

閉塞性動脈硬化症感受性遺伝子の同定と機能解析

理化学研究所 ゲノム医科学研究センター
循環器疾患研究チーム
尾崎 浩一

1. 背景および目的

閉塞性動脈硬化症 (ASO: arteriosclerosis obliterans) は下肢の大血管が閉塞する病気で、これにより筋肉に血液が行き届かない状態となり、重症の場合には下肢の壊死に至ることもある。また、糖尿病や虚血性心、脳疾患も合併することも多々あり、その予後は不良である。

ゲノムには多様性があり、その中で最も多く存在するのは一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) である。近年のゲノム科学の進歩により、SNPがヒトの形質、特に生活習慣病の感受性に関わることが証明されてきている。循環器系疾患についても例外ではなく、我々が2002年に心筋梗塞 (MI) を対象とした約7万SNPを用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) を報告¹⁾して以来、欧米においてはさらに大規模なGWASが施行され、疾患感受性遺伝子群が次々に同定されてきている。

しかしながら、ASO/PADについては疫学的研究により遺伝的背景の存在が示唆されているにも関わらず、これまでに大規模なGWASは日本のみならず欧米においても行われていないのが現状であった。しかし、現在までにASOのSNPを用いた日本人におけるGWASおよび異なるサンプルを用いたホローアップ解析を施行しており、ASO感受性と統計学的にGWAS有意性を示すマーカーSNP群 (統計的なP値 $< \sim 10^{-8}$) を染色体13番 ($P = \sim 10^{-12}$)、4番 ($P = \sim 10^{-9}$) 上に同定していた。4番染色体の感受性領域には疾患に関連候補になりえるレセプター遺伝子が存在しており、機能的にもASOとの関連が示唆された。しかしながら、染色体13番上の関連SNPの存在する連鎖不平衡領域のゲノム上約70kbには既知の遺伝子が存在しておらず、これらのSNP群がどの遺伝子に影響を与えて疾患の発症、進展に関与しているかは不明なままである。そこで本研究ではこれら13番染色体上感受性領域から真の疾患感受性SNP (群) を探索すること、およびそのSNP (群) が影響を与えている遺伝子、すなわちASO感受性遺伝子の同定と解析を試みた。

2. 方法

- 1、連鎖不平衡領域の全SNP探索 ; National Center for Biotechnology Information (NCBI) のリファレンスゲノム配列 (約80kb) を元にPCRプライマー、シークエンシングプライマーを作成し、48人のASO患者 (オーダーメイド医療実現化プロジェクト、バイオバンクジャパン ; <http://biobank.jp.org/> によって収集された) についてサンガー法によるダイレクトシークエンスを試行した。配列解析ソフト (Sequencher 4. 10. 1) により配列をアSEMBルし、バリエーションの検出を行った。ジェノタイピング法はマルチプレックス-PCR-invader assay法²⁾を用いた。
- 2、プロモーターアッセイ ; pGL3 basic vector (Promega) に各候補遺伝子のエクソン1から約1kbをクローニングし、それぞれのSNPバリエーションを含む30塩基のオリゴをルシフェラーゼ遺伝子上流、下流に制限酵素サイトを利用して挿入した。プロモーターアッセイに用いたヒト動脈血管平滑筋細胞、内皮細胞はLonza社より、その培養培地はプライマリーセル社より購入した。
- 3、ASO感受性SNPが存在する配列領域が低分子RNAとして発現している可能性の探索 ; mirBase (<http://www.mirbase.org/>) により、ASOと関連があったSNP領域を検索し、miRNAとして発現している可能性がある2つのSNP配列についてビオチン化オリゴを作成した。動脈血管平滑筋細胞より低分子RNAをmirVanaTM miRNA isolation kit (Ambion社) により抽出しRNAプロットを作成し、ビオチンオリゴ-RNAハイブリダイゼーション法を用いてアビジンによる検出を試みた。
- 4、関連SNP領域の上流、下流 (それぞれ約200kb-300kb離れている) に存在する3遺伝子の nuclear factor kappa B (NFkB) の活性に与える影響 ; 3位遺伝子を強制発現ベクター、pCMV-FLAGa (SIGMA社) にクローニングし、Nucleofection (Lonza社) によりNFkB に特異的なE-セレクチンのプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子がつながったpNifty vector

とともにトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

ここで使用しているASO患者より得られたDNAはすべてインフォームドコンセントを取得したものであり、本研究の施行は理化学研究所における倫理委員会において承認されている。

3. 結果 研究成果

関連SNPを含む連鎖不平衡領域について詳細なSNP探索解析をダイレクトシーケンス法により試行した。の結果、欠失・挿入を含む179個のバリエーションを同定することができた。このバリエーションのタイピングデータをもとに連鎖不平衡解析を行いタグSNP(代表SNP；連鎖不平衡にあるSNP群から一つのSNPを選ぶ)を選抜し、さらにASOにおける関連解析を試行したところ、もともとのマーカーSNP以外に有意な関連を示すSNPがなかったことから、この領域における真のASO関連SNPはもともとのマーカーあるいはそれと連鎖不平衡にある7個のSNPであるといところまでこの時点で絞り込めた。次にこれらのSNPの機能解析に着手していった。第一には、この領域には遺伝子が存在しないという事から、これら8個のSNP領域のどれかがマイクロRNAなどの低分子RNAとして発現していて、SNPによりターゲットへの結合能が変化することにより疾患感受性が規定されているのではないかと考えた。低分子RNAの候補となるであろうSNP領域を2つ選び出すことができたが(方法参照)、実際の発現を動脈血管平滑筋細胞で確認したところ、その発現は全く認められず、低分子RNAとしての可能性は極めて低いものと考えられた。したがって次に、これらのSNP領域がエンハンサーあるいはサプレッサーとしてゲノム上少し離れた遺伝子に働いている可能性を考えプロモーターアッセイを試行している。この連鎖不平衡領域の外には上流200kbさかのぼったところに2つの遺伝子があり、さらに下流200kbのところには一つの遺伝子が存在していたためこれらの遺伝子上流約1kbをpGL3 basic vectorにクローニングし、それにSNP領域を挿入することにより、ルシフェラーゼアッセイを試行している。現在までに得られた結果としては血管平滑筋細胞で、この中の一つの遺伝子のプロモーターを用いた時にアレル間でプロモーター活性が変化するSNPを見つけており、さらに検討を進めている。また、これらの遺伝子の強制発現系を構築し血管平滑筋細胞に導入して炎症のメディエーターであるNfκBの活性を測定しているが、やはりその活性を変化する遺伝子が見出されており、さらに現在深く追求している段階にある。

4. 考察 まとめ

ASOの遺伝疫学についての報告は現在までにはっきりとしたものがなく、ASOの発症にほんとうに遺伝因子が関係しているかどうかはこれまで不明であった。しかし、本研究においてASOのGWASを通じた解析によりASOの発症には遺伝的背景が少なからず関与していることが判明してきている。特に感受性SNPの連鎖不平衡領域における詳細な解析を行い、13番染色体上の最も関連が強かったマーカーSNPおよびこれと連鎖不平衡にあるSNPがASOの感受性原因SNPであることをファインマッピングにより明らかにしてきた。また、その後の機能解析により、これらのSNPは同一ゲノム上の少し離れたところに位置している遺伝子の発現に影響を与えて疾患感受性に寄与している可能性が示唆されている。また、その遺伝子は炎症のメディエーターであるNfκBの活性を変化させて動脈硬化の発症に関与している可能性も今回の研究で明らかになりつつある。冠状動脈硬化を原因とする虚血性心疾患である心筋梗塞の感受性遺伝子もまた炎症系カスケードに関連していることがわかっており、やはりNfκBの活性を調節している可能性も強く示唆されている³⁾⁻⁵⁾。しかしながら、心筋梗塞に関連した遺伝子内のSNP群については今のところASOとの関連は見いだせていないこと、逆に今回発見したASO感受性SNPも心筋梗塞との関連は今のところ見いだせていないことから、関連する分子群から見ると、それぞれの血管の動脈硬化を一つの病態として一言で片づけることはできない。動脈硬化の発生する場所によって感受性を規定する役者がそれぞれ異なり、微妙な炎症系の活性化調節の違いが起ることにより、それぞれの動脈硬化に進展している可能性があることも今回の研究から示された。

ASOは末梢性の動脈硬化であり、糖尿病や虚血性心、脳疾患と合併することが多くその予後は非常に不良である。遺伝的リスクファクターを組み合わせることによるASOの早期予知診断は生活習慣の改善や治療法を決定する上で非常に重要になると考えられし、また、疾患発症の分子機構を根本から解明することによりエビデンスに基づいた新たな薬剤の分子ターゲットを選択することも可能となってくる。今後、さらに新たな真の疾患感受性遺伝子・遺伝的リスクファクターを同定すること、および今回発見された遺伝子も含めて、詳

細な機能解析を行い根本的な疾患の全容を解明することがエビデンスに基づく医療を確立するために重要になってくる。

1. 参考文献

- 1) Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, and Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin-a gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. **Nature Genetics** 32, 650-654 (2002).
- 2) Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H and Nakamura Y. A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. **Journal of Human Genetics** 46, 471-477 (2001).
- 3) Ozaki K, Inoue K, Sato H, Iida A, Ohnishi Y, Sekine A, Sato H, Odashiro K, Nobuyoshi M, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. Functional variation in *LGALS2* confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion *in vitro*. **Nature** 429, 72-75 (2004).
- 4) Ozaki K, Sato H, Iida A, Mizuno H, Nakamura T, Miyamoto Y, Takahashi A, Tsunoda T, Ikebana S, Kamatani N, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. A functional SNP in *PSMA6* confers risk of myocardial infarction in the Japanese population. **Nature Genetics** 38: 921-925 (2006).
- 5) Ozaki K, Sato H, Inoue K, Tsunoda T, Sakata Y, Mizuno H, Lin TH, Miyamoto Y, Aoki A, Onouchi Y, Sheu SH, Ikegawa S, Odashiro K, Nobuyoshi M, Juo SH, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T SNPs in *BRAP* associated with risk of myocardial infarction in Asian populations. **Nature Genetics** 41: 329-333 (2009)