

厚生労働科学研究費補助金
健康科学総合研究事業

遺伝子解析に基づく循環器病・糖尿病の
予防医療診療の試み
(H16-健康-011)

平成17年度 総括研究報告書
平成18 (2006) 年3月

主任研究者

三木哲郎 (愛媛大学医学部老年医学講座)

分担研究者

田原康玄 (愛媛大学医学部統合医科学講座)

目 次

I. 総括研究報告

遺伝子解析に基づく循環器病・糖尿病の予防医療診療の試み

愛媛大学医学部老年医学講座・教授 三木哲郎

-----3

II. 分担研究報告

1. 遺伝的高HDL血症の動脈硬化発症・進展への影響

愛媛大学医学部老年医学講座・教授 三木哲郎

-----9

2. N-アセチル化転移酵素遺伝子多型の日本人における頻度の解明

愛媛大学医学部統合医科学講座・講師 田原康玄

----13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----18

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----19

厚生労働科学研究補助金（健康科学総合研究事業）
総括研究報告書

遺伝子解析に基づく循環器病・糖尿病の予防医療診療の試み

主任研究者 三木哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座教授

研究要旨

個別化医療の実現に向け、コレステリルエステル転送蛋白(CETP)遺伝子の Int14GA、D442G 多型と血中 HDL コレステロールならびに動脈硬化性疾患マーカーとの関連を検討した。加えて抗結核薬イソニアジド等の arylamine や hydrazine 系薬剤の代謝に影響する Hepatic arylamine N-acetyltransferase (NAT) 遺伝子多型について、日本人における頻度を検討した。その結果、CETP 遺伝子多型はいずれも HDL コレステロール量と有意に関連したが、各種動脈硬化性疾患マーカーとの関連は認められなかった。一方 NAT2 遺伝子については、代謝速度が遅く副作用の危険性が高い変異型のホモ接合体が、日本人一般地域住民において 11.6%認められた。これらの成績は、今後の予防医療診療実現に向けて、有用な知見になるといえる。

三木哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座・教授

田原康玄 愛媛大学医学部統合医科学講座・講師

A. 研究目的

生活習慣病やメタボリックシンドロームは、その発症要因や頻度から多因子疾患であることは間違いない。しかし、家族性高 HDL 血症のように、単一遺伝子の多型(変異)がその発症や進展に影響している場合もある。なかでも、コレステリルエステル転送蛋白(CETP)遺伝子の Int14GA、D442G 多型は、血中の高 HDL 血症の原因遺伝子のひとつとして良く知られている。CETP は、血管壁などの末梢組織から肝へコレステロールを逆転送して、処理・排泄に働くタンパク質である。具体的には、HDL 内の余剰コレステリルエステルが CETP を介して apoB 含有リポ蛋白(LDL, VLDL)に転送され、LDL レセプターを介して肝細胞に取りこまれる。

日系アメリカ人を対象とした検討では、Int14GA、D442G いずれかの変異型が 5~6%の頻度で認められ、有意に高い HDL コレステロール濃度を示すことが報告されている。また変異型保有者では、HDL コレステロール量が高いにもかかわらず、冠動脈疾患の有病率が高いことも報告されている。しかしながら、日本人におけるこれら遺伝子変異の頻度については明らかになっていない。加えて血中 HDL コレステロール濃度との関連、あるいは動脈硬化に対する影響についても検討されていない。

その一方で、薬剤応答性に関する遺伝的背景もテーラーメイド医療を実現化する上で早急に明確化すべき課題である。Hepatic arylamine N-acetyltransferase (NAT) は arylamine や hydrazine 系薬剤の代謝において重要な酵素である。NAT には 2 つのアイソフォーム (NAT1/NAT2) があり、このうち NAT2 にはアセチル化の速度に影響しうる多型が存在する(表 1)。野生型(4 型)に比して変異型ではアセチル化の速度が遅く、変異型の種類は日本人では 3 種類(5 型、6 型、7 型)、日本人以外の人種では 14 種類が報告されている。また、変異型の頻度にも人種特異性があり、白人では約 50%程度、日本人では 10%程度が変異型とされている。

表 1 ヒト NAT2 遺伝子多型の種類

NAT2 allele	Nucleotide change(s)	Amino acid change(s)
NAT2*4	None	None
NAT2*5A	T ³⁴¹ C, C ⁴⁸¹ T	Ile ¹¹⁴ → Thr
NAT2*5B	T ³⁴¹ C, C ⁴⁸¹ T, A ⁵⁰³ C	Ile ¹¹⁴ → Thr, Lys ²⁶⁸ → Arg
NAT2*5C	T ³⁴¹ C, A ⁸⁰³ G	Ile ¹¹⁴ → Thr, Lys ²⁶⁸ → Arg
NAT2*6A	C ²⁸² T, G ⁵⁶⁹ A	Arg ¹⁹⁷ → Gln
NAT2*6B	G ⁵⁶⁹ A	Arg ¹⁹⁷ → Gln
NAT2*7A	G ⁸⁵⁷ A	Gly ²⁸⁶ → Arg
NAT2*7B	C ²⁸² T, G ⁸⁵⁷ A	Gly ²⁸⁶ → Arg
NAT2*12A	A ⁸⁰³ G	Lys ²⁶⁸ → Arg
NAT2*12B	C ²⁸² T, A ⁸⁰³ G	Lys ²⁶⁸ → Arg
NAT2*13	C ²⁸² T	None
NAT2*14A	G ¹⁹¹ A	Arg ⁶⁴ → Gln
NAT2*14B	G ¹⁹¹ A, C ²⁸² T	Arg ⁶⁴ → Gln
NAT2*17	A ⁴³⁴ C	Glu ¹⁴⁵ → Pro
NAT2*18	A ⁸⁴⁵ C	Lys ²⁸⁷ → Thr

Doll MA, Anal biochem, 2005 より引用。

イソニアジドは、1950 年代後半より抗結核薬として広く使用されてきた。反面、一部の対象において重篤な副作用が報告されている。イソニアジド

ドの代謝に NAT2 が関与していることから、この多型が副作用の責任多型であることが知られている。しかし、日本人大規模集団を対象に、NAT2 遺伝子多型の頻度を検討した例は見あたらない。

そこで本研究では、CETP 遺伝子多型と血中 HDL コレステロール量ならびに各種動脈硬化性疾患マーカーとの関連、ならびに NAT2 遺伝子多型の頻度を大規模一般地域住民を対象に検討し、当該遺伝子多型のリスク評価を行うことで個別化医療の実現に資することを目的とした。

B. 研究方法

対象は、愛媛県下でコホート設定している A 町住民のうち、老人保健法に基づく一般住民検診を受診し、かつ本研究の趣旨に同意の得られた約 3000 例とした。対象者の一般臨床検査所見は健診時の検査値を利用した。加えて、高感度 CRP やアディポネクチンなどの動脈硬化性マーカーを、末梢血を用いて独自に測定した。対象の一部においては、脈波伝搬速度 (PWV) や頸動脈内中膜複合体厚 (IMT) の測定を行った。現病既往歴および生活習慣については問診にて把握した。

対象者の DNA は、末梢血より定法に則って抽出した。抽出した DNA は、DOP-PCR 法により増幅してから分析に供した。

CETP 遺伝子の Int14GA、D442G 多型は、TaqMan プローブ法で解析した。用いたプライマー/プローブの配列を以下に示す。なお、D442G 多型はアプライドバイオシステムズ社の Assay-on-demand にて既製のプライマー/プローブセットを購入して解析に供した (C_790072_1)。

CETP 遺伝子 Int14GA 多型

Probe1 FAM- CATGTCTCGTAAGTGTG-MGB
 Probe2 VIC- TCATGTCTCATAAGTGTG -MGB
 Primer1 CTGTGGGCATCCCTGAGG
 Primer2 CCTCGGCACCCAGTTTCC

解析した NAT2 遺伝子多型を表 2 に示した。これらの多型は、同様に TaqMan プローブ法で解析した。rs1801280 多型の解析に用いたプライマー/プローブの配列を以下に示す。

NAT2 遺伝子 rs1801280 多型

Probe1 FAM- CGTCAGTGGTCACC -MGB
 Probe2 VIC- CCGTCAATGGTCACC -MGB
 Primer1 ACTGGCATGGTTCACCTTCTC
 Primer2 CCCAGCATCGACAATGTAATTCCT

表 2 解析した NAT2 遺伝子多型

Rs 番号	置換		遺伝子型
	塩基	アミノ酸	
rs1799930	590GA	Arg197Gln	*6
rs1799931	857GA	Gly286Arg	*7
rs1041983	282CT	-	*13
rs1801280	341TC	Ile114Thr	*5

rs1799930, rs1799931, rs1041983 多型については、アプライドバイオシステムズ社の Assay-on-demand にて既製のプライマー/プローブセットを購入して解析に供した (C_1204091_10, C_572770_10, C_8684085_10)。

(倫理面への配慮)

愛媛大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会において、研究課題名「生活習慣病と動脈硬化性疾患の発症要因の探索」、「生活習慣病における個別化医療を目指した研究」「遺伝子多型解析による個別化医療を目指した研究」として承認を得ている。対象者には、事前に十分な主旨説明の上、書面にて同意を得た。個人情報、所定の手続きに則って匿名化し管理している。これらはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守したものであり、本研究における倫理面への配慮は十分であると判断した。

D. 研究結果

CETP 遺伝子 Int14GA 多型、ならびに D442G 多型の頻度を表 3 に示した。日系アメリカ人を対象とした検討では、Int14GA 多型では GA 型が 0.49%、D442G 多型では DG 型が 4.9%、GG 型が 0.17%と報告されており、本研究の成果と同程度であった。

表 3 CETP 遺伝子多型の頻度

Int14GA 多型		
GA	22 人	(0.8%)
GG	2851 人	(99.2%)
D442G 多型		
DD	2718 人	(94.6%)
DG	152 人	(5.3%)
GG	3 人	(0.1%)

各遺伝子多型と血中 HDL コレステロール濃度との関連を図 1、図 2 に示した。いずれにおいても変異型で有意に高い HDL コレステロール値を示し

た (Int14GA 多型 ; $p=2.4 \times 10^{-18}$ 、D442G 多型 ; $p=6.5 \times 10^{-7}$)。Int14GA 多型と D442G 多型の組み合わせと HDL コレステロール量との関係を図 3 に示した。両多型の組み合わせは、相加的に HDL コレステロール量と相関していた ($p=2.7 \times 10^{-24}$)。

CETP 遺伝子の Int14GA 多型と D442G 多型いずれかにおいて変異型を持つ例と、いずれも野生型である例とで各種動脈硬化性疾患マーカーとを比較した (表 4)。その結果、いずれにおいても有意差は認められず、遺伝子変異による高 HDL 血症が動脈硬化性疾患のリスクあるいは予防因子とはならない可能性が示された。

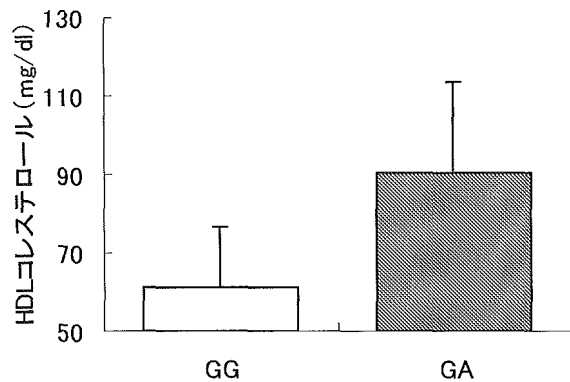


図 1 Int14GA 多型と HDL コレステロール量

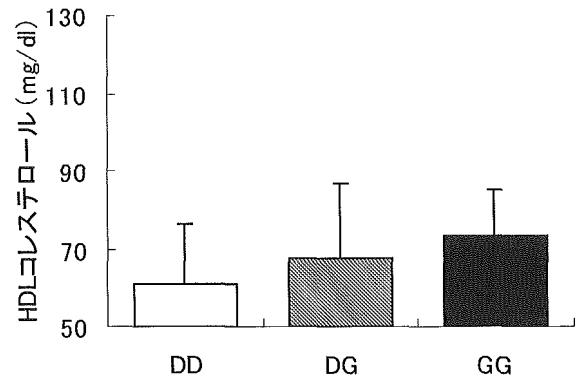


図 2 D442G 多型と HDL コレステロール量

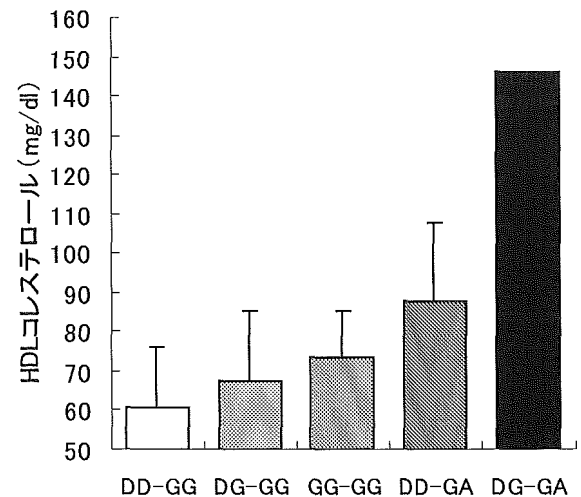


図 3 Int14GA 多型と D442G 多型の組み合わせと HDL コレステロール量

表 4 CETP 遺伝子多型と動脈硬化性疾患マーカーとの関連

	野生型	変異型	p
HOMA 指数	1.7 ± 1.7	1.8 ± 1.5	0.682
アディポネクチン (mg/dl)	6.0 ± 4.3	6.3 ± 5.0	0.578
高感度 CRP (ug/dl)	0.10 ± 0.17	0.12 ± 0.20	0.202
上腕一足首脈波伝搬速度 (cm/秒)	1743 ± 428	1762 ± 405	0.821
頸動脈内膜中膜複合体厚 (mm)	0.82 ± 0.12	0.80 ± 0.10	0.405

NAT2 遺伝子上で、解析した 4 つの遺伝子多型の頻度を表 5 に示した。このうちいずれの多型にも変異型をもたない野生型は 43.6%、ヘテロ接合体 (4*5, 4*6A, 4*6B, 4*7B) は 44.7%、変異型のホモ接合体は 11.6%であった (表 6)。この頻度は、性別や年齢階層に依らず一定であった。

D. 考察

CETP 遺伝子多型と血中 HDL コレステロール量と

に有意な相関が認められ、Int14GA 多型と D442G 多型はいずれも高 HDL 血症の原因遺伝子であることが確認された。

高 HDL 血症のリスク性については、未だ結論が得られていない。日系アメリカ人を対象とした検討では、CETP 遺伝子の変異による高 HDL 血症は、心血管系イベントのリスクとなる可能性が報告されている。反面、本研究では、血中の動脈硬化性疾患マーカー、あるいは頸動脈肥厚などの中間形質と CETP 遺伝子多型とに相関は認められなかった。日系アメリカ人と本調査対象とでは、生活

習慣が大きく異なることは既知である。また CETP 遺伝子多型頻度も、人種によって大きく異なることが予想される。今後の個別化医療の実現に向けて、さらに多くの対象において、より大規模かつ長期縦断的検討がなされることにより、当該遺伝子多型と心血管系イベントとの関連を明らかにしていく必要があるといえよう。

表5 NAT2 遺伝子多型の頻度

	野生型	ヘテロ	変異型
rs1799930	1884 (62.2)	1002 (33.1)	142 (4.7)
rs1799931	2386 (78.4)	613 (20.1)	45 (1.5)
rs1041983	1381 (45.4)	1341 (44.1)	322 (10.6)
rs1801280	2945 (97.6)	71 (2.4)	2 (0.1)

表6 NAT2 遺伝子多型の頻度

遺伝子型	人数	頻度
野生型	4*4	1292 (43.6)
ヘテロ	4*5	47 (1.6)
	4*6A	828 (27.9)
	4*6B	1 (0.0)
	4*7B	452 (15.2)
変異型	5*5	2 (0.1)
	5*6A	10 (0.3)
	5*7B	12 (0.4)
	6A*6A	142 (4.8)
	6A*7B	135 (4.6)
	7A*7B	1 (0.0)
	7B*7B	43 (1.5)

一方、NAT2 遺伝子多型は、イソニアジドなどの薬物代謝に強く影響することが知られている。特に変異型のホモ接合体ではアセチル化活性が著しく低く、薬物代謝が遅いため、副作用の発現が危惧される。このような遺伝子型が、日本人の約 10 人に 1 人の割合で認められたことは、今後の arylamine や hydrazine 系薬剤投与において、事前の遺伝子検査の必要性を示すものである。

変異型のヘテロ接合体については、日本人において約 40%程度存在することが示された。既報によれば、ヘテロ型の代謝速度は野生型の 50%程度である。変異型のホモ接合体とあわせると、日本人の半数は NAT2 遺伝子多型に変異型をもつことになり、このことから、将来的には、薬物投与前の遺伝子検査が必要となるであろう。

本研究では、NAT2 遺伝子上の 4 つの多型についてのみ検討した。しかし NAT2 遺伝子には、さらにいくつかの亜型が存在している。今後、これら亜型について、頻度や酵素活性への影響を検討することが必要であろう。

E. 結論

CETP 遺伝子多型は高 HDL 血症の原因遺伝子となることが確認されたが、動脈硬化性疾患マーカーとの関連は認められなかった。arylamine や hydrazine 系薬剤の代謝に関わる NAT2 遺伝子において、代謝能の低い変異型が、日本人において性別や年齢階層を問わず 11%程度認められることが明らかとなった。これらの成績は、今後の予防医療診療実現に向けて、有用な知見になる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tamaki S, Nakamura Y, Tabara Y, Okamura T, Kita Y, Kadowaki T, Tsujita Y, Horie M, Miki T, Ueshima H. Combined analysis of polymorphisms in angiotensinogen and adducin genes and their effects on hypertension in a Japanese sample: The Shigaraki Study. *Hypertens Res.* 2005;28:645-50.
- Abe M, Wu Z, Yamamoto M, Jin JJ, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with hypertension through interaction with fasting plasma glucose in Japanese. *Hypertens Res.* 2005;28:215-21.
- Osawa H, Onuma H, Ochi M, Murakami A, Yamauchi J, Takasuka T, Tanabe F, Shimizu I, Kato K, Nishida W, Yamada K, Tabara Y, Yasukawa M, Fujii Y, Ohashi J, Miki T, Makino H. Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335:596-602.

- Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M, Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease. *Life Sci.* 2005 in press
- Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease. *J Neurol Sci.* 2005;238:53-7.
- 血管壁硬化を中間形質とした脈圧に関連する遺伝的要因探索: J-SHIPP 研究 小原克彦・田原康玄・永井勲久・伊賀瀬道也・名倉潤・三木哲郎
- 加齢に伴う腎機能低下に関連する遺伝的要因の探索: J-SHIPP 研究 小原克彦・田原康玄・永井勲久・伊賀瀬道也・名倉潤・三木哲郎
- 虚血性脳卒中と MTHFR 遺伝子多型との関連について 川本龍一・小原克彦・富田仁美・田原康玄・三木哲郎

2. 学会発表

The American Society of Hypertension 20th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, May14-18, 2005

- Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Nakura J, and Miki T. Genetic risk factors for arterial stiffness.
- Kohara K, Fujisawa M, Ando F, Tabara Y, Niino N, Miki T, Shimokata H Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms and Silent Cerebral Infarcts in a Large Japanese General Population.
- Tabara Y, Kohara K, and Miki T on behalf of the study group of Millennium Genome Project for hypertension. Hunting for hypertension genes: The National Millennium Project in Japan,
- Kohara K, Tabara Y, and Miki T. Systemic multiple candidate genes approach for identification of susceptible genes for hypertension in a Japanese population; on behalf of the study group of Millennium Genome Project for hypertension

The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting, Salt Lake City, USA, October 25-29

- Kondo I, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Yamaguchi F, Kuwajima K. NSD1 polymorphic DNA markers for microdeletion screening in patients with sotos syndrome.
- Miki T, Tabara Y, Nakura J, Kohara K. Genom-wide scan for hypertension: The National Millennium Project in Japan.

第 47 回日本老年医学会学術集会 平成 17 年 6 月 15 日 ~17 日 東京

- Matric metalloproteinase 遺伝子多型と無症候性脳梗塞: NLS-LSA スタディ 永井勲久・小原克彦・藤沢道子・安藤富士子・田原康玄・三木哲郎・下方浩史
- 高血圧感受性遺伝子の解析: ミレニアム・ゲノム・プロジェクト 三木哲郎・小原克彦・名倉潤・田原康玄・ミレニアムゲノムプロジェクト高血圧部会

第 12 回遺伝子診療学会大会 平成 17 年 8 月 松本

- 高血圧感受性遺伝子解析におけるデータマイニングの有用性 三木哲郎, 田原康玄, 名倉潤, 小原克彦

第 28 回日本高血圧学会総会 平成 17 年 9 月 旭川

- Angiotensinogen M235T 多型および α adducin G640W 多型と高血圧の関連~日本人住民での検討 中村保幸・田原康玄・三木哲郎・環 慎二・山本貴子・喜多義邦・岡村智教・上島弘嗣
- 2 万個のマイクロサテライトマーカーを用い、本態性高血圧の疾患感受性 (成因) 遺伝子同定を目指したゲノムワイド相関解析 谷津圭介・平和伸仁・小川桃子・志和忠志・相馬正義・羽田 明・中尾一和・上島弘嗣・荻原俊男・友池仁暢・田原康玄・三木哲郎・木村彰方・岡 晃・水木信久・猪子俊英・梅村 敏
- マルチプル候補遺伝子アプローチによる高血圧感受性遺伝子、感受性経路の探索~ミレニアム・ゲノム・プロジェクト 小原克彦・田原康玄・名倉潤・三木哲郎
- Follicle stimulating hormone (FSH) 受容体遺伝子 5' 非翻訳領域の一塩基多型は転写活性に影響し本態性高血圧症と関連する (ミレニアムゲノムプロジェクト) 中山智祥・黒井信宏・佐野守彦・田原康玄・勝谷友宏・荻原俊男・蒔田芳男・羽田明・山田美智子・高橋規郎・平和伸仁・梅村 敏・三木哲郎・相馬正義
- RGS2 遺伝子多型と 12 年間の家庭血圧変化の関連: 大迫研究 勝谷友宏・田原康玄・大久保孝義・菊谷昌浩・目時弘仁・戸恒和人・小原克彦・柴木宏美・三木哲郎・今井 潤・荻原俊男
- 高血圧候補遺伝子と脂肪蓄積および血圧の関連性 小川桃子・平和伸仁・遠藤晃彦・谷津圭介・田村功一・木原 実・戸谷義幸・安田 元・田原康玄・三木哲郎・徳永勝士・梅村 敏

59th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on Kidney in Cardiovascular Disease. September 21, 24, 2005. Washington, DC

- Tabara Y, Kohara K, Nakura J, Miki T, The study Group of Millennium Genome Project for Hypertension. Whole-genome Candidate Gene

Association Study for the Development of Hypertension; The National Millennium Genome Project in Japan

- Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Igase M, Nakura J, Miki T. Candidate Gene Approach for Age-related Increase in Pulsere Pressure with an Employment of Arterial Stiffness as an Intermediate Phenotype: J-shipp Study
- Tabara Y, Kohara K, Kawamoto R, Osawa H, Nakura J, Makino H, Miki T. Association Between Adiponectin and C-reactive Protein in Community-based Large Scale Population

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝的高 HDL 血症の動脈硬化発症・進展への影響

分担研究者 三木 哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座教授

研究要旨

個別化医療の実現に向け、コレステリルエステル転送蛋白 (CETP) 遺伝子の Int14GA、D442G 多型と血中 HDL コレステロールならびに動脈硬化性疾患マーカーとの関連を検討した。その結果、両多型はいずれも HDL コレステロール量と有意に関連したが、各種動脈硬化性疾患マーカーとの関連は認められなかった。これらの成績は、今後の予防医療診療実現に向けて、有用な知見になるといえる。

A. 研究目的

生活習慣病やメタボリックシンドロームは、その発症要因や頻度から多因子疾患であることは間違いない。しかし、家族性高 HDL 血症のように、単一遺伝子の多型 (変異) がその発症や進展に影響している場合もある。なかでも、コレステリルエステル転送蛋白 (CETP) 遺伝子の Int14GA、D442G 多型は、血中の高 HDL 血症の原因遺伝子のひとつとして良く知られている。CETP は、血管壁などの末梢組織から肝へコレステロールを逆転送して、処理・排泄に働くタンパク質である。具体的には、HDL 内の余剰コレステリルエステルが CETP を介して apoB 含有リポ蛋白 (LDL, VLDL) に転送され、LDL レセプターを介して肝細胞に取りこまれる。

日系アメリカ人を対象とした検討では、Int14GA、D442G いずれかの変異型が 5~6% の頻度で認められ、有意に高い HDL コレステロール濃度を示すことが報告されている。また変異型保有者では、HDL コレステロール量が高いにもかかわらず、冠動脈疾患の有病率が高いことも報告されている。しかしながら、日本人におけるこれら遺伝子変異の頻度については明らかになっていない。加えて血中 HDL コレステロール濃度との相関、あるいは動脈硬化に対する影響についても検討されていない。

そこで本研究では、この CETP 遺伝子多型と血中 HDL コレステロール量ならびに各種動脈硬化性疾患マーカーとの関連を、一般地域住民を対象に検討し、当該遺伝子多型のリスク評価を行った。

B. 研究方法

対象は、愛媛県下でコホート設定している A 町住民のうち、老人保健法に基づく一般住民検診を

受診し、かつ本研究の趣旨に同意の得られた 2873 例とした。対象者の一般臨床検査所見は健診時の検査値を利用した。加えて、高感度 CRP やアディポネクチンなどの動脈硬化性マーカーを、末梢血を用いて独自に測定した。対象の一部においては、脈波伝搬速度 (PWV) や頸動脈内中膜複合体厚 (IMT) の測定を行った。現病既往歴および生活習慣については問診にて把握した。

対象者の DNA は、末梢血より定法に則って抽出した。抽出した DNA は、DOP-PCR 法により増幅してから分析に供した。CETP 遺伝子の Int14GA、D442G 多型は、TaqMan プローブ法で解析した。用いたプライマー/プローブの配列を以下に示す。なお、D442G 多型はアプライドバイオシステムズ社の Assay-on-demand にて既製のプライマー/プローブセットを購入して解析に供した (C_790072_1)。

CETP 遺伝子 Int14GA 多型

Probe1 FAM- CATGTCTCGTAAGTGTG-MGB
Probe2 VIC- TCATGTCTCATAAGTGTG -MGB
Primer1 CTGTGGGCATCCCTGAGG
Primer2 CCTCGGCACCCAGTTTCC

(倫理面への配慮)

愛媛大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会において、研究課題名「生活習慣病と動脈硬化性疾患の発症要因の探索」、「生活習慣病における個別化医療を目指した研究」「遺伝子多型解析による個別化医療を目指した研究」として承認を得ている。対象者には、事前に十分な主旨説明の上、書面にて同意を得た。個人情報、所定の手続きに則って匿名化し管理している。これらはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守したものであり、本研究における倫理面への配慮は十分であると判断した。

C. 研究結果

CETP 遺伝子 Int14GA 多型、ならびに D442G 多型の頻度を表 1 に示した。日系アメリカ人を対象とした検討では、Int14GA 多型では GA 型が 0.49%、D442G 多型では DG 型が 4.9%、GG 型が 0.17%と報告されており、本研究の成果と同程度であった。

表 1 CETP 遺伝子多型の頻度

Int14GA 多型		
GA	22 人	(0.8%)
GG	2851 人	(99.2%)
D442G 多型		
DD	2718 人	(94.6%)
DG	152 人	(5.3%)
GG	3 人	(0.1%)

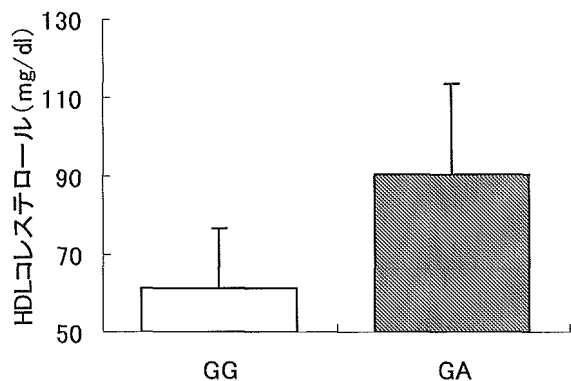


図 1 Int14GA 多型と HDL コレステロール量

各遺伝子多型と血中 HDL コレステロール濃度との関連を図 1、図 2 に示した。いずれにおいても変異型で有意に高い HDL コレステロール値を示した (Int14GA 多型; $p=2.4 \times 10^{-18}$ 、D442G 多型; $p=6.5 \times 10^{-7}$)。Int14GA 多型と D442G 多型の組み合わせと HDL コレステロール量との関係を図 3 に示した。両多型の組み合わせは、相加的に HDL コレステロール量と相関していた ($p=2.7 \times 10^{-24}$)。

CETP 遺伝子の Int14GA 多型と D442G 多型いずれかにおいて変異型を持つ例と、いずれも野生型である例とで各種動脈硬化性疾患マーカーとを比較した (表 2)。その結果、いずれにおいても有意差は認められず、遺伝子変異による高 HDL 血症が動脈硬化性疾患のリスクあるいは予防因子とはならない可能性が示された。

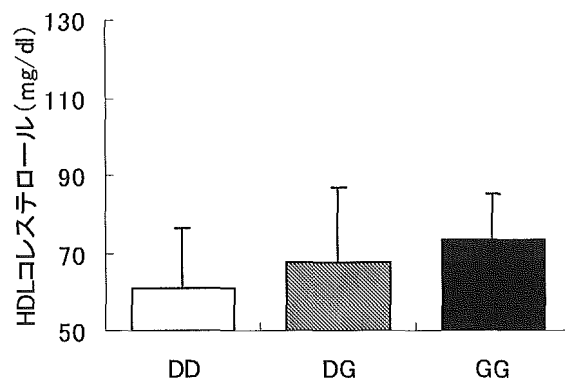


図 2 D442G 多型と HDL コレステロール量

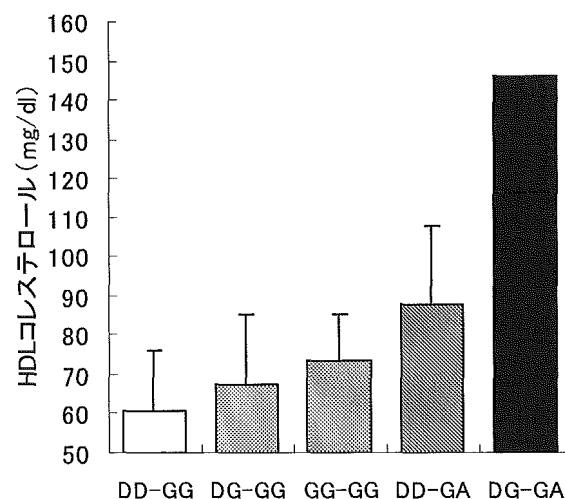


図 3 Int14GA 多型と D442G 多型の組み合わせと HDL コレステロール量

表 2 CETP 遺伝子多型と動脈硬化性疾患マーカーとの関連

	野生型	変異型	p
HOMA 指数	1.7 ± 1.7	1.8 ± 1.5	0.682
アディポネクチン (mg/dl)	6.0 ± 4.3	6.3 ± 5.0	0.578
高感度 CRP (ug/dl)	0.10 ± 0.17	0.12 ± 0.20	0.202
上腕一足首脈波伝搬速度 (cm/秒)	1743 ± 428	1762 ± 405	0.821
頸動脈内膜中膜複合体厚 (mm)	0.82 ± 0.12	0.80 ± 0.10	0.405

D. 考察

CETP 遺伝子多型と血中 HDL コレステロール量とに有意な相関が認められ、Int14GA 多型と D442G 多型はいずれも高 HDL 血症の原因遺伝子であることが確認された。高 HDL 血症のリスク性については、未だ結論が得られていない。日系アメリカ人を対象とした検討では、CETP 遺伝子の変異による高 HDL 血症は、心血管系イベントのリスクとなる可能性が報告されている。反面、本研究では、血中の動脈硬化性疾患マーカー、あるいは頸動脈肥厚などの中間形質と CETP 遺伝子多型とに相関は認められなかった。日系アメリカ人と本調査対象とでは、生活習慣が大きく異なることは既知である。また CETP 遺伝子多型頻度も、人種によって大きく異なることが予想される。今後の個別化医療の実現に向けて、さらに多くの対象において、より大規模かつ長期縦断的検討がなされることにより、当該遺伝子多型と心血管系イベントとの関連を明らかにしていく必要があるといえよう。

E. 結論

CETP 遺伝子多型は高 HDL 血症の原因遺伝子となることが確認されたが、動脈硬化性疾患マーカーとの関連は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tamaki S, Nakamura Y, Tabara Y, Okamura T, Kita Y, Kadowaki T, Tsujita Y, Horie M, Miki T, Ueshima H. Combined analysis of polymorphisms in angiotensinogen and adducin genes and their effects on hypertension in a Japanese sample: The Shigaraki Study. *Hypertens Res.* 2005;28:645-50.
 - Abe M, Wu Z, Yamamoto M, Jin JJ, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with hypertension through interaction with fasting plasma glucose in Japanese. *Hypertens Res.* 2005;28:215-21.
 - Osawa H, Onuma H, Ochi M, Murakami A, Yamauchi J, Takasuka T, Tanabe F, Shimizu I, Kato K, Nishida W, Yamada K, Tabara Y, Yasukawa M, Fujii Y, Ohashi J, Miki T, Makino H. Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335:596-602.
 - Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M, Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease. *Life Sci.* 2005 in press
 - Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease. *J Neurol Sci.* 2005;238:53-7.
- ### 2. 学会発表
- The American Society of Hypertension 20th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, May14-18, 2005
- Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Nakura J, and Miki T. Genetic risk factors for arterial stiffness.
 - Kohara K, Fujisawa M, Ando F, Tabara Y, Niino N, Miki T, Shimokata H Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms and Silent Cerebral Infarcts in a Large Japanese General Population.
 - Tabara Y, Kohara K, and Miki T on behalf of the study group of Millennium Genome Project for hypertension. Hunting for hypertension genes: The National Millennium Project in Japan,
 - Kohara K, Tabara Y, and Miki T. Systemic multiple candidate genes approach for identification of susceptible genes for hypertension in a Japanese population; on behalf of the study group of Millennium Genome Project for hypertension
- The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting, Salt Lake City, USA, October 25-29
- Kondo I, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Yamaguchi F, Kuwajima K. NSD1 polymorphic DNA markers for microdeletion screening in patients with sotos syndrome.
 - Miki T, Tabara Y, Nakura J, Kohara K. Genom-wide scan for hypertension: The National Millennium Project in Japan.
- 第 47 回日本老年医学会学術集会 平成 17 年 6 月 15 日 ~17 日 東京
- Matric metalloproteinase 遺伝子多型と無症候性脳梗塞: NLS-LSA スタディ 永井勅久・小原克彦・藤沢道子・安藤富士子・田原康玄・三木哲郎・下方浩史
 - 高血圧感受性遺伝子の解析: ミレニアム・ゲノム・プロジェクト 三木哲郎・小原克彦・名倉潤・田原康玄・ミレニアムゲノムプロジェクト高血圧部会
 - 血管壁硬化を中間形質とした脈圧に関連する遺伝要因探索: J-SHIPP 研究 小原克彦・田原康玄・永井勅久・伊賀瀬道也・名倉潤・三木哲郎

- 加齢に伴う腎機能低下に関連する遺伝要因の探索：J-SHIP 研究 小原克彦・田原康玄・永井勲久・伊賀瀬道也・名倉潤・三木哲郎
- 虚血性脳卒中と MTHFR 遺伝子多型との関連について 川本龍一・小原克彦・富田仁美・田原康玄・三木哲郎

第 12 回遺伝子診療学会大会 平成 17 年 8 月 松本

- 高血圧感受性遺伝子解析におけるデータマイニングの有用性 三木哲郎, 田原康玄, 名倉潤, 小原克彦

第 28 回日本高血圧学会総会 平成 17 年 9 月 旭川

- Angiotensinogen M235T 多型および α adducin G640W 多型と高血圧の関連～日本人住民での検討 中村保幸・田原康玄・三木哲郎・環 慎二・山本貴子・喜多義邦・岡村智教・上島弘嗣
- 2 万個のマイクロサテライトマーカーを用い、本態性高血圧の疾患感受性（成因）遺伝子同定を目指したゲノムワイド相関解析 谷津圭介・平和伸仁・小川桃子・志和忠志・相馬正義・羽田 明・中尾一和・上島弘嗣・萩原俊男・友池仁暢・田原康玄・三木哲郎・木村彰方・岡 晃・水木信久・猪子俊英・梅村 敏
- マルチプル候補遺伝子アプローチによる高血圧感受性遺伝子、感受性経路の探索～ミレニアム・ゲノム・プロジェクト 小原克彦・田原康玄・名倉潤・三木哲郎
- Follicle stimulating hormone (FSH) 受容体遺伝子 5' 非翻訳領域の一塩基多型は転写活性に影響し本態性高血圧症と関連する（ミレニアムゲノムプロジェクト） 中山智祥・黒井信宏・佐野守彦・田原康玄・勝谷友宏・萩原俊男・蒔田芳男・羽田明・山田美智子・高橋規郎・平和伸仁・梅村 敏・三木哲郎・相馬正義
- RGS2 遺伝子多型と 12 年間の家庭血圧変化の関連：大迫研究 勝谷友宏・田原康玄・大久保孝義・菊谷昌浩・目時弘仁・戸恒和人・小原克彦・柴木宏美・三木哲郎・今井 潤・萩原俊男
- 高血圧候補遺伝子と脂肪蓄積および血圧の関連性 小川桃子・平和伸仁・遠藤晃彦・谷津圭介・田村功一・木原 実・戸谷義幸・安田 元・田原康玄・三木哲郎・徳永勝士・梅村 敏

59th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on Kidney in Cardiovascular Disease. September 21, 24, 2005. Washington, DC

- Tabara Y, Kohara K, Nakura J, Miki T, The study Group of Millennium Genome Project for Hypertension. Whole-genome Candidate Gene Association Study for the Development of Hypertension; The National Millennium Genome Project in Japan

- Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Igase M, Nakura J, Miki T. Candidate Gene Approach for Age-related Increase in Pulsere Pressure with an Employment of Arterial Stiffness as an Intermediate Phenotype: J-shipp Study
- Tabara Y, Kohara K, Kawamoto R, Osawa H, Nakura J, Makino H, Miki T. Association Between Adiponectin and C-reactive Protein in Community-based Large Scale Population

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

N-アセチル化転移酵素遺伝子多型の日本人における頻度の解明

分担研究者 田原 康 玄 愛媛大学医学部統合医科学講座講師

研究要旨

抗結核薬イソニアジドの代謝に影響する Hepatic arylamine N-acetyltransferase (NAT) 遺伝子多型について、日本人大規模一般地域住民を対象にその頻度を明らかにすることで、予防医療診療の実現に貢献することを目的とした。愛媛県下の一般地域住民 3164 例を対象に検討したところ、野生型のホモ接合体が 43.6%であったのに対し、ヘテロ接合体 (4*5, 4*6A, 4*6B, 4*7B) は 44.7%、変異型のホモ接合体は 11.6%であった。日本人一般地域住民において、11.6%では arylamine や hydrazine 系薬剤の投与に十分な配慮が必要である。

A. 研究目的

Hepatic arylamine N-acetyltransferase (NAT) は arylamine や hydrazine 系薬剤の代謝において重要な酵素である。NAT には2つのアイソフォーム (NAT1/NAT2) があり、このうち NAT2 にはアセチル化の速度に影響しうる多型が存在する (表 1)。野生型 (4 型) に比して変異型ではアセチル化の速度が遅く、変異型の種類は日本人では 3 種類 (5 型、6 型、7 型)、日本人以外の人種では 14 種類が報告されている。また、変異型の頻度にも人種特異性があり、白人では約 50%程度、日本人では 10%程度が変異型とされている。

表 1 ヒト NAT2 遺伝子多型の種類

NAT2 allele	Nucleotide change(s)	Amino acid change(s)
NAT2*4	None	None
NAT2*5A	T ³¹¹ C, C ⁴⁸¹ T	Ile ¹¹⁴ → Thr
NAT2*5B	T ³¹¹ C, C ⁴⁸¹ T, A ⁸⁰³ G	Ile ¹¹⁴ → Thr, Lys ²⁶⁸ → Arg
NAT2*5C	T ³¹¹ C, A ⁸⁰³ G	Ile ¹¹⁴ → Thr, Lys ²⁶⁸ → Arg
NAT2*6A	C ²⁸² T, G ²⁹⁰ A	Arg ¹⁹⁷ → Gln
NAT2*6B	G ⁵⁹⁰ A	Arg ¹⁹⁷ → Gln
NAT2*7A	G ⁸⁵⁷ A	Gly ²⁸⁸ → Arg
NAT2*7B	C ²⁸² T, G ⁸⁵⁷ A	Gly ²⁸⁸ → Arg
NAT2*12A	A ⁸⁰³ G	Lys ²⁶⁸ → Arg
NAT2*12B	C ²⁸² T, A ⁸⁰³ G	Lys ²⁶⁸ → Arg
NAT2*13	C ²⁸² T	None
NAT2*14A	G ¹⁹¹ A	Arg ⁶⁴ → Gln
NAT2*14B	G ¹⁹¹ A, C ²⁸² T	Arg ⁶⁴ → Gln
NAT2*17	A ⁴³⁴ C	Glu ¹⁴⁵ → Pro
NAT2*18	A ⁸⁴⁵ C	Lys ²⁸² → Thr

Doll MA, Anal biochem, 2005 より引用。

イソニアジドは、1950 年代後半より抗結核薬として広く使用されてきた。反面、一部の対象において重篤な副作用が報告されている。イソニアジドの代謝に NAT2 が関与していることから、この多型が副作用の責任多型であることが知られて

いる。しかし、日本人大規模集団を対象に、NAT2 遺伝子多型の頻度を検討した例は見あたらない。

そこで本研究では、大規模な一般地域住民を対象に NAT2 遺伝子多型の頻度を明らかにし、イソニアジドによる副作用の軽減を通じて個別化医療の実現に資することを目的とした。

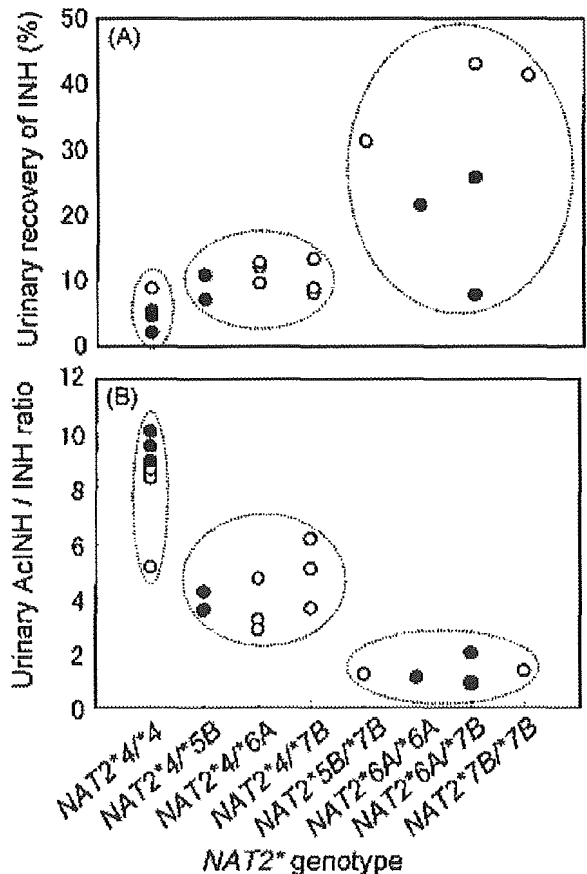


図 1 NAT2 遺伝子多型とイソニアジドの代謝
 Kita T et al, Biol Pharm Bull 2001 より引用

B. 研究方法

愛媛県下のA町住民を対象とした。このうち老人保健法に基づく一般住民健診を受診し、かつ本研究の趣旨に同意の得られた3164例を解析対象とした。対象者の一般臨床検査所見は健診時の検査値を利用した。

対象者のDNAは、末梢血より定法に則って抽出した。抽出したDNAは、DOP-PCR法により増幅してから分析に供した。解析したNAT2遺伝子多型を表1に示した。

表1 解析したNAT2遺伝子多型

Rs番号	置換		遺伝子型
	塩基	アミノ酸	
rs1799930	590GA	Arg197Gln	*6
rs1799931	857GA	Gly286Arg	*7
rs1041983	282CT	-	*13
rs1801280	341TC	Ile114Thr	*5

これらの多型の解析は、TaqManプローブ法で行った。rs1801280多型の解析に用いたプライマー/プローブの配列を以下に示す。

NAT2遺伝子rs1801280多型

Probe1 FAM- CGTCAGTGGTCACC -MGB
 Probe2 VIC- CCGTCAATGGTCACC -MGB
 Primer1 ACTGGCATGGTTCACCTTCTC
 Primer2 CCCAGCATCGACAATGTAATTCCT

上記以外のrs1799930, rs1799931, rs1041983多型については、アプライドバイオシステムズ社のAssay-on-demandにて既製のプライマー/プローブセットを購入して解析に供した(C_1204091_10, C_572770_10, C_8684085_10)。

(倫理面への配慮)

愛媛大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会において、研究課題名「生活習慣病と動脈硬化性疾患の発症要因の探索」として承認を得ている。対象者には、事前に十分な主旨説明の上、書面にて同意を得た。個人情報、所定の手続きに則って匿名化し管理している。これらはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守したものであり、本研究における倫理面への配慮は十分であると判断した。

C. 研究結果

解析した4つの遺伝子多型の頻度を表2に示した。このうちいずれの多型にも変異型をもたない野生型は43.6%、ヘテロ接合体(4*5, 4*6A, 4*6B, 4*7B)は44.7%、変異型のホモ接合体は11.6%であった(表3)。

表2 NAT2遺伝子多型の頻度

	野生型	ヘテロ	変異型
rs1799930	1884 (62.2)	1002 (33.1)	142 (4.7)
rs1799931	2386 (78.4)	613 (20.1)	45 (1.5)
rs1041983	1381 (45.4)	1341 (44.1)	322 (10.6)
rs1801280	2945 (97.6)	71 (2.4)	2 (0.1)

表3 NAT2遺伝子多型の頻度

遺伝子型	人数	頻度
野生型	4*4	1292 (43.6)
ヘテロ	4*5	47 (1.6)
	4*6A	828 (27.9)
	4*6B	1 (0.0)
	4*7B	452 (15.2)
変異型	5*5	2 (0.1)
	5*6A	10 (0.3)
	5*7B	12 (0.4)
	6A*6A	142 (4.8)
	6A*7B	135 (4.6)
	7A*7B	1 (0.0)
	7B*7B	43 (1.5)

性別のNAT2遺伝子多型頻度を表4に示した。変異型ホモ接合体の頻度は、男性で12.1%、女性で9.9%であり、男性で若干の高値を示したが有意差は認められなかった。

表4 NAT2 遺伝子多型の頻度 (男女別)

遺伝子型	男性		女性	
	人数	頻度	人数	頻度
4*4	521	(40.6)	690	(40.3)
4*5	23	(1.8)	23	(1.3)
4*6A	337	(26.2)	450	(26.3)
4*6B	0	(0.0)	1	(0.1)
4*7B	180	(14.0)	252	(14.7)
5*5	2	(0.2)	0	(0.0)
5*6A	8	(0.6)	2	(0.1)
5*7B	7	(0.5)	4	(0.2)
6A*6A	62	(4.8)	71	(4.1)
6A*7B	57	(4.4)	71	(4.1)
7A*7B	1	(0.1)	0	(0.0)
7B*7B	19	(1.5)	22	(1.3)
計	1284	(100.0)	1713	(133.4)

表5 NAT2 遺伝子多型の頻度 (50 歳未満)

遺伝子型	人数	頻度
野生型	4*4	260 (41.8)
ヘテロ	4*5	8 (1.3)
	4*6A	169 (27.2)
	4*6B	1 (0.2)
	4*7B	94 (15.1)
変異型	5*5	1 (0.2)
	5*6A	3 (0.5)
	5*7B	2 (0.3)
	6A*6A	21 (3.4)
	6A*7B	24 (3.9)
	7A*7B	0 (0.0)
	7B*7B	7 (1.1)
計	622	(100.0)

年齢階層別の NAT2 遺伝子多型頻度を表5～8 に示した。変異型ホモ接合体の頻度は、50 歳未満で 9.3%、50 歳代で 13.4%、60 歳代で 9.6%、70 歳以上で 10.9%であり、50 歳代で若干の高値を示したが有意差は認められなかった。

D. 考察

本研究結果から、日本人の約 11%に NAT2 遺伝子多型の変異型ホモ接合体が存在することが明

表6 NAT2 遺伝子多型の頻度 (50 歳代)

遺伝子型	人数	頻度
野生型	4*4	216 (38.3)
ヘテロ	4*5	18 (3.2)
	4*6A	137 (24.3)
	4*6B	0 (0.0)
	4*7B	77 (13.7)
変異型	5*5	0 (0.0)
	5*6A	3 (0.5)
	5*7B	4 (0.7)
	6A*6A	32 (5.7)
	6A*7B	28 (5.0)
	7A*7B	0 (0.0)
	7B*7B	9 (1.6)
計	564	(100.0)

表7 NAT2 遺伝子多型の頻度 (60 歳代)

遺伝子型	人数	頻度
野生型	4*4	346 (39.7)
ヘテロ	4*5	11 (1.3)
	4*6A	227 (26.0)
	4*6B	0 (0.0)
	4*7B	145 (16.6)
変異型	5*5	0 (0.0)
	5*6A	4 (0.5)
	5*7B	0 (0.0)
	6A*6A	38 (4.4)
	6A*7B	31 (3.6)
	7A*7B	0 (0.0)
	7B*7B	11 (1.3)
計	872	(100.0)

らかとなった。また、変異型の頻度は性別や年齢階層を問わず、ほぼ一定であることも示された。

NAT2 遺伝子多型は、イソニアジドなどの薬物代謝に強く影響することが知られている。特に変異型のホモ接合体ではアセチル化活性が著しく低く、薬物代謝が遅いため、副作用の発現が危惧される。このような遺伝子型が、日本人の約 10 人に 1 人の割合で認められたことは、今後の arylamine や hydrazine 系薬剤投与において、事前の遺伝子検査の必要性を示すものである。

表8 NAT2 遺伝子多型の頻度 (70 歳以上)

	遺伝子型	人数	頻度
野生型	4*4	389	(41.4)
	ヘテロ	9	(1.0)
	4*6A	254	(27.1)
	4*6B	0	(0.0)
	4*7B	116	(12.4)
変異型	5*5	1	(0.1)
	5*6A	0	(0.0)
	5*7B	5	(0.5)
	6A*6A	42	(4.5)
	6A*7B	45	(4.8)
	7A*7B	1	(0.1)
	7B*7B	14	(1.5)
計		939	(100.0)

一方、変異型のヘテロ接合体については、日本人において約 40%程度存在することが示された。既報によれば、ヘテロ型の代謝速度は野生型の 50%程度である。変異型のホモ接合体とあわせると、日本人の半数は NAT2 遺伝子多型に変異型をもつことになり、このことから、将来的には、薬物投与前の遺伝子検査が必要となるであろう。

本研究では、NAT2 遺伝子上の 4 つの多型についてのみ検討した。しかし NAT2 遺伝子には、さらにいくつかの亜型が存在している。今後、これら亜型について、頻度や酵素活性への影響を検討することが必要であろう。

E. 結論

arylamine や hydrazine 系薬剤の代謝に関わる NAT2 遺伝子において、代謝能の低い変異型が、日本人において性別や年齢階層を問わず 11%程度認められることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tamaki S, Nakamura Y, Tabara Y, Okamura T, Kita Y, Kadowaki T, Tsujita Y, Horie M, Miki T, Ueshima H. Combined analysis of polymorphisms in angiotensinogen and adducin genes and their effects on hypertension in a Japanese sample: The Shigaraki Study. *Hypertens Res.* 2005;28:645-50.
- Abe M, Wu Z, Yamamoto M, Jin JJ, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with hypertension through interaction with fasting plasma glucose in Japanese. *Hypertens Res.* 2005;28:215-21.
- Osawa H, Onuma H, Ochi M, Murakami A, Yamauchi J, Takasuka T, Tanabe F, Shimizu I, Kato K, Nishida W, Yamada K, Tabara Y, Yasukawa M, Fujii Y, Ohashi J, Miki T, Makino H. Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335:596-602.

2. 学会発表

The American Society of Hypertension 20th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, May14-18, 2005

- Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Nakura J, and Miki T. Genetic risk factors for arterial stiffness.
- Kohara K, Fujisawa M, Ando F, Tabara Y, Niino N, Miki T, Shimokata H Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms and Silent Cerebral Infarcts in a Large Japanese General Population.
- Tabara Y, Kohara K, and Miki T on behalf of the study group of Millennium Genome Project for hypertension. Hunting for hypertension genes: The National Millennium Project in Japan,
- Kohara K, Tabara Y, and Miki T. Systemic multiple candidate genes approach for identification of susceptible genes for hypertension in a Japanese population; on behalf of the study group of Millennium Genome Project for hypertension

The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting, Salt Lake City, USA, October 25-29

- Kondo I, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Yamaguchi F, Kuwajima K. NSD1 polymorphic DNA markers for microdeletion screening in patients with sotos syndrome.
- Miki T, Tabara Y, Nakura J, Kohara K. Genom-wide scan for hypertension: The National Millennium Project in Japan.

第 47 回日本老年医学会学術集会 平成 17 年 6 月 15 日
～17 日 東京

- Matric metalloproteinase 遺伝子多型と無症候性脳梗塞: NILS-LSA スタディ 永井勲久・小原克彦・藤沢道子・安藤富士子・田原康玄・三木哲郎・下方浩史
- 高血圧感受性遺伝子の解析: ミレニアム・ゲノム・プロジェクト 三木哲郎・小原克彦・名倉潤・田原康玄・ミレニアムゲノムプロジェクト高血圧部会
- 血管壁硬化を中間形質とした脈圧に関連する遺伝要因探索: J-SHIPP 研究 小原克彦・田原康玄・永井勲久・伊賀瀬道也・名倉潤・三木哲郎
- 加齢に伴う腎機能低下に関連する遺伝要因の探索: J-SHIPP 研究 小原克彦・田原康玄・永井勲久・伊賀瀬道也・名倉潤・三木哲郎
- 虚血性脳卒中と MTHFR 遺伝子多型との関連について 川本龍一・小原克彦・富田仁美・田原康玄・三木哲郎

第 12 回遺伝子診療学会大会 平成 17 年 8 月 松本

- 高血圧感受性遺伝子解析におけるデータマイニングの有用性 三木哲郎, 田原康玄, 名倉潤, 小原克彦

第 28 回日本高血圧学会総会 平成 17 年 9 月 旭川

- Angiotensinogen M235T 多型および α adducin G640W 多型と高血圧の関連～日本人住民での検討 中村保幸・田原康玄・三木哲郎・環 慎二・山本貴子・喜多義邦・岡村智教・上島弘嗣
- 2 万個のマイクロサテライトマーカーを用い、本態性高血圧の疾患感受性 (成因) 遺伝子同定を目指したゲノムワイド相関解析 谷津圭介・平和伸仁・小川桃子・志和忠志・相馬正義・羽田 明・中尾一和・上島弘嗣・萩原俊男・友池仁暢・田原康玄・三木哲郎・木村彰方・岡 晃・水木信久・猪子俊英・梅村 敏
- マルチプル候補遺伝子アプローチによる高血圧感受性遺伝子、感受性経路の探索～ミレニアム・ゲノム・プロジェクト 小原克彦・田原康玄・名倉潤・三木哲郎
- Follicle stimulating hormone (FSH) 受容体遺伝子 5' 非翻訳領域の一塩基多型は転写活性に影響し本態性高血圧症と関連する (ミレニアムゲノムプロジェクト) 中山智祥・黒井信宏・佐野守彦・田原康玄・勝谷友宏・萩原俊男・蒔田芳男・羽田明・山田美智子・高橋規郎・平和伸仁・梅村 敏・三木哲郎・相馬正義
- RGS2 遺伝子多型と 12 年間の家庭血圧変化の関連: 大迫研究 勝谷友宏・田原康玄・大久保孝義・菊谷昌浩・目時弘仁・戸恒和人・小原克彦・柴木宏美・三木哲郎・今井 潤・萩原俊男
- 高血圧候補遺伝子と脂肪蓄積および血圧の関連性 小川桃子・平和伸仁・遠藤晃彦・谷津圭介・田村功一・木原 実・戸谷義幸・安田 元・田原康玄・三木哲郎・徳永勝士・梅村 敏

59th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on Kidney in Cardiovascular Disease. September 21, 24, 2005. Washington, DC

- Tabara Y, Kohara K, Nakura J, Miki T, The study Group of Millennium Genome Project for Hypertension. Whole-genome Candidate Gene Association Study for the Development of Hypertension; The National Millennium Genome Project in Japan
- Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Igase M, Nakura J, Miki T. Candidate Gene Approach for Age-related Increase in Pulsere Pressure with an Employment of Arterial Stiffness as an Intermediate Phenotype: J-shipp Study
- Tabara Y, Kohara K, Kawamoto R, Osawa H, Nakura J, Makino H, Miki T. Association Between Adiponectin and C-reactive Protein in Community-based Large Scale Population

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	出版年	巻号	ページ
Tamaki S, Nakamura Y, Tabara Y, Okamura T, Kita Y, Kadowaki T, Tsujita Y, Horie M, Miki T, Ueshima H.	Combined analysis of polymorphisms in angiotensinogen and adducin genes and their effects on hypertension in a Japanese sample: The Shigaraki Study.	Hypertens Res.	2005	28	645-50
Abe M, Wu Z, Yamamoto M, Jin JJ, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J.	Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with hypertension through interaction with fasting plasma glucose in Japanese.	Hypertens Res.	2005	28	215-21
Osawa H, Onuma H, Ochi M, Murakami A, Yamauchi J, Takasuka T, Tanabe F, Shimizu I, Kato K, Nishida W, Yamada K, Tabara Y, Yasukawa M, Fujii Y, Ohashi J, Miki T, Makino H.	Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes.	Biochem Biophys Res Commun.	2005	335	596-602
Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M, Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T.	A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease.	Life Sci.	2005		
Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. 2005;238:53-7.	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease.	J Neurol Sci.	2005	238	53-7

研究成果の刊行物・別刷

Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease

Wangtao Zhong^a, Hidehisa D. Yamagata^{b,*}, Keiko Taguchi^a, Hiroyasu Akatsu^c,
Kouzun Kamino^d, Takayuki Yamamoto^e, Kenji Kosaka^e, Masatoshi Takeda^e,
Ikuko Kondo^b, Tetsuro Miki^a

^a Department of Geriatric Medicine, Ehime University School of Medicine, Ehime, Japan

^b Department of Medical Genetics, Ehime University School of Medicine, National University Corporation, Toon-shi, Ehime 791-0295, Japan

^c Chiji Medical Institute, Fukashimura Hospital, Toyohashi, Japan

^d Division of Psychiatry and Behavioral Pharmacology, Department of Post-Genomics and Diseases, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan

Received 1 March 2005; received in revised form 14 June 2005; accepted 18 June 2005

Available online 16 August 2005

Abstract

Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK) is a lymphoid-specific, Src family protein tyrosine kinase that is known to play a pivotal role in T-cell activation and interact with the T-cell coreceptors, CD4 and CD8. It has been shown to be significantly down-regulated in Alzheimer disease (AD) hippocampus compared with non-demented controls. Furthermore, it is located in a previously identified genetic linkage region (1p34-36) associated with AD. Therefore, we consider it to be a candidate gene for AD. We examined the relationship between AD and the LCK and apolipoprotein E (APOE) genes in 376 AD (including 323 late-onset AD (LOAD) cases and 53 early-onset AD (EOAD) cases) and 378 non-demented controls using a single nucleotide polymorphism (SNP). The polymorphism in exon 1 (+6424 A/G) was significantly associated with AD risk. The odds ratio (OR) for total AD associated with the GG genotype was 1.41 (95% CI = 1.06–1.87) and that for LOAD was 1.37 (95% CI = 1.02–1.85), while that for APOE-ε4 was 5.06 (95% CI = 3.60–7.12). In the APOE-ε4 non-carrier subgroup, the GG genotype also showed significant association (OR = 1.66; 95% CI = 1.16–2.38). These results indicate that the LCK is a novel risk gene for AD regardless of the APOE genotype.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer disease; Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK); Polymorphism; Association study; APOε; Risk factor

1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by multiple cognitive deficits and progressive memory impairment in mid- to late-life. Both genetic and environmental factors have been implicated in the development of AD, but it is still unclear how these factors combine and ultimately lead to the neurodegenerative process [1–3]. A number of chemokines, as well as their related receptors, have been shown to be up-

* Corresponding author. Tel.: +81 89 960 5278; fax: +81 89 960 5279.
E-mail address: hideyama@sm.ehime-u.ac.jp (H.D. Yamagata).

patients compared with non-demented controls [13]. Furthermore, human LCK is located in a previously identified genetic linkage region (1p34-36) associated with AD [14]. It has 13 exons distributed across 35 kb of genomic DNA. Its expression is driven by two promoters (distal and proximal) that are active at different stages of development [15]. All of these data suggest that LCK contributes to the pathogenesis of AD. To date, the potential roles for LCK have been reported in T-cell leukemia, colon cancer, type 1 diabetes, systemic lupus erythematosus, relapsing-remitting multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis [16–23]. However, there are no reports regarding the association of LCK gene polymorphism with AD. In this study, we investigated whether LCK gene polymorphism could contribute to the risk of sporadic AD.

2. Subjects and methods

The Ethics Committee of Ehime University School of Medicine approved the study protocol. Patients were selected using NINCDS-ADRDA criteria for definite or probable AD, and non-demented controls were rigorously evaluated for cognitive impairment using the Mini-Mental State Examination (MMSE) [24,25]. Brain and blood samples were obtained with informed consent from the patients (or their guardians) in the Chubu, Kansai and Ehime areas of Japan [26,27]. A total of 376 unrelated AD patients had been diagnosed previously, and 376 controls (outpatients or healthy volunteers) were selected and matched for age and place of residence for each patient. The mean age ± SD (years) at the time of this study was 78.2 ± 8.3 for late-onset AD and 75.5 ± 4.9 for controls. Genomic DNA was extracted from the brain or peripheral blood using the phenol-chloroform method [28].

During screening for LCK gene mutation and polymorphism, we detected a common single nucleotide polymorphism (SNP) of +6424 A/G (CT) (rsCV1895446) in the intron 1 region (minor allele frequency: 0.34). It was consistent with the SNP database, NCBI build 34 Genome (Caucasian 0.14, African-American 0.01, Japanese 0.33, and Chinese 0.30). Genotyping of SNPs was performed using the TaqMan-PCR method. The primers and probes

were obtained by ABI assay-on-demand C_1895446_10. Amplification was performed according to the manufacturer's protocol. The fluorescent intensity of the PCR products was measured using an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The person who assessed the genotype was blinded to the clinical data of the subjects from whom the samples originated. To investigate the contribution of the gene to sporadic LOAD, we compared allele frequencies between LOAD and control subjects. Because APOE-ε4 is a risk factor for AD, we stratified the population by ε4 carrier status. APOE genotyping was performed as described previously [26]. Allelic and genotype distribution were analyzed by the usual Chi-squared test of association. The genotypic frequencies were compared by Chi-squared test with the values predicted under the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium in the sample. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Odds ratios were calculated with two-tailed p values and 95% confidence intervals. The relation of genotypic factors and the effect of APOE-ε4 on AD were assessed by logistic regression analysis. Statistical analyses were performed with SPSS software version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

Table 1 shows the distribution of the three genotypes (GG, GA, AA). The distribution obtained for the patients and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium. The GG genotype was found in 53% of the 376 total AD patients (57% of early-onset AD (EOAD) and 52% of late-onset AD (LOAD)) and 44% of the 378 control subjects. A significant association was observed between the +6424 A/G polymorphism and total AD ($p < 0.02$), and LOAD ($p < 0.05$). The odds ratio (OR) for AD associated with the GG genotype was 1.41 (95% CI = 1.06–1.87; Table 2) and that for LOAD was 1.37 (95% CI = 1.02–1.85). Stratifying AD patients by sex, no statistically significant differences in allele distribution were observed (data not shown). As expected, APOE-ε4 conferred an increased risk for AD (OR = 5.06; 95% CI: 3.60–7.12; Table 2). After the logistic regression analysis, a co-dominant model (ε4 dose-effect)

Table 1
Genotype and allele numbers and frequencies for G/A polymorphism in LCK

Group	Genotype (frequency)			Allele (frequency)	
	GG	GA	AA	AA-GA	A
Control (378)	167 (0.44)	168 (0.44)	43 (0.12)	211 (0.56)	502 (0.66)
Total AD (376)	198 (0.53)	138 (0.37)	40 (0.10)	178 (0.47)**	534 (0.71)
EOAD (53)	30 (0.57)	15 (0.28)	8 (0.15)	23 (0.43)	75 (0.71)
LOAD (323)	168 (0.52)	123 (0.38)	32 (0.10)	155 (0.48)*	459 (0.71)

EOAD: early-onset AD; LOAD: late-onset AD.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.02$.