

201110004A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

創薬および臨床試験の効率化に資するメタボリックシンドロームと

心血管病のモデルラットの開発研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 規弘

平成24(2012)年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
創薬および臨床試験の効率化に資するメタボリックシンドロームと 心血管病のモデルラットの開発研究	----- 1
加藤 規弘	
II. 分担研究報告	
1. メタボリックシンドロームと心血管病のモデルラットの開発研究-	5
加藤 規弘	
2. 心血管病評価用ラットパネルの整備に関する研究	----- 8
並河 徹	
3. モデルラットを用いた心血管病の成因・病態に関する研究	---- 12
福田 昇	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 16

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進 研究事業）

総括研究報告書

創薬および臨床試験の効率化に資するメタボリックシンドロームと  
心血管病のモデルラットの開発研究

研究代表者 加藤 規弘 国立国際医療研究センター部長

研究要旨 心血管病（ないし動脈硬化）リスクファクターである高血圧や糖尿病に関しては、各々適切なモデル動物がいくつか存在するが、心血管病そのものに関しては、必ずしも十分な整備状況といえないため、新規モデルの開発を試みる。高血圧自然発症ラット（SHR）系統から作成したコンジェニック系統に関して、高血圧、脳卒中易発症性などの感受性遺伝子座の探索、遺伝子間相互作用の検討、疾患モデルとしての特徴付け・表現型解析を行った。また、げっ歯類の弱点とされてきた cholesteryl ester transfer protein（CETP）のトランスジェニック・ラットを作成し、ヒトの動脈硬化型脂質異常を模することができた。さらに SHR 系統での高血圧性腎硬化症の解析により、補体 C3 の遺伝的な発現増加、C3a 受容体を介した間葉系細胞の合成型形質転換、アンジオテンシン II（Ang II）産生を認め、同モデルが心血管病の基盤病態—リモデリング—に対する新規の治療標的開発において有用性が高いことを示した。

研究分担者

並河徹・島根大学医学部教授  
福田昇・日本大学大学院教授

心血管病関連形質（動脈硬化リスクファクター形質と個々の臓器障害）を特徴的に有する、一連の近交系ラットから“心血管病評価用ラットパネル”を作成・整備する部分であり、三つ目は心血管病の治療法開発に向けた病態探究（モデル動物を活用した研究）の実践である。

（倫理面への配慮）

当該研究ではヒト由来試料を取り扱わない。「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、動物愛護に配慮して研究立案し、立案した動物実験計画の妥当性について、機関内の動物実験委員会の審査と許可を受けて進める。

A. 研究目的

本研究は（1）ヒトの動脈硬化性心血管病を探究する上でのげっ歯類の弱点とされてきた cholesteryl ester transfer protein（CETP）の欠損を補うべく、トランスジェニック（Tg）ラットを作成して、脂質代謝障害から動脈硬化への進展を模する新規モデル動物を開発すること、（2）メタボリック・シンドロームなどの動脈硬化リスクファクターの集積に関して、代表的な組み合わせパターン疾患モデルラットを新たに開発すること、そして（3）これらを創薬および臨床試験の効率化に役立てるべく“心血管病評価用ラットパネル”として整備すること、を主たる目的とする。

C. 研究結果

1. ヒトCETP-Tgラットの作成・表現型解析  
transgene の導入に成功した系統が全部で 5 系統あり、そのうちの、3 系統の繁殖に成功した。血中脂質レベルに関しては、導入された copy 数にほぼ応じて（多くなればなるほど）総コレステロール（TC）が顕著に低下し、逆に中性脂肪（TG）が顕著に上昇

B. 研究方法

本研究の実施計画は大きく三つの部分から成る。一つ目は、SHR にヒト CETP を導入した Tg ラットを作成・表現型解析する部分であり、二つ目は、同 Tg ラットも含めて、

していた〔non-Tg 系統に比べて TC が 1/2-1/3、TG が 3-4 倍に増加〕。もともとラット TC の最大アポ蛋白分画は HDL であるが、TC (HDL 分画) ↓、TG (VLDL 分画) ↑という、ヒトの動脈硬化型脂質異常が見られた。Tg ラットでは、さらに脂肪肝の進行、雌での血圧上昇 (16 週齢で 14-19 mmHg 上昇) が認められた。

## 2. “心血管病評価用ラットパネル”の整備

SHR およびその亜系である脳卒中易発症 SHRSP (SHR-SP) より作成したコンジェニック系統に関して、高血圧、脳卒中、心肥大、脂質、体重、脂肪重量などの疾患関連表現型を調べた。なかでも顕著な表現型を示す「劇症型脳卒中易発症 SHR (E-SHRSP)」系統とともに、染色体 1 番のストレス感受性、染色体 3 番の心肥大、染色体 4 番のメタボリック・シンドローム (代謝関連形質の集積)、染色体 15 番の脂質、等の (作成した) コンジェニック系統に関する臨床的評価を行った。また、多因子疾患の成因・病態解析で重要な課題「遺伝子間相互作用」を探究すべく、コンジェニック系統同士を組み合わせたもの (double、triple コンジェニック系統) の開発を進めた。特に E-SHRSP は、通常餌での飼育下で高率に脳卒中を自然発症すること、食塩負荷により更に発症時期を早められること、等が判明した。さらに詳細な病態機序の解析 (マイクロアレイ解析など) を行ったところ、脳での発現変動を示す脳卒中感受性関連分子の候補がいくつか見いだされた。

## 3. モデルラットでの心血管病の病態探究

心血管病のなかでも特に腎障害 (高血圧性腎硬化症) に関して、先ず血圧影響の無い培養細胞 (*in vitro*) 実験系において補体 C3 の病因/病態的関与の検討を進めた。腎臓での C3、C3a 受容体の免疫染色により、C3 が糸球体で、C3a 受容体が尿細管で各々発現していることを確認した。糸球体からメサンジウム細胞 (MC) を単離後継代培養し、SHR および SHR-SP の MC が、対照の WKY

の MC よりも過剰増殖を示すこと、合成型形質マーカーの高発現、Ang II の過剰産生を示すことを見いだした。さらに個体 (*in vivo*) 実験系での C3a 受容体拮抗薬の投与は、これらの変動を抑制した。

## D. 考察

CETP-Tg ラットに関しては、今後、更に広範な表現型解析を進めるとともに、脂肪肝や動脈硬化病変などの病理学的所見を調べて、ヒト疾患モデルとしての有用な情報を付加していく。本研究で作成した一連のコンジェニック系統のなかでも、特に E-SHRSP や脳卒中関連コンジェニック系統は、脳卒中の自然歴と薬物介入の timing、機序を検討するうえで有用性が高いモデルと考えられる。

また従来、高血圧性心血管/腎障害は高血圧の“結果”と考えられていたが、血圧影響の無い培養細胞系においても、内因性異常として C3 の遺伝的過剰発現とそれに伴う細胞増殖が認められた。こうした知見は、新規の治療標的開発において有望な介入ポイントを提供し得るものと考えられる。

## E. 結論

CETP の Tg ラットを開発し、ヒトの動脈硬化型脂質異常を呈することを確認した。SHR 系統から、一連の特徴的な心血管病関連表現型を示すコンジェニック系統を開発し心血管病評価用ラットパネルとして整備した。高血圧性腎障害の病態改善に、補体 C3 阻害の治療的有用性を確証した。

## F. 健康危険情報

特記すべきものなし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Nabika T, Ohara H, Kato N, Isomura M. The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies? *Hypertens Res.* 2012 Mar 8. doi:

10.1038/hr.2012.30. [Epub ahead of print].

Takeuchi F, Kato N, *et al.* Genome-wide association study of coronary artery disease in the Japanese. *Eur J Hum Genet.* 2012, 20: 333-40.

Kato N, *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat Genet.* 2011, 43: 531-8.

Takeuchi F, Kato N, *et al.* Detection of common single nucleotide polymorphisms synthesizing quantitative trait association of rarer causal variants. *Genome Res.* 2011, 21: 1122-30.

Sasawatari S, Kato N, *et al.* The solute carrier family15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice. *Gastroenterology.* 2011, 140: 1513-25.

Takeuchi F, Kato N, *et al.* Confirmation of ALDH2 as a major locus of drinking behavior and of its variants regulating multiple metabolic phenotypes in Japanese. *Circ J.* 2011, 75: 911-8.

Hashimoto M, Nabika T, *et al.* Effects of hydrogen-rich water on abnormalities in a SHR.Cg-Leprcp/NDmcr rat - a metabolic syndrome rat model. *Med Gas Res.* 2011, 1: 26.

Xiao B, Harada Y, Kawakami K, Nabika T. A 1.8-Mbp fragment on chromosome 1 affects sympathetic response to stress: evaluation in reciprocal congenic strains between stroke-prone spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *J Hypertens.* 2011, 29: 257-65.

Han Y, Fukuda N, *et al.* Role of complement 3a in the synthetic phenotype and angiotensin II-production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J*

*Hypertens.* 2012, 25: 284-9.

Yoshida Y, Fukuda N, *et al.* Treatment with valsartan stimulates endothelial progenitor cells and renal label-retaining cells in hypertensive rats. *J Hypertens.* 2011, 29: 91-101.

Yamamoto C, Fukuda N, *et al.* Protective effects of statin on cardiac fibrosis and apoptosis in adrenomedullin knockout mice with the angiotensin II and high salt loading. *Hypertens Res.* 2011, 34: 348-53.

## 2. 学会発表

加藤規弘, 竹内史比古, 山本健, 磯野正人, 勝谷友宏, 杉山卓郎, 並河徹, 藤岡農宏, 大中佳三, 家森幸男, 山口修平, 小林祥泰, 高柳涼一, 荻原俊男. 日本人での大規模追試研究による、7つの候補遺伝子と血圧値/高血圧との関連の検討. 第34回日本高血圧学会総会, 宇都宮, 10月, 2011.

Horikoshi M, Kato N, Wiltshire S, Asimit J, Rayner NW, Robertson N, Takeuchi F, Teo YY, Zeggini, E, McCarthy M, Morris A, T2D-GENES Consortium. Trans-Ethnic Fine-Mapping of T2D Susceptibility Loci. ADA Annual Meeting 2011, San Diego, USA, June, 2011.

Tsend-Ayush Gandolgor, 小川淑子, 大原浩貴, 崔宗虎, 並河徹: SHR-SP由来の第1、18染色体領域は相乗的にSHRの脳卒中感受性を亢進させる. 第58回日本実験動物学会総会, 東京都江戸川区, 2011年5月25日~27日

桐原由美子, 武智眞由美, 黒崎薫, 海津幸子, 並河徹, 山田高也: Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラットの長期飼育における病理学的変化について. 第58回日本実験動物学会総会, 東京都江戸川区, 2011年5月25日~27日

並河徹: 疾患モデルラット研究の最前線. 第47回高血圧関連疾患モデル学会学術総

会，北海道，2011年9月6日～7日（座長）

池田和也、福田 昇、遠藤守人、山元智衣、上野高浩、松本紘一、相馬正義. 高血圧性血管および腎リモデリングにおける補体C3の役割. 第40回日本心脈管作動物質学会、高松、2011.02.

Zhou Xueli、福田 昇、上野高浩、遠藤守人、松本紘一、相馬正義. UUOモデルマウスでの腎髄質上皮間葉化(EMT)による補体C3を介した腎尿細管でのレニン産生. 第47回高血圧関連疾患モデル学会、札幌、2011.09

Zhou Xueli、福田 昇、遠藤守人、上野高浩、松本紘一、相馬正義. 腎尿細管での上皮間葉化(EMT)現象により補体C3とレニン分泌. 第41回日本腎臓学会東部学術大会、東京、2011.10

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべきものなし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進 研究事業）  
分担研究報告書

メタボリックシンドロームと心血管病のモデルラットの開発研究

研究代表者 加藤 規弘 国立国際医療研究センター部長

研究要旨 心血管病（ないし動脈硬化）リスクファクターである高血圧や糖尿病に関しては、各々適切なモデル動物がいくつか存在するが、心血管病そのものに関しては、必ずしも十分な整備状況といえないため、新規モデルの開発を試みる。高血圧自然発症ラット（SHR）系統から作成したコンジェニック系統は顕著な脳卒中易発症性や心肥大、脂質異常等を示した。また、げっ歯類の弱点とされてきた cholesterol ester transfer protein（CETP）のトランスジェニック・ラットを作成し、ヒトの動脈硬化型脂質異常を模することができた。

A. 研究目的

本研究は（1）ヒトの動脈硬化性心血管病を探究する上でのげっ歯類の弱点とされてきた cholesterol ester transfer protein（CETP）の欠損を補うべく、トランスジェニック（Tg）ラットを作成して、脂質代謝障害から動脈硬化への進展を模する新規モデル動物を開発すること、（2）メタボリック・シンドロームなどの動脈硬化リスクファクターの集積に関して、代表的な組み合わせパターン疾患モデルラットを新たに開発すること、そして（3）これらを創薬および臨床試験の効率化に役立てるべく“心血管病評価用ラットパネル”として整備すること、を目的とする。

B. 研究方法

本研究の実施計画は大きく二つの部分から成る。一つは、SHR にヒト CETP を導入した Tg ラットを作成・表現型解析する部分であり、もう一つは、同 Tg ラットも含めて、心血管病関連形質（動脈硬化リスクファクター形質と個々の臓器障害）を特徴的に有する、一連の近交系ラットから“心血管病評価用ラットパネル”を作成・整備する部分である。

（倫理面への配慮）

当該研究ではヒト由来試料を取り扱わない。「研究機関等における動物実験等の実

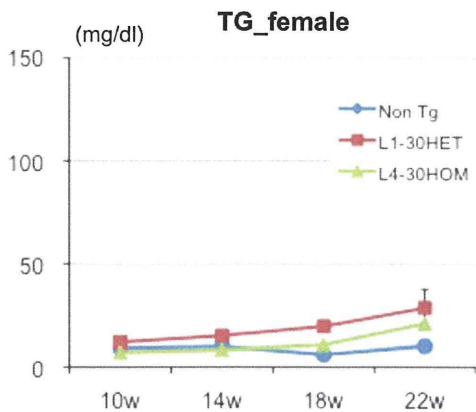
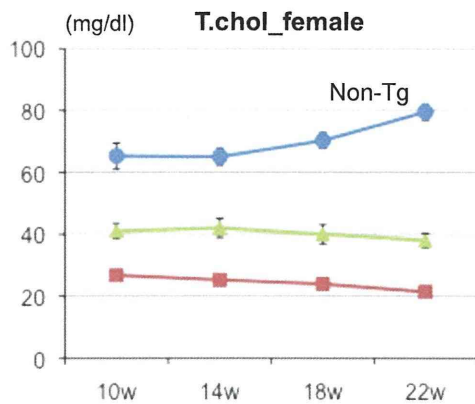
施に関する基本指針」および「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し、動物愛護に配慮して研究立案し、立案した動物実験計画の妥当性について機関内の動物実験委員会の審査と許可を受けて進める。

C. 研究結果

1. ヒト CETP-Tg ラットの作成・表現型解析  
transgene の導入に成功した系統が全部で 5 系統あり、そのうちの、3 系統（L1-6HOM、L1-30HET、L4-30HOM）の繁殖に成功した。L1-30HET のホモ型作成を試みたが、胎生致死の可能性が高く出生しないため、ヘテロ型状態で維持しており、L1-6HOM は現在表現型解析中である。血中脂質レベルに関しては、導入 copy 数にほぼ対応して（多くなればなるほど）総コレステロール（TC）が顕著に低下し、逆に中性脂肪（TG）が顕著に上昇していた〔non-Tg 系統に比べて TC が 1/2-1/3 以下、TG が 3-4 倍以上に増加〕。TG の上昇は雄ラットでより顕著であった。もともとラット TC の最大アポ蛋白分画は HDL であるが、TC（HDL 分画）↓、TG（VLDL 分画）↑という、ヒトの動脈硬化型脂質異常が見られた。Tg ラットでは、さらに脂肪肝の進行、雌での血圧上昇（16 週齢で 14-19 mmHg 上昇、 $P<0.05$ ）が認められた。

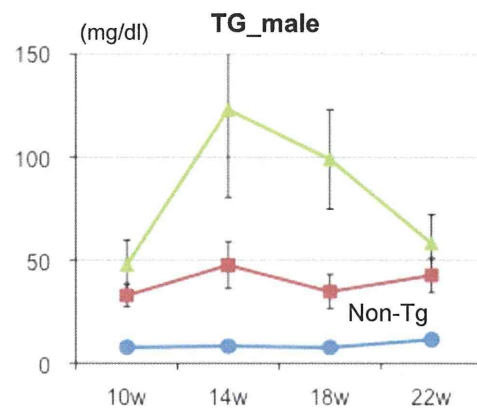
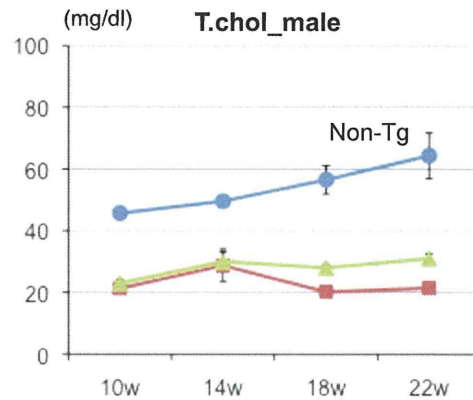
2. “心血管病評価用ラットパネル”の整備

SHR およびその亜系である脳卒中易発症 SHRSP (SHR-SP) より作成したコンジェニック系統に関して、高血圧、脳卒中、心肥大、脂質、体重、脂肪重量などの疾患関連表現型を調べた。なかでも顕著な表現型を示す「劇症型脳卒中易発症 SHR (E-SHRSP)」系統とともに、染色体 1 番のストレス感受性、染色体 3 番の心肥大、染色体 4 番のメタボリック・シンドローム (代謝関連形質の集積)、染色体 15 番の脂質、等の (作成した) コンジェニック系統に関する臨床的評価を行った。特に E-SHRSP は、通常餌での飼育下で高率に脳卒中を自然発症すること、食塩負荷により更に発症時期を早められること、等が判明した。さらに詳細な病態機序の解析 (マイクロアレイ解析など) を行ったところ、脳での発現変動を示す脳卒中感受性関連分子の候補がいくつか見



だされた。

#### D. 考察



CETP-Tg ラットに関しては、今後、更に広範な表現型解析を進めるとともに、脂肪肝や動脈硬化病変などの病理学的所見を調べて、ヒト疾患モデルとしての有用な情報を付加していく (上・左図参照)。

E-SHRSP や脳卒中関連コンジェニック系統は、脳卒中の自然歴と薬物介入の timing、機序を検討するうえで有用性が高いモデルと考えられる。

#### E. 結論

CETP の Tg ラットを開発し、ヒトの動脈硬化型脂質異常を呈することを確認した。SHR 系統から、一連の特徴的な疾患関連表現型を示すコンジェニック系統を開発・整備した。

#### F. 研究発表 論文発表



Takeuchi F, Kato N, *et al.* Genome-wide association study of coronary artery disease in the Japanese. *Eur J Hum Genet.* 2012, 20: 333-40.

Kato N, *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat Genet.* 2011, 43: 531-8.

Takeuchi F, Kato N, *et al.* Detection of common single nucleotide polymorphisms synthesizing quantitative trait association of rarer causal variants. *Genome Res.* 2011, 21: 1122-30.

Sasawatari S, Kato N, *et al.* The solute carrier family15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice. *Gastroenterology.* 2011, 140: 1513-25.

Takeuchi F, Kato N, *et al.* Confirmation of ALDH2 as a major locus of drinking behavior and of its variants regulating multiple metabolic phenotypes in Japanese. *Circ J.* 2011, 75: 911-8.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべきものなし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進 研究事業）  
分担研究報告書

心血管病評価用ラットパネルの整備に関する研究

研究分担者 並河 徹 島根大学医学部 教授

研究要旨 代表的な遺伝的高血圧・脳卒中モデルである stroke-prone SHR (SHR-SP)をベースに、同系統の持つ未知の高血圧、脳卒中遺伝子を対照ラットにうつすことで、限られた染色体領域のみで高血圧、脳卒中を起こすモデル系統を作成することを目的とし、数系統のコンジェニック系統の作成を行った。SHR と SHR-SP 間の脳卒中感受性の違いはわずか2つの染色体領域の入れ換えによって大部分説明可能であり、確立したコンジェニック系統は新たなモデル動物として有用と考えられた。これに対し、SHR-SP と WKY 間の血圧の相違を説明するには3カ所以上の染色体領域を入れ換える必要があることが示唆された。現在、このような triple および quadruple コンジェニック系統の開発を継続している。

A. 研究目的

近年の大規模なゲノムワイド関連解析 (GWAS) により発見された原因遺伝子の効果は非常にわずかであることがわかってきた。このことは、遺伝子どうしの相互作用が疾病発症の鍵となることを示唆する。そこで、本研究では、遺伝的な高血圧モデルから、複数の素因遺伝子領域を正常血圧モデルに入れることで、限られた数の染色体領域の組み合わせで親系統と同等の高血圧や脳卒中を起こす新たな系統を作出し、遺伝子相互作用の解明を行い、新たな発症機序に基づいた創薬につなげることを目的とした。

B. 研究方法

脳卒中感受性遺伝子座の検討：これまでの研究で脳卒中易発症自然発症高血圧ラット (SHR-SP) と自然発症高血圧ラット (SHR) 間の高血圧や脳卒中の感受性の違いに、第1、第18染色体上の一部の領域が関連することが明らかになった。この2つの領域の遺伝子型をモニターしながら SHR、SHR-SP 間で5～6世代戻し交配をすることで、この領域のみを入れ換えたコンジェニック4系統を作成した。さらにこれらを交配することで、上記2領域をとともに入れ換えた

double コンジェニック2系統を作成した。

これらの計6系統のコンジェニック系統の雄ラットを用いて、1%食塩水による食塩負荷を行い、脳卒中発症までの期間（脳卒中潜伏期間）を検討した。また、食塩負荷時の血圧の変化について、telemetry を用いて検討した。

高血圧素因遺伝子座の検討：加藤らによる研究から、正常血圧対照ラット WKY の第3、4染色体を SHR-SP に移したコンソミック系統で、SHR-SP にくらべて有意な血圧低下を見ることが明らかになり、この染色体上に高血圧素因遺伝子が存在することが示唆された（未発表データ）。

double コンジェニック/サブコンジェニック系統の解析：これに、遺伝解析で明らかになった第1染色体の高血圧遺伝子領域を加え、WKY を背景に、SHR-SP 由来の第1、3染色体、第1、4染色体を入れた2つの double コンジェニック系統の作成を試み、2つの染色体領域の血圧への影響を検討した。また、第1染色体領域を細かく分けたサブコンジェニック系統を用いて、血圧や交感神経活性のストレス反応性を検討し、この領域内に存在するストレス感受性遺伝子の同定を試みた。

### C. 研究結果

- ① 脳卒中関連遺伝子座：脳卒中感受性遺伝子領域2カ所を SHR-SP と SHR との間で交換した2系統の double コンジェニックを完成し、この2領域が脳卒中感受性に対して大きな影響を及ぼすことが明らかになった。食塩負荷による脳卒中潜伏期間の平均値は SHR-SP で13日、SHR で90日以上なのに対して、SHR-SP で上記2領域のみを SHR 型としたものでは66日、SHR で上記2領域のみを SHR-SP 型としたものでは23日となった。すなわち、ゲノムのおよそ3%の領域を交換するだけで、SHR-SP と SHR の違いの殆どを説明できることが明らかとなった。さらに、食塩負荷による血圧の変化を telemetry system を用いて無麻酔無拘束下で連続的にモニターしたところ、SHR をベースに2領域を SHR-SP に置き換えた double コンジェニック系統のみで、有意な血圧上昇を観察することができた。
- ② 高血圧関連遺伝子座：WKY をベースに、第1、4染色体の高血圧関連領域を SHR-SP 由来のものに入れ換えた double コンジェニックを作成したが、血圧の有意な上昇はみられなかった。現在、第1、3染色体について同様のダブルコンジェニックを作成しており、完成し次第、血圧のモニターを行う予定である。
- ③ ストレス感受性遺伝子座：第1染色体高血圧関連領域をさらに細かく分けたサブコンジェニック系統を作成し、ストレス感受性を検討したところ、約1.8 Mb の領域が SHR-SP の特徴であるストレス感受性に影響を与えることが明らかとなった。今回、この領域をさらに小さくしたサブコンジェニック系統を新たに作成したところ、この系統ではストレス

感受性に変化がみられず、このサブコンジェニック系統の持つ領域は候補領域から除外できることが明らかとなった。現在、残りの領域に含まれる遺伝子について検討中である。

### D. 考察

ヒトにおける大規模 GWAS から、生活習慣病の発症には複数の遺伝素因の相互作用が重要である可能性が指摘されている。このことは、動物実験において、一カ所の高血圧感受性遺伝子領域を正常血圧ラットに導入するのみでは高血圧や脳卒中を起こし得ないことから示唆される。本研究では、SHR-SP の脳卒中感受性に関しては、2つの染色体領域（全ゲノムのおよそ3%に相当）によってその大半が説明できることが明らかとなった。さらにこの2領域はラットの食塩感受性に強い影響を示すことが今回新たに明らかとなった。SHR-SP と SHR 間で作成したダブルコンジェニック系統を用いた今回の検討は、①SHR-SP における食塩感受性および脳卒中感受性遺伝子の同定に近づいたこと、②これら2領域間の相互作用を解明することで、具体的な遺伝子間相互作用のメカニズムを解明できること、③これらの double コンジェニック系統と親系統の間でゲノムの約97%は同一であるため、高血圧や脳卒中感受性に関与する因子を調べたり、介入実験の効果について調べたりする上でより理想に近い実験モデルを提供できる、といった意義がある。

これに比べて、WKY と SHR-SP の間の血圧の違いについては、SHR-SP をベースにターゲット領域を WKY 型に変えることで明らかな血圧下降を観察出来る一方、同じ領域を SHR-SP から WKY に移しても十分な血圧上昇を得られないことから、より多くの遺伝子領域が複雑な相互作用をしている可能性が示唆された。これまで、第1染色体と第3、4染色体とを組み合わせ

double コンジエニック系統につき検討したが、いずれも WKY に比べて有意な血圧上昇を認めなかった。第 1 染色体のコンジエニック系統と SHR-SP の間で行った QTL 解析でも関連領域が同定できなかったことを考慮すると、おそらく、3 つ以上の領域が必要と考えられる。今後このような triple コンジエニック系統、quadruple コンジエニック系統を作成し、WKY をベースに少数の染色体領域のみを SHR-SP 型に変えることで明確な血圧上昇を来すモデルの開発を目指したい。このようなモデルが完成すれば、血圧制御における遺伝子間相互作用の解明につながるのみならず、WKY と遺伝的背景の近い高血圧モデルとして、各種の研究に有用なモデルになることが期待できる。

#### E. 結論

有限の遺伝子領域の組み合わせで多因子遺伝性疾患のモデル動物を構築することができることを示した。このようなモデルを複数用意することで、単独では効果の小さい遺伝的変異の相互作用に基づく生活習慣病の発症メカニズム解明に役立てることが出来る。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hashimoto M, Katakura M, Nabika T, Tanabe Y, Hossain S, Tsuchikura S, Shido O: Effects of hydrogen-rich water on abnormalities in a SHR.Cg-Leprcp/NDmcr rat — a metabolic syndrome rat model. *Medical Gas Research*. 2011; 3 (1) 1, p26.

Nabika T, Ohara H, Kato N, Isomura M: The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies? *Hypertens Res*. 2012 Mar 8. doi: 10.1038/hr.2012.30. [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

Tsend-Ayush Gandolgor, 小川淑子, 大原浩貴, 崔 宗虎, 並河 徹: SHR-SP 由来の第 1、18 染色体領域は相乗的に SHR の脳卒中感受性を亢進させる. 第 58 回日本実験動物学会総会, 東京都江戸川区, 2011 年 5 月 25 日~27 日

桐原由美子, 武智眞由美, 黒崎 薫, 海津幸子, 並河 徹, 山田高也: Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラットの長期飼育における病理学的変化について. 第 58 回日本実験動物学会総会, 東京都江戸川区, 2011 年 5 月 25 日~27 日

並河 徹: 疾患モデルラット研究の最前線. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 北海道, 2011 年 9 月 6 日~7 日 (座長)

並河 徹, 崔 宗虎, 小川淑子, Tsend-Ayush Gandolgor, 島田大輝, 川上浩平, 大原浩貴, 磯村 実: 遺伝解析に基づく新たなモデルラット作成: congenic strategy からの展開. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 札幌市, 2011 年 9 月 6-7 日

並河 徹, 崔 宗虎, 小川淑子, Tsend-Ayush Gandolgor, 島田大輝, 川上浩平, 大原浩貴, 磯村 実: 遺伝子解析に基づく新たなモデルラット作成: Congenic strategy からの展開. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 札幌市, 2011 年 9 月 6~7 日

小川淑子, Tsend-Ayush Gandolgor, 大原浩貴, 島田大輝, 川上浩平, 崔 宗虎, 並河 徹: 第 1, 18 染色体上の QTL は SHR-SP の脳卒中感受性の大部分を説明する. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 札幌市, 2011 年 9 月 6-7 日

Ferdous MZ, Xiao B, Ohara H, Kawakami K, Nabika T: Further refinement of the QTL regulating sympathetic stress-response in

SHR-SP. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会総会, 北海道, 2011 年 9 月 6 日～7 日

川上浩平, 野津吉友, 土倉 覚, 大野怜一郎, 頓宮美樹, 山田和夫, 山田高也, 小林裕太, 並河 徹: ラット用の片手持ち搾乳器の開発: WKY と SHR ラットの乳汁中の成分分析. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 札幌市, 2011 年 9 月 6-7 日

山下康子, 並河 徹, 丹羽正美: 虚血性脳神経細胞障害と SHR-SP/Ngsk. 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 札幌市, 2011 年 9 月 6-7 日

大原浩貴, 並河 徹: SHR-SPの脳卒中感受性は2つの染色体領域に起因する: double congenic系統での検討 (The stroke-susceptibility in SHR-SP is caused by two chromosome regions: a study on a double congenic strain) 宇都宮市 第34回日本高血圧学会総会 2011年10月20-22日

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべきものなし。

モデルラットを用いた心血管病の成因・病態に関する研究

研究分担者 福田 昇 日本大学大学院総合科学研究科 教授

研究要旨 高血圧自然発症ラット系統（SHR、SHR-SP）の腎メサンジウム細胞では補体 C3 が遺伝的に高発現し、間葉系細胞の合成型形質への転換とアンジオテンシン II（Ang II）の産生が生じて、腎メサンジウム細胞の過剰増殖により高血圧性腎硬化症が引き起こされている。

#### A. 研究目的

最近、C3a-C3a受容体系が間葉系臓器の発生、脱分化、間葉系幹細胞性の維持に関与する事が明らかになった。我々はSHR由来間葉系細胞ではWKYに比較して補体C3を発現し、補体C3が心血管腎臓病を惹起している可能性を報告してきた。また補体C3は転写因子KLF-5の発現増加を介して、間葉系細胞を合成型形質に転換している事を報告した。今年度はSHR、SHR-SPの腎糸球体でのC3、C3a受容体発現、腎メサンジウム細胞(MC)の形質変換、過剰増殖、Ang II産生における補体C3の関与を検討した。

#### B. 研究方法

WKY、SHR、SHR-SPの腎臓でのC3、C3a受容体の免疫染色を行い、腎糸球体からMCを単離継代培養し、臭素化デオキシウリジン（BrdU）取り込みによるDNA合成、収縮型形質マーカー $\alpha$ -SMA、合成型形質マーカーOsteopontinの発現、RIAによるAng IIの産生を評価した。これらに対するC3a受容体拮抗薬の作用を検討した。WKY、SHR-SPでの*in vivo*食塩負荷実験でのBrdU取り込みにより臓器増殖を評価し、C3a受容体拮抗薬の作用を検討した。

（倫理面への配慮）

日本大学動物実験指針に基づき、動物実験を行った。

#### C. 研究結果

SHR、SHR-SPの糸球体ではC3を高発現し、

C3a受容体は尿細管で発現し、WKYと同様であった。SHR、SHR-SPのMCは、WKYに比して過剰増殖を示し、合成型形質マーカーを高発現し、Ang IIを過剰に産生していた。C3a受容体拮抗薬は、SHR、SHR-SP由来MCの増殖、DNA合成、Osteopontinの発現、Ang IIの産生を抑制し、 $\alpha$ -SMA発現を増加した。

#### D. 考察

今回の実験により、SHRおよびSHR-SPの腎糸球体MCでのC3の高発現が確認された。これは血圧の影響下に無い培養実験系においても観察され、高血圧の結果ではなく、内因性異常として、C3の遺伝的過剰発現が考えられた。C3は最終的にC3aとなり、C3aは免疫系に関与しているが、アナフィラトキシンとして間葉系細胞の増殖にも関与している。またC3は間葉系細胞の脱分化を維持している事が報告され、今回の結果からSHRおよびSHR-SPのMCではC3aが合成型形質変換、Ang II産生に関与していると考えられた。

#### E. 結論

高血圧のモデルラットであるSHRおよびSHR-SPでは、遺伝的に心血管腎臓などの間葉系臓器で補体C3が過剰に発現し、間葉系細胞を合成型に形質変換し、Ang II産生により心血管腎臓のリモデリングに関与している。したがって高血圧性血管障害、腎硬化症などの病態における補体C3の関与が考え

られ、新たな高血圧臓器合併症の治療ターゲットになると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Han Y, Fukuda N, et al. Role of complement 3a in the synthetic phenotype and angiotensin II-production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 25: 284-289, 2012.

Ikeda K, Fukuda N, et al. Role of complement 3a in the growth of mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2012 (in press).

### 2. 学会発表

池田和也、福田 昇、遠藤守人、山元智衣、上野高浩、松本紘一、相馬正義. 高血圧性血管および腎リモデリングにおける補体 C3 の役割. 第 40 回 日本心脈管作動物質学会、高松、2011.02.

Zhou Xueli、福田 昇、上野高浩、遠藤守人、松本紘一、相馬正義. UUOモデルマウスでの腎髄質上皮間葉化(EMT)による補体C3を介した腎尿細管でのレニン産生. 第47回 高血圧関連疾患モデル学会、札幌、2011.09

池田和也、福田 昇、遠藤守人、上野高浩、松本紘一、相馬正義. SHR および SHR-SP の腎臓リモデリングにおける補体 C3 の役割. 第 47 回 高血圧関連疾患モデル学会、札幌、2011.09.

Zhou Xueli、福田 昇、遠藤守人、上野高浩、松本紘一、相馬正義. 腎尿細管での上皮間葉化(EMT)現象により補体 C3 とレニン分泌. 第 41 回 日本腎臓学会東部学術大会、東京、2011.10

Zhou Xueli、福田 昇、上野高浩、遠藤守人、松本紘一、相馬正義. 腎尿細管での上皮間葉化(EMT)現象による補体 C3 を介したレニン分泌の検討. 第 34 回 日本高血圧学会、宇都宮、2011.10.

Zhou Xueli、福田 昇、上野高浩、遠藤守人、松本紘一、相馬正義. 腎髄質上皮間葉化(EMT)による補体C3を介した腎尿細管でのレニン産生. 第15回 日本心血管内分泌代謝学会、大阪、2011.11

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべきものなし。

## 別添5

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 【 書籍 】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
加藤規弘	高血圧関連遺伝子の解明はどこまで進みどこへ向かうのか？		EBM 循環器疾患の治療 2012- 2013	中外医学社	東京	2011	360-363
加藤規弘	ゲノムワイド関連解析 (GWAS)		動脈硬化予防	メディカルレビュー社	東京	2011	98-99
福田 昇	アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬	熊谷裕生、小室一成、堀内正嗣、森下竜一	高血圧ナビゲーター 第3版	メディカルレビュー	東京	2011	248-249

## 【 雑誌 】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeuchi F, Kato N <i>et al.</i>	Genome-wide association study of coronary artery disease in the Japanese.	<i>Eur J Hum Genet</i>	20(3)	333-40	2011
Kato N <i>et al.</i>	Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians.	<i>Nat Genet</i>	43(6)	531-8	2011
Takeuchi F, Kato N <i>et al.</i>	Detection of common single nucleotide polymorphisms synthesizing quantitative trait association of rarer causal variants.	<i>Genome Res</i>	21(7)	1122-30	2011



Nabika T <i>et al.</i>	The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies?	<i>Hypertens Res</i>	35(5)	477-484	2012
Hashimoto M, Nabika T <i>et al.</i>	Effects of hydrogen-rich water on abnormalities in a SHR.Cg-Leprcp/NDmcr rat - a metabolic syndrome rat model.	<i>Medical Gas Research</i>	3(1)	26	2011
Han Y, Fukuda N <i>et al.</i>	Role of complement 3a in the synthetic phenotype and angiotensin II-production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats.	<i>Am J Hypertens</i>	25(3)	284-289	2012
Ikeda K, Fukuda N <i>et al.</i>	Role of complement 3a in the growth of mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats.	<i>Hypertens Res</i>			印刷中

ARTICLE

# Genome-wide association study of coronary artery disease in the Japanese

Fumihiko Takeuchi<sup>1</sup>, Mitsuhiro Yokota<sup>2</sup>, Ken Yamamoto<sup>3</sup>, Eitaro Nakashima<sup>4,5</sup>, Tomohiro Katsuya<sup>6</sup>, Hiroyuki Asano<sup>7</sup>, Masato Isono<sup>1</sup>, Toru Nabika<sup>8</sup>, Takao Sugiyama<sup>9</sup>, Akihiro Fujioka<sup>10</sup>, Nobuhisa Awata<sup>11</sup>, Keizo Ohnaka<sup>12</sup>, Masahiro Nakatochi<sup>13</sup>, Hidetoshi Kitajima<sup>3</sup>, Hiromi Rakugi<sup>14</sup>, Jiro Nakamura<sup>4</sup>, Takayoshi Ohkubo<sup>15,16</sup>, Yutaka Imai<sup>15</sup>, Kazuaki Shimamoto<sup>17</sup>, Yukio Yamori<sup>18</sup>, Shuhei Yamaguchi<sup>19</sup>, Shotai Kobayashi<sup>20</sup>, Ryoichi Takayanagi<sup>21</sup>, Toshio Ogihara<sup>14,22</sup> and Norihiro Kato<sup>\*1</sup>

A new understanding of the genetic basis of coronary artery disease (CAD) has recently emerged from genome-wide association (GWA) studies of common single-nucleotide polymorphisms (SNPs), thus far performed mostly in European-descent populations. To identify novel susceptibility gene variants for CAD and confirm those previously identified mostly in populations of European descent, a multistage GWA study was performed in the Japanese. In the discovery phase, we first genotyped 806 cases and 1337 controls with 451 382 SNP markers and subsequently assessed 34 selected SNPs with direct genotyping (541 additional cases) and *in silico* comparison (964 healthy controls). In the replication phase, involving 3052 cases and 6335 controls, 12 SNPs were tested; CAD association was replicated and/or verified for 4 (of 12) SNPs from 3 loci: near *BRAP* and *ALDH2* on 12q24 ( $P=1.6 \times 10^{-34}$ ), *HLA-DQB1* on 6p21 ( $P=4.7 \times 10^{-7}$ ), and *CDKN2A/B* on 9p21 ( $P=6.1 \times 10^{-16}$ ). On 12q24, we identified the strongest association signal with the strength of association substantially pronounced for a subgroup of myocardial infarction cases ( $P=1.4 \times 10^{-40}$ ). On 6p21, an HLA allele, DQB1\*0604, could show one of the most prominent association signals in an ~8-Mb interval that encompasses the *LTA* gene, where an association with myocardial infarction had been reported in another Japanese study. CAD association was also identified at *CDKN2A/B*, as previously reported in different populations of European descent and Asians. Thus, three loci confirmed in the Japanese GWA study highlight the likely presence of risk alleles with two types of genetic effects – population specific and common – on susceptibility to CAD.

*European Journal of Human Genetics* advance online publication, 5 October 2011; doi:10.1038/ejhg.2011.184

**Keywords:** coronary artery disease; gene; association study; Japanese

## INTRODUCTION

Coronary artery disease (CAD) and its main complication, myocardial infarction (MI), are the leading causes of death and disability worldwide, with genetic component substantially contributing to the pathogenesis.<sup>1</sup> Genome-wide association (GWA) studies of common single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have recently been reported to identify susceptibility loci for CAD and/or MI mostly in populations of European descent.<sup>2–9</sup> Although reproducible evidence of disease association has been obtained at a few candidate loci that were originally detected through GWA scan, for example, near the *CDKN2A/B* gene on chromosome 9p21, in different populations of European descent and Asians,<sup>1,10,11</sup> the extent to which disease

association differs or overlaps between populations remains unknown. Besides comparing the genetic associations between European-descent and Japanese populations, we aim to identify new genetic variants through a GWA study.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

Detailed characteristics of the subjects analyzed in each stage of the study are described in Table 1 and Supplementary Note. Our CAD genetic studies were originally organized as part of an ongoing GWA study for cardiometabolic disorders among Japanese subjects. All participants are of Japanese ancestry. Cases were enrolled from clinical practices or annual medical checkups at

<sup>1</sup>Department of Gene Diagnostics and Therapeutics, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Department of Genome Science, Aichi-Gakuin University, School of Dentistry, Nagoya, Japan; <sup>3</sup>Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan; <sup>4</sup>Division of Endocrinology and Diabetes, Department of Internal Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; <sup>5</sup>Department of Diabetes and Endocrinology, Chubu Rosai Hospital, Nagoya, Japan; <sup>6</sup>Department of Clinical Gene Therapy, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan; <sup>7</sup>Department of Cardiology, Chiousha Iwakura Hospital, Iwakura, Japan; <sup>8</sup>Department of Functional Pathology, Shimane University School of Medicine, Izumo, Japan; <sup>9</sup>Institute for Adult Diseases, Asahi Life Foundation, Tokyo, Japan; <sup>10</sup>Amagasaki Health Medical Foundation, Amagasaki, Japan; <sup>11</sup>Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Disease, Osaka, Japan; <sup>12</sup>Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan; <sup>13</sup>Department of Biotechnology, Nagoya University School of Engineering, Nagoya, Japan; <sup>14</sup>Department of Geriatric Medicine and Nephrology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan; <sup>15</sup>Department of Planning for Drug Development and Clinical Evaluation, Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Sendai, Japan; <sup>16</sup>Department of Health Science, Shiga University School of Medical Science, Otsu, Japan; <sup>17</sup>Second Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan; <sup>18</sup>Mukogawa Women's University Institute for World Health Development, Nishinomiya, Japan; <sup>19</sup>Internal Medicine III, Shimane University School of Medicine, Izumo, Japan; <sup>20</sup>Shimane University Hospital, Izumo, Japan; <sup>21</sup>Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan; <sup>22</sup>Osaka General Medical Center, Osaka, Japan  
\*Correspondence: Dr N Kato, Department of Gene Diagnostics and Therapeutics, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan. Tel: +81 3 3202 7181; Fax: +81 3 3202 7364; E-mail: nokato@ri.ncgm.go.jp

Received 26 April 2011; revised 16 August 2011; accepted 7 September 2011

**Table 1** Baseline characteristics of case and control subjects in the present study

	Stage 1a		Stage 1b	Stage 2	
	Cases	Controls	Cases	Cases	Controls
<i>N</i>	806	1337	541	3052	6335
% of female	22.5	44.7	22.1	22.3	41.1
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23.9 ± 3.2	23.4 ± 3.2	23.6 ± 3.1	23.7 ± 3.0	23.0 ± 2.9
Mean age at recruitment (years)	66.6	65.6	65.8	62.7	62.4
Mean age at first event (years)	63.7	—	63.0	62.7	—
% of myocardial infarction	64.8	—	49.0	72.6	—
Former or current smoker (%)	67.4	41.3	62.8	65.7	44.1
Hypertension (%)	67.3	44.8	62.4	53.7	50.1
Diabetes mellitus (%)	53.5	25.5	36.0	37.9	16.7
Dyslipidemia (%)	61.0	54.8	50.7	51.9	49.9

Plus-minus values are means ± SD.

Diabetes, hypertension, and dyslipidemia were identified as risk factors on the basis of the meeting of diagnostic criteria or the receipt of treatment for these conditions (see Supplementary Note). Genotype frequencies in the general Japanese population ( $n=964$ ) derived from the Genome Medicine Database of Japan (GeMDBJ; <http://gemdbj.nibio.go.jp>) were used as an *in silico* control panel in stage 1b; the detailed characteristics of this sample were not made available.

Subjects genotyped in the present study (a total of 4399 cases and 7672 controls) were enrolled in four distinct sites of Japan: 346 cases and 272 controls in Tokyo; 3745 cases and 6335 controls in Nagoya; 303 cases and 567 controls in Osaka; and 5 cases and 498 controls in Shimane.

medical institutions and university hospitals in accordance with the uniformly defined criteria. These criteria included (1) a validated history of either MI (typical electrocardiographic changes; increased serum levels of enzymes/biomarkers including creatine kinase, aspartate aminotransferase, and troponin; a ventricular wall motion abnormality detectable with echocardiography) or coronary revascularization (coronary artery bypass grafting or percutaneous coronary intervention), or (2) subjective symptoms of angina pectoris with  $\geq 1$  major coronary vessels showing  $\geq 75\%$  stenosis documented by coronary angiography. Cases were consecutively recruited during a given period from different clinics participating in this cross-sectional study and could be representative for an average CAD patient population in Japan. Controls were deemed free of MI by history, physical examination, and electrocardiogram, also randomly selected from a cross-sectional study of cardiovascular risk factors without matching of cases and controls in the individual recruitment areas; the ratios of cases to controls were not concordant among the areas (Table 1) and the associations were tested separately. In addition to the samples genotyped here, we incorporated genotype frequencies in the general Japanese population ( $n=964$ ) derived from the Genome Medicine Database of Japan (GeMDBJ; <http://gemdbj.nibio.go.jp>), which was used as an *in silico* control panel, to increase the power of the GWA scan. Despite the recent changes in lifestyle, the prevalence estimate ( $< 2\%$ )<sup>12</sup> and incidence of CAD in the general Japanese population was much lower than those in Europeans.<sup>13</sup> CAD is one of the common diseases globally. Nevertheless, the *in silico* control panel seems to be useful in the case-control study, although we should take into account the possibility that some samples in this general Japanese population are falsely attributed.

All participants provided written informed consent, and the local ethics committees approved the protocols.

### Genome-wide scan

We designed a multistage GWA study of CAD in the Japanese population with three parallel tracks for SNP selection (Figure 1): genome-wide scan at stringent  $P$ -value threshold, genome-wide scan at less stringent threshold, plus targeted (or candidate-gene based) genotyping in stage 1 as separately described below. The discovery phase, stage 1, comprised stages 1a and 1b, which involved a combined panel of 1347 CAD cases and 1337 unaffected controls plus 964 general population subjects. In this discovery phase, we adopted a joint analysis strategy;<sup>14</sup> that is, 806 cases and 1337 controls were genotyped with the Infinium HumanHap550 or Human610-Quad BeadArray (Illumina, San Diego, CA, USA) in stage 1a, and only the top hit SNPs were followed up for *fast track* in stage 1b (Supplementary Table I). Here, in stage 1a, five SNPs were genotyped with the TaqMan assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) on 12q24 (four SNPs) and 6p21 (one SNP) apart from the whole-genome genotyping assay in order to infer haplotypes using not imputed but assayed

data of the SNPs that were in linkage disequilibrium (LD) to lead SNP (Supplementary Table II). SNPs showing significant ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) or suggestive ( $P < 5 \times 10^{-5}$  in the joint sample of stages 1a+1b) evidence of CAD association were forwarded to the replication phase, stage 2, which involved 3052 CAD cases and 6335 unaffected controls (Supplementary Table III). In stages 1b and 2, genotyping was performed with the TaqMan assay. A scheme for selecting SNPs genotyped in stages 1b and 2 is described in Supplementary Note.

Data cleaning and analysis were performed using PLINK (version 1.06)<sup>15</sup> as described elsewhere.<sup>16</sup> The  $\lambda$  value for the genomic control was 1.15 in the stage 1a GWA scan samples and the test statistic was adjusted using the genomic-control method.<sup>17</sup> To examine the potential influence of population structure on the association results for our GWA study, we further applied the EMMAX model,<sup>18</sup> an efficient implementation of a variance component approach to the stage 1a results. Details of SNP genotyping and quality control are described in Supplementary Note.

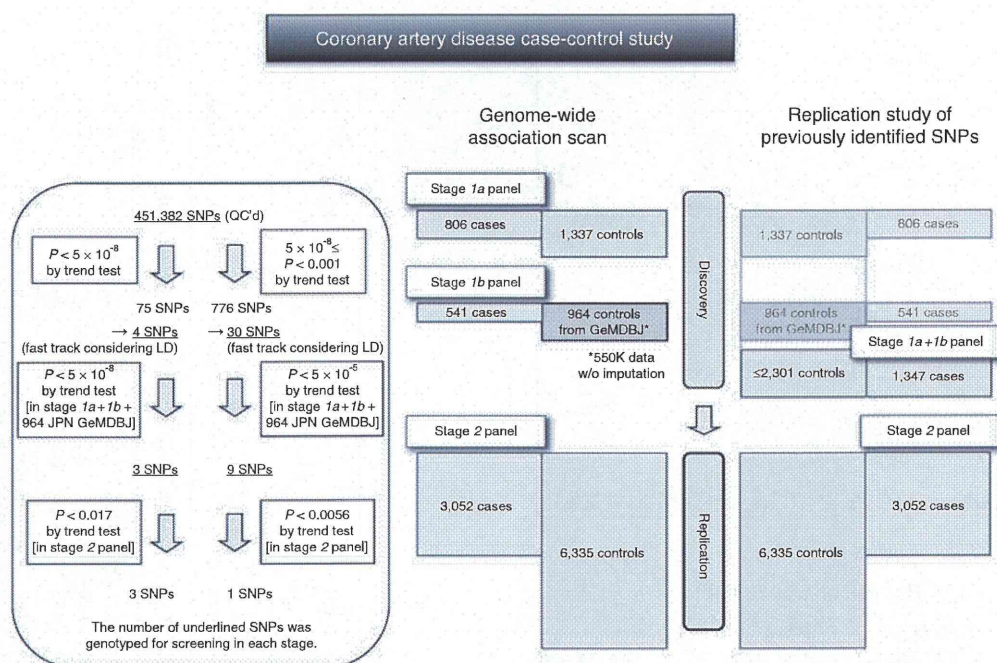
Imputation of genotypes to the HapMap phase 2 (JPT+CHB) set was carried out using BEAGLE software (version 3.0.4).<sup>19</sup> For 964 general Japanese population subjects from GeMDBJ in stage 1b, genotype results were available for SNPs assayed with the Infinium HumanHap550 (but not for imputed SNPs).

### Replication study of candidate loci

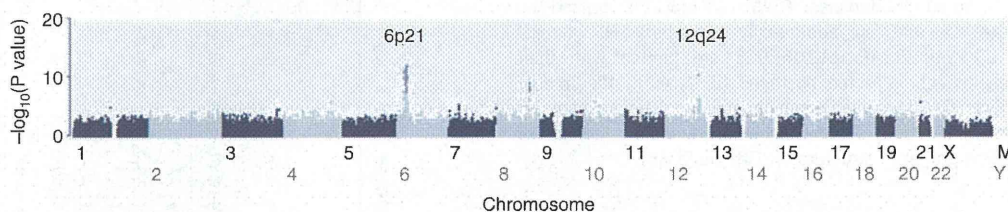
Along with genome-wide exploration, we aimed to replicate the disease association of 29 SNPs from 29 candidate loci, which had been robustly confirmed in GWA studies of CAD in European-descent populations (Supplementary Table IV).<sup>3-8</sup> We performed screening of these SNPs in the discovery phase sample (Figure 1). In addition, as we found prominent CAD associations of variants other than those previously identified on 6p21 and 12q24 in the Japanese,<sup>20,21</sup> we investigated in the whole sample (4399 CAD cases and 7672 controls) the genetic impacts of 3 SNPs from 3 known genes in the LTA (lymphotoxin- $\alpha$ ) cascade – rs1041981 in LTA, rs7291467 in LGALS2, and rs11066001 in BRAP.<sup>20-22</sup>

### Statistical analyses

**SNP association analysis.** The SNPs were tested for CAD association by using the Cochran–Armitage trend test. In the replication phase (stage 2), the significance level was set at  $P < 0.05$  after adjustment for multiple testing with Bonferroni correction. To summarize the statistical evidence for each SNP across different cohorts and multistage panels, we used the Mantel–Haenszel and inverse variance methods, which were implemented in the *rmeta* package for the R software (version 2.10.0; <http://cran.r-project.org/>), and combined the strata according to enrollment sites (Supplementary Note). For novel loci, we considered associations genome-wide significant if they attained  $P < 5 \times 10^{-8}$ . For the loci previously shown to have genome-wide significant associations, we considered a one-tailed  $P < 0.05$  (two-tailed  $P < 0.1$ ) as suggestive evidence of



**Figure 1** Flowchart summarizing the multistage design of the present study. Independent SNPs ( $r^2 < 0.8$ , in principle) were selected in the transition from stage 1a to stage 1b. The independency was secured between two parallel tracks for SNP selection in GWA scan (at stringent  $P$ -value threshold and at less stringent threshold) as well as within each track. Furthermore, on 6p21 and 12q24, we excluded SNPs that failed to show region-wide significant association with CAD after adjustment for lead SNPs: rs11752643 on 6p21 and rs3782886 on 12q24. Here, a region-wide significance level ( $P < 4.0 \times 10^{-5}$  for 6p21 and  $P < 2.9 \times 10^{-4}$  for 12q24) was set by Bonferroni correction (see Supplementary Table VI).



**Figure 2** Manhattan plots for stage 1 GWA study of CAD in the Japanese. SNPs showing  $P < 5 \times 10^{-8}$  are colored in red. The color reproduction of this figure is available at the *European Journal of Human Genetics* journal online.

replication. In addition, we tested the association of selected SNPs with MI (as well as CAD) between a subgroup of cases with a validated history of MI ( $n=3003$ ) and controls ( $n=7672$ ).

**Geographical variation.** In the stage 1a GWA scan samples, no difference was evident by visual inspection of the multidimensional scaling plots among the enrollment sites – Tokyo, Nagoya, Osaka, and Shimane. However, considering the potential presence of geographical variation within regions of interest on chromosomes, which could result in population structure, we also examined allele frequency differences between the subsets of controls, each derived from separate geographical regions of Japan (Supplementary Note and Supplementary Table V). Statistical significance at SNPs with a  $P$ -value of  $< 1 \times 10^{-5}$  is defined to be suggestive, as reported by Wellcome Trust Case-Control Consortium for the British population (Supplementary Figure I).<sup>2</sup>

**Haplotype phylogeny and positive selection on 12q24.** A previous European GWA study claimed significant evidence supporting CAD association and signatures of natural selection in a 1.6-Mb interval on 12q24,<sup>9</sup> near which the present Japanese GWA study also identified strong CAD associations at several SNP loci. Using a haplotype-based test, iHS,<sup>23</sup> we tested the hypothesis that a long-range, evolutionarily derived haplotype, upon which CAD risk alleles could lie, arose from a positive selection in the Japanese (or East Asians) independently of Europeans.

**Imputation of classic human leukocyte antigen (HLA) types on 6p21.** A number of SNPs in the extended major histocompatibility complex (MHC) region on 6p21 showed prominent CAD associations in stage 1a as well as suggestive evidence of geographical variation (Supplementary Figure I and Supplementary Table V). To examine the possibility that some classic HLA alleles were responsible for the association signals, we imputed classic HLA types for stage 1a samples using SNP genotypes and HLA alleles (at *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DQA1*, *-DQB1*, and *-DRB1* loci) of the HapMap JPT ( $n=44$ ) as a training set (see details in Supplementary Note),<sup>24</sup> employing the BEAGLE software (version 3.0.4).<sup>19</sup> In addition, we investigated the accuracy of imputation by comparing the tag SNP genotypes with the data for direct genotyping of HLA alleles in an independent panel of Japanese samples ( $n=92$ ), which were provided from the Cell Bank at the RIKEN BioResource Center through the National BioResource Project of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.<sup>25</sup> Alleles at *HLA-DRB1* and *HLA-DQB1* were determined by the Luminex microbead method (Luminex, Austin, TX, USA).

## RESULTS

### GWA analysis of CAD

In stage 1a, we observed a cluster of strong association signals in two chromosomal regions (Figure 2 and Supplementary Table VI) 12q24 and 6p21. On 12q24, significant association signals were observed