

高血圧感受性遺伝子群の同定

●三木 哲郎¹⁾ ◆小原 克彦¹⁾ ◆名倉 潤¹⁾ ◆田原 康玄²⁾

1) 愛媛大学大学院医学系研究科生命多様性医学講座加齢制御内科学 2) 愛媛大学大学院医学系研究科統合医科学講座

<研究の目的と進め方>

申請者らは、ミレニアム・プロジェクト～高血圧等循環器疾患感受性遺伝子解析グループにおいて、約8万個のSNPと約2万個のマイクロサテライトとを用い、ゲノム網羅的に高血圧感受性遺伝子の探索を行ってきた。一方、候補遺伝子アプローチからは、シグナル伝達系に焦点を絞って約300遺伝子をゲノム網羅的に抽出し、1遺伝子あたり1つのSNPを選択して高血圧感受性遺伝子のスクリーニングを進めてきた。

本研究では、候補遺伝子アプローチの成果を基盤としたさらなる相関解析から高血圧感受性遺伝子を同定するとともに、その疾患発症に対する影響力をゲノム疫学的なアプローチから明確化することを目的とする。併せて、疾患感受性遺伝子を同定することで疾患発症のあらたなパスウェイの解明を目指す。

<2008年度の研究の当初計画>

これまでに、網羅的に選択した約300個の候補遺伝子を1次スクリーニングした結果として38個の陽性SNPを得た。1次スクリーニングは、厳密な基準で全国から収集した700例ずつの高血圧/正常血圧サンプルを用いて行った。高血圧群(758例)の平均年齢は59±11歳であり、約67%が降圧薬を服用していた。平均収縮期血圧は164±25mmHg、拡張期血圧は100±16mmHg、BMIは24±3kg/m²であった。一方、正常血圧群(726例)の平均年齢は63±9歳であり、平均収縮期血圧は116±12mmHg、拡張期血圧は72±8mmHg、BMIは23±3kg/m²であった。各サンプルのゲノムDNAは、全ゲノム増幅した後にパネル化し、SNPタイピング、タイピング結果のデータベース化、相関解析がシームレスに行えるように整備されている。通常の2次スクリーニングでは、同規模以上の独立したケース/コントロールサンプルを用いるのが定石であるが、高血圧は多因子疾患であり、低い遺伝浸透率や高い表現型模写といった特徴を鑑みて、14,000例を超える大規模集団サンプル(地域・職域集団由来)を用いて2次スクリーニングを進めた。このサンプルは、日本有数のゲノム疫学コホートを統合したものであり、5～10年程度の経年的な臨床データや心血管系イベントの発症データなどが整っている。

一連の研究成果として、再現性をもって高血圧と強い相関を示す2つの遺伝子が得られている。このうち遺伝子Aについては、1次スクリーニングサンプルで10⁻⁵レベル、2次スクリーニングサンプルを含めると10⁻¹¹レベルの極めて強い相関を示したことから、当該遺伝子の機能ドメインを含むエクソン10のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、血圧値や血管内皮機能との関係などについて検討を進めることとした。

一方、2つめの候補遺伝子は、前駆型心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)を切断し活性型ANPを産生するセリンペプチダーゼCORINであり、これまでに黒人を中心として幾つかのアミノ酸置換を伴うSNPが高血圧や心肥大と相関することが報告されている。CORINと高血圧との相関について、十分な遺伝子解析はなされてこなかったことから、周辺領域にあるSNPの網羅的

解析により疾患感受性を検討することとした。

これらの成績を含め、これまでに世界的に報告されてきた疾患感受性遺伝子解析研究の成果は、いずでも断面的に疾患との相関をみたものが殆どである。そこで同定された2つの候補遺伝子や、既報告の高血圧感受性候補遺伝子、ならびに肥満などの関連疾患の感受性遺伝子について、大規模集団サンプルを用いたゲノム疫学的な長期縦断解析から、環境因子の交絡を調整した上で疾患の新規発症との相関を明確化することとした。

併せてゲノム疫学コホートの更なる拡大と臨床情報の充実とを目的に、共同研究機関との協働でさらなるサンプリングを進めることとした。

<2008年度の成果>

遺伝子Aについては、これまでに再現性をもって10⁻¹¹レベルの相関を示すSNPを同定している。14000例の集団サンプルを用いた検討から、このSNPは調整済み収縮期血圧で3mmHgに相当した。信頼性の高い検査値に裏付けられた大規模サンプルにおいて、平均収縮期血圧で3mmHgの低下は脳卒中死亡率9.6%(約14,000人)、罹患者数では約30,000人の減少に比例することから、当該SNPの臨床的意義が以下に大きいかが伺える。

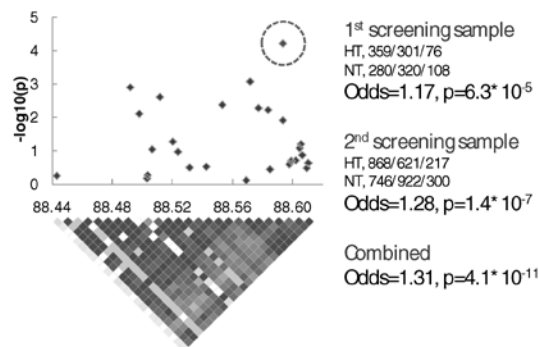


図1 遺伝子Aと高血圧との相関

遺伝子Aのコンディショナルノックアウトマウスが得られ、順調に繁殖している。さらなる繁殖を待って、血管内皮等、臓器特異的にCre酵素を発現するマウスと掛け合わせることで当該遺伝子と血圧との相関について検討する予定である。

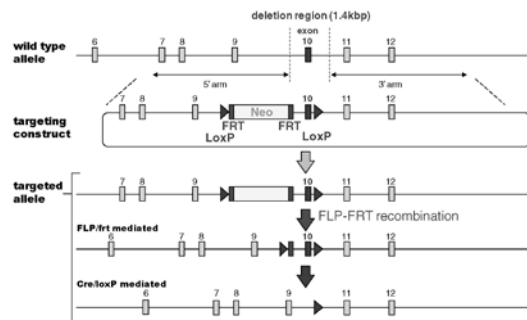


図2 コンディショナルKOマウスのターゲティング略

CORIN 遺伝子について、HapMap データベースを参照し、周辺領域約 200kb の SNP について 700 例ずつの高血圧/正常血圧サンプルを用いて検討したところ、CORIN 遺伝子領域で高血圧との緩やかな相関を認めた。しかし、その相関は 10^{-3} レベルであり統計の多重性を考慮すると有意な相関とはならなかった。

高血圧の新規発症に関するゲノム疫学的長期縦断研究の成績を図 3 に示す。2002 年度の断面解析で個々には高血圧と相関しなかった 12 個の候補 SNP も累積することで緩やかに高血圧と相関した。この断面解析で得られた相関は、縦断的な検討で平均 9.3 年間の高血圧新規発症とより強く相関した。

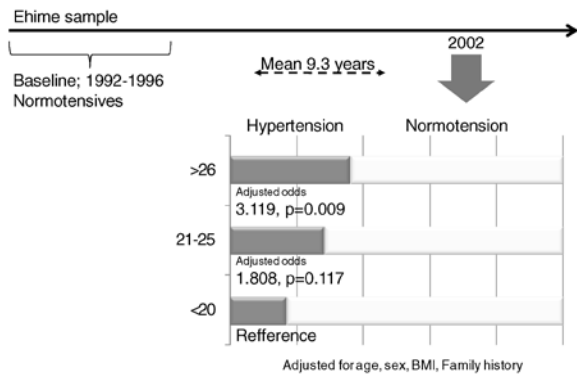


図 3 SNPの累積と高血圧新規発症に関する長期縦断研究

同様の相関は FTO 遺伝子 rs9939609 と肥満との相関においても認められ、断面解析で認められた相関 (TT 23.2 ± 3.2 , TA 23.7 ± 3.2 , AA 24.4 ± 3.2 kg/m², $p=2.5 \times 10^{-6}$) は、長期縦断検討から肥満の新規発症とも有意に相関した (表 1)。

表 1 FTO rs9939609と9.4年間の肥満新規発症との相関

	Odds ratio (95% C.I.)	p value
Age (years at entry)	0.968 (0.953-0.982)	<0.001
BMI (kg/m ² at entry)	3.128 (2.673 -3.705)	<0.001
FTO genotype		
TT	reference	
TA+AA	1.462 (1.040 -2.050)	0.028

<国内外での成果の位置づけ>

多因子疾患の感受性遺伝子解析研究においては、単なる相関解析のみならず、多くの臨床情報を用いたゲノム疫学的な取り組みが必要である。この遺伝疫学 (ゲノム疫学) 的アプローチを実現するには、多くの精緻な臨床情報を持つ大規模な集団サンプルが必要不可欠である。その点、申請者が有する 14,000 例超のサンプルは、日本有数の疫学コホートを統合したものであり、その規模ならびに臨床情報の豊富さからみて、我が国に類を見ず、世界的にも有数のサンプルといえる。また、本報告書で示したように、横断面のみならず経年的に蓄積した臨床データから長期縦断的な検討も可能であることは特筆に値する。

シグナル伝達系を中心に網羅的な感受性遺伝子解析から同定した遺伝子 A はと高血圧との相関は、世界的なこれまでの報告と比較しても再現性のある点で信頼性が高く、また統計学的有意性も最も強い。集団サンプルで認めた平均 3mmHg の血圧差は、脳卒中の発症で 1 万人以上の差を生むことから、当該 SNP の臨床的意義は極めて大きいといえる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

高血圧感受性を示した遺伝子 A について、公共データベースの情報に基づいた周辺領域の SNP 解析はほぼ終了した。我々は、SNP 解析において高いスループットを実現するために TaqMan 法を採用しているが、当該領域において方法依存的に解析不可能な SNP が少なからずあり、そのタイピング・感受性解析が課題として残されたままである。遺伝子 A 上で最も強い相関を示した SNP は、菅野らの完全長 cDNA データベースを参照すると転写開始点付近に位置していたが、GC リッチな領域であるためリ・シーケンスを含めた SNP 解析や機能解析が技術的に頓挫している。遺伝子産物をターゲットとした病態解析については、実験系の設定が困難であったが、コンディショナル KO マウスが得られたことより、高血圧の病因解明につながるものと基地される。

<今後の課題>

遺伝子 A をターゲットとした病態解明を進めるとともに、あらたな高血圧感受性 SNP のスクリーニングを進める。

<成果公表リスト>

- 0901162020
Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R, Onuma H, Shimizu I, Miki T, Kohara K, Makino H. Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. Diabetes. 2008 in press.
- 0901162025
Tamaki S, Nakamura Y, Tabara Y, Okamura T, Kanda H, Kita Y, Kadowaki T, Tsujita Y, Chowdhury Turin T, Horie M, Miki T, Ueshima H. Association between polymorphism of the AGTR1 and cardiovascular events in a Japanese general sample (The Shigaraki Study). Int J Cardiol. 2008 in press.
- 0806271156
Ueno T, Soma M, Tabara Y, Tokunaga K, Tahira K, Fukuda N, Matsumoto K, Nakayama T, Katsuya T, Ogihara T, Makita Y, Hata A, Yamada M, Takahashi N, Hirawa N, Umemura S, Miki T. Association between fatty acid binding protein 3 gene variants and essential hypertension in humans. Am J Hypertens. 2008;21:691-695.
- 0806271205
Mashimo Y, Suzuki Y, Hatori K, Tabara Y, Miki T, Tokunaga K, Katsuya T, Ogihara T, Yamada M, Takahashi N, Makita Y, Nakayama T, Soma M, Hirawa N, Umemura S, Ohkubo T, Imai Y, Hata A. Association of TNFRSF4 gene polymorphisms with essential hypertension. J Hypertens. 2008 May;26(5):902-13.
- 0901162036
Tabara Y, Kawamoto R, Osawa H, Nakura J, Makino H, Miki T, Kohara K. No association between INSIG2 Gene rs7566605 polymorphism and being overweight in Japanese population. Obesity (Silver Spring). 2008 Jan;16(1):211-5.