

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討に関する研究

研究分担者 是恒之宏 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター長

研究要旨：先行研究で得られたワルファリンの投与量と遺伝子多型、ビタミンK摂取量に関する解析を行いながら、ビタミンK摂取量における季節の影響についての研究を進めている。国立循環器病センターでは2008年10月25日、倫理委員会において研究プロトコルが承認され、2009年1月14日より症例登録が開始された。症例登録期間は当初2009年11月末としていたが、目標登録症例数に満たないことから2010年2月末まで延長した。国立病院機構大阪医療センターでは2009年11月30日までに50例が登録され、食事調査票の回収、ビタミンK採血などプロトコル通りに研究が進行している。

A. 研究目的

本研究は独立行政法人理化学研究所との共同研究であり、また国内の循環器・脳卒中の基幹的診療施設が参加する多施設共同研究である。具体的には、ワルファリンの至適用量の個人差にCYP2C9とVKORC1の遺伝子多型が影響を及ぼすことが近年知られているが、食事から摂取されるビタミンKの影響を加味して検討を加えることにより、ワルファリンの投与量に対する遺伝子、生理学的要因、さらに環境要因の与える影響を明らかにし、至適用量のより正確な推定方法の検索を目的とする。

B. 研究方法

血栓症の予防目的でワルファリンを服用している外来通院患者を対象に、ワルファリンの作用に大きな影響を与えるCYP2C9とVKORC1の遺伝子多型の決定と

四季のビタミンK摂取量の変動を食事調査票で調査する。それぞれの季節の調査期間は1ヶ月で、最初の季節は同時にビタミンKの血中濃度を測定する。背景因子としてはこれまで関連が認められている、身長、体重、性別、肝機能、腎機能、併用薬の調査を行う。

（倫理面への配慮）

（1）医学研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

説明を十分に行い、同意を得た患者のみを対象とする。また、匿名化を行うので遺伝情報が外部に漏れない。個人を特定できる情報は連結可能匿名化を用いて管理する。

（2）医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

対象となる患者は、すでにワルファリンを服用しているので、本研究への参加により治療方針が変わることはない。

食事調査に御参加いただくことで、普段の食事内容の分析結果を提供することが可能であり利益となる可能性がある。前向き介入試験についてはワルファリン服用が必要な症例が対象であるので、治療方針は変わらない。入院期間の短縮につながれば利益となる。初期投与量が高容量となる場合には、慎重に止血検査を繰り返し、過剰投与にならないように注意を払う。

C. 研究結果

本年度は当院において50例に対し文書同意のうえ、遺伝子多型およびビタミンK血中濃度の採血を行なった。食事アンケートについても季節ごとの集積が得られている。現時点で結果は得られていないが、来年度以降解析がすすめられる。

D. 考察

研究費による研究補助員により、スケジュール管理や食事内容のアンケートに関するフィードバックも行なうことができた。データの欠損は現時点で発生しておらず概ね良好にデータ集積が可能であった。

E. 結論

ワルファリンの至適用量の個人差に遺伝子多型と詳細な食事の内容の関連を検討することは大変有意義であり、来年度以降研究の遂行継続と成果に期待が持たれる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Ogawa S, Sato T, Aizawa Y, Atarashi H, Fujiki A, Inoue H, Ito M, Katoh T, Kobayashi Y, Koretsune Y, Kumagai K, Niwano S, Okazaki O, Okumura K, Saku K, Tanabe T, Origasa H, for the J-BAF Investigators. Dose response effects of bepridil in patients with persistent atrial fibrillation monitored with transtelephonic electrocardiograms. A multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind study (J-BAF Study). *Circ J* 2009;73:1020-1027.
- 2) Koretsune Y. The incidence of ischemic stroke. Paroxysmal Af vs Persistent/permanent Af. *Circ J* 2009;73:1393-1394.
- 3) 是恒之宏. 血栓塞栓の機序と抗凝固療法 特集：心房細動の総合的マネジメント 最新医学 2009;64(8):66-72.

2. 学会発表

- 1) Nakagawa A, Hamano G, Taniguchi T, Utsunomiya Y, Koide M, Yamato M, Sasaki N, Hirooka K, Koretsune Y, Yasumura Y. The degree of lung fluid accumulation is different between preserved and reduced systolic function in patients with acute heart failure. ESC congress 2009, 30 August 2009, Barcelona SPAIN

2) 是恒之宏 心不全を合併する心房細動
の抗血栓療法 第13回日本心不全学
会学術集会シンポジウム 2009年11
月1日 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究
脳梗塞急性期バイオマーカーに関する研究

研究分担者 長谷川泰弘 聖マリアンナ医科大学神経内科 教授
研究協力者 平山 俊和 聖マリアンナ医科大学神経内科 講師
研究協力者 高石 智 聖マリアンナ医科大学神経内科 助教

研究要旨：テーラーメイド医療のためには、個々の脳卒中患者の個人の特性を早期に確認する必要がある。本年度は共同研究の症例登録作業を進めるとともに、進行性脳梗塞発症予測における入院時バイオマーカー測定の有用性に関する研究を並行して進めた。発症 24 時間以内に入院した脳梗塞患者連続 232 例（平均年齢 72.9 ± 12.2 歳）を前向きに登録し、interleukin (IL)-6、IL-10、matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)、MMP-9、tumor necrosis factor (TNF)- α を、入院時、72 時間後、7 日後、14 日後に測定し、発症 3 日以内の神経症候増悪の有無との関連を解析した。進行性脳卒中の診断は European Progressing Stroke Study (EPSS) の定義に従って行った。ロジスティック回帰分析により、入院時 NIHSS スコア、主幹動脈閉塞の存在、IL-10 低値が発症 3 日以内の進行との間に有意な関連を有することが示された。但し、IL-10 の追加による予測精度の上昇は、Receiver operated curve (ROC) 解析による AUC の比較からは有意とはならなかった。進行性脳卒中予測値は低いものの、脳卒中発症早期の IL-10 値は NIHSS や梗塞体積に無関係であり、進行増悪における抗炎症性サイトカインの関与を示唆するものと考えられた。IL-6 や hsCRP の発症後の推移は、梗塞体積や重症度との間に関連が見られたが、進行性脳卒中に特異的なパターンは見られなかった。

A. 研究目的

近年脳卒中発症直後から炎症性サイトカインの変化が見られ、全身の免疫系に変化が生じていることが明らかとなり、これらの変化が脳卒中転帰や脳卒中後の臨床症状の変化に影響を与えているものと推定されている。本年度は共同研究の症例登録作業を進めるとともに、テーラーメイド医療確立に向けた脳卒中急性期バイオマーカー測定の意義に関する研究

を並行して進めた。本研究の目的は、発症 24 時間以内に入院した脳梗塞患者の血清バイオマーカーの進行性脳梗塞の予測値を明らかにすることにある。

B. 研究方法

発症 24 時間以内に入院した脳梗塞患者を前向きに登録した。入院直後に末梢静脈血採血を行い、一般生化学検査、血算、PT、APTT、fibrinogen、高感度 (hs) CRP、

interleukin (IL)-6、IL-10、Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)、MMP-9、tumor necrosis factor(TNF)- α を測定した。これらのバイオマーカーの測定は、72時間後、7日後、14日後にも行った。脳梗塞の臨床亜病型は、TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) 分類に従った。入院時のMRI 拡散強調画像により梗塞体積を算出した。進行性脳卒中の定義は、European Progressing Stroke Study (EPSS) の定義に従った。2群間の平均値の比較には Student's t-test, 3群以上の平均値の比較には、analysis of variance (ANOVA) および Bonferroni 法による検定を用いた。進行性脳卒中の予測因子については、バイオマーカーを含む入院時の諸因子と EPSS 診断基準による進行性脳卒中との関連をロジスティック回帰分析を行うことにより検討した。統計解析には SPSS ver. 14 for Windows を使用し、p 値が 0.05 未満を有意とした。

(倫理面への配慮)

本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を得て行われた。個人情報管理者を定め、承認された説明と同意を行い、データが施設外に出る場合は、平均値などに加工した形でのみ公表することで、倫理性ならびに個人情報の保護を厳重に図って行われた。

C. 研究結果

1. 患者背景

発症 3 日以内の進行増悪は 52 例 (22.4%) に観察された。72 時間以内の再発は見られなかった。単変量解析で進行の

有無別に背景因子を比較すると、年齢、性、合併症、脳卒中亜病型、梗塞体積に有意差はなく、主幹動脈閉塞の存在、入院時 NIHSS スコア、IL-10 値に有意差が見られた。

2. ロジスティック回帰分析

主幹動脈閉塞、入院時 NIHSS スコア、BAD-タイプ梗塞、入院時 IL-10 低値が有意に 72 時間以内の進行増悪と関連を有することが明らかとなった。

3. ROC 解析

Regression Model-1 は、stepwise logistic regression analysis で得られた主幹動脈閉塞、BAD タイプ梗塞、入院時 NIHSS スコアによる予測式、Model-2 はこれらに IL-10 基礎値を入れた full model として予測し、各々 ROC 解析を行った。Model-1 の AUC は 0.74 (SE 0.04; 95% CI, 0.66 to 0.82)、model-2 のそれは 0.77 for model 2 (SE 0.04; 95% CI, 0.70 to 0.84) で、これらの AUC に有意差はなかった (Delong's test $P=0.059$)。

4. バイオマーカーの経時的変化

入院時、72 時間後、7 日、14 日後に測定されたバイオマーカーの変化に、入院後の増悪進行と関連する特異な変化は明らかではなかった。ただし hsCRP と IL-6 は梗塞体積が大きいほど 72 時間後に高値をとった。

D. 考察

脳梗塞の直接原因となる血栓形成や粥腫破綻に炎症性メディエーターが深く関与している。今回の研究で、病初期の IL-10 値が梗塞発症後の進行増悪と関連があることが示された。

IL-10 は抗炎症性サイトカインとして知られ、活性化された monocyte や macrophage から IL-1 β , IL-6, TNF- α , nitric oxide (NO) などの pro-inflammatory cytokine 分泌を抑える作用を有する。IL-10 は type1 regulatory T (Tr1) cell をはじめとする様々な細胞から分泌されている。脳虚血後に、脾臓由来の IL-10 の増加が亢進することはよく知られている。Tarkowski らによれば、髄液中 IL-10 値は脳梗塞第3病日に最大に達し、pro-inflammatory cytokine ばかりでなく anti-inflammatory cytokine の分泌も増加することを示している。Vila らは IL-10 血中レベルが特にラクナ梗塞または皮質下梗塞患者の初期の増悪と関連していたと報告しているが、我々の検討では病型との関連は明らかではなかった。IL-10 は caspase3 活性を阻害し apoptosis との関連をも有する。IL-10 値は NIHSS スコアや梗塞体積には無関係であり、進行増悪における IL-10 の抗炎症性サイトカインとしての関与が推測され、今後病型を限定するなどして前向きに検証する価値がある。

E. 結論

発症 24 時間以内の進行増悪には、主幹動脈閉塞、BAD 型梗塞、NIHSS スコア高値の他、発症時 IL-10 低値が関与していた。進行性脳梗塞の予測価値として高いものではないが、進行のメカニズムの一つとして治療的介入の可能性を検討する上で意義があると考えられる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takaishi S, Kato B, Yamada K, Sakurai K, Shimizu K, Shimomura K, Tokuyama Y, Hasegawa Y. Changes in inflammatory biomarkers and neurological deterioration in patients with acute brain infarction. (abstract) International Stroke Conference, San Antonio, TX 2010.
- 2) Hasegawa Y, Shimada K, Yamaguchi T for the J-PADOC Study Investigators. Efficacy and safety of diuretics in combination with perindopril in hypertensive stroke patients: Results of the Japan Perindopril and Diuretics on Cerebrovascular Disease Study (J-PADOC). Blood Pressure (in press)
- 3) Shiraishi M, Kobayashi T, Watanabe H, Kamo T, Hasegawa Y. Serum somatostatin in early-stage Parkinson's disease. Acta Neurol Scand 2010 (現在 epub)
- 4) 長谷川泰弘. 5つの症状とストローク・バイパス. ER マガジン 2009;6(1):174-178.
- 5) 長谷川泰弘. rtPA 静注療法 海外文献レビュー. 脳卒中 2009;31(5): 360-365.
- 6) 長谷川泰弘. 病型ごとの再発予防 心原性脳塞栓症. 治療 2009;91(11):

2657-2660.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 花田裕典 国立循環器病センター研究所循環分子生理部 室員

研究要旨：本研究の目的は、SNP 遺伝子型のデータを利用して、個人の特性に応じた降圧を選択する治療法の開発をおこなうことである。平成 17-19 年にわたって行われた GEANE 研究（厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進事業「遺伝子多型による高血圧個別化診療の確立に関する研究」主任研究者：河野雄平）、及び HOSP-gene 研究（医薬基盤研究「推進事業高血圧等循環器疾患のゲノム情報多元的意義付けと画期的診断・治療法の開発に関する研究」主任研究者：森崎隆幸）で収集された検体の臨床及び SNP 遺伝子型データを併合し、平均血圧を中心にして、解析を行い、降圧効果と関連する SNP 遺伝子型の探索と、得られた SNP サイトの遺伝子型と降圧効果の関連性の正確性について検討した。その結果、遺伝子型と投薬前血圧の交互作用を考慮する必要があり、新たなモデルの検討が必要ながあきらかになった。

A. 研究目的

GEANE 研究の結果から、降圧量と投薬前血圧の関連性の解析から、3 種類の降圧薬での投薬前後の血圧の相関を解析すると、投薬前血圧が高いほど、投薬後の降圧量は大きくなるので、投薬前後の血圧値の差や、比をそのまま降圧効果の指標として用いると、薬剤の効果ではなく、血圧の高いことと SNP 遺伝子型の関連性を解析してしまうことになる。そのため、投薬前血圧を考慮した、降圧効果の指標を使用する必要がある。また、他研究で、一人の患者に複数の降圧薬を投与するのではなく、降圧薬ごとに異なる集団で降圧効果を検証した研究のデータも併合することによって、降圧効果と関連する SNP 遺伝子型の探索の信頼性の向上を試みた。

B. 研究方法

GEANE 研究は、一人の患者に対して、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬（バルサルタン）、カルシウムチャネル拮抗薬（アムロジピン）、サイアザイド類利尿薬（インダパミド）の 3 種類の降圧薬の順序をランダム化して投薬する、クロスオーバー試験だった。同時に、この試験では、基礎的な臨床データのほかに、ゲノム網羅的な 50 万 SNP サイトの遺伝子型データも収集された。HOSP-gene 研究は GEANE 研究と異なり、降圧薬ごとに異なる集団で基礎的な臨床データ及びゲノム網羅的 SNP サイトの遺伝子型データが収集されたが、利用可能な検体の抽出を行った。これらの研究のデータを併合すると、検体数はのべ 184 人、薬剤ごとでは、カルシウムチャネル拮抗薬では 159 人（+30）、サイ

アザイド類臨床薬では124人(0)、アンジオテンシン受容体阻害薬では148人(+18)(括弧内の数字は、GEANE研究単独の検体数からの増減)となった。

関連性の解析には、PLINK(ver. 1.06、<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>)を使用し、薬剤ごとに(1) ADDITIVE、DOMINANT、RECESSIVEの3種類の遺伝子型モデルを設定して、降圧量、投薬後血圧について遺伝子型による平均値の差を検定する量的解析と、(2)高血圧治療指針を元にして降圧量から有効/非有効の2群のSNP遺伝子型頻度の差を検定するCase/Control Studyを行った。(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守する。

C. D. 研究の結果と考察

3種類の降圧薬での投薬前後の血圧の相関を解析すると、その回帰直線の傾きは約0.4、相関係数は0.2-0.3、p値は 1×10^{-5} - 1×10^{-6} であった。このことは、遺伝子型間の血圧の降圧量の平均値の差が5mmHgであったとき、2mmHgは投薬前血圧で説明され、遺伝子型では3mmHgの一部しか説明できないことを表している。降圧量の平均値が10mmHg、標準偏差が8mmHgであること、平均値の差の検定で有意と判定されたSNPサイトの遺伝子型間の降圧量の平均値の差は2-6mmHgであることなどを考え合わせると、信頼性は高いことは容易に想像できる。また、Case/Control Studyで降圧効果と関連性

が有意となったSNPサイトとの一致性も低かった。その原因を考察すると、まず、モデルで考慮すべき変数が十分ではない。過去の研究でも、降圧薬の有効性の指標として投薬前の血圧を考慮しない降圧量のみで解析がおこなわれている。降圧量が投薬前血圧と強く関連していることから、遺伝子型と投薬前血圧の交互作用を考慮したモデルが必要であることが示唆された。現在、新たなモデルの検討を行っている。さらに、次年度は、これらの解析で関連性があると判定されたSNPサイトについて、確認のための集団を収集し、降圧効果と遺伝子型との関連性を解析する予定である。

E. 結論

降圧量は投薬前血圧と関連するため、降圧薬の有効性の指標として降圧量を使用するときは、投薬前血圧を考慮したモデル、例えば、遺伝子型と投薬前血圧の交互作用を組み込んだモデルのほうが、正確性が高い可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, Shimaoka I, Congrains A, Horio T, Hanada H, Ohishi M, Katsuya T, Okamura T, Miyata T, Kawano Y, Rakugi H. Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of the klotho gene in

patients with hypertension. Geriat
Gerontol Int (in press)

- 2) 富田誠、藤田利治、神出計、花田裕典、
宮田敏行、河野雄平. 大規模なゲノム
データにおける関連解析の手法とソフ
トウェア 日本計算機統計学会和文誌
「計算機統計学」2010年：印刷中
- 3) 神出計、宮田敏行、花田裕典、河野雄
平：高血圧のテーラーメイド治療の展
望. 血圧 2009:16: 691-694.

2. 学会発表

- 1) 松本幸子、神出計、宮田敏行、花田裕
典、友池仁暢 降圧薬感受性遺伝子多
型同定のための前向き多施設臨床試験
(GEANE研究)－候補遺伝子アプローチ
による検討. 第32回日本高血圧学会
総会：滋賀県大津市 2009/10/1-3

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 嘉田晃子 国立循環器病センター研究所病因部 室員

研究要旨:ワルファリン至適投与量に対する遺伝子多型と食事の影響を検討する単施設研究において、ワルファリン投与量の予測モデルの妥当性を検討した。既存研究の 2 つの予測モデルをあてはめたところ、遺伝子多型の分布が (VKORC1, CYP2C9) = (AA, AC) や (AG+GG, AA) において予測値と観測値の乖離が認められた。遺伝子多型の分布に民族差があるため、当該研究における推定モデルを、実施中の多施設共同研究でさらに確認していく予定である。

A. 研究目的

ワルファリンの投与量には個人差があり、個人に適した抗凝固療法を確立していくために、投与量に影響を与える要因を分析することは重要である。ワルファリン投与量の予測モデルは複数の研究において検討されている。予測因子として VKORC1、CYP2C9、体重、体表面積、年齢、併用薬などがある。今回、単施設で実施した研究データをもとに、すでに報告されている予測モデル式をあてはめ、予測の程度を検討する。

B. 研究方法

方法

次の 2 つの既存モデル、および当該単施設研究からの推定モデルを検討する。

①The International Warfarin

Pharmacogenetics Consortium のモデル¹⁾

要因:年齢、身長、体重、VKORC、CYP2C9、人種、enzyme inducer status、アミオダロン投与

②Sconce らのモデル²⁾

要因:年齢、身長、VKORC、CYP2C9
予測値と観測値の散布図を作成し、相関係数を算出する。また、遺伝子多型別の残差プロットを作成する。遺伝子多型は、(VKORC1, CYP2C9) = (AG+GG, AA)、(AG+GG, AC)、(AA, AA)、(AA, AC) の 4 タイプに分ける。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理委員会の承認を受けた上で実施した。データを解析する際には個人情報取り扱いに留意する。

C. 研究成果

単施設研究において、ワルファリン維持投与量に達した対象者は 170 名であり、ワルファリンの 1 日平均投与量（最小値－最大値）は 3.3 (1.3－8.0) mg であった。

モデル①の結果を図 1 に、モデル②の結果を図 2 に示す。予測値と観測値の相関係数は、それぞれ $R^2=0.37$ 、 $R^2=0.35$ で

あった。

また、残差プロットでは①②のモデルとも(VKORC1, CYP2C9) = (AG+GG, AA)での残差が大きく、例数は少ないが(VKORC1, CYP2C9) = (AA, AC)でも残差が認められた。

単施設研究においては、ビタミンK、性別、年齢、体表面積、VKORC、CYP2C9、Aspirin、スタチン、既往歴、喫煙、飲酒の要因を加えたところ、 $R^2=0.46$ となった。

D. 考察

単施設研究の遺伝子多型タイプは、(VKORC1, CYP2C9) = (AA, AA)が140名と最も多い。今回検討した2つのモデルは、投与量が少なくよい(VKORC1, CYP2C9) = (AA, AC)や、投与量が多く必要な(VKORC1, CYP2C9) = (AG+GG, AA)で予測値と観測値の乖離が認められた。既存研究の対象者集団と日本人での多型の分布が影響していると考えられる。

日本人での特徴を考慮したモデルを単施設研究から構築し、現在実施中での多施設研究で確認や再検討を加えていきたい。

E. 結論

ワルファリン至適投与量に対する遺伝子多型と食事の影響を検討する単施設研究において、ワルファリン投与量の予測モデルの妥当性を検討した。

既存研究のモデルでは遺伝子多型の分布が(VKORC1, CYP2C9)=(AA, AC)や(AG+GG, AA)において予測値と観測値の乖離が認められた。

遺伝子多型の分布に民族差があるため、

当該研究における推定モデルを、実施中の多施設共同研究でさらに確認していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 山本晴子、長東一行、嘉田晃子、浦敏郎、太田直孝、宮田茂樹、宮田敏行、峰松一夫、成富博章：ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討. 第50回日本神経学会総会、仙台、5月22日、2009.
- 2) 藤山啓美、宮本恵宏、太田直孝、山本賢、佐野隆宏、山本晴子、嘉田晃子、峰松一夫、成富博章、宮田敏行、宮田茂樹、長東一行、吉政康直、鎌倉史郎、佐野道孝：ワルファリン療法に対する遺伝子多型の影響の検討. 第63回国立病院総合医学会、仙台、10月24日、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

引用文献

- 1) Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King B, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005;106:2329-2333.
- 2) The international warfarin pharmacogenetics consortium. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *NEJM* 2009 ;360 :753-764.

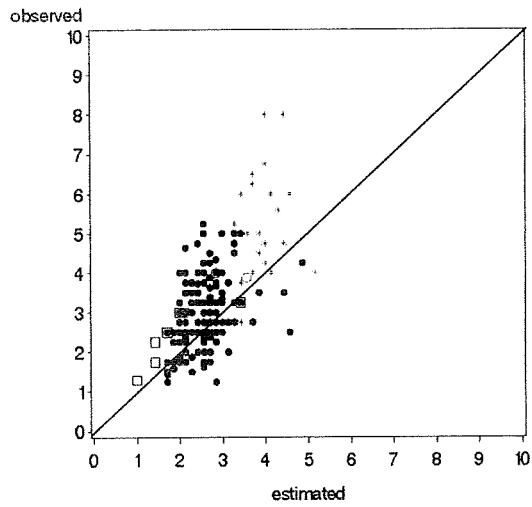


図1 モデル①による予測値と観測値の散布図(mg)

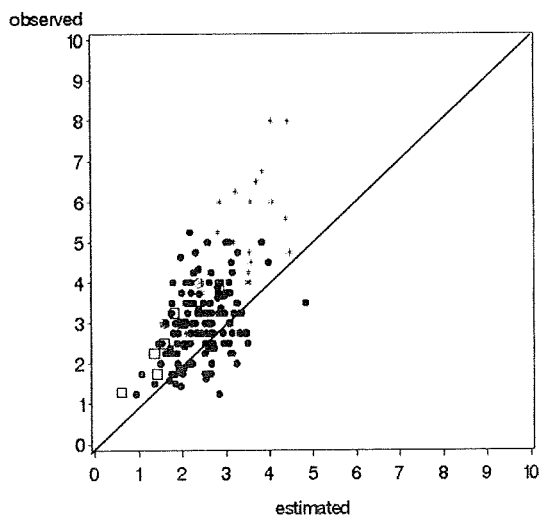


図2 モデル②による予測値と観測値の散布図(mg)

(VKORC1, CYP2C9)

* : (AG+GG, AA)、○ : (AG+GG, AC)、

● : (AA,AA)、□ : (AA,AC)

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 楽木宏実 大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学 教授

研究要旨： 欧米の複数のゲノム網羅的関連解析(GWAS)において肥満・糖尿病の原因遺伝子素因として fat-mass and obesity-associated gene (FTO) の一塩基多型(SNP) の関与が明らかとなった。我々は高血圧、降圧薬の効果にこの FTO SNP が関連する可能性があるため、まず日本人の高血圧、糖尿病、肥満、メタボリックシンドローム(MS) への関与を明らかにすることを目的として解析を行った。北海道で行われているゲノム疫学研究である端野・壮瞥町研究参加の一般住民(1514名)を対象として FTO SNP と高血圧を含むメタボリック因子との関連解析を施行した。解析は欧米の GWAS で肥満・糖尿病との有意な関連性が示されている 3 つの SNP (rs 9939609, 1121980, 1558902) を用いて TaqMan 法にて遺伝子型を決定した。高血圧や BMI (≥ 25) で定義した肥満、日本の診断基準による MS などとこれらの SNP の間に有意な関連性は認められなかったが、rs1121980 は血漿インスリン値、インスリン抵抗性の指標である HOMA 指数と強い関連性を示した。またこれら 3 つの SNP は連鎖不平衡関係にあるが、一つのハプロタイプが同様にインスリン抵抗性と有意な相関を示したことから本 FTO の遺伝子素因は日本人のインスリン抵抗性に関連している可能性があり、降圧薬の選択において考慮すべき情報と成り得る可能性が示された。

A. 研究目的

近年、肥満、糖尿病などの代謝性疾患の疾患感受性遺伝子を明らかにする研究が盛んに行われている。その解析法としてゲノム網羅的関連解析(Genome wide association study: GWAS)が主流である。欧米で施行された複数の GWAS によって肥満・糖尿病関連遺伝子の同定が試みられたが、fat-mass and obesity-associated gene (FTO) の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP) はほとんどの GWAS 研究で肥満や糖尿病との有意な関連性を示し、特に肥満関連遺伝子素因

としては最も有望視されている。最近の報告では FTO 遺伝子のノックアウトマウスは痩せ型を示し、高カロリー食を負荷しても耐糖能異常を示さないことから FTO 遺伝子は糖・脂質代謝などに重要な役割を果たしていることは間違いないと考えられている。ヒトにおいて肥満は、糖尿病や脂質異常症のリスクであるだけでなく、インスリン抵抗性などを介して高血圧にも深く関与し、本研究プロジェクトの主なテーマである、降圧薬の効果にも影響をもつ病態の一つである。今回我々はこの肥満関連遺伝子素因である

FTO の SNP と高血圧やメタボリック因子につき我が国を代表する疫学コホート研究である北海道地方の端野・壮瞥町研究を対象者に検討を行った。

B. 研究方法

対象は端野・壮瞥町研究に参加している一般住民 1514 名で、一般的な健康診断項目に加えて空腹時インスリン値、アディポネクチンなどの代謝指標を測定している。高血圧は無投薬であれば 140/90mmHg 以上、もしくは降圧薬内服中、肥満は BMI \geq 25kg/m²、高コレステロール血症は総コレステロール \geq 220mg/dl、もしくは薬物治療中、糖尿病は空腹時血糖 \geq 126mg/dl、もしくは薬物治療中、メタボリックシンドロームは日本の診断基準を用いている。インスリン抵抗性の指標として HOMA-IR を用いた。FTO SNP は海外で肥満、糖尿病との関連が指摘されている、rs 9939609, 1121980, 1558902 を選択し、TaqMan PCR 法にて遺伝子型を決定した。
(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守する。

C. 研究結果

FTO rs9939609 と rs1558902 では肥満、高血圧、メタボリックシンドロームなど各因子との明らかに有意性は認められなかったが、rs1121980 の additive ならびに recessive model (AA・AG・GG, AA vs AG+GG) では IRI (p=0.022, p=0.0294) と HOMA-IR (p=0.01, p=0.0008) と有意性を

認めた。この関連性は年齢、性別、BMI などの交絡因子を補正した後も有意性が保たれた。これら 3SNPs は強い連鎖不平衡を示すため、ハプロタイプ解析を施行した。頻度 1%以上のハプロタイプを解析対象としたところ

rs9939609/1121980/1558902 : AT/AA/AT のハプロタイプを有した場合、IRI と HOMA-IR との明らかな有意性が認められ (p=0.0006, p<0.0001)、交絡因子補正後も同様の結果を示した。

D. 考察

FTO の遺伝子多型 rs1121980 ならびに rs9939609/1121980/1558902 : AT/AA/AT のハプロタイプは日本人の一般住民においてインスリン抵抗性に関与することが示唆された。現段階では、これらの遺伝子多型がすぐに高血圧治療に結びつく可能性は低いが、肥満改善、減量治療による有用性が高い患者を選定するテーラーメイド診療に、今回の遺伝子情報が有用となる可能性がある。

E. 結論

FTO の遺伝子多型 rs1121980 ならびに rs9939609/1121980/1558902 : AT/AA/AT のハプロタイプは日本人の一般住民においてインスリン抵抗性に関与する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimaoka I, Kamide K, Ohishi M, Katsuya T, Akasaka H, Saitoh S, Sugimoto K, Oguro R, Congrains A, Shimamoto K, Ogihara T, Rakugi H. Association of gene polymorphism of the fat-mass and obesity-associated gene with insulin resistance in Japanese. *Hypertens Res* 2010;33:214-218.
- 2) Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, Shimaoka I, Congrains A, Horio T, Hanada H, Ohishi M, Katsuya T, Okamura T, Miyata T, Kawano Y, Rakugi H. Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of the klotho gene in patients with hypertension and in the general population. 82st American Heart Association 2009 Scientific Sessions. 2009:Nov.18 Orland, USA
- 3) Koriyama H, Nakagami H, Katsuya T, Akasaka H, Saitoh S, Shimamoto K, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R, Rakugi H. Variation in OSBPL10 is associated with dyslipidemia. *Hypertens Res* (in press)
- 4) Iio K, Nagasawa Y, Iwatani H, Yamamoto R, Horii A, Okuzaki D, Furumatsu Y, Inohara H, Nojima H, Imai E, Isaka Y, Rakugi H. Microarray analysis of tonsils in immunoglobulin A nephropathy patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393:565-570.
- 重幸、大石充、島本和明、楽木宏実
FTO 遺伝子多型とインスリン抵抗性との関連性 - 端野・壮瞥町研究
第 32 回日本高血圧学会総会 2009 年 10 月 大津
- 2) Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, Shimaoka I, Congrains A, Ohishi M, Okamura T, Miyata, Kawano Y, Rakugi H. Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of klotho gene in patients with hypertension and in the general population. 82st American Heart Association 2009 Scientific Sessions. 2009:Nov.18 Orland, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

- 1) 島岡泉、神出計、勝谷友宏、小黒亮輔、Ada Congrain、杉本研、赤坂憲、斎藤

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

降圧治療および抗凝固療法の個人の特性に応じたテーラーメイド治療確立に関する研究

研究分担者 相馬正義 日本大学医学部内科学系総合内科学分野 教授

研究要旨：本態性高血圧症（EH）、脳梗塞（CI）、急性心筋梗塞（MI）患者を対象に候補遺伝子多型を用いて関連研究を行った。Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2 (P2RY2) は、EH, CI および MI と有意に関連し、apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox effector factor-1 (APE1/REF-1) は、EH および CI と関連した。また、Solute carrier family 6, member 9 (SLC6A9) および elastin microfibril interface 1 (EMILIN1) は EH と、receptor (calcitonin) activity-modifying protein-1 (RAMP1) は CI と、calcium-activated potassium channel subfamily N4 (KCNN4) は MI と、それぞれ有意に関連することが判明した。

A. 研究目的

EH、CI、MI の疾患候補遺伝子領域の遺伝子多型を用いて関連研究を行い、本研究の基盤となるデータを集積する。

B. 研究方法

(1) EH、CI および MI 患者と健常者(C)を対象とし末梢血からゲノム DNA を抽出した。

(2) 公共データベースから P2RY2, APE1/REF-1, SLC6A9, EMILIN1, RAMP1 および KCNN4 遺伝子領域の tagSNPs を選出し、TaqMan 法およびダイレクトシーケンス法にてゲノタイプを決定し、関連研究をおこなった。

（倫理面への配慮）

尚、採血に当たっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠し、日本大学医学部倫理委員会で承認された方法に則って書面での同意を得た。

C. 研究結果

①P2RY2 遺伝子領域の 5 つの SNPs (rs4944831, rs1783596, rs4944832, rs4382936, rs108989) について関連研究を行った。SNP rs4944831 のゲノタイプとハプロタイプ T-A-G

(rs1783596-rs4382936-rs10898909) の頻度は EH 群と C 群で有意差を認めた。また、本ハプロタイプ頻度は CI で、T-C-A ハプロタイプ頻度は MI で、それぞれ有意に高かった (p=0.031, p=0.045)。

②APE1/REF-1 遺伝子領域の 5 つの SNPs (rs1760944, rs3136814, rs17111967, rs3136817, rs1130409) について関連研究を行った。rs1760944-rs3136814-rs1130409 のハプロタイプ G-T-T は EH 群で、G-C-T は CI 群で、C 群に比べそれぞれ有意に頻度が高かった。

③ラット血圧の QTL と相同するヒト遺伝子領域から選ばれた SLC6A9 遺伝子領域の

3つのSNPs (rs2286245, rs3791124, rs2486001)について関連研究を行った。rs2286245のアレル頻度はEH群とC群で有意差があり、rs3791124のゲノタイプ頻度も両者で有意に異なった。

④EMILIN1 遺伝子領域の5つのSNPsについて関連研究を行った。Rs2011616のゲノタイプ、

rs2536512-rs2016116-rs17881426のハプロタイプG-A-TがEHと有意に関連した。

⑤RAMP1 遺伝子領域の6つのSNPsについて関連研究を行った。

rs3754701-rs3769048-rs7590387のハプロタイプT-A-Cの頻度が有意にCI群で高かった(p=0.0024)。

⑥KCNN4 遺伝子領域の5つのSNPsについて関連研究を行った。rs2306799のG/GゲノタイプがMIと有意(p=0.005)に関連し、さらにG-T-A (rs2306799-rs347519-rs3786954)ハプロタイプがMIと有意に関連した。CIとの関連は見いだせなかった。

D. 考察

今回我々は、候補遺伝子アプローチ法を用いて、EH, CI, MIの関連解析を行った。P2RY2はこの3疾患に共通した遺伝要因と考えられ今後さらなる検討が必要と考えられた。また、複数のtagSNPsで構成したハプロタイプ解析がヒト疾患の関連遺伝子を検出する鋭敏な方法であることが確認された。

E. 結論

P2RY2, APE1/REF-1, SLC6A9, EMILIN1, RAMP1 または KCNN4 遺伝子が EH, CI また

はMIの単独または複数の発症に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fu Z, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Shindo A, Ohta M, Soma M, Aoi N, Sato M, Ozawa Y, Ma Y, Matsumoto K, Doba N, Hinohara S. A haplotype of the CYP4F2 gene associated with myocardial infarction in Japanese men. *Mol Genet Metab* 2009;96(3):145-7.
- 2) Ueno T, Fukuda N, Nagase H, Tsunemi A, Tahira K, Matsumoto T, Hiraoka-Yamamoto J, Ikeda K, Mitsumata M, Sato Y, Soma M, Matsumoto K, Yamori Y. Atherogenic dyslipidemia and altered hepatic gene expression in SHRSP. Z-Leprfa/IzmDmcr rats. *Int J Mol Med*. 2009;23(3):313-20.
- 3) Ueno T, Tabara Y, Fukuda N, Tahira K, Matsumoto T, Kosuge K, Haketa A, Matsumoto K, Sato Y, Nakayama T, Katsuya T, Ogihara T, Makita Y, Hata A, Yamada M, Takahashi N, Hirawa N, Umemura S, Miki T, Soma M. Association of SLC6A9 gene variants with human essential hypertension. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(3):201-6.
- 4) Ueno T, Watanabe H, Fukuda N, Tsunemi

- A, Tahira K, Matsumoto T, Takayama T, Chiku M, Saito S, Sato Y, Hirayama A, Matsumoto K, Soma M. Influence of genetic polymorphisms in oxidative stress related genes and smoking on plasma MDA-LDL, soluble CD40 ligand, E-selectin and soluble ICAM1 levels in patients with coronary artery disease. *Med Sci Monit*. 2009;15(7):CR341-8.
- 5) Naganuma T, Nakayama T, Sato N, Fu Z, Yamaguchi M, Soma M, Aoi N, Usami R, Doba N, Hinohara S. Haplotype-based case-control study between human apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox effector factor-1 gene and cerebral infarction. *Clin Biochem*. 2009;42(15):1493-9.
- 6) Yamaguchi M, Nakayama T, Fu Z, Naganuma T, Sato N, Soma M, Doba N, Hinohara S, Morita A, Mizutani T. Relationship between haplotypes of KCNN4 gene and susceptibility to human vascular diseases in Japanese. *Med Sci Monit* 2009;15(8):CR389-97.
- 7) Wang Z, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Ohta M, Soma M, Aoi N, Ozawa Y, Ma Y. The purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2 (P2RY2) gene associated with essential hypertension in Japanese men. *J Hum Hypertens* 2009: in press
- 8) Nakazato T, Nakayama T, Naganuma T, Sato N, Fu Z, Wang Z, Soma M, Sugama K, Hinohara S, Doba N. Haplotype-based case-control study of receptor (calcitonin) activity-modifying protein-1 gene in cerebral infarction. *J Hum Hypertens* 2009 :in press
- 9) Wang Z, Nakayama T, Sato N, Yamaguchi M, Izumi Y, Kasamaki Y, Ohta M, Soma M, Aoi N, Ozawa Y, Ma Y, Doba N, Hinohara S. Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2 (P2RY2) gene is associated with cerebral infarction in Japanese subjects. *Hypertens Res* 2009;2(11):989-96.
- 10) Wang ZX, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Ohta M, Soma M, Aoi N, Matsumoto K, Ozawa Y, Ma YT, Doba N, Hinohara S. Association of the Purinergic Receptor P2Y, G-Protein Coupled, 2 (P2RY2) Gene With Myocardial Infarction in Japanese Men. *Circ J* 2009;73(12):2322-9.
- 11) Naganuma T, Nakayama T, Sato N, Fu Z, Soma M, Yamaguchi M, Shimodaira M, Aoi N, Usami R. Haplotype-based case-control study on human apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox effector factor-1 gene and essential hypertension. *Am J Hypertens* 2010;23(2):186-91.

2. 学会発表

- 1) 田平和宣、上野高浩、福田昇、常見明子、松本太郎、松本史郎、相馬正義、松本絃一、榛葉繁紀、松本宜明. 白血球と内臓、皮下脂肪、肝臓での生体内時計遺伝子発現の日内変動に対する肥