

**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14年度総括研究報告**

**主任研究者 石川義弘(横浜市立大学)**

**平成15(2003)年4月**

## **研究報告書目次**

### **総轄研究報告**

**石川義弘**

<b>自律神経関連遺伝子と心不全発症に関する研究—</b>	<b>1</b>
<b>研究成果の刊行に関する一覧表</b>	<b>— 9</b>
<b>研究成果の刊行物・別刷り</b>	<b>— 10</b>

# 厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム再生医療等) 総括研究報告書

## 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  
分担研究者 梅村敏、北村均、高梨吉則 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「テイルメイド治療」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き、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

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「老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3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、昨年報告した新規検出法をさらに改良した。

**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ことにより、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** 日本人における6型酵素の多型性と心肥大との関連を比較した。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、そこから抽出された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-ゼの免疫プロッティング方法に応用する事により、アデニル酸シクラ-ゼをサブタイプ毎に検出定量する事に成功した。今回の改良では市販抗体を用いて容易に同酵素が検出できるよう改良がなされた。

**遺伝子構造解析** 6型アデニル酸シクラ-ゼはヒト第12染色体上の12q12—q13に存在し、全長18kbの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。他のサブタイプに関しても同様の解析がなされた。

**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)、日本人2068人において検束した結果、発生頻度は(TT:TA:AA=1301:681:86)であり、臨床的所見には有意な違いは見られなかったが、TTおよびTA群においては心肥大群、非心肥大群との間に前者において有意な血圧の上昇が見られたが、AA群においては心肥大群における血圧の上昇はみられなかった。このことから、AA変異は血圧から独立した心肥大の誘因因子となることが推測された。これは心臓型アデニル酸シクラ-ゼと遺伝子多型を特定した初めての報告となった。

**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-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脳線状体においては80%以上、心臓では40%程度のアデニル酸シクラ-ゼ活性減弱が見られた。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、また中枢では運動機能障害をおこす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改良された。

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型は頻度は少ないが、同変異を有するものは血圧と葉独立した心肥大の危険因子を持つものと考えられ、今後は性別、年齢および人種との関連を、他の心不全危険因子(心機能、不整脈など)との関連において調査することが必要と思われる。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。我々の同定したSNPは血圧と独立した心肥大の危険因子である可能性がある。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

##### 論文発表

##### 雑誌発表

1. Takano M, Horie H, Iijima Y, Dezawa M, Sawada H and Ishikawa Y: Brain-derived neurotrophic factor enhances neurite regeneration from retinal ganglion cells in aged human retina in vitro. *Exp. Eye Res.*, 74: 319-323, 2002
2. Saito, H., Sango, K., Horie, H., Takeshita, K., Ikeda, H., Ishigatsubo, Y. and Ishikawa, Y: Trachea enhances neurite regeneration from adult rat nodose ganglia in vitro. *Life Sci.*, 70:1935-1946, 2002.
3. Ebina T, Takahashi N, Mitani I, Sumita S, Ishigami T, Ashino K, Minamizawa K, Kuji N, Ochiai H, Ishikawa Y, Matshubara S, and Umemura S: Clinical implication of cardiac I123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy and cardiac natriuretic peptides in patients with heart disease. *Nucl. Med. Commun.* 23:795-801, 2002
4. Sango K, Horie H, Saito H, Ajiki K, Takahashi A, Takeshita K, Ishigatsubo Y, Kawano H, and Ishikawa Y: Diabetes is not a potent inducer of neuronal cell death in mouse sensory ganglia, but it enhances neurite regeneration in vitro. *Life Sci.* 71: 2351, 2002

- 5 . Aoyagi T, Ishikawa Y, Oshikawa H, Kinugawa K, Yokoyama I, and Nagai R. Caveolin-3 is upregulated in the physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training in rats. *J. Sports Sci. Med.* 4; 141-146, 2002
- 6 . Okumura S, Kawabe J, Takagi G, Lee L, Hong C, Liu J, Takagi I, Sadoshima J, Yatani A, Vatner DE, Homcy CJ, Vatner SF, and Ishikawa Y: Type 5 adenylyl cyclase disruption alters not only sympathetic, but also parasympathetic regulation of cardiac function. *Circ. Res.* *In press*
- 7 . 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.* 41; S53-S56, 2003
- 8 . Oshikawa J, Toya Y, Fujita T, Sakai I, Hashimoto Y, Kawabe J, Umemura S, and Ishikawa Y: Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 regulates cAMP signal via inhibiting a calcium-sensitive adenylyl cyclase isoform. *Am. J. Physiol.* *In revision*
- 9 . Minamisawa S, Wang Y, Chen J, Ishikawa Y, Chien K R, and Matsuoka R. Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and by hypertrophy. *J. Biol. Chem.* *In press.*
- 10 . Oshikawa J, Minamisawa S, Takeshima H, Hoshijima M, Umemura S, Wang Y, Ishikawa Y, Chien K R, and Matsuoka R. Downregulation of juncophilin-2 in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circ. Res.* submitted
- 11 . Iwamoto T, Okumura S, Iwatsubo K, Kawabe J, Ohtsu K, Sakai I, Hashimoto Y, Izumitani A, Sango K, Ajiki K, Toya Y, Umemura S, Goshima Y, Arai N, Vatner S F, and Ishikawa Y. Motor dysfunction in type 5 adenylyl cyclase null-mice. *J. Biol. Chem.* *In press*
- 12 . Ikoma E, Tsunematsu Y, Nakazawa I, Shiwa T, Hibi K, Ebina T, Mochida Y, Toya Y, Hori H, Uchino K, Minamisawa S, Kimura K, Umemura S, and Ishikawa Y. Polymorphism of the type 6 adenylyl cyclase gene and cardiac hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *In press*
- 13 . Ishikawa Y: Adenylyl cyclase; a molecule of diversity. *Catecholamine Research* 53; 87-90, 2002 in *Advances in Behavioral Biology* Eds. Nagatsu T, Nabeshima T, McCarty R, and Golstein D S. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- 14 . Ishikawa Y: Isoform-targeted regulation of cardiac adenylyl cyclase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41; S1-S4, 2003

15. Iwatsubo K, Tsunematsu T, and Ishikawa Y. Isoform-specific regulation of adenylyl cyclase; a potential target in future pharmacotherapy *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, in press

**梅村敏 (共同研究者)**

Okuda J, Kimura K, Kosuge M, Endo T, Sugano T, Nakatogawa T, Ishikawa T, and Umemura S. Significance of thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) grade 2 flow early after thrombolysis followed by immediate percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 67(3):238-42, 2003

**北村均 (共同研究者)**

Hayashi H, Ogawa N, Ishiwa N, Yazawa T, Inayama Y, Ito T, and Kitamura H. High cyclin E and low p27/Kip1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patient. *Lung Cancer* 34(1):59-65, 2001

**学会発表**

1. Okumura S, Kawabe J, Takagi G, Lee M-C, Hong C, Liu J, Honda R, Takagi I, Yatani A, Vatner DE, Homcy CJ, Vatner SF, Ishikawa Y:  $\beta$ -Adrenergic, muscarinic and calcium-mediated regulation of the heart; effects of targeted disruption of type 5 adenylyl cyclase gene. *FASEB J* 16; II-A-821, 2002
2. Okumura S, Kawabe J, Takagi G, Lee L, Hong C, Takagi I, Yatani A, Vatner DE, Homcy CJ, Vatner SF, and Ishikawa Y. Loss of muscarinic regulation in the heart of type V adenylyl cyclase knockout mice. *Circulation* 106; II-67, 2002
3. Okumura S, Takagi G, Kawabe J, Lee L, Hong C, Honda R, Takagi I, Sadoshima J, Yatani A, Vatner DE, Homcy CJ, Vatner SF, Ishikawa Y: Blunted autonomic regulation in the hearts of type 5 adenylyl cyclase null mice. The 3<sup>rd</sup> International Amsterdam Mouse Symposium. Amsterdam, 2002.
4. 押川仁、酒井偉久子、岩本彩雄、戸谷義幸、梅村敏、石川義弘、ニコチン性アセチルコリン受容体の細胞内局在のサブユニット特異性、日本生理学会、2002年
5. Oshikawa J, Sakai I, Iwamoto T, Toya Y, Umemura S, and Ishikawa Y: Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  exists within lipid rafts and regulates cAMP signal.
6. Fujita T, Hashimoto Y, Sakai I, Iwatsubo K, Toya Y, Umemura S, and Ito T, Egawa M, and Ishikawa Y: Calcium plays a major role in caveolin-mediated inhibition of growth signal in the heart. *Circulation Journal* 66, suppl 1; 672, 2002
7. 常松尚志、南沢亮、生駒英子、石川義弘。肥大型心筋症におけるVI型アデニル酸シクラーゼの遺伝子変異と神経



体液性因子および心機能に関する検討。第六回 Molecular Cardiovascular Conference、小樽、2002年。

8. Iwatsubo K, Minamisawa S, Toya Y, Scarborough RM, , Cherbavaz DB, Bao M, Tomlinson JE, Sedlock DM, Levy DE, Umemura S, Homcy CJ, and Ishikawa Y: Pharmacological Inhibition of cardiac adenylyl cyclase in an isoform-specific manner. *Circulation*, II-49, 2002
9. 生駒英子、仲沢一郎、海老名俊明、持田泰行、常松尚志、南沢亮、志和忠志、日比潔、木村一雄、梅村敏、石川義弘  
VI型アデニル酸シクラーゼの遺伝子多型似ついでの検討。カテコラミンと循環器系研究会、東京、2002年。

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

特許申請中

USパテント出願中

アデニル酸シクラーゼ活性調節による運動機能と高血圧治療

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌発表

1. Takano M, Horie H, Iijima Y, Dezawa M, Sawada H and Ishikawa Y: Brain-derived neurotrophic factor enhances neurite regeneration from retinal ganglion cells in aged human retina in vitro. *Exp. Eye Res.*, 74: 319-323, 2002
2. Saito, H., Sango, K., Horie, H., Takeshita, K., Ikeda, H., Ishigatsubo, Y. and Ishikawa, Y: Trachea enhances neurite regeneration from adult rat nodose ganglia in vitro. *Life Sci.*, 70:1935-1946, 2002.
3. Sango K, Horie H, Saito H, Ajiki K, Takahashi A, Takeshita K, Ishigatsubo Y, Kawano H, and Ishikawa Y: Diabetes is not a potent inducer of neuronal cell death in mouse sensory ganglia, but it enhances neurite regeneration in vitro. *Life Sci.* 71; 2351-2361, 2002
4. Aoyagi T, Ishikawa Y, Oshikawa H, Kinugawa K, Yokoyama I, and Nagai R. Caveolin-3 is upregulated in the physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training in rats. *J. Sports Sci. Med.* 4; 141-146, 2002
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.* 41; S53-S56, 2003
6. Ishikawa Y: Adenylyl cyclase: a molecule of diversity. *Catecholamine Research* 53; 87-90, 2002 in *Advances in Behavioral Biology* Eds. Nagatsu T, Nabeshima T, McCarty R, and Golstein D S. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
7. Ishikawa Y: Isoform-targeted regulation of cardiac adenylyl cyclase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41; S1-S4, 2003

共同研究者(共同研究者は主にサンプル収集を共同で行ったため発表論文は主任研究者に比して少ない)

**梅村敏**

Okuda J, Kimura K, Kosuge M, Endo T, Sugano T, Nakatogawa T, Ishikawa T, and Umemura S. Significance of thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) grade 2 flow early after thrombolysis followed by immediate percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 67(3):238-42, 2003

**北村均**

Hayashi H, Ogawa N, Ishiwa N, Yazawa T, Inayama Y, Ito T, and Kitamura H. High cyclin E and low p27/Kip1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patient. *Lung Cancer* 34(1):59-65, 2001