

循環器疾患の疾患感受性遺伝子検索 本態性高血圧症を中心に

中山 智祥

要 旨：循環器疾患の疾患感受性遺伝子検索は単一遺伝子疾患の原因遺伝子単離に比べて困難を極めているが、全染色体を網羅するゲノムスキャン法など新しい方法も検討されるようになった。本稿では、筆者らが病態との関連を解析してきたプロスタサイクリン合成酵素(PGIS)遺伝子、ナトリウム利尿ペプチドA受容体(NPRA)遺伝子変異を取り上げ、新旧の方法論を比較し今後の心・血管病におけるゲノム医学の将来像について予見したいと思う。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 183-189)

Key words: Susceptibility genes, Cardiovascular diseases, Mutation, Polymorphism, Essential hypertension

序 言

本態性高血圧症、脳梗塞、心筋梗塞などの循環器疾患は多因子遺伝性疾患と思われるため、感受性遺伝子検索は単一遺伝子疾患の原因遺伝子単離に比べて現状では困難を極めている。近年ヒトゲノム配列解読完了と分子生物学的手法の向上とにより、全染色体を網羅する遺伝子マーカーを用いたゲノムスキャン法が可能となりその威力を発揮しつつある。その一方で、遺伝子座や責任遺伝子・責任変異が判明したとしても、それらが遺伝子発現や表現型に影響を及ぼし病態に関連するかを確認するにあたっては、実験手法のみならず、ヒト生体や家系解析の検討が不可欠である。今回、本態性高血圧症を中心に、上記循環器疾患の疾患感受性遺伝子検索について概説するとともに、筆者らが病態との関連を解析してきたプロスタサイクリン合成酵素(prostacyclin synthase: PGIS)遺伝子、ナトリウム利尿ペプチドA受容体(natriuretic peptide receptor type A: NPRA)遺伝子変異を取り上げ、今後の心・血管病におけるゲノム医学の将来像について予見したいと思う。

循環器疾患の感受性遺伝子単離の方法論

循環器疾患のうち、本態性高血圧症感受性遺伝子はこれといったものはまだ決定されていない。その困難さは腎性高血圧症の鑑別を例にとるとわかりやす

い。糸球体腎炎、腎盂腎炎、嚢胞腎、糖尿病性腎症、ループス腎炎、妊娠腎などの腎実質性疾患では、腎からのNaや水の排泄が障害され体液量が増大することやレニン分泌亢進などが関与し、多くの症例で高血圧症を合併している。そして高血圧症が持続すると腎機能低下を促進させるため、腎機能がさらに悪くなるという悪循環になる。一方、本態性高血圧症でも血圧のコントロールが悪いと、やがて腎機能が悪化する。腎性高血圧症では高血圧症に先立ちタンパク尿が先行する場合が多いこと、本態性高血圧症では血圧をコントロールすることで腎機能の改善をみる場合があることなどが鑑別点となるが、両者の末期的状態ではたいへんよく似た病態を呈しているため、長期間臨床の場でフォローしていなければ鑑別はなかなか困難である。つまり腎機能が先に障害されたのか、高血圧症が先なのかという問題は、「たまご」が先か「にわとり」が先かという問答に通じるところがある。そこで多くの研究者たちが、一人の体内で一生変化するのではない物質「DNA」に目を付け、高血圧症を一つの遺伝病という概念の中で研究することに飛びついたのは当然の流れであろう。

では多くの医学・生物学研究に用いられる実験動物は本態性高血圧症感受性遺伝子を同定するために有用であろうか。自然発症高血圧ラット(spontaneously hypertensive rats: SHR)やDahl食塩感受性・耐性ラット

などの遺伝的背景が関与すると考えられる高血圧ラットの原因遺伝子を、コンジェニックラット作成などの遺伝学的手法を用いて単離する試みや、ヒトの血圧調節物質が過剰発現しているトランスジェニックラットを作成し病態解明に役立てている。また、限定された遺伝子のみ発現しないようなノックアウトマウスを作って遺伝子の機能を見る方法も多用されている。これら実験動物を用いた試みによって複数の高血圧感受性座位が判明しているが、座位内の感受性遺伝子単離まで到達している例は数少ない。ここでもモデル動物の病態がそのまま人間にあてはまるかどうかは必ず疑問として挙げられる点である。例えばステロイド合成経路についてはマウスやラットでは 17α -水酸化酵素が存在しないため主要な糖質コルチコイドはコルチコステロンであるが、ヒトではコルチゾールである。また、モデル動物が単一遺伝形式なのか多因子遺伝形式なのかは不明な部分があり、結局ヒトの本態性高血圧症にアプローチするために最終的にはヒトのサンプルを用いる必要があると考えられる。かつてヒトのサンプルを研究に用いるのは困難な時代があったが、この数十年の分子生物学の猛烈な進歩、とりわけ1980年代後半に発明されたpolymerase chain reaction(PCR)法の普及によって技術的な問題が少なくなり、連鎖解析を行うことによって単一遺伝子病(メンデル型遺伝病)の原因遺伝子が次から次へと解明されていった。そのため、多因子遺伝性疾患の解明にも連鎖解析が大きな威力を発揮するだろうと、当初は楽観的に考えられていた。しかし連鎖解析はさほど信頼性がなく、多くの疾患感受性遺伝子を検出できないことが判明した。最近では関連解析を用いた疾患感受性遺伝子の同定が注目されるようになってきた。

関連解析は血のつながりのない集団、すなわち症例群(case)と対照群(control)とを用いるcase-control studyともいう。特定の遺伝マーカーのどの型(アレル)が疾患と関連しているかを検出する。この方法の最たる利点はサンプルの収集が比較的容易な点である。日本は島国であり単一民族に近いのでこの方法は有効である。また各群が200名程度あれば最低限の解析は可能である。この統計学的パワーに優れる利点を活用して、候補遺伝子アプローチによる関連解析が盛んに行われている。症例群で有意に頻度の高い遺伝子型を感受性遺伝子と考える手法である。多型が特異的に遺伝子発

現やタンパク量に影響を及ぼす際には、病理・病態における意義を捉えやすいという利点もある。しかし層化集団や混合集団からのサンプリング、あるいは両群間でマッチしていないサンプリングによる場合でも偽陽性となる場合があるので、家系を使った関連解析よりも不正確になる要因を抱えている。そのため、有意水準 p 値を0.05ではなく0.01にすればよいなどの意見があるが、はっきりとした理論的裏づけをいうならばBonferroniの補正を用いることである。すなわち n 個のアレルがあるマイクロサテライト多型との関連を検討する場合には、有意水準を0.05ではなく、 $0.05/n$ に補正することである。例えば10種類のアレルがあれば p 値0.005未満を有意差とする¹⁾。連鎖解析・関連解析にかかわらず陽性結果が出た場合、転写活性への影響、*in vitro* transcription実験、家系解析、代謝産物の測定、タンパクの構造解析などを行い、表現型との関連を確認する。

今までの関連解析は候補遺伝子を取り上げて遺伝子内あるいは近傍の遺伝子マーカーを使用するのが一般的であったが、ゲノムワイドスクニングを関連解析で行う方法が見られるようになってきた²⁾。SNPsにマイクロサテライト多型並みの検出力を期待するには膨大な数のSNPs解析を必要とすることが予想されたが、技術の進歩がそれを可能にするようになったのである。近年は国家プロジェクト規模の大規模ゲノムスクニングが行われるようになり、その成果が期待されている。最近、この方法を用いて心筋梗塞の感受性遺伝子が同定されている³⁾。当初はこの方法論の成否が疑われたが、今後はこの方法によって多くの多因子遺伝性疾患が解析されるであろう。ただし、そうした研究は経済的にも労働力的にも個人研究者レベルでは困難であり、また一般人口である程度出現頻度の多型を用いることが多いため非常に稀な(低頻度の)変異は見逃される場合もある。

疾患感受性遺伝子研究の問題点と光明

単一遺伝子疾患のように浸透率が高く健常人には存在しない変異を同定する場合にはポジショナルクローニング法は非常に有効であるが、多因子遺伝性疾患では、現在まで大きな成果が出ていない。その理由の一つは環境要因の影響が強く、遺伝要因の影響力が少ないことである。遺伝要因自体が複数の遺伝子の支配を

受けているため一つの遺伝子の影響力はかなり弱いと考えられる。この解決策として解析数を増やすこと、環境要因を揃えること、連鎖解析よりも感度の高い関連解析やハプロタイプ解析によってゲノムスキャンニングを行うことなどが考えられている。その他の理由としてcontrol群の設定に伴うものがある。比較的均一と考えられていた日本人の遺伝的背景も不均一な可能性があり、この解決策として家族歴をきちんと把握したうえでのcontrol群の設定が必要かもしれない。こうした問題点が克服され感受性遺伝子単離まで到達できればよいが、その他の方法によるアプローチはないものであろうか？ そこでわれわれのグループで実施した有効な手立てと思われる一つを述べることにする。

われわれが感受性遺伝子検索を始めた10年前にはヒトゲノムプロジェクトの明確な終了時期さえわからない時代であった。多因子遺伝性疾患に対して関連解析が有効なのかどうか、どの遺伝子マーカーが有用なのかについても明確な答えがなかった。そこでわれわれは生理学・生化学・薬理的知見から候補遺伝子をつ取り上げ、まずexon・intron構造決定から開始し、上流およびexon内の変異・多型検索をsingle strand conformation polymorphism (SSCP) 法やsequencing法にて本態性高血圧症で行った。そして見いだした変異・多型を用いてcase-control studyを行うのである。一つ一つの遺伝子ごとにこれを推し進めていく。この戦略は一見効率が悪く、関連調査で“関連あり”の結果が出れば発表できるが、“関連なし”が出れば掲載される医学雑誌が少なくなるという不利もある。しかし、この方法の最大の利点は(単なる個人差を示す多型ではなく)本態性高血圧症に直接関係する変異をpick upできる可能性があることである。そのような変異は 遺伝子異常による高血圧症として本態性高血圧症から独立した疾患として分類されるかもしれない。大規模ゲノムスキャンニングは経済的にも、労働力的にも個人研究者レベルでは困難であることを考えると、われわれの戦略はむしろ効率がよいのかもしれない。現代は方法論が確立していないからこそ、さまざまな方法があってもよいのではなからうか。次にこの方法でわれわれのグループが発見したPGIS遺伝子変異とNPRA遺伝子変異について述べることにする。

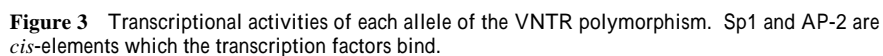
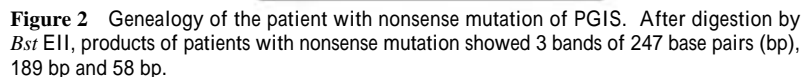
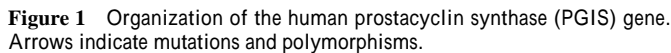
PGIS遺伝子変異による高血圧症

プロスタサイクリン(PGI₂)はPGH₂を基質としてPGIS

の働きにより生成され血管拡張作用と血小板凝集抑制を示す。よってその作用障害で高血圧症、血栓・塞栓性疾患が起こる可能性があり、PGIS遺伝子はこれら疾患の感受性遺伝子・原因遺伝子になり得る。われわれは1996年にこの遺伝子構造を解明⁴⁾して以来、遺伝子内に6種類の変異・多型を発見し疾患との関連を研究してきた(Fig. 1)。まずexon 2にナンセンス変異を発見した。これでexon 2の2番目の塩基がCからTに変わるとアルギニンがストップコドンに変わる。ストップコドンから作られるタンパク質はここで構造が終わってしまう。本態性高血圧症群とcontrol群計300名中、本態性高血圧症群に1名認めただけでまさしく変異である。この家系を調査したところ、この患者を含め生存する兄弟6名のうち4名に同変異を認めた。4名全員が高血圧症を呈し、うち2名は脳梗塞を合併していた(Fig. 2)⁵⁾。

開始コドンから-150塩基対までの間はGC含有量が79%に達しており、人工的に作成したdeletion mutantによる*in vitro*の実験でこの部が転写活性に対して主要な(コア)働きを持つことがわかっている。このコアプロモーター領域内には開始コドン直上流領域の9塩基対繰り返し配列が存在しており、この場所にはちょうど転写因子Sp1とAP-2がタンデムに繰り返して結合する部位がある。実際にヒトのサンプルを用いた解析では3リピートから7リピートまでの5種類の多型があることがわかった。これらの多型をそれぞれ別々に細胞へtransfectionすることによってリピート数が少ないほど転写活性が低くなることが証明された(Fig. 3)⁶⁾。臨床的にはアレル頻度は本態性高血圧症群とcontrol群との間に有意差はなかったが⁷⁾、脳梗塞群、非脳梗塞群とでは有意差があり、ロジスティック解析でリピート数が少ないほど脳梗塞の発症率が高くなっていた(Fig. 4)⁸⁾。疾患の発症に遺伝子の転写活性が関連していることは非常に興味深い。

最後にintron 9のスプライシングサイトである2番目の塩基におけるTからCへの塩基置換について述べる。この置換を含んだminigene constructを*in vitro* transcriptionさせることによりexon 9が抜け落ちること(skiping)が起こることがわかった。ペプチドの3D構造解析によって酵素活性に重要な場所であるheme結合部位がtruncatedされることが示された。このスプライシング変異は本態性高血圧症群とcontrol群計400名のう



ち本態性高血圧症群に1名のみ認めた。この患者の家系で変異を持つ者は全員高血圧症であり尿中PGI₂代謝産物は有意に低値であった(Fig. 5)⁹⁾。

NPRA遺伝子変異による高血圧症

NPRA遺伝子の5'上流領域の解析ではexon 1 非翻訳領域の転写因子AP-2 siteに8塩基対の欠失を発見した(Fig. 6)。本態性高血圧症群200名、正常血圧群200名中、本態性高血圧症群8名、正常血圧群1名にこの欠失を持つ者を見いだした(有意差あり)。すべてヘテロ接合体であった。細胞を使ったルシフェラーゼアッセイによる検討では、転写活性は欠失を持つタイプが持たないタイプに比べて約30%に低下し、またゲルシフトアッセイによって欠失タイプにはAP-2が結合しないことを証明した。血漿BNP濃度が欠失のある本態性高血圧症患者で高値であったことは、NPRAの機能障害により代償的に引き起こされた可能性がある(Fig. 7A)。また、変異を持つ者の血漿BNP濃度がそれらの平均血圧に対して相対的に高値であったことはやはりNPRAの機能障害により起こされたと思われた(Fig. 7B)。正常血圧群の1名は正常血圧であるものの左室肥大を伴っていたことは、NPRA遺伝子のノックアウトマウスは高血圧を呈し左室肥大を伴うとの報告と一致していた⁹⁾。以上から非翻訳領域の欠失では転写活性が低下し、本態性高血圧症群に関連することを証明した。

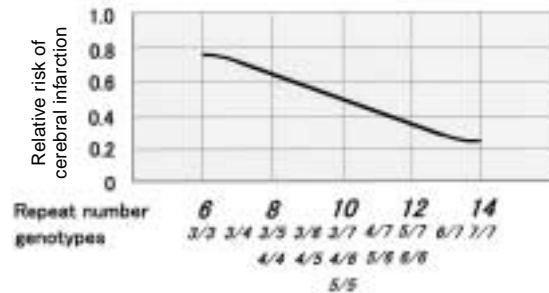


Figure 4 Relative risk of cerebral infarction associated with tandem repeat numbers.
Odds ratio=1.38, 95% CI 1.11 to 1.71
p=0.0033
Odds ratio=15.9 between 3/3 genotype and 7/7 genotype

今後の課題

これらの発見は、PGISやNPRA遺伝子変異による高血圧症という新たな疾患の存在を示唆している。それが将来、Liddle症候群のような単一遺伝子による高血圧症に分類される可能性があり、本態性高血圧症の解明に寄与すると考えられる。

医学は過去になされた研究の積み重ねによって進歩してきたのであるが、全ゲノムスクニングでは先人の積み上げてきた生理活性物質やシグナル伝達の生理学・生化学・薬理的な情報を考慮しなくても行うことができる。このことが学問的に良いことなのかどう

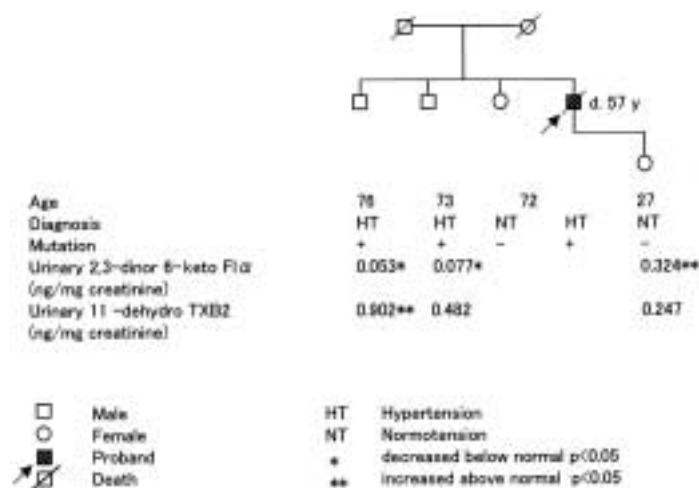


Figure 5 Genealogy of the patient with splicing site mutation of PGIS.

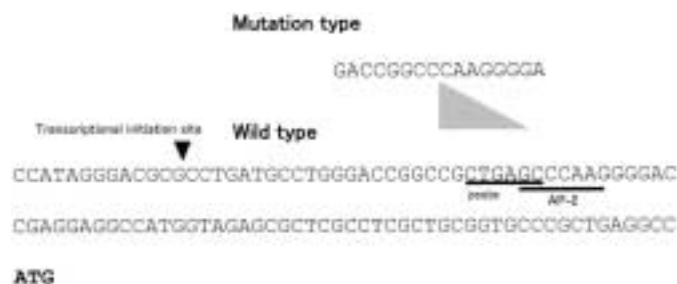


Figure 6 Nucleotide sequence of 5' nontranslated region of the NPRA gene. ATG in bold type indicates the start codon. *Cis*-elements are underlined. The eight nucleotides missing in the deletion-type allele are indicated in upper nucleotide sequence. The transcription initiation site is shown with a black triangle.

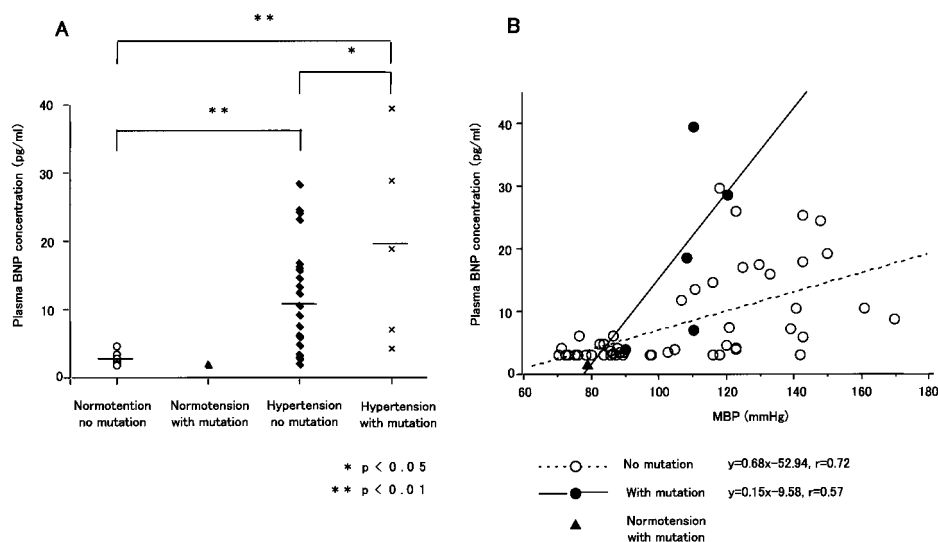


Figure 7 Comparison of BNP levels in each group. Plasma BNP levels in normotensive subjects without and with the deleted allele and in hypertensive patients without and with the deleted allele (A). Scatterplots show the relationships between plasma BNP levels and mean blood pressure in subjects with the deleted allele and without the deleted allele (B). The slope of the plasma BNP levels in subjects with the deleted allele was steeper than that of subjects without the deleted allele.

かについては議論の余地があるが，成功するか否かを将来明らかになるであろうし，また，候補遺伝子アプローチでポジティブな関連が出たものが正しかったかどうかでも確認できるであろう。

文 献

- 1) Nakayama T, Soma M, Takahashi Y et al: Association analysis of CA repeat polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Clin Genet*, 1997, **51**: 26–30.
- 2) 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.

- 3) Nakayama T, Soma M, Kanmatsuse K et al: The microsatellite alleles on chromosome 1 associated with essential hypertension and blood pressure levels. *J Hum Hypertens*, 2004, in press.
- 4) Nakayama T, Soma M, Izumi Y et al: Organization of the human prostacyclin synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221**: 803–806.
- 5) Nakayama T, Soma M, Rahmutula D et al: Nonsense

- mutation of prostacyclin synthase gene in a family. *Lancet*, 1997, **349**: 1887–1888.
- 6 Nakayama T, Soma M, Rehemudula D et al: Association of 5' upstream promoter region of prostacyclin synthase gene variant with cerebral infarction. *Am J Hypertens*, 2000, **13**: 1263–1267.
- 7 Nakayama T, Soma M, Takahashi Y et al: Polymorphism of the promoter region of prostacyclin synthase gene is not related to essential hypertension. *Am J Hypertens*, 2001, **14**: 409–411.
- 8 Nakayama T, Soma M, Watanabe Y et al: Splicing mutation of the prostacyclin synthase gene in a family associated with hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **297**: 1135–1139.
- 9 Nakayama T, Soma M, Takahashi Y et al: Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese. *Circ Res*, 2000, **86**: 841–845.

Identifying Genes Susceptible to Cardiovascular Diseases Such as Essential Hypertension

Tomohiro Nakayama

Division of Receptor Biology, Advanced Medical Research Center, Nihon University School of Medicine

Key words: Susceptibility genes, Cardiovascular diseases, Mutation, Polymorphism, Essential hypertension

The major impact of the completion of the human genome sequence is the understanding of disease etiology with deduced therapy. Methodological and conceptual advances in human genetics have led to the identification of an impressive number of human disease genes. This wealth of information has also revealed that the traditional distinction between single-gene and multifactorial disorders is sometimes not as clear as be believed. Here, we review the strategy of identifying susceptible genes, and describe several traditional methods. Furthermore, we introduce several newer methods established by our group for using prostacyclin synthase (PGIS) gene and natriuretic peptide receptor type A (NPRA) gene. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 183–189)