

- 2 Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 2002; **35**:1001–1015.
- 3 Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* 2000; **13**:31S–38S.
- 4 Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**:5192–5196.
- 5 Orr AW, Murphy-Ullrich JE. Regulation of endothelial cell function BY FAK and PYK2. *Front Biosci* 2004; **9**:1254–1266.
- 6 Avraham H, Park SY, Schinkmann K, Avraham S. RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 2000; **12**:123–133.
- 7 Inagami T, Eguchi S. Angiotensin II-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling. *Braz J Med Biol Res* 2000; **33**:619–624.
- 8 Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; **71**:435–478.
- 9 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.
- 10 Kokubo Y, Inamoto N, Tomoike H, Kamide K, Takiuchi S, Kawano Y, *et al.* Association of genetic polymorphisms of sodium-calcium exchanger 1 gene, NCX1, with hypertension in a Japanese general population. *Hypertens Res* 2004; **27**:697–702.
- 11 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.
- 12 Matayoshi T, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Miwa Y, Takami Y, *et al.* The thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter gene, C17B4T, and adrenergic receptor-beta3 gene, T727C, may be gene polymorphisms susceptible to the antihypertensive effect of thiazide diuretics. *Hypertens Res* 2004; **27**:821–833.
- 13 Tanaka C, Kamide K, Takiuchi S, Miwa Y, Yoshii M, Kawano Y, *et al.* An alternative fast and convenient genotyping method for the screening of angiotensin converting enzyme gene polymorphisms. *Hypertens Res* 2003; **26**:301–306.
- 14 Kokubo Y, Kamide K, Inamoto N, Tanaka C, Banno M, Takiuchi S, *et al.* Identification of 108 SNPs in TSC, WNK1, and WNK4 and their association with hypertension in a Japanese general population. *J Hum Genet* 2004; **49**:507–515.
- 15 The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; **426**:789–796.
- 16 Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; **21**:263–265.
- 17 Taniyama Y, Weber DS, Rocic P, Hilenski L, Akers ML, Park J, *et al.* Pyk2- and Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK1 regulates focal adhesions. *Mol Cell Biol* 2003; **23**:8019–8029.
- 18 Daou GB, Srivastava AK. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biol Med* 2004; **37**:208–215.
- 19 Kodama H, Fukuda K, Takahashi T, Sano M, Kato T, Tahara S, *et al.* Role of EGF receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002; **34**:139–150.
- 20 Wang D, Yu X, Brecher P. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced activation of the calcium-sensitive tyrosine kinase proline-rich tyrosine kinase 2 without affecting epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 1999; **274**:24342–24348.
- 21 Blaschke F, Stawowy P, Kappert K, Goetze S, Kintscher U, Wollert-Wulf B, *et al.* Angiotensin II-augmented migration of VSMCs towards PDGF-BB involves Pyk2 and ERK 1/2 activation. *Basic Res Cardiol* 2002; **97**:334–342.
- 22 Rocic P, Jo H, Lucchesi PA. A role for PYK2 in ANG II-dependent regulation of the PHAS-1-eIF4E complex by multiple signaling cascades in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; **285**:C1437–C1444.
- 23 Owens GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1989; **257**:H1755–H1765.
- 24 Rosendorff C. Vascular hypertrophy in hypertension: role of the renin-angiotensin system. *Mt Sinai J Med* 1998; **65**:108–117.
- 25 Berk BC, Vallega G, Muslin AJ, Gordon HM, Canessa M, Alexander RW. Spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells in culture exhibit increased growth and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J Clin Invest* 1989; **83**:822–829.
- 26 Rocic P, Griffin TM, McRae CN, Lucchesi PA. Altered PYK2 phosphorylation by ANG II in hypertensive vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **282**:H457–H465.
- 27 Herzog H, Nicholl J, Hort YJ, Sutherland GR, Shine J. Molecular cloning and assignment of FAK2, a novel human focal adhesion kinase, to 8p11.2-p22 by nonisotopic in situ hybridization. *Genomics* 1996; **32**:484–486.
- 28 Diz DI. Approaches to establishing angiotensin II as a neurotransmitter revisited. *Hypertension* 2006; **47**:334–336.
- 29 Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001; **37**:1199–1208.
- 30 Dantas AP, Franco Mdo C, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, *et al.* Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovasc Res* 2004; **61**:22–29.
- 31 Tatchum-Talom R, Eyster KM, Martin DS. Sexual dimorphism in angiotensin II-induced hypertension and vascular alterations. *Can J Physiol Pharmacol* 2005; **83**:413–422.
- 32 Xue B, Pamidimukkala J, Hay M. Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **288**:H2177–H2184.
- 33 Sainz J, Osuna A, Wangenstein R, de Dios Luna J, Rodríguez-Gómez I, Duarte J, *et al.* Role of sex, gonadectomy and sex hormones in the development of nitric oxide inhibition-induced hypertension. *Exp Physiol* 2004; **89**:155–162.
- 34 Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fernandes L, Fior-Chadi DR, Akamine EH, Carvalho MH, *et al.* A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2004; **62**:587–593.
- 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**: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 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.

総説

高血圧個別化診療に向けた臨床介入試験とゲノム解析の現況と展望

<sup>1</sup>神出 計, <sup>2</sup>宮田 敏行, <sup>1</sup>河野 雄平

国立循環器病センター <sup>1</sup>内科高血圧腎臓部門, <sup>2</sup>研究所

緒言

高血圧症の9割以上は本態性高血圧 (EHT) であり、我が国で3,000万人以上罹患者がいると考えられているように、EHTは最も頻度の高い生活習慣病である。さらに多くのEHT患者は家族歴を有し、遺伝の血圧の変化に対する寄与率は30-50%あると推定されている<sup>1)</sup>。したがって高血圧の原因遺伝子を同定することがもたらすインパクトは計り知れないものがあると考えられる。しかしながら多因子疾患であるEHTには原因遺伝子が複数個存在する可能性が示唆されており<sup>2)</sup>、現在報告されているものの多くは高血圧関連遺伝子多型である。特に一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs) はタイピングの容易さから、高速タイピングに適しており、近年、多数の検体を用いた解析に頻用されている。ポストゲノムの今、SNPsを解析することによって高血圧の発症を予測し、治療薬の選択を行う個別化医療 (Individualized Medicine) の確立に期待がかけられている。我が国でも2000年より5年計画で開始された癌、高血圧、糖尿病、痴呆、喘息に対する個別化医療の確立とゲノム創薬を目標に掲げた遺伝子解析計画、ミレニアム・ゲノムプロジェクト (MGP) が2005年3月末に予定期間を終了した<sup>3)</sup>。現段階でゲノム情報を基にした個別化医療が確立された疾患はないが、MGPによりその基盤は整備され、得られた膨大なゲノム情報はここ数年のうちに臨床の現場に応用されていくことは間違いないと考えられる。本総説は、国立循環器病センターにおいて行われたMGPの一端である我々の部門での高血圧関連遺伝子に対するSNPs解析を紹介し、最近の高血圧遺伝子解析研究の現況と高血圧の個別化医療の確立のための臨床

介入試験をテーマに概説する。

高血圧原因遺伝子

高血圧への遺伝素因の関与は多岐にわたる。EHTの病態の根幹を成すレニン・アンジオテンシン系 (RAS) や交感神経系 (SNS) の活性化、食塩感受性やインスリン抵抗性の形成など、すべての機序に遺伝因子は関与すると考えられる<sup>3)</sup> (図1)。これまで数多く行われて来た候補遺伝子アプローチによる高血圧原因遺伝子同定の試みは、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) I/D多型に代表されるように<sup>4)</sup>、RASやSNSの受容体や酵素の遺伝子をターゲットにして、ケース・コントロールを用いた解析が主流となってきた。一方で、欧米では大規模な高血圧の患者家系を用いた連鎖解析、ならびに高血圧の兄弟・姉妹を集めて解析する同胞対解析が数多く行われてきたが一定の結果が得られていない。しかしながら複数の報告をまとめると高血圧に関連を示した遺伝子座には報告の重なりが認められる<sup>5)</sup>。特に染色体2番短腕 (2p) は、6つの異なった国や地域の集団から得られた解析で高血圧遺伝子座とされている。さらにこの染色体2pの領域

高血圧における遺伝因子の影響

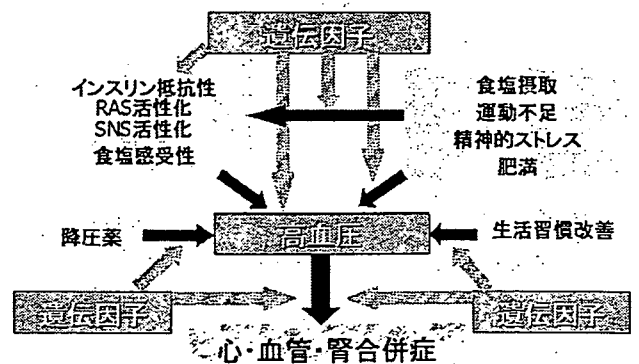


図1

\* 1) 国立循環器病センター 内科高血圧腎臓部門  
 2) 国立循環器病センター 研究所  
 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1)

はイタリア、サルディニア地方の高血圧家系の連鎖解析で26.5-27.1cMと非常に狭い領域にピークがあることが報告され<sup>6)</sup>、また我々日本人に遺伝的バックグラウンドが似ているとされる中国からも同部位を含む2番に高血圧遺伝子座があると報告されている<sup>7)</sup>。したがってこの領域に存在する遺伝子が日本人EHTに関連する可能性が考えられる。我々はこの領域に注目し、高血圧原因遺伝子の同定を試みた<sup>8)</sup>。イタリア、サルディニアからの報告でピークを示したマイクロサテライトマーカー(D2S2278-D2S168)の近傍に存在し、高血圧との関連が示唆される遺伝子を候補に挙げ、それぞれの遺伝子のSNPsを、日本人を対象としたSNP情報の公開データベースであるJSNP (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)より両アレル頻度10%以上のSNPsを選別し(図2)、計14遺伝子、47SNPsに対して1,880人の地域住民のタイピングをTaqMan法にて行った。その結果、血圧値ならびに高血圧の頻度いずれにも有意な関与を認めた遺伝子はHPCAL1 (Hippocalcin-like-1)とGREB1 (Gene regulated by estrogen in breast cancer)に存在する計3つのSNPsであった<sup>8)</sup>。これらの遺伝子が血圧調節に関与する機序は現段階では不明であるが、日本人高血圧感受性遺伝子と考えている。

候補遺伝子アプローチにおいては、腎臓での水・電解質代謝に関わる遺伝子がEHTの重要なターゲットと考えられる。事実、メンデル型遺伝を示す稀な遺伝性高血圧疾患であるLiddle症候群では上皮型ナトリウム・チャンネル遺伝子が原因と考えられ、この遺伝子のLiddle症候群原因変異以外のより頻度の多い多型がEHTと関連

することも報告されている<sup>9)</sup>。最近、Liftonのグループは高血圧、高カリウム血症、代謝性アシドーシスを呈する常染色体優性遺伝疾患のGordon症候群の原因遺伝子が、腎臓の遠位尿細管に発現し電解質調節に関与するWNK1, WNK4 遺伝子であることを報告した<sup>10)</sup>。我々はこれらの遺伝子多型とEHTとの関連を検討した<sup>11)</sup>。両遺伝子にダイレクト・シーケンスを行うことによりWNK1に35 SNPs, WNK4に21 SNPsを見出した。この中から頻度、LDを考慮しWNK1 7 SNPs, WNK4 2 SNPsを一般住民1,818名に対してタイピングを施行した。結果は男性のみでWNK4 C14717T (イントロン14)のCC型 (n=670) 保有者の平均収縮期血圧131.3mmHgに比し、Tアレル型 (n=165) では134.4mmHgと有意に高く (p=0.042)、また高血圧患者もTアレル保有者で有意に高頻度に認めた (OR; 1.62, 95% CI; 1.12-2.33, p=0.010)。この結果よりWNK4は高血圧原因遺伝子の一つと考えられる。さらに我々はGordon症候群の原因多型が存在するWNK4 遺伝子のエクソン7と17につき956名の高血圧患者でシーケンスを行い、3つの新規なミスセンスSNPs (Met546Val, Pro556Thr, Pro1173Thr)を見出した<sup>12)</sup>。これらは頻度が0.1%程度と少なかったが、1,875名の一般住民にこれらの多型は存在しなかったことから高血圧発症に関与している可能性があり、機能の解析が重要と考えている。このような低頻度のSNPsの集積がEHTの発生に関わっている可能性も否定できず、我々は積極的にミスセンス変異に関する情報を集積している<sup>13)</sup>。さらに候補遺伝子アプローチのターゲットとして、種々の血圧調節に関わるホルモンや血管作動性物質

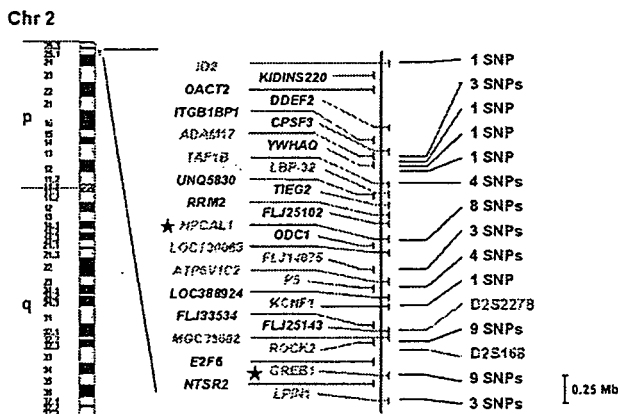


図2. 選択されたSNPsと有意差を示した遺伝子

イタリア、サルディニアの家系解析で最も強いピークを示したD2S2278-D2S168近傍から高血圧関連の遺伝子を選別し、遺伝子型を検討した。ピンクがタイピングした遺伝子。この中で星印のHPCAL1 1 SNP (JST126186-A/C 女性)とGREB1の2 SNPs (JST116268-C/T, JST149390-A/Gいずれも男性)が高血圧の頻度、血圧値両方で有意な関連を示した。

表1. 高血圧患者ならびに一般市民におけるRGS2 遺伝子ミスセンス多型、フレームシフト変換を有する人のまとめ

Mutations	高血圧患者集団 (n=953)	一般住民	
		高血圧 (n=771)	正常血圧 (n=1,102)
Gln2Leu	2	0	0
Gln2Arg	1	2	1
Met5Val	1	0	0
Arg44His	2	4	1
Gln78His	1	0	2
1925-1926insT	1	1	0
計	8	7	4

高血圧を有する人に明らかにRGS2 遺伝子ミスセンス多型、フレームシフト変換は多く認められた。

の共通の細胞内情報伝達経路に存在するリン酸化蛋白や酵素などが挙げられる。そこでG蛋白結合受容体(GPCR)に結合するホルモンやペプチドにはアンジオテンシンIIやエンドセリン1など代表的な昇圧ペプチドが多いため、GPCRの情報伝達系構成因子や調節因子に注目した。Regulators of G protein signaling (RGS) 蛋白は、G蛋白がGDP型からGTP型となり活性化したものを不活性化型-GDP型に加水分解により戻す働きをする蛋白であり、Heximerらはこの蛋白に注目し、その遺伝子 (rgs2) のノックアウトマウスを作製し、血圧調節の異常を検討したところ<sup>14)</sup>、このマウスはホモ接合対 (rgs2 -/-) のみならずヘテロ接合対 (rgs2 +/-) でもホモと同等の血圧上昇を示した。この結果より、RGS2遺伝子はヒトにも存在するため、RGS2遺伝子の調節異常がヒトEHTの原因である可能性があり、その遺伝子多型と高血圧の関連性を調べた<sup>15)</sup>。953人の高血圧患者のrgs2をプロモーターから全コーディング領域をダイレクト・シーケンスしたところ5つのミスセンス変異 (Gln2Leu, Gln2Arg, Met5Val, Arg44His, Gln78His) ならびに1つのフレームシフト変換 (1925-1926 insT) をおこすSNPがおのおの変異で1-2人見つかった。1,873人の一般住民にもこれらの変異は認められ、まとめると表1のように、高血圧患者で明らかにこれらの機能変化に関わると考えられるSNPsが多く認められた<sup>15)</sup>。またイントロン1 (1026T>C) と3 (1891-1892 delTC) の両アレル頻度が約60%/40%と頻度の高いSNPsも女性の高血圧に関与したことから、RGS2遺伝子は高血圧原因遺伝子であると考えられ現在機能解析を進めている。これらの高血圧原因遺伝子多型の同定はこれまで断面調査で調べられて来た。今後は機能解析による裏付けに加えて、疫学的な前向き観察研究にて、多くの人を高血圧のない時期から調査することにより、高血圧原因遺伝子多型を有する人がそれを保有しない人と比較して血圧上昇を来しやすいか、高血圧に罹患した場合、その程度がどうかといった検討をすることにより再評価されていく必要があると考えている。

高血圧性臓器障害関連遺伝子

我々は高血圧性臓器障害の進行に関与する遺伝子多型を明らかにするために、高血圧患者ならびに検診受診中の一般住民を対象に動脈硬化、心肥大、腎障害の感受性遺伝子の検索を進めている。なぜなら高血圧患者の予後を左右するのは心血管腎の合併症であり、遺伝子情報を用いた個別化診療の実現には遺伝子多型から合併症の進展が予測できれば、より厳格な降圧を行ったり、それぞれの臓器障害に有効とされる薬剤を早期から服薬させる

ことにより発症を予防することが可能となると考えられるからである。

我々は高血圧性動脈硬化の表現形として頸動脈エコーによって得られる内中膜厚 (Intima-Media Thickening: IMT) を用い、動脈硬化促進に関わる遺伝子多型を検索してきた。これまでに高血圧患者約800人における頸動脈硬化の進行にリボカリンタイプ-プロスタグランジンD合成酵素 (L-PDGS) 遺伝子3'非翻訳領域に存在する4111 A>Cが関与することを報告した<sup>16)</sup>。さらに、多くの臨床・基礎研究により動脈硬化との因果関係が指摘されていた肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF)<sup>17)</sup> やIL-6 (interleukin-6)<sup>18)</sup>、Clusterin<sup>19)</sup>、の遺伝子多型がやはり、頸動脈硬化に関与することを高血圧患者ならびに一般住民対象の解析で報告している。IL-6遺伝子のプロモーター領域-636 G>Cにおいては表2に示すように、女性のみではあるがGG群で最もIMT肥厚を認め、なおかつこの群で収縮期血圧がCアレル (CC+GC) 群に比し有意に高かった (表2)。この結果より、IL-6遺伝子プロモーター領域の多型は動脈硬化形成に関与し、動脈硬化を介し収縮期血圧上昇を引き起こす可能性が示唆される<sup>18)</sup>。これまでに我々は高血圧性心肥大に関与する遺伝子多型として1型インスリン様成長因子受容体 (IGF-1R) 遺伝子、高血圧性腎障害にはACE、ミネラルコルチコイド受容体 (MLR)、スーパーオキシドジスムターゼ3 (SOD3)、エンドセリン変換酵素1 (ECE1)、ナトリウム利尿ペプチド受容体1 (NPR1) 遺伝子、また動脈硬化には前述の4遺伝子以外にマトリックス・メタロプロテアーゼ2 (MMP2) 遺伝子<sup>20)</sup>の多型が関連することを見出している。既報の高血圧臓器障害関連遺伝子多型と合わせてこれらの多型を調べることが高血圧患者の臓器障害進展を予測するツールになり得ると考えており、個別化医療への応用の

表2. IL-6 遺伝子SNPと血圧値、総頸動脈内中膜肥厚との関連 (交絡因子補正後)

SNP	男性			女性					
	GG	GC+CC	p	GG	GC+CC	p			
-636G>C	DBP, mmHg	80.5±1.1	81.0±0.3	0.656	80.4±1.1	78.8±0.3	0.160		
	SBP, mmHg	127.9±1.8	129.3±0.5	0.461	133.3±2.0	128.4±0.5	0.017		
	DBP, mmHg	81.1±0.5	80.9±0.4	0.656	78.6±0.4	79.1±0.4	0.383		
	SBP, mmHg	129.7±0.8	128.8±0.7	0.363	128.7±0.8	128.8±0.7	0.935		
-636G>C	DBP, mmHg	81.1±0.5	80.9±0.4	0.656	78.6±0.4	79.1±0.4	0.383		
	SBP, mmHg	129.7±0.8	128.8±0.7	0.363	128.7±0.8	128.8±0.7	0.935		
	mean IMT, mm	0.91±0.01	0.91±0.01	0.90±0.00	0.288	0.89±0.01	0.86±0.00	0.85±0.00	0.005
	Max-IMT, mm	1.70±0.08	1.78±0.04	1.70±0.03	0.357	1.47±0.06	1.36±0.02	1.33±0.02	0.025

値は平均±標準偏差。年齢、BMI、高脂血症、糖尿病、喫煙、飲酒、降圧薬服用の有無にて補正。

可能性を検討中である。実際に、これら合併症関連遺伝子多型を複数有する高血圧患者では高血圧性臓器障害の進行が予想されるため、約1,000名の高血圧患者の中において心肥大関連遺伝子IGF-1 R C-328T, A275124Cと、動脈硬化MMP2 A26223C, 腎障害5多型(ACE I/D, MLR C850G, SOD3 C-1708T, ECE1 T65251C, NPR1 G2979C)の3つを有する患者の心血管合併症の罹患率を検討したところ、少なくとも1/3に心筋梗塞や脳卒中、解離性大動脈瘤などのメジャーな心血管合併症の発症が認められた(表3)。このような合併症関連遺伝子多型の重なりを調べることにより、高血圧性臓器障害が特に進行しやすい患者の選別が可能となると考えている。今後は高血圧原因遺伝子のところで述べたように、このような断面研究で得られた遺伝子多型が真に高血圧性臓器障害に関わるかを、多型を有する患者を前向きに経過観察し検証する研究が必要である。このような前向き試験でも断面研究と同様の結果が得られれば、これらの遺伝子多型は高血圧合併症関連遺伝子として、遺伝子診断により合併症の進展しやすい患者が予測可能となり、個別化医療への応用が期待できる。

Pharmacogenomicsによる薬剤感受性遺伝子多型の同定

これまでの成果：薬剤反応性の個人差には人種差のような集団として影響を及ぼす因子と各個人の遺伝素因がもたらす因子により20-95%は規定され、これに年齢や薬物代謝に関わる臓器の機能、併用薬剤や治療、病気の程度など非遺伝因子が加わると考えられている。冒頭に述べたように高血圧は最も頻度の多い生活習慣病で降圧薬服用者は高血圧治療患者の半数以上を占める。したがって遺伝的に規定されている降圧薬に対する感受性を

薬剤選択の際に考慮できれば、効率の良い降圧薬治療を実現することが可能となる。こういった観点から近年、降圧薬感受性遺伝子多型を明らかにする試みがなされて来た。しかしながらほとんどの研究がRASやSNSの酵素や受容体の1つから数個の多型の関与を調べた検討のみで結果は非常にコントロールが難しいであった。特にACE遺伝子I/D多型のACE阻害薬(ACEI)やアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)、β遮断薬の効果への関与はさまざまな人種で検討されているが、ACE遺伝子I/D多型に関してはポジティブ・ネガティブ両方とも多くの報告があり、ポジティブでもIAレル、Dアレルの両方に薬剤感受性を認める報告がなされており、多型研究の難しさを表している<sup>21)</sup>。我々も従来から多く見られたレトロスペクティブな検討ではあるが、多数の候補遺伝子を解析する方法でサイアザイド利尿薬(TZD)の降圧効果に関わるSNPsを調べたので紹介する。TZDは米国ガイドラインJNC7で最優先で使用すべき薬剤として推奨されているが、その効果には個人差が認められる。TZDの効果に関与する遺伝子変異は、現在までのところG蛋白・3サブユニット遺伝子(GNB3)のC825T多型<sup>22)</sup>と・-Adducin遺伝子(ADD1)のGly460Trp多型<sup>23)</sup>の2つが知られている。これらの成績はすべて欧米からのもので、日本人である程度大規模なTZDの効果に関連する遺伝子変異・多型の報告はなされていなかった。我々は、76人の新規TZD服用患者の降圧効果から感受性遺伝子多型の同定を試みた<sup>24)</sup>。平均血圧で5 mmHg以上の降圧を認めた群を反応群と定義し、遺伝子多型はGNB3 C825T, ADD1 Gly460Trp, RASやSNS関連遺伝子に加え、サイアザイド感受性Na-Cl共輸送体遺伝子(TSC)、サイアザイド利尿薬感受性のGordon症候群の原因遺伝

表3. 高血圧合併症関連遺伝子多型の重なりを有する高血圧患者の心血管合併症の発生状況

Case	Age	心肥大		動脈硬化	腎障害	心血管合併症
		IGF1R C-328T	IGF1R A275124C	MMP2 A26223C	SNPs	
1	56	CC	AA	CC	ACE I/D DD	Stroke 3/3
2	67	CC	AA	CC	DD	AMI
3	77	CC	AA	CC	DD	AMI
4	76	CC	AA	CC	MLR C850G CC	Stroke 1/2
5	56	CC	AA	CC	CC	なし
6	86	CC	AA	CC	SOD3 C-1708T CT	労作性狭心症 1/2
7	58	CC	AA	CC	CT	なし
8	56	CC	AA	CC	ECE1 T65251C GG	Stroke 2/2
9	60	CC	AA	CC	GG	Stroke
					NPR1 G2979C GG	Stroke 1/3
10	71	CC	AA	CC	GC	解離性大動脈瘤
11	69	CC	AA	CC	GC	なし
12	60	CC	AA	CC	GC	なし

高血圧合併症関連遺伝子多型を複数有する高血圧患者ではメジャーな心血管合併症が1/3以上の頻度で認められた。

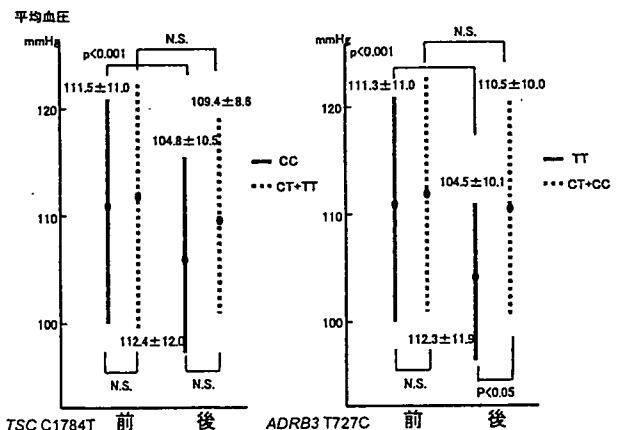


図3. サイアザイド利尿薬感受性遺伝子多型 TSC C1784TではCC型の患者でサイアザイド利尿薬投与により有意に降圧するが、Tアレル保有者では有意な降圧が得られていない。ADRB3 T727CではTT保有者がサイアザイド利尿薬に感受性を持つ。

子である *WNK1*, *WNK4*, ミネラルコルチコイド受容体遺伝子 (MLR) などをダイレクト・シーケンシングにより同定したSNPs, 合計17遺伝子, 48多型をタイピングした。その結果, TSC C1784TとADRB3 T727C (Trp64Arg) の2 SNPsが有意な関連性を示した (図3)。しかしながら前述したGNB3 C825T, ADD2 Gly460Trpでは有意な相関を認めなかった。

SILVHIA研究:スウェーデン・ウプサラ大学の研究グループはARB (Irbesartan) の降圧ならびに心肥大抑制効果に対する遺伝子多型の関与をSILVHIA (Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol) 研究として势力的に検討している<sup>25)</sup>。この研究ではIrbesartanとatenololをそれぞれ50名程度の高血圧患者に12週間, 単剤投与するといったプロトコールで, それぞれの薬剤の降圧効果, 心肥大退縮作用を検討したものである。Irbesartanは軽・中等症高血圧患者の40-50%で有効な降圧効果を持つ薬とされているが, ACE遺伝子I/D多型のII型を示す患者の89%に拡張期血圧 (DBP) で10mmHg以上の降圧を認めた。一方, DD型では24%しかDBP>10mmHg以上の降圧を示した患者はいなかった<sup>26)</sup>。同様にアルドステロン合成酵素 (aldosterone synthase) 遺伝子 C-344TもIrbesartanの降圧効果に有意な関連性を示していた<sup>27)</sup>。他のRAS関連の遺伝子多型では降圧効果に有意性を認めたものはなかったが, angiotensinogen遺伝子T174M, M235Tならびにアンジオテンシンtype1受容体 (AT1R) 遺伝子A1166C多型はIrbesartanの心肥大退縮作用に有意性を認めた<sup>28)</sup>。またこの研究グループはマイクロアレイを用いた独自のタイピング法 (Microarray based DNA polymerase assisted

minisequencing single nucleotide primer extension assay with fluorescence detection)を開発し, SILVHIA研究においてIrbesartanの降圧効果<sup>29)</sup> や心肥大退縮作用<sup>30)</sup> に関与するSNPsをRASやSNS, 血管作動性物質, 脂質代謝などに関わる25遺伝子, 74SNPsで検討して複数の薬剤感受性遺伝子多型を同定している。今後, Pharmacogenomicsによる個別化医療の実現に向けてこのような迅速に多数の遺伝子多型をタイピングする方法の開発が望まれていただけに, このマイクロアレイを用いたタイピング方法は今後急速に発展していくことが予測される。

GEANE研究:降圧薬には抗癌剤のような重篤な副作用はほとんど認められないため, Pharmacogenomicsは, 降圧薬の効果, つまり薬剤応答性の予測のために応用される必要がある。ここまで述べてきたように残念ながら各降圧薬でその効果にはっきりと関連性をもった遺伝子変異・多型の報告はまだ少なく<sup>31)</sup>, 今後のさらなる研究成果が待たれるところである。より関連性の強い薬剤応答性・感受性遺伝子の同定ためには, 多数例の無治療高血圧患者に前向きに降圧薬を投与し, 正確に降圧の程度を把握し, 数多くの薬物代謝酵素や薬理作用機序関連の遺伝子多型との相関を検討する必要がある。これまで我が国にこのような研究はなかったが, 現在, 国立循環器病センターでは全国の大学・医療センター計8施設とともに降圧薬感受性遺伝子多型同定のための多施設共同研究 (GEANE研究 - Gene Evaluation for ANti-hypertensive drug Effect)を開始した。GEANE研究では, 無投薬の軽・中等症本態性高血圧患者にTZD, ARB, 長時間作用型ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬 (CCB) を3ヵ月ごとに少量から通常使用量に増量して内服してもらい観察期も含め合計10ヵ月間で投薬を終了するデザインで施行中である (図4)。降圧効果のみならず副作用や代謝性の異常も解析予定で複数のSNPsを検討し, 降圧薬として特に重要と考えられる3種類の薬剤の感受性遺伝子多型ならびに副作用関連遺伝子多型を検討する予定である。本研究は1) 同一患者に3種類の降圧薬をクロスオーバーに内服させるため, その個人の正確な薬剤反応性が評価できる。2) 多施設共同で行うことにより, 従来の研究より多くの対象者での解析が期待できる。3) 迅速遺伝子タイピング法を用いて複数の遺伝子多型の解析が可能である, といった特徴を有しているため, これにより同定された遺伝子多型を実際の臨床に応用し, 個別化医療を確立することを構想している。

インフォームド・コンセント (軽・中等症の未治療高血圧患者を対象とする)

- ↓ 血圧測定, 採血(一般生化学-特に血清K, 脂質値, 尿酸値, 血糖値, 遺伝子採血)
- ↓ 観察期(1ヶ月) 投薬順ランダムマイゼーション(以下1.TZD, 2.CCB, 3.ARBの場合)
- 第1薬投薬(3ヶ月:1回/月受診)
- ↓ サイアザイド系利尿薬(インダパミド1mgより開始)
- ↓ Dose up (インダパミド2mgに増量)
- ↓ (インダパミド2mgを継続, 採血(一般生化学))
- 第2薬投薬(3ヶ月:1回/月受診)
- ↓ Ca拮抗薬(アムロジピン2.5mgより開始)
- ↓ Dose up (アムロジピン5mgに増量)
- ↓ (アムロジピン5mgを継続, 採血(一般生化学))
- 第3薬投薬(3ヶ月:1回/月受診)
- ↓ アンジオテンシン受容体拮抗薬(バルサルタン40mgより開始)
- ↓ Dose up (バルサルタン80mgに増量)
- ↓ (バルサルタン80mgを継続, 採血(一般生化学))
- 終了

図4. GEANE研究投薬プロトコール

GEANE研究は国立循環器病センター高血圧腎臓内科・研究所, 国立病院機構九州医療センター高血圧内科, 大阪大学老年・腎臓内科, 金沢医科大学高齢医学, 日本大学第2内科, 九州大学臨床薬理学, 愛媛大学老年医学, 第2内科の共同研究である。

個別化医療の実現に向けて

高血圧の個別化医療実現には適確な研究成果の集積と

出てきた遺伝子多型を用いた迅速遺伝子診断システムの開発, このような遺伝子診断システムを導入した場合の有用性を確かめる前向き試験, 遺伝子診断を考慮した新しい高血圧診療ガイドラインの制定などが必要と考えられ, 道程は長い. しかしながら確実な研究成果の集積により必ずや実現できるであろう. 無駄が少なく, より安全で, 合併症を減少させることができるような高血圧診療を患者に提供することを最終目標に研究を進めることが重要である.

#### 謝辞

本稿中の研究成果は, 独立行政法人医薬品医療機器総合機構の「保健医療分野における基礎研究推進事業」より助成金を得たミレニアムゲノムプロジェクト(高血圧等循環器疾患における遺伝子解析, 創薬推進事業: 研究代表者-国立循環器病センター病院長: 友池仁暢)ならびに厚生労働省循環器病研究委託費(16公-1)によるものである. またGEANE研究は平成17年度より厚生労働科学研究費(萌芽的先端医療技術推進研究事業)のサポートを受けている. 本研究に協力をいただいた内科高血圧腎臓部門・循環器予防検診部のスタッフ, ミレニアム実験室の関係者ならびに運営部調査課の花井荘太郎先生に深謝いたします.

#### 参考文献

- (1) Dominiczak AF, Negrin DC, Clark JS, et al. Genes and hypertension. *Hypertension* 2000; 35: 164-72
- (2) Lalouel J-M. Large-scale search for genes predisposing to essential hypertension. *Am J Hypertens* 2003; 16: 163-6.
- (3) Kamide K, Takiuchi S, Miyata T, et al. Single nucleotide polymorphisms analysis of hypertension relating to the effect of antihypertensive drugs-Millennium Genome Project at NCVG-Jpn Heart J 2004; 45 (suppl): S69-S93.
- (4) Higaki J, Baba S, Katsuya T, et al. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men: The Suita Study. *Circulation* 2000; 101: 2060-5.
- (5) Samani NJ. Genome scan for hypertension and blood pressure regulation. *Am J Hypertens* 2003; 16: 167-71.
- (6) Angius A, Petretto E, Maestrale GB, et al. A new essential hypertension susceptibility locus on chromosome 2p24-p25, detected by genomewide search. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 893-905.
- (7) Zhu DL, Wang HY, Xiong MM, et al. Linkage of hypertension to chromosome 2q14-q23 in Chinese families. *J Hypertens* 2001; 19: 55-61.
- (8) Kamide K, Kokubo Y, Yang J, et al. Hypertension Susceptibility Genes on Chromosome 2p24-p25 in a General Japanese Population in Japanese. *J Hypertens* 2005; 23: 955-960.
- (9) Iwai N, Baba S, Mannami T, et al. Association of sodium channel  $\gamma$ -subunit promoter variant with blood pressure. *Hypertension* 2001; 38: 86-9.
- (10) Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 2001; 293: 1107-12.
- (11) Kokubo Y, Kamide K, Inamoto N, et al. Identification of 108 SNPs in TSC, WNK1, and WNK4 and their association with hypertension in a Japanese general population. *J Hum Genet* 2004; 49: 507-15.
- (12) Kamide K, Takiuchi S, Tanaka C, 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: 446-9.
- (13) Kamide K, Tanaka C, Takiuchi S, et al. Six missense mutations of the epithelial sodium channel  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits in Japanese hypertensives. *Hypertens Res* 2004; 27: 333-8.
- (14) Heximer SP, Knutsen RH, Sun XG, et al. Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *J Clin Invest* 2003; 111: 445-452.
- (15) Yang J, Kamide K, Kokubo Y, et al. Genetic variations of regulator of G-protein signaling 2 in hypertensive patients and in the general population. *J Hypertens* (in press)
- (16) Miwa Y, Takiuchi S, Kamide K, et al. Identification of gene polymorphism in lipocalin-type prostaglandin D synthase and its association with carotid atherosclerosis in Japanese hypertensive patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 428-33.
- (17) Takiuchi S, Mannami T, Miyata T, et al. Identification of 21 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in human hepatocyte growth factor gene and its association with blood pressure and carotid arteriosclerosis in Japanese population. *Atherosclerosis* 2004; 173: 301-5.
- (18) Tanaka C, Mannami T, Kamide K, et al. Single nucleotide polymorphisms in the interleukin-6 gene associated with blood pressure and atherosclerosis in Japanese general population. *Hypertens Res* 2005; 28: 35-41.
- (19) Miwa Y, Takiuchi S, Kamide K, et al. Insertion/deletion polymorphism in clusterin gene influences serum lipid levels and carotid intima-media thickness in hypertensive Japanese females. *Biochem Biophys Res Commun* (in press)
- (20) Takiuchi S, Kamide K, Horio T, et al. Catalogue of matrix metalloproteinase gene polymorphisms and susceptibility to cardiovascular hypertrophy in Japanese hypertensive patients. *J Hypertens* 2004; 22: S4 (supple. I)

- (21) Koopmans RP, Insel PA, Michel MC. Pharmacogenetics of hypertension treatment: a structured review. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 705-713.
- (22) Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E. C825T polymorphism of the G protein beta (3)-subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 2001; 37 (Part 2): 739-43.
- (23) Glorioso N, Manunta P, Filigheddu F, et al. The role of alpha-adducin polymorphism in blood pressure and sodium handling regulation may not be excluded by a negative association study. *Hypertension* 1999; 34: 649-54.
- (24) Matayoshi T, Kamide K, Takiuchi S, et al. Thiazide-sensitive Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-cotransporter gene, C1784T, and adrenergic receptor-beta 3 gene, T727C, may be gene polymorphisms susceptible to the antihypertensive effect of thiazide diuretics. *Hypertens Res* 2004; 27: 821-33.
- (25) Kurland L.  
The antihypertensive response to irbesartan treatment from a pharmacogenetic perspective. *Minerva Medica* 2003; 94: 251-258.
- (26) Kurland L, Melhus H, Karlsson J, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism predicts blood pressure response to angiotensin II receptor type I antagonist treatment in hypertensive patients. *J Hypertens* 2001; 19: 1783-1787.
- (27) Kurland L, Melhus H, Karlsson J, et al. Aldosterone synthase (CYP11B 2)-344C/T polymorphism is related to antihypertensive response: result from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *Am J Hypertens* 2002; 15: 389-393.
- (28) Kurland L, Melhus H, Karlsson J, et al. Polymorphisms in the angiotensinogen and angiotensin II type 1 receptor gene are related to change in left ventricular mass during antihypertensive treatment: result from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial. *J Hypertens* 2002; 20: 657-663.
- (29) Liljedahl U, Karlsson J, Melhus H, et al. A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 7-17.
- (30) Liljedahl U, Kahan T, Malmqvist K, et al. Single nucleotide polymorphisms predict the change in left ventricular mass in response to antihypertensive treatment. *J Hypertens* 2004; 22: 2321-2328.
- (31) Schelleman H, Sticker BHC, Boer AD, et al. Drug-gene interactions between genetic polymorphisms and antihypertensive therapy. *Drugs* 2004; 64: 1801-1816.