

## ゲノムワイドSNP解析による心筋梗塞関連遺伝子の単離

大西 洋三 田中 敏博

**要 旨**：心筋梗塞などの生活習慣病の発症や進展には、遺伝子多型が背景として存在すると考えられている (common disease-common variant仮説)。われわれは、心筋梗塞を対象に約10万カ所の一塩基多型 (SNP) を用いて、ゲノムワイドな相関解析を行った。その結果、心筋梗塞関連遺伝子としてLTA遺伝子領域を同定した。また、LTA結合タンパク上のSNPにおいても、心筋梗塞の発症と強い相関を認めた。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 175-178)

Key words: Myocardial infarction, SNP, Association study, Common disease

### 動 向

生命の設計図といわれるヒトゲノムの全塩基配列が明らかになったことにより、ゲノムプロジェクトはポストシーケンスというフェーズに入った<sup>1,2)</sup>。そこでは、ヒトの持つすべての遺伝子をまとめて網羅的に解析することが可能となり、従来の少数の分子を対象とした解析手法からのパラダイムシフトが起きている。

人間の外見、性格などは個人によって異なる。同じような生活習慣であっても、生活習慣病に罹患する人もいれば、罹患しない人もいる。さらには、同じ薬剤を服用しても、効果のある場合もあれば、逆に副作用のみが目立つ場合もあり、個々人によって反応が異なる。これらヒトの多様性は環境要因と遺伝要因が複雑に影響を及ぼしあって決定されているものと考えられる。この多様性を遺伝要因の面から規定しているのがDNA多型であり、common disease-common variant仮説に代表されるように、比較的罹患者数の多いcommon diseaseの遺伝的な背景として存在するという考え方が主流となっている。SNP (一塩基多型; single nucleotide polymorphism) は、ゲノム上で最も単純で最も数多く存在する多型であり、それらが遺伝子領域内に存在する場合、その遺伝子の機能や発現量、発現時期、発現の臓器特異性などに影響を及ぼし、疾患の病態に直接関わっている可能性が高い。これらの遺伝子領域内

SNPを網羅的に解析することにより、common diseaseの関連遺伝子(群)を単離することで、遺伝的側面を解明し、最終的には個々の遺伝子型に応じたオーダーメイド医療が可能となると考えられる。

心筋梗塞を含む循環器系の疾患は、日本人の死亡原因の第2位である。また、一般診療医療費の20%以上を占めている。危険因子を解明し、発症あるいは再発の予防につなげることが国民福祉の観点からも重要である。ところが、心筋梗塞に関しては、環境要因面での危険因子はある程度明らかになっている一方で、日本人の集団における遺伝的要因についてはこれまで大規模な解析は行われていなかった。海外での疫学研究としてはFrammingham heart studyが50年以上続いている非常に有名な研究であり、脂質代謝における危険因子の発見などに大きな役割を果たしてきている。しかしながら、遺伝的な側面を解明する多型解析研究に関しては患者数、有意差の程度(p値)などを考慮すると、信頼するに足る研究はこれまでになかったといつてよい。これまでの研究では、疾患関連候補遺伝子を絞って解析を行っていたのも、その一因であると思われる。

一方、ヒトゲノムの配列が明らかになるにつれ、SNPが数多く同定されてきている<sup>3)</sup>。SNPは他のDNA多型よりも解析が比較的容易であることから、他の生活習慣病と同様、心筋梗塞の発症に関連する遺伝子を同定する方法として、体系的、網羅的なSNP解析が注目

されている(ゲノムワイドアプローチ)。本稿では、心筋梗塞を代表とする虚血性心疾患の発症や病態にかかわる近年の遺伝子解析研究について、遺伝子多型解析研究を中心に述べる。

### 候補遺伝子アプローチ

心筋梗塞などの虚血性心疾患の発症に、血栓形成、血小板凝集、脂質代謝や交感神経の賦活などが重要な役割を果たしているという従来からの見地より、これらの機能に関与する遺伝子の多型と心筋梗塞の発症との相関解析が積極的に行われてきたが<sup>4-7)</sup>、大規模臨床試験やメタ解析において関連が疑問視されている遺伝子も多い<sup>8-10)</sup>。近年、心筋梗塞の基盤となる動脈硬化の発症や進展に炎症が重要な役割を果たしていることが示唆されてきたため、白血球やマクロファージの遊走能に関与する接着因子やサイトカインをコードする遺伝子が候補遺伝子として解析されている<sup>11-13)</sup>。また、冠動脈内プラークの安定性に関与すると考えられる細胞外マトリックスの形成に関与する遺伝子も重要な候補遺伝子である<sup>14)</sup>。

### ゲノムワイドアプローチ

他の多くの疾患と同様に、心筋梗塞についてもマイクロサテライトマーカーを用いた、ゲノムワイドな連鎖解析が行われている。Pajukantaらは、罹患同胞対を用いた連鎖解析にてchromosome 2q21.1-22とchromosome Xq23-26の心筋梗塞に関連する2つの関連領域を同定した<sup>15)</sup>。一方、Broeckelらは、513家族を対象とした連鎖解析にて14番染色体上に2つの心筋梗塞関連領域を同定した<sup>16)</sup>。また、Wangらは、15q26, 1p34-36の2領域を同定し、15q26についてはMEF2Aの変異が虚血性心疾患と関連していると結論付けている<sup>17,18)</sup>。

われわれは、遺伝子領域を中心に同定したSNP<sup>3)</sup>を用いて、大規模な相関解析を行った<sup>19)</sup>。この結果、染色体6p21上のSNPにおいて心筋梗塞の発症と有意な相関を認めた。このSNPを含む130kbについてさらに187SNPを同定し、詳細なSNPマップを作成した後、これらのSNPについて相関解析を行った。その結果、lymphotoxin- $\alpha$ (LTA)遺伝子上のイントロン1上のSNP(intron1 252A>G)およびエクソン3上に存在するSNP(exon3 804C>A; T26N)において有意な相関を認めた。さらに、intron1 252A>Gを含む33塩基のオリゴを用い

たルシフェラーゼアッセイの結果、intron1 252Gではintron1 252Aに比べ、LTAの発現量が多いことが示唆された。また、アミノ酸の変化を伴うSNP(exon3 804C>A)が、その遺伝子産物による冠動脈血管平滑筋細胞の接着因子発現量に影響を与えることが示唆された。LTAはサイトカインの一つであり、心筋梗塞の発症に炎症が大きく関与することが考えられる。さらに、われわれはLTAに結合するタンパクを検索し、ガレクチン2がLTAの結合タンパクであることを確認した。そして、ガレクチン2をコードする遺伝子のSNPを検索し、ケース・コントロールスタディにて、ガレクチン2遺伝子が心筋梗塞発症に関連することを発見した。さらに、ガレクチン2の発現量の低下がLTAの細胞外への分泌量を抑えることがわかり、LTAとガレクチン2との相互作用も解明した<sup>20)</sup>。これらの結果は、SNPを用いた大規模な相関解析が、生活習慣病の疾患感受性遺伝子を検索するために有用な方法であることを示している。

### 最後に

現在までに、心筋梗塞をはじめとする虚血性心疾患の発症や進展に関連するとされる遺伝子が数多く報告されている。しかし、その大部分は少人数での検討であり、後の大規模な検討で結果が否定されることが少なくない。心筋梗塞などの生活習慣病では、単一の遺伝子だけではなく、多くの遺伝子が発症や進展に関与していると考えられているため、一つ一つの遺伝子の相対危険度は2倍前後と考えられている。このような遺伝子(群)を検出するためには、単純計算で1,000人以上での検討が必要である。また、心筋梗塞の新たな発症機序を解明するためには、候補遺伝子(分子)を絞らない手法である、ゲノムワイド遺伝子解析が強力な武器となるであろう。

今後、より多くの患者を対象として網羅的・体系的な遺伝子解析を行うことにより、病態や薬剤応答性をより詳細に把握することが可能となり、最終的にはオーダーメイド医療の実現へとつながると考えている。

### 文 献

- 1) Lander ES, Linton LM, Birren B et al: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, **409**: 860-921.

- 2 )Venter JC, Adams MD, Myers EW et al: The sequence of the human genome. *Science*, 2001, **291**: 1304–1351.
- 3 )Haga H, Yamada R, Ohnishi Y et al: Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J Hum Genet*, 2002, **47**: 605–610.
- 4 )Holmer SR, Hengstenberg C, Kraft HG et al: Association of polymorphisms of the apolipoprotein(a) gene with lipoprotein(a) levels and myocardial infarction. *Circulation*, 2003, **107**: 696–701.
- 5 )Chen Q, Reis SE, Kammerer CM et al: Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet*, 2003, **72**: 13–22.
- 6 )Flavell DM, Jamshidi Y, Hawe E et al: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease. *Circulation*, 2002, **105**: 1440–1445.
- 7 )Heckbert SR, Hindorff LA, Edwards KL et al:  $\beta_2$ -adrenergic receptor polymorphisms and risk of incident cardiovascular events in the elderly. *Circulation*, 2003, **107**: 2021–2024.
- 8 )Keavney B, McKenzie C, Parish S et al: Large-scale test of hypothesized associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. International Studies of Infarct Survival (ISIS) Collaborators. *Lancet*, 2000, **355**: 434–442.
- 9 )Boekholdt SM, Bijsterveld NR, Moons AH et al: Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review. *Circulation*, 2001, **104**: 3063–3068.
- 10 )Sethi AA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A: Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 1269–1275.
- 11 )Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115–126.
- 12 )Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM et al: Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation*, 1999, **99**: 861–866.
- 13 )Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V et al: The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. *Hum Mol Genet*, 1998, **7**: 1277–1284.
- 14 )Beyzade S, Zhang S, Wong YK et al: Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **41**: 2130–2137.
- 15 )Pajukanta P, Cargill M, Viitanen L et al: Two loci on chromosomes 2 and X for premature coronary heart disease identified in early- and late-settlement populations of Finland. *Am J Hum Genet*, 2000, **67**: 1481–1493.
- 16 )Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B et al: A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nat Genet*, 2002, **30**: 210–214.
- 17 )Wang L, Fan C, Topol SE et al: Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science*, 2003, **302**: 1578–1581.
- 18 )Wang Q, Rao S, Shen GQ et al: Premature myocardial infarction novel susceptibility locus on chromosome 1P34–36 identified by genomewide linkage analysis. *Am J Hum Genet*, 2004, **74**: 262–271.
- 19 )Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A et al: Functional SNPs in the lymphotoxin- $\alpha$  gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*, 2002, **32**: 650–654.
- 20 )Ozaki K, Inoue K, Sato H et al: Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin- $\alpha$  secretion in vitro. *Nature*, 2004, **429**: 72–75.

## A Large-scale Gene-based SNP Association Study Identifies Genes as Susceptibility to Myocardial Infarction

Yozo Ohnishi and Toshihiro Tanaka

Laboratory for Cardiovascular Diseases, SNP Research Center, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Tokyo, Japan

---

**Key words:** Myocardial infarction, SNP, Association study, Common disease

Myocardial infarction (MI) has become one of the leading causes of death in the world. It is characterized by abrupt occlusion of coronary artery, resulting in necrosis of myocardium. Using a large-scale, case control association study with gene-based SNP catalog and a high-throughput genotyping system, we have identified *LTA* locus that were associated with susceptibility to MI. Furthermore, we have reported that SNP in *LGALS2* encoding galectin-2, that binds to *LTA* protein, is significantly associated with susceptibility to MI. We believe that the results of these studies provide an anchoring point for better understanding of the pathogenesis of MI. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 175–178)