

20030367

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井ノ上 逸朗

平成16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：200300367A

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15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.28～P.38

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15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. Hemolysate に対する培養血管平滑筋細胞の遺伝子発現の変化 :

cDNAmicroarray を用いて . . . . . 11

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 . . . . . 19

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 2 本鎖 RNA 処理に伴うレチノイン酸誘導遺伝子 I の発現  
. . . . . 23

佐藤 敬

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 39

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

## 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

本研究は（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。

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（ $\lambda_s$ ）は6と推定されている。本研究ではくも膜下出血の主要原因である、脳動脈瘤の感受性遺伝子の同定を試みた。基本戦略として、罹患同胞対連鎖解析を用いた遺伝子座マッピング、そして特定できた連鎖領域でのポジショナル・クローニングをおこなった。

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、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。最も強い連鎖を得た染色体7番の連鎖ピークマーカー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LDブロック構造を明らかにすることで、かつ新たに開発したPermutation法でのアソシエーション・スタディにより、エラスチン遺伝子、もしくはエラスチン領域に原因を特定できている。

### 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

### A. 研究目的

脳動脈瘤の破裂によるくも膜下出血はほぼ半数が死に到る重篤な疾患であり、予防医学的対策が求められる。脳動脈瘤破裂は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)

すでに家系収集を終了しており、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121同胞対を収集した(継続中)。アソシエーション・スタディのために、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。同様にアソシエーション・スタディに必要な脳動脈瘤患者、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いる。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200例、ドイツ人50例収集できてい

る。海外施設の臨床データに関しても同一ファイル(File Maker)に従い収集しており(臨床データは同一)、採取的にエクセルファイルで管理している。

### B-2) 倫理面への配慮 (糟谷担当)

今回の脳動脈瘤遺伝解析研究は、東京女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)。研究実施機関である東京大学医科学研究所においても倫理承認を得ている(平成13年6月28日付け)。血液からのゲノムDNA精製は常法に従った。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。

### B-2) SNPによるアソシエーション・スタディ (井ノ上担当)

連鎖領域に存在する候補遺伝子のSNP(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](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SNPを直接シーケンスにより開発した。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4.7M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 SNPalyze プログラム (Dynacom) を用いた。

B-3) Permutation 法の開発 (井ノ上担当)

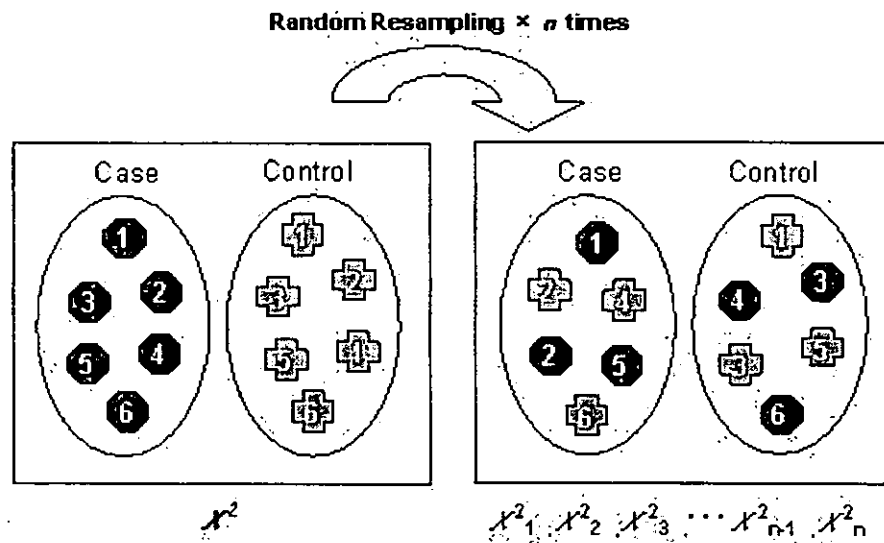
疾患遺伝子同定は SNP によるアソシエーション・スタディとハプロタイプ解析を組み合わせている。ハプロタイプは推定頻度なので、患者、対照で推定頻度を比較するのは統計学的に問題がある。そこで、Permutation 法をおこなうことで、より精度の高いハプロタイプ関連解析を試みた。10000 回の Permutation (入れ替え) をおこないカイ分布を得、最初に得られたカイ 2 乗値が分布のどこに位置するかで P

値を算出する (図 1)。プログラムは SNPalyze に組込んでいる。この手法により、サンプル数が少なくても、また頻度の低いハプロタイプが存在していても精度の高い関連解析が可能となった。

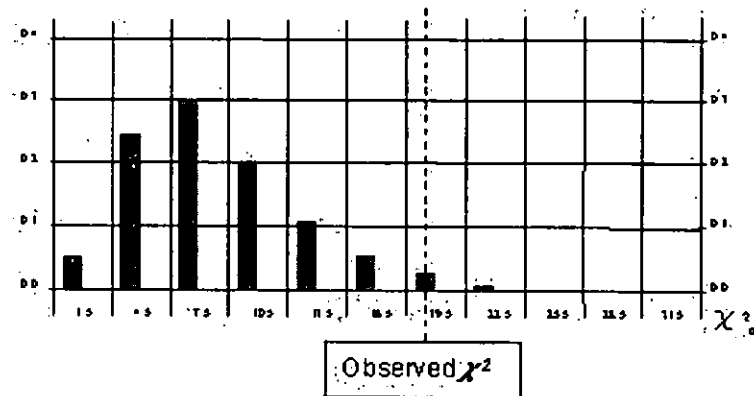
B-4) 平滑筋細胞培養 (中島、佐藤担当)

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。培養細胞から RNA を抽出し、常法に従い RT-PCR をおこなう。

## ☒1 Permutation Test



### Statistical Distribution of Replicated $\chi^2$ values



$$\text{Permutation P} = \frac{\text{Number of } \chi^2_i \geq \chi^2}{\text{Replication Times}}$$

### 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 7q11 領域で詳細な連鎖不平衡マッピングを試みた。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。

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。

同時にゲノム領域を 2、3、4 SNP ずつスキャンし、アソシエーション・スタディ、連鎖不平衡解析をおこない、疾患遺伝子座のピンポイントを試みた。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 (図 2)。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があることが明らかになった。領域をスキャンさせた結果、図 3 に示すよう ELN, LIMK1, CYLN2 遺伝子が存在する領域に疾患遺伝子座をピンポイントできている。

図2. Physical map and LD map of susceptible region for IA

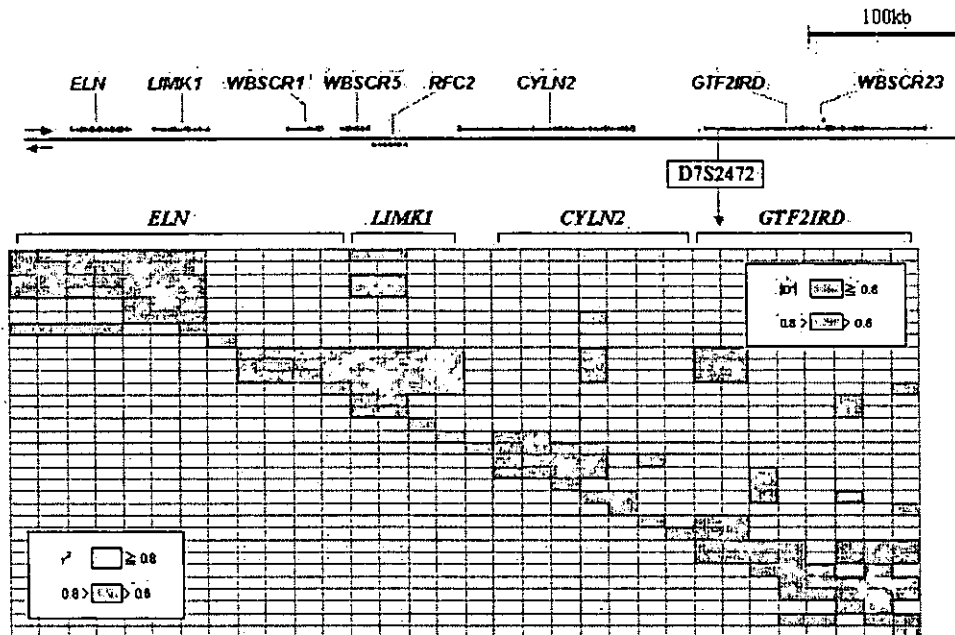
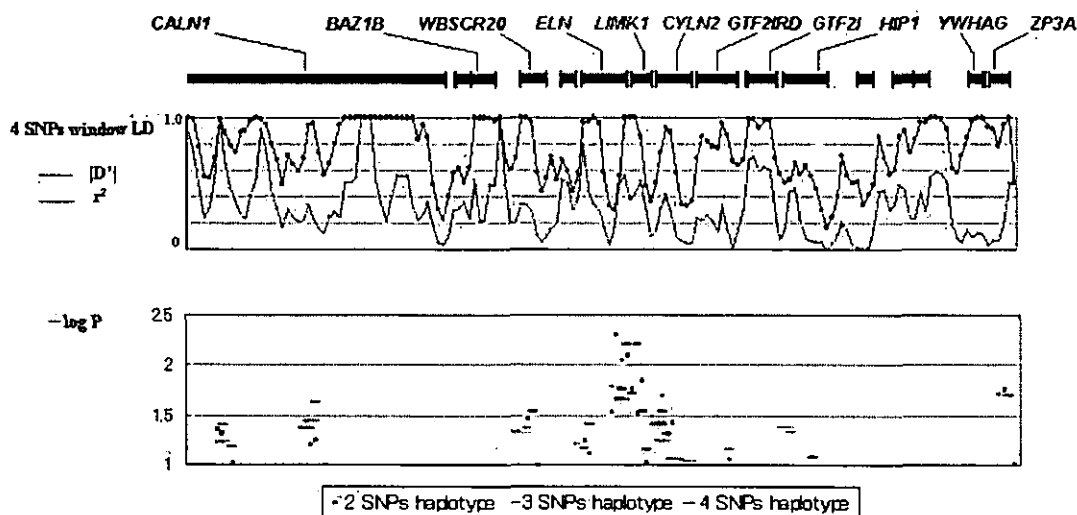




図3 Results for sliding window analysis



C-2) エラスチン遺伝子の遺伝学的関与  
 家族歴のある脳動脈瘤患者、および50歳未満で発症した患者（計210例）をアソシエーション・スタディに用いると、エラスチン遺伝子イントロン31に存在するSNPで  $P=0.0013$ ,  $OR=3.40$  と強い関連を認めている。Permutation法でも有意差を得ている。また平滑筋細胞を用い、エラスチン mRNA のスプライシングを検討したところ、いくつかの症例でエクソン32が抜ける特異的なパターンを示した。スプライシングパターンと脳動脈瘤発生との関連について今後の検討を要する。

#### D. 考察

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。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ごくわずかである。追試できた例はさらに少ない。全国で収集した罹患同胞対を用いたゲノム全域での連鎖解析により、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、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、188SNPsをもちゲノム領域での連鎖不平衡マッピングをおこなった。同時にPermutation法を開発し、精度の高いアソシエーション・スタディを

目指した。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. 研究発表

### 1. 論文発表

Sasaki T, Kasuya H, Onda H, Sasahara A, Hori T, Inoue I. Role of p38 mitogen-activated protein kinase on cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, in press.

Nakajima T, Wooding S, Sakagami T, Emi M, Tokunaga K, Tamiya G, Ishigami T, Umemura S, Munkhbat B, Jin F, Guan-jun J, Hayasaka I, Ishida T, Saito N, Pavelka K, Lalouel J-M, Jorde LB, Inoue I. Natural selection and population history in the human angiotensinogen gene (AGT): 736 AGT sequencing in worldwide chromosomes. *Am J Hum Genet*, in press.

Yoshida K, Inoue I. Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors. *Oncogene*, in press.

Ohmori H, Ando Y, Makita Y, Onouchi Y, Nakajima T, Saraiva MJM, Terazaki H, Sulu O, Sobue G, Nakamura M, Yamaizumi M, Munar-Ques M, Inoue I, Uchino M, Hata A. Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Med Genet*, in press.

Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, Akagawa H, Hashiguchi K, Nakajima T, Hori T, Inoue I. Collagen type I $\alpha$ 2 (COL1A2) is the susceptible gene for intracranial aneurysms. *Stroke*, 35, 443-448, 2004.

Matsui H, Suzuki K, Ohtake N, Nakata S, Takeuchi T, Yamanaka H, Inoue I. Genomewide linkage analysis of familial prostate cancer in Japanese population. *J Hum Genet*, 49, 9-15, 2004.

Yoshida K, Oyaizu N, Dutta A, Inoue I. The destruction box of human Geminin is critical for proliferation and tumor growth in human colon cancer cells. *Oncogene*, 23, 58-70, 2004.

Uno Y, Sakamoto Y, Yoshida K, Hasegawa T, Hasegawa Y, Koshino T, Inoue I.

Characterization of six base pair deletion in the putative HNF1-binding site of human *PXR* promoter. *J Hum Genet*, 48, 594-597, 2003.

Yoshida K, Inoue I. Conditional expression of MCM7 increases tumor growth without altering DNA replication activity. *FEBS Lett*, 553, 213-217, 2003.

Tanaka T, Ikari K, Furushima K, Okada A, Tanaka H, Furukawa K, Yoshida K, Ikeda T, Ikegawa S, Hunt S, Takeda J, Toh S, Harata S, Nakajima T, Inoue I. Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses identify *COL6A1*, on chromosome 21, as the locus for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Am J Hum Genet*, 73, 812-822, 2003.

Tachikui H, Saitou N, Nakajima T, Hayasaka I, Ishida T, Inoue I. Lineage specific homogenization of the polyubiquitin gene among human and great apes. *J Mol Evol*, 57, 737-744, 2003.

Kawaguchi Y, Furushima K, Sugimori K, Inoue I, Kimura T. Association Between Polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with the radiologic characteristic and ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine*, 28, 1424-1426, 2003.

Isashiki Y, Sonoda S, Izumo S, Sakamoto T, Tachikui H, Inoue I. Phylogenetic Assessment of the mitochondrial DNA displacement loop haplotype in Japanese patients with Leber's hereditary optic neuropathy harboring the mitochondrial DNA G11778A mutation. *Ophthalmic Res* 35, 224-231, 2003.

Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, Akagawa H, Jinnai N, Nakajima T, Hori T, Inoue I. Association of positional and functional candidate genes FGF1, FBN2, and LOX on 5q31 with intracranial aneurysm. *J Hum Genet* 48, 309-314, 2003.

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. Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 358-363, 2003.

Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Hori T, Nakajima T, Inoue I. Endoglin is not a major susceptibility gene for intracranial aneurysm among Japanese. *Stroke* 34, 1640-1644, 2003.

## 2. 学会発表

なし

## G. 知的所有権の取得状況

なし

1. 実用新案登録

なし

2. その他

なし

hemolysate に対する培養血管平滑筋細胞の遺伝子発現の変化：  
cDNA microarray 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**

これまでのイヌクも膜下出血モデルの検討では、脳血管攣縮に一致して脳血管壁で上昇しているのは炎症に関与するcytokineであった。また、これらの産生に関係すると考えられるp38MAPKのinhibitorであるFR167653を、イヌクも膜下出血モデルで使用すると、脳血管攣縮は有意に抑制された。

今回はこれらの作用機序をくわしく分析するために、ヒト培養平滑筋細胞にhemolysateを作用させ、細胞の遺伝子発現の変化をcDNA microarrayで網羅的にみるとともに、FR167653の作用をRT-PCRを用いて検討した。24時間では、transcription factorやoxidative stressに関与するものが、48時間後および72時間後にはinterleukinやchemokineなど炎症にかかわる遺伝子が、120時間後にはextracellular matrixがup-regulateされていた。これらの経時的変化は、イヌクも膜下出血モデルと一致する結果であった。FR167653は炎症に関するIL1 $\beta$ , IL1 $\alpha$ , IL8の遺伝子発現の上昇を有意に抑制し、p38MAPKのリン酸化を抑制した。

**A. 研究目的**

脳血管攣縮の原因はまだ十分解明されたといえないが、シグナル伝達系とともに、蛋白、遺伝子発現の変化が関係しているのは明らかである。これまで我々は、イヌクも膜下出血モデルにおいて、どの遺伝子が血管壁で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。なかでも特に炎症に関係する遺伝子の発現が著明に上昇しており、抗炎症作用を持ち IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  の suppressant として知られ p38MAPK inhibitor である FR167653 (FR) が脳血管攣縮を抑制することを示してきた。そこで今回、これらの作用機序をくわしく分析するために、ヒト培養平滑筋細胞に hemolysate を作用させ、細胞の遺伝子発現の変化を cDNA microarray で網羅的にみるとともに、FR167653 の作用を RT-PCR を用いて検討した。さらに、Western blotting を用いてや蛋白のリン酸化を解析した。

**B. 研究方法**

ヒト培養平滑筋細胞を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10%FBS を加え 37°C にて培養した。hemolysate は採血した動脈血を 2500G にて 15 分間遠沈し、上清を除いた後に 3 倍量の生理食塩水にて 3 回 wash して可能な限り血小板を除去した。超音波破碎を行った後に 15,000G にて 90 分間遠沈し、上清を hemolysate として使用した。培養平滑筋細胞に hemolysate を 10 倍希釈濃度となるように加えた。使用した hemolysate の oxyhemoglobin 濃度は 4.73  $\pm$  0.50mM であった。それぞれ 24 時間、48 時間、72 時間、120 時間後の細胞より total RNA を抽出し、Agilent cDNA microarray human I kit にて control に対する遺伝子発現の変化を検討した。Agilent cDNA microarray human I kit はスライドガラス上に約 13,000 の cDNA を plot したものであり、一度に網羅的な遺伝子発現の変化を見る事が出来る。dye-swap reaction にて 2 回の実験を行い、2 回とも 2 倍以上に上昇していた遺伝子を有意とした。

次に、FRの培養血管平滑筋細胞の遺伝子発現に及ぼす影響をreal-time RT-PCRにて確認した。培養平滑筋細胞にFR 1  $\mu$  M (5.43ng/ml)を加え、30分pre-incubateした後にhemolysateを投与し、24時間後にtotal RNA抽出し、加えないものと比較した。またhemolysate投与およびhemolysate + FR投与60分後の細胞におけるp38MAPKおよびHSP27のリン酸化をWestern blottingにより測定した。

### C. 結果

cDNA microarrayによる遺伝子発現の変化を見ると、controlと比較してその発現がhemolysateによって2倍以上に上昇し、2回の実験で再現性を示した遺伝子数は、24時間後に397遺伝子、48時間後に49遺伝子、72時間後に23遺伝子、120時間後に31遺伝子であった。11924遺伝子については明らかな変化が認められないか再現性が見られず(0.5-2倍)、74遺伝子については発現が0.5倍以下に抑制されていた(Table1)。24時間後の遺伝子発現を見ると、zinc finger proteinやtranscription factorなど転写に関与するもの、またnitric oxide synthase 3やsuperoxide dismutase 1など

のoxidative stressに関与するものが多く認められた。48時間後および72時間後にはinterleukinやchemokine、あるいはinterleukinによってup-regulateされるprostaglandin

-endoperoxide synthase 2など炎症にかかわる遺伝子の上昇が認められ、transcription factorはほとんど認められなかった(Table2, Table3)。120時間後にはextracellular matrixのcollagen type1、type3、type5の上昇が認められた(Table4)。

24時間後に遺伝子発現がcDNA microarrayで4倍以上に上昇していたものについてはreal-time RT-PCRを用いて定量し、その変化を確認した。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 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ においては、FR投与群とプラセボ投与群間において有意差を認めた( $P < 0.05$ )。

Western blottingにおいては、hemolysateの投与によりp38MAPKのリン酸化は促進しており、FRによって有意に抑制されていた。HSP27はhemolysateによるリン酸化の上昇は認められたが、FRによるリン酸化の抑制効果は認められなかった。

Table 1. Up-regulated genes on day1 (24 hours)

Gene Name	Systematic	Fold change
Alu-binding protein with zinc finger domain	JB3877	7.5642
phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	U67733	6.597965
general transcription factor IIIe, polypeptide 1 (alpha subunit, 56kD)	567859	5.242253
nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	D26607	5.045556
cytochrome P450, subfamily 1 (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3; primary)	U03688	4.999401
superoxide dismutase 2, mitochondrial	YD0985	4.679969
collagen, type XVII, alpha 1	MD91669	4.457825
zinc finger protein 195	AJ874297	4.411842
CD2 antigen (p50), sheep red blood cell receptor	M16445	4.402932
superoxide dismutase 1, soluble (erythrocytic lateral sclerosis 1 (aduk))	AI421041	4.246372
fms-related tyrosine kinase 3	U02687	3.863092
activating transcription factor 7	XS2943	3.709061
interleukin-1 receptor-associated kinase 2	AF026273	3.559066
interleukin 13	NM_002188	3.535192
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	U12767	3.425382
regulator of G-protein signalling 7	U32439	3.386648
protein kinase C, gamma	ZL5114	3.373432
novel Ras family protein	AK001478	2.973521
G protein-coupled receptor 38	AF034632	2.953901
myelin basic protein	M13577	2.881025
zinc finger protein 137 (clone pHZ-30)	U09414	2.864251
jagged 1 (Alagille syndrome)	U73936	2.842202

These genes were significantly up-regulated (>2fold) with cDNA Microarray after stimulated by hemolysate

**Table 2 Up-regulated genes on day2 (48 hours)**

Gene Name	Systematic	Fold change
interleukin 8	M17017	41.18509
matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	NM_002425	10.29177
epiregulin (schwannoma-derived growth factor)	M30703	8.910498
GR01 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	NM_001511	8.744863
Human angiopoietin-like protein PP1158 mRNA; complete cds	AF202636	7.44672
interleukin 1, beta	X04500	7.165145
small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 11 (cotablin)	Z75668	4.795799
prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase)	D28235	4.14509
metallothionein 1G	J03910	4.005014
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	M59465	3.863812
STAT induced STAT inhibitor 2	AF037989	3.197275
interleukin 6 (interferon, beta 2)	X04430	2.945791
transforming growth factor beta-stimulated protein TSC-22	NM_006022	2.703012
GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle	AW297828	2.55815
superoxide dismutase 2, mitochondrial	Y00472	2.552031
transcription factor ets	AF218235	2.436492
MAD (mothers against decapentaplegic, Drosophila) homolog 7	NM_005904	2.207359
GATA-binding protein 6	NM_005257	2.053142
tight junction protein 2 (zona occludens 2)	L27476	2.028299

These genes were significantly up-regulated (>2fold) with cDNA Microarray after stimulated by hemolysate

**Table 3 Up-regulated genes on day3 (72 hours)**

Gene Name	Systematic	Fold change
interleukin 8	X83877	22.95514
superoxide dismutase 2, mitochondrial	U67733	5.823083
collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	S67859	5.797049
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	D26607	5.227909
epiregulin	U03688	5.012876
cytochrome P450, subfamily 1 (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glaucoma 3)	Y00985	4.401057
interleukin 1, beta	M91669	3.733645
interleukin 13 receptor, alpha 2	AB74297	2.593218
GR02 oncogene	M16445	2.590377
heme oxygenase (decycling) 1	AF41041	2.427024
GR01 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	U02687	2.323625
suppression of tumorigenicity 16 (melanoma differentiation)	J052943	2.296249
cathpsin L	AF026273	2.281744

These genes were significantly up-regulated (>2fold) with cDNA Microarray after stimulated by hemolysate

Table 4 Up-regulated genes on day5 (120 hours)

Gene Name	Systematic	Fold change
heme oxygenase (deacylase) 1	Z82244	14.0711632
complement component 3	KD2765	7.96309689
collagen, type I, alpha 1	Z74615	5.56009229
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	S77035	3.83168677
interleukin 13 receptor, alpha 2	R52795	3.47472949
interleukin 6 (interferon, beta 2)	JD4430	3.39985973
collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	XI4420	3.31491197
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	Y00630	2.93436411
collagen, type V, alpha 2	Y14690	2.69858437
prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	D38145	2.67829864
coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	AJ085165	2.53141296
superoxide dismutase 2, mitochondrial	Y00472	1.98571538
fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)	AJ075338	1.91722022
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	Y00630	1.82500896
cytochrome P450, subfamily I (dioxin-inducible), polypeptide 1 (glioma 3)	NM_000104	1.8219439
interleukin 8	M17017	1.73746474
tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (collagenase inhibitor)	D11139	1.63195057

These genes were significantly up-regulated (>2fold) with cDNA Microarray after stimulated by hemolysate

#### D. 考察

脳血管攣縮においては、シグナル伝達系とともに、蛋白、遺伝子発現の変化が関係しているのは明らかである。今回、培養血管平滑筋細胞を用いてその本質に迫るべく、網羅的な遺伝子発現の検討をおこなった。transcription factorはhemolysate投与後早期に上昇が認められるが、48時間以降ではほとんど上昇が認められない。48時間から72時間後においては炎症系cytokineやchemokineの上昇が認められた。120時間後ではextracellular matrixであるcollagen type1, type3, type5の上昇が認められた。

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報告されており、炎症系cytokine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,

#### E. 結論

ヒト培養平滑筋細胞のhemolysateの作用

NF- $\kappa$ Bなどに働き様々な遺伝子発現に関与する。これらは好中球にIL-8の発現を促し、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の産生を促す。またp38MAPKによりリン酸化されたMAPKAP2は、HSP27やcaldesmonを介して平滑筋収縮に関与するとの報告もある。

今回用いた継代5-8世代の培養細胞では、hemolysateによっても収縮はみられないため、攣縮との関係は明らかにはできない。しかし、hemolysateによる培養平滑筋細胞における遺伝子発現の変化とp38MAPKのリン酸化はイヌ脳血管攣縮モデルときわめて類似しているため、実際のくも膜下出血時の脳血管の反応を反映しているものと考えてよいといえる。今後はprimary cultureなどで、より実際の攣縮に近い状況をつくりだし、in vitroモデルを確立することも重要な課題である。脳血管攣縮は、生理的範囲を超えて持続する脳血管の収縮である。今回検討した培養血管平滑筋の遺伝子発現の変化とp38MAPKのリン酸化が、どのように攣縮に関係しているかは、推測の域をでないが、炎症産物の産生などからみて、内皮、外膜からの細胞浸潤など、周囲の環境も考慮して考える必要があろう。をcDNA microarrayで網羅的にみると、24時間では、transcription factorや



oxidative stressに関与するものが、48時間後および72時間後にはinterleukinやchemokineなど炎症にかかわる遺伝子が、120時間後にはextracellular matrixがup-regulateされていた。これらの経時的变化は、イヌくも膜下出血モデルと一致する結果であった。FR167653は炎症に関するIL1 $\beta$ , IL1 $\alpha$ , IL8の遺伝子発現の上昇を有意に抑制し、p38MAPKのリン酸化を抑制した。

#### F. 研究発表

##### 【論文発表】

Kasuya H, Onda H, Yoneyama T, Sasaki T, Hori T: Bedside monitoring of circulating blood volume following subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 34:956-960, 2003

Hiyama H, Kasuya H, Dan S, Hori T: Orbital syndrome after a surgery of vestibular schwannoma via middle fossa approach. *Acta Neurochir (Wien)* 145:83-85, 2003

Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Hori T, Nakajima T, Inoue I: Endoglin is not a major susceptibility gene for intracranial aneurysm among Japanese. *Stroke* 34:1640-1644, 2003

Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, Akagawa H, Jinnai N, Nakajima T, Hori T, Inoue I: Association of positional and functional candidate genes FGF1, FBN2, and Lox on chromosome 5q31 with intracranial aneurysm. *J Hum Genet* 48:309-314, 2003

Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, Akagawa H, Hashiguchi K, Nakajima T, Hori T, Inoue I: Collagen type I  $\alpha$  2 (COL1A2) is the susceptible gene for intracranial aneurysms. *Stroke* 35:443-448, 2004

Sasaki T, Kasuya H, Onda H, Sasahara A,

Hori T, Inoue I: Role of p38 mitogen-activated protein kinase on cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2004 (in press)

Kasuya H: Fisher's classification. *J Neurosurg* 2004 (letter) (in press)

Kasuya H, Onda H, Sasahara A, Akagawa H, Yoneyama T, Takeshita M, Hori T: Impact of cerebral vasospasm on outcome after the application of nicardipine prolonged-release implants: Analysis of 83 consecutive patients with acute subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2004 (in press)

Kasuya H, Onda H, Sasahara A, Akagawa H, Yoneyama T, Hori T: Circulating blood volume following subarachnoid hemorrhage. Loch Macdonald (ed): *Cerebral Vasospasm VII Proceedings of the 8th International Conference on Cerebral Vasospasm*. Chicago 2003 Thieme Medical Publishers, Inc. (in press)

Sasaki T, Kasuya H, Onda H, Sasahara A, Hori T: Effects of MAPK inhibitor (FR167653) on cerebral vasospasm in a canine double-hemorrhage model. Loch Macdonald (ed): *Cerebral Vasospasm VII Proceedings of the 8th International Conference on Cerebral Vasospasm*. Chicago 2003 Thieme Medical Publishers, Inc. (in press)

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

糟谷英俊、恩田英明、川島明次、米山琢、白石和子、堀智勝:脳神経外科患者における深部静脈血栓症、肺塞栓症:危険因子とヘパリンの使用経験。脳神経外科速報 13: 857-862, 2003

赤川浩之、糟谷英俊、米山琢、恩田英明:脳血管障害の遺伝子異常:脳動脈瘤。脳神経外科速報 14:258-265, 2004

糟谷英俊、赤川浩之、米山琢、恩田英明:脳動脈瘤と遺伝子。分子脳血管病 (in press)

#### 【学会発表】

Kasuya H, Onda H, Sasaki T, Sasahara A, Hori T: Clinical Trial of Nicardipine Prolonged-Release Implants for Prevention of Vasospasm. 8<sup>th</sup> International Conference on Cerebral Vasospasm. Chicago July 9-12, 2003 Abstract 47 (Invited lecture)

Kasuya H, Onda H, Sasahara A, Akagawa H, Yoneyama T, Hori T: Bedside monitoring of circulating blood volume following subarachnoid hemorrhage. 8<sup>th</sup> International Conference on Cerebral Vasospasm. Chicago July 9-12, 2003 Abstract 40

Sasaki T, Kasuya H, Onda H, Sasahara A, Hori T: Effects of MAPK inhibitor (FR167653) on cerebral vasospasm in a canine double-hemorrhage model. 8<sup>th</sup> International Conference on Cerebral Vasospasm. Chicago July 9-12, 2003 Abstract 31

Sasahara A, Sasaki T, Kasuya H, Onda H,

Hori T: Microarray analysis of hemolysate-induced differential gene expression in cultured human vascular smooth muscle cells. 8<sup>th</sup> International Conference on Cerebral Vasospasm. Chicago July 9-12, 2003 Abstract 59

Kasuya H: Nicardipine prolonged-release pellet for preventing cerebral vasospasm. Department of Neurosurgery, Philipps University Hospital, Marburg, Germany, Oct 6, 2003(Invited lecture)

Kasuya H: Genetic analysis for intracranial aneurysms. Department of Neurosurgery, Philipps University Hospital, Marburg, Germany, Oct 6, 2003 (Invited lecture)

Kasuya H: Nicardipine prolonged-release pellet for preventing cerebral vasospasm. Department of Neurosurgery, Klinikum Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Oct 10, 2003 (Invited lecture)

Kasuya H: Genetic analysis for intracranial aneurysms. Department of Neurosurgery, Department of Neurosurgery, Klinikum Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Oct 10, 2003 (Invited lecture)

糟谷英俊、恩田英明、川島明次、堀智勝:くも膜下出血患者の循環血液量変化。第8回日本脳神経外科救急学会 大阪 2003/17,18 抄録集 pp86

川島明次、岡田芳和、糟谷英俊、恩田英明、堀智勝:椎骨動脈解離性動脈瘤の治療予後の検討。第32回日本脳卒中の外科学会 東京 2003/3/14,15 プログラム抄録集 pp126

糟谷英俊、恩田英明、川島明次、岡田芳和、堀智勝:重症くも膜下出血の治療、管理。第32回日本脳卒中の外科学会 東京 2003/3/14,15 プログラム抄録集 pp113

恩田英明、糟谷英俊、米山琢、堀智勝:脳動脈瘤原因遺伝子同定のための研究戦略。第32回日本脳卒中の外科学会 東京 2003/3/14,15 プログラム抄録集 pp49

佐々木寿之、糟谷英俊、恩田英明、笹原篤、堀智勝:血管平滑筋培養細胞における遺伝子発現の変化:cDNA Microarray, Real-time RT-PCR を用いて。第19回スパズムシンポジウム 東京 2003/3/14 抄録集 pp21

糟谷英俊、笹原篤:くも膜下出血に伴う脳血管攣縮の分子生物学。平成15年度脳動脈瘤の責任遺伝子同定と出血前診断への臨床応用 班会議 弘前 2003/4/25

赤川浩之、米山琢、恩田英明、糟谷英俊、堀智勝:脳動脈瘤と COL1A2 の遺伝子の SNPs 関連解析。第4回日本分子脳神経外科学会。東京 2003/9/3,4 プログラム抄録集 pp17

恩田英明、糟谷英俊、米山琢、赤川浩之、堀智勝:脳動脈瘤と連鎖を認めた 7q11 の連鎖不平衡マッピング。第4回日本分子脳神経外科学会。東京 2003/9/3,4 プログラム抄録集 pp18

糟谷英俊:脳動脈瘤の責任遺伝子同定。第13回脳血管シンポジウム 大阪 2003/9/6 プログラム抄録集 pp13-14 (招待講演)

糟谷英俊、堀智勝:再発顔面痙攣の手術。第6回脳神経減圧術研究会。2003/9/30 抄録集 pp29

糟谷英俊、恩田英明、堀智勝:ニカルジピンペレットのスパズム予防効果。第62回日本脳神経外科学会総会 仙台 2003/10/123

恩田英明、糟谷英俊、米山琢、赤川浩之、堀智勝:脳動脈瘤と連鎖を認めた第7番染色体長腕の物理地図の作製と連鎖不平衡マッピング。第62回日本脳神経外科学会総会 仙台 2003/10/123

赤川浩之、米山琢、恩田英明、糟谷英俊、堀智勝:脳動脈瘤と COL1A2 の遺伝子の SNPs 関連解析。第62回日本脳神経外科学会総会 仙台 2003/10/123

高須雄一、糟谷英俊、佐々木寿之、塩川和彦、久保長生、堀智勝:cauda equina spinal AVMの一症例。第92回日本脳神経外科学会 関東地方会 2003/11/29

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. 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と考えられる。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、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し、3つの大陸集団（アフリカ、ユーラシア、東アジア）に共通する54個の遺伝子多型による連鎖不平衡の解析をおこなった。アフリカ系の集団に比べ、ユーラシア系、東アジア系の集団では連鎖不平衡が保たれており、ハプロタイプ構造も類似することが示された。疾患遺伝子の同定には連鎖不平衡のブロック構造、ハプロタイプ解析が不可欠であると考えられた。

一方、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

くも膜下出血は重篤な疾患であり、その死亡率は昭和26年より一貫して漸増している。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