

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：20590553
研究課題名（和文） 遺伝子素因に基づくニトログリセリン生体応答性の客観的評価とその個別医療への応用
研究課題名（英文） The relationship between biological responses to nitroglycerin and genotypes of the activating enzyme in human, and the application to personalized medicine
研究代表者：米澤 一也（YONEZAWA KAZUYA）
独立行政法人国立病院機構函館病院・臨床研究部・部長
研究者番号：20301955

研究成果の概要：

ニトログリセリン（GTN）が生体内で一酸化窒素（NO）を遊離して血管拡張をきたす機序は不明である。近年、アルデヒド脱水素酵素2（ALDH2）がGTNからNOを遊離させると報告されている。モンゴロイド系人種では遺伝的にALDH2の変異が一定の割合で存在することから、GTNの効果減弱または無効の可能性が推測される。今回の研究では、ALDH2の変異と飲酒高感受性をアンケートにより検討し強い関連性を確認。ALDH2遺伝子変異(すなわち飲酒耐性)にかかわらずGTNによる血管拡張反応が同様に認められ、生体内ではALDH2に依存する代謝経路以外の存在が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：ファーマコゲノミクス

キーワード：アセトアルデヒド脱水素酵素2（ALDH2）、ニトログリセリン、

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患の治療薬や血圧コントロールに用いられるニトログリセリン（GTN）から、生体内でNOが遊離されて血管拡張をきたす作用機序は不明である。近年、Z.Chenらにより生体内でアルデヒドを分解するアルデヒド脱水素酵素2（ALDH2）がGTNからNOを遊離させ血管拡張反応を起こす働きが

あると報告されている。もし、ALDH2がGTNの効果の規定する主な因子であるならば、モンゴロイドでは、白色人種や黒色人種にはほとんど認められない遺伝的なALDH2の変異が一定の割合で存在することから、GTNの効果が減弱する群が存在し、特にホモの変異の場合は効果が全く得られなくなる可能性も推定される。

これが事実であれば、遺伝子変異を持つ個体、特に日本人をはじめモンゴロイドの多くの人種は、一定の割合で飲酒耐性がないばかりでなく、虚血性心疾患や高血圧緊急症などの加療において臨床上大きな問題が生じることになる。

2. 研究の目的

ALDH2 の遺伝的な変異を検出し、遺伝子変異と GTN への反応性に関連があるか否かを検討する。

(1) ALDH2 の変異を安定して検出する分子生化学的な測定系を確立する。

(2) 臨床的に遺伝子の変異型を推測するために、飲酒への耐性と ALDH2 遺伝子変異との関連性を検討する。

(3) 各遺伝変異型における NTG による血管拡張反応性の差異を調べる。

3. 研究の方法

(1) ALDH2 遺伝子の genotype の解析

・ヒト血液の採取と保存

ヒト血液は、通例行われているように EDTA 入りの真空採血管を用いて肘静脈より採血を行った。採血された血液は室温にて函館・大阪を郵送、ALDH2 遺伝子の genotype の解析に供された。

・ALDH2 遺伝子の genotype の解析

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞より Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Co., Madison, WI) を用いて抽出したゲノム DNA、または、ヒト全血を鋳型とし、各種プライマーセットを用いて PCR を行った。得られた DNA 断片は、1% アガロースゲル電気泳動法により分離した。引き続き、目的の DNA を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Co., Madison, WI) によって精製した。精製された DNA 断片を基に、ABI BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA) によってシーケンス反応を行い、ABI 3730xl Analyzer (96 capillary type) によって DNA 配列を解析した。

PCR には DNA Polymerase として、KOD plus ver.2 (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan)、AmpDirect® (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)、Phusion® Blood Direct PCR Kit (New England Biolabs, Beverly, MA) を用いた。

実験キットを用いた実験は、付属の説明書に従い実施された。

(2) 日常生活での飲酒に対しての反応を調べるアンケート作成と評価。

アンケートの項目は、飲酒の可否 (否 0, 可 1)、主観的耐性・他者からの評価・嗜好性・気分不快・赤面、について、各 4 段階 (耐性弱 0 ~ 耐性強 3)、一週の飲酒日数とした。各項目およびその総和で飲酒耐性を評価した。

(3) ALDH2 の遺伝子変異と GTN の反応性の差に関する研究

GTN は舌下常用量では抵抗血管を拡張しないが、静脈系や冠動脈および末梢の弾性血管を拡張することが知られている。当初は GTN 投与前後での冠動脈径の変化を MRI で測定しその効果判定をする計画であったが、解像の点で十分な判定が出来ないと判断された。そこで GTN 舌下投与時に末梢の弾性血管径の変化をエコー画像を用いて定量的に測定することで、GTN が生体内で有効に作用しているか否かを判定することとした。

測定は UNEX 社製ユネクスイーエフを用い、上腕動脈の血管系をエコーで測定し血管拡張の経時変化を記録した。

測定の手順を以下に示す。

① 被験者は水平に臥床し右腕の上腕動脈をエコープローブにより描出する。

② FMD (Flow-Mediated Dilation) の測定を行う。(内因性の NO による血管拡張性の測定) : 前腕にカフを巻き収縮期圧 + 50mmHg 以上の圧で圧迫し、5 分後に圧を開放し、血管の拡張反応を経時的に測定。動脈の最大拡張度を計算。
$$FMD(\%) = (\text{駆血解放後最大拡張径} - \text{安静時径}) / \text{安静時径} \times 100$$

③ NMD (Nitroglycerin-mediated Dilation) の測定を FMD 測定終了後 30 分以上開けて行う。安静 3 分間のベースライン血管径を測定後、GTN 舌下錠 (ニトロペン) 0.1mg (3 分の 1 錠) を舌下し、同様に血管径の変化を経時的に測定。計算式は②と同様。

FMD, NMD を各遺伝子変異タイプ (野生型/野生型、野生型/変異型、変異型/変異型) 別に反応性の差を検討。

4. 研究成果

(1) ALDH2 遺伝子の全血からの直接的な genotype 解析系の構築

ALDH2 の酵素活性に対して著しい影響を与える Glu504Lys を導く一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) の genotype の解析方法について検討した。

本研究において ALDH2 遺伝子の genotype を正確に決定することは研究の基盤であり、極めて重要である。正確な

genotype を決定するためには、PCR Direct Sequencing を行う必要がある。全血から直接的に PCR を可能にしゲノム DNA の精製ステップを減らすことにより、血液間のクロスコンタミネーションのリスクを減らすために、下記の各種検討を行った。

①ヒト肝がん細胞由来 HepG2 のゲノム DNA からの DNA 増幅

設計したプライマーが PCR において機能することを検出するために、ヒト肝がん細胞由来 HepG2 細胞より得られたゲノム DNA 100 ng を鋳型とし、KOD plus ver.2 と以下のプライマーセットを用いて、PCR を行った (Fig. A)。

プライマーセット 1

Forward: 5'- ccc ata acc ccc aag agt ga -3'
Reverse: 5'- tta ccc tct ctt gtc act tc -3'
Sequencing: 5'- agt agg aaa cac tga tgg cc -3'

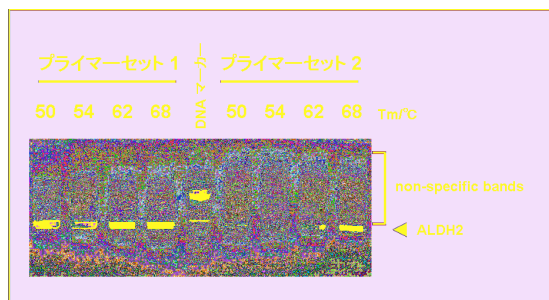
プライマーセット 2

Forward: 5'- tgg gca aca gag aaa gat tct atc -3'
Reverse: 5'- cca cca gca gac cct caa g -3'
Sequencing: 5'-taa ccc ata acc ccc aag a -3'

PCR プログラム

94°C 2分
94°C 15秒
Tm°C 30秒 } 35 サイクル
68°C 1分
68°C 3分

Fig. A ゲノム DNA を鋳型とした PCR



いずれのプライマーセットを用いた場合でも、非特異的な増幅が見られるものの、目的サイズの DNA 断片を得ることができた。また、この DNA 断片を精製し、Sequencing primer を用いて DNA 配列を得ることができた。以上より、設計されたプライマーセットは、いずれも当初の想定通り機能することが示された。

②全血からの直接的な DNA 増幅と DNA 配列の決定

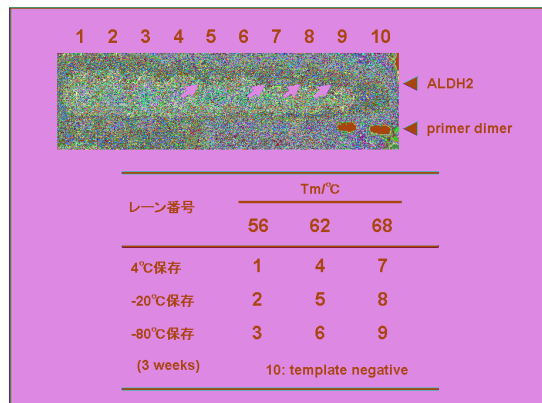
全血からゲノム DNA を抽出し、上記の方法によって genotype を決定する系よりも、全血から直接的に DNA を増幅し genotype を決定する方が、ゲノム DNA の抽出のステップを省略できるため、血液試料間のクロスコンタミネーションのリスクを減らすことができる。そこで、上記のプライマーセットを用い以下の PCR プログラムにて、AmpDirect®により全血からの直接的な増幅を試みた。

PCR プログラム

95°C 10分
94°C 5秒
Tm°C 15秒 } 35 サイクル
72°C 1分
72°C 3分

いずれのプライマーセットを用いた場合でも、反応容量に対して血液容量を 5–20% (v/v)、Tm を 50–72°C において、DNA の増幅は極めて限定的であり、大量の primer dimer と思われる DNA 断片が検出された。そのため、この試料に関して、DNA 配列の解析において特異的なシグナルを得ることができなかった (data not shown)。この原因の一つとして血液の保存状態が適していない可能性が考えられた。つまり、血液の状態によって PCR の反応の進行が変わると考えられるので、この保存条件について検討した (Fig. B)。

Fig. B 血液の保存状態が PCR に与える影響

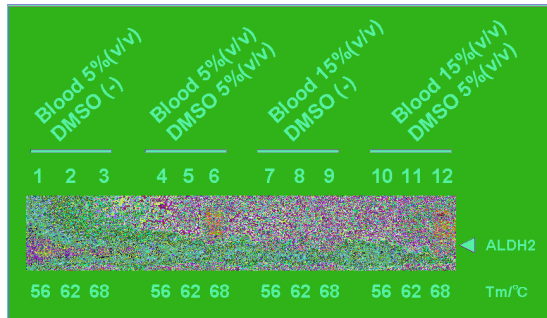


上記のいずれの保存状態であってもプライマーセット 1 (Fig. B)、プライマーセット 2 (data not shown) で、全血の保存状態に依存せず DNA の増幅を検出することができた (Fig. B, lane 7–9)。つまり、AmpDirect®により増幅効率が悪いのは、血液の保存状態によるものではないと考えられた。

そこで、他の crude 試料からの PCR 反応試薬である Phusion® Blood Direct PCR Kit を用いて、-80°C 保存の全血を鋳型に、検討

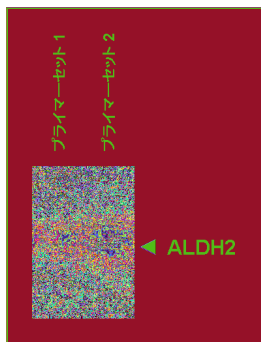
を行った (Fig. C)。

Fig.C Phusion® Blood Direct PCR Kit を用いた PCR



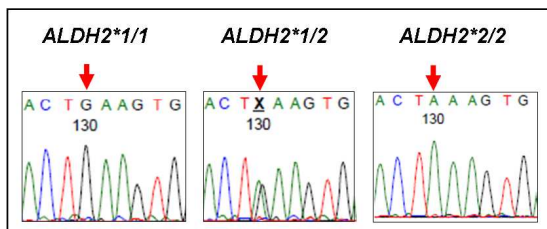
プライマーセット 2 と Phusion® Blood Direct PCR Kit によって、全血を反応溶液の 15%(v/v)、DMSO を加えない条件において、広い Tm 条件下で PCR が進行した (Fig. C, lane 7-9)。一方、プライマーセット 1 を用いた同試薬での PCR では、反応は進行しなかった (Fig. D)。

Fig. D 全血 15%(v/v)、DMSO(-)での PCR



プライマーセット 2 にて、全血を反応溶液の 15%(v/v)、DMSO を加えない条件において得られた DNA 断片より、Fig.E のように明確な genotyping が可能となった。

Fig. E Direct Sequencing による ALDH2 遺伝子の genotyping



以上より、ALDH2 遺伝子の genotyping において、極めて明確かつ再現性の高い全血からの Direct Sequencing の系の構築に成功した。

(2) ALDH2 遺伝子変異と飲酒耐性の検討

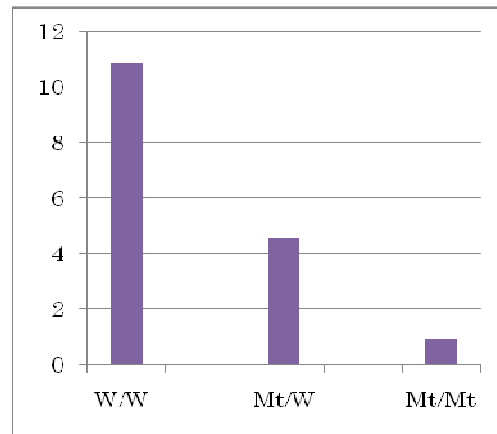
ALDH2 の遺伝変異の分析結果は、飲酒に対する耐性を非常によく反映していた。

遺伝子的一方に変異型があると (ヘテロ型)、飲酒は可能であるが、自己および他者評価では飲酒への耐性は正常型とホモ変異型の中間より、むしろ飲酒耐性が弱い方へ偏ると考えられた。

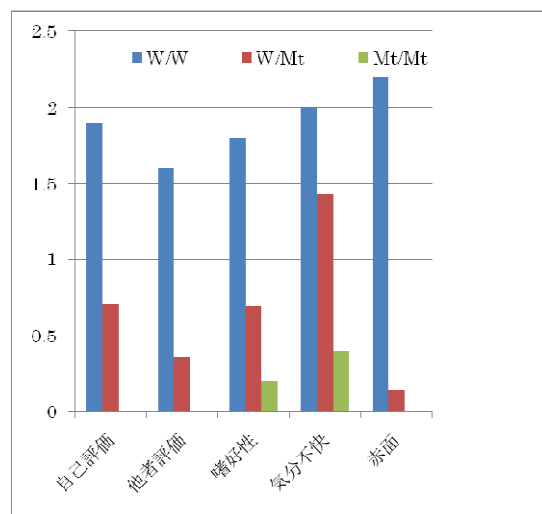
特に赤面の有無に関しては正常型とヘテロ変異に関して大きな差が認められた。

	W/W n=10	W/Mt n=14	Mt/Mt n=10
飲酒可否	1.00±0.00	1.00±0.00	0.30±0.50
自己評価	1.90±0.57	0.71±0.73	0.00±0.00
他者評価	1.60±1.07	0.36±0.84	0.00±0.00
嗜好性	1.80±0.92	0.71±0.83	0.20±0.60
気分不快	2.00±0.67	1.43±1.09	0.40±0.97
赤面	2.20±0.79	0.14±0.36	0.00±0.00
飲酒日/週	0.33±0.31	0.18±0.24	0.00±0.01
総計	10.83 ± 2.12	4.54 ± 2.85	0.90 ± 1.92

(W:野生型、Mt:変異型)



各遺伝子群でのアンケート総点数の差



各遺伝子群でのアンケート項目の平均点数 (縦軸はアルコール耐性の強さ)

(3) ALDH2 遺伝子変異と GTN への反応性の差異に関する検討

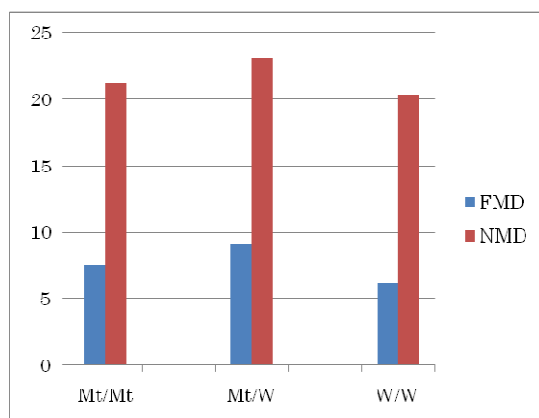
遺伝子変異にかかわらず、すべての対象で GTN による血管拡張反応が認められ、生体内ではその効果発現に ALDH2 のエステラーゼ活性による NO の放出以外の他の経路が存在することが強く示唆された。

以上のことから、ALDH2 活性の高さすなわち飲酒耐性の強弱により、ニトログリセリンの治療効果に差は生じないと考えられる。

	FMD(%)	NMD(%)
W/W (n=6)	6.2±3.1	20.4±3.2
W/Mt(n=7)	9.0±4.6	23.1±4.8
Mt/Mt(n=8)	7.6±4.7	21.2±9.2

(W:野生型、Mt:変異型)

FMD、NMD いずれに関しても各群間で有意差なし。



各遺伝子群での FMD と NMD (縦軸%)

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 9 件)

Toru Nishinaka, Takeshi Miura, Manami Okumura, Fumika Nakao, Haruka Nakamura, Tomoyuki Terada
Regulation of Aldo-keto reductase AKR1B10 gene expression: involvement of transcription factor Nrf2.
Chemico-Biological Interactions, 191(1-3):185-191, 2011 年 5 月発行, 査読有り

Tomoyuki Terada, K Okamoto, Junichi Nishikawa, Takeshi Miura, Toru Nishinaka, T Nishihara
Site-directed mutagenesis of rat

thioltransferase: effects of essential cysteine residues for the protection against oxidative stress.

Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology

24 (1) : 60-65, 2010 年 1 月発行, 査読有り

Miura Takeshi, Nishinaka T, Terada T
Importance of the substrate-binding loop region of human monomeric carbonyl reductases in catalysis and coenzyme binding.

Life Sciences

85 (7-8) : 303-308, 2009 年 6 月発行, 査読有り

Takeshi Miura, Yuma Itoh, Masahito Takada, Hidenobu Tsutsui, Tokihito Yukimura, Toru Nishinaka, Tomoyuki Terada

Investigation of the role of the amino acid residue at position 230 for catalysis in monomeric carbonyl reductase 3.

Chemico-Biological Interactions

178 (1-3) : 211-214, 2009 年 3 月発行, 査読有り

Takeshi Miura, Toru Nishinaka, Masashi Takama, Masahiro Murakami, Tomoyuki Terada
Chinese hamster monomeric carbonyl reductases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily

Chemico-Biological Interactions

178 (1-3) : 110-116, 2009 年 3 月発行, 査読有り

Takeshi Miura, Toru Nishinaka, Tomoyuki Terada, Kazuya Yonezawa

Relationship between aging and dosage of warfarin : the current status of warfarin anticoagulant therapy for Japanese outpatients in a department of cardiovascular medicine

Journal of Cardiology

53 (3) : 355-360, 2009 年 2 月発行, 査読有り

Takeshi Miura, Toru Nishinaka, Masashi Takama, Masahiro Murakami, Tomoyuki Terada
Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1.

Molecular and Cellular Biochemistry,

315 (1-2) : 113-121, 2008 年 8 月発行, 査読有り

米澤一也,

急性心不全とその関連疾患に対する効果的

かつ効率的な治療等の確立に関する臨床研究—院外心停止者の救命率向上に対する自動体外式除細動器を用いた心肺蘇生法の普及とエビデンス確立のためのウツタイン様式を用いた大規模研究

厚生労働科学研究費補助金による循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業：急性心不全とその関連疾患に対するより効果的かつ効率的な治療等の確立に関する臨床研究

『院外心停止者の救命率向上に対する自動体外式除細動器を用いた心肺蘇生法の普及とエビデンス確立のためのウツタイン様式を用いた大規模研究』課題番号：H16-心筋-02
平成18年度 総括・分担研究報告書、

25-26、

平成19年発行、査読なし

米澤一也、

焦点 心不全のディジーズマネジメント
新しい疾病管理と患者支援

〔Ⅱ〕心不全のディジーズマネジメントの実践を探る、

急性期 急性増悪期の臨床薬理、

54 (12) : 56-61、

看護技術 10月臨時増刊号、

2008年10月発行、査読なし

〔学会発表〕(計 5件)

寺田知行 三浦健 西中徹、

ラットオールトランスフェラーゼの変異導入による機能変化、

第83回日本生化学会・第33回日本分子生物学会合同年会、2010年12月発表、神戸市

西中徹 奥村麻奈美 中尾文香 中村遥香 三浦健 寺田知行、

転写因子 Nrf2 によるアルドケト還元酵素 AKR1B10 遺伝子の発現調節、

第83回日本生化学会・第33回日本分子生物学会合同年会、2010年12月発表、神戸市

Toru Nishinaka, Takeshi Miura, Tomoyuki Terada、

Regulation of Aldo-keto reductase 1B10 (AKR1B10) gene expression、

15th International workshop on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism、
2010年7月発表、アメリカ

三浦健、筒居秀伸、小淵修平、田中亮輔、山形雅代、大喜多守、松村靖夫、雪村時人、寺田知行
ラット腎虚血再灌流障害に対する内因性モノアミンオキシダーゼ阻害物質イサチンの効果

(The effect of an endogenous monoamine oxidase inhibitor, isatin, on

ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats)

第130回 日本薬学会年会、2010年3月28日、岡山市

Takeshi Miura, Toru Nishinaka, Tomoyuki Terada

Potential targeting region for the specific inhibition of human monomeric carbonyl reductases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily.

3rd Asian Pacific Regional Meeting (ISSX)

2009年5月10日、バンコク、タイ

〔図書〕(計4件)

米澤一也、

指導士資格認定試験準拠

心臓リハビリテーション必携、

2. 代謝機能・骨格筋機能

19-23、

特定非営利活動法人 日本心臓リハビリテーション学会編発行、2010年10月発行、全346ページ

米澤一也、

3章 心臓リハビリテーションの理解に役立つ Tips. 1 病態生理・疫学

Q39 心臓が悪くなると骨格筋も悪くなる？

—心不全時の骨格筋変化、238-241、心臓リハビリテーション 知っておくべき Tips、

中山書店発行、2008年6月発行、全275ページ

米澤一也、

ECC(Emergency Cardiovascular Care) 超急性期をのりこえる、

第1章 急性心筋梗塞症の疫学

発症における性差—女性での知見と中心として、28-36、

中山書店発行、2007年3月発行、全308ページ

米澤一也、北島顕

説明上手なナースになる！心臓病患者さんの生活・退院指導、

第1章 心臓病の予防、検査、2. 理学的所見、20-29、

メディカ出版発行、2006年8月発行、全262ページ

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 一也 (YONEZAWA KAZUYA)

国立病院機構函館病院

臨床研究部・部長

研究者番号：20301955

(2) 研究分担者

三浦 健 (MIURA TAKESHI)

大阪大谷大学

薬学部・助教

研究者番号：60434809

(3) 連携研究者