

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、2000年からのミレニアム・プロジェクトにおいて、約8万個のSNPならびに約2万個のマイクロサテライトを用いて、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。それと平行して、シグナル伝達系に関わる約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を選択して感受性SNPのスクリーニングを行ってきた。

候補遺伝子のスクリーニングには、700例ずつの高血圧/正常血圧サンプルを用いた。十分なサンプル数とはいえないが、世界的に見ても中規模のデザインといえる。スクリーニングでは、p値を5%に設定した。比較的緩やかな基準とすることで、偽陰性を除外するように工夫した。その結果、約38個の候補遺伝子が選別された。通常のスクリーニングでは、別のケース/コントロールサンプルを用いて、これら候補遺伝子の有意性を再確認する方法が定石であるが、高血圧は多因子疾患であるため、その低い遺伝浸透率や高い表現型模写といった特徴を鑑み、2次スクリーニングは、14,000例を超える大規模サンプル（地域・職域集団由来）で行った。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。

本研究では、この大規模集団サンプルで再現性の確認されたSNPについて、周辺領域のファインマッピングや機能解析を行うとともに、解析する候補遺伝子の範囲をさらに広げていく。最終的には、高血圧発症とゲノム情報との関連を、直線的な相関ではなく、臨床情報を加味したネットワークとして捉える試みを進めていくことを考えている。

<2007年度の研究の当初計画>

現在、解析を進めている約38個の候補遺伝子、引き続き周辺領域のファインマッピングや機能解析を行っていく。加えて、あらたに選別した40個程度の候補遺伝子についても、ケース/コントロールサンプルを用いて解析を進めていく。具体的な計画は以下の通りである。

共同研究機関の協力を得て収集した約700例ずつのケース/コントロールサンプルを解析に用いる。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、タイピング、データ化、解析がシームレスに行えるように整備されている。

上記とは別に収集した48例のサンプルを用い、必要に応じてエクソンやプロモーター領域を中心にシーケンスを行い、公共データベースに収載されていないSNPを探索する。その上で、公共データベースの情報も含めてハプロタイプを構築し、タグと

なるSNPの選択を行う。

有意性の確認されたSNPについて、ルシフェラーゼアッセイ等により機能性を確認する。一部のサンプルでは、Bリンパ球を不死化しており、それを利用した発現解析も同時に行っていく。

<2007年度の成果>

約300個の候補遺伝子からスクリーニングされた11遺伝子(11SNP)について、周辺領域の更なる検討から高血圧と最も強く相関した遺伝子Aについて、ファインマッピングを継続して行った。遺伝子A上で最初にスクリーニングされたSNP-1の統計学的有意性は、アレル頻度で $p=0.052$ （オッズ比=1.13）、ジェノタイプ頻度で $p=0.071$ であった。このSNPを中心に、前後50kbの範囲でファインマッピングを行ったところ、約9000bp上流により強く高血圧と相関するSNP-2を見いだした。アレル頻度での検討では $p=9.7 \times 10^{-5}$ （オッズ比=1.28）、ジェノタイプ頻度での検討では $p=0.001$ であった。大規模集団サンプルで検証したところ、種々の交絡因子を調整した重回帰分析でも、SNP-2は血圧に対して独立した説明変数となった。このとき、収縮期血圧に対する有意性は、リスクアレルのヘテロ型で $p=3.0 \times 10^{-4}$ 、ホモ型で $p=2.6 \times 10^{-7}$ であった。血圧値とはステップワイズな相関が認められ、ヘテロ型では平均収縮期血圧で1.5mmHg、ホモ型では3.0mmHgの上昇を認めた。そこで、このSNP-2の周辺領域をさらに探索したところ、さらに20kb下流に、より強い有意性を示すSNP-3を見いだされた。アレル頻度での検討では $p=1.2 \times 10^{-5}$ （オッズ比=1.32）、ジェノタイプ頻度での検討では $p=8.9 \times 10^{-5}$ であった。当該領域には2つの連鎖不平衡ブロック（LDブロック）が観察され、SNP-1, 2, 3を含むブロックでは、これら以外に3つのSNPで 10^{-3} 以下のp値を認めた。また、このLDブロックはプロモーター領域までカバーしていたことから、本年度は当該領域を中心に約20個のSNPについて検討したところ、 10^{-6} レベルの相関を示すSNP-4（オッズ比=1.37）を見いだされた。このSNPは、菅野らの完全長cDNAプロジェクトにより決定された転写開始点の近傍に位置していた。そこで転写開始点近傍を中心に5SNPを公共データベースよりピックアップして高血圧との相関をみたところ、いずれも有意な相関（アレル頻度で $p=0.004 \sim 0.022$ ）は示すものの、SNP-4以上に強い相関は認められなかった。

このSNP-4について、14,000例の集団サンプルで検討したところ、高血圧（SBP 140mmHg以上 and/or DBP 90mmHg以上 and/or 降圧薬服用）に対する粗オッズ比は、ヘテロ型で1.15（1.02-1.29）、ホモ型で1.23（1.09-1.38）であった。年齢、性、BMIを調整した検討では、それぞれヘテロ型、ホモ型のオッズ比は、それぞれ1.18（1.03-1.35）、1.30（1.13-1.48）であった。さらに、中性脂肪、血糖、HDLコレステロール、喫煙、日本酒換算飲酒量などの高血圧の主なリスク因子を調整した上でも、SNP-4は高血圧の独立した危険因子であった。一方、血圧レベルでみると、遺伝子多型ごとの平均収縮期血圧（降圧薬服用者含む）は129.4

± 19.2, 131.3 ± 19.7, 132.4 ± 20.0 mmHg ($p=8.6 \times 10^{-7}$) と、アレルあたりおよそ 1.5 mmHg の上昇と相関した。拡張期血圧については、同様に 77.4 ± 11.1, 78.3 ± 11.6, 79.0 ± 11.9 mmHg とアレルあたりおよそ 0.75 mmHg の上昇と相関した。

健康日本 21 のガイドラインでは、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 3 mmHg 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が示されている。また、申請者らの検討では、加齢 (1 歳) の高血圧に対するオッズ比が 1.08 であったことから、SNP-4 は 3 歳の加齢に相当すると計算される。これらのことは、当該 SNP の臨床的意義がいかに大きいかを証明する知見といえる。

遺伝子 A には幾つかのアイソフォームがあるが、このうちユビキタスに発現している遺伝子 A4 についても同様に高血圧との相関を検討した。連鎖不平衡を加味しつつ選択した 17 個の tagSNP について相関解析を行ったところ、最も強い相関を示した SNP の有意性は、アレル頻度で $p=0.047$ 、ジェノタイプ頻度で $p=0.086$ であった。両遺伝子産物の細胞内での機能は同様であるが、その発現部位 (作用点) が異なるため、遺伝子 A のみで高血圧との相関が認められても不思議ではない。

遺伝子 A ではオルタネートスプライシングがあることが予てより報告されている。骨格筋と心筋でスプライシングバリエントが観察されているが、白血球では検討されておらず、また臨床所見との相関も報告されていない。そこで末梢血由来白血球を EB ウィルスで形質転換し、培養後に抽出した mRNA から合成した cDNA を用いてスプライシングバリエントの有無について検討した。独立した 55 検体について検討したが、いずれにおいてもスプライシングバリエントは認められなかった。

<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、申請者らが有する 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、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。一方、疾患 / 対象研究においては、厳密な基準で収集した 700 例ずつの高血圧 / 正常血圧サンプルを収集しており、これに前述の集団サンプルからの抜粋分を加えると、1100 例ずつのセットが構築され、高感度な感受性遺伝子のスクリーニングが可能である。

シグナル伝達系を中心に網羅的な感受性遺伝子解析を行った。従来の検討は、1 つの遺伝子、あるいは 1 つの生物学的パスウェイ上の遺伝子群を対象としたものであり、本研究のような網羅的な検討はなされていない。また従来の検討の多くは、小規模な患者対照を用いた相関研究であり、高血圧のように個々の関連遺伝子の影響力が弱い疾患では統計学的なパワーが不足していた。その点、本研究では、スクリーニングの候補遺伝子を選択する際にマイナーアレル頻度の低いものを除外し、かつ大規模なケース / コントロールサンプルで検討するなどの工夫を行うとともに、大規模集団サンプルで再現性が確認することで信頼性の高い成果が得られた。有意性を示した SNP の周辺領域を探索して得られた、最も強い感受性を示す SNP は、集団サンプルで 3mmHg の血圧

差を示した。小規模なサンプルでの検討では、データのバラツキから大きな血圧差を示すことがあるが、このように大規模なサンプルで 3mmHg の差を示した SNP は今までに報告されておらず、この SNP の高血圧感受性は極めて高いといえる。また、集団の平均値として 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 は、臨床的意義もかなり大きいといえる。

<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ファインマッピングはほぼ終了した。SNP 解析では、少量の DNA で、高効率で正確な分析が要求される。我々は、高いスループットを実現するために、TaqMan 法を用いて解析を行っているが、全ての SNP について万能ではない。そのため解析不可能な SNP が少なからず発生している。また、転写開始点付近で高血圧と強い相関を認めたことから、当該領域の再シークエンスを含めた更なる検討を進めたが、DNA 配列からシークエンスが上手く機能せずに頓挫している。この点は、ルシフェラーゼアッセイについても同様であり、遺伝子の機能解析が進まない要因となっている。さらに、遺伝子産物の機能についても、現段階で測定系が確立しておらず、この点もこれからの大きな課題といえる。この課題を克服する一助として、現在、ノックアウトマウスを作成しており、実験動物学的に当該遺伝子と血圧との相関を検討していく予定である。

<今後の課題>

遺伝子 A およびその産物 (タンパク質) の機能解析を進めて血圧との相関を明らかにするとともに、別に有意性を示した遺伝子の解析を進めることで、高血圧の遺伝的背景の明確化を目指す。

<成果公表リスト>

- 0801281235
Kato N, Miyata T, Tabara Y, Katsuya T, Yanai K, Hanada H, Kamide K, Nakura J, Kohara K, Takeuchi F, Mano H, Yasunami M, Kimura A, Kita Y, Ueshima H, Nakayama T, Soma M, Hata A, Fujioka A, Kawano Y, Nakao K, Sekine A, Yoshida T, Nakamura Y, Saruta T, Ogihara T, Sugano S, Miki T, Tomoike H. High-Density Association Study and Nomination of Susceptibility Genes for Hypertension in the Japanese National Project. *Hum Mol Genet.* 2007 in press
- 0801281239
Nakamura Y, Tabara Y, Miki T, Tamaki S, Kita Y, Okamura T, Ueshima H. Both angiotensinogen M235T and alpha-adducin G460W polymorphisms are associated with hypertension in the Japanese population. *J Hum Hypertens.* 2007;21:253-255.
- 0801281241
Kohara K, Tabara Y, Nakura J, Imai Y, Ohkubo T, Hata A, Soma M, Nakayama T, Umemura S, Hirawa N, Ueshima H, Kita Y, Ogihara T, Katsuya T, Takahashi N, Tokunaga K, Miki T. Systemic multiple candidate gene approach for identification of susceptible genes and susceptible pathways for hypertension: A Millennium Genome Project for Hypertension. *Hypertension Res.* In press