

全ゲノム罹患同胞対連鎖解析及び候補遺伝子関連解析による心筋梗塞感受性遺伝子の同定

●横田 充弘¹⁾ ◇井澤 英夫²⁾ ◇成憲武³⁾

1) 愛知学院大学歯学部 2) 藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院 3) 名古屋大学医学部

<研究の目的と進め方>

目的： ①心筋梗塞 (MI)・冠動脈疾患 (CAD) 罹患同胞対を対象としたゲノムワイド罹患同胞対連鎖解析により、MI責任遺伝子座を同定し、②その領域内に存在する遺伝子 (多型) について症例-対照関連解析を実施し、MI感受性遺伝子を同定すること。③症例-対照関連解析の結果から得られたMI感受性遺伝子多型を他の大規模症例-対照集団で、有用性を確認する。

進め方： MI・CAD罹患同胞対 (227対、457例) を対象として、405個のマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド連鎖解析 (GWLS) を実施し、5染色体の6領域に候補連鎖領域を得た。1領域以外の5領域は、他の論文で報告されていない。さらに、この内の3領域 (LOD>2.2) に20マーカーを追加、設定し、連鎖領域の確認と狭小化を実施した。なお、この解析で得られた max. peak LOD score=2.9である。

2 番染色体候補連鎖領域に約 3,000 SNPs (一塩基多型) を設定し、高密度 SNP タイピングを MI 症例、対照各約 500 例で実施し候補感受性遺伝子 A (特許出願準備中及び論文作成中のため、遺伝子名及び SNP 情報を明らかにできない) を特定した ($p<0.000001$)。さらに、約 4,000 例の大規模関連解析を実施し、MI 感受性遺伝子 A を同定した (特許申請中、論文準備中)。

さらに、MI 感受性遺伝子を同定するための大規模ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を「応用ゲノム」及び「基盤ゲノム」支援班に申請中である。

信頼性の高い大規模症例-対照研究 (横断研究) を実施するための研究基盤を確立した。また、縦断研究コホートとして、健康管理体制の確立した企業従業員コホート (NGK 研究、NCT00408824) 及び北名古屋市住民コホート (北名古屋ゲノム疫学研究: KING Study, NCT00262691) を構築し、遺伝子リスクマーカー、HOMA-IR 及びアディポネクチン、レジスチン等のアディポサイトカインを含むバイオリスクマーカーを包括した MI、メタボリックシンドロームをはじめとした生活習慣病の包括的リスク診断アルゴリズムの検証的前向き研究が平成 16 年から進められている (2005~7 年度科学研究費補助金 (日本学術振興会) 基盤研究 (A))。

<2008 年度の研究の当初計画>

MI 罹患同胞対を対象としたゲノムワイド連鎖解析で得られた 6 染色体候補領域の内の 1 番染色体候補領域に関して、高密度 SNPs 解析を実施し、2 番染色体候補領域と同様の手法で、MI 感受性遺伝子の同定を図る。

現在までに、国内外から報告された MI 感受性遺伝子に関して、逐次、大規模関連解析により再現性研究 (replication study) を実施している。有意な遺伝子に関して、我々の報告してきた MI 感受性遺伝子とともに、地域住民を対象とした前向き研究で信頼

性を検証する。

現在、GWAS の研究支援を申請中である。受理されれば、GWLS と GWAS が同時に可能となり、1) SNP を用いた連鎖解析の実施と、マイクロサテライトを用いた連鎖解析との比較、2) 遺伝的素因の強い罹患同胞対症例と孤発例との感受性遺伝子の同定性、3) 連鎖領域に位置する遺伝子の同時並行相関解析の実施、など、遺伝学的にも興味深い多面的な解析が可能になると考える。

<2008 年度の成果>

MI・CAD 罹患同胞対 (227 組、457 例) を対象として、405 個のマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド連鎖解析 (GWLS) を実施し、5 染色体の 6 領域に候補連鎖領域を得た。このうちの 3 領域 (LOD>2.2) に 20 マーカーを追加設定し、連鎖領域の確認と狭小化を行った。この解析により 2 番染色体に peakLOD score=2.9 の領域を認めた。

この領域に 3072SNPs (一塩基多型) を設定し、MI 症例および対照各約 500 例を用い、高密度 SNP タイピングを実施し、関連解析により、MI 感受性候補遺伝子 ALMS1 を同定した ($P<0.000001$)。

現在、ALMS1 遺伝子の候補遺伝子多型 3SNPs に関して、MI 症例約 1000 例、対象約 3000 例を用いて大規模関連解析を実行中である。

また、信頼性の高い大規模症例-対照研究 (横断研究) を実施するための研究基盤を確立した。また、縦断研究コホートとして、健康管理体制の確立した企業従業員コホート (NGK 研究、NCT00408824) 及び北名古屋市住民コホート (北名古屋ゲノム疫学研究: KING Study, NCT00262691) を構築し、遺伝子リスクマーカー、HOMA-IR 及びアディポネクチン、レジスチン等のアディポサイトカインを含むバイオリスクマーカーを包括した MI、メタボリックシンドロームをはじめとした生活習慣病の包括的リスク診断アルゴリズムの検証的前向き研究が平成 16 年から進められている (2005~7 年度科学研究費補助金 (日本学術振興会) 基盤研究 (A))。

<国内外での成果の位置づけ>

国外を中心に家系資料を用いた冠動脈疾患連鎖解析や、冠動脈疾患のゲノムワイド関連解析 (GWAS) の報告はなされているが、日本人を対象とした MI 罹患同胞対連鎖解析や GWAS の報告は少ない。我々が同定した領域は、過去に報告されたものとは異なっており、日本人固有の MI 感受性遺伝子を同定できる可能性がある。現在候補として同定された ALMS1 遺伝子も、冠動脈疾患との関連を示した報告はなく、新規の MI 感受性遺伝子として遺伝子リスク診断に活用できる可能性がある。日本人規模集団を用

いた解析により、日本人固有の疾患感受性遺伝子多型を同定することが、将来の日本人を対象とした予防医療にとって重要である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

この種の研究において、横断研究及び縦断研究コホートの確立は極めて重要である。しかし、このために必要な研究費は極めて少ない。

<今後の課題>

MI 罹患同胞対を対象としたゲノムワイド連鎖解析で得られた6染色体候補領域の内の1番染色体候補領域に関して、高密度SNPs解析を実施し、2番染色体候補領域と同様の手法で、MI感受性遺伝子の同定を図る。

現在までに、国内外から報告されたMI感受性遺伝子に関して、逐次、大規模関連解析により再現性研究 (replication study) を実施している。有意な遺伝子に関して、我々の報告してきたMI感受性遺伝子とともに、地域住民を対象とした前向き研究で信頼性を検証する。

MI・CAD罹患同胞対も含めたGWASを行い1) SNPを用いた連鎖解析の実施と、マイクロサテライトを用いた連鎖解析との比較、2) 遺伝的素因の強い罹患同胞対症例と孤発例との感受性遺伝子の相同性、3) 連鎖領域に位置する遺伝子の同時並行相関解析の実施、など、遺伝学的にも興味深い多面的な解析が可能になると考える。

<成果公表リスト>

論文

1. 0811131207: Cheng, X.W., Murohara, T, Kuzuya, M., Izawa, H., Sasaki, T., Obata, K., Nagata, K., Nishizawa, T., Kobayashi, M., Yamada, T., Kim, W., Sato, K., Shi, G-P., Okumura, K., Yokota, M. : Superoxide-dependent cathepsin activation is associated with hypertensive myocardial remodeling and represents a target for Angiotensin II type 1 receptor blocker treatment. *The American Journal of Pathology*, 173(2), 358-369 (2008)
2. 0801181241 : Tomita, Y., Nakatochi, M., Asano, H., Izawa, H., Yokota, M., Honda, H.: Investigation of the relationship between sample size and risk factors for complex diseases based on a simulation study. *Chem-Bio Informatics Journal*, 7(1), 1-11 (2007)
3. 0704241555 : Cheng, X.W., Kuzuya, M., Nakamura, K., Maeda, K., Tsuzuki, M., Kim, W., Sasaki, T., Liu, Z., Inoue, N., Kondo, T., Jin, H., Numakuchi, Y., Okumura, K., Yokota, M., Iguchi, A., Murohara, T.: Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in MMP-2-deficient mice. *Circulation Research*, 100, 904-913 (2007)
4. 0701301739 : Cheng, X. W., Kuzuya, M., Nakamura, K., Di, Q., Liu, Z., Sasaki, T., Kanda, S., Jin, H., Shi, G-P., Murohara, T., Yokota, M., Iguchi, A: Localization of cysteine protease, Cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with Integrin $\alpha v \beta 3$. *American Journal of Pathology*, 168(2), 685-694 (2006)
5. 0701301740 : Nagata, K., Obata, K., Xu, J., Ichihara, S., Noda, A., Kimata, H., Kato, S. T., Izawa, H., Murohara, T., Yokota, M:

Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension*, 47, 656-664 (2006)

6. 0702020944 : Cheng, X. W., Obata, K., Kuzuya, M., Izawa, H., Nakamura, K., Eri Asahi, Nagasaka, T., Saka, M., Kimata, T., Noda, A., Nagata, K., Jin, H., Shi, G-P., Iguchi, A., Murohara, T., Yokota, M: Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure. *Hypertension*, 48, 979-987 (2006)
7. 0702020948 : Tomita, Y., Asano, H., Izawa, H., Yokota, M., Kobayashi, T., Honda, H.: Classification method for predicting the development of myocardial infarction by using the interaction between genetic and environmental factors. *Transactions on Bioinformatics*, 47, 48-66 (2006)

特許

1. 0801151320 : 動脈硬化性疾患のリスク検査法及びリスク検査用キット (特願2007-305320) H19.11.27出願
2. 0811131235 心筋梗塞のリスク検査方法 (特願2008-053196) H20.3.4出願
3. 0806131724 : 冠動脈攣縮のリスク検査法 (特願2008-155306) H20.6.13出願
4. 0811131235 心筋梗塞のリスク検査法 (特願2008-190409) H20.7.24出願
5. 0811131245 メタボリック症候群又は心血管疾患のリスク検査法及びリスク検査用キット (特願2008-209757) H20.8.18出願

共同研究

九州大学生体防御医学研究所ゲノム機能制御学部門：山本健先生
 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学：井ノ上逸朗先生
 名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科学：室原豊明先生、新谷理先生、浅野展行先生、谷村大輔先生
 名古屋大学医学部附属病院検査部：平敷安希博先生
 愛知学院大学歯学部内科学：松原達昭先生、成瀬桂子先生