

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462159

研究課題名(和文) 閉塞性動脈硬化症(ASO)関連遺伝子解析・機能解析

研究課題名(英文) Genome-wide association study of peripheral arterial disease

研究代表者

宮田 哲郎 (Miyata, Tetsuro)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：70190791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：閉塞性動脈硬化症は下肢の慢性虚血性変化を本態とする疾患だが、疾患発症に関する遺伝学的報告は極めて少ない。遺伝子多型の一つである一塩基多型(SNPs)に着目して、多数の患者群DNAサンプルと対照群サンプルを使用して全染色体で網羅的解析(ゲノムワイド関連解析：GWAS)を行い、第4、7、13染色体上で疾患に関連する遺伝子領域を特定した。第13染色体上のSNPに関しては、In vitroでリポーター遺伝子解析による機能解析を行った。今回検出した3 SNPsは全て動脈硬化進展メカニズムに関与する遺伝子と相関を認め、従来のリスクファクターに依存しない本疾患固有の遺伝的因子であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Characteristics of peripheral arterial disease (PAD) are the occlusion or stenosis of multiple vessel sites caused mainly by atherosclerosis and chronic lower limb ischemia. To identify PAD susceptible loci, we conducted a genome-wide association study (GWAS) with 785 cases and 3,383 controls in a Japanese population using 431,754 single nucleotide polymorphisms (SNP). After staged analyses including a total of 3,164 cases and 20,134 controls, we identified 3 novel PAD susceptibility loci at IPO5/RAP2A, EDNRA and HDAC9 with genome wide significance (combined $P = 6.8 \times 10^{-14}$, 5.3×10^{-9} and 8.8×10^{-8} , respectively). Fine-mapping at the IPO5/RAP2A locus revealed that rs9584669 conferred risk of PAD. Luciferase assay showed that the risk allele at this locus reduced expression levels of IPO5. To our knowledge, these are the first genetic risk factors for PAD.

研究分野：Vascular surgery

キーワード：PAD GWAS

1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症 (Arteriosclerosis obliterans; ASO)は動脈硬化による両側総腸骨動脈以下の下肢を栄養する動脈の狭窄もしくは閉塞と定義される。近年では上肢動脈、内臓動脈、頸動脈病変、腹部大動脈病変と併せて末梢動脈疾患 (Peripheral Arterial Disease; PAD)と総称されている。ASO 罹患患者は非罹患患者と比較して約3倍の心血管病変発症リスクと死亡リスクがあり、動脈硬化に関連した心血管病死亡原因の第三位を占めている。過去10年間で罹患患者数は20%増加しており糖尿病罹患数の増加と相まって、今後も全世界で罹患患者数の増加が確実視されている。ASOの疫学的な疾患罹患危険因子としては喫煙・高血圧・脂質代謝異常症・糖尿病・家族歴が挙げられる。いずれの基礎疾患に関しても遺伝学的に危険因子は同定されているが、ASO自体に関して発症に直接関与する明確な遺伝学的危険因子、メンデル遺伝する確立した遺伝子は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究ではバイオバンクジャパン計画 (BioBank Japan Project; BBJ)の一部門として、理化学研究所 統合生命医科学センターと共同してASO疾患関連遺伝子領域を精査した。

3. 研究の方法

閉塞性動脈硬化症の疾患関連遺伝子領域を精査するために、日本人DNAサンプルを使用して、患者サンプルと対照群サンプルの一塩基多型 (SNPs)の頻度を検証するゲノムワイド関連解析 (GWAS)を行った。更にGWASで特定された疾患関連遺伝子領域を対象に、細胞モデルで疾患関連遺伝子領域の機能解析を行い病態への寄与メカニズムを明らかにした。解析したサンプルはバイオバンク

ジャパン計画で収集されたDNAサンプルの他に、Replication studyでは東京大学、東京医科大学及び関連病院で収集したASO患者サンプルを使用した。患者群サンプルの全ゲノムタイピングにはイルミナ社 HumanHap610-Quad ビーズチップを使用し、対照群サンプルのタイピングには HumanHap550v3を使用した。個々のSNPのアレル頻度の解析はインベーター法を用いてマニュアルで行った。

4. 研究成果

GWASではASO患者群 (n=785)と対照群 (n=3,383)を対象に全ゲノムタイピングを行い、497,509 SNPsを対象にクオリティフィルター (call rate of ≥ 0.99 in both cases and controls and Hardy-Weinberg equilibrium test $P \geq 1.0 \times 10^{-6}$ in controls)を適用して、フィルターをパスした431,666 SNPsについて解析を行った。GWASではゲノムワイド有意性 ($p < 1.2 \times 10^{-7}$)を満たすSNPsは存在しなかったため、Cochrane-Armitage 検定による関連解析の結果p値が低かった順に500 SNPsを選択してGWASと独立した患者群サンプル (n=1,150)と対照群サンプル (n=16,752)を使用してReplication studyを行った。GWASとReplication studyの結果を統合して、ゲノムワイド有意性を満たすSNPsを *IPO5/RAP2A* (rs9584669), *EDNRA* (rs6842241) 及び *HDAC9* (rs2074633) 遺伝子領域に検出した (combined $P = 6.8 \times 10^{-14}$, 5.3×10^{-9} and 8.8×10^{-8})。交絡因子の可能性を確認するため年齢、性別、及び古典的な危険因子である、糖尿病、高血圧、喫煙歴、高脂血症との関係を解析した。結果として3 SNPs全てに関連因子を認めなかった。EIGENSTATによるサンプルの主成分解析で、今回使用したサンプルは全て日本人であることを確認した他に、ゲノムコ

ントロール法で GWAS サンプルの階層化を検証した。以上の結果を総合して、今回特定した3 SNPsは従来のリスクファクターに依存しない ASO 独自の遺伝的因子であると判断した。

最も統計学的に有意であった rs9584669 は第13染色体上の *IP05/RAP2A* 遺伝子間領域に位置しており、詳細な SNP 地図作成と *in vitro* の機能解析で隣接する遺伝子のどちらに影響を及ぼしているかを精査した。SNP 地図作成は計96名の患者サンプルを対象に行い、rs9584669 前後の約100kb領域 (chromosome position (NCBI build 38); 97,658,003-97,758,002) を対象にサンガーシークエンスを施行して、総計249 SNPs を検出した。連鎖不平衡解析を行い24 tag SNPs に絞り GWAS で使用した患者群サンプル (n=750) と対照群サンプル (n=2405) をタイピングした結果、rs9584669 が最も統計学的に有意な tag SNP であることが明らかになった。13q32.2 染色体領域の rs9584669 を含む7 SNPs はいずれもタンパク質のアミノ酸配列の変化に関わらなかったため、続いてレポーター遺伝子解析を行った。リアルタイム PCR で *IP05/RAP2A* 両遺伝子の mRNA 発現を血管平滑筋細胞で確認できたため、ヒト大動脈平滑筋細胞を使用した Dual Reporter Luciferase Assay を施行した。*IP05/RAP2A* 両遺伝子の H3K27Ac 配列を組み込んだベクターを使用して、上記7 SNPs のルシフェラーゼ活性をアレル間で解析した結果、rs9584669 のリスクアレルは非リスクアレルと比較して有意に *IP05* の転写活性を低下させた。遺伝子 *RAP2A* の H3K27Ac 配列を対象とした実験ではアレル間に発現の差は認めなかった。この結果より我々は rs9584669 の領域が何らかの形で物理的に *IP05* 遺伝子のエンハンサーもしくはリプレッサー領域に干渉して、転写抑制因子として作用する可能性があるかと判断

した。

IP05 遺伝子の転写産物である Importin-5 (*IP05*) は importin beta family の一つであり、細胞質の特に核膜孔に主として局在している。*IP05* はタンパク分泌のエンハンサーの役割を持ち、アポリポrotein A-1 (apo A-1) 分泌を促進することが報告されている。apo A-1 は高比重リポタンパク (HDL) の主要な構成成分であり、末梢組織から肝臓へのコレステロール輸送を担っている (reverse cholesterol transport pathway)。Apo A-1 はコレステロール輸送タンパクを介する経路とスカベンジャーB1 受容体を介する経路で、HDL 粒子内のコレステロール量を調整している。上記過程により HDL は血管内膜のプラーク蓄積を抑制している。中小径動脈の動脈硬化性変化が ASO の本態であり、HDL 機能は病態進展に重要な役割を果たしていると考えられる。

第4染色体に検出された rs6842241 は A 型エンドセリン受容体遺伝子 (*EDNRA*) の5' 末端領域に位置している。*EDNRA* はエンドセリン-1 に対する受容体をコードしている。エンドセリン-1 は長時間持続する血管収縮と炎症誘発作用を有するペプチドであり、血管平滑筋細胞の活性化を仲介すると共に特に動脈硬化部位で発現上昇を認める。このためエンドセリン-1 は動脈硬化に伴う慢性炎症のメカニズムに関係していると考えられている。rs6842241 のリスクアレルは *EDNRA* の機能的変異を起こすことが冠動脈疾患、脳動脈瘤、虚血性脳疾患といった他の動脈硬化関連疾患で示されている。

第7染色体に検出された rs2074633 はヒストンデアセチラーゼ-9 (*HDAC9*) をコードする *HDAC9* 遺伝子の近傍に存在していた。*HDAC* は転写で生じる反応を修飾する複合タンパク体であり、転写過程の制御と細胞周期の進行に非常に重要な役割を果たして

いる。HDAC9の遺伝子変異は虚血性脳疾患、頸動脈の硬化性変化、冠動脈疾患と関連があることが報告されている。

日本人を対象とした心血管病変の GWAS の報告は少ないが、冠動脈疾患に関して疾患関連遺伝子として LTA、LGALS2、PSMA6、BRAP が報告されている。しかし今回の解析ではいずれも ASO との関連は認めなかった。日本人以外の多人種を対象とした心筋梗塞、腹部大動脈瘤、脳動脈瘤患者の GWAS では 9p21 領域の SNP (rs10757278、rs10811161) が疾患に有意に関連すると報告されているが、本研究で同染色体領域はゲノムワイド有意性を満たさなかった。また 41,692 名のヨーロッパ人を対象とした GWAS で同領域の rs10757269 が ABI 低下に関係すると報告されているが、本研究では同 SNP は疾患に有意な関連を認めなかった。

本研究の限界として人種間の遺伝的多様性を考慮すると、日本人以外の人種で我々の研究結果を検証する必要がある他に、比較的少数のサンプル数で初回の GWAS を施行したため、疾患に関係している SNP を見逃した可能性がある。他にボンフェローニ補正に基づきゲノムワイド有意水準を規定したため、偽陰性となった SNPs が存在する可能性は否定できない点、replication cohort として BBJ サンプルを使用しているため、independent cohort ではない点が限界として挙げられる。またアレル頻度の低い SNPs や構造多型に関する検討は不十分である。また今回解析した ASO 患者は間欠性跛行から重症虚血肢まで様々な病期の患者が含まれており、病期に応じて遺伝学的危険因子が若干異なる可能性はあったが、検出力の関係で解析結果を病期で分類することは行わなかった。閉塞性動脈硬化症の疾患関連遺伝子領域の報告は世界的にも稀少であり、今回明らかになった遺伝学的リスク因子と関連分子カスケードの知見は病

態メカニズム解明に貢献すると考えられる。上記に加えて特に平成 27 年度からはバイオバンクジャパン登録症例を対象に施行された、90 万 SNPs を解析するプラットフォームの GWAS 結果に関して解析を進めると共に、ASO 患者サンプルから併存疾患の少ない 65 歳以下の患者 24 名を選択して全 Exom 解析を施行して解析を行った。更に将来的に micro RNA 解析やプロテオーム解析を行うことを目的として、ASO 患者血清サンプルを収集するための準備を行った。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1 . 著者名 : Matsukura M, Ozaki K, Takahashi A, Onouchi Y, Miyata T, et al
Genome-Wide Association Study of Peripheral Arterial Disease in a Japanese Population

雑誌名 : PLOS ONE

巻、発行年、頁、DDI : 2015 Oct 21;
DOI:10.1371/journal.pone.0139262

[学会発表] (計 2 件)

1 . 発表者名 : 松倉 満、宮原拓也
第 55 回日本脈管学会 一般演題 「閉塞性動脈硬化症のゲノムワイド関連解析」
H26 年 10 月 30 日 於 倉敷市芸文館 (岡山県倉敷市)

2 . 第 56 回日本脈管学会 一般演題 「閉塞性動脈硬化症の全エクソーム解析」
H27 年 10 月 30 日 於 虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都港区)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 哲郎 (MIYATA Tetsuro)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：70190791

(2)研究分担者

保坂 晃弘 (HOSAKA Akihiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90625170

(3)連携研究者

宮原 拓也 (MIYAHARA Takuya)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20704943