

令和元年6月14日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09477

研究課題名(和文)新規高血圧遺伝子ATP2B1と頸動脈硬化症進展への病態解明と治療戦略の開発

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiology for development of new hypertension gene ATP2B1 and carotid atherosclerosis and development of treatment strategy

研究代表者

谷津 圭介(Yatsu, Keisuke)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10457856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はゲノムワイド関連解析により新規高血圧感受性遺伝子ATP2B1を同定した。この遺伝子は細胞内からCaイオンを排泄するPMCA1をコードする。我々はATP2B1血管平滑筋特異的KOマウス、全身ヘテロATP2B1KOマウスを作製し、血圧上昇機序に細胞内Ca動態変化やNOS活性の変化が関与し、骨密度やPTH分泌など血圧以外のCa動態にも関与していることを報告した。さらに、ATP2B1が高血圧合併腎障害に関わっていることが示唆された。また、人においてもATP2B1と動脈硬化の直接的な関連を検討するため、新規動脈硬化指標CAVIを測定した人を対象にATP2B1の有力なSNPを網羅的に解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧症は心血管疾患、脳血管障害の重大なリスクの一つである。本態性高血圧の機序解明、治療戦略開拓のため、ヒトゲノムを網羅的に調べ本態性高血圧候補遺伝子として最も関連がある遺伝子としてATP2B1を同定した。この遺伝子が血圧に関与するメカニズムを解明することで本態性高血圧の新たな治療法開発に繋げることができる。さらに、ヒト個々の遺伝子変異、SNPsに応じたテーラーメイド医療の開発に繋げる事ができる。

研究成果の概要(英文)：We identified, a novel hypertension susceptibility gene, ATP2B1 by genome-wide association analysis. This gene encodes PMCA1, which excretes Ca²⁺ from cells. We created ATP2B1 vascular smooth muscle specific KO mice and whole body ATP2B1 hetero KO mice. We reported that Ca²⁺ dynamics and alteration of eNOS activity were involved in the mechanism of blood pressure elevation by ATP2B1 and that it is also involved in bone density and PTH secretion. In addition, it was suggested that ATP2B1 is involved in hypertension related renal disease. Furthermore, in order to investigate the direct relationship between ATP2B1 and atherosclerosis also in human, we have comprehensively analyzed potent ATP2B1 SNPs in people who measured the new atherosclerosis index CAVI.

研究分野：高血圧症

キーワード：ATP2B1遺伝子疾患 SNPs 本態性高血圧 動脈硬化 CAVI ノックアウトマウス カルシウム動態 高血圧合併腎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

GWAS で明らかとなった新規高血圧成因遺伝子である ATP2B1 遺伝子は、近年、冠動脈疾患、メタボリックシンドローム、治療抵抗性高血圧などとの関連を認める報告が出始めていたが、動脈硬化症との直接的な関連は報告されていなかった。

2. 研究の目的

「ATP2B1 遺伝子が動脈硬化症に影響を与えているかを検討する」ことを目的とし、動脈硬化を定量化する指標である CAVI 検査(Cardio-Ankle Vascular Index: 心臓から大動脈、足首までの動脈の硬さを反映し、血圧に依存されない血管固有の硬さも反映する)を受けた患者において、「動脈硬化の程度と遺伝子型、合併症、薬剤応答性などの関係」を総合的に解析する。また、その病態機序を解明するために、「ATP2B1 遺伝子改変マウスを用い、動脈硬化症との関連を解明し、新たな治療戦略を探索」する。

3. 研究の方法

共同研究施設である小林内科クリニック(院長 小林英雄先生横浜市泉区中田南2-2-2)に通院加療中の生活習慣病患者で CAVI 検査を施行した患者約 1500 名を対象とした。サンプルサイズは、同クリニックに通院する患者数を元に期間内に収集可能な最大数とした。生活習慣病で加療中の CAVI 値を測定し診療データのある患者が 2015 年 9 月現在で 1200 名おり、同意を得て口腔粘膜や血液から DNA を採取した検体を収集していく。ATP2B1 遺伝子以外にタイピングする遺伝子生活習慣関連遺伝子群の選定には、高血圧感受性遺伝子を中心に、論文や機能などで候補遺伝子のランキングをつけ選定。さらに HapMap データや 1000genome から SNP の QC は、HWE $P > 0.001$, MAF > 0.01 , R_{sq} > 0.3 とし、日本人や東アジア人で多型性のある SNP を選択する。SNP タイピングと解析(平成 28-29 年度) SNP に関しては、TaqMan 法とシークエンシング法を利用し、効率的かつ一番安価な方法で、タイピング予定とした。統計学的手法としては、ヒト遺伝子多型と CAVI 値や内服薬、暴露要因など詳細な臨床データとのロジスティック回帰分析、ならびにトレンド解析として Cochran-Armitage 検定を予定している。

動脈硬化症をターゲットにしていることから、ATP2B1 遺伝子血管平滑筋細胞特異的ノックアウトマウスと全身ヘテロマウス、及び ATP2B1 遺伝子血管平滑筋特異的過剰発現マウスを利用する。上記、2つのノックアウトマウスは血圧上昇を認めることをすでに報告しており、それに伴う血管の組織学的変化、炎症性マーカーの変化、動脈硬化の程度、血管張力の比較、および生存期間の比較検討をする。また、保護的薬剤(降圧薬やスタチンなど)の投与による動脈硬化症の改善なども同時に検討する。一方、ATP2B1 遺伝子血管平滑筋特異的過剰発現マウスは上記マウスとは反対に ATP2B1 遺伝子の作用による抗動脈硬化作用を予想している。ノックアウトマウスで行った実験と同様のことを行い、その影響を検討する。

4. 研究成果

平成 28 年度は共同研究施設である小林内科クリニックに生活習慣病で通院加療中の患者のうち、CAVI 検査を施行した患者約 1300 名から口腔粘膜や血液から DNA の採取を完了した。DNA に関しては、quality チェック及び、量の確認を行い、1139 検体において実験に用いることは問題ないことを確認した。残り 161 検体は quality や量的問題で解析が行えなかった。研究使用に問題がないと認められた 1139 検体において ATP2B1 遺伝子の 12 個の SNPs をタイピングした。SNP タイピングの方法は、Agena Bio science 社の MassARRAY システムを用いて行った。全 1139 検体の Call rate は 99.9%と非常に高かった。血圧、脂質や糖尿病プロフィール、CAVI 値などとの関連を統計学的に解析し、実際のタイピングデータに加え、HapMap データ及び 1000genome を利用した imputation 法を用いて SNP データの補完を行った。上記解析により、ATP2B1 遺伝子と動脈硬化の程度を表す CAVI 値、薬剤や暴露要因を総合的に検討し、ヒトにおける動脈硬化進展の交絡要因を除去した解析を行い、サブ解析の臨床データに関して論文化し報告した(Kobayashi Y, et al. Clin Exp Hypertens. 2018 Apr 19:1-8.)。また、人において進めていた約 1300 名の SNP 解析の本解析がまとまりつつあり、令和元年度に学会発表・論文化が見込まれる。

また、ATP2B1 遺伝子血管平滑筋特異的ノックアウトマウスと全身ヘテロマウス、及び、ATP2B1 遺伝子血管平滑筋特異的過剰発現マウスの継代飼育を続け、ATP2B1 遺伝子血管平滑筋特異的ノックアウトマウスの薬剤応答性に関して、Hypertension research 誌に報告した(Okuyama Y, et al. Hypertens Res. 2018 Feb;41(2):80-87.)。同マウスにおける薬剤応答性に関しては機能解析に更なる余地を残しており、同マウスからの細胞培養を行いより詳細なメカニズム解明を始めた。

平成 30 年度は高血圧感受性遺伝子である ATP2B1 がコードするタンパク質 plasma membrane calcium ATPase 1 (PMCA1)について、腎における発現量が、病態に応じて変化するか調べ

るために、腎障害、高血圧を惹起する介入をマウスに行い、解析した。高血圧合併腎障害でのみ腎臓での PMCA1 発現が増加することがわかり、ATP2B1 が高血圧合併腎障害に寄与する分子の一つとしての役割が示唆され、その内容を ISN frontier 2018 で発表を行った。(Sumida K, Yatsu K et al. [Renal plasma membrane calcium pump isoform 1 expression is involved in hypertension-related kidney injury])
また、我々は全身ヘテロ ATP2B1 欠損マウスを用いて、Ca 代謝に関わる表現型変化と血圧との関連に関して研究を行った。このマウスは血圧上昇を認めることは報告してきたが、低カルシウム血症と PTH 分泌減少を同時に呈することがわかった。また、尿中カルシウム排泄と骨密度の増加も確認した。PTH 分泌減少に関しては、副甲状腺細胞での ATP2B1 遺伝子欠損により PMCA1 タンパク質が減少、細胞内 Ca²⁺濃度が上昇したため PTH 分泌が抑制されたと考え、PTH 分泌抑制の影響で骨吸収が誘起されなかった事が骨密度増加の一因と考えた。また、尿中 Ca 排泄の増加に関しては、細胞基底膜側に存在する PMCA1 の減少により、血中への Ca²⁺吸収が減少したためと考えられた。これらの研究結果を論文化し、Hypertension Reseach 誌に掲載された。(Ehara Y, Yatsu K et al. Hypertens Res. 2018;41(2):699-707.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kobayashi Y, Yatsu K, Hirawa N, Umemura S, Tamura K et al: Atherosclerosis of the carotid bulb is associated with the severity of orthostatic hypotension in non-diabetic adult patients: a cross-sectional study. *Clin Exp Hypertens*. 41: 194-201, 2019.
2. Ehara Y, Hirawa N, Yatsu K, Umemura S, Tamura K et al: Reduced secretion of parathyroid hormone and hypocalcemia in systemic heterozygous ATP2B1-null hypertensive mice. *Hypertens Res*. 41: 699-707, 2018.
3. Okuyama Y, Yatsu K, Hirawa N, Umemura S, Tamura K et al: The effects of anti-hypertensive drugs and the mechanism of hypertension in vascular smooth muscle cell-specific ATP2B1 knockout mice. *Hypertens Res*. 41: 80-87, 2018.
4. Wakui H, Sumida K, Yatsu K, Hirawa N, Umemura S, Tamura K et al: Enhancement of intrarenal plasma membrane calcium pump isoform 1 expression in chronic angiotensin II-infused mice. *Physiological Reports*, 5: Iss11, 1-8, 2017

〔学会発表〕(計 1 件)

Sumida K, Wakui H, Yatsu K, Hirawa N, Umemura S, Tamura K et al: Renal plasma membrane calcium pump isoform 1 expression is involved in hypertension-related kidney injury. *ISN frontier 2018*

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：梅村 敏

ローマ字氏名：Satoshi Umemura

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：・医学研究科

職名：客員教授

研究者番号(8桁): 00128589

研究分担者氏名：平和 伸仁

ローマ字氏名：Nobuhito Hirawa

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：附属市民総合医療センター

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20315766

研究分担者氏名：岡 晃

ローマ字氏名：Akira Oka

所属研究機関名：東海大学

部局名：総合医学研究所

職名：講師

研究者番号(8桁): 80384866

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。