

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 高血圧関連疾患に関する多面的なゲノム疫学研究
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

### 研究代表者

加藤 規弘 (国立国際医療センター研究所遺伝子診断治療開発研究部 部長)

### 主たる共同研究者

並河 徹 (島根大学医学部 教授)

深水 昭吉 (筑波大学大学院生命環境科学研究科 教授) (~平成 19 年 3 月)

三木 哲郎 (愛媛大学医学部 教授)

荻原 俊男 (大阪大学大学院医学系研究科 教授) (~平成 19 年 3 月)

勝谷 友宏 (大阪大学大学院医学系研究科 講師)

藤岡 晨宏 ((財)尼崎健康医療事業財団 常務理事)

小林 祥泰 (島根大学医学部附属病院 病院長)

猿田 享男 (慶応大学 名誉教授) (~平成 19 年 3 月)

寺本 民生 (帝京大学医学部 教授)

### 3. 研究内容及び成果

本研究課題(「高血圧関連疾患に関する多面的なゲノム疫学研究」)では、最も高頻度な多因子疾患である高血圧、およびその関連疾患に関して、ヒトでの遺伝素因の探究と、モデル動物を活用した基盤的知見の収集および homolog の(ヒトにおける)検証を行った。

本研究は、①解析対象とする遺伝子座と SNPs の選出に関する部分(コンジュニクプラットフォーム、SNP データベース構築、転写調節因子解析の3つのサブグループから成る)と、②コホート研究体制及びゲノム疫学研究のデザインに関する部分(尼崎研究および島根研究を含む5つのサブグループから成る)とに大別される。以下、項目ごとに研究成果を記す。

#### ヒトでの高血圧遺伝素因の探究

候補遺伝子アプローチ:既報の候補遺伝子及び生理的役割から候補と考えられる遺伝子を合わせて162個選出し、日本人での多型情報をカバーするために、550 kb超のゲノム断片を48人分re-sequencingした。その結果、2229 SNPsを同定して、これらを対象に候補遺伝子のassociation studyを行った。

高血圧では、尼崎研究の被験者より、1191 名(543 cases 対 648 controls)を選出して、150 遺伝子、1436 SNPs を typing した。1191 名の case-control 群間比較で有意な P 値(Armitage's trend test で  $P \leq 0.01$ )を示した 11 SNPs に関して、次に、連続的に収集した 5736 名(うち 4978 名が高血圧治療を受けていないもの)での QT 解析を行ったところ、4 つの SNPs で性特異的に血圧との有意な association の傾向が認められた。

脳梗塞では、島根研究の被験者より、1001 名(無症候性脳梗塞 [SBI] 320 名、有症候性皮質下梗塞 [SSI] 184 名、MRI 上病的所見のない control 497 名)を選出して、131 遺伝子、535 SNPs を 2-stage 法(SBI 群を 2 段階に分けて解析)にて typing したところ、6 SNPs に関して、disease status との有意な association の傾向を認めた。また、別施設の GWAS にて同定され、最近、報告されたラクナ梗塞の感受性遺伝子 PRKCH に関して、島根研究の被験者での追試を行い、有意な association を replicate できた。

また、高血圧に関連した心血管病の危険因子として、(生活習慣の1つである)飲酒、及び血中脂質レベルに関する SNP 解析を行った。アルコール反応性(飲酒行動と血圧への影響)に関して 4 つの候補遺伝子を選出し、

10 tag SNPs を尼崎住民サンプル 5736 名で typing した結果、2 SNPs が飲酒行動を協調的 (synergistic) に規定しており、うち1つ (ALDH2 の Glu487Lys) は収縮期血圧との有意な association の傾向を示した。脂質代謝に関しては、14 の候補遺伝子を選出し、138 tag SNPs を、最初に尼崎の case-control panel 1191 名で typing し、有意な P 値を示した 5 遺伝子 (6 SNPs) に関して、さらに尼崎住民サンプル 5736 名での QT 解析を行った。その結果、ApoE の isoform と総コレステロール値の間、CETP Gly549Asp と HDL コレステロール値の間で有意な association ( $P < 0.0001$ ) が認められた。

GWAS (genome-wide association study) : 高血圧に関しては、ミレニアムプロジェクトの分担研究として、8万SNPs のJSNPスキャンの一部を分担した。一方、脳梗塞に関しては、島根研究の被験者サンプルを対象とした55万SNPsのGWASを本研究課題で立ち上げて進めている。

高血圧では、3 次スクリーニング (case 群対、非罹患者 control 群間の比較としては、2段階目のスクリーニング) として、尼崎研究の被験者全体より、2025 名 (619 cases vs. 1406 controls) を選出して 75 SNPs の追試目的の typing を行った。9 SNPs との有意な association の傾向を認め、特に3つの遺伝子 (ADD2、KIAA0789、M6PR) に関しては、re-sequencing 後に 25 tag SNPs を追加 typing し fine mapping した。さらに、未知の遺伝子 KIAA0789 に関しては、分子レベルでの機能解析とともに、トランスジェニックラット作成を通じた個体レベルでの血圧値への影響を検討中である。

脳梗塞では、55 万 SNPs を用いた 1 次スクリーニングとして、SBI 260 名と control 760 名 (MRI 上病的所見のないもの 260 名と healthy control 500 名) を解析対象としており、平成 20 年 2 月中には typing が終了する見込みである。同 1 次スクリーニングの結果に基づいて、島根研究のサンプル及び他施設のサンプルを合わせて、約 3000 名 (case、control とも 1500 名ずつ) での replication study を実施予定である。

## モデル動物

血圧のQTL解析: 高血圧自然発症ラット (SHR) およびその垂系である脳卒中易発症SHR (SHRSP) から、各々6系統と8系統のコンソミックラットを作成した。そのうち4つの染色体領域に関しては、コンジェニック化 (計32コンジェニック系統) による、QTLの推定存在範囲の絞り込みとマイクロアレイ法による遺伝子発現変動、さらにルシフェラーゼ・アッセイ等による機能的検証を行ってきた。

ラット染色体1番上には、3つの独立した血圧 QTL の存在することを解明し、各々の責任遺伝子候補を同定した。(いずれの遺伝子も血圧調節との関わりは未報告。) これらに関して、re-sequencing 後、尼崎サンプルでの association study を行ったが、高血圧との有意な association の傾向は認められていない。

薬物負荷に対する遺伝子発現変動: 代表的な降圧薬6種およびスタチンに関して、その降圧作用と臓器保護作用に影響する主要因子を探索するために、DNAマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現解析を行った。35Kのマイクロアレイで、脳、心臓、腎臓とともに、肝臓、脂肪組織での発現を調べたところ、組織 (臓器) 特異的な傾向をもって、薬物特異的な変動、血行動態に連動した変動を認めた。これらのなかから、ファーマコゲノミクスにおける候補遺伝子と考えられるもの (薬剤ごとに5-8個、及び薬剤間で重複したものから脳、心臓、腎臓の3標的臓器で12個を選出) に関して、re-sequencing及び培養細胞での機能的検証等に取り組んでいる。

## コホート研究

本研究課題において、重点的に整備し遺伝子解析研究の被験者として主に活用したのは、尼崎研究 (都市化した集団として、メタボリックシンドロームという観点から追跡調査を行うコホート) と島根研究 (脳ドック受診者および高齢者脳検診受診者を対象として追跡調査を行うコホート) の2つのコホートである。また国立国際医療センターでも平成 17 年より病院コホート研究を立ち上げ、その一部を第1項で述べた脳梗塞の GWAS の healthy

controlとして活用した。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本研究では、最も高頻度な多因子疾患である高血圧とその関連疾患に関して、ヒトでの遺伝素因の探索と、モデル動物を用いた基盤的知見の収集とヒト homolog の検証を行い、これらの疾患のテーラーメイド医療の進展に寄与することを目的とした。

ヒトでの遺伝素因の探索では、候補遺伝子アプローチとゲノムワイド関連解析を行い、1) 候補遺伝子アプローチでは、高血圧では尼崎研究の被験者についての検討から4つのSNPsで、脳梗塞では島根研究の被験者についての検討から6SNPsにおいて病態との有意な関連を認めた。2) ゲノムワイド関連解析では、高血圧において3つの候補遺伝子を得て、うち1遺伝子については機能解析の検討を開始した。モデル動物を用いた検討では、3) 高血圧自然発症ラット(SHR)、脳卒中易発症SHRから、各々6系統、8系統のコンソミックラットを作成し、うち4つの染色体領域に関してはコンジュニック化によるQTLの絞込みと機能解析を実施中である。ラットの1番染色体に関しては、3つの独立した血圧QTLの存在を確認し、夫々の責任遺伝子候補を同定した。また、薬物負荷に対する遺伝子発現変動についての検討では、候補遺伝子を選定して機能的検証を行っている。本研究では、尼崎、島根の両コホートと、平成17年に立ち上げた病院コホート(国立国際医療センター)を整備して活用している。

これらの多角的な取り組みから得られた研究成果は、32編の原著論文(及び63件の口頭及びポスター発表)として発表されている。現在実施中の検討が進展し、テーラーメイド医療に結びつく成果が早期に得られることを期待する。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

高血圧症の成因としては、多くの遺伝子の微妙な機能変化と環境要因の影響が挙げられているが、詳細は依然として不明である。同様の取り組みが諸外国でも行われているが、遺伝要因の特定では顕著な成果は未だ上がっていない。本研究では、整備した尼崎および島根コホートの被験者を対象とした候補遺伝子アプローチとゲノムワイド関連解析から高血圧および脳梗塞の病態と関連する多数のSNPsを抽出し、一部の遺伝子についてはその機能解析を開始した。これらの遺伝子が高血圧あるいは脳梗塞の発症にどのように関わっているかを明らかにすることが急務であろう。また、モデル動物による高血圧関連疾患の遺伝子解析が本研究での戦略の一つであり特色であるが、QTLの絞込みが進めば、責任遺伝子およびそれらのヒトとの関連が明らかになるものと期待される。

研究の基盤となるコホートおよび疾患ベースのSNPsデータベースの構築と整備は順調に進んでいる。この間、質の高い臨床情報を付与したサンプルを多数収集し、これらを活用して多数の遺伝子候補を同定したことは国際的にも高い評価を受けることが期待される。完成までに長期間を要する研究であるが、多面的な取り組みで着実に目標に向かって進んでおり、今後の進展が期待される。

##### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

高齢化が進む日本では、最も頻度の高い多因子疾患である高血圧およびその関連疾患の予防は医療経済学的にも極めて重要である。時間もかかり、複雑な解析を必要とする難しい研究課題であることから、目標の達成には更なる努力が必要であるが、常に研究戦略を見直しながら研究を推進し、テーラーメイド医療に早期に貢献することを期待する。