

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：32653

課題番号：19791013

研究課題名 (和文) 脳動脈瘤候補遺伝子座 LOXL3 領域の SNPs 関連解析

研究課題名 (英文) Association of *LOXL3* single nucleotide polymorphisms with susceptibility to intracranial aneurysms.

研究代表者

赤川 浩之 (AKAGAWA HIROYUKI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：60398807

研究成果の概要:脳動脈瘤の有力な機能的候補遺伝子である LOXL3 遺伝子に注目し SNPs 関連解析を行った。その結果、特に家族性脳動脈瘤患者患者群に注目した解析で有意な関連が認められた。関連を認めた SNP は 3' 側遺伝子近接領域に存在していた。さらに、4 患者由来の脳動脈瘤壁で遺伝子発現を検討したところ、脳動脈瘤壁においても LOXL3 遺伝子の発現が確認された。以上から、LOXL3 遺伝子の脳動脈瘤成因への寄与が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳動脈瘤、感受性遺伝子、一塩基多型、LOX family genes

## 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤の破裂はクモ膜下出血をきたす。クモ膜下出血は重篤疾患で、約半数は初回出血で死亡する。さらに、手術で救命しても意識障害や片麻痺といった重度の後遺症を残すことも少なくなく、出血前診断・治療に対する社会的要請が最も高い疾患のひとつといえる。polycystic kidney disease のような遺伝性疾患に脳動脈瘤を合併すること、脳動脈瘤やくも膜下出血を多発する家系が存在することなどから、脳動脈瘤に遺伝的な要因が高く関与している

ことが示されてきた。ヒトゲノム計画が成功のうちに終了し、遺伝子検索が簡単になったこと、ゲノムを網羅する遺伝子多型がカタログ化されていること、タイピング技術の飛躍的進歩により、膨大な量の遺伝子多型を用いた疾患感受性遺伝子の同定が可能となってきた。我々は既に、世界に先駆けて全ゲノム領域での罹患同胞対連鎖解析を終えており、5 番、7 番、14 番染色体上に脳動脈瘤感受性領域を同定している (Am J Hum Genet 69:804-819, 2001)。この研究が口火となり、現在では世界中で脳

動脈瘤関連遺伝子の研究が行われるようになった。我々の研究で最も強い連鎖を認めた7番染色体長腕11領域は、米国ユタ大学の研究班の解析でも連鎖が再現されたことから (Hum Genet 114:250-255, 2004)、ピークマーカーD7S2472の近傍に注目し感受性遺伝子の同定を進めてきた。D7S2472領域を4.6Mbにわたり塩基多型(SNP)で詳細に解析した結果、D7S2472より約400kbセントロメア側のELN、LIMK1遺伝子を含む連鎖不平衡ブロックに疾患関連遺伝子座を絞り込むことに成功した。さらにこの領域を404例の脳動脈瘤患者と458例の非脳動脈瘤コントロールで詳細に検討したところ、ELN、LIMK1遺伝子の転写産物を減少させる機能的SNPが疾患と有意に関連していることが明らかになった。ひとつはELN 3' UTR(+502) A挿入SNPでmRNA結合蛋白の親和性を変化させることにより転写産物を減少させる。もうひとつはLIMK1プロモーターC(-187)T SNPで転写活性を減少させる。そして、最も強い連鎖を認めたのがELN 3' UTR G(+659)C SNPで(P=0.000002)、ELN、LIMK1遺伝子の転写産物を減少させる2つの機能的SNPを同時に乗せるハプロタイプ・タグSNPであった。すなわち、ELN、LIMK1遺伝子の転写産物がともに減少することが脳動脈瘤の成因に深くかかわっていることを見出したのである。この機能的タグSNPは韓国人グループでの患者・対照研究でも有意な連鎖が再現されている (Hum Mol Genet 15(10):1722-1734, 2006)。近年の報告によると、ELN、LIMK1遺伝子はともに、アクチンの重合を制御することにより血管平滑筋細胞の表現形を決定する同じsignaling pathway上にあることが明らかになっている。さらに、血管平滑筋細胞の表現形は血管壁の動脈硬化性変化に深くかかわっていることも知られている。今回の我々の研究で、脳動脈瘤成因にかかわる分子生物学的機序の一端が明らかになった。

7番染色体のプロジェクトと並行して、候補遺伝子解析というアプローチでも感受性遺伝子検索を進めてきた。既知の遺伝子やESTの中で有力な候補となり得る遺伝子をスクリーニングし、当該形質における差異をもたらす感受性遺伝子を特定していく手法である。この手法で我々は既に、Collagen Type I 2 (COL1A2)遺伝子の同定に成功している (Stroke 35(2):443-448, 2004)。今回、我々が注目した遺伝子はLysyl Oxidase (LOX)遺伝子群である。LOXはエラスチンやコラーゲンといった細胞外マトリクスでの、リシン残基を解した架橋の構築を触媒する。この架橋形成を阻害すると、皮膚、腱、血管などの構造は脆くなる。動物での実験脳動脈瘤の作成の際に投与され

るアミノプロピオニトリルはLOXの特異的なインヒビターである。これらのことから、LOX遺伝子群は、脳動脈瘤の有力な機能的候補遺伝子と考えた。5番染色体のLOX遺伝子については、先に我々が行ったゲノムワイド連鎖解析で連鎖を認めた5q31に存在していたので、すでに解析を終えている。4つのSNPsを同定し、SNPs関連解析、ハプロタイプ解析を行ったが、関連は認められなかったという結果で2003年に論文発表した (J Hum Genet 48:309-314, 2003)。近年、LOXのアイソザイムの存在が知られるようになり、遺伝子座位も明らかになっている。現在までにLOX like protein 1~4のアイソザイムが存在することがわかっており、これら4つのアイソザイムをコードするLOXL1~4遺伝子に注目してSNPs関連解析を行すすめてきた。

## 2. 研究の目的

LOXL遺伝子群と脳動脈瘤の詳細な関連解析である。そのうち、我々は特にLOXL3遺伝子に注目した。LOXL3遺伝子は2番染色体短腕13に存在しているが、この領域はオランダ人の脳動脈瘤家系の解析により有意な連鎖が認められており (Stroke 35(10):2276-2281, 2004)、非常に有力な候補領域である。さらに、このLOXL3遺伝子の3'側はHtrA serine peptidase 2 (HTRA2)遺伝子とオーバーラップしているという点でも興味深い。このHTRA2遺伝子はserine proteaseをコードする。serine protease deficiencyは以前より脳動脈瘤発症との関連が示唆されており、serine protease関連遺伝子は有力な候補遺伝子として解析の対象となってきた。我々もこれに関連して2報の論文報告を行っている (Stroke 35:e376-e378, 2004, Cerebrovasc Dis 23(1):46-49, 2006)。また、LOXL3は、特にcollagenを基質としてその架橋構造を触媒する。我々が同定に成功したCOL1A2遺伝子との遺伝子間相互作用の検証も計画した。

## 3. 研究の方法

LOX遺伝子群がヒトの脳動脈瘤組織で発現しているかどうかを検証した。まず、同一の動脈瘤患者からペアで浅側頭動脈壁と脳動脈瘤壁を採取した。計4例の脳動脈瘤患者からサンプルを採取できた。それぞれRNAを採取し、LOX遺伝子群の発現を定量的RT-PCRにて検討した。サンプルはごく少量のため、この実験に先んじて、培養臍帯動脈平滑筋細胞を用いて条件検討を行った。

ゲノム DNA サンプルは 402 例の脳動脈瘤患者 (平均年齢  $54.2 \pm 10.0$ ) と非罹患コントロール 462 例 (平均年齢  $63.5 \pm 10.0$ ) から採取した。LOXL1-4 遺伝子の SNP は NCBI dbSNP データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) と IMS-JST JSNP データベース (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>) から抽出した。SNPs ジェノタイピングは TaqMan SNP Genotyping Assay を用い ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System で検出を行った (Applied Biosystems)。TaqMan SNP Genotyping Assay でカバーできない SNP については BigDye Terminator V1.1 を用いてシーケンス反応を行い、ABI 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) にて検出した。SNP データ解析には DYNACOMs 社の SNP データ統計処理ソフト SNPalyze を用いた。

#### 4. 研究成果

脳動脈瘤壁を用いた発現解析にて、LOXL1-4 遺伝子群が全て発現していることが確認された。これにより LOXL1-4 遺伝子群が機能的候補遺伝子であることが支持されたので、SNP 関連解析へ移った。LOXL1-4 遺伝子群で計 55 個の SNP をジェノタイピングした。その結果、LOXL2、3 遺伝子に疾患との有意な関連を見出した。そのうち、特に強い関連があったのが、LOXL2 遺伝子のエクソン 5 に存在する SNP であった。この SNP は独立した危険因子ではなく、我々が先に見出した ELN/LIMK1 領域の関連 SNP との遺伝子間相互作用により脳動脈瘤発症にかかわっていることも MDR 解析 (multifactor dimensionality reduction analysis) により明らかにした。さらに、先に述べた動脈壁の遺伝子発現の検討では LOXL2 遺伝子でのみ、統計学的有意差をもって動脈瘤壁での発現が浅側頭動脈よりも高かった。LOXL3 遺伝子では、特に家族性脳動脈瘤患者群に注目した解析で有意な関連が認められた。関連を認めた SNP は LOXL3 遺伝子の 3' 側遺伝子近接領域に存在していた。この研究成果を Hum Genetics 誌、121(3-4) 号において、「Systematic screening of lysyl oxidase-like (LOXL) family genes demonstrates that LOXL2 is a susceptibility gene to intracranial aneurysms.」とのタイトルで論文発表した。

患者、コントロールそれぞれの群での連鎖不平衡解析では、LOXL3 遺伝子領域はひとつの大きな連鎖不平衡ブロックを形成していることがわかった。すなわち、この領域には真の機能的な原因 SNP が潜んでいる可能性がある。今後の研究は、この真の原因 SNP を突き止め、その SNP が機能的差異をもたらすかどうか検証することである。

具体的には、その SNP が遺伝子のどの部分に存在するかにより、転写調節能やスプライシングの差異などを検証することになる。その後は、MDR 解析などの統計学的手法を用いて COL1A2 遺伝子との遺伝子間相互作用を検証する。そこにさらに臨床情報 (年齢、性別や喫煙歴、高血圧症の有無などのリスクファクター) を加味し、多変量解析を行う。同定された遺伝子多型がどの程度発症リスクに寄与するか、また、遺伝子情報と臨床情報で個人の易罹患性を数値化し、診断補助ツールとしての実用化を目指したい。

#### 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 3 件)

恩田英明、米山琢、赤川浩之、糟谷英俊. 「脳動脈瘤の遺伝解析」 BRAIN and NERVE, 60巻11号, 2008年, P.1245-1260, 査読無

Akagawa H, Narita A, Yamada H, Tajima A, Krischek B, Kasuya H, Hori T, Kubota M, Saeki N, Hata A, Mizutani T, Inoue I. Systematic screening of lysyl oxidase-like (LOXL) family genes demonstrates that LOXL2 is a susceptibility gene to intracranial aneurysms. Hum Genet. 2007 May;121(3-4): 377-87, 査読有

米山琢、赤川浩之、恩田英明、糟谷英俊. 「脳動脈瘤と遺伝子」東京女子医科大学雑誌, 77(5): 219-232, 2007, 査読有

[学会発表](計 2 件)

赤川浩之、竹原弥生、米山琢、恩田英明、糟谷英俊、堀智勝. 「家族性脳動脈瘤患者における TNFRSF13B 遺伝子の変異解析」第9回日本分子脳神経外科学会, 2008年8月31日, 京都

赤川浩之、成田暁、田嶋敦、米山琢、Boris Krische、恩田英明、糟谷英俊、堀智勝、

井ノ上逸朗 . 「Lysyl oxidase-like  
(LOXL) family 遺伝子群と脳動脈瘤の  
SNPs 関連解析」第 66 回日本脳神経外科  
学会総会, 2007 年 10 月 4 日, 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

赤川 浩之 (AKAGAWA HIROYUKI )  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 60398807

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし