

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：44523

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700815

研究課題名(和文) 高血圧性疾患の重症化に関わる遺伝要因の解明とその成果に基づく栄養指導法の構築

研究課題名(英文) Association of genetic polymorphisms in hypertension related genes with an increased risk of cardiovascular disease in hypertensive patients

研究代表者

坂野 麻里子 (BANNO, Mariko)

武庫川女子大学短期大学部・食生活学科・准教授

研究者番号：90400530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧患者において血圧日内変動の異常は心血管疾患の独立したリスクとなる。本研究では日本人高血圧患者の心血管疾患リスク亢進に関わる遺伝要因を解明することを目的とした。高血圧関連遺伝子の一塩基多型解析の結果、ACE2、ECE2、SCNN1A、SLC12A3、MOP4、PER2、PER3遺伝子多型が高血圧患者の夜間血圧上昇と関連を示すことが明らかとなった。また、EDNRAおよびNCX1遺伝子多型が慢性腎臓病発症に、VWF遺伝子多型が頸動脈肥厚の拡大に関与することが判明した。本研究の成果を応用することで、心血管疾患リスクの高い高血圧患者を早期に発見し、適切な栄養指導や投薬を実施できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Blood pressure (BP) variations, especially non-dipping patterns during sleep, are known to increase cardiovascular event risk in hypertensive patients. In this study, we examined the relationship between 185 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in hypertension related genes and circadian variation of BP in Japanese hypertensives. We found that the SNPs in ACE2, ECE2, SCNN1A, SLC12A3, MOP4, PER2 and PER3 genes were significantly associated with the non-dipping pattern of BP in essential hypertensive patients. We also found the significant association between the SNPs in EDNRA and NCX1 genes and the prevalence of chronic kidney disease complication in hypertensives. The SNP in VWF gene was associated with the carotid intima-media thickness in hypertensives. Taken together, our results revealed that the genetic polymorphisms in ACE2, ECE2, SCNN1A, SLC12A3, MOP4, PER2, PER3, EDNRA, NCX1 and VWF genes could cause an increased risk of cardiovascular event in Japanese hypertensives.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：高血圧 遺伝子多型 24時間血圧 血圧日内変動 慢性腎臓病 頸動脈肥厚

## 1. 研究開始当初の背景

近年の疫学、臨床研究から、高血圧患者において、診察室で測定される随時血圧よりも24時間自由行動下血圧測定により得られた血圧レベルが、心血管イベント発症の予測に重要であるというコンセンサスが確立されている。さらに、血圧には明確な日内変動があり、その変動リズムの異常が平均血圧に加えて、重要な心血管リスクとなることが明らかにされていた。

また、腎臓は高血圧の主要な標的器官の一つであり、高血圧患者では慢性腎臓病 (CKD) を合併することが多い。CKD は進行すると人工透析を要する末期腎不全に至るというだけでなく、比較的早い段階から心血管イベント発症の独立した危険因子となることが明らかにされていた。高血圧患者の中で、血圧日内変動の異常や CKD 発症リスクの高い集団を予め選抜し、栄養指導や投薬による予防措置を早期より実施できれば、致死的な心血管イベントを回避できる可能性が高い。

これらの背景を踏まえて本研究では、心血管疾患リスクの高い高血圧患者を早期に発見し、適切な栄養指導を実施するため、日本人高血圧患者の血圧変動異常および CKD 併発に関わる遺伝要因の解明を試みた。

## 2. 研究の目的

(1)高血圧患者において、睡眠時血圧の上昇は脳卒中や虚血性心疾患をはじめとする心血管イベント発症リスクを亢進させることが知られている。本研究では、日本人高血圧患者における24時間血圧変動と高血圧関連遺伝子多型との関連を解析し、高血圧発症のリスクとなる遺伝子多型を明確にすることを目的とした。

(2)高血圧に起因するCKDの併発は、重篤な心血管イベント発症リスクを高めることから、CKDの予防対策が世界的に注目されている。そこで、日本人高血圧患者の高血圧関連遺伝子解析を行い、CKDの発症や重症度にかかわる遺伝子多型の同定を目指した。

(3)高血圧は動脈硬化のリスクにもなることから、血小板接着蛋白質 VWF 及び、血小板膜受容体の切断に関わる ADAM17 に着目し、その遺伝子多型が高血圧患者の動脈硬化発症に関わるかどうかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)高血圧患者の血圧日内変動に関わる高血圧関連遺伝子多型の同定

### 24時間自由行動下血圧測定

本態性高血圧患者334名を対象とし、24時間血圧を30分間隔で測定した。対象者の睡眠時と覚醒時の平均収縮期血圧差を比較し、「24時間血圧計の使用基準に関するガイドライン」に従って、睡眠時に10%以上の低下が見られた例をDipper、10%未満の低下であった例をNon-Dipperとした。

### DNA抽出およびダイレクトシーケンス

対象患者の血液サンプルよりゲノムDNAを抽出し、高血圧関連遺伝子の全エキソンをPCR増幅後、ダイレクトシーケンスにより新規一塩基多型を探索した。得られた多型情報と拡張期および収縮期血圧等の臨床情報との相関を解析し、高血圧発症に関わる一塩基多型を同定した。

### TaqMan-PCR解析

関連遺伝子のタンパク質コード領域とプロモーター領域のDNAシーケンスを解析し、新たに同定したSNPと両アレル頻度が5%以上の既知SNPについて、全対象者の遺伝子型をTaqMan-PCR法を用いて判定した。

(2)高血圧患者の慢性腎臓病発症に関わる遺伝子多型の同定

### CKDの判定

本態性高血圧患者943名を対象とし、Jaffe法により血清クレアチニン値を測定した。この測定値を基に、日本腎臓学会による「日本人のためのGFR推算式」に従って、推算糸球体濾過量(eGFR)を算出した。eGFRが60ml/分/1.73m<sup>2</sup>未満の場合をCKDと判定した。

### TaqMan-PCR法

対象患者の血液サンプルよりゲノムDNAを抽出し、高血圧関連遺伝子のSNP型をTaqMan-PCR法を用いて判定した。

(3)高血圧患者の動脈硬化形成に関わる遺伝子多型の同定

### 頸動脈肥厚の判定

本態性高血圧患者962名を対象とし、頸動脈エコーにより両側総頸動脈の内膜中膜複合体厚(IMT)の最大厚と平均厚を測定し、頸動

脈肥厚の進行度を判定した。

#### TaqMan PCR 法

対象患者の血液サンプルよりゲノム DNA を抽出し、VWF 遺伝子および ADAM17 遺伝子の SNP 型を TaqMan PCR 法を用いて判定した。

(人権の保護及び法令等の遵守への対応)

本研究ではヒト遺伝子および検体を使用するため、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成 20 年 12 月 1 日一部改正)」、「臨床研究に関する倫理指針(平成 20 年 7 月 31 日全部改正)」、「疫学研究に関する倫理指針(平成 19 年 8 月 16 日全部改正)」を遵守した。また、事前に所属機関の倫理審査委員会の承認を得て実施した。被験者およびその家族に研究内容を十分説明した上で、書面にて同意を得た。全ての臨床情報、遺伝子情報は匿名化し、パスワードで守られたコンピュータで管理した。

#### 4. 研究成果

(1) 高血圧患者の血圧日内変動に関わる高血圧関連遺伝子多型の同定

44 の高血圧関連遺伝子内の計 159 SNP について、24 時間血圧との関連を検討した結果、ACE2, ADRB2, CAT, NOS2, NOS3, SLC4A1, SLC12A3, SCNN1A, MOP4, PER2, PER3 遺伝子多型が、日本人高血圧患者の睡眠時血圧上昇と関連を示すことが明らかとなった。これらの遺伝子解析から高血圧患者の心血管イベント発症リスクを予測できる可能性が示唆される。

(2) 高血圧患者の慢性腎臓病発症に関わる遺伝子多型の同定

高血圧性 CKD 発症に関わる解析の結果、NCX1 (1 型 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体) 遺伝子多型が本邦高血圧患者の CKD 発症と関連を示すことが明らかとなった。NCX1 は CKD 発症と関わっており、その遺伝子解析により、致死的な心血管イベント発症リスクの高い高血圧患者を早期に発見できる可能性がある。

(3) 高血圧患者の動脈硬化形成に関わる遺伝子多型の同定

血小板接着蛋白質 VWF 及び、血小板膜受容体の切断に関わる ADAM17 の遺伝子多型を同定し、解析した結果、VWF 遺伝子の G-1051A、G88379A 多型が日本人高血圧患者の頸動脈肥厚に関わることが示唆された。これらの SNP

解析により動脈硬化リスクの高い高血圧患者を予測できる可能性がある。

#### 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)

小久保喜弘、古川曜子、坂野麻里子、都市部一般住民を対象とした大豆摂取の動脈硬化進展予防に関する追跡研究、**大豆たん白研究**、査読有、16、1-6、2013.

坂野麻里子、高ホモシステイン血症と心血管疾患について、**栄養兵庫**、査読有、219、5、2013

Kamide K, Kokubo Y, Yang J, Takiuchi S, Horio T, Matsumoto S, Banno M, Matayoshi T, Yasuda H, Miwa Y, Yoshihara F, Nakamura S, Nakahama H, Iwashima Y, Oguro R, Ohishi M, Rakugi H, Okamura T, Miyata T, Kawano Y, Association of intima-media thickening of carotid artery with genetic polymorphisms of the regulator of G-protein signaling 2 gene in patients with hypertension and in the general population. **Hypertension Research**, 査読有, 34, 740-746, 2011.

[学会発表](計 4 件)

小久保喜弘、古川曜子、坂野麻里子、都市部一般住民を対象とする大豆摂取の動脈硬化進展予防に関する追跡研究、**大豆たん白研究報告会**、2013年5月27日、千里阪急ホテル(豊中市)。

小久保喜弘、古川曜子、坂野麻里子、都市部一般住民を対象とするコーヒー摂取量と動脈硬化との関連に関する疫学研究 吹田研究、**日本栄養改善学会学術総会 第58回大会**、2011年9月7日、広島国際会議場(広島市)。

Banno M, Kamide K, Horio T, Miyata T, Kawano Y, Genetic polymorphisms of endothelin-related genes associated with risk of chronic kidney disease in Japanese hypertensives, **The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIII Congress**, 2011年7月27日, Kyoto International Conference Center (Kyoto).

Kokubo Y, Miyata T, Sakata T, Okamoto A, Watanabe M, Ono Y, Banno M, Miyamoto Y, THE ASSOCIATION BETWEEN PLASMA-FIBRINOGEN AND CORONARY HEART DISEASE IN A JAPANESE URBAN COHORT : THE SUITA STUDY, *The International Society on Thrombosis and Haemostasis XXIII Congress*, 2011 年 7 月 26 日, Kyoto International Conference Center (Kyoto).

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

坂野 麻里子 (BANNO Mariko)  
武庫川女子大学短期大学部・食生活学科・  
准教授  
研究者番号 : 90400530