

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

循環器疾患関連遺伝子の解明に関する研究  
(H13ゲノム-002)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山崎 力  
平成 16(2004)年 4月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

- 循環器疾患関連遺伝子の解明に関する研究 ----- 1  
山崎力

## II. 分担研究報告書

1. 心血管リモデリングにおける分子メカニズムの解明----- 3  
永井良三
2. 遺伝子多型と動脈硬化性疾患との関連解析 ----- 6  
今井靖
3. 薬効と遺伝子多型との関連解析  
ー遺伝子変異が心臓にもたらす機能的修飾に関する検討ー----- 9  
門前幸志郎
4. 遺伝子プロモーターおよびその多型性の検討と転写制御の解明 ----- 11  
ーマルチプルリスクファクター関連因子の分子機序の解明ー  
前村浩二
5. 臨床データのファイリングとその活用に関する研究 ----- 13  
林同文

総括研究報告書

循環器疾患関連遺伝子の解明に関する研究

主任研究者 山崎 力

東京大学大学院医学系研究科・クリニカルバイオインフォマティクス研究ユニット 教授

研究要旨

心血管疾患の発症およびそれに関連した治療・予後に関連する遺伝的素因について網羅的臨床情報データベース構築と心臓血管病との関連が期待される遺伝子群との統合的解析を行うことにより複数の遺伝子多型が心臓血管病の病態と関連することを示した。また併せて候補遺伝子の機能解析についても遺伝子改変マウス、心臓血管系細胞株を活用することにより実施した。本研究の成果は実地臨床においてゲノム情報に基づく個別化医療を実施する上での礎になるものであり、さらなるデータ集積が今後に求められる。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

永井良三

東京大学大学院医学系研究科・循環器内科学、  
教授

今井靖

東京大学附属病院・救急部・集中治療部、  
助手

門前幸志郎

東京大学大学院医学系研究科・薬剤疫学講座、  
助手

前村浩二

東京大学大学院医学系研究科・循環器内科、  
助手

林同文

東京大学大学院医学系研究科・薬剤疫学講座、  
助手

A. 研究目的

循環器疾患の発症進展には多種類の環境・遺伝要因が関与する。本研究は循環器疾患の病態および治療反応性を遺伝子多型研究から解明することを目指し、詳細な臨床情報のデータベース化を行い、それと遺伝子解析結果を統合的に処理することにより（1）心血管病の発症、重症度と関連する遺伝子マーカーの同定（2）環境因子に対する感受性、治療に対する反応性を規定する遺伝子の同定（3）心血管病の病態を制御する遺伝子およびその遺伝子異常・多型の機能解明の実現を目的とした。

B. 研究方法

東京大学医学部付属病院循環器内科に入院する全症例について網羅的な臨床情報のデータベースを構築・データ集積を行い、平行して承諾の得られた患者から

DNA 採取を行った。あわせて関連医療機関においても遺伝子検体の収集を行い、対照群あるいは追加の疾患群として遺伝子解析に組み入れ主として case-control study の手法で遺伝子解析を行った。候補遺伝子アプローチによる解析であるが、その解析対象遺伝子としては動脈硬化性疾患および心臓疾患との関連が示唆される因子の約 60 に及ぶ遺伝子に着目して解析した。特にその遺伝子多型は蛋白構造を規定するコーディング領域の遺伝子多型、遺伝子の発現量を規定するプロモーター領域の多型に着目した。関連性が有意な遺伝子多型が認められる場合には近傍の遺伝子多型についても探索し疾患感受性ハプロタイプの選出した。さらに心臓・血管構成細胞の培養株または遺伝子改変動物を使用することにより遺伝子多型およびその遺伝子自体の機能についての解明を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究の開始にあたり患者サンプルの採取に関するインフォームドコンセントの内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は東京大学医学部内に設置されたヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会（「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に準拠）において審査・承認されそれに基づいて実施した。

C. 研究結果

(1) 遺伝子多型研究において ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A 1) 遺伝子の Met823Ile 多型が HDL 濃度を有意に規定する遺伝的要因であること、matrix metalloproteinase (MMP) の MMP1 および MMP3 の遺伝子多型からなるハプロタイプが心筋梗塞発症に強く関連すること、 $\beta 2$  アドレナリ

ン受容体多型およびそのハプロタイプが冠動脈硬化、特に心筋梗塞発症に強く関連すること、心臓血管のリモデリングの制御に関与する転写因子 KLF5 のプロモーター領域の遺伝子多型が冠動脈硬化に関連することが示された。KLF5 の生理的機能はこの遺伝子の欠損マウスを解析すると遺伝子欠損により心臓血管系リモデリングが抑制されることが明らかにされており、その知見にも矛盾しない。

- (1) 冠動脈形成術後(PCI)の再狭窄は本治療法の最大の障壁となっているが、MMP3, MMP9, p21 phox の遺伝子多型が標的病変の性状で補正した再狭窄発症に有意に関連することが認められた。
- (1) 複数の遺伝子多型を組み合わせることにより、よりハイリスク症例の峻別が可能になることが示された(一例として、lymphotoxin alpha と MCP-1 は単独では心筋梗塞発症には 1.5 倍程度のオッズ比であるが、これを組み合わせることによりオッズ比は4倍となる)。

#### D. 考察

海外において遺伝子多型研究は精力的に行われているが Caucasian のデータは必ずしも日本人にそのまま外挿出来ないためこのような日本人を対象とした研究の意義は大きい。とりわけ充実した臨床情報と統合的に解析することにより、単なる疾患感受性以外の臨床事象、たとえば治療反応性などの関連因子の同定が行われており、そのような研究環境を有する施設は稀少と考えられる。

さらに、遺伝子の機能についても遺伝子改変動物あるいは細胞株を用いて詳細に検討されている。例えば冠動脈硬化に関連する KLF5 遺伝子が遺伝子欠損マウスでは血管障害後の内膜肥厚が抑制されることが示され、臨床事象とモデル動物で矛盾のない結果が得られており、本遺伝子の重要性がさらに高まったといえる。また単独の遺伝子多型での寄与率が低くてもその組み合わせを検討することにより、強力な冠硬化リスクを推定出来る可能性があり、今後も機能的に相加・相乗的に作用する遺伝子多型の組み合わせについての検討が要求される。

#### E. 結論

心血管疾患の発症およびそれに関連した治療・予後に関連する遺伝的素因について網羅的臨床情報データベース構築と心臓血管病との関連が期待される遺伝子群との統合的解析を行うことにより複数の遺伝子多型が心臓血管病の病態と関連することを示した。本研究の成果は実地臨床においてゲノム情報に基づく個別化医療を実施する上での礎になるものであり、さらなる

データ集積が今後求められる。

#### 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

Harada T., Imai Y., Nojiri T., Morita H., Hayashi D., Maemura K., Fukino K., Kawanami F., Nishimura G., Tsushima K., Monzen K., Yamazaki T., Mitsuyama S., Shintani T., Watanabe N., Seto K., Sugiyama T., Nakamura F., Ohno M., Hirata Y., Yamazaki T., Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* 169: 105-112, 2003

Nojiri T., Morita H., Imai Y., Maemura K., Ohno M., Ogasawara K., Aizawa T., Saito A., Hayashi D., Hirata Y., Sugiyama T., Yamazaki T., Nagai R. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *International J Cardiol* 92: 181-186, 2003

##### 1. 学会発表

Tsutomu Yamazaki, Establishment of clinical data management system and its practical application to genetic epidemiology in cardiovascular medicine. 第68回日本循環器学学術集会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 特記すべきことなし
1. 実用新案登録 特記すべきことなし
1. その他 特記すべきことなし

## 心血管リモデリングにおける分子メカニズムの解明

分担研究者 永井 良三 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科学 教授

### 研究要旨

心臓・血管は炎症、酸化ストレスといった外的刺激に対して代償的に適応するが、その適応の破綻は動脈硬化、心不全などの病態形成に結びつく。心臓血管病におけるストレス応答を規定する転写因子 KLF5 が心臓血管リモデリングに関与する重要な転写因子であることを遺伝子欠損マウスの解析ですでに確認している。今回、KLF5 の本遺伝子と協調あるいは拮抗的に作用する相互作用因子を複数同定、そのうち SET による KLF5 の誘導抑制、転写抑制および、PDGF 産生における NF- $\kappa$ B との協調作用を呈するなど KLF5 相互作用因子の分子機序を明らかにした。

### A. 研究目的

心臓・血管は炎症、酸化ストレスといった外的刺激に対して代償的に適応するが、その適応の破綻は動脈硬化、心不全などの病態形成に結びつく。本研究では、心臓血管病におけるストレス応答の際に多数のエフェクターが関与するがそれらを統御する転写因子群に着目し、その分子機序を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

心臓血管疾患の病態に関与する種々のエフェクター（アンジオテンシン、エンドセリンなどの液性因子、各種炎症惹起物質、組織因子などの凝固促進因子など）は、外的刺激に応答して産生・分泌されるが、その遺伝子発現の制御は転写因子により行われる。本研究では心臓血管病、とくに動脈硬化巣において血管細胞の活性化・増殖に関与する転写因子 KLF5 に着目し、その分子機序につき血管由来培養細胞株を用いた蛋白工学的検討を通じてアプローチを行った。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノムの解析にあたって東京大学医学部内に設置されたヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会（「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に準拠）において審査・承認されそれに基づいて実施した。

### C. 研究結果 および D. 考察

循環器疾患において入院診療対象の7割は虚血性心疾患でありその主たる治療手段はPTCA（冠動脈形成術）である。しかし本手技では2-3割の症例で半年以内に再狭窄を来すため、それ

が本治療の最大の障壁となっている。この再狭窄の分子メカニズムとして血管平滑筋の脱分化・活性化が重要であることを以前より指摘してきたが、このプロセスに Zn フィンガー型転写因子 KLF5 が重要であることを明らかにしてきた。この因子は PDGF, iNOS, 組織因子などのエフェクターのほか脱分化した平滑筋において発現する平滑筋型ミオシンのアイソザイム Smemb などの発現上昇に寄与する。以前、我々は本転写因子の生理学的機能を解明するためにノックアウトマウスを作成、ホモ接合体は胎性早期に死亡することから初期発生に必須の転写因子であること、ヘテロ接合体では正常に発生、成長するが血管障害・心筋障害モデルにおいて組織リモデリングがヘテロ接合体で抑制されることから本遺伝子が心臓血管病の病態形成に重要な役割を担うことを明らかにした。またこの遺伝子改変マウスを用いることにより KLF5 がレチノイン酸受容体 RXR と相互作用することが判明、合成型レチノイド Am80 が KLF の活性化を抑制し心臓血管リモデリング抑制薬としての活用の可能性が見いだされた。現在、この Am80 のヒトへの臨床応用を前提にブタなどの大動物における薬効につき検証を加えている。

また KLF5 の相互作用する因子としてプロテオミクス的手法を用いて癌抑制遺伝子 SET が KLF5 と相互作用することを発見、通常は SET が KLF5 の転写活性を抑制するが、血管細胞の活性化の際に SET の発現が抑制され、かつ KLF5 が活性化するために KLF5 の下流遺伝子の発現上昇がもたらされることがあきらかとなった。また炎症刺激

で誘導される転写因子 NFκB とも協調的に作用して血管平滑筋細胞などの増殖・脱分化に重要な PDGF の発現亢進に寄与することが示された。このように遺伝子改変マウスおよび細胞を用いた蛋白工学による検証により KLF5 の心臓血管病における重要性が実証された。さらに、本遺伝子の多型性については共同研究者の今井とともに解析を進めており、5' flanking region の多型が冠動脈硬化と関連することを確認している。

## E. 結論

循環器疾患関連遺伝子の解明を目指し、特に心臓血管病発症に寄与するマスター遺伝子の機能解析として *KLF/KLF5* が冠動脈形成術後再狭窄あるいは動脈硬化進展に果たす役割を発生工学および蛋白工学の手法を駆使して明らかにした。今後は本転写因子およびこの因子の統御を受ける多数のエフェクターについての遺伝子多型性の検討結果を活かした個別化医療の実践と、本因子およびエフェクターに関連した新規薬剤の開発（ゲノム創薬）への発展が今後の課題である。

## 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

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R.

A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis*. 2003;169:105-12.

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Saito A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003;92:181-186.

Hayashi D, Imai Y, Hiroyuki M, Fujita H, Monzen K, Yamazaki T, Yamazaki T, Nagai R. Development of the pioneering clinical support system utilizing

information technology -clinical informatics and genome analysis -. *Jpn Heart J* (in press).

Aizawa K, Suzuki T, Kada N, Ishihara A, K Kawai-Kowase, Matsumura T, Sasaki K, Munemasa Y, Manabe I, Kurabayashi M, Collins T, Nagai R. Regulation of platelet-derived growth factor -A chain by kruppel like factor 5 *J Biol Chem* 2004;279:70-76.

Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K, Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y, Adachi N, Horikoshi M, Nagai R. Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA binding domain. *Mol Cell Biol* 2003;23:8528-8541.

Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 2004;314:415-9

Suzuki T, Muto S, Miyamoto S, Aizawa K, Horikoshi M, Nagai R. Functional interaction of the DNA-binding transcription factor Sp1 through its DNA-binding domain with the histone chaperone TAF-I. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(31):28758-64.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423(6941):762-9.

### 2. 学会発表

第76回日本生化学学会

シンポジウム 生活習慣病と転写調節因子 —モデル動物から創薬への模索—

「Role of kruppel-like factor 5 (KLF5) in the cardiovascular system: From pathophysiological mechanisms to therapeutic target」

第 13 回国際動脈硬化学会 XIIIth International Symposium on Atherosclerosis

シンポジウム Proliferation and differentiation of smooth muscle cells

「Role of KLF5/BTEB2, a Kruppel-like zinc-finger type transcription factor, in vascular remodeling」

74<sup>th</sup> American Heart Association

Cardiovascular Seminars

「Kruppel-like zinc-fingers in cardiovascular development and remodeling」

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 特記すべきことなし
2. 実用新案登録 特記すべきことなし
3. その他 特記すべきことなし

## 遺伝子多型と動脈硬化性疾患との関連解析

分担研究者 今井 靖 東京大学附属病院・救急部・集中治療部 助手

### 研究要旨

心血管疾患の発症およびそれに関連した治療・予後に関連する遺伝的素因について網羅的臨床情報データベース構築と心臓血管病との関連が期待される遺伝子群との統合的解析を行うことにより心臓血管病との関連性が期待される候補遺伝子の多型性と臨床情報とを統合的に解析することにより複数の遺伝子多型、すなわち *KLF5*、マトリクスメタロプロテアーゼ、ATP binding cassetteA1,  $\beta 2$  アドレナリン受容体、アディポネクチンなどが心臓血管病の病態と関連することを示した。本研究の成果は実地臨床においてゲノム情報に基づく個別化医療を実施する上でその基礎となるものであり、さらなるデータ集積が今後求められる。

### A.研究目的

循環器疾患の発症進展には多種類の環境・遺伝要因が関与する。本研究は循環器疾患の病態および治療反応性を遺伝子多型研究から解明することを目指し、詳細な臨床情報のデータベース化を行い、それと遺伝子解析結果を統合的に処理することにより心血管病の発症、重症度と関連する遺伝子マーカーの同定することを目標とし特に冠動脈疾患および冠動脈形成術後の再狭窄などとの関連性を中心に候補遺伝子アプローチの手法により遺伝子解析を行い、疾患感受性遺伝子の同定を試みた。

### B.研究方法

東京大学医学部付属病院循環器内科に入院する全症例について網羅的な臨床情報のデータベースを構築・データ集積を行い、平行して承諾の得られた患者からDNA採取を行った。あわせて関連医療機関においても遺伝子検体の収集を行い、対照群あるいは追加の疾患群として遺伝子解析に組み入れ主として case-control study の手法で遺伝子解析を行った。

候補遺伝子アプローチによる解析であるが、その解析対象遺伝子としては動脈硬化性疾患および心臓疾患との関連が示唆される因子の約 60 に及ぶ遺伝子に着目して解析した。その候補遺伝子のなかでとくに動脈硬化において重要な役割を果たす血管平滑筋の活性化、脱分化に関与する転写因子 *KLF5* についてはこの遺伝子を含む全長 25kb にわたる領域の遺伝子多型につき探索し、それと疾患との関連性を検討した。また関連性が有意な遺伝子多型が認められる場合には近傍の遺伝子多型についても探索し疾患感受性ハプロタイプの選出した

(倫理面への配慮)

本研究の開始にあたり患者サンプルの採取に関するインフォームドコンセントの内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は東京大学医学部内に設置されたヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会（「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に準拠）において審査・承認されそれに基づいて実施した。

### C.研究結果

- (1) 遺伝子多型研究において ABCA1(ATP-binding cassette transporter A 1)遺伝子の Met823Ile 多型が HDL 濃度を有意に規定する遺伝的要因であること、matrix metalloproteinase (MMP) の MMP1 および MMP3 の遺伝子多型からなるハプロタイプが心筋梗塞発症に強く関連することを明らかにした。
- (2)  $\beta 2$  アドレナリン受容体多型およびそのハプロタイプが冠動脈硬化、特に心筋梗塞発症に強く関連すること、そしてそれは高血圧、糖尿病などとは独立して発症に寄与していることが示された。
- (3) *KLF5* について 25kb にわたる本遺伝子全長における遺伝子多型の探索を行い、新規 SNP 8 を含む 13SNP について解析を行った。各 SNPs は有意な連鎖不平衡であり、本遺伝子の多型はひとつのハプロタイプブロック内にあることが判明した。5'flanking region 内の多型は *KLF5* の転写活性に関連し、また臨床像と対比するとこの多型が冠動脈の重症度および冠動脈形成術後再狭窄との関連性も認められた。現在はより解析サンプルを増やし、データの検証を継続している。
- (4) 冠動脈形成術後(PCI)の再狭窄は本治療法の最大の



障壁となっているが、MMP3, MMP9, p21 phox の遺伝子多型が標的病変の性状で補正した再狭窄発症に有意に関連することが認められた。

- (5) すでに報告のある遺伝子多型についても検証し機能的に関連する遺伝子多型間の組み合わせについて検討したところ、おなじ炎症関連因子である lymphotoxin alpha と MCP-1 は単独では心筋梗塞発症には 1.5 倍程度のオッズ比であるが、これを組み合わせることによりオッズ比は 4 倍となることを示した。

#### D. 考察

海外において遺伝子多型研究は精力的に行われているが Caucasian のデータは必ずしも日本人にそのまま外挿出来ないためこのような日本人を対象とした研究の意義は大きい。また KLF5 のように全長にわたり遺伝子変異・多型を探索し疾患との関連性をみる研究はオリジナリティーが高く、また疾患との関連性を通して本転写因子の生物学的な意義付けをあらたに加える可能性がある。

このような研究が行える背景としては充実した臨床情報とそれとあわせて解析する遺伝子解析システムの充実があってのことでありそのような研究環境を有する施設は稀少と考えられる。

また単独の遺伝子多型での寄与率が低くてもその組み合わせを検討することにより、強力な冠リスクを推定出来る可能性があり、今後も機能的に相加・相乗的に作用する遺伝子多型の組み合わせについての検討が要求される。

#### E. 結論

心血管疾患の発症に関連する遺伝的素因について網羅的臨床情報データベース構築をもとに候補遺伝子の遺伝子多型検索を行うことにより複数の遺伝子多型が心臓血管病の病態と関連することを示した。本研究の成果は実地臨床においてゲノム情報に基づく個別化医療を実施する上での礎になるものであり、さらなるデータ集積が今後に求められる。

#### 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

Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K, Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y, Adachi N, Horikoshi M, Nagai R Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic

regulator SET through interaction and acetylation on the DNA binding domain. *Mol Cell Biol* 2003;23:8528-8541

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis*. 2003;169:105-12.

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Saito A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003;92:181-186.

Hayashi D, Imai Y, Hiroyuki M, Fujita H, Monzen K, Yamazaki T, Yamazaki T, Nagai R. Development of the pioneering clinical support system utilizing information technology -clinical informatics and genome analysis -. *Jpn Heart J* (in press).

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003;278:2461-2468.

Hara K, Ohe K, Kadowaki T, Kato N, Imai Y, Tokunaga K, Nagai R, Omata M. Establishment of a method of anonymization of DNA samples in genetic research. *J Hum Genet*. 2003;48:327-30.

##### 2. 学会発表

第68回 日本循環器学会学術集会

Establishment of clinical database system and identification of genetic factors contributing to the pathogenesis of atherosclerosis. Imai Y, Hayashi D, Hara K, Shindo T, Manabe I, Monzen K,

Harada T, Maemura K, Kadowaki T, Yamazaki T, Nagai R.

The genetic polymorphisms in the insulin-resistance related genes as coronary risks.

Imai Y, Harada T, Hayashi D, Nishimura G, Tsushima K, Nojiri T, Monzen K, Yamazaki T, Hosoda T, Kawanami D, Takeda N, Manabe I, Suzuki T, Maemura K, Yamazaki T, Nagai R.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 特記すべきことなし
2. 実用新案登録 特記すべきことなし
3. その他 特記すべきことなし

薬効と遺伝子多型との関連解析—遺伝子変異が心臓にもたらす機能的修飾に関する検討—

分担研究者 門前 幸志郎 東京大学大学院医学系研究科・薬剤疫学講座 助手

研究要旨

循環器疾患における治療薬剤の反応性には大きな個人差が存在する。その相違を遺伝子多型の観点から解析を行っているが、現在の治療薬剤の場合、副作用の出現率がそもそも低いこと、治療薬毎の予後についての検討は観察期間が短くいまのところ有意な遺伝子多型は得られていない。遺伝子による心臓の機能的・発生的修飾について検討を行うこととし、我々は心筋特異的転写因子 CSX/Mlx2.5 に関連する HMGA2 という遺伝子に着目、この遺伝子導入により心筋細胞への分化が促進されることが示され、目下本遺伝子の過剰発現マウスを作成中である。

A.研究目的

循環器疾患の発症進展には多種類の環境・遺伝要因が関与する。本研究では循環器疾患の特に治療反応性、すなわち薬効及び副作用についてそれを規定する遺伝的要因を明らかにすることを一つの目的とした。

また遺伝子それ自体、あるいはその変異によりもたらされる心臓の機能的修飾について検討を行うこととした。特に後者に関する研究は、再生能力を基本的には持たないと考えられる心臓において、心筋細胞分化や心臓疾患の病態形成に関与する遺伝子の転写調節機構を分子レベルで解明することにより将来的には遺伝子や増殖因子などによる心筋の再生を実現することを通じて、心臓疾患の遺伝子治療や再生医療に発展する可能性が考えられる。

B.研究方法

循環器内科において構築した臨床データベースを用いて心臓血管病および高血圧治療に用いた薬剤とその反応性、副作用のデータ抽出を行い、その有無と遺伝子多型の関連性を検討することとした。我々のデータベースには治療薬の開始、中止および反応性、副作用まで網羅されているため、そのような情報を含むデータベースと遺伝子情報を統合的に解析する環境がすでに整備されている。

心臓における遺伝子機能解析については心筋細胞分化のモデル細胞であるマウス由来の P19CL6 細胞を利用し、その分化過程に発現が上昇する遺伝子を differential display 法を用いて分離、得られた転写共役因子因子 HMGA2 がどのように分化に関わるかを、遺伝子を強制発現させた細胞株の解析などを通じて検討した。また、心筋転写因子 Csx/Nlx2-5 と会合する蛋白質の同定を yeast two hybrid 法を用いて行い、候補遺

伝子を導入した COS 細胞や P19CL6 細胞の解析を通じて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の開始にあたり患者サンプルの採取に関するインフォームドコンセントの内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は東京大学医学部内に設置されたヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会（「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に準拠）において審査・承認されそれに基づいて実施した。

動物実験については当該動物実験施設ガイドラインを遵守した。

C.研究結果 および D.考察

1. 薬剤投与に対する反応性および副作用と遺伝子多型

循環器領域で心不全および高血圧治療薬として知られるアンギオテンシン変換酵素阻害薬(ACE 阻害薬)には咳嗽が 5%から一割の症例に認められる。その副作用の有無とレニンアンギオテンシン系およびブラジキニン受容体の遺伝子多型(ACE, AT1 受容体,AT2 受容体,ブラジキニン BK2 受容体など)について検討し、比較を行った。しかしながら咳嗽と有意に相関するデータを得る事が出来なかった。他の施設からは BK2 受容体の関連性が報告されているが、さらなるデータ集積をまって再検討を行う予定である。

現在、チトクローム P450 に関連した遺伝子多型・変異の検討を行っており、心不全治療のもう一つの標準治療薬であるβ遮断薬の薬効・副作用につき検討を継続中である。

## 2. 転写共役因子 HMG ファミリータンパクが関与する心筋細胞分化の分子機構の解明

我々は、**differential display** 法を用いて、P19CL6 細胞の心筋への分化途上において発現が上昇する因子の一つとして、転写共役因子である HMGA2 を見いだした。HMGA2 は **high-mobility-group protein** ファミリーに属する因子であり、胚の発生期に広範な組織に豊富に発現し、DNA のプロモーター領域に会合して DNA の構造に変化を与え、さらに他の転写因子とも結合し転写複合体を形成して特定の遺伝子の発現を制御する。P19CL6 細胞において、HMGA2 を過剰に発現させた細胞株では心筋関連遺伝子の発現が増強しており、心筋への分化能も著明に亢進した。一方で C 末端側を一部欠損した HMGA2 の変異体を過剰に発現させた細胞株においては、心筋細胞への分化能は著しく低下した。さらに HMGA2 が細胞増殖因子 BMP のシグナル伝達因子である Smad と会合することや、この HMGA2 と Smad の複合体が心筋転写因子 Csx/Nkx2-5 のプロモーター領域に結合して、その転写を活性化することを発見した。これらの結果から、HMGA2 が心筋細胞分化に重要な役割を担うことが分子レベルで示された。現在、この遺伝子を心筋に過剰発現させるトランスジェニックマウスを作製中であり生体における機能解析を試みる予定である。

## E. 結論

心血管疾患の発症およびそれに関連した治療に関連する臨床情報が集積し、その治療の反応性・副作用と遺伝子多型・変異との関連研究が可能になったが、いまのところ有意な関連遺伝子の同定には至っていないが、今後臨床データ集積と遺伝子解析の進行により新規の治療反応性を規定する遺伝子群の同定が可能になるものと思われる。

心臓における遺伝子制御についてあらたに HMGA2 という転写関連因子に注目し解析を進めているが、この知見も踏まえて、引き続き心筋細胞分化の分子機構の解明を目指した研究を継続中であり、最終的にはヒトゲノムを利用した新規の診断・治療法の開発に結びつけたいと考える。

## 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

1) Cohen-Barak O, Yi Z, Hagiwara N, Monzen K, Komuro I, Brilliant MH. Sox6 regulation of cardiac myocyte development. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:5941-8.

2) Naito AT, Tominaga A, Oyamada M, Oyamada Y, Shiraiishi I, Monzen K, Komuro I, Takamatsu T. Early stage-specific inhibitions of cardiomyocyte differentiation and expression of

Csx/Nkx-2.5 and GATA-4 by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *Exp Cell Res.* 2003;291:56-69.

3) Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis.* 2003;169:105-12.

## 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- |           |           |
|-----------|-----------|
| 1. 特許取得   | 特記すべきことなし |
| 2. 実用新案登録 | 特記すべきことなし |
| 3. その他    | 特記すべきことなし |

遺伝子プロモーターおよびその多型性の検討と転写制御の解明  
—マルチプルリスクファクター関連因子の分子機序の解明—

分担研究者 前村 浩二 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科 助手

研究要旨

遺伝子発現はそのプロモーターの制御により行われるためにその機能解明は心臓血管病の病態解明において重要である。血管リモデリングにおいて重要なマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)の遺伝子多型について MMP1, MMP3 のプロモーター多型と心筋梗塞発症との有意相関を見いだした。

平行してマルチプルリスクファクターの背景にあるインスリン抵抗性について抵抗性をもたらすレジスチンが血管の接着分子発現亢進をもたらして動脈硬化促進に寄与すること、またインスリン抵抗性を改善するアディポネクチンが逆にそれを抑制することを明らかにした。

これらの研究の推進により循環器診療における病態生理の解明にあらたな糸口を与え、これらの遺伝的素因を考慮した個別化医療の実践に結びつくと考えられる。

A.研究目的

本研究では、心臓血管病との関連性が考えられる遺伝子群に着目し、とくにその遺伝子発現量を直接規定するプロモーター領域の解析を通じて心臓血管病の病態生理の解明を行うと共に、その領域の遺伝子多型を同定することを目的とした。

また冠動脈疾患に代表される心臓血管病は高血圧、糖尿病、高脂血症などのリスクの集積により発症すると考えられるが、背景になるインスリン抵抗性を規定するアディポサイトカインに着目し、それが血管にもたらす病態についても併せて検討することとした。

B.研究方法

東京大学医学部附属病院循環器内科に入院する全症例について網羅的な臨床情報のデータベースを構築・データ集積を行い、平行して承諾の得られた患者から DNA 採取を行った。あわせて関連医療機関においても遺伝子検体の収集を行い、対照群あるいは追加の疾患群として遺伝子解析に組み入れ主として case-control study の手法で遺伝子解析を行った。候補遺伝子アプローチによる解析であるが、その解析対象遺伝子としては動脈硬化性疾患および心臓疾患との関連が示唆される因子に着目、特に遺伝子の発現量を規定するプロモーター領域の多型に着目した。

またプロモーター領域の転写調節についての分子機序の解明には血管系培養細胞株を用いて検証を行った。アディポサイトカインの血管細胞への薬理作用についての検討はアディポサイトカインのリコンビナント蛋

白を使用し血管由来細胞へ添加、その応答を RNA、蛋白レベルにて検証するとともに、それらアディポサイトカインの血液中の濃度、遺伝子多型と疾患との関連性についても検証した。

(倫理面への配慮)

本研究の開始にあたり患者サンプルの採取に関するインフォームドコンセントの内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は東京大学医学部内に設置されたヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会（「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に準拠）において審査・承認されそれに基づいて実施した。

C.研究結果 および D.考察

動脈硬化に代表される血管のリモデリングに深く関与するマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)の遺伝子多型に関して東京大学循環器内科で収集している遺伝子検体および臨床情報データベースを活用して解析した。MMP-1 -16071G/2G 多型と MMP-3 -1171 5A/6A 多型はそれぞれその多型の部位あるいは近傍に転写因子が結合するためにこの多型の遺伝子型毎に転写活性が異なる functional な遺伝子多型である。この2つの多型は染色体上で近接しているために強い連鎖不平衡を認め、MMP3 5A-MMP1 1G ハプロタイプを保有することは有意に心筋梗塞発症のリスク因子となることを明らかとした。この遺伝子型は心筋梗塞を伴わない冠動脈硬化との関連性は乏しいことから粥腫崩壊（動

脈硬化巢の破綻)に関連した遺伝的マーカーであることが示唆された。

マルチプルリスクファクターはインスリン抵抗性を背景としているが、そのインスリン抵抗性をもたらすレジスチン、逆にそれを改善するアディポネクチンに着目し、それらの血管細胞に及ぼす影響につき培養血管内皮細胞を用いて検討した。前者は糖脂質代謝を介することなく内皮細胞の接着分子発現を促して動脈硬化促進に作用すること、逆に後者はそれを抑制することが示され、両アディポサイトカインの血管への直接作用が明かとなった。またアディポネクチンについてはその血中濃度と冠動脈疾患の重症度が逆相関すること、またアディポネクチンの遺伝子多型が冠動脈疾患と関連することを確認した。

## E. 結論

遺伝子発現はそのプロモーターの制御により行われるためにその機能解明は心臓血管病の病態解明において重要であり、マトリクスメタロプロテアーゼの多型の病態への寄与が明らかとなった。平行してマルチプルリスクファクターの背景にあるインスリン抵抗性について抵抗性をもたらすレジスチンが血管の接着分子発現亢進をもたらして動脈硬化促進に寄与すること、またインスリン抵抗性を改善するアディポネクチンが逆にそれを抑制することが示された。

これらの研究の推進により循環器診療における病態生理の解明にあらたな糸口を与え、これらの遺伝的素因を考慮した個別化医療の実践に結びつくと考えられる。

## 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

Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314:415-419.

Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Iwata T, Fujimoto K, Furukawa M, Miyazaki K, Honma S, Honma K, Kato Y. A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun.*

2004;313:117-124.

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Saito A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol.* 2003;92:181-186.

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis.* 2003;169:105-112.

### 2. 学会発表

13th International Symposium on Atherosclerosis (Kyoto: 2003/9/28-10/2)

Maemura K, Takeda N, Morita H, Imai Y, Harada

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 特記すべきことなし
2. 実用新案登録 特記すべきことなし
3. その他 特記すべきことなし

## 臨床データのファイリングとその活用に関する研究

分担研究者 林 同文 東京大学大学院医学系研究科・薬剤疫学講座 助手

### 研究要旨

心筋梗塞、高血圧に代表される循環器疾患の発症およびその予後、治療と関連する臨床的指標および遺伝的多型性を同定することを目的とし、包括的な臨床データベースを構築、それを活用することにより利尿ペプチドが遺伝的影響を受けることなく心不全、および虚血性心疾患の重症度の予知マーカーになること、また ABCA1 遺伝子多型が HDL 濃度を規定し、それを介して動脈硬化発症に関連する可能性があることを示した。これらの臨床的知見は実地臨床に大いに資するものである。

### A.研究目的

本研究は心筋梗塞、高血圧などに代表される循環器疾患の発症およびその予後、治療と関連する要因について遺伝的背景も加味しつつ各種臨床的指標、検査データ、および心血管疾患の病態に関連することが期待される遺伝子多型性を統合的に解析することにより循環器診療において有用な臨床事象、指標および遺伝的背景をあきらかにすることを目的としている。

さらに診療データベースを活用し、迅速に臨床現場にデータを還元することにより患者の個性に合わせた個別化医療の実践が可能になるような汎用性が高くデータ処理能力に優れた診療支援システムの構築を目指す。

### B.研究方法

東京大学医学部付属病院循環器内科に入院する全症例について網羅的な臨床情報のデータベースを構築・データ集積を行った。データ集積を行うデータベースは約 600 項目にわたる膨大な臨床事象を蓄積するもので、かつデータベース内で自動的に統計処理が内蔵されたいわば統計機能付き電子カルテともいえる高品質のデータベースの構築を独自に達成した。

あわせて関連医療機関においても遺伝子検体の収集を行い、対照群あるいは追加の疾患群として遺伝子解析に組み入れ主として case-control study の手法で遺伝子解析を行った。候補遺伝子アプローチによる解析であるが、その解析対象遺伝子としては動脈硬化性疾患および心臓疾患との関連が示唆される因子の約 60 に及ぶ遺伝子に着目して解析した。特にその遺伝子多型は蛋白構造を規定するコーディング領域の遺伝子多型に着目した。関連性が有意な遺伝子多型が認められる場合には近傍の遺伝子多型についても探索し疾患感受性ハプロタイプの選出した。

### (倫理面への配慮)

本研究の開始にあたり患者サンプルの採取に関するインフォームドコンセントの内容や方法、ならびに本研究にかかる目的や方法などの研究内容は東京大学医学部内に設置されたヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会（「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に準拠）において審査・承認されそれに基づいて実施した。

### C.研究結果 および D.考察

2004 年 3 月には約 3000 例におよぶ臨床情報収集が終了、遺伝子検体は約 1400 例に達している。この臨床情報と遺伝子検体を活用し以下の結果を得た。

- (1) 脂質代謝において抗動脈硬化作用を有する高比重リポ蛋白コレステロール(HDL コレステロール)に関する遺伝子多型について HDL コレステロールの生成に関わる ABCA1(ATP-binding cassette transporter A 1)遺伝子の Met823Ile 多型が日本人において HDL 濃度を有意に規定する遺伝的要因であることが判明した。この解析にあたっては脂質降下薬投与の有無により患者群を分別する必要があったが、データベース内のデータおよび患者の自動峻別機能により瞬時にその対応が可能であったことを付け加えておく。
- (2) 本来心不全で血中濃度が上昇するマーカーとして知られるナトリウム利尿ホルモン(ANP,BNP)が左室収縮能力が正常である狭心症患者群においてその病変枝数と正相関し、狭心症の重症度のマーカーになる可能性があること、その機序として心筋虚血による拡張障害が背景にあることを見いだした。さらに糖尿病を合併している患者群において特にその差異は大きく、利尿ペプチドが心疾患の有無の評価のみならず、心収縮能正常例において

は心筋虚血の検出に有用な検査指標であることを明らかにした。また ANP, BNP およびそのクリアランスに関わる受容体 NPR-C の遺伝子多型について検討したが、ANP, BNP 濃度はそれらの遺伝子多型との関連性が見いだされず、ANP, BNP は遺伝的素因の影響を受けることのない有用な心疾患予知マーカーであることがあきらかとなった。

#### E. 結論

循環器疾患患者の包括的臨床情報データベース構築により臨床ペプチドが心不全の予知マーカーとしての意義に加え、虚血性心疾患の重症度を予知する指標になりうることを示された他、遺伝子多型を含めた解析の結果、ABCA1 遺伝子多型が HDL 濃度と関連し、それを介して動脈硬化進展に関与する可能性があることを示した。今後、臨床情報収集と遺伝子情報を含めたデータ解析により実地臨床に応用可能なマーカーを複数選出することができ、最終的にはそれを実地臨床に還元されることが期待される。

#### 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

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis*. 2003;169:105-12.

Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Saito A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003;92:181-186.

Hayashi D, Imai Y, Hiroyuki M, Fujita H, Monzen K, Yamazaki T, Yamazaki T, Nagai R. Development of the pioneering clinical support system utilizing

information technology -clinical informatics and genome analysis -. *Jpn Heart J* (in press).

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 特記すべきことなし
2. 実用新案登録 特記すべきことなし
3. その他 特記すべきことなし