

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590377
 研究課題名（和文） 病理解剖症例を用いた粥状動脈硬化症と炎症性サイトカイン遺伝子多型の関連解析
 研究課題名（英文） Association studies between atherosclerosis and genetic polymorphisms of inflammatory cytokines, using large numbers of autopsy cases
 研究代表者
 沢辺 元司（SAWABE MOTOJI）
 財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・東京都老人総合研究所・研究員
 研究者番号：30196331

研究成果の概要：

本研究の目的は遺伝子多型解析という最新の手法を用いて、心筋梗塞、脳血管障害などの基礎病態である動脈硬化症の発生に関係する遺伝子を同定する事である。対象症例はセンターで行われた約 2,000 例の連続病理解剖症例であり、冠状動脈、脳動脈などの全身 10 動脈の動脈硬化度と各種遺伝子多型の関連を解析した。その結果、炎症性サイトカイン、葉酸代謝に関する酵素、リポタンパクの遺伝子が動脈硬化症に関係していることを見つけた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：循環器・高血圧、ゲノム、病理学、免疫学、老化

1. 研究開始当初の背景

現在、粥状動脈硬化症の合併症である心筋梗塞、脳卒中などに関して遺伝子多型関連解析により、疾患感受性遺伝子を同定する多数の研究が国内、国外で進行している。しかし、疾患や患者が均一性に乏しい、症例数が少ないなどのことから、必ずしも一定の結果が得られていない。理論的にはオーダーメイド医療

実現化プロジェクトなどで得られた、何万人ものサンプルについて、ゲノムワイド SNP を検索する事が理想的であるが、そのためには何百億円もの予算が必要となり、実現が困難である。この欠点を補い効率的な遺伝子多型研究を行うためには、詳細な中間的表現型をもつ対象について、十分なサンプル数を集める事が必要である。心血管イベントである

心筋梗塞、脳卒中についての中間的表現型としては病理学的に検討した粥状硬化症の程度が最も適しており、病理解剖症例を多数集める必要がある。

心血管イベントである心筋梗塞、脳卒中などについては既に多くの遺伝子多型研究が行われている。しかし、病理解剖症例を用いた粥状硬化症の遺伝子多型研究は、我々の知る限りではヘルシンキ突然死研究と、米国の多施設共同研究である PDAY 研究があるのみである。HSDSではMMP-3, MMP-9, MPO, PON1などの遺伝子多型について報告があり、PDAYではACEについての報告がある。また国内で本研究以外に病理解剖症例を用いた粥状硬化症の遺伝子多型研究は行われていない。

2. 研究の目的

心筋梗塞は最大の循環器系疾患であり、脳卒中は死因になる事は少ないものの、ADLを著しく低下させ医療費を高騰させる原因となっている。その他、閉塞性動脈硬化症、動脈瘤、腎硬化症、虚血性腸疾患などの疾患は、全て粥状動脈硬化症を基盤として発症する。一方、粥状動脈硬化症は栄養、運動、喫煙などの環境要因と共に遺伝的要因（主に遺伝子多型）が、その発生に大きく関与している。本研究の目的は遺伝子多型研究により粥状動脈硬化症の疾患感受性遺伝子多型を同定する事にある。

3. 研究の方法

(1). 研究体制

臨床病理情報解析・サンプル採取は東京都老人総合研究所・東京都老人医療センターで行い、研究代表者の沢辺元司が担当した。遺伝子多型解析は東京医科歯科大学分子疫学（村松正明、池田仁子）、東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態（木村彰方）が担当した。統計解析はハーバード大学生物統計の田中紀子が担当した。

(2). 研究対象

対象症例は東京都老人医療センターで行われた約 2,000 例の連続病理解剖症例である。男女比は 1.2:1、平均年齢は 80 歳である。喫煙歴は男性で 70%、女性で 22%であった。高血圧、高脂血症、糖尿病の頻度は 29%、11%、15%であり、脳血管障害、冠血管疾患の頻度は 30%、16%である。臨床診断、血清脂質値、喫煙歴、心筋梗塞の有無などの病事情報、粥状動脈硬化度・狭窄度などの臨床病理情報に関連解析に用いた。病事情報、粥状動脈硬化度・狭窄度では冠状動脈、脳動脈、頸動脈、大動脈、大腿動脈を含めた 10 動脈が対象となっている。

(3). 遺伝子多型解析

遺伝子多型解析は LightCycler, TaqMan, Multiplex-PCR-Luminex 等を用いて行った。対象となる遺伝子、遺伝子多型は個々の研究で異なっている。

(4). 倫理的配慮

東京都老人医療センターの解剖承諾書では「遺伝子研究を含む医学研究に用いる」旨の承諾をご遺族より得ている。運用は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って行った。個々の研究内容は老人医療

センター、東京医科歯科大学、東京都老人総合研究所の倫理委員会での承認を得ている。

4. 研究成果

(1). 粥状動脈硬化症に関連する炎症性サイトカイン遺伝子多型 (発表論文 #11)

[目的] 粥状硬化症は広義の炎症性疾患であり、炎症性サイトカインの遺伝子多型が、粥状硬化症の疾患感受性に影響する可能性がある。

[遺伝子解析] 遺伝子解析は東京医科歯科大学分子疫学が担当した。対象遺伝子は *TNF*, *TGFB1*, *IL1B*, *IL4*, *IL10* の 5 遺伝子、9SNP である。遺伝子多型解析は LightCycler, TaqMan で行った。

[結果] *TNF* の 21031C アリルは頸動脈、大腿動脈、脳動脈の防御性因子であった (OR: 0.72, 0.73, 0.70)。 *IL-1b* の 2511T、 *TGF-b1* の 129T は鎖骨下動脈、脳動脈の危険因子であった (OR: 1.35, 1.48)。

[結論] *TNF*, *IL-1b*, *TGF-b1* の機能 SNP は粥状硬化症発生に影響している可能性があったが、伝統的危険因子と比較するとその影響は小さく、また特定の動脈に局限していた。

(2). 粥状動脈硬化症に関する喫煙感受性を規定する遺伝子多型 (発表論文 #2)

[目的] 喫煙は粥状動脈硬化症の重要な外的危険因子であるが、喫煙感受性を規定する遺伝的要因については知られていない。

[遺伝子解析] 遺伝子解析は東京医科歯科大学分子疫学が担当した。対象遺伝子は *TNF*, *TGFB1*, *IL1B*, *IL4*, *IL10*, *CCL2*, *CCL2*, *MPO*, *ADIPOQ*, *ADRB3*, *SOD2*, *MTHFR*,

PON1, *NOS3*, *AGT*, *CYBA*, *ABCA1*, *CETP*, *XRCC1*, *OGG1*, *TP53*, *ELN*, *COL3A1*, *ESR1*, *CYP1A1* の 24 遺伝子、36SNP である。遺伝子多型解析は LightCycler, TaqMan で行った。

[結果] 34SNP の内、7SNP は一つの動脈系において、2SNP は二つの動脈系において有意な交互作用を認めた。 *MTHFR* Ala222Val (677C>T) 多型では 4 動脈において有意な交互作用を認め、677TT ホモはヘテロ、CC ホモと比較し喫煙に関する粥状硬化症の感受性が高かった。

[結論] 禁煙は全ての喫煙者に必要であるが、 *MTHFR* 677TT ホモでは、粥状硬化症の進行を防ぐ観点から特に重要である。遺伝子多型解析が喫煙指導の一助になる可能性が示された。

(3). *LPA* 多型と粥状硬化性疾患の関連

[目的] 高リポプロテイン(a) [Lp(a)] 血症は心血管イベントの遺伝的リスクである。最近 *LPA* I4339M 多型が血清 Lp(a) 値と心筋梗塞に関連すると報告されたので、我々の剖検例を対象として再現性研究を行った。

[結果] *LPA* I4399M(rs3798220) の遺伝子型頻度は Hardy-Weinberg 平衡から有意に逸脱していた。 *LPA* I4399M と血清 Lp(a) 値、心血管疾患、全身 10 動脈の粥状硬化度・狭窄度間に有意な関連を認めなかった。

[結論] 日本人では *LPA* I4399M 多型と血清 Lp(a) 値、粥状動脈硬化症とその合併症に有意な関連は認められなかった。

(4). *LTA*, *LGALS2*, *PSMA6* 多型と心筋梗塞との関連 (発表論文 #3, 13)

[目的] 最近の大規模関連解析により日本人における心筋梗塞の遺伝的リスクとして *LTA*, *LGALS2*, *PSMA6* 多型が同定された。しかし心筋梗塞の中間形質である冠動脈硬化症に対する効果は不明である。

[対象] 東京都老人医療センターの病理解剖例を含む日本人、韓国人の冠動脈疾患、対照例を解析に用いた。

[遺伝子解析] 遺伝子解析は東京医科歯科大学分子病態が担当した。対象遺伝子は *LTA*, *LGALS2*, *PSMA6* である。遺伝子多型解析は TaqMan で行った。

[結果] *LTA* 804C>A と *LGALS2* 3279C>T と冠動脈硬化度はそれぞれオッズ比で 1.54 (95%CI, 1.17-2.01, AA+CA over CC) と 1.62 (95%CI, 1.11-2.37, TT over CC+CT) であり有意な関連を示した。両 SNP は心筋梗塞とは有意な関連を示さなかった。一方、*PSMA6* -8C>G は冠動脈硬化、心筋梗塞と有意な関連を示さなかった。

[結論] *LTA* 804C>A と *LGALS2* 3279C>T は心筋梗塞の中間形質である冠動脈硬化症と有意な関連を示した。

(5). 9p21 染色体にある遺伝子多型と冠動脈疾患との関連 (発表論文 #9)

[目的] 最近、欧米から心筋梗塞のゲノムワイド関連解析により有意な関連を示す遺伝子多型として、9p21 染色体にある rs1333049 が同定された。本研究では日本人、韓国人の冠動脈疾患患者を対象として、この関連の再現性を検討した。

[対象] 東京都老人医療センターの病理解剖例を含む日本人、韓国人の冠動脈疾患、対照

例を解析に用いた。

[遺伝子解析] 遺伝子解析は東京医科歯科大学分子病態が担当した。対象遺伝子多型は rs1333049 である。遺伝子多型解析は TaqMan で行った。

[結果] 日本人と韓国人で rs1333049 と冠動脈疾患の間に有意な関連を認めた。オッズ比はそれぞれ 1.30 (95%CI; 1.13-1.49, p = 0.00027), 1.19 (95% CI; 1.02-1.38, p = 0.025) であった。

[結論] 9p21 染色体のこの遺伝子多型領域は東アジアにおいても冠動脈疾患の疾患感受性座位であった。

(6). 冠動脈疾患と関連する新規遺伝子 (*MKL-1*) (発表論文 #1)

[目的] 冠動脈疾患には遺伝的因子が関与しており、幾つかの疾患関連遺伝子が報告されているが、再現性の高い関連遺伝子は少なく、新規遺伝子の存在を示唆する。

[対象] 東京都老人医療センターの病理解剖例を含む日本人、韓国人の冠動脈疾患、対照例を解析に用いた。

[遺伝子解析] 遺伝子解析は東京医科歯科大学分子病態が担当した。

[結果] マイクロサテライトマーカーを用いてスクリーニングし、冠動脈疾患に関連する 6 座位を新たに同定した。特定した座位の SNP 解析により、関連する遺伝子として Megakaryoblastic leukemia factor-1 gene (*MKL1*) を同定した。*MKL1* のプロモーター領域の -184C>T 多型は日本人、韓国人において冠動脈疾患と関連していた。*MKL1* の -184C>T 多型では *MKL1* の発現が増加して

いた。

[結論] *MKL1* は冠動脈疾患の発生に関係している事が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Hinohara K, Nakajima T, Yasunami M, Houda S, Sasaoka T, Yamamoto K, Lee BS, Shibata H, Takahashi YT, Takahashi M, Arimura T, Sato A, Naruse T, Ban J, Inoko H, Yamada Y, Sawabe M, Park JE, Izumi T, Kimura A, Megakaryoblastic leukemia factor-1 gene in the susceptibility to coronary artery disease. *Human Genetics*, in press, 2009, 査読有
- ② Sawabe M, Arai T, Araki A, Hosoi T, Kuchiba A, Tanaka N, Naito T, Oda K, Ikeda S, Muramatsu M, Smoking confers a *MTHFR* 677C>T genotype-dependent risk for systemic atherosclerosis: results from a large number of elderly autopsy cases that died in a community-based general geriatric hospital. *J Atheroscl Thromb* 16, 91-104, 2009, 査読有
- ③ Hinohara K, Nakajima T, Sasaoka T, Sawabe M, Lee BS, Ban J, Park JE, Izumi T, Kimura A, Replication studies for the association of PSMA6 polymorphism with coronary artery disease in East Asian populations. *J Hum Genet*, 54, 248-251, 2009, 査読有
- ④ Kurosaki T, Suzuki M, Enomoto Y, Arai T, Sawabe M, Hosoi T, Homma Y, Kitamura T, Polymorphism of cytochrome P450 2B6 and prostat cancer risk: A significant association in a Japanese population. *Int J Urol*, 16, 364-368, 2009, 査読有
- ⑤ Yamada Y, Fuku N, Tanaka M, Aoyagi Y, Sawabe M, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Kato K, Watanabe S, Nozawa Y, Hasegawa A, Kojima T, Identification of CELSR1 as a susceptibility gene for ischemic stroke in Japanese individuals by a genome-wide association study. *Atherosclerosis*, In press, 2009, 査読有
- ⑥ Takei K, Ikeda S, Arai T, Tanaka N, Muramatsu M, Sawabe M, Lymphotoxin-alpha polymorphisms and presence of cancer in 1,536 consecutive autopsy cases. *BMC Cancer*, 8, 235, 2008, 査読有
- ⑦ Sawabe M, Hamamatsu A, Chida K, Arai T, Harada K, Ozawa T, Tanaka N, Elderly patients with minimal common carotid atherosclerosis not infrequently have severe coronary atherosclerosis and myocardial infarction. *Circ J*, 72, 1946-1952, 2008, 査読有
- ⑧ Harihara S, Nakamura K, Fujiwara M, Arai T, Sawabe M, Takeuchi F, Takubo K, Markedly different clinical features in 2 diabetes mellitus patients with extremely high tissue levels of the mitochondrial DNA A3243G mutation. *Gerontology*, 54, 168-172, 2008, 査読有
- ⑨ Hinohara K, Nakajima T, Takahashi M, Hohda S, Sasaoka T, Nakahara K, Chida K, Sawabe M, Arimura T, Sato A, Lee BS, Ban JM, Yasunami M, Park JE, Izumi T, Kimura A, Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. *J Hum Genet*, 53, 357-359, 2008, 査読有
- ⑩ Suzuki M, Kurosaki T, Arai T, Sawabe M, Hosoi T, Kitamura T, The Val158 Met polymorphism of the catechol-O-methyltransferase gene is not associated with the risk of sporadic or latent prostate cancer in Japanese men. *Int J Urol*, 14, 800-804, 2007, 査読有
- ⑪ Oda K, Tanaka N, Arai T, Araki J, Song Y, Zhang L, Kuchiba A, Hosoi T, Shirasawa T, Muramatsu M, Sawabe M, Polymorphisms in pro- and anti-inflammatory cytokine genes and susceptibility to atherosclerosis: a pathological study of 1503 consecutive autopsy cases. *Hum Mol Genet*, 16, 592-599, 2007, 査読有
- ⑫ Nakano N, Hori H, Abe M, Shibata H, Arimura T, Sasaoka T, Sawabe M, Chida K, Arai T, Nakahara K, Kubo T, Sugimoto K, Katsuya T, Ogihara T, Doi Y, Izumi T, Kimura A, Interaction of BMP10 with Tcap may modulate the course of hypertensive cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ*, 293, H3396 - 3403, 2007, 査読有
- ⑬ Kimura A, Takahashi M, Choi BY, Bae SW, Hohta S, Sasaoka T, Nakahara KI, Chida K, Sawabe M, Yasunami M, Naruse T,

Izumi T, Park JE, Lack of association between LTA and LGALS2 polymorphisms and myocardial infarction in Japanese and Korean Populations. Tissue Antigens, 69, 265-269, 2007, 査読有

- ⑭ Naito T, Sawabe M, Arai T, Chida K, Hamamatsu A, Harada K, Ozawa T, Murayama S, Muramatsu M, Dyslipidemia is a major determinant of systemic atherosclerosis in the elderly: An autopsy study. Geriatrics & Gerontology International, 7, 229-237, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① Sawabe M, Lipoprotein(a) level has equal positive effects on coronary atherosclerosis and myocardial infarction: A path analysis using 1,062 autopsy cases. 第73回日本循環器学会学術集会、2009. 3. 22、大阪
- ② Sawabe M, Phenome scan (genotype/dense phenotype association studies) of a comprehensive clinicopathological database derived from large numbers of autopsies. The 13rd Human Genome Meeting 2008, 2008. 9. 27-30, Hyderabad, India
- ③ 沢辺 元司、ミトコンドリアハプログループM7aは冠状動脈粥状硬化症の危険因子となりうる: 1,536高齢者連続剖検例での検討. 第50回日本老年医学会学術集会、2008. 6. 20、千葉
- ④ 沢辺 元司、血清リポ蛋白(a)値は全身動脈の粥状硬化症、冠動脈疾患に対して高いリスクを示す: 高齢者病理解剖例を用いた全身動脈の検討. 第50回日本老年医学会学術集会、2008. 6. 20、千葉
- ⑤ Sawabe M, Smoking confers a MTHFR 677c>t genotype-dependent risk for systemic atherosclerosis. 第72回日本循環器学会総会、2008. 3. 30、福岡
- ⑥ Sawabe M, Mitochondrial haplogroup M7a confers a genetic risk for coronary atherosclerosis in the elderly: an autopsy study of 1,536 patients. 第72回日本循環器学会総会、2008. 3. 30、福岡
- ⑦ Naito T, Hypercholesterolemia is the strongest risk factor for autopsy-verified coronary stenosis in the elderly women. 第72回日本循環器学会総会、2008. 3. 29、福岡
- ⑧ 沢辺 元司、老年病SNPデータベース(JG-SNP): 病理解剖症例を対象として作成された遺伝子多型データベース. 第52回日本人類遺伝学会大会、2007. 9. 14、東京
- ⑨ 沢辺 元司、大動脈拡張は血管老化の指標であり、粥状硬化症危険因子の寄与は

小さい. 第49回日本老年医学会学術集会、2007. 6. 21、札幌

〔図書〕(計 1 件)

- ① 沢辺 元司、朝倉書店、からだの年齢事典、2008. 217-226.

〔その他〕

東京都健康長寿医療センター病理解剖コラボレーション (共同研究) 事業ホームページ
<http://www.tmghig.jp/pathology-d/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沢辺 元司 (SAWABE MOTOJI)

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・東京都老人総合研究所・研究員

研究者番号: 3 0 1 9 6 3 3 1

(2) 研究分担者

村松 正明 (MURAMATSU MASAOKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 5 0 2 3 0 0 0 8

田中 紀子 (TANAKA NORIKO)

ハーバード大学公衆衛生大学院・生物統計・客員研究員

研究者番号: 1 0 3 7 6 4 6 0

(3) 連携研究者

池田 仁子 (IKEDA SHINOBU)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号: 2 0 4 1 5 5 0 8