

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

冠動脈攣縮原因遺伝子のゲノム的解析と分子病態の解明

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 小池 城司

平成15（2003）年4月



## 目 次

I	総括研究報告書 冠動脈攣縮原因遺伝子のゲノム的解析と分子病態の解明 小池城司	1-6ページ
II	研究成果の刊行に関する一覧表	7ページ
III	研究成果の刊行物・別刷	8-10ページ

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）  
総括研究報告書

冠動脈攣縮原因遺伝子のゲノム的解析と分子病態の解明

主任研究者 小池城司 九州大学医学部附属病院循環器内科

研究要旨

虚血性心疾患は、遺伝子異常による遺伝的要因及び食事・生活環境などの非遺伝的要因が複雑に関与する生活習慣病（多因子疾患）の代表的なものの一つであり、その原因解明およびより効果的な治療法の確立は国民の健康増進を計る上で重要な課題である。虚血性心疾患の原因には、冠動脈硬化による器質的な狭窄と機能的な冠動脈攣縮の二つがあり、そのうち冠動脈攣縮による虚血性心疾患に対する遺伝・ゲノム解析はほとんどなされていない。冠動脈攣縮が、狭心症・急性心筋梗塞・突然死などの虚血性心疾患全般の成因に深く関与し、また、冠攣縮性虚血性心疾患は欧米に比べて特に日本人に非常に多いことは以前より認められている。そこで本研究では冠動脈攣縮の遺伝・ゲノム解析を進め、原因遺伝子を同定することで、その原因解明およびより効果的な治療法の確立を目指すことを目的とする。

具体的には、本研究は以下の点からなる、1)冠攣縮性虚血性心疾患患者群およびその対照患者群のリクルートおよびその血液サンプルからのDNA抽出、2)血管平滑筋収縮に関わる遺伝子群が、我々のこれまでの研究結果から、冠攣縮の原因候補遺伝子と考えられ、それらについて日本人特有の遺伝子多型を同定する、3)冠攣縮性虚血性心疾患患者群およびその対照患者群において冠動脈攣縮の遺伝学・ゲノム学的解析を行なう。

平成14年度は本研究の3年目（最終年）で、平成12および13年度に引き続き以下の点においてさらなる成果を得た、1)冠攣縮性虚血性心疾患患者群および対照群の血液サンプルからのDNA抽出の継続、2)本研究対象患者サンプル（九州大学群）における候補遺伝子群の遺伝子多型決定およびそれを用いた遺伝学・ゲノム学的解析の継続、3)ENCORE I研究サンプル（スイス・チューリッヒ大学群）における遺伝子多型決定の継続およびそれを用いた遺伝学・ゲノム学的解析の開始。これまでに本研究により得られた知見から、日本人の遺伝子多型の研究において、日本人のサンプルを用いた検討が必要なことが確認された。また、本研究で同定されたRho-kinase遺伝子G930T多型はRho-kinaseのcatalytic domain内の塩基性アミノ酸(Lys)から非荷電極性アミノ酸(Asn)への変異を伴い、このことによりRho-kinaseの機能が変化する可能性が高く、それに加えて、本研究の遺伝解析でRho-kinase遺伝子G930T多型が冠動脈攣縮に相関する傾向を認めており、このRho-kinase遺伝子異常が冠動脈攣縮の原因である可能性が出てきた。そこで、今年度はこのアミノ酸変異が実際にRho-kinaseの機能に変化を生じさせるかを培養平滑筋の実験系での検討も開始し、このアミノ酸変異がRho-kinaseの機能に及ぼす影響の機序の一部が明らかになりつつある。本研究は今後も引き続き、冠動脈攣縮の遺伝学・ゲノム学的解析を進め、その原因解明およびより効果的な治療法の確立を目指す。そして、各種冠動脈攣縮における遺伝的要因を明らかにされ、冠攣縮性虚血性心疾患に対する新たな治療法・新薬の開発や、現在ある薬剤のより効果的な使用につながれば、それは国民の福祉におおいに役立つものと考えられる。

分担研究者氏名・所属施設名および所属施設における職名

下川宏明 九州大学大学院医学研究院循環器内科学・助教授

A. 研究目的

虚血性心疾患は、遺伝子異常による遺伝的要因及び食事・生活環境などの非遺伝的要因が複雑に関与する生活習慣病（多因子疾患）の代表的なものの一つである。虚血性

心疾患の原因には、冠動脈硬化による器質的な狭窄と機能的な冠動脈攣縮の二つがある。そのうち、冠動脈攣縮による虚血性心疾患に対する遺伝的解析はほとんどなされていない。冠動脈攣縮が、狭心症・急性心筋梗塞・突然死などの虚血性心疾患全般の成因に深く関与し、また、冠攣縮性虚血性心疾患は欧米に比べて特に日本人に非常に多いことは以前より認められており、その遺伝的解析を進め、原因遺伝子を同定する

ことは我が国において特に重要である。

そこで本研究では、我々のこれまでの研究結果を踏まえて、以下の点を明らかにすることを目的とする。すなわち、冠攣縮性狭心症患者群、微小血管狭心症患者群及び対照群を対象に以下の点を解明する。

- (1) 血管平滑筋収縮に関わるprotein kinase CやRho/Rho-kinaseを含むシグナル伝達機構に関与する蛋白質をコードする遺伝子群の遺伝子多型を上述の3患者群で決定し、それらの遺伝子が冠攣縮に関与するかどうかを関連解析により検討する。
- (2) 本研究で同定される様々な遺伝子多型のパターンと様々な薬剤の冠攣縮性狭心症及び微小血管狭心症に対する治療効果を解析する。
- (3) 日本人の患者集団(九州大学)およびCaucasianの患者集団(スイス・チューリッヒ大学)における冠攣縮の遺伝的要因を比較検討することにより、冠攣縮に関わる遺伝的背景の人種差を解明する。
- (4) 候補遺伝子(群)多型による相関が検出ができなかった場合は、300-400の遺伝マーカー(SSLPs)を用いて全ゲノムを検索する。

以上のような冠動脈攣縮における遺伝的要因を本研究によって明らかにすることにより、冠攣縮性虚血性心疾患に対する新たな治療法・新薬の開発や、現在ある薬剤のより効果的な投与につながる点で、学術的に大きな意義があると考えられる。また、本研究は、我が国だけでなく、ヨーロッパのグループと共同研究を行うことにより、冠攣縮性虚血性心疾患における人種差を解明することが強く期待できる。また、研究対象がシグナル伝達機構を対象にしているところから、血管平滑筋の異常による冠攣縮だけではなく、ガンをはじめとする他の疾患の研究分野にも大いに貢献でき、それらの疾患原因遺伝子解明を加速させるものと考ええる。

## B 研究方法

本研究は、遺伝子多型の同定および血液からのDNA抽出とPCR法による遺伝子多型の決定及びその結果を用いた遺伝学的解

析が中心となる。具体的には以下の方法で行う。

### (1) 患者集団及びDNA抽出用検体の収集

本研究では、九州大学循環器内科において、1994年9月より現在までの間に入院し胸痛を主訴として心臓カテーテル検査を施行された患者の中より、以下に示すような患者群を対象に行なう、冠攣縮性狭心症群217名、微小血管狭心症群104名、対照群70名(動脈硬化性狭心症、冠攣縮性狭心症及び微小血管狭心症が否定された症例)。本研究での診断基準は当科におけるもの(Mohr *et al*, *Lancet* 351 1165-1169, 1998)により、DNA解析のインフォームドコンセントの得られた患者のみから20mlの採血を行ない、その血液サンプルよりDNAの抽出を行ない、後述の遺伝解析に用いた。当科では、約50名/年の本研究の対象となる患者群が新たに診断されており、それらの患者群も逐次本研究に追加している。また、スイス、チューリッヒ大学のThomas F Lüscher教授が中心となったヨーロッパの研究グループ(ENCORE I研究)から、冠攣縮性虚血性心疾患患者集団を含んだ347検体分のDNAサンプルおよび臨床データの提供を受けた。

### (2) Protein kinase Cシグナル伝達経路上の各種遺伝子多型の検討

これまでに我々は、Protein kinase Cシグナル伝達経路上の分子の遺伝子群(RhoA, Rho-kinase, Protein kinase Cs, Myosin phosphatase, Myosin light chain kinase, Phospholipase C, Calponin, C kinase-activated phosphatase inhibitor 17)から、平成12年度のRho AおよびRho-kinase遺伝子の遺伝子多型の同定を、平成13年度にはProtein kinase C  $\alpha$ および $\delta$ 遺伝子の新規遺伝子多型の同定を行った。今年度は残りの遺伝子についても検討を行なった。これまでの経験より、データベースの情報が必ずしも日本人に特異的な遺伝子多型に該当するものではないことがあきらかである。そこで本研究においてRhoAおよびRho-kinaseの遺伝子多型の同定で用いた戦略、すなわちPCR法・RT-PCR法によりそれら遺伝子群のプロモーター・翻訳

領域のクローニングおよびシーケンスを行ない、それらの遺伝子多型を同定する方法を用いた。

### (3) Renin-angiotensin系遺伝子群の遺伝子多型の決定

微小血管狭心症に対する治療にACE阻害薬が有効であることが報告されている。このことよりrenin-angiotensin系が微小血管狭心症発症の原因に関与している可能性が高く、また血管平滑筋収縮に関与していることは以前より知られている。そこで本研究では、renin-angiotensin系の候補遺伝子としてACE(angiotensin converting enzyme)遺伝子(I/D多型)、AGT(angiotensinogen)遺伝子(M235T多型)、AGTR1(angiotensin II type 1 receptor)遺伝子(A1166C多型)についてそれぞれの遺伝子多型を決定し、その遺伝子多型とそれぞれの病態との相関を統計学的に検討する。また、もう1つの有力な候補遺伝子であるNOS3(endothelial nitric oxide synthase)遺伝子(T786C多型)についても同様の検討をおこなう。

### (4) 遺伝マーカーを用いた全ゲノムサーチ

上記の候補遺伝子(群)多型による相関が検出できなかった場合は、300-400の遺伝マーカー(SSLPs)を用いて全ゲノムを検索し、冠攣縮に相関のあるゲノム上の領域を同定し、冠攣縮に関与している遺伝子を同定する。

#### (倫理面での配慮)

本研究は倫理面への配慮として「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告知第1号)」を遵守することとする。具体的には、本研究の目的、内容、人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を説明し、承諾を得られた研究対象者のみからDNA抽出用の採血を施行する。また、本研究の研究プロトコールについては、九州大学大学院医学研究院の遺伝子解析ガイドラインに沿って実施する。なお、この研究プロトコールは、九州大学大学院医学研究院のヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員

会において審議され、承認されたものである。

### C 研究結果及び考察

#### (1) 本研究における患者・対照群のリクルートおよびそのDNA抽出について

本研究では前述したように、九州大学において以下に示すような患者群をリクルートしてきた、冠攣縮性狭心症群217名、微小血管狭心症群104名、対照群70名(動脈硬化性狭心症、冠攣縮性狭心症及び微小血管狭心症が否定された症例)。そのうち、DNA解析のインフォームドコンセントの得られた患者のみから20mlの採血を行ない、現在までに207検体分の血液サンプルからDNA抽出を完了している。当科では、約50名/年の本研究の対象となる患者群が新たに診断されており、それらの患者群も逐次本研究に加えていく予定である。今年度は昨年度の報告時から49名の新規患者が本研究にリクルートされた。

また、スイス、チューリッヒ大学のThomas F. Luscher教授が中心となったヨーロッパの研究グループ(ENCORE I研究)から、冠攣縮性虚血性心疾患患者集団を含んだ347検体分のDNAサンプルおよび臨床データの提供を受け、本研究での遺伝解析に用いた。

#### (2) 候補遺伝子群遺伝子多型同定について

これまでの動物モデルを用いた冠動脈攣縮の成因に関する我々の研究結果から、血管平滑筋収縮に関わるProtein kinase CやRho/Rho-kinaseを含むシグナル伝達機構の異常が関与していることを明らかにしてきた。そこでまずその中心的な分子であるRhoAおよびRho-kinaseの遺伝子多型の同定を行ない、それについては平成12年度に報告した。平成13年度も引き続き候補遺伝子群の遺伝子多型の探索を行ない、Protein kinase C  $\alpha$ および $\delta$ 遺伝子の新規遺伝子多型の同定し、また、Myosin phosphataseなどいくつかの遺伝子については遺伝子多型の探索を行なったが、日本人での新規の遺伝子多型は同定できなかったことを報告した。今年度も引き続き残りの遺伝子群についての遺伝子多型について検討を行なったが、新規の遺伝子多型は同定できなかった。

た。

### (3) 冠動脈攣縮の遺伝学・ゲノム学的解析について

1で述べたDNAサンプルを用いて、本研究で我々が同定したRho kinase遺伝子K310N多型、および既知のACE I/D多型、AGT M235T多型、AGTR1 A1166C多型、NOS3 T-786C多型についての遺伝子多型を決定し、冠動脈攣縮の遺伝学・ゲノム学的解析を行なった(表1)。これまでの解析結果からは患者・対照群間ではRho-kinase遺伝子G930T多型が冠動脈攣縮に相関する傾向は認められたが有意ではなかった。これは対照群にT alleleを持つ個人がないためであると考えた。そこで健康人(98名)でのallele頻度を用いた解析では冠動脈攣縮で有意にT alleleの頻度が高いことを認めた。このことから冠動脈攣縮の5%がG930T多型のT alleleで説明することが可能である。今後は患者・対照サンプルをさらに増やした遺伝学・ゲノム学的解析が必要と考える。それ以外の遺伝子多型については現在のところまで冠動脈攣縮との間で相関を認めていない。特に、NOS3遺伝子多型に関してはこれまでの熊本大学グループからの報告と異なる点で興味深い。

また、ENCORE I研究のDNAサンプルを用いた上記遺伝子群の遺伝子多型の決定を開始したところであるが、そのうちRho-kinase遺伝子G930T多型についてはCaucasianの検体では認められず、前述の日本人での冠動脈攣縮との相関解析の途中経過および冠動脈攣縮が日本人に多いことと合わせて、冠動脈攣縮の人種差の一部が説明できる可能性がある。

### (4) Rho-kinase遺伝子G930T多型の遺伝子機能への影響についての解析

本研究で同定されたRho-kinase遺伝子G930T多型はRho-kinaseのcatalytic domain内の塩基性アミノ酸から非荷電極性アミノ酸への変異を伴い、このことによりRho-kinaseの機能が変化する可能性が高い。また、本研究の遺伝解析でRho-kinase遺伝子G930T多型が冠動脈攣縮に相関する傾向を認めており、Rho-kinase遺伝子異常が冠動脈攣縮の原因である可能性が出てきた。そこ

て、まず健康人で、T alleleを持つ個人と持たない個人の白血球からmRNAを抽出し、Rho-kinaseの発現を比較したが、有意な差を認めなかった。また、野生型および変異型のRho-kinaseを発現するアデノウイルスを作製し、それぞれをヒト冠動脈由来血管平滑筋に発現させ、それによる各種指標について比較検討を行なった。発現させたのみでは両方でRho kinase活性に差を認めなかった。しかし、冠動脈攣縮は何らかの刺激により生じると考えられていることから、現在Angiotensin IIを含めた各種刺激下での検討を行なっている。

### (5) 本研究の意義および展望

#### 1) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究では、我々の動物モデルを用いた研究から得られる冠動脈攣縮の分子機構に関する知見を基に、ヒトにおいてそれを検討する戦略を用いており、これらの点で先駆的・独創的である。さらに、冠動脈攣縮によって生じる2種類の疾患、冠攣縮性狭心症および微小血管狭心症の成因を分子遺伝学的に比較検討した研究はない。本研究は、各種冠動脈攣縮における遺伝的要因を明らかにすることで、冠攣縮性虚血性心疾患に対する新たな治療法・新薬の開発や、現在ある薬剤のより効果的な投与につながる点で、学術的・社会的に重要な意義があると考えられる。

さらに、遺伝子多型は人種による異なりが大きいことが最近になって明らかになり、日本人に非常に多い冠動脈攣縮について日本人を対象にこのような遺伝情報を蓄積することは、非常に重要であり、この点でも本研究は学術的・社会的に大きな意義があると考えられる。

#### 2) 今後の展望について

引き続き患者・対照群のリクルートおよびその血液サンプルからのDNA抽出を行ない、本研究の対象患者・対照群のサンプル数の増加を図る。それを用いての冠動脈攣縮の遺伝学・ゲノム学的解析を行なう。さらに、治療経過などの患者の臨床データを用いたより詳細な解析を行なう予定である。

また、引き続きRho-kinase遺伝子G930T多型がRho-kinase遺伝子の機能におよぼす影響についての検討を継続する。

#### D 結論

本研究は、日本人に非常に多い冠攣縮性虚血性心疾患について、我々のこれまでの基礎および臨床研究を基に、遺伝的解析を進め、その原因遺伝子を同定することを目的にしている。今年度までの遺伝学・ゲノム学的解析により Rho-kinase が冠動脈攣縮に関与している可能性が高くなってきた。Rho-kinase 遺伝子 G930T 多型が単なるマーカーなのか、それとともに冠動脈攣縮の原因遺伝子であるかは今後の機能解析が重要であると考えられる。本研究はこれまで順調に進行しており、それを続けることで各種冠動脈攣縮における遺伝的要因を明らかにでき、冠攣縮性虚血性心疾患に対する新たな治療法・新薬の開発や、現在ある薬剤のより効果的な使用につながり、国民の福祉に役立つと考える。

E 健康危険情報  
とくになし。

#### F 研究発表

##### 1 論文発表

なし

##### 2 学会発表

Kamiunten H, Koike G., Masumoto A, Mohri M, Takeshita A Hypertension is not a risk factor for coronary vasospastic ischemic heart disease among Japanese *J Hypertens* 18 S60, 2000

Kamiunten H, Koike G., Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H., Takeshita A

Hypertension is not a risk factor for coronary vasospastic ischemic heart disease among Japanese 第23回日本高血圧学会総会 (平成12年10月19-21日、福岡)

Koike G. Epidemiological and Genetic Analysis of Coronary Vasospasm 心・腎と高血圧研究会 (平成12年10月21日、福岡)

小池城司 冠動脈攣縮原因遺伝子のゲノム解析と分子病態の解明 平成12年度ヒトゲノム・再生医療等研究発表会 (平成13年3月27日、東京)

小池城司 冠動脈攣縮原因遺伝子のゲノム解析と分子病態の解明 平成13年度ヒトゲノム・再生医療等研究発表会 (平成14年3月22日、東京)

Kamiunten H, Koike G., Shimokawa H., Takeshita A A novel missense variation in the catalytic domain of Rho-kinase may genetically impact on coronary vasospastic ischemic heart disease in the Japanese *Am J Hum Genet* 71 350, 2002

Kamiunten H, Koike G., Shimokawa H., Takeshita A A novel missense variation in the catalytic domain of Rho-kinase may have a genetic impact on coronary vasospastic ischemic heart disease in the Japanese *Circ J* 67(Suppl 1) 196, 2003

#### G 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

現在のところ、本研究における知的所有権の出願・取得はない。しかしながら、本研究で発見された未知の遺伝子多型により、その遺伝子産物の機能的な変化が明らかにされれば(この点についても現在検討中である)、それについての知的所有権の出願・取得を行う予定である。



表1 Rho kinase遺伝子G930T多型と冠動脈攣縮の相関  
患者集団(九州大学)での検討

	GG	GT
LAS	98	4
MVS	53	2
Control	50	0

$\chi^2$   $p=0.372$

	GG	GT
LAS+MVA	151	6
Control	50	0

$\chi^2$   $p=0.161$

健常人を対照としたときの検討

	GG	GT
LAS+MVA	151	6
健常人	97	1

$\chi^2$   $p=0.0102$

冠動脈攣縮とRho kinase遺伝子G930T多型T alleleが有意に相関する。

LAS 冠攣縮性狭心症

MVS 微小血管狭心症

Control 対照群

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kamiunten H, Koike G, <i>et al</i>	Hypertension is not a risk factor for coronary vasospastic ischemic heart disease among Japanese	<i>J Hypertens</i>	18	S60	2000
Kamiunten H, Koike G, Shimokawa H, <i>et al</i>	A novel missense variation in the catalytic domain of Rho-kinase may genetically impact on coronary vasospastic ischemic heart disease in the Japanese	<i>Am J Hum Genet</i>	71	350	2002
Kamiunten H, Koike G, Shimokawa H, <i>et al</i>	A novel missense variation in the catalytic domain of Rho-kinase may have a genetic impact on coronary vasospastic ischemic heart disease in the Japanese	<i>Circ J</i>	67 (Suppl 1)	196	2003

20020445

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P 7の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。