

# 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<sup>1)</sup> ◆井澤 英夫<sup>2)</sup> ◆小幡 孝二<sup>1)</sup>

1) 愛知学院大学歯学部 2) 名古屋大学大学院医学系研究科

## <研究の目的と進め方>

1. 研究目的： ①心筋梗塞・冠動脈疾患罹患同胞対を対象としたゲノム全域罹患同胞対連鎖解析により、心筋梗塞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）について大規模症例—対照関連解析を実施し、心筋梗塞感受性遺伝子を同定すること。

2. 研究計画： ①臨床情報データベース及びゲノムDNAバンクの構築： 信頼性の高い症例—対照研究を実施するための情報基盤を確立した。20,000例以上の心筋梗塞・冠動脈疾患、糖尿病、高血圧症を含む疾患群、及び対照群として病院受診者だけでなく、健康管理体制の確立した企業従業員からのサンプル収集（約5,400例）を完了した（NCT00408824）。また、平成17年5月末から、名古屋市近郊の西春町の50歳以上の住民を対象とした前向きコホート研究の一環として、現在までに約2,800例のサンプル収集が行われた。同町は合併により北名古屋市に移行し、本年度中には約4,000名のサンプル収集を予定している。同市でのサンプル収集の目標は6,000例であり、その後少なくとも10年間継続観察される（北名古屋ゲノム疫学研究、KING study, NCT00262691）。②心筋梗塞・冠動脈疾患罹患同胞対サンプル収集： 公的45病院の参加を得て、サンプル収集をしている。現在238組収集した。300組を目標に収集する。③マイクロサテライトタイピングとノンパラメトリック連鎖解析： 対象を全対象、少なくとも1名が心筋梗塞である同胞のみ、罹患同胞対すべてが心筋梗塞の同胞のみの3群に分類して、連鎖解析を実施する。当初、405マイクロサテライトマーカーを用いてタイピングするが、連鎖候補領域が存在した場合、その領域に関してより密なマーカーを設定しタイピングする。

## <2007年度の研究の当初計画>

心筋梗塞・冠動脈疾患罹患同胞対 222対 457名を対象としたゲノム全域に亘るマイクロサテライトタイピングを「基盤ゲノム支援班」（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）の研究支援を得て進めている。

- 1) 405個のマイクロサテライトマーカー（ヘテロ接合性：平均75.6%、マーカー間の距離：平均8.7cM）を用いたタイピングにより5染色体6領域に連鎖候補領域を得た。これらの領域は、中間成績で得た成績（東京大学医学研究所、現東海大学：井ノ上逸朗先生）とほぼ一致していた。
- 2) 連鎖候補6領域のうち、連鎖の高い3領域に20マイクロサテライトマーカーを追加して、連鎖解析を実施した結果、LOD値の上昇を認めた。
- 3) 得られた3領域の内の1領域に関して、3072 SNPsを用いた高密度SNPタイピングを実施し、心筋梗塞500例、対照500例を対象とした症例—対照関連解析を行う（スクリーニング研究）。有

意なSNPsに関して大規模症例—対照関連解析を実施し、心筋梗塞感受性遺伝子の同定を図る。本研究は基盤ゲノム支援班「情報解析および成果効果のための支援活動」の研究支援を得て実施されている。

## <2007年度の成果>

①臨床情報データベース及びゲノムDNAバンクの構築： 信頼性の高い症例—対照研究を実施するための情報基盤を確立した。20,000例以上の心筋梗塞・冠動脈疾患、糖尿病、高血圧症を含む疾患群、及び対照群として病院受診者だけでなく、健康管理体制の確立した企業従業員からのサンプル収集を行った（約5,400例、NCT00408824）。平成17年5月から実施している名古屋市近郊の50歳以上の住民健康診断受診者を対象とした前向きコホート研究（北名古屋ゲノム疫学研究、KING study, NCT00262691）もサンプル収集が実施されている。

②心筋梗塞・冠動脈疾患罹患同胞対サンプル収集： 公的45病院の参加を得て、サンプル収集をしている。平成18年度までに238組収集した。

心筋梗塞・冠動脈疾患罹患同胞対（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を実施し、5染色体6領域に候補連鎖領域を得た。1領域以外の5領域は、国内外の他の論文で未だ報告されていない。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を設定し、高密度SNPタイピングを心筋梗塞症例、対照各約500例で実施し、有力な心筋梗塞候補遺伝子Aを発見した。現在、約4,000例以上の大規模関連解析を実施している。他の候補連鎖領域に関しても、同様に、大規模関連解析を実施する計画である。

## <国内外での成果の位置づけ>

本研究は、①質的にも量的にも優れた大規模集団を対象として可及的多数の候補遺伝子を選択し、症例—対照関連解析により、心筋梗塞をはじめとする冠動脈疾患、高血圧症等の感受性遺伝子を包括的に同定すること、②冠動脈疾患については、罹患同胞対を対象としてゲノム全域にわたるマイクロサテライトタイピング及び連鎖解析を実施し、染色体候補領域を同定し、新規感受性遺伝子の発見を試みること、③遺伝子—環境因子相互関係の解明、及び性別、リスクファクターの有無別に層別化解析を実施し、心筋梗塞をはじめとする冠動脈疾患の総合的リスク診断アルゴリズムを開発すること、④地域住民を対象とした前向きコホート研究により開発された遺伝子リスク診断アルゴリズムの妥当性を検証すること、⑤最終的には、各個人個人の遺伝子情報に基づいた

冠動脈疾患の総合的・包括的予防システムを開発すること、⑥感受性遺伝子（多型）の機能解析を行い、創薬ターゲットを設定すること、を研究戦略として進められている。このような心筋梗塞・冠動脈疾患についての包括的研究は世界に類を見ない。

我々は、既に、恐らく現時点で我が国最大の心筋梗塞罹患同胞対及び孤発症例の試料及び臨床情報データベースを構築している。さらに、症例—対照関連解析では、症例だけでなく対照も極めて重要であるが、1万例以上の対照試料を保有しており、バイアスを最小限にした対照例の選択が可能である。今までに各国から報告された研究よりも、より興味深い結果が得られると考えている。また、日本人固有の心筋梗塞感受性遺伝子の同定も可能と考えている。最終的に実施する大規模症例—対照関連解析により、確実にエビデンスを提供できるものと考えている。

大規模な検体を有するばかりでなく、臨床情報も揃っており、ゲノムワイド症例—対照関連解析ができれば、得られるリスク遺伝的多型と生活習慣との相互作用解明へと研究を進展させることが現実的に可能であり、有意義な成果が得られるものと確信している。

#### <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>

現在までに、国内外から報告された心筋梗塞・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心筋梗塞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、ゲノムワイド症例—対照関連解析の研究支援を申請中である。受理されれば、ゲノムワイド連鎖解析とゲノムワイド症例—対照関連解析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>

##### 特許

- 081151320 : 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

##### 論文

- 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)
- 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)

- 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)
- 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)
- 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)
- 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)

#### 研究支援及び研究協力

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  
名古屋大学院医学系研究科循環器内科学：室原豊明先生、浅野展行先生  
愛知学院大学歯学部内科学：松原達昭先生、成瀬桂子先生