

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム再生医療等研究事業

自律神経関連遺伝子と心不全発症に関する研究

(H12—ゲノム—023)

平成13年度総轄研究報告

主任研究者 石川義弘（横浜市立大学）

平成14（2002）年4月

研究報告書目次

総轄研究報告

石川義弘

自律神経関連遺伝子と心不全発症に関する研究— 1

研究成果の刊行に関する一覧表 — 9

研究成果の刊行物・別刷り — 10

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等） 研究報告書

自律神経関連遺伝子と心不全発症に関する研究 (H12—ゲノム—023)

主任研究者名 石川義弘 横浜市立大学

研究要旨

自律神経関連遺伝子のなかでも申請者が長年に渡って研究してきたアデニル酸シクラーゼに関する遺伝子情報（遺伝子構造の決定、SNP検索および疾患との関連）を検討し、さらに遺伝子操作動物などを用いて、遺伝子機能を検討するのが目的である。本年度の報告では、6型アデニル酸シクラーゼの遺伝子構造、SNPの存在、および5型アデニル酸シクラーゼを標的にした遺伝子操作動物の作成について報告する。

A. 研究目的

全世界的に進められているヒトゲノムプロジェクトは目覚ましい勢いで、従来未知の分野であったヒトを構成する遺伝子情報の分析をおこなっている。ゲノムプロジェクトはヒト遺伝子の全解明であり、そこで得られた情報の医学応用である。本邦での目標の一つは「テイラーメイド治療」の確立であり、究極的には遺伝子情報から疾患発症を予測し、発症以前の段階において薬物治療によって食い止めることである。遺伝子多型を含めて、幅広い疾患において遺伝情報と疾患の関連性が検討されているが、現段階の最大の問題点は遺伝子多型あるいは変異が単なる頻度集計分析にとどまっており、実際にその多型あるいは変異がどのような

機能的意義を持つかの情報に乏しい。これは遺伝子機能解析と遺伝子多型出現分析が必ずしも並行して行われていないからである。少なくとも主要な疾患群、機能遺伝子群においては早急に検討されるべき課題である。

フラミンガムスタディによれば、労作時息切れ、むくみ、呼吸困難など心機能低下による心不全症状は高齢人口の数%に見られる。したがって人口の1/4が高齢者となる21世紀の日本では、百万人以上のお年寄りがこれらの症状に悩むこととなる。また心不全は虚血性心疾患や呼吸器疾患などの誘因ともなり、急性期の診断および治療や入院にかかる費用、あるいは慢性期のリハビリ、さらには社会復帰後の受け入れに必要な費用など、

国民医療費の増大に拍車をかけることが予想される。これは医療費がすでに高沸している我が国にとっては回避せねばならない優先事項である。また一方では、心不全の諸症状により、日常生活を営む上での活動制限を受け、なによりも高齢者の QOL を著しく低下させ、国民福祉の観点からも著しい負のインパクトをおよぼす。

心機能低下は加齢変化の古典的現象であるが、個人差が大きい。動物モデルやヒト心不全心筋組織を用いた研究からは自律神経系の異常が強く関与していることがわかっている。アデニル酸シクラーゼをはじめとする自律神経関連因子は心臓の自律神経制御の中心となるが、その遺伝子変化（多型および変異）と疾患との結びつきについては不明である。申請者の研究室では過去 10 年間にこれらの因子の機能および構造解析をおこなってきた。本申請ではそれらの研究結果と遺伝子情報をフィードバックさせつつ心不全の病因としての遺伝子変化メカニズムの検討をおこなう。

B. 研究方法

我々は当初の標的を自分達によってクローニングされたアデニル酸シクラーゼを中心にしぼり、自律神経制御に関与する遺伝子（カテコラミン受容体、G 蛋白質など）における遺伝子情報と心不全の病態を関連させて検討していく。最終目標は「高齢期における心不全発症に、自

律神経制御因子が遺伝子レベルでどのように関与するか」の検討であり、3 年計画の 2 年目である。

蛋白質の検出方法 アデニル酸シクラーゼの機能および発現測定の際にもっとも問題となるのが、本酵素の蛋白としての希少性であり、これは免疫ブロッティング法などの通常の検出方法では、測定が困難である事を意味する。そこで我々は、心臓をはじめとする組織におけるアデニル酸シクラーゼ発現定量を容易に行なえる方法の開発を試みた。

遺伝子構造解析 さらに我々は心臓の cAMP シグナルの基幹部分をなすアデニル酸シクラーゼのサブタイプにおいて、6 型サブタイプに目標を絞り遺伝子構造の解析を行った。既存のデータベースと我々のもつ 6 型アデニル酸シクラーゼの遺伝子配列を元に、遺伝子構造を決定した。これにあたっては、コンピュータデータベースに既に存在するゲノム情報と我々の有する情報を照らし合わせるにより、イントロンおよびエクソン構造、および両者の接合部の推定を行った。さらに、既に遺伝子構造が判明している 9 型アデニル酸シクラーゼの構造を元にして、比較検討しながらおこなった

多型性解析 白人における 6 型サブタイプのシーケンスと、日本人におけるシーケンスを比較した。これにあたっては、横浜市立大学医学部病院において内科、外科、病理部門の各共同研究者である梅村敏、北村均、高梨吉則の協力

の元に、患者血液検体を採集し白血球を分離し、そこより抽出されたDNAをもとにして、PCRにより標的部分を増幅し、遺伝子配列解析をおこなった。

遺伝子操作動物の作成 5型アデニル酸シクラーゼを欠損させた動物モデルを作成した。これはホモログスリコンビネーション方法によって同遺伝子を破壊したプラスミドを作成し、これをマウスES細胞に導入することにより、5型アデニル酸シクラーゼのみを選択的に破壊した動物個体を産生するものである。

倫理面への配慮

患者検体利用にあたっては、厚生労働省のガイドラインに従っておこなった。具体的には以下に準じた。

対象となる患者の人権擁

本研究に参加するかは本人の意志に基づくものであり、不参加の際にも現在あるいは今後受ける治療などに不利益が生じないことを保証する。同意の得られた患者鑿から、検体および臨床情報を収集するが、機密保持のための責任者を設定し、主任申請者（本申請者）に送付する時点に於いて検体および臨床情報の匿名化を行い、さらに将来発表された情報から特定の個人が特定できないようにする。また、患者にはいつでもこの研究から離脱できる事を保証する。

インフォームドコンセントの確認

検体を提供していただく患者には説明文書「研究協力依頼書」を渡し、かつ説明を行う。遺伝子解析の意味、研究内

容、研究者などを明確にし、承諾書「遺伝子解析に関する承諾書」にサインを頂く。検体保存場所および保存責任者を明記し、承諾書は本学において保管する。

C. 結果

蛋白質の検出方法 密度シヨ糖勾配法軽分画に含まれる蛋白量は、総細胞蛋白の数%に過ぎないため、この方法をアデニル酸シクラーゼの免疫ブロッティング方法に応用する事により、市販の抗体を用いて今まで困難とされていたアデニル酸シクラーゼをサブタイプ毎に検出定量する事に成功した。今後ゲノムの研究成果と相まって、今後蛋白レベルのでの遺伝子多型性および変異の持つ意義を検討するに当たって有力な道具となると考えられ、今後の計画遂行の実現性を高める事となった。

遺伝子構造解析 6型アデニル酸シクラーゼはヒト第12染色体上の12q12-q13に存在し、全長14万bpの巨大な遺伝子構造を持つ事がわかった。合計21のエクソンからなるが、従来言われていたスプライス変異体は14番目のエクソンのスプライシングによって生成されることが明かとなった。さらに特徴的な事は、5'上流域のいわゆるN末端細胞質ドメインからTM1と総称される前半部分の膜貫通ドメインが長さ1kb前後の巨大単一エクソンと、3'側の非翻訳領域に最低2kb以上ある巨大なエクソンからなっている事である。こ

の部分は各アデニル酸シクラーゼサブタイプ間でもアミノ酸配列の多様性が大きい部分とされており、はたして全てのサブタイプにおいて同様のエクソン構造がなされているのかは今後の検討課題である。以上から、同遺伝子のサイズは、当初の我々の予測をはるかに上回るものであることが事実となった

多型性解析 第2細胞質ドメイン（いわゆるC2ドメイン）のイントロン部分において数個のポリモルフィズムが認められたが（TT/TA/AA）、現在の所これが人種差によるものなのか、何らかの疾患と関係するものかは不明である。発現頻度では266人中、162、92、12人であった。また、アミノ酸位508番において、グリシンからアラニンへの遺伝子変異が存在する可能性が示された。同部位は酵素活性ドメインに相当するため、変異株における酵素活性変化も推定される。今後、他部位を含めて詳細を検討していく。

遺伝子操作動物の作成 ホモログスリコンビネーションを用いて5型アデニル酸シクラーゼを欠損させた動物モデルを作成した。同モデルにおいては心臓の他のサブタイプによる代償は見られず、純然としたアデニル酸シクラーゼ欠損がえられた。アデニル酸シクラーゼ活性においては3—4割の減弱が見られた。心機能低下はみられないものの、副交感神経刺激が現弱している可能性が考えられた。

D. 考察

我々の研究と既存のデータベース活用により、さまざまな遺伝子情報と生化学的な手法による解析結果が統合されつつある。自律神経関連遺伝子としてもっとも重要な位置をしめるcAMP産生酵素であるアデニル酸シクラーゼのなかでも心臓に優位な発現を示す6型の遺伝子構造が決定された。さらにその発現を定量するための手段であるウエスタンブロットの手法が確立された。このことは、SNPなどの変異が発見された個体において、蛋白レベルでの発現量を検討することができることを意味する。したがって、両者の同定は今後の研究に大きな影響を及ぼすと思われる。

さらにわれわれの研究によって、少なくともひとつ以上のSNPが6型アデニル酸シクラーゼ遺伝子に存在することがわかった。TT/TA/AA分類のうち、AA型は4.5%において見られるのみであり、今後この変異と疾患の発現頻度との関連を検討していく予定である。我々の当初の予定では、心機能の関連が持っとも疑われるため、心筋症などの先天性心不全疾患との関連を中心に検討していく予定である。

さらに我々は、遺伝子操作動物の検討により、心臓におけるアデニル酸シクラーゼの型発現が、自律神経調節に重要な役割を果たしている可能性を発見した。この発見は、ゲノム分析において、アデニル酸シクラーゼの変異がどのような自

律神経調節異常をおこすかを予測する上でも重要な発見であると考えられる。

E. 結論

アデニル酸シクラーゼは心機能維持および心不全の発展に重要な役割を果たす酵素であり、特有の遺伝子構造およびSNPを有する。SNPの発現頻度は、疾患関連分析が可能な程度である。また、遺伝子操作動物を用いての機能解析も可能である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

雑誌発表

1. Ishikawa Y, B Seth Grant, Okumura S, Schwencke C, and Yamamoto M: Immunodetection of adenylyl cyclase protein in tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 162; 107-112, 2000
2. Kawabe J, Grant S B, Yamamoto M, Schwencke C, Okumura S, and Ishikawa Y: Changes in caveolin subtype protein expression in aging rat organs *Mol. Cell. Endocrinol.* 176; 91 - 95, 2001
3. Fujita T, Toya Y, Kousaku Iwatsubo K, Onda T, Kimura K, Umemura S, and Ishikawa Y: Accumulation of molecules

involved in $\alpha 1$ -adrenergic signal within caveolae; caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Res.* 51; 709-716, 2001

4. Onda T, Hashimoto Y, Nagai M, Kuramochi H, Saito S, Yamazaki H, Toya Y, Sakai I, Homcy CJ, Nishikawa K, and Ishikawa Y: Type-specific regulation of adenylyl cyclase; selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J. Biol. Chem.* 276; 47785-47793, 2001
 5. Iwatsubo K, Tao Y, Onda T, Toya Y, Schwencke C, Fujita T, Ebina T, Iwamoto T, Hori H, Umemura S, and Ishikawa Y: Characterization of beta adrenergic receptor sequestration by newly developed whole cell binding assays. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* in press 2002
- ### 2. 学会発表
1. Fujita T, Toya Y, Iwatsubo K, Onda T, Umemura S, and Ishikawa Y. Accumulation of molecules involved in alpha1-adrenergic signal within caveolae; the role of caveolin in the development of cardiac hypertrophy. *Circulation* 102; II-198, 2000
 2. Nishizuka T, Iwase M, Ishiki R, Nagata K, Takagi K, Nagasaka T, Onda T, Fujita T, Ishikawa Y, Yokota M. Altered beta-adrenergic signaling at the onset of

- left ventricular dysfunction in cardiomyopathic hamster. *Circulation* 102; II-102, 2000
3. Iwatsubo K, Tao Y, Onda T, Fujita T, Umemura S, and Ishikawa Y. NKH477, a new inotropic reagent that directly stimulates adenylyl cyclase, does not cause the beta-adrenergic receptor downregulation; demonstration using a newly developed whole cell binding assays. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37, 272A, 2001
 4. Consistent effects of growth hormone on LV function in early and advanced state of heart failure in cardiomyopathic hamsters. Nishizawa T, Iwase M, Kanazawa H, Nagasaka T, Hasegawa T, Ishiki, Somura F, Izawa H, Ishikawa Y, Yokota M. *J. Am. Coll. Cardiol* 37, 177A, 2001
 5. Nishizawa T, Iwase M, Takagi K, Kanazawa H, Fujita T, Ishikawa Y, Izawa H, and Yokota M. Ischemia may induce attenuated adenylyl cyclase activities in TO-2 cardiomyopathic hamsters. MI 2001, *Scientific Conference on Molecular, Integrative, and Clinical Approaches to Myocardial Ischemia*, 2001
 6. 恩田健、永井昌史、斎藤清一、山崎弘子、倉持浩、西川清、石川義弘。アデニル酸シクラーゼをサブタイプを標的にしたカテコラミンシグナル調節 第74回日本生化学会、京都、2001年10月。生化学 73 ; 761、2001 1P—478
 7. Fujita T, Hashimoto Y, Iwatsubo K, Sakai I, Toya Y, Egawa M, Umemura S, Okumura S, Ishikawa Y: Caveolin 3 inhibits growth signal in cardiac myoblasts in a calcium-dependent manner. *Circulation* 104;II-196, 2001
 8. Onda T, Nagai M, Saito S, Kuramochi H, Yamazaki H, Homcy C J, Nishizawa K, and Ishikawa Y: Development of type V adenylyl cyclase-targeted drugs. *Circulation* 104;II-144, 2001
- H. 知的財産権の出願、登録状況
- 特許申請中
 日本特許申請
 特願2001—154039
 サブタイプ選択的アデニル酸シクラーゼ
 活性化剤
 日本特許申請
 特願2001—153954
 アデニル酸シクラーゼ5型阻害剤

2.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌発表

1. Ishikawa Y, B Seth Grant, Okumura S, Schwencke C, and Yamamoto M: Immunodetection of adenylyl cyclase protein in tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 162; 107-112, 2000
2. Kawabe J, Grant S B, Yamamoto M, Schwencke C, Okumura S, and Ishikawa Y: Changes in caveolin subtype protein expression in aging rat organs *Mol. Cell. Endocrinol.* 176; 91 – 95, 2001
3. Fujita T, Toya Y, Kousaku Iwatsubo K, Onda T, Kimura K, Umemura S, and Ishikawa Y: Accumulation of molecules involved in α 1-adrenergic signal within caveolae; caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Res.* 51; 709-716, 2001
4. Onda T, Hashimoto Y, Nagai M, Kuramochi H, Saito S, Yamazaki H, Toya Y, Sakai I, Homcy CJ, Nishikawa K, and Ishikawa Y: Type-specific regulation of adenylyl cyclase; selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J. Biol. Chem.* 276; 47785-47793, 2001
5. Iwatsubo K, Tao Y, Onda T, Toya Y, Schwencke C, Fujita T, Ebina T, Iwamoto T, Hori H, Umemura S, and Ishikawa Y: Characterization of beta adrenergic receptor sequestration by newly developed whole cell binding assays. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* in press 2002

20010441

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。