

別添2

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

脳動脈瘤責任遺伝子同定と出血前診断への臨床応用

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井ノ上 逸朗

平成14年4月

報告書の [差し替え] について

分担研究報告書の論文発表の部分に削除する部分が生じたため、以下の通り [差し替え] しました。

文献番号：200100422A

課題番号：

補助金名：厚生労働科学研究費補助金

研究事業名：ヒトゲノム・再生医療等研究事業

年度・研究成果の区別：平成13年度 総括・分担研究報告書

研究課題名：脳動脈瘤責任遺伝子同定と出血前診断への臨床応用

研究代表者名：井ノ上 逸朗

【修正箇所】

P.32～P.41

修正前： 「Sato,Y」が筆頭著者として執筆した論文の書誌情報を掲載

修正後： 上記書誌情報を削除

【修正理由】

本研究課題の研究分担者である佐藤 敬（弘前大学）の平成13年度における分担研究報告書の論文発表のうち、「Sato,Y」が筆頭著者として執筆した論文の一部が取り下げられたことから、「Sato,Y」が筆頭著者として執筆した論文の書誌情報を全て削除することにしたため

年月日：平成29年12月18日

研究代表者 井ノ上 逸朗

目 次

I. 総括研究報告書	
脳動脈瘤の責任遺伝子同定と出血前診断への臨床応用	1
井ノ上逸朗	
II. 分担研究報告	
1. 脳血管祝攣縮の遺伝子発現プロファイル解析	11
糟谷英俊	
2. 脳動脈瘤感受性遺伝子同定にむけての実践的な連鎖不平衡マッピング法 の確立	21
中島敏晶	
3. ヒト臍帯動脈からの平滑筋細胞培養と炎症反応に伴う遺伝子発現	27
佐藤 敬	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	43

脳動脈瘤の責任遺伝子同定と出血前診断への臨床応用

主任研究者 井ノ上 逸朗 東京大学・医科学研究所 助教授

研究要旨

脳卒中の死亡率は昭和40年以降順調に低下し、脳卒中の制圧はある程度成功したといえる。しかしながら、中でもくも膜下出血(脳動脈瘤破裂)の死亡率は昭和26年より一貫して漸増している。くも膜下出血患者の一部のみが、手術治療の対象であり、約半数の患者は初回出血で死亡するためである。特に高齢者では手術成績が悪く、後遺症により寝たきりになる例が非常に多い。そのため、早期発見、早期治療(出血前に発見し治療する)を行う二次予防への社会的要請が最も高い疾患といえる。くも膜下出血の80%以上が脳動脈瘤の破裂を原因とする。脳動脈瘤は遺伝背景の強い疾患であり、兄弟での相対危険率(λ_s)は6と推定されている。今回の研究は(1)脳動脈瘤の責任遺伝子を同定する、(2)脳動脈瘤の発症メカニズムを解明する、(3)これを基に遺伝的リスクを有する人を同定し、出血前に診断する二次予防の体制確立を目的とする、ひいては(4)成因に基づく創薬の開発を目指す。

我々は世界に先駆けてゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析法を用いて遺伝子座特定を完了した。くも膜下出血は死亡率の高い疾患のため家系収集はきわめて難しいと予想されたが、日本全国の主要病院に依頼し脳動脈瘤家系85、罹患同胞対104を集めることができた。85家系のうち73家系がくも膜下出血家系で、残り12家系が未破裂家系であった。ゲノム全域を網羅する404のマикроサテライト解析により、5番、7番、14番染色体で有意な連鎖を認めた。それぞれの領域において、アソシエーション・スタディによる責任遺伝子同定作業にはいつている。解析にはSNP(single nucleotide polymorphism)を用い、それぞれの遺伝子について主にデータベースからSNPを得た。候補遺伝子解析から責任遺伝子のひとつとしてエラスチンの関与を報告できた。ゲノムドラフト配列が発表され、SNPデータベースも充実してきたので、疾患感受性遺伝子同定作業は飛躍的に加速している。初年度は連鎖を認めた3領域での候補遺伝子について、SNPによるアソシエーション・スタディをおこなった。

分担研究者

糟谷 英俊 東京女子医大・脳神経センター 助手
佐藤 敬 弘前大学・医学部 教授
中島 敏晶 東京大学・医科学研究所 助手

A. 研究目的

脳動脈瘤の破裂によるくも膜下出血は重篤な疾患であり、予防医学的対策が求められる。脳動脈瘤は40歳以上の4-6%に存在する頻度の高い疾患であることが最近の報告で明らかにされてき

た。かつ疫学調査により遺伝性の強い疾患ということが知られている。脳動脈瘤関連遺伝子同定が脳動脈瘤発生の成因解明の端緒となると予想され、ひいては新規治療法開発に結びつくと期待される。

B. 研究方法

B-1) サンプル収集(糟谷担当)

疾患遺伝子同定のために、サンプル収集が重要であり、成功にいたるかどうかは収集されたサンプルの数、質に負うところが大きい。脳動脈瘤遺伝子座同定のため、罹患同胞対連鎖解析による、染色体上での遺伝子座の特定を試みた。脳動脈瘤(多くはくも膜下出血)に罹患している同胞対は全国の主要な1100ヶ所の脳神経外科施設にお願いし、糟谷の責任のもと臨床データ、個人情報管理されている。今回の脳動脈瘤遺伝解析研究は、東京女子医科大学倫理委員会の承認(平成10年12月28日付け)を得ており、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針が示されたのに応じ、この指針を遵守する形で再承認されている(平成12年8月18日付け)。同様にアソシエーション・スタディに必要となる脳動脈瘤患者、非脳動脈瘤患者(CTもしくはMRI検査で脳動脈瘤の存在を否定できたグループ)、それぞれ250例、200例収集できている。それぞれの患者について、発症年齢、症状、脳動脈瘤存在場所、多発性の有無などの臨床情報をエクセルファイルで管理している。なお個人情報に関しては個人情報管理者により匿名化されており、ここでの臨床データとしては入力されていない。日本人以外での解析も重要なので、Chicago 大学で白人および黒人、Chonbuk 大学で韓国人の患者サンプル収集も開始している。血液からのゲノム DNA 精製は常法に従った。

B-2) 連鎖解析

ゲノム全域を網羅するマイクロサテライトマーカーセットは400個のマーカーから成る Linkage mapping set version II をもちいた。ゲノム全域を平均8センチモルガン間隔で網羅できる。元来このマーカーセットは白人ではヘテロ接合性が高いものの、日本人においては400マーカーのうち40個は多型性(情報度)の低いマーカーであった(ヘテロ接合性=60%以下)。そこで、データベースからマイクロサテライトを検索し、代わりとなるマーカーを探した。結果、404個からなる日本人に適応した新たなマーカーセットができあがった。平均ヘテロ接合性は 75.6%、平均インターバルは 8.7 cM、最大インターバルは 26.8 cM である。連鎖の検定はふたつの方法に従った。SIBPAL と GENEHUNTER である。両方ともノンパラメトリック連鎖解析であり、メンデルの遺伝形式、浸透度、遺伝子頻度などの情報は必要でない。脳動脈瘤のような多因子疾患には適した手法であるが、検定力が弱い、特定できる領域が広い(20センチモルガン程度)という欠点がある。有意な連鎖を認められた領域では、マイクロサテライト数を増やし連鎖検定をおこなった。

B-3) SNP によるアソシエーション・スタディ

連鎖領域に存在する候補遺伝子の解析をおこなっている。Single nucleotide polymorphism (SNP) を用いたアソシエーション・スタディによる感受性遺伝子同定を試みた。SNP は以下のデータベースから得た。

<http://snp.cshl.org>

http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html

データベースに SNP が存在していない遺伝子については独自に SNP を直接シーケンスにより開発した。アソシエーション・スタディで有意差を得た遺伝子については、すべての SNP 同定を試みている。データベース SNP は日本人において多型性が認められないことが多いので、直接シーケ

ンスにより随時多型性を確認した。SNP タイピングは化学発光反応によりシーケンスをおこなうPYROSEQUENCING法を採用している。この方法により、1600タイピング/1日が可能である。かつそのタイピング精度は高い。SNP 頻度は患者・対照関連解析にてカイ検定を用い解析した。必要に応じて Odds 比をだしている。有意差を認めた SNP については、さらにいくつかの遺伝子内 SNP を検討し、ハプロタイプ、連鎖不平衡解析を用い、詳細な遺伝解析をおこなっている。ハプロタイプ解析は Arlequin プログラムおよび、SNPAlyze プログラム(Dynacom)を用いた。

B-4) 平滑筋細胞培養(中島、佐藤担当)
 遺伝解析の結果は統計学に基づき、直接機能変化と関連するものではない。疾患に関連する変異(多型)がどのような機能変化をおこすかについては、実験手法を用いて示す必要がある。感受性遺伝子が同定されていない段階ではあるが、実験材料の準備は必要である。当然のことながら、ヒト脳動脈組織を実験に用いることは不可能である。また SNP 遺伝型による機能的変化を検討する必要上、ヒト組織を用いなければならない。ヒト臍帯動脈から平滑筋細胞を得、初代培養系を確立した。平滑筋特異的アクチン染色により、平滑筋細胞が90%以上であることを確認した。遺伝子タイピング用にゲノムDNAを精製し、細胞は液体窒素タンクで保存している。

C. 研究結果

C-1) ゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析
 全国の脳神経外科関連施設の協力により、104組の罹患同胞対を得ることができた(Table 1)。脳動脈瘤の相対危険率は6と算出されているので、この罹患同胞対でゲノム全域解析がおこなう検定力を有すると判断した。得られたデータは GENESCAN, GENOTYPER 等のプログラムで半自動的にタイピングをおこない、その後の連鎖解析に導入した。連鎖検定は SIBPAL, GENEHUNTER でおこなっている。400個の遺伝マーカーをもちいることにより、ゲノム全域を10センチモルガン以下の間隔で解析できる。罹患同胞対連鎖解析法の欠点のひとつは、組換え情報がないので狭い領域への絞り込みが不可能な点である。一方、同様の理由で10-20センチモルガンにわたり連鎖を認めるので、10センチモルガン間隔での解析でも連鎖を見逃すことは少ないともいえる。脳動脈瘤ゲノムスキャン解析で3ヶ所の遺伝子座を特定できた。ゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析により、3ヶ所に脳動脈瘤遺伝子座を絞り込むことができた。すなわち、5q22-23, 7q11-21 そして 14q24 で、それぞれ最大ロッド値は、2.24, 3.22, 2.31 であった。当然この領域に感受性遺伝子が存在すると予想でき、領域に存在する血管形成に関与する候補遺伝子を SNP アソシエーション・スタディにより検討した。

Table 1 Samples for affected sib-pair linkage analysis

Families	Individuals			Sibpairs
	SAH (+)	SAH (-)		
Pairs	77	68	9	77
Trios	7	4	3	21
Quartet	1	1	0	6
total	85	73	12	104

SAH(+/-) indicates occurrence of subarachnoid hemorrhage in the proband

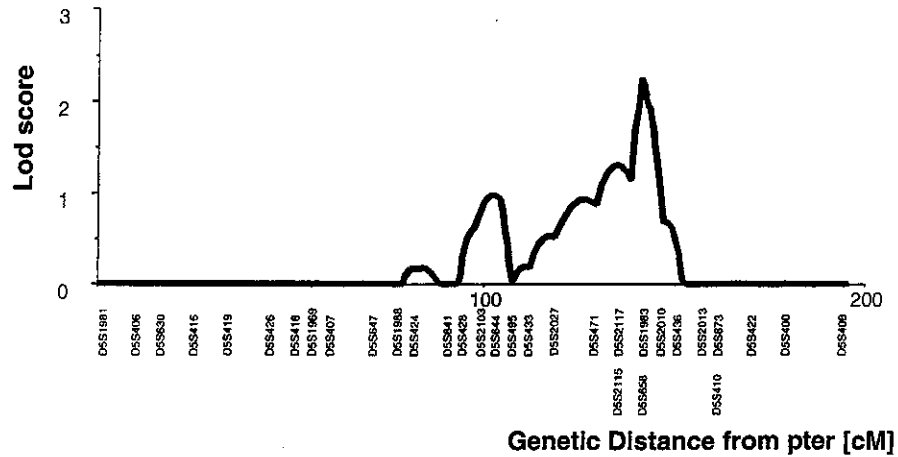
C-2) 連鎖領域からの脳動脈瘤関連遺伝子探索

ゲノムスキャンで得られた3ヶ所の連鎖領域それぞれについて、脳動脈瘤関連遺伝子の

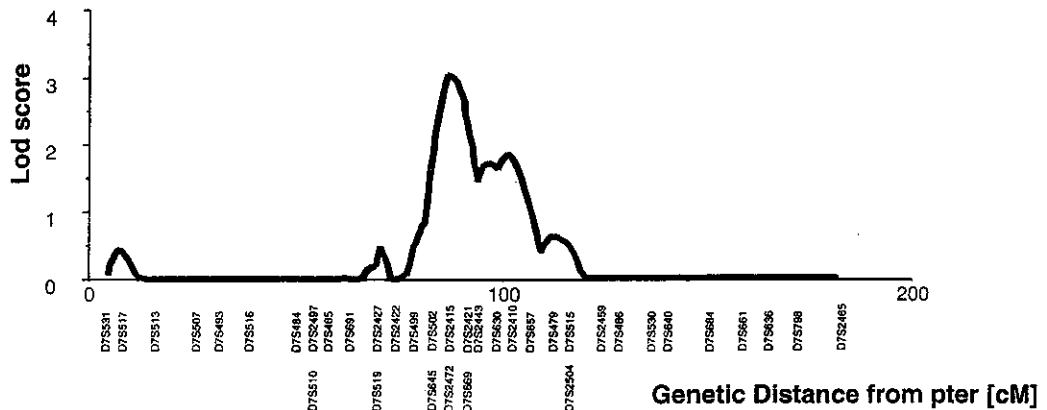
同定を試みている(図1)。

図1 ゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析

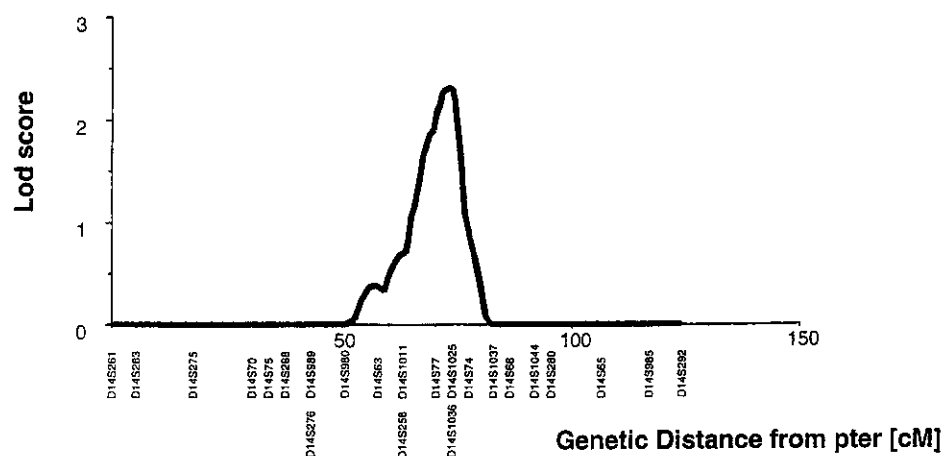
Multipoint MLS Linkage Analysis : Chromosome 5



Multipoint MLS Linkage Analysis : Chromosome 7



Multipoint MLS Linkage Analysis : Chromosome 14



- 1) 5番染色体での解析:5q22-23 に連鎖を認め最大ロッド値は 2.24 であった。1 Lod インターバルは 14.4Mb におよび、領域に存在する遺伝子数は180であった。その中で Lysyl oxidase と fibrillin 2, fibroblast growth factor 1 を候補と考え、合計40個の SNP によりアソシエーション・スタディ、ハプロタイプ解析をおこなった。結果、fibroblast growth factor 1 において、intron 4 での SNP で 弱い有意差を得ている ($\chi^2 = 4.44$, $df=1$, $P=0.035$)。イントロン4に存在するふたつの SNP でハプロタイプ解析をおこなったところ、比較的強い有意差を得ることができている ($\chi^2 = 8.88$, $df=1$, $P=0.0029$)。
- 2) 7番染色体での解析:7q11-21 に連鎖を認め、最大ロッド値は 3.22 とともに高かった。1 Lod インターバルは 30.8 Mb におよび、70個の遺伝子が存在している。その中で、elastin, collagen type I alpha1, KREV interaction trapped 1 を候補と考えた。ハプロタイプ解析の結果、エラスチン遺伝子のイントロン20と23の間で有意なアソシエーションを認めた ($\chi^2 = 27.90$, $df=3$, $P=3.81 \times 10^{-6}$)。特にこのハプロタイプをホモ接合体で有する人はそうでない人より 4.4 倍、脳動脈瘤に罹るリスクが高いという結果を得た。
- 3) 14番染色体での解析:14q24 に連鎖を認め、最大ロッド 2.31 であった。1 Lod インターバルは 14.4 Mb, 遺伝子数は60である。領域候補遺伝子、alpha 1 antitrypsin, latent TGF-beta binding protein 2 についてアソシエーション・ス

タディをおこなった。これら候補遺伝子では有意な差は認めていない。

D. 考察

近年、いくつもの Common Disease の責任遺伝子座が相次いでマッピングされてきているものの、Common Disease の責任遺伝子同定はまだまだ遠い道のりである。実際にこれまで疾患遺伝子座からのポジショナルクローニング成功例は糖尿病における NIDDM1 のみであろう。おそらく遺伝要因の弱さがすべての解析段階で邪魔をしている。しかしながら疾患関連遺伝子同定の意義が小さいわけではない。疾患遺伝子同定により、疾患メカニズムの解明が可能となり、本質的な治療法の開発が可能となる。本研究では脳動脈瘤罹患同胞対連鎖解析によりゲノム全域からマッピングされた染色体領域からのポジショナル候補クローニングによる遺伝子同定を目指す。連鎖解析により、ゲノム全域から3ヶ所に候補領域を絞ることに成功した。すなわち、5q22-23, 7q11-21 そして 14q24 で、それぞれ最大ロッド値は、2.24, 3.22, 2.31 であった。当然この領域に感受性遺伝子が存在すると予想でき、領域に存在する血管形成に関与する候補遺伝子を SNP アソシエーション・スタディにより検討した。

7q11-21 での連鎖ピークは D7S2472 で認めており、800k 塩基離れてエラスチン遺伝子が存在していた。エラスチンは動脈弾性組織の主構成成分であり、エラスチン遺伝子のなんらかの異常により、血管脆弱性がおこり、動脈瘤形成しやすくなると予想された。エラスチン遺伝子は位置的かつ機能的候補遺伝子といえる。エラスチン遺伝子で14ヶ所の SNP を同定でき、ハプロタイプを用いたアソ

シエーション・スタディの結果、イントロン20、イントロン23多型の組み合わせにより、脳動脈瘤に罹るリスクが高くなることが示された。すなわちイントロン20のメジャーアレルとイントロン23のマイナーアレルのハプロタイプホモ接合体では、4.4 倍リスクが高くなっていた。本知見は易罹患性遺伝子診断により危険率の高い人を抽出できることを示す。特にくも膜下出血は死亡率の高い重篤な疾患なので、易罹患性遺伝子診断は予防医学に重要であると考えられる。今後、SNP から得られたリスクについて、さらに大規模な疫学的検討が必要となるだろう。ここまでの結果は遺伝統計学によるもので、機能解析をおこなうことにより、疾患メカニズムの解明を試みる必要がある。現在のところ、血管平滑筋培養細胞を用い、ハプロタイプによるエラスチンスプライシングへの影響について、検討しているところである。ここからの知見より、脳動脈瘤発生の理解が深まり、創薬等、新規治療法開発が可能となろう。

脳動脈瘤の感受性遺伝子はひとつとは考えられず、いくつかの遺伝子の関与が予想される。5、7、14番染色体連鎖領域に存在する候補遺伝子についてアソシエーション・スタディも継続しておこなっている。これまで解析した遺伝子は、Lysyl oxidase, fibrillin 2, fibroblast growth factor 1, collagen type 1 alpha1, KREV interaction trapped 1, alpha 1 antitrypsin, latent TGF-beta binding protein 2 である。

E. 結論

脳動脈瘤(多くはくも膜下出血)罹患同胞対104対でのゲノム全域連鎖解析の結果、5、7、14番染色体で強い連鎖を得た(最大

LOD=3.22 at D7S2472)。連鎖領域からのポジショナル候補クローニングをおこなっている。これまでエラスチン遺伝子の関与を示すことに成功している。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakajima, T., Inoue, I., Cheng, T., Lalouel, J-M. 2002. Molecular cloning and functional analysis of a factor that binds to the proximal promoter of human angiotensinogen. *J. Hum. Genet.* 47, 7-13.

Nakajima, T., Jorde, LB., Ishigami, T., Umemura, S., Emi, M., Lalouel, J-M., Inoue, I. 2002. Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 108-123.

Onda, H., Kasuya, H., Yoneyama, T., Takakura, K., Hori, T., Takeda, J., Nakajima, T., Inoue, I. 2001. Genome wide linkage and haplotype association studies map intracranial aneurysm to chromosome 7q11. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 804-819.

Furushima, K., Shimo-onoda, K., Maeda, S., Nobukuni, T., Ikari, K., Koga, H., Komiyama, S., Nakajima, T., Harata, S., Inoue, I. 2001. Large scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Miner. Res.* 17, 128-137.

Mori, H., Ikegami, H., Kawaguchi, Y., Seino,

S., Yokoi, N., Takeda, J., Inoue, I., Seino, Y., Yasuda, K., Hanafusa, T., Yamagata, K., Awata, T., Kadowaki, T., Hara, K., Yamada, N., Gotoda, T., Iwasaki, N., Iwamoto, Y., Sanke, T., Nanjo, K., Oka, Y., Matsutani, A., Maeda, E., Kasuga, M. 2001. Association of the Pro12-Ala substitution in peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 both with resistance to development of diabetes and with impairment of insulin secretion and disease severity in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 50, 891-894.

The Study Group of Comprehensive Analysis of Genetic Factors in Diabetes Mellitus (Kanamori, M., Wang Y-J, Takeda, J., Inoue, I., Sanke, T., Nanjo, K., Mori, H., Kasuga, M., Hara, K., Kadowaki, T., Tanizawa, Y., Oka, Y., Iwami, Y., Ohgawara, H., Yasuda, K., Yamada, Y., Seino, Y., Yokoi, N., Yano, H., Seino, S.) 2001. S20G mutation of the amylin gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *Diabetologia* 44, 906-9.

Maeda, S., Ishidou, Y., Koga, H., Taketomi, E., Ikari, K., Komiya, S., Takeda, J., Sakou, T., Inoue, I. 2001. Functional impact of human collagen α 2 (X1) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Miner. Res.* 16, 948-957.

Aihara, Y., Onda, H., Teraoka, H., Yokoyama, Y., Seino, Y., Kasuya, H., Hori, T., Tomura, H., Inoue, I., Kojima, I., Takeda, J. 2001. Assignment of SLC17A6 (alias DNPI), the

gene encoding brain/pancreatic islet-type Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter to human chromosome 11p14.3. *Cytogenet. Cell Genet.* 92, 167-169.

Havelka, S., Vesela, M., Pavelkova, A., Halman, L., Ruzickova, S., Koga, H., Maeda, S., Inoue, I., 2001. Are diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL) genetically related? *Annal. Rheum. Dis.* ARD: 118.

Yabe, I., Sasaki, H., Yamashita, I., Tashiro, K., Tatei, A., Suzuki, Y., Kida, H., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Hokezu, Y., Nagamatsu, K., Oda, T., Ohnishi, A., Inoue, I., Hata, A. 2001. Predisposing chromosome of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) in Japanese. *J. Med. Genet.* 38, 328-333.

Nishigori, H., Tomura, H., Kanamori, M., Yamada, S., Kikuchi, N., Sho, K., Tonooka, N., Onigata, K., Inoue, I., Kojima, I., Yamagata, K., Yang, Q., Matsuzawa, Y., Kohama, T., Miki, T., Seino, S., Kim, M., Choi, H., Moore, D., Takeda, J. 2001. Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 575-580.

Takeoka, S., Unoki, M., Onouchi, Y., Doi, S., Fujiwara, H., Miyatake, A., Fujita, K., Inoue, I., Nakamura, Y., Tamari, M., 2001. Amino-acid substitutions in the IKAP gene product significantly increase risk for

bronchial asthma in children. *J. Hum. Genet.* 46, 57-63.

Maeda, S., Koga, H., Matsunaga, S., Numasawa, T., Takeda, J., Harata, S., Sakou, T., Inoue, I. 2001. Gender-specific haplotype association of collagen $\alpha 2$ (X1) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Hum. Genet.* 46, 1-4.

井ノ上逸朗 多因子病の遺伝子解析の進め方
内分泌・糖尿病科 科学評論社 14(1)3-10, 2002.

井ノ上逸朗 後縦靭帯骨化症とコラーゲン11A2 遺伝子
整形・災害外科 金原出版 44(11)1251-1253, 2001.

古島弘三 井ノ上逸朗 後縦靭帯骨化症の原因遺伝子解明に向けて
BIO Clinica 北隆館 16(9)28-33, 2001.

井ノ上逸朗 罹患同胞対連鎖解析法による疾患遺伝子研究
アレルギー科 化学評論科 11(6)554-560, 2001.

井ノ上逸朗 SNP 解析の実際
血液・免疫・腫瘍 メディカルレビュー社 6(4)347-352, 2001.

井ノ上逸朗 くも膜下出血の SNP 解析
日医大誌 68(5)422-425, 2001.

坂上拓郎 井ノ上逸朗 SNPs タイピング技術の進歩と SNPs の今後
ゲノム医科学がわかる 羊土社 108-114, 2001.

井ノ上逸朗 後縦靭帯骨化症の責任遺伝子解明に向けて
蛋白質 核酸 酵素 46(16)2289-2294, 2001.

2. 学会発表

23rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research
【Phoenix, Arizona, USA】October 12-16, 2001

Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell could be regulated by b-catenin pathway.

S. Maeda^{1,2}, K. Shimo-Onoda^{1,2}, T. Nobukuni¹, K. Hayashi², H. Koga², S. Matsunaga², K. Yone², S. Komiya², I. Ituro¹.

¹Division of Genetic Diagnosis, The Institute for Medical Science, The University of Tokyo.

²Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, Kagoshima University.

51st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics
【San Diego, USA】October 12-16, 2001

A thorough linkage disequilibrium analysis within the human angiotensinogen gene (*AGT*)

T. Nakajima¹, T. Ishigami², S. Umemura³, M. Emi⁴, J-M Lalouel², I. Inoue¹.

¹Division of Genetic Diagnosis, The Institute

of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ²Department of Human Genetics, University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT; ³Internal Medicine, Yokohama City University, Yokohama, Japan; ⁴Department of Molecular Biology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School, Kawasaki, Japan;

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

「脳動脈瘤感受性遺伝子」

特許出願:特願2001-42907号

発明者:井ノ上 逸朗

出願人:大塚製薬(株)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脳血管攣縮の遺伝子発現プロファイル解析

分担研究者 糟谷英俊 東京女子医科大学脳神経外科 助手

研究要旨

くも膜下出血後の脳血管攣縮は、くも膜下出血の原因である脳動脈瘤が急性期クリッピング術により安全に処置できるようになった今日、くも膜下出血の予後を大きく左右する合併症である。出血の後、4日から14日に遅発性に、出血周囲の脳主幹動脈が持続的に生理的範囲を越えて収縮し、脳の血流障害、神経症状を来し、脳梗塞をおこす病態である。この原因については、くも膜に存在する血腫から放出されるオキシヘモグロビンが主因と考えられているが、詳細は不明である。脳血管攣縮:脳主幹動脈の持続的収縮に到る過程は複雑で、シグナル伝達系と転写制御経路が複雑にからみ合っているものと予想されている。本研究は後者を解析していこうとする試みであり、脳血管攣縮の本体の解明にせまれるものとする。

ゲノム塩基配列のすべてが解読されようとしている現在、生体における遺伝子発現の調節機構を網羅的に解明することが今後の大きな課題の一つとなる。ここ数年の間に急速に発展してきた mRNA differential display 法、DNA チップや DNA アレイの手法はこれを可能とする。脳血管攣縮をこのような視点からとらえ、この方法を用いて原因を解明しようとする試みは今まで存在しない。

今回我々は、イヌくも膜下出血モデルを用いて検討を試みた。攣縮血管を採取し、RNA を抽出し、mRNA differential display 法、DNA アレイ法、さらに Taq Man 法を用いて攣縮血管に多く発現する遺伝子を網羅的に検索した。既知遺伝子としては MCP-1、GADD45、VEGF、Neuromodulin、BiP protein、IHRP、cystatin B、SAA、ASM-like PDE などの発現が上昇していた。特に MCP-1 に注目し、cytokine、chemokine、adhesion molecule、growth factor、extracellular matrix に属する IL-1 α 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF α 、E-selectin、fibrinectin、ICAM-1、VCAM-1、TGF- β 、bFGF、collagen I、collagen III、collagen IV を TaqMan 法で、攣縮血管での発現量を経時的に検討したところ、IL-1 α 、IL-6、IL-8、ICAM-1 は出血から7日目に最も上昇しており、collagen I は14日目に最も上昇していた。

以上から、脳血管攣縮は、炎症に関係する血管壁での反応が、血管の持続的な収縮に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

今回はイヌ脳血管攣縮モデル(ヒトの脳血管攣縮に最も近いとされる)を作成し、攣縮血

管より RNA を抽出し、mRNA differential display 法、DNA アレイ法、さらに Taq Man 法を用いて攣縮血管に多く発現する遺伝子を

網羅的に検索し、攣縮に至る脳血管での遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。解析には専用ソフトを用い、脳血管攣縮に到る遺伝子発現調節機構を解明する。

さらに、最終的には、イヌ脳血管由来 cDNA ライブラリーより作製した一万個以上の cDNA を用い、マイクロアレイを作製する。これにより、イヌを用いた脳血管障害の研究にはどのようなものにも対応可能となる。

B. 研究方法

1. イヌも膜下出血モデルの作成

くも膜下出血モデルは大槽 2 回注入法を用いる。雑種成犬に挿管し、全身麻酔とする。股動脈よりカテーテルを椎骨動脈まで挿入した。脳血管撮影を行った後、体位を腹臥位とし、大槽を穿刺し、0.3ml/kg の髄液を除去し、0.5ml/kg の動脈血をゆっくり注入した。2 日後に全身麻酔下動脈血を大槽に注入した。7 日目に全身麻酔下、椎骨動脈撮影を行い脳血管攣縮の程度を確認する。開胸し、脳血管の灌流を生理食塩水で行い、開頭、脳をとりだし、脳血管を剥離、凍結保存した。Day0 はコントロール、Day2 は一回の血液注入の後 2 日目に摘出した血管、Day7 は2回の血液注入の後、7 日目に摘出した血管、Day 14 は同様に 14 日目に摘出した血管である。

2. Total RNA の抽出、mRNA differential display 法

摘出した脳動脈から total RNA を抽出する。さらに total RNA より oligo(dT)12 MN primer を用いて相補的 DNA を作成し、PCR の鋳型とする。Oligo (dT)12 MN primer を [g-32P]ATP を用いて末端標識し、これと 21 種類の任意の上流 primer と組み合わせて

PCR を行ない、ポリアクリルアミドゲルに PCR 産物の display を行った。

3. 特異バンドの同定、塩基配列の決定

Day 0, Day 2, Day 7 の各群で display されたバンドを比較し、Day 0 群と比較し Day 2, Day 7 群で異なる発現レベルを示したものを特異バンドとした。発現パターンの再現性を高めるために、4ないし5組のそれぞれのグループの脳底動脈から別々に total RNA を抽出し、differential display を行い、3組以上で同じ発現パターンを示すものを脳血管攣縮に関連した特異バンドとしてゲルから切り出した。これを鋳型とし同じ組み合わせの primer を用いて、2回目の PCR を行い再増幅を行った。この PCR 産物をプラスミドベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定した。

4. RT-PCR と塩基配列の解析

得られた塩基配列を基に RT-PCR に用いる特異的 primer をデザインした。各群の total RNA を鋳型に oligo(dT)12-17 primer を用いて相補的 DNA を作成した。これを鋳型に特異的 primer を用いて RT-PCR を行い、実際に遺伝子の発現量に変化が生じていることを autoradiogram で確認した。RT-PCR で実際に遺伝子の発現量に変化が生じていることが確認された DNA の塩基配列を GeneBank により検索し、攣縮血管で発現に変化を生じている遺伝子を決定した。

5. Complementary DNA expression array 法

Total RNA から messenger RNA を精製し、これを鋳型に逆転写反応により cDNA プローブを作製した。Day0 と Day 7 群のプローブを用いて 588 個の既知遺伝子がプロットされて

いる Atlas human cDNA Expression Array フィルター2枚にそれぞれハイブリダイゼーションし、オートラジオグラムにより脳血管で発現している遺伝子および2群間で発現レベルが変化している遺伝子を検索した。攣縮血管で発現レベルに変化を認めた遺伝子については RT-PCR で発現レベルの変化を確認した。

6. TaqMan 法を用いた quantitative RT-PCR cytokine、chemokine、adhesion molecule、growth factor、extracellular matrix に属する IL-1 α 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF α 、E-secretin、fibrinectin、ICAM-1、VCAM-1、TGF- β 、bFGF、collagen I、collagen III、collagen IV をイヌに特異的な primer を作製し、TaqMan 法で、攣縮血管での発現量を Day 0、Day 2、Day 7、Day 14 のグループで検討した。

7. イヌ脳血管 EST: expression sequence tag の作製
質の高い DNA マイクロアレイを作製するために、イヌ脳血管 EST を作製する。我々がすでに保有しているイヌ脳血管 cDNA ライブラリーは ZAPII というベクターに組み込まれているため容易にプラスミド DNA を抽出する事が可能である。抽出したプラスミド DNA に組み込まれたイヌ脳血管で発現している mRNA の塩基配列を順次決定し、その EST を作製する。得られた EST のホモロジーサーチを行い、イヌ脳血管で発現している遺伝子 1 万種類以上を目標に同定する。脳血管の EST が作製されれば、脳血管で発現している遺伝子が解明され、脳血管攣縮のみならず、

脳血管を病変の主座とするあらゆる疾患の研究は加速される。

8. DNA マイクロアレイの作製とハイブリダイゼーション

プローブ DNA をスポットイングして DNA マイクロアレイを作製する。コントロールおよび脳血管攣縮の脳血管より抽出した mRNA を蛍光ラベルして cDNA プローブを作製、マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションし、脳血管攣縮時に変化する遺伝子を検索する。スキャナーで読み取り、各クローンを対応させ、解析ソフトを用いて解析する。

C. 結果

1. 脳血管攣縮モデル

図 1 に示すごとく、脳血管撮影より、Day 2、Day 7 群で有意に血管径の狭小化を認め、その程度は有意に Day 7 で強かった。

2. mRNA differential display

105 組の primer について differential display を行い、発現量に変化が生じていた 40 種類の特異バンドを得た。その塩基配列を決定したところ、一部に重複があり 26 種類の異なる塩基配列を得た。RT-PCR を行い、実際に攣縮血管で発現量に変化が生じていることが確認された塩基配列はそのうち 16 種類であった。塩基配列の解析を行った結果、8 種類の既知遺伝子との相同性を認め、8 種類の塩基配列は既知遺伝子と相同性を認めなかった。

既知遺伝子は以下である: IHRP cystatin B, PDI ASM-like PDE Alu sequence SAA frizzled 6 BiP。これを表 1 に示した。

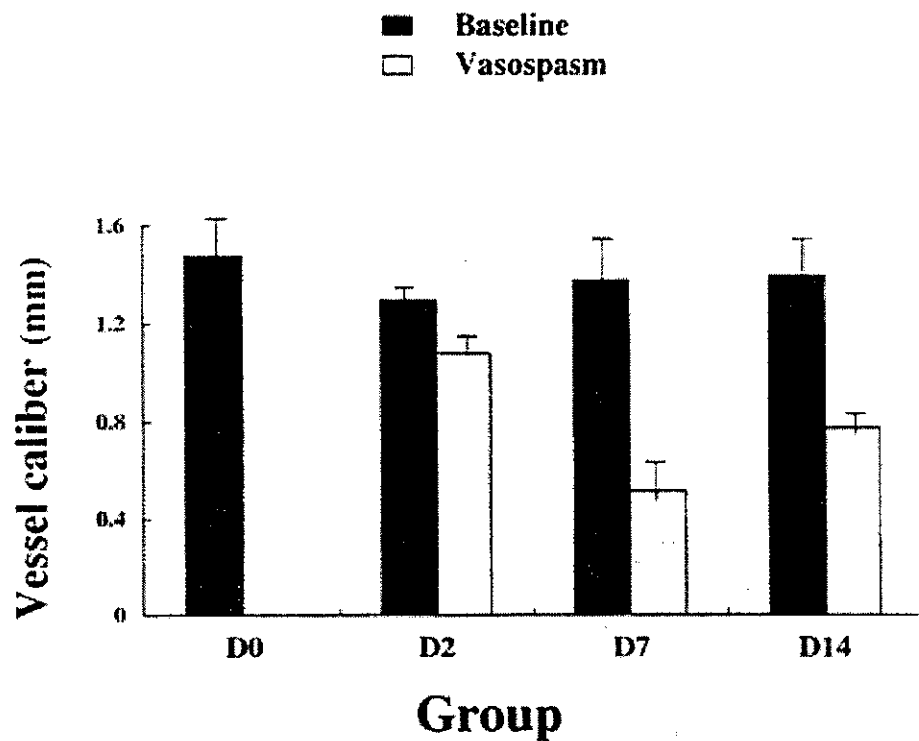


Figure 1. Graph showing change in vessel caliber of basilar arteries after cisternal injection of blood. Bars represent mean \pm SD. Significant reduction in vessel caliber was recognized on angiograms in D2, D7, and D14 groups compared with D0 baseline (n=5, each group). There was no difference in vessel caliber at baseline between groups. There was a significant difference in vessel caliber between D0, D2, D7, and D14 groups ($P < 0.0001$).

図1

3.cDNA expression array 法

フィルターにプロットされた 588 種類の既知の遺伝子のうち 3 個の oncogene と 5 個の cell cycle control protein、3 個の modulator、1 個の stress response protein、7 個の apoptosis associated protein、2 個の DNA repair protein、12 個の DNA binding/transcription factor、3 個の cell surface antigen、7 個の

growthfactor/chemokine をコードする遺伝子および 6 個の house keeping protein の合計 49 種類の遺伝子の発現を脳血管で認めた。このうち、4 種類の遺伝子 (GADD45、MCP-1、neuromodulin、VEGF) の攣縮血管での発現レベルの上昇を RT-PCR で確認した。

表 Expression pattern and sequence homology of cDNA fragments identified by mRNA differential display

Band	expression pattern			sequence homology
	Day0	Day2	Day7	
DVS2	→	↓	↓	no
DVS4	→	↑	↑↑	IHRP
DVS5	→	↑	↑	cystatin B
DVS11	→	↑	↑↑	PDI
DVS14	→	↑↑	↑↑↑	ASM-like PDE
DVS15	→	↑	↑	no
DVS16	→	↑	↑	no
DVS22	→	↑↑	↑↑	Alu sequence
DVS23	→	↑	↑	no
DVS26	→	↑↑	↑↑↑	SAA
DVS27	→	↑↑	↑↑↑	no
DVS28	→	↑	↑	no
DVS29	→	↓	→	frizzled 6
DVS30	→	↑	↑	BiP
DVS31	→	↑	↑	no
DVS37	→	↑	↑	no

IHRP: inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chained-related protein

PDI: protein disulfide isomerase-related protein

ASM-like PDE: acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase

SAA: serum amyloid A protein

表1

4. TaqMan 法を用いた quantitative RT-PCR
 攣縮血管での発現量を経時的に検討したと
 ころ、IL-1a IL-6 IL-8 ICAM-1 は出血から 7

日目に最も上昇しており、collagen I は 14 日
 目に最も上昇していた。これらの結果は以下
 の図に示す。

Cytokine/Chemokine

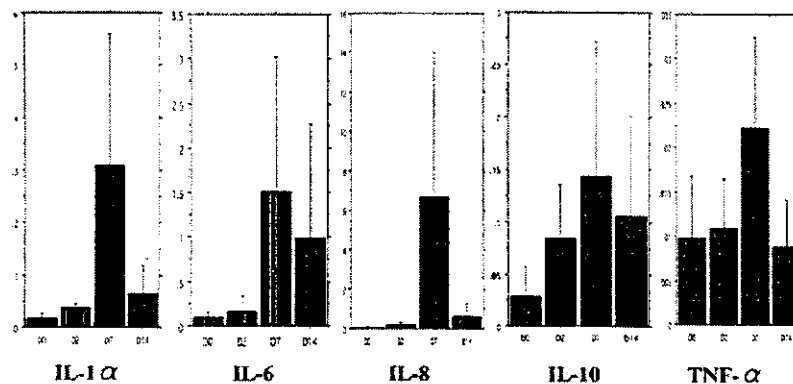


Figure 2. Levels of mRNA expression for cytokine/chemokine (IL-1a, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF-a) in basilar artery after SAH. Expression levels are expressed as relative ratios in C₁ values for these genes to β-actin. Bars represent mean±SD (n=5, each group). There were significant differences of IL-1a, IL-6, IL-8, and TNF-a mRNA between D0, D2, D7, and D14 groups (P=0.0075, 0.1039, 0.0310, and 0.0354. ANOVA; P=0.0079, 0.0196, 0.0040, and 0.0648, Kruskal-Wallis).

Growth Factor / Extracellular Matrix

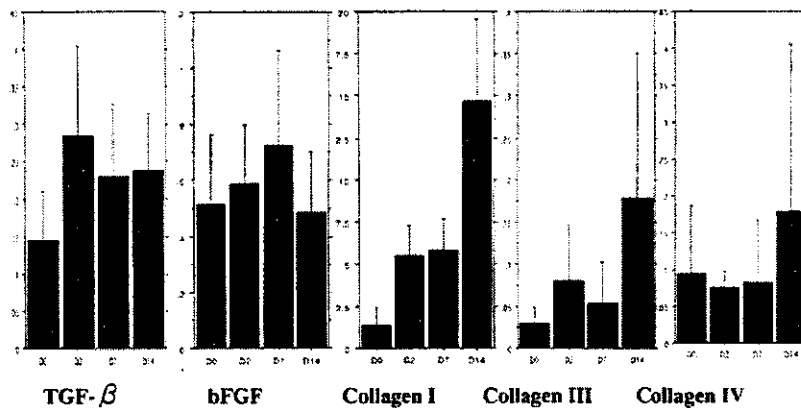


Figure 4. Levels of mRNA expression for growth factor/extracellular matrix (TGF- β , bFGF, and collagen types I, III, and IV) in basilar artery after SAH. Expression levels are expressed as relative ratios in C_t values for these genes to β -actin. Bars represent mean \pm SD (n=5, each group). There was significant difference of collagen type I mRNA between D0, D2, D7, and D14 groups ($P < 0.0001$, ANOVA; $P = 0.0016$, Kruskal-Wallis).

Adhesion Molecule

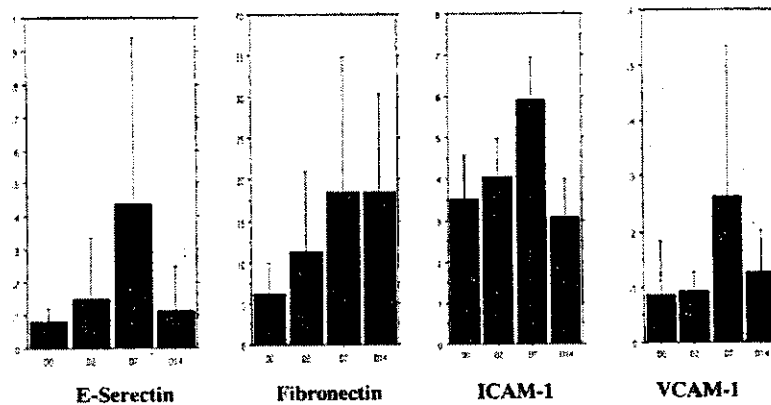


Figure 5. Levels of mRNA expression for adhesion molecule (E-serectin, fibronectin, ICAM-1, and VCAM-1) in basilar artery after SAH. Expression levels are expressed as relative ratios in C_t values for these genes to β -actin. Bars represent mean \pm SD (n=5, each group). There was significant difference of ICAM-1 mRNA between D0, D2, D7, and D14 groups ($P = 0.0017$, ANOVA; $P = 0.0095$, Kruskal-Wallis).

D. 考察

今回の実験で、攣縮血管に発現量の変化を認めた蛋白について考察を述べていく。BiP protein はストレス蛋白の一つで、HSP 70 family に分類される。種々のストレスで誘導され、細胞内では小胞体に局在する。いわゆる分子シャペロンの一つで、蛋白が高次構造をとるための折り畳みや会合を促進する働きがある。また、PDI も細胞内で小胞体に局在し、BiP protein と共同して蛋白の合成を促進する。IHRP cystatin B はともにプロテアーゼインヒビターであるが、攣縮血管でこれらが上昇している理由是不明である。SAA は acute phase protein の一つで、炎症反応の

際に著明に上昇する。攣縮血管で SAA の発現が増加しており、炎症機転の関与が示唆された。最近スフィンゴ脂質が、細胞間シグナル伝達やその制御に役割を果たしていることが知られてきた。今回の実験では、ASM-like PDE の発現量が攣縮血管で上昇しており、スフィンゴ脂質代謝とそのシグナル伝達経路の関与が示唆された。

MCP-1 は monocyte に特異的な遊走因子で、炎症性サイトカインなどの刺激により血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞などで産生される。攣縮血管壁で MCP-1 遺伝子の発現が亢進していたことは、脳血管攣縮の発生、進展に炎症機転が深く関与しているこ

とを示唆する。GADD45はDNAにダメージを与える刺激により発現が誘導される物質で、最近、一過性の脳虚血で発現が誘導されることが報告されている。VEGFは血管内皮細胞に特異的な増殖因子で、低酸素、低グルコースなどのストレスにより発現が強く誘導される。攣縮血管は強い生物学的なストレスにさらされていると考えられる。Neuromodulinはニューロンの発生や再生に関連する物質であるが、脳血管攣縮におけるその発現の亢進の意義は不明である。

MCP-1の上昇や他の炎症性分子の上昇に注目し、サイトカイン、ケモカイン細胞接着因子などの炎症関連分子の脳血管攣縮への関与を系統的に解析した。その結果IL-1 α 、IL-6、IL-8、ICAM-1は出血から7日目に最も上昇しており、collagen Iは14日目に最も上昇していることを見出した。

E. 結論

脳血管攣縮は、炎症に関係する血管壁での反応が、血管の持続的な収縮に関係している可能性が示唆された。

F. 研究発表

【論文発表】

Aihara Y, Kasuya H, Onda H, Hori T, Takeda J: Quantitative analysis of gene expressions related to inflammation in canine spastic artery following subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 32:212-217, 2001

Aihara Y, Onda H, Teraoka M, Yokoyama Y, Seino Y, Kasuya H, Hori T, Inoue I, Kojima I, Takeda J: Assignment of the human gene encoding brain/pancreatic islet-type Na⁺-dependent inorganic phosphate

cotransporter to chromosome 11q14.3. *Cytogenet Cell Genet* 92:167-169, 2001

Kasuya H, Onda H, Kawashima A, Sasahara A, Hori T: Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir [Suppl]*77: 13-16, 2001

Kasuya H, Kawashima A, Sasahara A, Onda H, Hori T: Development of nicardipine prolonged-release implants for preventing vasospasm. *Acta Neurochir [Suppl]*77: 217-220, 2001

Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Takakura K, Hori T, Takeda J, Nakajima T, Inoue I: A genome-wide scan for intracranial aneurysms and a possible involvement of elastin gene. *Am J Hum Genet* 69:804-819, 2001

Kasuya H: Statistical techniques and vasospasm. *J Neurosurgery* 96:381, 2002 (letter)

Kasuya H, Onda H, Takeshita M, Okada Y, Hori T: Efficacy and safety of nicardipine prolonged-release implants for preventing vasospasm in humans. *Stroke* 33: 1011-1015, 2002

竹下幹彦、川俣貴一、糟谷英俊: 中枢神経系の合併症。 *Heart View* 5: 618-624, 2001

竹下幹彦、川俣貴一、糟谷英俊: 髄膜炎の補助療法 ステロイドは有効か。化学療法の

領域 17:1244-1249, 2001

糟谷英俊、恩田英明、竹下幹彦、岡田芳和、氏家弘、堀智勝:未破裂無症候性脳動脈瘤の治療指針。脳卒中の外科 29: 282-285, 2001

糟谷英俊、堀智勝:脳神経領域の突然死。Cardiovascular Med-Surg 3: 433-438, 2001

糟谷英俊、平沢研一、竹下幹彦、岡田芳和、堀智勝:くも膜下出血急性期患者管理:DDGアナライザーを用いて。浅野孝雄、大田富男、その他:脳血管攣縮 vol 16 2001, 中外医学社 pp101-105

糟谷英俊、恩田英明、竹下幹彦、岡田芳和、堀智勝:新しいスパズム治療:ニカルジピンペレットの臨床効果。浅野孝雄、大田富男、その他:脳血管攣縮 vol 16 2001, 中外医学社 pp124-128

糟谷英俊、恩田英明、川島明次、笹原篤、岡田芳和、堀智勝:ニカルジピンペレット(NP)の有効性と安全性。脳卒中の外科(増刊号)29 (suppl): 96-99, 2001

【学会発表】

Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Takakura K, Hori T: A genom-wide search for human intracranial aneurysms genes reveals major susceptibility loci on chromosome 5, 7 and 14. The fourth annual meeting of the AANS/CNS Section on cerebrovascular Surgery and the American Society of Interventional and Therapeutic Neuroradiology. The Big Island Hawaii Feb 9-12, 2001 Abstract pp134

Kasuya H, Onda H, Kawashima A, Okada Y, Hori T: Efficacy of nicardipine prolonged-release implants to prevent clinical vasospasm. The fourth annual meeting of the AANS/CNS Section on cerebrovascular Surgery and the American Society of Interventional and Therapeutic Neuroradiology. The Big Island Hawaii Feb 9-12, 2001 Abstract pp92

Kasuya: Genetic analysis for intracranial aneurysm. Invited lecture in Chonbuk National University, Chonju Korea, January 23, 2002

Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Takakura K, Hori T: Genome-wide linkage and haplotype association studies map intracranial aneurysm to chromosome 7q11. American Association of Neurological Surgeons Annual Meeting. Chicago April 6-11, 2002 Abstract paper 802

Kasuya H, Onda H, Yoneyama T, Hori T: Normoreninemic hypoaldosteronism after subarachnoid hemorrhage. American Association of Neurological Surgeons Annual Meeting. Chicago April 6-11, 2002 Abstract 1034

Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, Sasaki T, Hori T: Association of intracranial aneurysm with haplotype frequency in fibroblast growth factor-1 gene. American Association of Neurological Surgeons Annual Meeting. Chicago April 6-11, 2002 Abstract 1020

Kasuya H: Efficacy and safety of nicardipine