

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790549

研究課題名（和文） 日本人におけるヒト核内受容体遺伝子多型と疾患の関連研究

研究課題名（英文） Association of genetic polymorphisms in human NR1I3 with the diseases in elderly Japanese population.

研究代表者

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：20415508

研究成果の概要（和文）：本研究は、核内受容体 CAR(NR1I3)遺伝子多型と様々な疾患との関連を、約 1500 症例の日本人高齢者連続剖検例においてフェノームスキャン解析した研究である。11 種類の hCAR 遺伝子多型と臨床診断および病理診断における悪性腫瘍や代謝性疾患、循環器系疾患等のフェノームスキャン解析から、rs2501873 多型は肺癌と、rs2307424(P180P)多型は造血器系悪性腫瘍、高脂血症、血清 HDL コレステロール値と、そして rs6686001 多型は動脈瘤と統計学的に有意な関連を示すことを見出した。本研究で得られた新規の遺伝子-疾患関連は、その一部が分子生物学的手法により既に得られている研究データと一致していることから、CAR を分子標本とする病態の予防や治療法の新規開発に有効な疫学的エビデンスとしての貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed search for genotype-phenotype associations in consecutive autopsies of elderly Japanese population, focusing on human CAR polymorphisms and various diseases. We found that several SNPs in NR1I3 gene were significantly associated with reduce or increase risk of the diseases, after adjustment. We provide data that polymorphisms of CAR, which controls the metabolism and elimination of endogenous and exogenous toxic compound or drugs, may play an important role in the development of the diseases. However, further prospective studies with large sample sizes are required to confirm our observations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1700000	510000	2210000
2010 年度	1200000	360000	1560000
2011 年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：分子遺伝疫学・フェノームスキャン研究

1. 研究開始当初の背景
ヒトで報告されている 48 種類の核内受容体遺伝子は、それぞれが性分化、細胞分化、脂質代謝や癌など多数の生命現象に重要な機

能を示すことが知られているが、これらの実験は培養細胞や昆虫あるいは一部の実験動物を用いて行われた細胞生物学的手法によるものがほとんどである。また、リガンドが

判明している核内受容体を中心にして、新たな化合物や阻害剤が多数合成され、メタボリックシンドロームや骨粗鬆症の改善薬、抗がん剤など医療分野への応用が期待されている。なかでも、Constitutive Androstane Receptor (CAR, NR113)は、生体内異物センサーと呼ばれ、医薬品や化学物質に応答して、CYPs, UGTs, MRPs, MDRs等の薬物代謝酵素群を誘導することが知られている(PhLamba JK. Pharmacogenomics 9(1): p71-83: 2008)。

CARの活性化機構は、他の核内受容体とは異なり、リガンドの有無に関わらず常に活性化状態にあり、その転写活性は薬剤応答性による局在変化により制御されていると考えられている(Negishi M. et al. Steroids. 72(3): p231-246: 2007)。CARに関する研究は、培養細胞や一部の動物を用いた、転写活性機構ならびに代謝経路の解明研究がほとんどで、ヒト疾患への関与については未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究では、他の核内受容体と異なる活性化機構を持つCARに焦点を当て、日本人集団における悪性腫瘍や代謝性疾患とHuman CAR (hCAR) 遺伝子多型の関連を、フェノームスキャンという手法を用いて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) JG-SNPでの研究

①研究対象者：

東京都健康長寿医療センター病理診断科がデータベース化した「老年病 SNP データベース (JG-SNP)」に登録・保管されている日本人高齢者連続剖検例から得た約1500検体のDNAサンプルを対象とした。

②ジェノタイピング：

hCAR 遺伝子全領域に渡って選定した Tag SNP を含めた、日本人でのマイナーアレル頻度が20%以上の遺伝子多型と1%以下のレアバリエーションを合わせて11種類の遺伝子多型をLightCycler480® (Roche)というリアルタイムPCR装置を使用したMelting Curve Analysis法により検出した。

③統計解析：

多型データは、臨床病理情報等と統合させ、統計学的関連解析に用いるデータセットを作成した。

JG-SNPに登録されている疾患情報のうち、まずhCAR遺伝子と関連があると考えられる代謝型疾患および悪性腫瘍について、次に循環器疾患や骨粗鬆症等の疾患について各多型

との関連の有無を検討した。

遺伝的効果と各疾患の関連解析の検討には、多重ロジスティック回帰分析を用いた。関連性の評価には、対象者の死亡時年齢、性別、高血圧や高脂血症、糖尿病などの既往歴、そして喫煙や飲酒週間など生活習慣の有無について調整した後の結果を用い、P値が0.05未満の時に、統計学的に有意な関連であると判断した。すべての統計学的解析にはSAS統計解析ソフトウェア(for Window ver. 9.2)を使用した。

研究対象者の臨床学的背景

対象者数		N = 1536
脂質レベル		Mean ± S.D.
血清総コレステロール [mg/dL]*		166.1 ± 44.7
血清HDLコレステロール [mg/dL]*		42.6 ± 15.7
血清リポ蛋白(a) [mg/dL]*		209.7 ± 215.1
臨床診断頻度		N (%)
高血圧症		447 (29)
糖尿病		226 (15)
高脂血症		32 (2)
検査値診断頻度		
高コレステロール血症 [総コレステロール ≥ 220mg/dL]		144 (9)
低HDLコレステロール血症 [HDL < 40mg/dL]		876 (57)
嗜好習慣		
喫煙習慣(あり)		730 (51)
飲酒習慣(あり)		510 (36)

④原因多型の探索：

疾患関連解析の結果から、統計学的に有意な関連がみられた多型をマーカーとして、hCAR 遺伝子近傍の他の遺伝子を含めた領域に拡大して、3種類の Tag SNP を選定した。

JG-SNP 1500 検体の DNA サンプルについて、これら Tag SNP を TaqMan SNP Genotyping Assay 法により調べ、各臨床病理情報と統合させて関連の有無を検討した。

(2) 日本人職域コホートでの研究

高齢者連続剖検例で疾患と統計学的に有意な関連を示した5種類の多型のうち2種類の SNP について、別の日本人コホート集団を用いて、本当にこれらの疾患 - 多型の関連が、別の日本人集団でも再現性が確認できるのかを検討した。

①研究対象者：

ある工場に勤務する日本人健康男性労働者約400人である。

②ジェノタイピング：

健康診断の際に採血した抹消血からDNAを抽出しTaqMan SNP Genotyping Assay法により多型の判定を行なった。

③統計解析：

多型データは生活習慣や既往歴、血液検査等のデータと統合して、JG-SNPでの研究と同様に遺伝的効果と疾患の関連解析を行なった。

4. 研究成果

(1) JG-SNP での研究

① 遺伝子多型解析結果:

10 種類の hCAR 遺伝子多型のうち、3 種類のレアバリエントは、今回の集団では検出されなかった。残りの多型は全て Hardy-Weinberg 平衡が保持されていた。

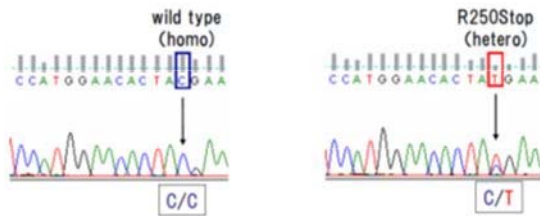
SNP No.	NCBI rs number	Position*	Amino acid change	Nucleotide change	Minor allele	Minor allele frequency	HapMap (JPT)
1	rs55802895	-4743	—	G/A	A	0.289	—
2	rs11584174	-4453	—	G/A	A	0.292	0.273
3	rs11265571	-3899	—	T/A	A	0.291	—
4	rs56835010	-3216	—	A/G	G	0.292	—
5	rs6686001	IVS3-131	—	C/A	A	0.291	0.267
6	rs2501873	IVS3+1099	—	A/G	G	0.413	0.367
7	—	+398**	V133G	T/G	G	0.000	—
8	rs2307424	+540**	P180P	T/C	C	0.465	0.432
9	—	+737**	H246R	A/G	G	0.000	—
10	rs2307418	IVS8+17	—	A/C	C	0.077	0.133
11	—	+923**	L308P	T/C	C	0.000	—

* From the transcription initiation site or from the nearest exon.

** A of the translation initiation codon ATG is numbered +1.

② 新規レアバリエントの検出:

日本人高齢者連続剖検例 1536 検体のうち 3 検体に、アレル頻度が 0.1% の新規レアバリエントを見出した。このレアバリエントは、終止コドンを含むナンセンス変異 (R250Stop) であり、これを有する検体はいずれも何かしらの癌の所見 (前立腺癌、悪性リンパ腫、肝胆道癌) が見られた。



新規 rare variant (R250Stop) を有する3検体の特徴

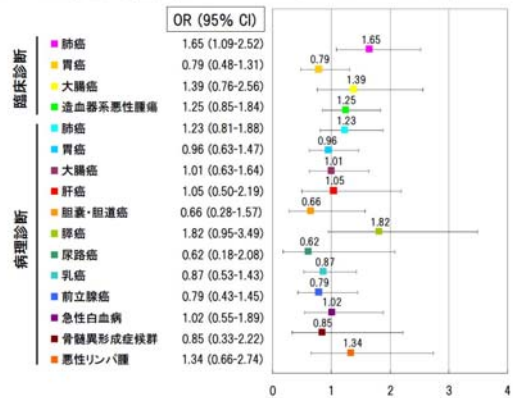
Sample	Gender	Age (at death)	Clinical diagnose	Pathological diagnose
1	男性	89	前立腺癌 急性腎不全 横紋筋融解症 肺炎	前立腺癌 急性腎盂腎炎 肺炎
2	女性	77	悪性リンパ腫 肺炎 薬剤性間質性肺炎	悪性リンパ腫 肺炎
3	女性	70	胆管癌 肝細胞癌 C型肝炎 高血圧 胸水 腎不全 肝性昏睡	肝細胞癌 乙型肝炎 閉塞性黄疸 陳旧性心筋梗塞

③ 悪性腫瘍と遺伝子多型の関連解析:

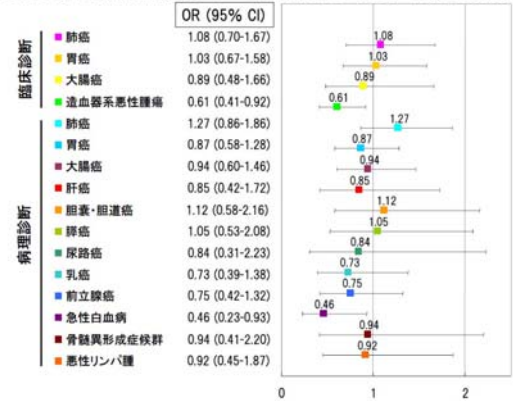
多型と悪性腫瘍との関連をフェノームスキャンした結果、イントロン 3 に存在する rs2501873 多型 (IVS3+1099A>G) の G-allele 保持者 (GG+GA) は、肺癌のリスクが統計学的有意に高かった。特に、喫煙群において肺癌の罹患リスクが上昇した。

一方で、エクソン 5 に存在する rs2307424 多型 (+540T>C, P180P) の C-allele 保持者 (CC+CT) は造血管系悪性腫瘍ならびに急性白血病に対して統計学的有意に罹患リスクが低かった。

rs2501873多型と悪性腫瘍のフェノームスキャン: GG+GA vs. AA(reference)



rs2307424多型と悪性腫瘍のフェノームスキャン: CC vs. CT+TT(reference)



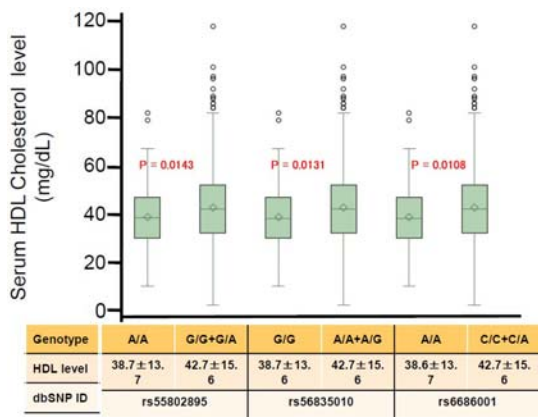
④ 代謝性疾患と遺伝子多型の関連解析:

多型と代謝性疾患との関連をフェノームスキャンした結果、rs2307424 多型の C-allele を 1 つ以上持つヒトは高脂血症の罹患リスクが低い事が示された。一方で、5' -UTR 領域に存在する rs55802895 多型 (-4743 G>A) の A-allele 保持者 (AA+AG) は高脂血症の罹患リスクが有意に高かった。A-allele をホモで持っているヒトと G-allele 保持者 (GG+GA) の血清 HDL コレステロール値を比較してみると A-allele 保持者が有意に低いことから、高脂血症になり易いのだと考えられた。

代謝性疾患と多型の関連

疾患	db_SNP ID rs number	Genotype	Adjusted OR (95% CI)	P value
高脂血症	rs2502615	G/G	1.00 Reference	0.0016
		A/G + A/A	0.28 (0.12-0.61)	
	rs2307424	T/T	1.00 Reference	
		T/C + C/C	0.29 (0.13-0.65)	0.0025
低HDLコレステロール血症 [HDL < 40mg/dL]	rs55802895	G/G + G/A	1.00 Reference	0.0377
		A/A	1.52 (1.02-2.26)	
	rs56835010	A/A + A/G	1.00 Reference	
		G/G	1.54 (1.04-2.28)	
	rs6686001	A/A + C/A	1.00 Reference	
C/C		1.55 (1.04-2.31)		

各ジェノタイプにおける血清脂質レベルの違い



⑤高脂血症の原因遺伝子探索：

rs2307424 多型をマーカーとして Tag SNPs を選出した際に挙がってきた 3 つの SNP は APOA2 遺伝子の 5' -UTR 領域に位置しており、どれもマイナーアレルを 1 以上持つヒトで高脂血症のリスクが有意に低かった。

Tag SNPs の高脂血症への関連

疾患	db_SNP ID rs number	Genotype	Adjusted OR (95% CI)	P value
高脂血症	rs3829793	G/G	1.00 Reference	0.0134
		G/C + C/C	0.37 (0.17-0.81)	
	rs3813627	T/T	1.00 Reference	
		G/T + G/G	0.45 (0.21-0.98)	
	rs3813628	C/C	1.00 Reference	
A/C + A/A		0.36 (0.16-0.80)		

⑥循環器疾患と遺伝子多型の関連解析：

多型と循環器疾患との関連をフェノームスキャンした結果、イントロン 3 に位置する rs6686001 多型 (IVS3-131 C>A) の A-allele 保持者 (AA+AG) が動脈瘤の罹患リスクが有意に高かった。

rs6686001 多型と動脈流の関連

疾患	Genotype	Adjusted OR (95% CI)	P value
動脈瘤	GG + GT	1.00 Reference	0.01
	TT	2.36 (1.23-4.54)	

(2) 日本人職域コホートでの研究

日本人高齢者連続剖検例において、高脂血症の罹患リスクを上昇させた rs55802895 多型と高い連鎖不平衡 (LD=1, R2=0.99) にある rs56835010 多型 (-3216 A>G) を、日本人職域コホート集団において検出し、血清の脂質レベルとの関連を検討した。

その結果、G-allele の数が増える程、血清中の中性脂肪値が有意に高くなっていった。

また、G-allele の増加と共に高脂血症の罹患割合も有意に増えていった。この結果は、連続剖検例での高脂血症と多型との関連を再現する結果となった。

rs56835010 多型は hCAR (NR1I3) 遺伝子の転写開始点上流に位置しており、変異による塩基の変化が、他の共役因子との結合に影響を与え、遺伝子の活性や発現を変えている可能性が考えられた。

(3) まとめ

本研究は、hCAR 遺伝子と疾患の関連を検討する初めての研究であり、hCAR 遺伝子多型が悪性腫瘍、代謝性疾患、循環器疾患の発生の有無に關与する可能性を示唆した。

今後は、本研究で各疾患と統計学的有意な新規の関連が見られた遺伝子多型の機能解析を行うと共に、他の大規模な集団を用いて同様の関連解析を行い、更なる再現性の確認が必要である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

①池田仁子、日本人高齢者における心筋梗塞関連遺伝子多型の冠動脈狭窄に対する影響、第 56 回日本人類遺伝学会、2011 年 11 月 9 日～12 日、幕張メッセ (千葉絵)。

②IKEDA SHINOBU, CUMULATIVE EFFECT OF 12 POLYMORPHISMS ON BLOOD PRESSURE AND PREVALENCE OF HYPERTENSION, 第 21 回日本疫学会、2011 年 1 月 21 日～22 日、札幌 (北海道)。

③池田仁子、核内受容体 CAR 遺伝子多型を用いたフェノームスキャン解析、第 55 回 日本人類遺伝学会、2010 年 10 月 28 日～30 日、大宮 (埼玉)。

④IKEDA SHINOBU, Association of genetic polymorphisms in human NR1I3 with hyperlipidemia in elderly Japanese population, 14th Human Genome Meeting 2010, May 18-21, 2010, Montpellier, France.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：20415508