

Genetic variations of regulator of G-protein signaling 2 in hypertensive patients and in the general population

Jin Yang^a, Kei Kamide^a, Yoshihiro Kokubo^b, Shin Takiuchi^a, Chihiro Tanaka^c, Mariko Banno^c, Yoshikazu Miwa^a, Masayoshi Yoshii^a, Takeshi Horio^a, Akira Okayama^b, Hitonobu Tomoike^{a,b}, Yuhei Kawano^a and Toshiyuki Miyata^c

Objectives Mice deficient in the regulator of G-protein signaling 2 (*RGS2*) exhibit a strong hypertensive phenotype. We studied whether genetic variations in *RGS2* are implicated in hypertension or other phenotypes in Japanese hypertensive individuals and the general population.

Methods We sequenced all exons of *RGS2* and the promoter region in 953 and 48 hypertensive individuals, respectively. Genotyping by the TaqMan polymerase chain reaction method was performed for six missense or frameshift mutations and common single nucleotide polymorphisms in the general population, with a sample size of 1872 individuals (862 men and 1011 women).

Results We identified five novel missense mutations (Q2L; $n = 2$, Q2R; $n = 1$, M5V; $n = 1$, R44H; $n = 2$, Q78H; $n = 1$) and one novel frameshift mutation (1925–1926insT; $n = 2$) in a heterozygous state, in addition to 33 variations including five common single nucleotide polymorphisms. Six missense/frameshift mutations and three common single nucleotide polymorphisms (–638A > G, 1026T > A, 1891–1892delTC) were successfully genotyped in the general population. Mutations Q2L ($n = 2$), M5V ($n = 1$), and 1925–1926insT ($n = 2$) were only identified in hypertensive subjects. Six out of seven individuals with the R44H mutation, which occurs in the amphipathic α -helical domain of *RGS2*, had hypertension. The results showed a significant association of two common single nucleotide

polymorphisms, 1026T > A [TT versus TA + AA: odds ratio (OR) 1.33; 95% confidence interval (CI) 1.02–1.74; $P = 0.035$] and 1891–1892delTC (I: insertion allele, D: deletion allele, II versus ID + DD: OR 1.47; 95% CI 1.09–1.97; $P = 0.012$), with hypertension in women by multivariate logistic regression analysis.

Conclusion Our results suggest that genetic variations in *RGS2* contribute partly to the hypertensive phenotype. *J Hypertens* 23:1497–1505 © 2005 Lippincott Williams & Wilkins.

Journal of Hypertension 2005, 23:1497–1505

Keywords: association study, hypertension, missense mutation, *RGS2*, single nucleotide polymorphism

^aDivisions of Hypertension and Nephrology, ^bPreventive Cardiology and ^cResearch Institute, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan.

Sponsorship: This study was supported by the Programme for Promotion of Fundamental Studies in Health Science of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan and a grant-in-aid from the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare.

Correspondence to Kei Kamide, MD, PhD, Division of Hypertension and Nephrology, National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8566, Japan.
Tel: +81 6 6833 5012; fax: +81 6 6872 7486; e-mail: kamide@hsp.ncvc.go.jp

Received 22 November 2004 Revised 11 April 2005

Accepted 11 April 2005

See editorial commentary page 1465

Introduction

Signaling by G-protein-coupled neurotransmitter receptors in the autonomic nervous system and vasoregulatory factor receptors in the periphery govern both blood pressure, by controlling the constriction and dilatation of resistance arterioles, and electrolyte and fluid balance by the kidneys [1,2]. Hypertension can arise in rodents after the deletion of genes encoding G-protein-coupled receptors (GPCR) such as the dopamine D3 receptor and the endothelin type B receptor [3,4], which normally decrease blood pressure. It can also be caused by the overproduction of GPCR agonists, such as angiotensin and endothelin, which act together to elevate blood pressure [5,6]. In addition, an increased risk of hypertension has been associated with genetic polymorphisms in genes encoding components of

GPCR signaling pathways in certain human populations [7–10].

The recently identified regulator of G-protein signaling (RGS) proteins are important in regulating signaling cascades initiated by GPCR activation [11]. RGS proteins facilitate the intrinsic inactivating guanosine triphosphatase reaction of G-protein α -subunits, and thereby serve as effector antagonists. Of the approximately 30 RGS proteins encoded in the human or mouse genome, *RGS2* may be critical for blood pressure regulation. *RGS2* is unique among the RGS proteins in its apparent selectivity towards Gq α , which mediates the action of most physiological vasoconstrictors, including norepinephrine, angiotensin II, endothelin-1, and thrombin. *RGS2* can also attenuate Gi and Gs-mediated pathways [12,13],

which can also affect blood pressure via other physiologically important agonists such as serotonin, dopamine, and bradykinin. In addition, human *RGS2* maps to chromosome 1q31 [14], within an interval (1q31–42) linked to one of three allelic forms of the gene for pseudohypoaldosteronism type II, an inherited human hypertension disorder [15]. More importantly, it was recently reported that mice lacking *Rgs2* exhibit a strong hypertensive phenotype and persistent constriction of the resistance vasculature [16,17]. Both heterozygous and homozygous *Rgs2*-null mice exhibited a similar level of profound hypertension [16], suggesting that naturally occurring mutations that affect the level of RGS2 protein may have a significant impact on blood pressure regulation.

So far, there are no reports about the relationship between genetic variations in human *RGS2* and hypertension or other phenotypes. Human *RGS2* consists of five exons that encode 211 amino acid residues. In the present study, we screened the promoter and exon regions of *RGS2* in Japanese hypertensive individuals for genetic variations. By genotyping the rare missense/frameshift mutations and common single nucleotide polymorphisms (SNP) in a Japanese general population, we assessed the role of these genetic variations in hypertension and clarified the contribution of common SNP to hypertension and to other phenotypes.

Methods

Hypertensive patients

A total of 953 hypertensive patients (522 men and 431 women, average age 65.0 ± 10.5 years) were recruited from the Division of Hypertension and Nephrology at the National Cardiovascular Center as reported previously [18,19]. Briefly, 92% of study subjects (880 subjects) were diagnosed with essential hypertension, and the rest had secondary hypertension. Hypertension was defined as systolic blood pressure (SBP) of 140 mmHg or greater, diastolic blood pressure (DBP) of 90 mmHg or greater, or the current use of antihypertensive medication. Hyperlipidemia was defined by total cholesterol 220 mg/dl or greater or the current use of antihyperlipidemia medication. Diabetes mellitus was defined by fasting plasma glucose of 126 mg/dl or greater or non-fasting plasma glucose of 200 mg/dl or greater or haemoglobin A1c of 6.5% or greater or the current use of antidiabetic medication. Study subjects had routine laboratory tests, including electrolytes, renal function, blood glucose, haemoglobin A1c, plasma renin activity and plasma aldosterone concentration.

Screening of genetic variations in *RGS2*

We sequenced all exons and the promoter region of *RGS2* in 953 Japanese hypertensive patients. Blood samples were obtained from hypertensive patients, and genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocyte [20].

All exons with their flanking sequences and approximately 1.6 kb of the upstream region were directly sequenced using an ABI PRISM 3700 DNA analyser (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using seven sets of primers, as described previously [20]. Information on primers and polymerase chain reaction (PCR) conditions is available on request. The obtained sequences were examined for the presence of variations using Sequencher software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA), followed by visual inspection. The A of the ATG of the initiator Met codon is denoted nucleotide +1. The nucleotide sequence (GenBank accession ID NT-004671) was used as a reference sequence.

General population (the Suita Study)

The sample selection and study design of the Suita Study have been described previously [21–23]. Briefly, the subjects visited the National Cardiovascular Center every 2 years for general health check-ups. In addition to performing a routine blood examination that included lipid profiles, glucose levels, blood pressure, anthropometric measurements, a physician or nurse administered questionnaires covering the personal history of cardiovascular diseases, including angina pectoris, myocardial infarction or stroke. Blood pressure was measured after at least 10 min of rest in a sitting position. SBP and DBP were the means of two measurements by well-trained doctors using a mercury sphygmomanometer (recorded in a 3 min pause). The subjects were classified as current drinkers if they drank at least 30 ml ethanol per day, non-drinkers if they had never drunk, and past drinkers if they previously had drunk above 30 ml ethanol per day.

Genotyping of mutations and single nucleotide polymorphisms in the general population

Six rare missense/frameshift mutations and four common SNP with a minor allele frequency of greater than 10% were tried for genotyping (Table 1). The TaqMan PCR method was used for genotyping [24]. The sequences of PCR primers and probes for the TaqMan PCR method are available on request. Among four common SNP, genotyping for $-161G > T$ failed. Nine genetic variations were thus successfully genotyped in 1873 subjects (862 men and 1011 women) participating in the large cohort of the Suita Study. All the participants for genetic analysis in the present study gave written informed consent. All clinical data and sequencing and genotyping results were anonymous. The study protocol was approved by the Ethical Review Committee of the National Cardiovascular Center.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm SD. The distribution of patient characteristics between men and women in the Japanese general population was analysed using Student's *t* test or χ^2 analysis. The correlations of three

Table 1 Sequence variations in the promoter region and exons in RGS2 identified in 953 Japanese hypertensive patients

SNP name	LD	Region	Amino acid substitution	Allele 1 freq.	Allele 2 freq.	Flanking sequence	Typing	db SNP ID
(-1502)-(-1501)insA*		Promoter		0.979	0.021	cttaagaaaaaa[-/a]tggcattcctag		
-956C > T*		Promoter		0.979	0.021	aaatctatgt[c/l]tgcagctttctc		
-638A > G*	a	Promoter		0.617	0.383	gagggtctcccc[a/g]ttgcctcagttc	Taqman	rs2746071
-395G > C*	a	Promoter		0.656	0.344	ggcggccccggc[g/c]ggccgcccga		
-339G > A*		Promoter		0.979	0.021	cgagcccgccc[g/a]ccgccacgcttc		
-218C > G	b	Promoter		0.965	0.035	aagccggggccg[c/g]agacgtcagcag		
-204G > T		Promoter		1.000	0.000	gacgtcagcagc[g/t]ccccggcttcca		
-203C > T		Promoter		0.999	0.001	acgtcagcagc[g/c]tcccggcttcgag		
-194C > G	c	Promoter		0.996	0.004	gcgccccggctt[c/g]agagacctctgg		
-193G > C		Promoter		1.000	0.000	cgccccggctt[c/g]cagacctctggc		
-183G > A		Promoter		0.995	0.005	tcgagacctt[c/g/a]gcagcagccgtg		
-167G > A		Promoter		1.000	0.000	gcagccgtgact[g/a]ccggcggcgggc		
-161G > T		Promoter		0.885	0.115	gtgactgcgcc[g/t]cggggcgctgac	Failed	rs16834859
-155C > G		Promoter		0.999	0.001	gcccggggggg[c/g]gctgacctatcc		
-149C > T		Promoter		0.999	0.001	ggcggggcgctg[c/t]ccatccccgtgc		
-43A > T	d	Promoter		0.958	0.042	atgctgcagcgc[a/t]cgcccagccgca	rs12130714	
5A > T**		Exon 1	Q2L	0.998	0.001	gaacgataatgc[a/t]aagtgtatgtt	Taqman	
5A > G**		Exon 1	Q2R		0.001	gaacgataatgc[a/g]aagtgtatgtt	Taqman	
9T > C	c	Exon 1	S3S	0.996	0.004	gataatcgaatg[c/t]gctatgttcttg		
13A > G		Exon 1	M5V	0.999	0.001	atgcaaatgtct[a/g]tgttctggctg	Taqman	
144C > G		Intron 1		0.992	0.008	ctcccggcccc[c/g]ctgccccacact		
169C > T		Intron 1		0.999	0.001	gcaagctgcaaa[c/t]gctgactttcg		
928G > A	e	Intron 1		0.930	0.070	tgctcagtcac[g/a]aggtttaaagt		
969C > A	b	Intron 1		0.963	0.037	atttgaagagtt[c/a]ttgctttgcctt		
1026T > A	a	Intron 1		0.572	0.428	atttggtaaaaa[t/a]gggtcagctgc	Taqman	rs2746073
1115G > A		Exon 2	R44H	0.999	0.001	atggaagagccc[g/a]tttgagctactt	Taqman	
1229A > G		Intron 2		0.992	0.008	ttgcaaatatca[a/g]tagttagctgct		
1245C > G		Intron 2		0.998	0.002	ttagctgctgaa[c/g]tgaaggggaa		
1255G > A		Intron 2		0.999	0.001	aactgaaaaggg[g/a]aactctgatgtg		
1294T > C		Intron 2		0.999	0.001	cagaacctctt[c/g]cagggcctctc		
1320G > C		Exon 3	Q78H	0.999	0.001	tgaggaagcaca[g/c]ctgtggtcagaa	Taqman	
1891-1892delTC	a	Intron3		0.594	0.406	ttctgcatgctc[t/-]ttttccccccc	Taqman	
1925-1926insT		Exon 4	Frameshift	0.999	0.001	tcttgcctgactt[-/t]cagggcttttt	Taqman	
2067T > C	e	Exon 4	A144A	0.927	0.073	agaaaaggaagc[t/c]cctcaaaagaggta		
2297A > G	d	Intron4		0.956	0.044	ctttaacttga[a/g]taccataataac	rs17647363	
2456C > T	b	Exon 5	F189F	0.965	0.035	ttactctgltt[c/t]tggagtcagaa		
2474C > T		Exon 5	Y195Y	0.998	0.002	gtcagaattcta[c/t]caggactgtgt		
2642T > A	e	Exon 5	3'UTR	0.935	0.065	aggaaacatcac[t/a]cagaactattga		
2643C > A	e	Exon 5	3'UTR	0.935	0.065	ggaaacatcac[c/a]agaactattgat		

UTR, Untranslated region. *Sequence variations were screened in 48 hypertensive patients. **Triallelic. The apparent linkage disequilibrium (LD), defined by r -square more than 0.5, was indicated by a-e in the LD column. Taqman, The single nucleotide polymorphism (SNP) was successfully genotyped by the Taqman method. Failed, The typing was failed. The A of the ATG of the initiator Met codon is denoted nucleotide +1, as recommended by the Nomenclature Working Group (*Hum Mut* 1998; 11:1-3). The nucleotide sequence (GenBank Accession ID: NT-004671) was used as a reference sequence.

common SNP to hypertension or diabetes mellitus were analysed by logistic regression analysis, adjusting for confounding factors, including age, body mass index (BMI), present illness (hyperlipidemia and diabetes mellitus), and lifestyle (smoking and drinking). All analyses were performed using the SAS (release 8.2, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Statistical significance was established at $P < 0.05$. Linkage disequilibrium was calculated using the SNPalyze version 2.1 (DYNACOM Co. Ltd., Mobar, Japan).

Results

Identification of genetic variations in RGS2 in a Japanese hypertensive population

We identified five missense mutations and one frameshift mutation in RGS2 by sequencing 953 hypertensive individuals (Table 1). Two out of 925 individuals successfully genotyped had an A-to-T substitution at nucleotide 5 in exon 1, which led to an amino acid substitution from Q to L at position 2 (Q2L). One individual had an A-to-G

substitution at nucleotide 5 in exon 1, resulting in an amino acid substitution from Q to R at position 2 (Q2R). One out of 938 individuals had an A-to-G substitution at nucleotide 13 in exon 1, leading to an amino acid substitution from M to V at position 5 (M5V). Two out of 924 individuals had a G-to-A substitution at nucleotide 1115 in exon 2, leading to an amino acid substitution from R to H at position 44 (R44H). One out of 937 individuals had a G-to-C substitution at nucleotide 1320 in exon 3, resulting in an amino acid substitution from Q to H at position 78 (Q78H). We also found one out of 914 individuals with a frameshift mutation that resulted in a thymine insertion at position 1925-1926 in exon 4 (1925-1926insT). These missense/frameshift mutations were all found in the heterozygous form.

We also identified four synonymous polymorphisms, which encoded for S3 (9T > C in exon 1) with a minor allele frequency of 0.4%, A144 (2067T > C in exon 4) with a minor allele frequency of 7.3%, F189 (2456C > T

in exon 5) with a minor allele frequency of 3.5%, and Y195 (2474C > T in exon 5) with a minor allele frequency of 0.2%. Twenty-nine additional genetic variations in the promoter, intronic, and 3'-untranslated regions were also identified. Among these were five common SNP with a minor allele frequency over 10% (-638A>G, -395G>C, -161G>T, 1026T>A, and 1891-1892delTC), and four of them (-638A>G, -395G>C, 1026T > A, 1891-1892delTC) were in tight linkage disequilibrium with an *r*-square of more than 0.5 (Table 1).

Characteristics of patients with rare missense/frameshift mutations in the hypertensive population

The characteristics of eight hypertensive patients who had missense/frameshift mutations are shown in Table 2. With the exception of one hypertensive patient with the R44H mutation (case 5), seven other hypertensive patients with mutations had hyperlipidemia. Two patients with the R44H mutation (cases 5 and 6) had non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), one of which (case 6) showed diabetic nephropathy with overt proteinuria, even when treated with insulin and an angiotensin-converting enzyme inhibitor. The patient with the 1925-1926insT frameshift mutation (case 8) was diagnosed with NIDDM and hyperlipidemia. Regarding the antihypertensive medication for this patient (case 8), the angiotensin II type 1 receptor blocker (ARB), losartan, was prescribed for this patient; however, losartan was totally ineffective at lowering blood pressure (pre-treatment blood pressure: 162/97 mmHg, post-treatment blood pressure 185/110 mmHg). He also

Table 3 Basic characteristics of subjects in the Suita Study.

	Women (n = 1011)	Men (n = 862)
Age (years)	63.3 ± 11.0	66.3 ± 11.1*
Systolic blood pressure (mmHg)	128.0 ± 19.8	131.8 ± 19.4*
Diastolic blood pressure (mmHg)	76.5 ± 9.8	79.7 ± 10.7*
Body mass index (kg/m ²)	22.2 ± 3.2	23.3 ± 2.9*
Total cholesterol (mg/dl)	215.6 ± 30.8*	197.9 ± 30.4
HDL-cholesterol (mg/dl)	64.5 ± 15.2*	55.0 ± 14.2
Current smokers (%)	6.2	30.4 [†]
Current drinkers (%)	29.5	67.2 [†]
Present illness (%)		
Hypertension	38.0	47.3 [†]
Hyperlipidemia	54.3 [†]	27.8
Diabetes mellitus	5.2	12.8 [†]

Hypertension indicates systolic blood pressure of 140 mmHg or greater, or diastolic blood pressure of 90 mmHg or greater, or antihypertensive medication. Hyperlipidemia, total cholesterol 220 mg/dl or greater, or antihyperlipidemia medication. Diabetes, fasting plasma glucose 126 mg/dl or greater, or non-fasting plasma glucose level of 200 mg/dl or greater, or haemoglobin A1c 6.5% or greater, or antidiabetic medication. HDL, high-density lipoprotein. Values are mean ± SD or percentage. **P* < 0.05 between women and men by Student's *t*-test; [†]*P* < 0.05 between women and men by χ^2 test.

showed low plasma renin activity (0.3 ng/ml per hour). There were no records regarding which other patients with missense mutations of RGS2 were taking ARB.

Characteristics of individuals with rare missense/frameshift mutations in the general population

The characteristics of the 1873 subjects comprising the Japanese general population group (862 men, 1011 women) are summarized in Table 3. Age, SBP, DBP, BMI, the percentage of current smokers, the percentage of current drinkers, and the prevalence of hypertension and diabetes mellitus were significantly higher in men than in women. Total cholesterol, high-density

Table 2 Clinical profiles of eight hypertensive patients with missense/frameshift mutation in the hypertensive population

Case	1	2	3	4	5	6	7	8
Mutation	Q2L	Q2L	Q2R	M5V	R44H	R44H	Q78H	1925-1926insT
Age (years)	63	72	74	64	54	68	71	60
Sex	Female	Male	Male	Male	Male	Female	Male	Male
Body mass index (kg/m ²)	24.1	24.7	-	23.2	23.4	17.0	22.3	28.7
Diagnosis	EHT, HL	EHT, HL, HU, VSA	EHT, HL, IGT	EHT, HL	EHT, NIDDM	EHT, NIDDM, HL, HU, DN	EHT, HL, AF, CAS	EHT, NIDDM, HL, VSA
Hypertension duration (years)	5	42	< 1	24	10	30	26	25
Hypertension family history	Mother, brother	Father, mother, brother	None	Mother, brother	Father, mother, brother	Mother	Mother, brother	None
Systolic blood pressure (mmHg)	140	140	122	140	122	126	170	134
Diastolic blood pressure (mmHg)	66	90	86	72	80	68	100	70
Medication	CCB, HLD	CCB, BB, HLD, HUD	CCB, ACEI, AB, DU	CCB, ACEI	CCB	CCB, ACEI, HUD, AP, INS	BB	CCB, ARB, BB, AB, DMD
Sodium ion (mEq/l)	141	137	139	139	142	139	140	145
Potassium ion (mEq/l)	4.0	4.1	4.2	4.4	3.7	4.4	4.4	4.0
Chloride ion (mEq/l)	107	105	96	104	107	103	106	107
Creatinine (mg/dl)	0.5	0.6	0.6	0.8	0.4	0.9	0.7	0.6
Overt proteinuria	No	No	No	No	No	Yes	No	N
Plasma renin activity (ng/ml/h)	1.2	3.0	-	-	1.2	-	1.0	0.3
Plasma aldosterone concentration (ng/dl)	15.6	15.3	-	-	14.0	-	15.1	12.0
Fasting blood sugar (mg/dl)	98	77	103	110	136	159	89	115
Haemoglobin A1c (%)	5.2	-	5.4	5.2	6.7	6.0	5.0	5.3

AB, α -adrenergic blocker; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; AF, atrial fibrillation; AP, anti-platelet aggregation drug; ARB, angiotensin II receptor blocker; BB, β -adrenergic blocker; CAS, carotid artery stenosis; CCB, calcium antagonist; DMD, diabetes mellitus drug; DN, diabetic nephropathy; DU, diuretics; EHT, essential hypertension; HL, hyperlipidemia; HLD, hyperlipidemia drug; HU, hyperuricemia; HUD, hyperuricemia drug; IGT, impaired glucose tolerance; INS, insulin; NIDDM, non-insulin dependent diabetes mellitus; VSA, vasospastic angina. Normal values in our institute: sodium ion, 136-146 mEq/l; potassium ion, 3.6-4.9 mEq/l; chloride ion, 99-109 mEq/l; creatinine, 0.6-1.1 mg/dl; plasma renin activity, 0.2-2.7 ng/ml per hour; plasma aldosterone concentration, 2-13 ng/dl.

Table 4 Clinical profiles of 11 subjects with missense/frameshift mutations in the general population

Individual	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Mutation	Q2R	Q2R	Q2R	R44H	R44H	R44H	R44H	R44H	Q78H	Q78H	1925-1926insT
Age (years)	61	83	73	58	71	81	80	61	52	53	59
Sex	Female	Female	Male	Female	Male	Male	Male	Male	Female	Male	Female
Body mass index (kg/m ²)	18.0	28.1	25.6	24.0	25.4	24.0	20.5	17.7	21.0	25.8	28.0
Systolic blood pressure (mmHg)	127	171	166	143	152	131	145	131	127	110	120
Diastolic blood pressure (mmHg)	72	67	83	86	82	78	92	83	80	75	63
Total cholesterol (mg/dl)	236	237	232	183	242	187	235	217	213	171	251
HDL-cholesterol (mg/dl)	61	65	65	56	44	69	73	53	59	46	57
Triglyceride (mg/dl)	125	76	57	104	292	55	72	112	137	95	104
Creatinine (mg/dl)	0.4	0.6	0.7	0.4	0.9	0.9	0.7	0.8	0.7	0.9	0.6
Overt proteinuria	-	-	-	-	-	2+	-	-	-	-	-
Fasting blood sugar (mg/dl)	81	109	87	147	92	104	96	83	86	101	145
Haemoglobin A1c (%)	5.3	5.6	5.7	6.9	5.4	5.9	5.4	5.4	5.2	5.6	6.4
Current smoker	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No
Current drinker	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Hypertension	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No	Yes
Hyperlipidemia	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No	No	Yes
Diabetes mellitus	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes
Other diseases		Stroke				Stroke					
Antihypertension treatment	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes

Hypertension indicates systolic blood pressure of 140 mmHg or greater and diastolic blood pressure of 90 mmHg or greater, or antihypertensive medication. Hyperlipidemia, total cholesterol of 220 mg/dl or greater, or antihyperlipidemia medication. Diabetes, fasting plasma glucose of 126 mg/dl or greater, or non-fasting plasma glucose of 200 mg/dl or greater, or haemoglobin A1c of 6.5% or greater, or antidiabetic medication. HDL, high-density lipoprotein.

lipoprotein (HDL)-cholesterol, and the percentage of hyperlipidemia were significantly higher in women than in men. In this population, 771 individuals were diagnosed with hypertension.

In the general population, four (Q2R $n = 3$, R44H $n = 5$, Q78H $n = 2$, 1925-1926insT $n = 1$) out of six missense/frameshift mutations were observed among 11 subjects (Table 4). The remaining two missense mutations (Q2L, M5V) were not present in the general population, suggesting that Q2L and M5V might be specific for hypertensive patients (Table 5). The three mutations, Q2R, R44H, and Q78H, were found in both hypertensive and normotensive subjects (Table 5). Six out of seven individuals with the R44H mutation had hypertension (Table 5). The remaining 1925-1926insT mutation was observed in one individual (case 11) who was diagnosed with essential hypertension, NIDDM, and hyperlipidemia (Table 4). Therefore, four rare mutations, Q2L, M5V, R44H, and 1925-1926insT, are probably linked with hypertension, and the 1925-1926insT mutation was associated with various phenotypes, including hypertension, hyperlipidemia, and diabetes mellitus.

Table 5 Number of subjects with missense/frameshift mutations in the hypertensive and general populations

Mutations	Hypertensive population ($n = 953$)	General population	
		Hypertensive subjects ($n = 771$)	Normotensive subjects ($n = 1102$)
Q2L	2	0	0
Q2R	1	2	1
M5V	1	0	0
R44H	2	4	1
Q78H	1	0	2
1925-1926insT	1	1	0
Total	8	7	4

Association of common single-nucleotide polymorphisms with hypertension and diabetes mellitus

Next, we looked for an association in the general population between common SNP in *RGS2* and hypertension, diabetes mellitus or hyperlipidemia. Three common SNP, -638A > G, 1026T > A, and 1891-1892delTC, were genotyped for the association in population-based samples. These three SNP were in linkage disequilibrium with an r -square more than 0.5. The results of the case-control study are shown in Table 6. The 1891-1892delTC polymorphism was significantly associated with hypertension in women ($\chi^2 = 6.34$, $P = 0.04$). Multivariate logistic regression analysis performed after adjusting for age, BMI, present illness (hyperlipidemia and diabetes mellitus), and lifestyle (smoking and drinking) showed a significant association of two common SNP, 1026T > A [TT versus TA + AA: odds ratio (OR) 1.33; 95% confidence interval (CI) 1.02-1.74; $P = 0.035$] and 1891-1892delTC (I: insertion allele, D: deletion allele, II versus ID + DD: OR 1.47; 95% CI 1.09-1.97; $P = 0.012$), with hypertension in women (Table 7). A significant association of 1891-1892delTC (II versus ID + DD: OR 1.23; 95% CI 1.02-1.50; $P = 0.034$) with hypertension was observed in total. However, no SNP were associated with diabetes mellitus and hyperlipidemia (data not shown).

Discussion

Previous studies showed that mice deficient in *Rgs2* exhibited a strong hypertensive phenotype and persistent constriction of the resistance vasculature, implicating *RGS2* as a candidate gene for hypertension in humans [16,17]. In our study, we evaluated the relationship between genetic polymorphisms in *RGS2* and clinical phenotypes such as hypertension using two different populations, a hypertensive population and the general

Table 6 Genotype distributions of three polymorphisms of *RGS2* in normotensive and hypertensive individuals

Polymorphisms	Genotypes	Women		Men		Total	
		Hypertensives n (%)	Normotensives n (%)	Hypertensives n (%)	Normotensives n (%)	Hypertensives n (%)	Normotensives n (%)
-638A > G	AA	102 (27)	197 (31)	106 (27)	131 (28)	208 (27)	328 (30)
	AG	183 (49)	320 (50)	206 (52)	234 (50)	389 (50)	554 (50)
	GG	89 (24)	120 (19)	85 (21)	100 (22)	174 (23)	220 (20)
		$\chi^2 = 3.95, P = 0.14$		$\chi^2 = 0.27, P = 0.87$		$\chi^2 = 2.70, P = 0.26$	
1026T > A	TT	126 (34)	257 (40)	136 (34)	167 (36)	262 (34)	424 (39)
	TA	193 (52)	290 (46)	197 (50)	221 (48)	390 (51)	511 (46)
	AA	55 (14)	90 (14)	64 (16)	77 (16)	119 (15)	167 (15)
		$\chi^2 = 4.63, P = 0.10$		$\chi^2 = 0.39, P = 0.82$		$\chi^2 = 4.19, P = 0.12$	
1891-1892delTC	II	122 (33)	257 (40)	135 (34)	163 (35)	257 (33)	420 (38)
	ID	198 (52)	288 (45)	195 (49)	225 (48)	391 (51)	513 (47)
	DD	56 (15)	92 (15)	67 (17)	77 (17)	123 (16)	169 (15)
		$\chi^2 = 6.34, *P = 0.04$		$\chi^2 = 0.10, P = 0.95$		$\chi^2 = 4.61, P = 0.10$	

n, Number of individuals; %, frequency of each genotype; * $P < 0.05$.

population. The sequencing and genotyping of six rare missense/frameshift mutations in both populations indicated that three mutations, Q2L, M5V, and 1925-1926insT, might be specific for the hypertension phenotype. Six out of seven individuals with another of the mutations, R44H, had hypertension, also strongly linking this mutation to the hypertensive phenotype (Table 5). In addition, two common SNP in *RGS2* were associated with hypertension in women from the general population (Tables 6 and 7). Taken together, these data suggest that *RGS2* is involved in hypertension in humans.

Like other members of the RGS family, *RGS2* regulates G protein signaling partly by acting as a guanosine triphosphatase-activating protein for several classes of G α subunits via its core RGS domain [25,26]. The binding of RGS proteins to active G α subunits can also interfere with effector binding, thereby blocking activation and downstream signaling [27]. The core domain of rat *RGS4* has been defined as K58-T178 by X-ray crystallography [28]. From the amino acid sequence alignment of rat *RGS4* with human *RGS2*, the human

RGS2 core domain is predicted to extend from L79 to C199. Four of the missense mutations identified in this study (Q2L, Q2R, M5V, R44H) are not present in the *RGS2* core domain, but the remaining mutation, Q78H, is very close to the core domain. As shown in Figure 1a, four of the missense mutations occurred in highly conserved residues among three different species, indicating that these mutations may result in functional changes in *RGS2*.

RGS2 shares with *RGS4* and *RGS16* a conserved N-terminal domain that is necessary and sufficient for plasma membrane targeting [29]. Importantly, it was recently reported that *RGS2* directly binds to the C1 domain of type V adenylyl cyclase, inhibiting the activity of this enzyme, and that the N-terminal 19 amino acid residues of *RGS2* are sufficient for this inhibitory effect [30]. Three mutations, Q2L, Q2R, and M5V, are present in this domain, suggesting functional changes in mutation-bearing *RGS2* mutants. We identified two missense mutations, Q2L and M5V, in *RGS2* in the hypertensive population but not in the general population, implying that these mutations might be involved in

Table 7 Comparison of hypertension prevalence by genotypes of three polymorphisms of *RGS2*

Polymorphisms	Genotypes	Women		Men		Total	
		Odds ratio (95% CI)	P^*	Odds ratio (95% CI)	P^*	Odds ratio (95% CI)	P^*
-638A > G	AA	1		1		1	
	AG + GG	1.21 (0.90-1.58)	0.219	0.94 (0.68-1.29)	0.692	1.20 (0.97-1.46)	0.091
	AA + AG	1		1		1	
	GG	1.23 (0.85-1.70)	0.266	0.89 (0.63-1.26)	0.51	1.04 (0.76-1.36)	0.912
1026T > A	TT	1		1		1	
	TA + AA	1.33 (1.02-1.74)	0.035	1.07 (0.81-1.42)	0.858	1.21 (0.98-1.47)	0.078
	TT + TA	1		1		1	
1891-1892delTC	AA	1.05 (0.73-1.51)	0.8	0.97 (0.67-1.39)	0.671	1.10 (0.88-1.50)	0.415
	II	1		1		1	
	ID + DD	1.47 (1.09-1.97)	0.012	0.96 (0.71-1.29)	0.747	1.23 (1.02-1.50)	0.034
	II + ID	1		1		1	
	DD	1.07 (0.72-1.61)	0.726	0.98 (0.72-1.47)	0.901	1.05 (0.81-1.35)	0.717

CI, Confidence interval; D, deletion allele; I, insertion allele. *Conditional logistic analysis, adjusted for age, body mass index, present illness (hyperlipidemia and diabetes mellitus), and lifestyle (smoking and drinking) for hypertension.

Fig. 1

(a)			
h-RGS2	1	<u>M</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> -HKSEEKREKMKRLLKDWKTR	44
m-RGS2	1	MQSAMFLAVQHDCVPMDKSAGNG-PKVEEKREKMKRLLKDWKTR	44
x-RGS2	1	MQSAMFLAIQHNLWAVERSSPGGCQKNEEKRGKMKKTI LKDWKTR	45
h-RGS4	1	MCKGLAGLPASCLRSKDMKHR	22
h-RGS2	45	<u>LSYFLQNS</u> --STPGPKPTG--KSKQQA FIKPSPEEAQLWSEAFD	85
m-RGS2	45	LSYFLQNS--SAPGPKPTG--KSKQQT FIKPSPEEAQLWAEAFD	85
x-RGS2	46	LSYFLQNSQNTSNGSLNMGQNKRGKKNAYCRPTPEEAKSWSETFD	90
h-RGS4	23	LGFLQKS---DSCEHNSSHKKDKVVI CQRVSEQEEVKKWAESLE	64
(b)			
Wild-type		GCATTCAGGGCTTTTTTAAAGTCGGAATTCTGTGAAGAAAAT	
		A F R A F L K S E F C E E N (96-109)	
Mutant		GCATTCAGGGCTTTTTTAAAGTCGGAATTCTGTGAAGAAAA	
		A F <u>Q</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>L</u> *** (96-106)	

Partial amino acid sequence surrounding the mutations in RGS2. (a) Alignment of partial amino acid sequences of RGS2 from three species and human RGS4. RGS2 sequences are from *Homo sapiens* (h), *Mus musculus* (m), and *Xenopus laevis* (x). Numbers indicate the position of the amino acid sequence. The asterisks indicate the positions at which missense mutations occur (Q2L, Q2R, M5V, R44H, Q78H). Underlining in the human RGS2 sequence indicates the N-terminal 19 amino acid residues and the amphipathic α -helical domain. (b) Nucleotide and amino acid sequences of wild-type allele and the 1925-1926insT allele. Numbers indicate the amino acid residues. The asterisk indicates 1925-1926insT, which causes a frameshift mutation from Q98. The extended nine amino acids are underlined. ***Stop codon.

the pathogenesis of hypertension. However, as most of the hypertensive patients were treated, it is difficult to clarify the relationship of the severity of hypertension with the mutations. Further in-vitro and in-vivo studies are needed to clarify whether these missense mutations really result in functional changes in RGS2. The pedigrees of carriers harbouring these mutations would be useful for the co-segregation analysis with hypertension.

The importance of an amphipathic α -helical domain consisting of 23 amino acid residues from K32 to T54 in RGS2 has been proposed [29]. This helix forms a hydrophobic face (W41, L45, F48, L49) surrounded by two positive charges, K42 and R44, and this amphipathic structure is essential for the plasma membrane localization of RGS2 [29]. The R44H mutation is contained within this amphipathic α -helical domain and may thereby interfere with the membrane association of RGS2. We identified seven individuals with this mutation (Tables 2, 4 and 5), of whom six showed hypertension. The predicted functional defect as well as the high prevalence among hypertensive individuals suggests that the R44H mutation may be linked with hypertension in our population. The frequency of the mutant allele is calculated to be 0.133% (five alleles/3746 alleles) in the Japanese general population. The functional effect of this mutation needs to be examined experimentally.

We identified two hypertensive patients with a frameshift mutation (1925-1926insT) in RGS2. It is evident that this mutation results in the dysfunction of RGS2 (Fig. 1b). One of these two patients with 1925-1926insT

had specific clinical phenotypes that were not only high blood pressure but also resistance to the ARB, losartan. The allele frequency of this mutant is very low (0.027%, one allele/3746 alleles) in the Japanese general population. However, it is worthwhile noting that this defective allele might be rich in other ethnic populations, because the frequency of some genetic mutations varies with ethnicity. Rare genetic mutations collectively contributing to a quantitative trait variation, such as plasma levels of HDL-cholesterol, have recently been reported [31]. In this scenario, the frameshift mutation and three of the missense mutations, Q2L, M5V, and R44H, in RGS2 could contribute collectively to hypertension (Table 5). Although only 0.86% of hypertensive subjects had missense/frameshift mutations in the two populations studied here, we have previously identified missense mutations in hypertension candidate genes such as *WNK4*, *SCNN1B* and *SCNN1G* in hypertensive patients [18,19]. Such studies support the present study in the scenario that rare mutations collectively contribute to hypertension.

It has been reported that mice lacking *Rgs2* show not only a hypertensive phenotype but also reduced T-cell proliferation and IL-2 production, which indicates an impaired antiviral immunity *in vivo* [32]. Interestingly, homozygous *Rgs2*-null mice also display increased anxiety responses and decreased male aggression in the absence of cognitive or motor deficits. RGS2 also controls synaptic development and basal electrical activity in hippocampal CA1 neurons. RGS2 is thus important for T-cell activation, synapse development in the hippocampus, and emotive behaviours. These phenotypes were observed only in homozygous *Rgs2*-null

mice and not in heterozygous mice, suggesting that the rare mutations identified in our study might not induce these phenotypes in humans in whom it is a heterozygous state.

The mechanisms by which the two common polymorphisms (1026T > A, 1891–1892delTC) might contribute to hypertension in only women are unknown. The association in men was not observed. This inconsistency might be derived from sex differences or a lack of statistical power because of the sample size. Regarding the sex differences, RGS proteins are important in regulating signaling cascades initiated by GPCR activation, including both angiotensin II and endothelin-1 receptors. It is thought that these vasoactive peptides acting on GPCR may have different regulating mechanisms by sex. It has been reported that there are sex differences in aldosterone production after angiotensin II administration [33], and oestrogen influences angiotensinogen production through its regulation of the promoter region [34]. Endothelin-1 also acts on vasculatures differently in males and females. The elevation in blood pressure after endothelin-1 administration is much higher in male rats than in female rats [35], because oestrogen may reduce endothelin-1-induced vasoconstriction [36]. Therefore, we suppose that the cause of sex differences in the relationship between RGS2 polymorphisms and hypertension may be via the influences of these vasoactive pressor peptides. However, as both 1026T > A and 1891–1892delTC are located in an intronic region, we speculate that these mutations may be mere genetic markers, and other functional polymorphisms may play more important roles in hypertension.

In previous studies, we performed an association study of other genes using the same Suita population. In the study of genetic analysis of 118 SNP of 22 candidate genes for hypertension, multiple logistic analyses indicated that 13 SNP (eight genes), six SNP (four genes) and 11 SNP (four genes) were associated with hypertension ($P < 0.05$) in the total, male, and female population, respectively [37]. One of the SNP was significantly associated with hypertension in women even after correction by the Bonferroni method (corrected $P = 0.0236$). The analyses of 118 SNP of 22 genes would thus be required for the correction of the Bonferroni method to identify the possible candidate genes for hypertension. In the present study, we genotyped only three SNP that are in tight linkage disequilibrium. Therefore, we did not perform correction for multiple testing.

In summary, we suggest that the rare mutations in RGS2, Q2L, M5V, R44H, and 1925–1926insT collectively contribute to the pathogenesis of hypertension. The association study also suggests that RGS2 is associated with hypertension in the Japanese general population. As association studies are not consistently reproducible as

a result of false positives, false negatives, and problems with true variability in association between different populations [38], the association of RGS2 polymorphisms with hypertension has to be re-examined in another population. Further functional analyses of RGS mutants are also necessary to clarify the functional defects caused by these genetic findings.

Acknowledgements

The authors would like to express their highest gratitude to Dr Soichiro Kitamura, President of the National Cardiovascular Center, for his support of the millennium genome project. They would also like to express their gratitude to Drs Ootosaburo Hishikawa, Katsuyuki Kawanishi, Tadashi Fujikawa, and Toshifumi Mannami for their continuous support of the population survey in Suita city. The authors would like to thank the members of the Satsuki-Junyukai, and also all the staffs in the Division of Hypertension and Nephrology, and Preventive Cardiology for supporting medical examination and Y. Tokunaga for technical assistance.

References

- 1 Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; **104**:545–556.
- 2 Takahashi N, Smithies O. Gene targeting approaches to analyzing hypertension. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**:1598–1605.
- 3 Asico LD, Ladines C, Fuchs S, Accilli D, Carey RM, Semeraro C, et al. Disruption of the dopamine D₃ receptor gene produces renin-dependent hypertension. *J Clin Invest* 1998; **102**:493–498.
- 4 Berthiaume N, Yanagisawa M, Labonte J, D'Orleans-Juste P. Heterozygous knock-out of ET_B receptors induces BQ-123-sensitive hypertension in the mouse. *Hypertension* 2000; **36**:1002–1007.
- 5 Kim HS, Kregge JH, Kluckman KD, Haganman JR, Hodgins JB, Best CF, et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:2735–2739.
- 6 Niranjani V, Telemaque S, deWit D, Gerard RD, Yanagisawa M. Systemic hypertension induced by hepatic overexpression of human preproendothelin-1 in rats. *J Clin Invest* 1996; **98**:2364–2372.
- 7 Bengtsson K, Melander O, Orho-Melander M, Lindblad U, Ranstam J, Rastam L, Groop L. Polymorphism in the β_1 -adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation* 2001; **104**:187–190.
- 8 Bray MS, Krushkal J, Li L, Ferrell R, Kardia S, Sing CF, et al. Positional genomic analysis identifies the β_2 -adrenergic receptor gene as a susceptibility locus for human hypertension. *Circulation* 2000; **101**:2877–2882.
- 9 Liolitsa D, Powell JF, Prince M, Lovestone S. Association study of the 5-HT_{2A} receptor gene polymorphism, T102C and essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2001; **15**:335–339.
- 10 Sierra C, Coca A, Gomez-Angelats E, Poch E, Sobrino J, de la Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and cerebral white matter lesions in essential hypertension. *Hypertension* 2002; **39**:343–347.
- 11 De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG. The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; **40**:235–271.
- 12 Ingi T, Krumins AM, Chidiac P, Brothers GM, Chung S, Snow BE, et al. Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J Neurosci* 1998; **18**:7178–7188.
- 13 Sinnarajah S, Dessauer CW, Srikumar D, Chen J, Yuen J, Yilma S, et al. RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature* 2001; **409**:1051–1055.
- 14 Wu HK, Heng HH, Shi XM, Forsdyke DR, Tsui LC, Mak TW, et al. Differential expression of a basic helix-loop-helix phosphoprotein gene, G0S8, in acute leukemia and localization to human chromosome 1q31. *Leukemia* 1995; **9**:1291–1298.
- 15 Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, et al. Multilocus linkage of familial hyperkalemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31–42 and 17p11–q21. *Nat Genet* 1997; **16**:202–205.

- 16 Heximer SP, Knutsen RH, Sun XG, Kaltenbronn KM, Rhee MH, Peng N, *et al.* Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in *RGS2*-deficient mice. *J Clin Invest* 2003; **111**:445–452.
- 17 Tang M, Wang G, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, *et al.* Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med* 2003; **9**:1506–1512.
- 18 Kamide K, Tanaka C, Takiuchi S, Miwa Y, Yoshii M, Horio T, *et al.* Six missense mutations of the epithelial sodium channel β and γ subunits in Japanese hypertensives. *Hypertens Res* 2004; **27**:333–338.
- 19 Kamide K, Takiuchi S, Tanaka C, Miwa Y, Yoshii M, Horio T, *et al.* Three novel missense mutations of *WNK4*, a kinase mutated in inherited hypertension, in Japanese hypertensives: implication of clinical phenotypes. *Am J Hypertens* 2004; **17**:446–449.
- 20 Okuda T, Fujioka Y, Kamide K, Kawano Y, Goto Y, Yoshimasa Y, *et al.* Verification of 525 coding SNPs in 179 hypertension candidate genes in the Japanese population: identification of 159 SNPs in 93 genes. *J Hum Genet* 2002; **47**:387–394.
- 21 Mannami T, Konishi M, Baba S, Nishi N, Terao A. Prevalence of asymptomatic carotid atherosclerotic lesions detected by high-resolution ultrasonography and its relation to cardiovascular risk factors in the general population of a Japanese city: the Suita study. *Stroke* 1997; **28**:518–525.
- 22 Mannami T, Baba S, Ogata J. Potential of carotid enlargement as a useful indicator affected by high blood pressure in a large general population of a Japanese city: the Suita study. *Stroke* 2000; **31**:2958–2965.
- 23 Mannami T, Baba S, Ogata J. Strong and significant relationships between aggregation of major coronary risk factors and the acceleration of carotid atherosclerosis in the general population of a Japanese city: the Suita study. *Arch Intern Med* 2000; **160**:2297–2303.
- 24 Tanaka C, Kamide K, Takiuchi S, Miwa Y, Yoshii M, Kawano Y, Miyata T. An alternative fast and convenient genotyping method for the screening of angiotensin converting enzyme gene polymorphisms. *Hypertens Res* 2003; **26**:301–306.
- 25 Watson N, Linder ME, Druey KM, Kehrl JH, Blumer KJ. RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein α -subunits. *Nature* 1996; **383**:172–175.
- 26 Ingi T, Krumins AM, Chidiac P, Brothers GM, Chung S, Snow BE, *et al.* Dynamic regulation of *RGS2* suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J Neurosci* 1998; **18**:7178–7188.
- 27 Hepler JR, Berman DM, Gilman AG, Kozasa T. *RGS4* and *GAIIP* are GTPase-activating proteins for $G_{\alpha q}$ and block activation of phospholipase $C\beta$ by γ -thio-GTP- $G_{\alpha q}$. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:428–432.
- 28 Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR. Structure of *RGS4* bound to AlF_4^- -activated $G_{\beta\gamma}$: stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 1997; **89**:251–261.
- 29 Heximer SP, Lim H, Bernard JL, Blumer KJ. Mechanisms governing subcellular localization and function of human *RGS2*. *J Biol Chem* 2001; **276**:14195–14203.
- 30 Salim S, Sinnarajah S, Kehrl JH, Dessauer CW. Identification of *RGS2* and type V adenylyl cyclase interaction sites. *J Biol Chem* 2003; **278**:15842–15849.
- 31 Cohen JC, Kiss RS, Pertsemidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004; **305**:869–872.
- 32 Oliveira-Dos-Santos AJ, Matsumoto G, Snow BE, Bai D, Houston FP, Whishaw IQ, *et al.* Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by *RGS2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **97**:12272–12277.
- 33 Giacche M, Vuagnat A, Hunt SC, Hopkins PN, Fisher ND, Azizi M, *et al.* Aldosterone stimulation by angiotensin II: influence of gender, plasma renin, and familial resemblance. *Hypertension* 2000; **35**:710–716.
- 34 Fischer M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2002; **53**: 672–677.
- 35 Tatchum-Talom R, Martel C, Labrie C, Labrie F, Marette A. Gender differences in hemodynamic responses to endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; **36**(Suppl. 1):S102–S104.
- 36 Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Acute effect of 17 beta-estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1. *Am J Physiol* 1992; **263**:H271–H275.
- 37 Iwai N, Tago N, Yasui N, Kokubo Y, Inamoto N, Tomoike H, Shioji K. Genetic analysis of 22 candidate genes for hypertension in the Japanese population. *J Hypertens* 2004; **22**:1119–1126.
- 38 Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003; **33**: 177–182.

ミレニアム・ゲノム・プロジェクト

友池仁暢，宮田敏行，森崎隆幸，岩井直温，河野雄平，
花井荘太郎，花田裕典，小久保喜弘，岡山 明，加藤久雄

循環器病研究の進歩(通巻45号)
Vol.XXVI No.1(2005.11) p.2~23

ミレニアム・ゲノム・プロジェクト

友池仁暢^{*}, 宮田敏行^{*2}, 森崎隆幸^{*3}, 岩井直温^{*4}, 河野雄平^{*5},
花井荘太郎^{*6}, 花田裕典^{*7}, 小久保喜弘^{*8}, 岡山 明^{*8}, 加藤久雄^{*9}

Key word

hypertension
SNPs (一塩基多型)
Gene
疫学研究
環境因子
ゲノム網羅的解析

Millennium Genome Project

*Hitonobu Tomoike :

Hospital Director General,
National Cardiovascular Center
国立循環器病センター 病院長

*²Toshiyuki Miyata :

Department of Etiology and Pathogenesis,
Research Institute
同 研究所 病因部

*³Takayuki Morisaki : Department of Bioscience,

同 研究所 バイオサイエンス部

*⁴Naoharu Iwai : Department of Epidemiology,

同 研究所 疫学部

*⁵Yuhei Kawano :

Internal medicine (hypertension & kidney),
National Cardiovascular Center, Hospital General Wards
同 内科高血圧部腎臓部門

*⁶Sotaro Hanai :

Division of Statistics & Computing,
National Cardiovascular Center, Administration
Department
同 運営局調査課

*⁷Hironori Hanada : Department of Molecular Physiology,

同 研究所循環分子生理部

*⁸Yoshihiro Kokubo, Akira Okayama :

Department of Preventive Cardiology,
同 予防検診部

*⁹Hisao Kato :

Human Science Research Foundation,
Proteome Factory, Research Consultant
財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
創薬プロテオームファクトリー施設 研究顧問

はじめに

国が重点的に支援する研究事業としての「ミレニアム・プロジェクト」は2000年に発足し、2005年3月に終了した。計画の詳細は、1999年末(小渕内閣時代)に内閣総理大臣決定(資料1, 文末)として公表されている。その基本的な考え方は、新しいミレニアム(千年紀)を目前に控え、「人類が直面する様々な課題に応えるためには、大胆な技術革新に基づく新しい産業を生み出す必要がある」と表現されている。すなわち、わが国の経済社会にとって、重要性や緊急性の高い①情報化、②高齢化、③環境対応の3分野における技術革新を目指したものであった。このなかに、5大疾患(痴呆、がん、高血圧、糖尿病、アレルギー疾患)の遺伝子研究が取り上げられている(<http://www.kantei.go.jp/jp/mille/>)。いずれの疾患も重篤であること、患者数が多いこと、死亡の主要な原因であることなどの理由から、その病因の解明、診断・治療法の開発は国全体として取り組むべきと考えられたことによる。ミレニアム・ゲノム・プロジェクトの全体像を、図1に示す。

ゲノム研究は検体と臨床情報収集の規模の大きさ、タイピングシステムの精度・機密性・効率の確保、遺伝子研究における個人情報保護のあり方などの面で社会に大きな影響を及ぼすことから、欧米では国レベルの事業となっている。その代表例は、ヒトゲノム計画(Human Genome Project : HGP, 米国)で

ある。質に優れた世界的な巨大プロジェクトは1993～1998年の目標達成を受けて、1998～2003年次に約30億塩基対のヒトゲノムの核酸の配列解明を目指した³⁾。計画完了に先立つこと3年、ヒトゲノムのドラフト配列は2000年6月にNIHとセセラ社からクリントン大統領立ち会いのもとに発表され、その詳細は2001年2月に論文として公表された (Science 2001;291:No5507, Nature 2001;409:No.6822)。2003年4月に終了宣言がなされた (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/>)。このようにDNA解析技術の進歩は目覚しく、遺伝子研究の領域は稀な単一遺伝子病から日常的疾患 (common disease) と言われる高血圧・冠動脈疾患・精神病など多因子疾患の解明に拡大してきた⁴⁾。わが国のミレニアム計画は世界的潮流と足並みをそろえた事業であり、その成果が期待されている。

ゲノム情報の活用やその取り扱いは保険や職業上の差別、個人と家族に心理的な葛藤が生じるなど、社会、倫理、法制などの各分野に新たな問題を投げかけつつある⁴⁾。国はミレニアム研究の発足と相前後して、遺伝子研究に関する三省 (厚生労働省、文部科学省、経済産業省) 指針を整備した。医学・生物学研究にその社会性、倫理性が強く要求されるようになったのは、遺伝子研究の進展によるところも大きいと思われる。ゲノムは究極の個人情報と言われ、その扱いは人の尊厳と密接にかかわることから同意のあり方と情報保護は疫学研究や臨床研究よりも厳しい規定が設けられている。

I. なぜ高血圧なのか

心臓病と脳卒中は致死性が高く、また例えば悲劇的事象を免れてもQOL (生活の質) を損うことの著しい動脈硬化性疾患であり、その最大の危険因子は高血圧である。高血圧そのものは、ほとんど自覚症状を伴うことがない

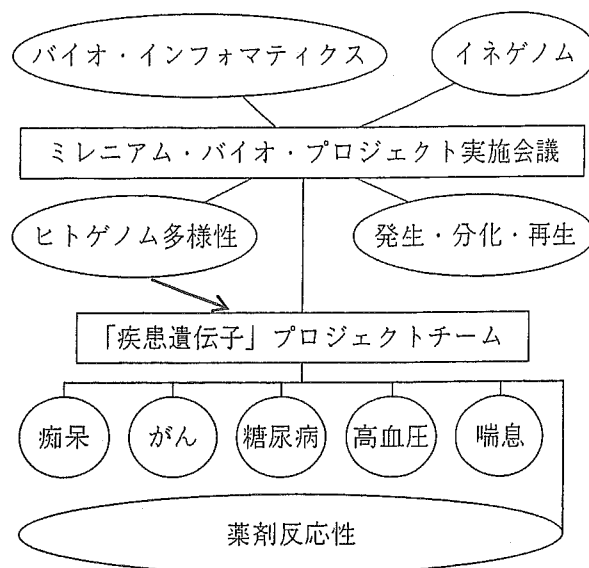


図1. ミレニアム・ゲノム・プロジェクト全体像

ので、‘Silent killer’ とも呼ばれている。その有病者数は全疾病のなかで最も多く、本邦では約4,000万人とも推定されている。高血圧性疾患の医療費は1兆9551億円と概算されており、全医療費の約8%を占めている。従って、高血圧の1次予防と2次予防の確立は、高齢社会においては焦眉の課題である。高血圧に有効な薬剤は、この30年の間に他の分野に例を見ないほど豊富に開発された。さらに、運動や食事療法 (減塩、肥満対策) といった非薬物療法の有用性も明らかになってきた。ところが、高血圧の易発症性、重症化、治療の有効性などは個人差が大きいことも知られている。したがって、個人個人を相手にした時、高血圧の予防や治療として何をどう選択するのかは、これからの個別化医療 (テーラーメイド医療) の大きな課題でもある。

II. 高血圧と遺伝

遺伝性疾患の場合、単一遺伝子の役割がはっきりしているが、高血圧を始めとする日常的疾患の場合は成因、疾患易感受性、重症度規定など様々の局面で遺伝と環境が複雑に絡

みあっていると推測されている⁹⁾。本態性高血圧の場合、遺伝と環境の組み合わせによる発症や重症化の過程で複数 (oligogenic, polygenic) の遺伝子の関与が指摘されている。

病態の家族集積性を調べることは、遺伝子探索の糸口とされている。高血圧も家族集積性が知られているが、この場合は、高食塩食という環境因子の影響が大きいと考えられている。高血圧の発症にある遺伝と環境の関与の割合は、家系の分析から検討されている。1980年代に発表されたモントリオール養子研究によると、収縮期血圧への遺伝の関与は61%、環境の関与39%、拡張期血圧では遺伝の関与が58%、環境は42%と算定されている¹⁰⁾。最近の双生児研究では、遺伝因子の影響46%、家族が共有する環境因子の影響は31%であったと報告されている¹¹⁾。単一の遺伝子が本態性高血圧の発症に関与しているという証拠は、今のところ得られていない。

遺伝的要因が関与していると推測される形質から、関連する遺伝子の探索が始まる。高血圧は大きなカテゴリーであるので、その病態の特徴をより具体的にとらえた形質、たとえば、食塩感受性、薬剤感受性、副作用の易出現性、高血圧による合併疾患 (心筋肥大、機能障害など) の易発症性などが研究対象となる。さらに、これらの形質の成り立ちには複数の分子機序が知られている。例えば高血圧の病態生理に関連するレニン-アンジオテンシ系とその情報伝達の分子ネットワークの各要素は、関連する遺伝子を絞り込む上で格好の中間形質となっている。

Ⅲ. どの遺伝子を疑うのか

日常ありふれた疾患 (Common disease) がゲノム研究の対象に値すると判断されるに至った根拠は、何処にあるのであろうか。

1. 日常的な疾患でも、単一遺伝子がはっきりした役割を果たしていることがある。

米国では乳がんが日常的疾患となっていて、女性におけるがんの死因として肺がんに次いで多い。家族性に若年発症する乳癌の23家系146症例についての連鎖解析の結果、Kingらはlod scoreが5.98という易発症遺伝子が17番染色体上 (17q21) にあることを示した¹²⁾。その4年後にBRCA1、さらに15カ月後にBRCA2の変異にたどり着いた¹³⁾。この間は、分析技術がセンチモルガン (1センチモルガンはおよそ100万塩基対に相当) から塩基対 (bp) 単位へ飛躍的に進歩した時代であった。連鎖解析による遺伝子探索は、原因遺伝子を特定する基本的手法である。日常的疾患のなかでも、2型糖尿病については連鎖解析から複数の遺伝子が成因として見出されている^{10, 11)}。

2. ありふれた疾患共通変異仮説 (Common disease / common variant hypothesis)

病気を起こす原因突然変異が共通の祖先遺伝子に由来するのであれば、その突然変異が起きた染色体の近傍のハプロタイプが子孫にも残っていて、病因座位と連鎖不平衡を形成していると考えられる。そこで患者集団と対照集団でハプロタイプ解析を行うと、原因座位周辺で大きな差異となって見つかる。このような理解は、ゲノム網羅的解析や候補遺伝子探索における関連研究の根拠となっている¹²⁾。わが国からも、心筋梗塞の遺伝的リスクを示す遺伝子多型が関連解析で見出され、発表されている^{13, 14)}。しかしながら、頻度の高い多型は効果が低くかつ多遺伝子性であることから、遺伝子を特定するには多数例の解析が不可欠となる。

高血圧に関連する細胞情報伝達系の分子機序は、他の4疾患と同様に解明が進んでいる。したがって、候補遺伝子アプローチであって

も、確かな中間形質についての関連研究を行えば、創薬のヒントやテーラーメイド医療の組み立ても可能と期待された。

3. ありふれた疾患/稀少アリル仮説

(Common disease / rare allele hypothesis)

日常的疾患と言えども、頻度の低い稀な疾患の集積という考え方も認められつつある。Cohenらの仕事は、低HDL血症がメンデル遺伝する稀なアリルの集積であることを一般住民の関連研究で証明したが¹⁵⁾、当センターで追試を行ったところ、良好な再現を確認できなかった¹⁶⁾。おそらく、稀少アリルは民族差の影響も少なくないものと推測される。また、岩井が見出したGitelman(ジテルマン)症候群が低血圧の数%を埋める可能性があるという成績は、稀少アリル仮説の意義を示す代表例と思われる。

IV. 高血圧のミレニアムゲノム研究

ミレニアム・ゲノム・プロジェクトの開始に当たって呈示された内閣総理大臣決定には、各研究の目標についても明示されている(資料1)。高血圧に関連するところを抜き出すと、下記に示すとおりである。

1. 目標と実施機関

3項目の目標が呈示されていた。

- (a) 疾患関連遺伝子、薬剤反応性関連遺伝子を合わせて30以上発見。
- (b) 患者個人に対する最適な投薬(オーダーメイド医療)などによる治療成績の向上。
- (c) 循環器病の推計入院患者数を20%削減し、脳卒中の受療率を20%削るなどの画期的新薬の開発に着手。

ミレニアムの他の4疾患についても、基本的に同様の趣旨の到達目標が示されている。

高血圧分野の主たる実施機関は国立循環器

病センター、旭川医科大学、愛媛大学、筑波大学と明示された。最終的に高血圧サブチームは、全国14施設に増えた。

国立循環器病センターは、大学グループと研究推進共同体(コンソーシアム, consortium)を形成した。同時に国立精神・神経センター、国立がんセンター、国立国際医療センター、国立成育医療センター、国立医薬品食品衛生研究所と連携し、以下に述べるホールゲノムのタイピングやデータベース形成などの共同作業を行った。

2. 国立循環器病センターの取り組み

国立循環器病センターは、質の高い臨床研究を背景に遺伝子多型のタイピングを行う必要性から、病院と研究所の緊密な連携のもとにプロジェクトチームを編成した。

図2は研究・管理体制を示したものであるが、これらの大きな組織を有機的に動かすために、疾患グループに横断的組織としてタイピンググループと情報管理班を機能させた。被験者の臨床情報と遺伝子多型情報の匿名化やサンプル管理などは、個人情報保護の観点から厳密なシステムを構築した(図3)。

本研究を実施するにあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(H13.3.29)」,「疫学研究に関する倫理指針(H14.6.17)」,「臨床研究に関する倫理指針(H15.7.30)」,「大学等における動物実験について(S62.5.25)」に従った。なお、これらの指針は平成17年4月1日個人情報保護法施行にあわせて、16年末から17年にかけて改訂された。当センターでのプロジェクト実施にあたって、個々の研究計画は外部委員が過半数を占める(10人中6名)倫理委員会において審議・助言を受けて実施した。被験者に対するインフォームドコンセントは、研究のあらましを十分に説明のうえ文書に残した。研究計画の概要と、その審議経過を以下に示

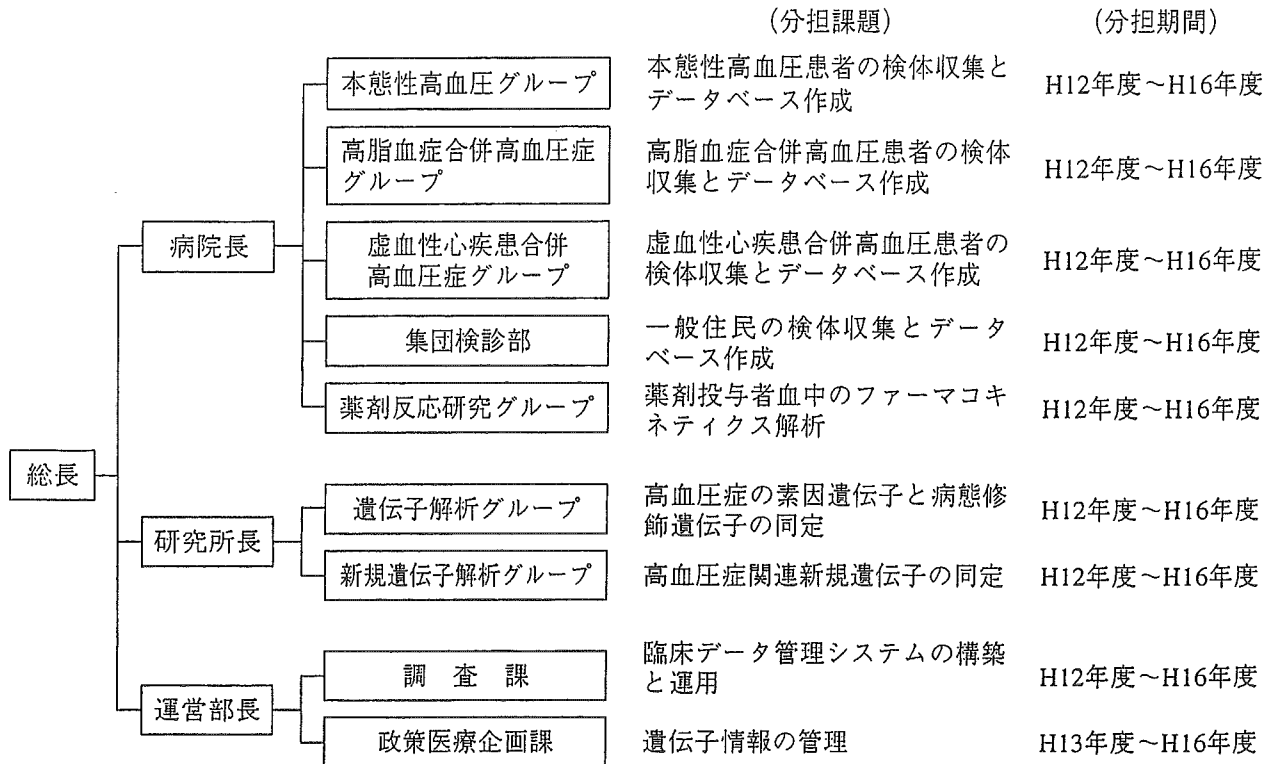


図 2. 研究・管理体制 (平成 12 年発足時)

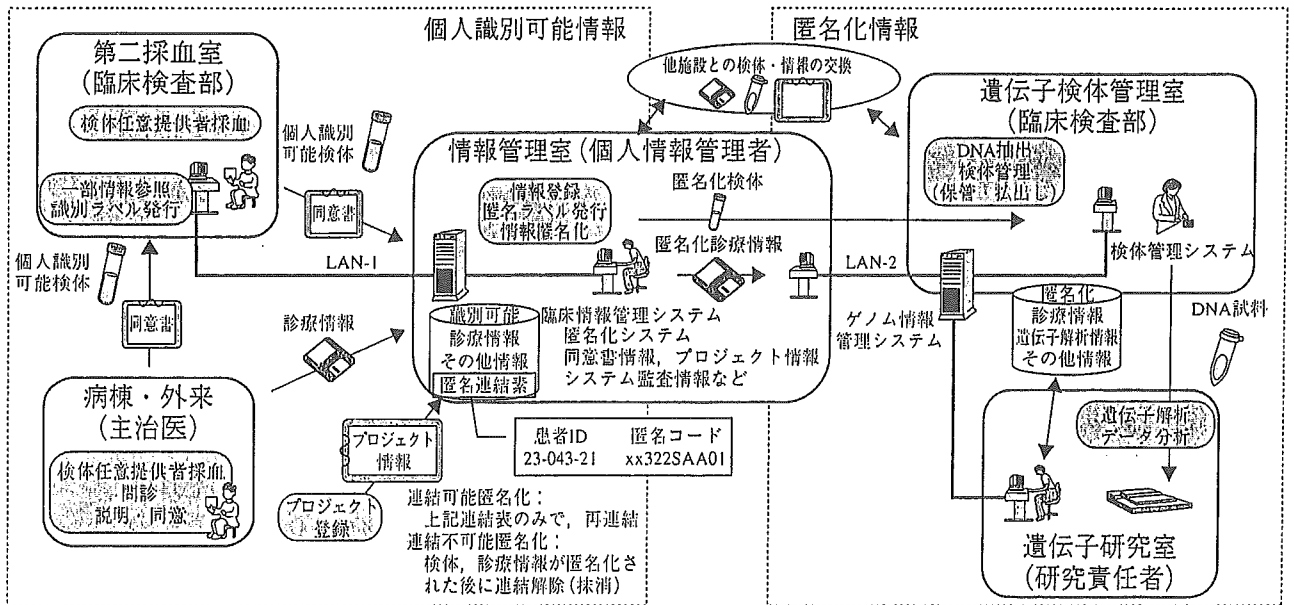


図 3. 国立循環器病センターにおけるミレニウム疾患遺伝子解析研究に係る試料等のフロー
平成 12 年 7 月 17 日版 (平成 13 年 4 月改版)

す。

【研究計画1】 高血圧患者の既提供試料の遺伝子解析，平成12年9月18日に倫理委員会で承認

【研究計画2】 一般住民の既取得試料の遺伝子解析研究，平成12年9月18日に倫理委員会で承認

【研究計画3および研究計画5】 新たな患者試料の遺伝子解析，平成13年4月27日および平成13年7月16日に倫理委員会で承認

【研究計画3-2】 高血圧患者試料のゲノム網羅的遺伝子1次タイピング実施，平成13年10月15日に倫理委員会で承認

【研究計画4】 新たな一般住民試料の遺伝子解析研究，平成13年12月17日に倫理委員会で承認

【研究計画3-3】 高血圧患者試料のゲノム網羅的遺伝子2次タイピング研究，平成14年12月16日に倫理委員会で承認

【研究計画4-2】 一般住民試料のゲノム網羅的遺伝子2次タイピング研究，平成14年12月16日に倫理委員会で承認

【研究計画3-4】 降圧薬感受性遺伝子同定のための前向き多施設臨床試験，平成15年6月16日に倫理委員会で承認

3. 研究の戦略

候補遺伝子探索アプローチとゲノム網羅的アプローチを並行して実施し，疾患の成因，感受性，薬剤反応性に関与する遺伝子の具体的捕捉を試みた。さらにこれら遺伝子の機能は細胞レベル，遺伝子操作動物，前向き臨床試験などの手法を用いて，その意義が確認されることになる。

全ゲノム探索は，10万個のSNPsを用いる手法と，サンプルをプールし1.6万個のマイクロサテライト多型を用いる手法の2つを採用した。SNPs解析は理化学研究所と国立がんセンターで，マイクロサテライト解析は東

海大学で行った。

候補遺伝子アプローチでは，血圧レベルを規定する要素（例えば，前述の情報伝達に関与する分子）と高血圧の結果生じる心・血管・腎合併症に至る過程を修飾する要因に関連する遺伝子多型を調べた。

V. 主な研究成果（資料2 [文末] 参照）

1. ゲノム網羅的SNP解析

全染色体領域を網羅したSNPについて高血圧症と対照群の相関解析を行えば，仮説としての疾患遺伝子を予め想定することなく病態（高血圧や糖尿病など）と関連するSNPを探索することができる。未知の関連遺伝子に当たりをつける上で優れた方法と思われるが，この画期的手法がミレニアム・ゲノム・プロジェクトで実用化できた意義は大きい。

「ヒトゲノム多様性チーム（中村祐輔チームリーダー・東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター）」は，2000年から約20万のSNPsを日本人について同定すべく研究が進行中であった。SNPsの高速タイピングが微量インベーター（Invader）法を用いて可能となった背景には，MultiplexPCR法，384マイクロウェルカード，バーコードによるLIMS（実験管理システム）などの技術開発が並行して行われたことがあげられる。対象となるSNPsは，遺伝子のコーディング領域について検出されたもので，JSNP (http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html) と略称されている¹⁷⁾。ちなみに，国際的にはヒトゲノムのSNPマップは2001年段階で142万個のSNPsが見出されており，密度的には1.9kbに1個のSNPがあることになる¹⁸⁾。

疾患遺伝子チームは，5疾患に共通のプロトコルを採用した。疾患群と正常者の患者対照研究を2段階のスクリーニングとして行い，関連性の強いSNPsを絞り込む。その上で，3次タイピングを行って候補SNPsを特

表 1.

症例群		対照群	
一次タイピング 約10万 SNPs			
188検体		752検体	
性別	男性	JSNP標準頻度	
発症年齢	30～59歳	もしくは	
家族歴	1親等以内にあり	752検体	
BMI	25未満	痴呆・糖尿病・がん	
血圧	SBP=>160and/or DBP=>100or 降圧薬服用	喘息のケースサンプル	
二次タイピング 約2,000SNPs			
752検体		752検体	
性別	男女	性別	男女
発症年齢	30～59歳	年齢	50歳以上
家族歴	1親等以内にあり	家族歴	なし
BMI	問わない	BMI	問わない
血圧	SBP=>160and/or DBP=>100or 降圧薬服用	血圧	SBP=<130and DBP=<80or 降圧薬非服用
三次タイピング 約100SNPs			
619検体		1,406検体	
患者群—対照群の選別基準は、二次タイピングと同じ		患者群—対照群の選別基準は、二次タイピングと同じ	

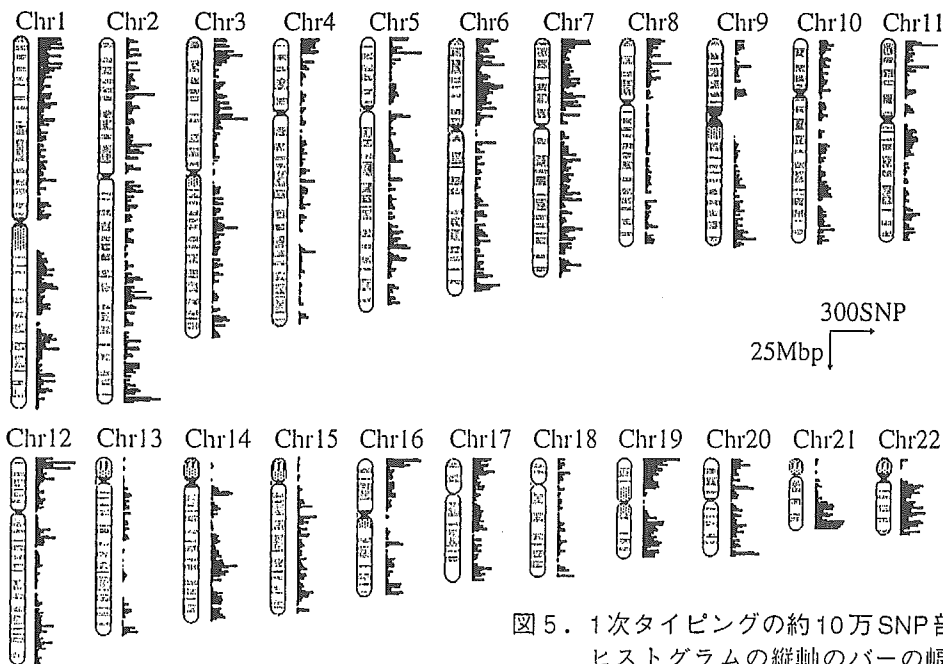


図 5. 1次タイピングの約10万 SNP 部位のヒストグラム
ヒストグラムの縦軸のバーの幅はMbp, 横軸はその中に含まれる SNP サイト数。イデオグラムの灰色はGバンド, 黒はセントロメア, 点網かけは非セントロメアヘテロクロマチン, 縦棒はリボゾーマルDNA。

定しようとするものである。高血圧チームは国立循環器病センターを含む14施設から組織され、表1にあるような基準で高血圧患者血液サンプルと臨床データの収集を行った。

1次スクリーニングに用いたSNPsをヒトゲノムの最新のアノテーション情報 (NCBI build 35.1) によって解析SNPサイトの染色体上の位置を再マップしたところ、セントロメア領域と非セントロメアヘテロクロマチン領域以外のゲノム領域全体に分布し、染色体ごとに異なるが、サイト間距離の平均値は134~1706kb, 中間値は1.7~5.2kbだった。これは、解析SNPサイトが翻訳領域とその周辺に重点を置いて選択されているJSNPの性質を反映している(図5)。SNPサイトが1個以上に解析された遺伝子数は約14,000個であり、データベース上に登録されている遺伝子32,746個の42.7%にあたる²⁰⁾。これら1次タイピングは、理化学研究所遺伝子多型研究センターで行った。なお、最近市販されるようになったAffymetrix100k mapping systemの25.8%と比べ、より多くの遺伝子との関連が解析できていることになる。

2次タイピングは、1次スクリーニングの結果から候補として絞り込まれた約2,000個のSNPsを752人の高血圧患者と752人の正常血圧者について関連解析を行った。なお、2次の対象者と1次の対象者は全く異なったパネル由来である。2次タイピングは、国立がんセンターで行った。3次タイピングは、2次タイピングで有意であったものを1, 2次とは異なるパネルを用いてさらに症例対照研究を行い、候補遺伝子を特定する。

理化学研究所の研究グループが行ったゲノム網羅的SNPs解析は、これまで疾患に関連するとは考えられていなかった遺伝子を多数同定している。例えば、心筋梗塞/lymphotoxin- α (LTA)¹³⁾、関節リウマチ/peptidylarginine deiminase type 4 (PAD14)¹⁹⁾、solute

carrier family 22 member 4 (SLC 22A4)、糖尿病性腎症/solute carrier family 12 member 3 (SLC 12A 3)²⁰⁾、変形性関節症/calmodulin 1 (CALM1)²¹⁾などがある。

²⁰⁾ ちなみに、今日では、ヒトの持つ蛋白をコードする遺伝子数は2万~2万5千前後と推定されている (Nature 2004;431:931-945)。

2. ゲノム網羅的マイクロサテライト解析

マイクロサテライト (MS) を用いた網羅的解析は、東海大学 (猪子 英俊教授) と横浜市立大学 (梅村 敏教授) のグループが担当している。MSは連鎖不平衡を示す距離が約100~150kbであり、SNPsの約20~30kbより長いことから疾患関連遺伝子のスクリーニングの効率が期待される。本プロジェクトは、先に述べた1次スクリーニングの対象者のうち95人と正常血圧者95人についてDNA濃度を一定に調整したのち検体を混合しDNAをプールし、まとめてPCRを行った後、約2万のMSマーカーを用いてタイピングした。2次集団120人ずつ、三次集団170人ずつで行い、現在17個の候補領域に絞り込んでいる²²⁾。

3. 候補遺伝子アプローチ (既発表論文は資料2にまとめた)

候補遺伝子についてはJSNPsとは独立にプロモーター領域と翻訳領域を重点的にSNP検索し、新たに見出したSNPsとJSNPsを加えてタイピングを行った。

高血圧症とその合併症患者を対象にした研究では、2,770名の試料と臨床情報を収集しSNPsタイピングを行った。その結果、病態修飾遺伝子や薬剤感受性遺伝子を同定できた。これによりアンジオテンシン変換酵素やエンドセリン変換酵素など5遺伝子が腎障害に関与すること、インスリン様成長因子受容体遺伝子が高血圧患者での左心室肥大と左室形態変化やインスリン抵抗性、動脈硬化の進

展に関連すること、リポカリン型プロスタグランディンD₂合成酵素など5遺伝子が動脈硬化に関与すること、Na-Ca交換体、サイアザイド感受性NaCl共輸送体など7遺伝子が降圧薬感受性に関与。アルデヒド脱水素酵素2やアポリポ蛋白A1が心筋梗塞に関与することが明らかになった。

一般住民を対象にした研究では、延べ7,739名（既取得試料3,773名，新規取得試料3,966名）の試料と臨床情報を収集した。これらのSNPsタイピングの結果，新規素因遺伝子（*GREB1*，*ACADSB*，*PTK2B*など）を明らかにしたほか，ジテルマン症候群の原因遺伝子*SLC12A3*に，機能を喪失させる変異が日本人16人に1人存在することが明らかになった。尿酸トランスポーター遺伝子*URAT1*のW258Stop変異が日本人に2.7%見られ，ほとんどの低尿酸血症を説明できた。ヒト染色体16p12領域に存在する*SAH*遺伝子群の*MACS2*遺伝子やアポリポ蛋白質A5が中性脂肪レベルに大きく影響を与えることを明らかにした。アポリポ蛋白質A1及び*ABCA1*がHDLコレステロールレベルに影響を与えることを明らかにした。薬剤反応性遺伝子に関する研究では，322試料を国立医薬品食品衛生研究所に提供した。 β 遮断薬の排泄に関わる*UGT1A6*及び*SLC22A2*の新規多型を同定した。*SLC22A2*のT199IとR234Wは，著明な活性低下をもたらした。本多型は，薬物有害作用を未然に予防する検査方法として有用である。当センターで得られた主な成績を表2に示す。これらを大別すると，当初予測されたように中間形質と遺伝子多型の相関，環境と遺伝子多型の相互作用，遺伝子多型と遺伝子多型の相互作用など遺伝子の関与は多彩であることが分かる。なお，高血圧コンソーシアムとしては29件の特許を出願中である。

Ⅵ. ゲノム研究の今後

5年にわたるミレニアム・ゲノム・プロジェクト・疾患遺伝子研究は，平成17年度以降基盤研究所の委託事業としてさらに5年の予定で継続されることになった。疾患ゲノム研究はその規模と長期性，もたらされると予想されるパラダイムシフトの観点から，医療におけるポエニ戦争とも言えよう。過去5年の研究を振り返ると，血圧や血圧-疾病という転帰に，遺伝子と環境の精妙な相互作用が厳然と存在することを垣間見ることができた。日常的疾患であるが故に，遺伝子的解明は現在の知識や技術をもってしても難攻不落と思われてならないが，視野の広い研究・探索によって医療に豊かな稔りをもたらされることも予感される。

ミレニアム・ゲノム・プロジェクトは，疾患遺伝子研究に根源的な問題を突きつけつつある。第一に，病気/疾患をどうとらえるのがゲノム研究の本質をつくことになるのか，第二に，多因子疾患に関与する遺伝子をどのようにして特定していくかという理論的裏付けと現実的解析法の確立。第三に，データベースが今後充実していくが，いかにして集団の利益を図りつつ個人のプライバシーや利益を保護するかという倫理問題である。

高血圧は，血圧という生理的にも変動しやすい連続量を人為的（疫学と医療のエビデンスに照らして）に基準を設けて定義したものである。恒常的な高血圧は脳卒中や心筋梗塞といった動脈硬化性血管疾患の有力な危険因子であるが，その連関は個体差が大きく必ずしも決定的因果関係が成り立つわけではない。遺伝子変異と単一遺伝病の間には浸透率という関連性の強さを示す指標があるが，多因子疾患になると遺伝子変異との関連はさらに希薄になる。疫学研究や臨床研究では過去の研究で得られた豊富な知識から，年齢，性

などの因子の交互作用などを推測し、疾患との関連性の検定を行う統計的手法（危険因子のオッズ比など）が用いられている。

遺伝子変異と生理学的特徴の関連について同様の解析を行うにはこれまで蓄積された知識では不十分である。疾患に関連する遺伝子変異を特定するには環境要因（食事などの生活習慣）とその履歴、血圧に影響を与える神経体液性因子の特徴と生体の反応性の個別的特徴の抽出などを定量化し、遺伝要因によって規定されていると判断される臨床情報を抜き出しかつ定量性を持たせることは不可避の作業である。また、候補遺伝子と疾患との関連性を推測する検出力や正確性を上げようとすると、多数の例についての症例対照研究を組み立てなければならない。それでも統計学的偽陽性（ α 効果）や「population shift効果」が生じる可能性は避けられないので、異なったパネル（集団）での再検討が必要となってくる。環境因子に影響されにくい定量指標の導入も、分析感度を上げる上で工夫される必要がある。従来型の研究にない中間形質の発見と再定義も必要と考えられる。その上で、遺伝子発現プロファイルやプロテオームとの関連など戦術的に検討すべきことは少なくない。

第二の問題は、ゲノム網羅的SNPs研究のように特定の仮説を導入しないことも“予期せぬ重大遺伝子探索”に有力な手法と思われる。ヒトのゲノムは、約30億の塩基配列から成る。その配列は全ての人に同一ではなく、遺伝子多型（polymorphism）が認められている。多型は一般集団のなかで1%以上の頻度で生じるものと定義されているが、その1つに本稿でタイピングのマーカーとして用いた塩基多型（SNP）があり、ヒトゲノム中には300万カ所以上あると想定されている。今回の解析では約10万カ所のSNPsを用いたので、研究者としては天文学的量の解析を行っ

たつもりであるが、数量からは1/30（3%弱）をサーベイしたに過ぎない。これはプロモーターや翻訳領域に焦点を絞った結果であり、非翻訳領域については未知のままである。本年のScience 9月2日号（2005;309(5740), September 2）には暗黒世界としてのRNAが特集されており、さらにマウスゲノムの研究から、ゲノム配列がRNA転写される割合は70%前後であるという論文が2編掲載されている^{23), 24)}。どうも多様で複雑な遺伝子発現の鍵は、従来非翻訳領域と呼ばれたところにもあることになる。「セントラルドグマ」は、必ずしも単純な世界でないことが示されつつある。

ミレニアムゲノムの成果を広く研究者に活用して頂くために、疾患ゲノムチームは国立がんセンターにデータベースセンターを構築しつつある。高速タイピングの実現、取り扱うことが可能な中間形質が豊富になったこと、統計学的解析法（インフォマティクス）の進歩などを受けて、世界は日常疾患の解析に大きなストライドを踏み出しつつある²⁵⁾。わが国の疾患ゲノム研究も第二期を迎え、理論的背景、エビデンスの蓄積、新規薬剤の発見と開発に向けて、さらに強化されることが望まれる。国際的競争は疾患についての民族差、性差、年齢依存性などに明解な解答を導き出すはずであり、それらの成果によって医療はより確実性を増す方向で個別化（テーラーメイド化）を実現するに違いない。

謝 辞

本研究の遂行に当たっては、医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構からの研究助成（MPJ-3）をいただきました。深く御礼申し上げます。

貴重な臨床情報と血液サンプルを御提供いただきました患者の皆様、当センターの予防検診部で隔年健診を受けておられる住民の皆様