

20020417

別添2

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井ノ上 逸朗

平成15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：200200417A

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14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.23～P.32

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14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. MAPK inhibitor(FR167653)の結果—脳血管伸縮および遺伝子発現の変化： イヌくも膜下出血モデルを用いて	9
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	15
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 —培養平滑筋細胞の炎症性刺激に伴うレチノイン酸誘導遺伝子 I の発現 . . .	19
佐藤 敬	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
-------------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	33
---------------------------	----

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

くも膜下出血は重篤疾患で、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。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。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。ゲノム全域を網羅する404のマイクロ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ている。それぞれの領域において、アソシエーション・スタディ、ハプロタイプ解析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。すでにエラスチン遺伝子のハプロタイプ解析で有意な差を得ており、エラスチン、もしくは近傍の遺伝子の関与が示唆された。今回我々は連鎖解析において最も強い連鎖を得た染色体7番の連鎖ピークマーカ-D7S2472を中心とした約4.7Mの領域に焦点をあて、188箇所のSNPを用いた遺伝子スクリーニングを行った。さらに、領域の連鎖不平衡を詳細に検討し連鎖不平衡ブロック構造を明らかにすることで、疾患遺伝子同定手法の確立を目指す。

分担研究者

糟谷 英俊 東京女子医大・脳神経センター
講師

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

な疾患であり、予防医学的対策が求められる。特に予兆なく発症するので、易罹患性遺伝子診断が有効となる疾患であろう。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

A. 研究目的

脳動脈瘤の破裂によるくも膜下出血は重篤

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、患者および対照 DNA サンプル収集が重要であり、責任遺伝子同定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、すでに家系収集を終了している。全国の主要な 1100ヶ所の脳神経外科施設にお願いし、脳動脈瘤 (多くはくも膜下出血) に罹患している 114 同胞対を収集した。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) の収集をおこない、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、フライブルグ大学でドイツ人、Chonbuk 大学で韓国人の患者サンプル収集も開始している。現在までに患者・対照合わせて、日本人 731 例、韓国人 166 例、ドイツ人 5 例収集できている。すべて糟谷の責任のもと臨床データ、個人情報は管理されている。今回の脳動脈瘤遺伝解析研究は、東京女

B-2) 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 SNP

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)。血液からのゲノム DNA 精製は常法に従った。表にはゲノム領域でのスクリーニングに用いたそれぞれ 192 例の患者と対照の臨床データを示す (表 1)。

Table 1 Clinical information of samples for screening

	Cases (n=192)	Controls (n=192)
Age (Ave. ± SD)	60.2 ± 11.7	63.3 ± 13.4
Gender: male/female	62 / 129 (0.32 / 0.68)	108 / 84 (0.56 / 0.44)
SAH: +/-	129 / 61 (0.68 / 0.32)	
FH of SAH: +/-	96 / 96 (0.50 / 0.50)	
Site of IAs:		
A-com	53 (0.26)	
MCA	76 (0.37)	
ICPC	48 (0.23)	
Others	30 (0.14)	
Total	207 (1.00)	
Multiple:	37/192 (0.19)	

FH indicates family history

(single nucleotide polymorphism) 解析をおこなっている。領域の SNP でアソシエーション・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直接シーケンスにより SNP を開発した。タイピングには Taqman PCR 法を採用した。使用するプローブは D7S2472 を中心とした約 4.7 Mb の領域に存在する遺伝子内を中心に登録されている ABI の Taqman Probe を用いた。この方法により、4000 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非常に高い。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。患者・対照間での SNP 頻度差の検定にはカイ検定を用いた。また、患者を 2 群 (家族歴があるものと、孤発例) に分けて対照との検定を行った。患者・対照検定、各 SNP 間の連鎖不平衡解析、ハプロタイプ解析は我々が製作に関与した SNPlyse プログラム (Dynacom) を用いた。

B-3) 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、それ自体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。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) 連鎖領域からの脳動脈瘤関連遺伝子探索

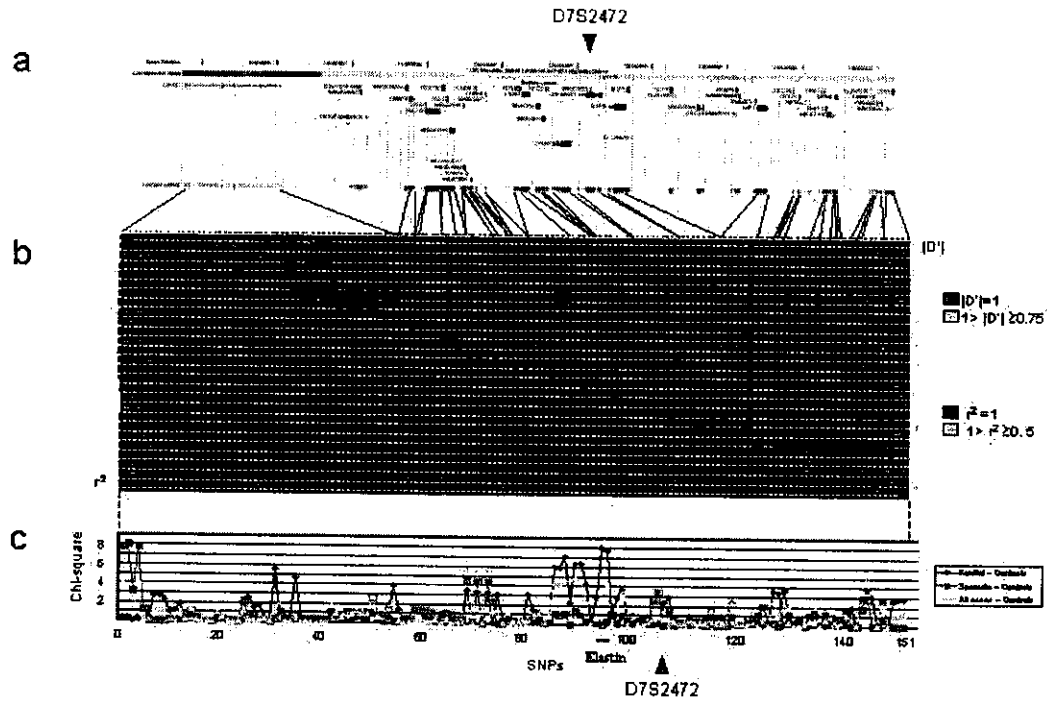
今年度は最も強い連鎖を得た染色体 7 番 q11 領域で詳細な連鎖不平衡マッピングを試みた (図 1)。

最大 lod を認めた D7S2472 領域 4.7 Mb で 188 個の gene-based SNPs をそれぞれ 192 例の患者と対照でタイピングした。領域に存在する遺伝子は 26 個だったので、遺伝子あたり 7 個の SNPs を検討したことになる。

まず、188 個の SNPs についてすべての組み合わせで連鎖不平衡を検討した。連鎖不平衡とはふたつの SNP が連鎖して存在するか、独立して存在するかを検討する手法である。ゲノム領域での連鎖不平衡解析の結果、遺伝子に特有な連鎖不平衡ブロックが存在しており、ゲノム領域をカバーする連鎖不平衡ブロックは存在していなかった。すなわち、疾患遺伝子検索には遺伝子ごとのスクリーニングをおこなう必要性があることが明らかになった。

連鎖領域でのアソシエーション・スタディにより、いくつかの SNPs で有意差を得ている。特にエラスチン遺伝子に存在する SNPs で有意差を得ているので、昨年度示した、エラスチン遺伝子ハプロタイプと脳動脈瘤との関連を反映するものと考えられた。

図1



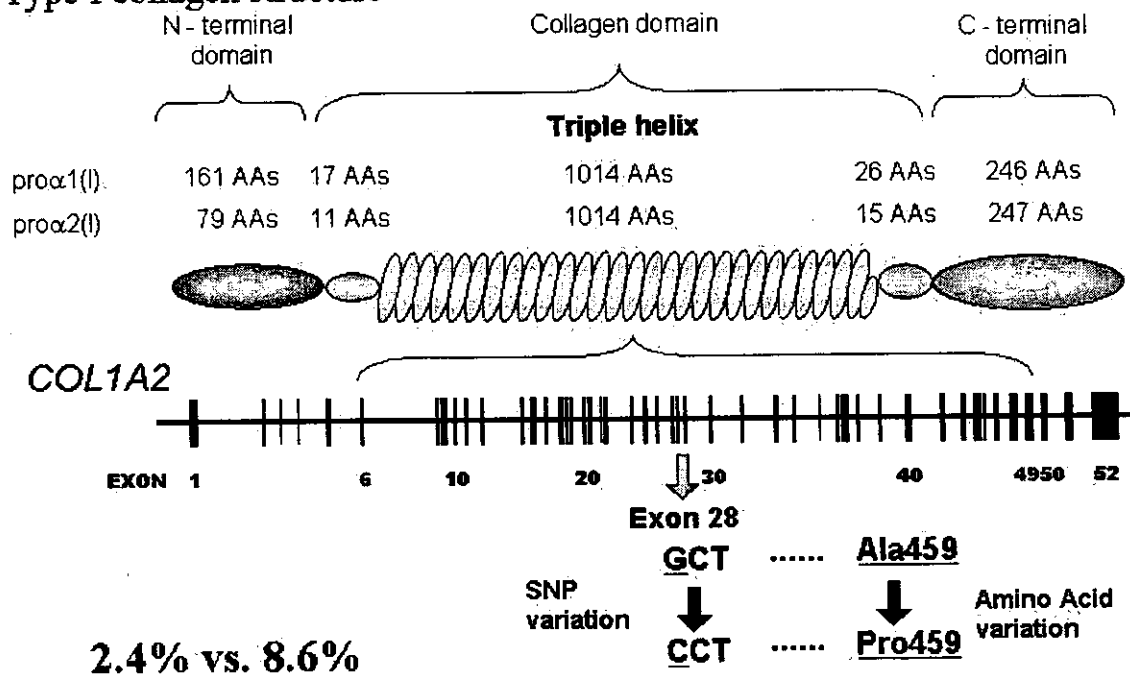
C-2) コラーゲン 1A2 の関与

また候補遺伝子解析も継続しており、7 番染色体連鎖領域に存在していたコラーゲン 1A2 遺伝子での解析を示す。すでに候補遺伝子としてエラスチンの関与を示してきたが、同じ細胞外マトリックスタンパクをコードしているコラーゲン 1A2 遺伝子を候補と考え、アソシエーション・スタディをおこなった。コラーゲン 1A2 遺伝子のエクソン 28 に存在し Ala から Pro への置換をきたす SNP 頻度は脳動脈瘤患者で 8.6%、対照 2.4%であり、有意差は $P=0.00087$ であった (図 2)。またアミノ酸置換はコラーゲンドメインのトリプルヘリックスの Gly-X-Y の Y 位置の置換であった。この多型による機能変化を検討するために、人工ペプチド合成による検討を

試みた。Gly-Pro-Pro をくり返すペプチドは溶液中でトリプルヘリックスを形成することが知られている。10 回くり返すペプチドを合成し実験に用いている。実際に Gly-Pro-Pro のくり返しペプチドの中心に Ala を配置したペプチドを合成し、円二色性分散解析で検討した。どちらのペプチドも溶液中でトリプルヘリックスを形成したが、温度感受性を検討すると、Gly-Pro-Pro タイプが Gly-Pro-Ala タイプより安定であることが示された。よって Ala から Pro 置換に伴う機能変化が示唆され今後脳動脈発生との関連を検討する。

図2

Type I collagen structure



$\chi^2=11.08, df=1, P=0.00087, odds\ ratio=3.19 (95\%C.I.=2.22-6$

D. 考察

近年、Common Disease の責任遺伝子座が相次いでマッピングされているものの、Common Disease の責任遺伝子同定は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、気管支喘息における ADAM33 など少ない。疾患遺伝子が同定できても、大きな機能変化は期待できないので、疾患発症メカニズムを明らかにすることは困難を伴う。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クローニングによる遺伝子同定を目指す。ゲノム全域での連鎖解析により、3ヶ所に候補領域を絞ることができ、7q11-21 で最大ロッド値 3.22 を得た。7q11-21 での連鎖ピークは D7S2472 で認めており、すでにエラスチン遺伝子が脳動脈瘤と関連することを示している。しかしながら機能変化と結びつく遺伝子多型の同定にはいたらなかった。

そこで、この領域の体系的なスクリーニングをおこなうことを試みた。領域 26 遺伝子、188 SNPs をもちいゲノム領域での連鎖不

平衡マッピングをおこなった。ゲノム領域からのスクリーニングでもエラスチン領域に有意差を有する SNP を検出でき、候補遺伝子としてのエラスチン遺伝子同定と考えあわせると、エラスチンもしくは近傍の遺伝子が脳動脈瘤発症と関与している可能性が強く示唆された。

E. 結論

ゲノム全域連鎖解析の結果、脳動脈瘤（多くはくも膜下出血）の遺伝子座を染色体 7 番に特定できた（最大 LOD=3.22 at D7S2472）。連鎖領域（4.7 Mb）での 188 個の SNP タイピングによるポジショナル候補クローニングの結果、エラスチン遺伝子の関与が強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Inoue I, Onda H, Kasuya H, Yonayama T. 2003. A genome-wide linkage and a haplotype association studies mapped intracranial aneurysm to elastin locus on chromosome 7. *Excerpta Medica, ICS 1244*, in press

Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, Akagawa H, Jinnai N, Nakajima T, Inoue I. 2003. Association of positional and functional candidate genes FGF1, FBN2, and LOX on 5q31 with intracranial aneurysm. *J Hum Genet* in press

Ikeda R, Furukawa T, Mitsuo R, Noguchi T, Kitazono M, Okumura H, Sumizawa T, Haraguchi M, Che XF, Uchimiya H, Nakajima Y, Ren XQ, Oiso S, Inoue I, Yamada K, Akiyama S. 2003. Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 358-363.

Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Hori T, Nakajima T, Inoue I. 2003. Endoglin is not a major susceptibility gene for intracranial aneurysm among Japanese. *Stroke* in press

Shimo-onoda K, Tanaka T, Furushima K, Nakajima T, Toh S, Harata S, Yone K, Komiya S, Adachi H, Nakamura E, Fujimiya H, Inoue I. 2002. Akaike's information criterion for an alternative measure of linkage disequilibrium. *J Hum Genet* 47, 649-655.

Maeda S, Nobukuni T, Shimo-onoda K, Hayashi K, Yone K, Komiya S, Inoue I. 2002. Sortilin is up-regulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. *J Cell Physiol* 193, 73-79.

Kobayashi Y, Nakajima T, Inoue I. 2002. Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *Eur J Biochem* 269, 4701-4710.

Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata A. 2002. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet* 47, 400-406.

Rohrwasser A, Zhang S, Dillon HF, Inoue I, Callaway CW, Hillas E, Lalouel JM. 2002. Contribution of Sp1 to initiation of transcription of angiotensinogen. *J Hum Genet* 47, 249-56.

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.

Furushima K, Shimo-onoda K, Maeda S, Nobukuni T, Ikari K, Koga H, Komiya S, Nakajima T, Harata S, Inoue I. 2002. Large scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Miner. Res.* 17, 128-137.

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.

坂上拓郎 中島敏晶 井ノ上逸朗 遺伝子多型の意義と解析法
Surgery Frontier メディカルレビュー社 10(1)8-12, 2003.

2. 学会発表

52nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics

【Baltimore, USA】October, 2002

Deficient alleles (S and Z) of alpha-1 antitrypsin gene among patients with intracranial aneurysm in Japanese population

T. Yoneyama¹, H. Onda², H. Kasuya², T. Nakajima¹, H Hori², I. Inoue¹.

¹Division of Genetic Diagnosis, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ²Neurosurgery, Tokyo Women's Medical University;

52nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics

【Baltimore, USA】October, 2002

Natural selection may have impact to maintain linkage disequilibrium at interleukin-4/ interleukin-13 region on chromosome 5q31-33

T Sakagami¹, T Nakajima¹, N Jinnai¹, T Hasegawa², E Suzuki², F Gejyo², I Inoue¹

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

²Division of Respiratory Medicine, Graduate

School of Medical and Dental Science,
Niigata University

H. 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

MAPK inhibitor(FR167653)の効果—脳血管攣縮および遺伝子発現の変化：
イヌくも膜下出血モデルを用いて

分担研究者 糟谷英俊 東京女子医科大学脳神経外科 講師

研究要旨

くも膜下出血後の脳血管攣縮の原因は十分には解明されていないが、攣縮血管壁の遺伝子発現を検討すると炎症に関与するサイトカインの上昇がみられた。そこで我々は、炎症に関与するIL-1 β やTGF- α の suppressant である MAPK inhibitor(FR167653)を犬二重出血モデルに投与し、効果を判定した。モデルにFRを1mg/kg/day投与し(n=7)day0およびday7に脳血管撮影を行ってその効果をプラセボ群(n=7)と比較した。また脳血管における炎症系サイトカインの遺伝子発現量をTaqMan quantitative RT-PCRを用いてコントロール群(n=7)と比較した。プラセボ群では著明な脳血管攣縮を認めたが、薬剤投与群では脳血管攣縮が有意に抑制されていた(P<0.05)。薬剤の血中濃度との関係は、血中濃度の高いものほど脳血管攣縮が抑制されていた。脳血管のIL-8の遺伝子発現量はプラセボ群では著明に上昇し、薬剤投与群で抑制されていた。MAPK inhibitor(FR)は血中濃度に相関して脳血管攣縮を抑制するものと思われ、その経路には炎症系サイトカインの関与が示唆された。

A 研究目的

くも膜下出血後の脳血管攣縮の原因は、現在においても十分には解明されていない。しかし脳血管攣縮において蛋白、遺伝子レベルで変化が起こっており、これが一因となっているのは間違いない。これまで我々は、イヌくも膜下出血モデルにおける脳血管壁において、どの遺伝子が最も脳血管攣縮に関与しているのかを differential mRNA display, cDNA expression array, RT-PCR, TaqMan systemなどの手法を用いて検索してきた。なかでも特に IL-6, IL-8, MCP-1, ICAM-1 などの炎症に関係する遺伝子の発現

が著明に上昇していることが分かっている。そこで今回、抗炎症作用を持ち IL-1 β やTNF- α の suppressant として知られる p38MAPK inhibitor (FR167653)をイヌくも膜下出血モデルに投与し、その効果を脳血管撮影にて検討し、TaqMan quantitative-realtime RT-PCRにて脳血管壁の遺伝子発現を解析した。

B 研究方法

くも膜下出血モデルには雑種成犬大槽内自家動脈血2回注入モデルを用いた。コントロール群(n=5)および、くも膜下出血モデ

ル(n=10)の FR167653 投与群(n=5)とプラセボ投与群(n=5)を比較検討した。雑種成犬に挿管し全身麻酔下に体位を腹臥位とし、大槽穿刺にて 0.3ml/kg の髄液を除去し 0.5ml/kg の自己動脈血をゆっくり注入する。この後頭部を 15 分間 30 度下げる。これを day0, day2 に行い、くも膜下出血モデルを作成する。薬剤投与法は雑種成犬の静脈にカニューレーションを行い ALZET osmotic infusion pump を皮下に留置し、1mg/kg/day の速度で 7 日間持続的に静脈内投与する。プラセボ投与群では同様の方法にて生理食塩水を投与する。Day7 に全身麻酔下に呼気二酸化炭素分圧を 35-45mmHg に維持し、脳血管撮影による血管径を測定し脳血管攣縮に対する薬剤効果を比較検討する。その後開胸し約 2L の生理食塩水を用いて脳血管を灌流し、脳を摘出し脳底動脈を剥離、冷凍保存し遺伝子レベルでの発現の解析を TaqMan quantitative real-time RT-PCR を用いてコントロール群(n=5)と比較した。

C 結果

薬剤投与群とプラセボ投与群の day7 における day0 に対する血管径の比率を見ると、薬剤投与群では day7 の血管径は平均値 0.75mm であったのに対してプラセボ投与群では平均 0.49mm であり、薬剤投与群において有意に脳血管攣縮が抑制されていた ($P < 0.01$) (表 1)。薬剤投与群ではプラセボ投与群で認められた様な食欲低下や歩行障害などの症状は認められず、その臨床効果は充分なものであったと考えられる。また薬剤の血中濃度との関係は、血中濃度が 0.1 μM (54.3ng/ml) 以上のケースで脳血管攣縮

が抑制されており、血中濃度依存性に脳血管攣縮を抑制する傾向が認められた。脳血管壁の IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α の遺伝子発現量を TaqMan real-time RT-PCR を用いて定量し、コントロール群の値を 1 として各遺伝子の変化を示した (表 2)。各遺伝子ともコントロール群に対しプラセボ群では有意に上昇していた ($P < 0.05$)。IL-1 β においては、薬剤投与群とプラセボ投与群間において統計学的な有意差を認めた ($P < 0.05$)。

D 考察

MAPK は炎症、アポトーシス、骨代謝など様々な生命現象に関与することがいわれており、炎症系サイトカインや osmotic shock、UV light などによって活性化される 3 つの Family が存在する。Raf, MEK1 などによる p42/44MAPK の経路である ERK family、MEK kinase1 による JNK family、そして MKK3, MKK6 を介する p38MAPK family である。p38MAPK pathway は様々な刺激で RAS, Rac1, cdc42, MLKs を介して MKK3, MKK6 を活性化し p38MAPK をリン酸化する。リン酸化された p38MAPK は、転写因子である ELK-1, ATF-2, NF- κ B などに働き様々な遺伝子発現に関与する。これらは neutrophil における IL-8 の発現を促し、TNF- α 、IL-1 β の産生をうながす。また p38MAPK によりリン酸化された MAPKAPK2 は、HSP27 や Caldesmon を介して平滑筋収縮に関与する事が言われている。FR167653 は p38MAPK のリン酸化を阻害することによって、TNF- α 、IL-1 β などの炎症系サイトカインの産生を抑制する抗炎症薬である。

イヌクも膜下出血モデルにおいて、p42/44MAPK inhibitor や p38MAPK inhibitor が髄腔内投与にて脳血管攣縮を抑制したとの報告はあるが、静脈内投与の報告や薬剤投与時の脳血管壁の遺伝子発現を検討した報告はまだ無い。我々は今回の実験において、くも膜下出血後 day7 における攣縮血管壁内の炎症関連メディエーターである各種インターロイキンの発現量の上昇を認めた。これらは MAPK の activator であり、平滑筋細胞の収縮機構を介して脳血管攣縮に関与している可能性が考えられた。次に FR167653 によって脳血管攣縮が臨床症状および脳血管撮影上抑制された。この事から p38MAPK の substrate である MAPKAPK2、HSP27 のリン酸化が抑制され、actin filament の関与する血管平滑筋収縮を抑制した可能性がある。また p38MAPK が NF- κ B の recruitment に関与している事が報告されているが、p38MAPK のリン酸化を FR167653 で阻害した事によって Feedback 機構が働かず、IL-1 β を介した収縮機構が抑制された可能性も考えられる。これらのどちらがより脳血管攣縮に関与しているかは現段階では不明であり、今後の検討課題である。また Tyrosine, Threonine 部位の MAPKK による MAPK のリン酸化は唯一の活性経路であると思われてきたが、最近 p38MAPK の活性化

に関して典型的な kinase cascade である MKK6 が関与しない別の活性経路が存在する事が報告されている。これは p38 α と TAB1(TGF β -activated protein kinase binding protein1)との相互作用に依存しており、p38 の活性化と p38 自己リン酸化を誘導するというものである。このように一つの pathway に関しても我々の予想していない経路の関与が問題となってくる。

今回の実験において我々は p38MAPK pathway が脳血管攣縮の一要因となっており、その inhibitor である FR167653 は十分な脳血管攣縮抑制効果を持つ事を示した。くも膜下出血患者の髄液中では MAPK pathway を介して IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインが上昇していることも知られている。しかし脳血管攣縮に関連する遺伝子は多岐にわたると考えられ、脳血管攣縮において発現レベルが大きく変化する未知遺伝子も報告されている事から、ある特定の遺伝子発現やひとつのシグナル系を解析するだけでは十分な検討がなされたとは言い難い。それゆえ特定のシグナル系や遺伝子でなく、大量の遺伝子について解析を行うことがそのメカニズムの解明には必須である。今後は DNA Microarray 等を用いた網羅的な遺伝子解析が必要と思われる。

Figure legends

图1 p38 MAPK pathway

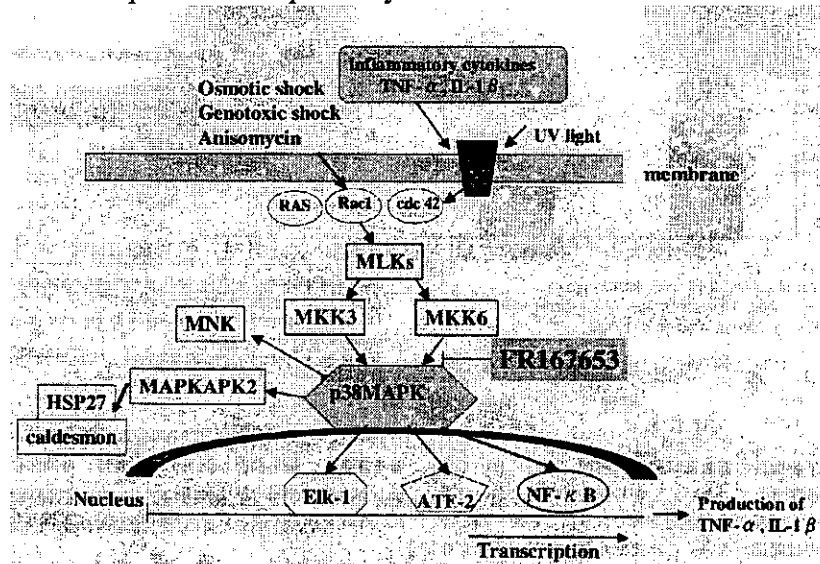


表1 Vessel caliber of FR and placebo group

Data show the vessel caliber of the basilar artery following cisternal injection of blood

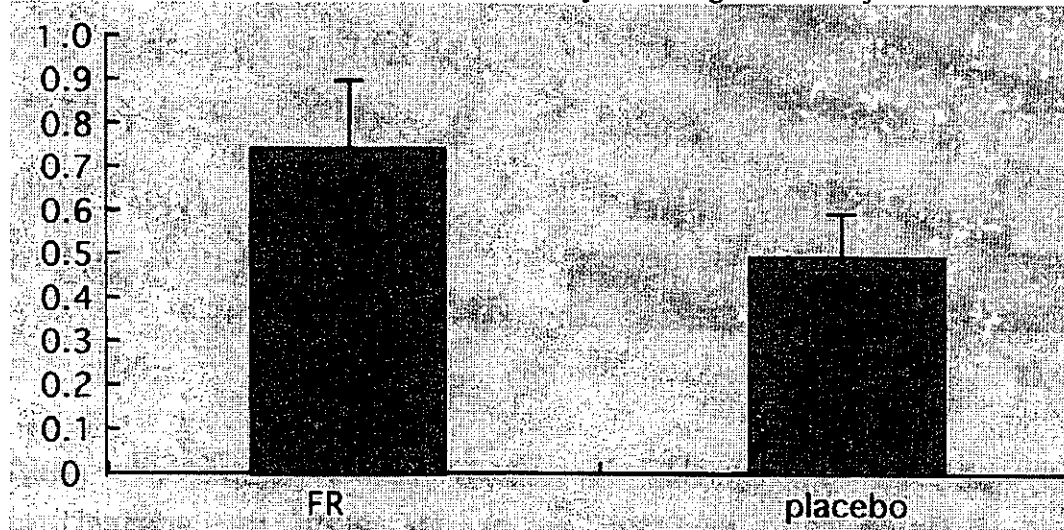


表2 Expression changes of cytokine genes related to inflammation

Data are compared with amount of control group, placebo group, and FR treated group by TaqMan RT-PCR. Data are expressed as relative ratios to the level of gene expressions of control group. There are significant changes in control group and placebo group.

	Control	Placebo	FR
IL-1 α	1	4.94	4.38
IL-1 β	1	5.75	3.47
IL-6	1	8.37	11.30
IL-8	1	33.21	27.61
IL-10	1	4.37	5.14
TNF- α	1	4.56	6.95

E. 結論

MAPK inhibitor(FR167653)は脳血管攣縮抑制効果を示し、しかも脳血管攣縮で上昇する炎症に関係する遺伝子の upregulation を抑制していた。血管壁でのこれらの反応が、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. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

【論文発表】

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

Abe Y, Kasuya H, Suzuki S, Yamanishi Y, Hori T: Effect of a platelet-activating factor (PAF) antagonist, E5880, on cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in a canine double-hemorrhage model. Eur J Pharmacol 455:127-133, 2002

糟谷英俊、堀智勝:IX 小脳テント髄膜腫 テント切痕髄膜腫;subtemporal approach 高倉公朋、斉藤勇、河瀬、寺本明:脳神経外科 Advanced Practice 7 髄膜腫 2002 メジカルビュー社 pp118-127

佐々木寿之、糟谷英俊、恩田英明、藍原康雄、井ノ上逸朗、堀智勝:MAPK inhibitor (FR167653)の脳血管攣縮への効果—イヌく

も膜下出血モデルを用いて— 脳卒中の外科 (増刊号) 30 (suppl): 50-53, 2002

糟谷英俊、恩田英明、佐々木寿之、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(第2報)。脳卒中の外科(増刊号) 30 (suppl): 137-141, 2002

【学会発表】

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 prolonged-release implants for preventing vasospasm in humans. Symposium in honor of Bryce Weir. Chicago April 5, 2002 (invited

lecture)

恩田英明、糟谷英俊、米山琢、高倉公朋、堀智勝：脳動脈瘤の遺伝解析。第27回遺伝医学研究会 東京 2002/3/8

糟谷英俊、恩田英明、岡田芳和、氏家弘、堀智勝：内頸動脈瘤の手術：私達の方法。第31回日本脳卒中の外科学会 仙台 2002/4/25,26

佐々木寿之、糟谷英俊、藍原康雄、恩田英明、堀智勝：MAPK inhibitor (FR167653)の脳血管攣縮への効果：イヌくも膜下出血モデルを用いて 第18回スパズムシンポジウム 仙台 2002/4/26

糟谷英俊、恩田英明、川島明次、岡田芳和、堀智勝：脳血管攣縮予防の現状打開：ニカルジピンペレットを用いて 第18回スパズムシンポジウム 仙台 2002/4/26

米山琢、恩田英明、糟谷英俊、堀智勝：罹患同胞対連鎖解析で得られた5q31領域に存在する脳動脈瘤候補遺伝子の検討 第27回日本脳卒中学会総会 仙台 2002/4/24,25

糟谷英俊：脳血管攣縮 成因、治療、管理 第66回十勝脳神経懇話会 2002/8/23

糟谷英俊、恩田英明、米山琢、堀智勝：脳動脈瘤の遺伝解析 第15回クモ膜下出血研究会 名古屋 2002/4/19

佐々木寿之：MAPK inhibitor (FR167653)の脳血管攣縮への効果：イヌくも膜下出血モデルを用いて 第61回日本脳神経外科学会総会 2002/2-4

糟谷英俊：くも膜下患者の循環血液量モニタリング 第61回日本脳神経外科学会総会 2002/2-4

米山琢：脳動脈瘤罹患者集団における alpha 1-antitrypsin deficiency allele S,Z の頻度について 第61回日本脳神経外科学会総会 2002/2-4

H. 知的所有権の取得状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

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

分担研究者 中島 敏晶 東京大学医科学研究所 助手

研究要旨

罹患同胞対連鎖解析にて同定された脳動脈瘤遺伝子座から、効率良く疾患感受性遺伝子を同定するにはヒトゲノムにおける連鎖不平衡を応用する方法が最も効率的である。そのためにはヒトゲノムにおける連鎖不平衡の成り立ち、およびヒトゲノムの多様性を理解することが不可欠である。我々は遺伝子における連鎖不平衡、ゲノムの多様性に関する理解を深めるために、全世界の16集団（アフリカ4集団、ユーラシア6集団、東アジア6集団）から収集した368人においてヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子領域の塩基配列を詳細に比較した。同定された246個の塩基配列の変化（235塩基置換、10挿入/欠失変異、1マイクロサテライト多型）のうち54個の塩基配列の変化は3つの大陸集団（アフリカ、ユーラシア、東アジア）に共通であり、これらの遺伝子多型による連鎖不平衡の解析では、アフリカ人集団では連鎖不平衡が保たれていないことが確認された。また、各々の大陸集団に特異的な塩基配列の変化も多数存在することが確認され、現在のcommon variant-common haplotypeを中心としたcommon disease感受性遺伝子の同定戦略にも今後留意する必要があると考えられる。

A. 研究目的

我々はゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析法により、脳動脈瘤遺伝子座を5番、7番、14番染色体の各々約20cMのゲノム領域に絞り込んでいる。しかし、この領域には数百個の遺伝子が存在しており、これらの遺伝子と脳動脈瘤との関連を効率良く網羅的に調べるには、ヒトゲノムにおける連鎖不平衡を応用する方法が最も効率的であると考えられる。

連鎖不平衡とは2つ(以上)の変異が連鎖している状態であり、異なった座位のSNPが強い連鎖不平衡にあれば患者・対照関連試験を行った場合に同じような疾患との関連が認められる。つまりあるゲノム領域のひとつのSNPと疾患の関連を調べれば、その変異と連鎖不平衡の関係にある複数のSNPと疾患の関連が明らかになり、連鎖不平衡を利用すれば効率良く膨大な数のSNPと疾患との関連を調

べることができる。この理論を応用したのが連鎖不平衡マッピング法である。しかし、ヒトの遺伝子における連鎖不平衡の成り立ちについては詳細な検討がほとんどなされておらず、理論が先行している点は否めない。また、連鎖不平衡の成り立ちは人種、民族により大きく異なることが予想される。

本研究では疾患感受性遺伝子の解明に不可欠な連鎖不平衡マッピング法を、より実践的なマッピング法として確立するために、ヒトの遺伝子における連鎖不平衡の成り立ち、ヒトゲノムの多様性を明らかにしようとするものである。そのモデル研究として、今回我々はヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子における連鎖不平衡の解明を行った。我々はこれまでに罹患同胞対連鎖解析、および患者・対照関連試験などの分子遺伝学的手法を駆使することにより、本態性高血圧症の疾患感受性遺伝子のひとつとしてアンギオテンシノーゲン遺伝子の関与を明らかにし、疾患と関連する遺伝子多型として、強い連鎖不平衡の関係にある M235T とプロモーター領域の多型 (A-6G) を見い出してきた。common disease の発症に関わるアンギオテンシノーゲン遺伝子内に存在する SNP 間の連鎖不平衡を詳細に検討することは、より実践的な連鎖不平衡マッピング法を確立するうえでのよいモデル研究になるものと考えられる。すでにアンギオテンシノーゲン遺伝子内の責任変異を明らかにしているため、どのように効率

良く連鎖不平衡を利用すれば責任変異を明らかにできるのかを検討することが可能であるからである。

B. 研究方法

1) 対象 全世界の 16 集団 (アフリカ 4 集団、ユーラシア 6 集団、東アジア 6 集団) から収集した 368 人のゲノム DNA。

2) ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子を含む 15kb にわたるゲノム領域の塩基配列決定; 我々がすでに決定したこの領域の塩基配列を基に、必要な PCR および sequence プライマーを作成する。ゲノム DNA を PCR で増幅し、自動シーケンス解析装置 (ABI PRISM3700) を用い、direct sequence 法にて塩基配列を決定する。その塩基配列を比較することにより遺伝子多型を同定する。

2) ヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子領域における連鎖不平衡の検討
遺伝子多型の typing データーを基に各集団での連鎖不平衡の解析を行う。SNP 間の連鎖不平衡は D (Lewontin and Kojima, 1960)、 D' (D/D_{max}) (Lewontin 1964)、 $r^2(D^2/p_1(1-p_1)p_2(1-p_2))$ 、およびカイ検定 (χ^2 値、p 値) にて評価する。

C. 研究結果

全世界の 16 集団 (アフリカ 4 集団、ユーラシア 6 集団、東アジア 6 集団) から収集した 368 人のヒトアンギオテンシノーゲン遺伝子領域の塩基配列を詳細に比較検討した。同定された 246 個の塩基配

列の変化 (235 塩基置換、10 挿入/欠失変異、1 マイクロサテライト多型) のうち 54 個の塩基配列の変化は 3 つの大陸集団 (アフリカ、ユーラシア、東アジア) に共通であった。これらの各集団に共通な遺伝子多型による、遺伝子多型間の距離と連鎖不平衡の関係は、アフリカ人集団ではヨーロッパ、中東、アジアの集団サンプルに比べ連鎖不平衡が保たれていない傾向が確認された。

また、各々の大陸集団に特異的な塩基配列の変化も多数存在することが確認された。

D. 考察

連鎖不平衡の強さは集団サンプルによって異なり、疾患感受性遺伝子の同定には日本人を対象とした詳細な連鎖不平衡の検討が不可欠であると考えられた。また、各々の大陸集団に特異的な塩基配列の変化も多数存在することが確認され、現在の common variant-common haplotype を中心とした common disease 感受性遺伝子の同定戦略にも今後留意する必要があると考えられる。

E. 結論

脳動脈瘤の疾患感受性遺伝子の同定に向け、ヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子領域における詳細な連鎖不平衡の検討をおこなった。今後、この知見をもとに遺伝子多型と脳動脈瘤の関連を効率よく進めていくことが可能であると考えられる。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T, Umemura S, Emi M, Lalouel JM, Inoue I (2002). Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am J Hum Genet.* 70:108-23

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

Furushima K, Shimo-Onoda K, Maeda S, Nobukuni T, Ikari K, Koga H, Komiya S, Nakajima T, Harata S, Inoue I (2002). Large-scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res.* 17:128-37

Shinohara Y, Ezura Y, Iwasaki H, Nakazawa I, Ishida R, Nakajima T, Kodaira M, Kajita M, Shiba T, Emi M (2002). Three TNFalpha single nucleotide polymorphisms in the Japanese population. *Ann Hum Biol.* 29:579-583.