

高血圧・心筋梗塞の発症・治療感受性遺伝子の診断支援システムの構築

●山崎 力¹⁾ ◆今井 靖²⁾ ◆森田 啓行³⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科クリニカルバイオインフォマティクス研究ユニット 2) 同 循環器内科 3) ハーバード大学医学部

〈研究の目的と進め方〉

心血管病は環境要因と遺伝的素因が複雑にからみ合って発症する。したがって同じ環境要因に曝露されてもそれに対する感受性には大きな個人差が存在し、その個人差は多種の遺伝子における遺伝子変異または多型性によりもたらされると考えられている。また心臓血管疾患に用いられる主要な薬剤の治療効果についても大規模臨床試験で示されているものの、反応性に個人差が大きく、その恩恵にあずかる症例は必ずしも多くはない。

我々は本研究においてこのような環境要因、治療介入に対する反応性を規定する遺伝素因の相違を臨床像と対比して明らかにすることを目的としている。しかしながら、実地臨床で経験される症例は、背景因子、環境要因のばらつきが非常に大きいため、個々の症例に関する網羅的な臨床情報の集積が必要と考えられる。そこで我々は臨床疫学および日常臨床のいずれにも対応する臨床データベース構築を行い、その情報と心臓血管系に関連する遺伝子群の多型性との対比的な解析を行うことにより、有用な疾患、治療感受性マーカーを同定することとした。我々のこのようなアプローチは個人の遺伝的危険因子を同定し個別の生活指導や薬剤選択を行う個別化医療の基盤となる。

〈研究開始時の研究計画〉

東大病院循環器内科では診療電子端末とは独立して、1999年より心臓カテーテル検査を施行した全患者を対象に臨床データの体系的ファイリングを施行している。集められる臨床情報は患者の基本情報および一般検査所見に加え、治療薬の投薬履歴、心臓カテーテル検査時の定量的冠動脈造影(QCA)データ、心臓の冠動脈形成術手技記録、血管内超音波検査データ、脈波伝達速度なども含まれており、単なる疾患発症の有無のみならず、定量的な動脈硬化の進展度と遺伝子多型との関連についても検討可能な状況にある。本研究を開始するときの段階において約2000例の臨床情報が集積されており、また研究利用のために採取されてきた遺伝子検体は約1200に達していた。

すでに集積された臨床情報および遺伝子検体の解析を実施するが、平行してデータベースの再構築とさらなるデータ集積を行う必要がある。

(1) 既存の診療データベースの再構築と新システムの樹立

入院実績からは年間800例の新規症例が加わり、またすでに登録された症例の時系列的な経過情報が加わることを考慮すると、システムを再構築する必要がある。そのためには複雑な病歴管理システム、統計処理ソフトを運用できる、処理能力の高いコンピューターサーバーが必要であり導入を検討する。

また病院の診療端末からは臨床情報をデータベースに自動的に移動、格納する体制にないために、診療カルテにもとづいてマニュアル入力をせざるをえない状況にある。したがって、システム、メーカーも異なる病院診療

端末からのデータ移送についての体制づくりが必要である。またデータベース内で統計解析が行える付加的機能を搭載する。

(2) 取り扱う臨床データおよびその処理

治療(処方)に対する反応性 例えは心筋梗塞に対する冠動脈拡張療法後の再狭窄率や心機能の評価を画像情報とともに保存する。

発症前の危険因子および環境要因・生活習慣、発症後の臨床イベントの頻度・重症度、活動度や生命予後といった多彩な情報をファイリングする。

また治療反応性からの観点では、薬剤服薬履歴は非常に重要である。診療の現場では患者の病態にあわせて投薬が頻回に変更されるため、リアルタイムに治療内容を集積させるシステムおよびデータ収集を構築する体制が必要である。

ドロップアウトあるいは紹介元に戻された患者および生存・死亡確認といった予後情報についても電話連絡、手紙調査もあわせて実施することで患者のリアルタイムの現状把握に努め、データベースに反映させる。

(3) 心血管疾患発症および治療反応性を規定する遺伝的素因の開明

集積された、あるいはこれから集積を行う臨床情報を基盤として、心臓血管病との関連性が示唆される多数の遺伝子に着目し、それらの遺伝子変異・多型を検索する。その変異、多型頻度と、心血管病の発症・重症度または治療反応性との関連性を検討し、それらと強く関連する遺伝子マーカーを同定する。環境因子に対する感受性を規定する因子を割り出し、早期により強力な生活習慣の是正をおこなうべき症例の峻別を可能にする。

(4) 遺伝子情報を踏まえた個人のリスク、予後評価と患者への還元

蓄積されたデータをふまえ、同じようなリスクを有する患者では、治療法Aであればどのくらいの治療成功率で、治療後の活動性はどこまで回復が見込めるか、また内服薬はどの程度必要か、治療法Bであればどうかといった内容を患者に提示できる。個別の診療行為を多数の症例の中で位置づけることを可能にするデータ構築を取るようし、当診療科の担当医師および可能であれば患者さん自身へリアルタイムの情報還元を行う。

〈研究期間の成果〉

(1) データベースの改良・再構築とデータ集積

東大病院循環器内科において心臓カテーテル検査を施行した全患者を対象に臨床データの体系的ファイリングを行い、延べ3000症例以上の臨床情報が集積された。予後に関する情報として定期的なカルテ調査および手紙法による患者の現状調査を実施し、データベースに反映させた。

データベースのシステム面についてはデータ収集に関して病院の診療用端末からのデータ転送について整備を行い、病院全体の診療情報管理を行う医療情報部から定期的に血液検査、処方などの診療情報を我々のデータベ

ース内に移送する体制が整い、現在定期的にデータ更新を行っている。また心臓血管疾患においては血管造影、超音波検査などと画像情報を多く取り扱う診療科であるため、画像情報についてもデータベース化を行うこととし、心臓カテーテルおよび冠動脈形成術については主要画像、動画をデータベースに格納するシステムを構築した。

また実際の疫学統計などを行うための統計処理機能をパッケージし、さまざまな時相で入院する循環器症例を、例えば初回入院時と半年後のデータを投薬内容毎に比較を行うといった解析が、データベース内で自動処理できるシステムを構築した。

(2) 心血管疾患発症および治療反応性を規定する遺伝的素因の開明

心臓血管疾患の発症を規定する可能性のある遺伝子に関する解析については、全ゲノムにわたる網羅的な解析を行うアプローチと候補遺伝子を選出し解析する候補遺伝子アプローチとがあるが、我々の研究規模においてはゲノムワイドの解析は実施困難と判断し、心臓血管系との関連性が期待される遺伝子群を約50種類前後選出し遺伝子多型、変異解析を行うこととした。

候補遺伝子の選出にあたっては、すでに文献的に病態との関連がよく知られるもののほかに、我々の研究室にて同定または機能解析を行った遺伝子を加えた。特に vasorin は signal sequence trap 法にて発現クローニングにて得た新規タンパク質で、TGF β との結合活性があり、この遺伝子の過剰発現で動脈硬化巣形成が抑制されること、また病的組織、幼弱な組織で過剰発現することをすでに示している。

また候補遺伝子選出にあたり実際の動脈硬化病変形成時に発現が誘導または抑制される遺伝子が重要と考えられたため、心臓外科と共同で大動脈瘤手術の際に切除される大動脈瘤および近傍の正常大動脈組織から messenger RNA を抽出して、DNA chip またはマイクロアレイを用いて網羅的に発現遺伝子プロファイリングを実施した。その解析においては特に matrix metalloproteinase ファミリーが重要であることが分かったが、そのなかで選出された遺伝子についても多型、変異研究に用いた。

遺伝子解析においては、本学ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会の審議を受け、承認を受けたのちに文書にて同意の得られた症例から集められた約1500例の遺伝子検体を用いた解析を実施した。また当院のみでの採取では健常者の遺伝子検体が得られないため関連病院との提携の上、サンプリングし、それらも解析に加えた。

遺伝子解析については本研究費により購入した Roche 社 LightCycler および ABI 社 multicapillary sequencer, Applied Biosystem 社 TaqMan PCR を用いて実施した。

解析を行った候補遺伝子を以下に示す。

<遺伝子多型解析を実施した候補遺伝子>

ACE	angiotensinogen
AT1 receptor	CYP11B2
BKBR2	ET1
endothelial NOS	GPIIa
GPIb	beta fibrinogen
Prothorombin	PAI-1
Paraoxonase 1	paraoxonase 2
Werner helicase	MTHFR
Methionine synthase	p22phox

CD14	stromelysin
Lipoprotein lipase	apolipoprotein E
CETP	ANP
hOGG1	ABCA1
PPAR gamma	leptin receptor
B3 adrenergic receptor	UCP1
Prostacycline synthase	MCP-1
Glutathione S transferase	CYP2C9
Klotho	heme oxygenase 1
AT2 receptor	NPR-C
ADRB1	ADRB2
BNP	CSX (Nkx2.5)
BMP2	adiponectin
KLF5 (IKLF,BTEB2)	vasorin
Ftl1	Flk1

それらの中で疾患および病態との関連性が認められた遺伝子多型について詳述する。

<A> ABCA1 遺伝子多型が日本人において HDL コレステロール濃度を規定する

ABCA1 遺伝子は HDL 欠損症および低下症の原因遺伝子であるが、欧米からの報告では R219K, M823I 多型が HDL コレステロール濃度と相関し、それを介して動脈硬化性疾患発症に関連すると従来より報告が認められる。我々は日本人を対象に検討を行ったところ各遺伝子多型の頻度が欧米と大きく異なること、M823 多型の保有者では有意に HDL コレステロールが高いこと、そしてそれは糖尿病、肥満などの他の修飾因子とは独立していることを明らかにした、一方、R219K 多型は HDL 濃度および疾患との関連性は否定的であった。

 matrix metalloproteinase (MMP) が心血管病形成に重要

我々は大動脈瘤手術で得られた動脈硬化性大動脈組織における遺伝子発現プロファイリングの解析のなかで、動脈硬化形成に MMP family が重要な役割を果たすことを確認した。また文献的には心筋梗塞は動脈硬化のプラークの破綻による血栓形成がその病態であるとされているが、プラーク破綻に MMP が大きく関与することが知られている。それらを受けて、特に MMP1, MMP3 のプロモーター多型について着目し解析を行った。心筋梗塞発症に関して検討を行ったところ、MMP1 との関連性はみいだされなかったが、MMP3 の多型が心筋梗塞発症に関連し、そのオッズ比が 1.8-2.0 であることが示された。また冠動脈形成術治療反応性として循環器領域での有力な治療法 PTCA の最大の障壁である再狭窄についてその遺伝的背景について検討を加えたところ、やはり MMP3 遺伝子多型が冠動脈形成術後の再狭窄率と関連することが示された。このことから循環器領域において診断・治療において MMP3 遺伝子多型性のタイピングの有用性が非常に高いことが示唆された。

<C> β 2 アドレナリン受容体と心筋梗塞との関連性

β 2 アドレナリン受容体については海外では気管支喘息の発症および β 作動性気管支拡張薬の薬効との関連で着目されている遺伝子である。我々は血管拡張性および糖代謝との関連を含めて、循環器疾患発症との関連性を検討したところ、虚血性心疾患全体とは関連性は認められなかったものの、心筋梗塞発症と強い相関が認められた。ほかの冠危険因子で補正しても関連性が認められることから、遺伝子多型と疾患発症との間の関連性についてのさらなる検討は必要であるが、心筋梗塞発症リスク評価項目の一つとして有用であると考えられた。

<D> KLF5 と動脈硬化性疾患との関連

動脈硬化組織における血管平滑筋の活性化・脱分化に関与する転写因子としてKLF5/BTEB2が知られる。我々はKLF5のノックアウトマウスを樹立したが、ホモは胎生致死であったため、正常に発育するhetero接合体を用いて解析したところ、KLF5の遺伝子抑制により心臓血管系のリモデリングが抑制されることが示された。この遺伝子について直接シーケンス法により多型について新規のSNPを8個検出し、その一部が心臓疾患発症および冠動脈形成術後再狭窄に関連する可能性が示された。

<E>アディポネクチン遺伝子と心臓血管疾患との関連

循環器疾患発症の危険因子である糖尿病、高血圧、高脂血症などはインスリン抵抗性という基盤のもとに生じるがその抵抗性を改善する物質としてアディポネクチンが知られる。この遺伝子多型が冠動脈疾患の重症度、脂質糖代謝系と関連することが判明した。

<F>薬剤反応性を規定する遺伝子多型性

薬剤感受性についてはACE阻害薬の咳嗽の副作用について着目しACE、アンギオテンシン受容体、ブラジキニン受容体の多型について検討をしたが有意に副作用と関連するものは認められなかった。現在、 β 遮断薬およびwarfarin代謝との関連性に着目し、CYP2D6, CYP2C9, VKORC1遺伝子多型についての検討を追加している。

<G>単一遺伝子疾患における遺伝子解析

循環器疾患の大半は虚血性心疾患に代表される多因子疾患であるが、一部には肥大型心筋症、拡張型心筋症、QT延長症候群などの単一遺伝子疾患があり、それに該当する症例については原因遺伝子検索を実施してきた。我々は、家族性心臓粘液腫の症例においてPRKAR1A遺伝子異常を見出した。

(3) 遺伝子情報を踏まえた個人のリスク、予後評価と患者への還元

蓄積された臨床情報については、病院内の院内専用ホームページにてデータの一部の開示およびユーザーが検討項目を入力すると統計値が呈示されるといった情報公開を開始し、患者さんの病状説明などにも活用されている。

いまのところ、遺伝子情報を患者さん本人に返却することはおこなっていないが、近々、薬剤代謝酵素のCYP2D6, CYP2C9の多型については希望する患者さんに還元する予定である。

<国内外での成果の位置づけ>

欧米人と日本人では遺伝子多型・変異の頻度は大きく異なり、また生活環境を含めた環境要因には非常に大きな差異が存在する。したがって本邦独自の検討が必要となり、国内においても多数の施設で精力的に検討が進められている。しかしながら我々のように包括的な臨床情報のフェイリングと多数の遺伝子多型との間で環境要因を含めた遺伝子多型の臨床的意義の検討を行おうとする試みは本邦においても少なく、その臨床的意義は大きい。とくに包括的な臨床データベース構築については、医学雑誌、商業雑誌などに掲載され、国内外からの多数の見学希望者が来院されており、その関心の高さが伺える。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

健常人での遺伝子収集が進まず、現時点では朝日生命成人病研究所との共同研究によりコントロール群を設定せざるを得なかった。また遺伝子研究においてはcase control研究の型式で解析を行ったが、背景因子が若干異なるため、その補正の必要性が多く、より背景のそろっ

た集団での前向き研究の実施が今後に残された課題である。

また薬剤投与などに伴う効果判定、あるいは心臓血管イベントといった予後との関連性に関する研究はまだまだ途上にあり、有意な関連性を見出すに至らなかった。今後データがさらに集積した段階で再度解析を考慮する。

<今後の課題>

疾患感受性あるいはその中間形質としての検査データと遺伝子多型との間で検討を加えるとともに、心血管病治療の予後、反応性についても引き続き包括的臨床データベースと遺伝子多型との間で統計解析を実施する予定である。

本邦独自のSNPと臨床像との対比研究とそのデータ集積が必要であり、特に薬剤応答性、環境因子感受性を含めた綿密な臨床データ収集を継続して行っていく。既報のSNPに関して昨年度同様、遺伝子解析を継続すると共に心血管系において重要な役割を果たすと考えられる遺伝子群に着目して遺伝子多型解析を行い、新たな病態修飾因子の同定を目指す。

さらに我々の解析で得られた有用な遺伝子マーカーのデータについて患者への還元をいかに行うかその条件作りと手法について整備する必要がある。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. Hayashi D, Imai Y, Morita H, Fujita H, Monzen K, Harada T, Nojiri T, Yamazaki T, Yamazaki T, Nagai R. Development of a pioneering clinical support system utilizing information technology. *Jpn Heart J* 2004;45:315-324.
2. Taketani T, Imai Y, Morota T, Maemura K, Morita H, Hayashi D, Yamazaki T, Nagai R, Takamoto S. Altered patterns of gene expression specific to thoracic aortic aneurysms: microarray analysis of surgically resected specimens. *Int Heart J* 2005;46:265-277.
3. Amaki T, Suzuki T, Nakamura F, Hayashi D, Imai Y, Morita H, Fukino K, Nojiri T, Kitano S, Hibi N, Yamazaki T, Nagai R. Circulating malondialdehyde modified LDL is a biochemical risk marker for coronary artery disease. *Heart* 2004;90:1211-3.
4. Hara K, Ohe K, Kadowaki T, Kato N, Imai Y, Tokunaga K, Nagai R, Omata M. Establishment of a method of anonymization of DNA samples in genetic research. *J Hum Genet* 2003;48:327-330.
5. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003;278:2461-8.
6. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:415-9.
7. Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, Manabe I, Nagai R. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the

transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res* 2004;95:146-153.

8. Hayashi D, Kudoh S, Shiojima I, Zou Y, Harada K, Shimoyama M, Imai Y, Monzen K, Yamazaki T, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:310-319.

9. Ikeda Y, Imai Y, Kumagai H, Nosaka T, Morikawa Y, Hisaoka T, Manabe I, Maemura K, Nakaoka T, Imamura T, Miyazono K, Komuro I, Nagai R, Kitamura T. Vasorin, a transforming growth factor beta-binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *Proc Nat Acad Sci* 2004;101:10732-7.

10. Shindo T., Manabe I, Fukushima Y, Tobe K, Aizawa K, Miyamoto S, Kawai-Kowase K, Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura K, Sata M, Hirata Y, Komukai M, Kagechika H, Kadowaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nature Med* 2002;8:856-863.

11. Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost* 2001;85:226-230.

12. Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Saito A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003;92:181-6.

13. Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* 2003;169:105-112.

14. Imai Y, Taketani T, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Kawanami D, Monzen K, Hayashi D, Murakawa Y, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Takamoto S, Nagai R. Genetic analysis in a patient with recurrent cardiac myxoma and endocrinopathy. *Circ J* 2005;69:994-5.

2) データベース/ソフトウェア 特記事項なし

3) 特許など 特記事項なし

4) その他顕著なもの 特記事項なし