

脳卒中の遺伝素因解明に向けた網羅的アプローチ

●加藤 規弘¹⁾ ◆小林 祥泰²⁾ ◆並河 徹²⁾

1) 国立国際医療センター研究所 2) 島根大学医学部

<研究の目的と進め方>

本研究においては、①脳卒中をサブタイプ—無症候性脳硬塞および有症候性脳血管障害—に分類し、互いに比較しながら疾患感受性遺伝子の関与を各々明らかにすること、②高血圧に関する感受性遺伝子の探索結果を考慮することにより、脳卒中がその二次的影響なのか、あるいは血圧とは独立した、脳卒中“固有の”感受性遺伝子が存在するのかを分子遺伝学的手法により明らかにすること、を目的とする。

研究計画としては、大まかに、(1)臨床病型間比較に基づく関連解析と、(2)既知の生理的機序等に基づく候補遺伝子アプローチ、さらに(3)モデル動物を用いた疾患感受性遺伝子の探索を進める。

<2007年度の研究の当初計画>

脳卒中という成因的に“ヘテロ”な疾病カテゴリーを対象として感受性遺伝子を探索するために、(1)臨床病型間比較に基づく関連解析と(2)既知の生理的機序等に基づく候補遺伝子アプローチ、(3)モデル動物を用いた疾患感受性遺伝子の探索を進める。

(1)臨床病型間比較に基づく関連解析のデザイン

本研究では脳ドック受診者中のMRI所見正常者を「対照群」と位置付ける。我々は無症候性脳硬塞に関して既に130候補遺伝子の関連解析を行っており、本研究では、同様に有症候性臨床病型を200名ずつ相互比較しながら、対照群との間で関連解析を行っていく。

(2)既知の生理的機序等に基づく候補遺伝子アプローチ

標的となる遺伝子の選出に際しては、主に2つの研究アプローチを並行して推進する。①機能的候補リストの選出：130候補遺伝子に関しては、既に598個のtag-SNPを設定しており、さらに随時、候補リストに追加しtag-SNPを設定していく。②芽球化リンパ球を用いた網羅的発現解析：viableな状態で脳組織を入手することは困難なため、本研究では代替法として末梢血リンパ球を芽球化した状態で試料として用い、罹患者群とsuper-normal群（高齢で脳血管障害を呈していない人々）との間でマイクロアレイ法による発現比較を行う。

(3)モデル動物を用いた脳卒中の感受性遺伝子探索

脳卒中の成因および病態を解析するためのモデル動物として、脳卒中易発症自然高血圧発症ラット（stroke-prone spontaneously hypertensive rat: SHRSP）を用いる。同モデル動物において、逆相遺伝学的手法により脳卒中の感受性遺伝子探索を進める。

<2007年度の成果>

大規模候補遺伝子スクリーニングを行い、脳硬塞感受性候補遺伝子を9個同定した。さらに、既報の脳梗塞（ラクナ梗塞）の感受性遺伝子PRKCHの追試を行い、同遺伝子多型の日本人でのリ

スク上昇を確認した。

罹患者に関する臨床病型間比較とともに、正常コントロールとしては、島根難病研究所脳ドック受診者中のMRI所見正常者を用いており、遺伝子解析への同意の得られた被験者数（対照群）は既に1300名に達し、さらに継続収集している。

また、本研究では新規候補遺伝子を選出する一アプローチとして、モデル動物（自然高血圧発症ラットSHRおよびその重型である脳卒中易発症SHR）を用いた基盤研究を進めている。我々は食塩負荷時の血圧上昇を規定する主要な遺伝子座をラット染色体1番と3番上に見出しており、それら2染色体領域のコンジュニクシステムの作成を進めた。これらの系統でのポジショナルクローニング、および食塩負荷、薬物負荷時の組織レベルでの発現ネットワーク探索として大規模なDNAマイクロアレイ解析を行い、いくつかの鍵遺伝子候補を同定できた。

<国内外での成果の位置づけ>

国内外では、これまで、機能的に有望な候補遺伝子多型と脳卒中の発症ないし頸動脈肥厚などの中間疾病形質（intermediate phenotype）との遺伝的関連が繰り返し検討されてきたが、報告間で必ずしも一致した結果は認められていない。一般に、統計学的検出力を高めるためにサンプル規模を大きくすれば、様々な臨床病型を同一のグループとして扱ってしまうことになりがちである。また機能的に有望な既知の遺伝子だけでは疾患感受性遺伝子を十分に網羅できていないという議論もある。

そこで我々は、脳卒中のなかでも特に遺伝的均一性が高いといわれるサブタイプ—無症候性脳硬塞（ないし深部白質病変）—に先ず着目し、その罹患者と脳ドック正常者との間で厳密な遺伝的関連を検討してきた。本研究では、さらに、機能未知ないし注目されていない標的遺伝子を選出する手法として、脳卒中のモデル動物（脳卒中易発症SHR）での分子遺伝学的研究成果、および芽球化したリンパ球を用いた罹患者-正常者間の遺伝子発現プロフィールの比較解析結果も活用する計画である。

脳という臓器の特殊性（ヒトの病態に絡んだ試料入手が実質的に不可能なこと）を鑑み、これらはいずれも現実的なアプローチであり、上述したような当該分野の論点（特に病態との関連が示唆されたSNPの機能的意義の検証が困難な点など）に対する一定の解答を提示しうる点で研究意義が大きい。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

異なる病型間の遺伝素因を比較探究していくための新たなパネル（脳卒中のサブタイプ・パネル）の作成に関しては、なかなか思うように収集症例数を伸ばすことができないでいる。

脳卒中という疾病の性質上、急性期を何とかしのいで病態が一旦、慢性化した後は、リハビリ等の長期療養指導が主体となる。

様々なサブタイプの罹患者を収集するためには、相当数の急性期脳血管障害患者をケアしている必要があるとともに、フォーマット化した臨床データ収集を進めていくためには、急性期治療を受け持つ医師個人においても相当な動機付けが必要である。

<今後の課題>

脳卒中は、減塩指導の普及や新たな高血圧治療薬の開発とともに、重症脳出血が激減したことにより、その死亡率は大幅に低下した。しかし、「予知・予防医療」という視点から、個人人の体質に合わせて効率的なケアを施せないかという社会的需要が大きい。

そこで本研究では、①平成19年度までの知見をさらに展開するため、脳卒中急性期患者をケアする専門医療機関群で収集する大規模な脳卒中サブタイプ・パネル間での比較検討を行っていく計画である。また②機能未知ないし注目されていない標的遺伝子を選出する手法として、脳卒中のモデル動物（脳卒中易発症 SHR）での分子遺伝学的研究成果も活用する計画である。加えて、予防医学的見地からも我が国における重要性が特に高い、脳卒中の関連病態（深部白質病変、peri-ventricular hyperintensity）にも注目して、最新の実験技術を用いたゲノムワイドな解析を進めている。

<成果公表リスト>

1) 論文／プロシーディング

1. 0801291810

Jesmin, S., Maeda, S., Mowa, C.N., Zaedi, S., Togashi, H., Prodhan, S.H., Yamaguchi, T., Yoshioka, M., Sakuma, I., Miyauchi, T., Kato, N.: Antagonism of endothelin action normalizes altered levels of VEGF and its signaling in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat., 574(2-3), 158-171 (2007)

2. 0801291726

Takeuchi, F., Serizawa, M., Kato, N.: HapMap coverage for SNPs in the Japanese population., J. Hum. Genet., 53(1), 96-99 (2008)

3. 0801291713

Serizawa, M., Nabika, T., Ochiai, Y., Takahashi, K., Yamaguchi, S., Makaya, M., Kobayashi, S., Kato, N.: Association between PRKCH Gene Polymorphisms and Subcortical Silent Brain Infarction., Atherosclerosis, Dec 28 (2007) [Epub ahead of print]

2) データベース／ソフトウェア

1. 0602201822

JMDBase (Japan Metabolic Disease Database)

<http://www.jmdbase.jp>

代謝性疾患（心血管合併症を含む）のデータベースとして、独自に開発整備した SNP 情報等を公開している。今後、疾病ゲノム解析の成果も加えて「統合データベース」として拡張していく予定である。