

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670409

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析による心肥大感受性遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of genetic determinants of LV mass in a healthy Japanese population by a GWAS

研究代表者

佐野 元昭 (Sano, Motoaki)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：30265798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：左室肥大は、心不全への共通最終経路である。我々はJPDSCのデータベースを用いて健康日本人の心電図で左室重量を反映するV5誘導のR波の起電力(高さ)を規定する遺伝因子をGWASで検討した。RV5に関連しているSNPに関しては独立した日本人集団(長浜コホート研究)を対象に再現性を検討した。その結果、TBX 3上のSNP rs7301743は、 $p=7.635 \times 10^{-8}$ で、minor alleleが一つ入るごとに、RV5が0.1mV減高する傾向にあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have searched for genetic determinants of left ventricular (LV) mass using values for absolute electrocardiographic QRS voltage in a healthy Japanese population. After adjusting for covariates, the corrected S and R wave voltages in leads V1 and V5 from 2,994 healthy volunteers in the Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium (JPDSC) database were subjected to a genome-wide association study. Potential associations were validated by an in silico replication study using an independent Japanese population obtained from the Nagahama Prospective Genome Cohort. We identified a novel association between the lead V5, R wave voltage in Japanese individuals and SNP rs7301743[G], which maps near the gene encoding T-box transcription factor Tbx3. Meta-analysis of two independent Japanese datasets demonstrated a marginally significant association of SNP rs7301743 with a 0.071 mV (95% CI, 0.038 - 0.11 mV) shorter R wave amplitude in the V5 lead per minor allele copy ($P = 7.635 \times 10^{-8}$).

研究分野：循環器内科 (心臓)

キーワード：左室肥大 GWAS TBX3 JPDSC 心電図

1. 研究開始当初の背景

心疾患の終末像である心不全は、5年生存率50%と予後不良な病態である。心不全の4大原因は、高血圧、虚血性心疾患、弁膜症、心筋症だが、心筋症以外の病態は、「圧負荷 心肥大 心不全」という機序が背景に存在する。したがって、心不全の intermediate phenotype として、過去25年間以上心肥大の分子機序の関する分子生物学的研究がなされてきた。その結果、心筋細胞の肥大を引き起こす多くの分子が報告されてきた。しかし、それらの分子を標的とした治療介入はマウスでは有効であっても、臨床の現場に薬として届けられることはなかった。この原因として、種差の問題、全身に投与した場合の多臓器に対する副作用の問題などもあげられるが、「心肥大において活性化されている遺伝子に着目して、心肥大における機能的意義を実験で検証していく」というこれまでの方法論「自体に問題がある可能性も考える必要がある。体の中で起こっている現象は、しばしば、どちらが原因で、どちらが結果か、判断できない状況が多い。原因に対して治療介入を行えば、結果を変えることが出来るが、結果をいじっても、原因は変えられない。多様性に富んだ生物の世界で、原因と結果の関係がはっきりしているのは、「親が原因で子供が結果」、「遺伝子が原因で表現型が結果」という事象だけである。心肥大の遺伝要因、すなわち、心肥大になりやすい遺伝的背景を明らかにすることが出来れば、先制医療という観点からも、また、創薬のターゲットの探索という視点からも、これまでの方法論では見つけることが出来なかった新規遺伝子の同定、あるいは、遺伝子操作マウスを用いた実験から心肥大との関連性が示唆されてきた膨大な数の候補遺伝子の中から真に重要な遺伝子を絞り込める可能性が多いに期待される。

Japan PGx Data Science Consortium (JPDSC)は日本の主要6社の製薬会社(武田、アステラス、第一三共、田辺三菱、大塚、大正)によって設立されたコンソーシアムであり、日本人約3,000人のボランティア健康人より心電図、血液検査などのデータ、および一人当たり約250万個のSNP遺伝型データが取得されている(JPDSCデータ)。JPDSCデータに含まれる心電図のRV5(V5誘導のR波の高さ)、SV1(V1誘導のS波の深さ)、及びRV5+SV1のデータと左室肥大に関係すると考えられる環境因子(年齢、性別、BMI、収縮期血圧など)との関係を明らかにする。次に、RV5、SV1、RV5+SV1の値を環境因子で補正した値と一人当たり約250万個のSNP遺伝型データを用いてゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study:GWAS)を行う。その結果、得られた候補遺伝子に関しては、韓国のデータ Korea Association Resource (KARE [n = 6805]) dataset に replication を依頼し、replication がとれ

た遺伝子に関しては、日本と韓国のデータを併せてメタ解析を行う。新規遺伝子座が見つかった場合は、次世代シーケンサーを用いた疾患関連遺伝子の探索、遺伝子操作マウスを用いた遺伝子表現型連関の検証を行う。

【斬新性・チャレンジ性】左室肥大は、心血管疾患(冠動脈疾患、心不全、脳卒中、死亡)の危険因子であることはよく知られている。過去25年間以上心肥大の分子機序の関する分子生物学的研究がなされてきた。その結果、心筋細胞の肥大に関与する分子が数多く報告され、創薬の対象として期待されたが、実際に臨床の現場に薬として届けられたものはない。この原因として「心肥大において活性化されている遺伝子に着目して、心肥大における機能的意義を実験で検証していく」というこれまでの方法論「自体に問題がある」可能性も考える必要がある。左室肥大の程度(左室の重量)には個体差があり、年齢、性別、血圧、BMIなどの環境因子と遺伝因子によって規定されている。左室肥大をおこしやすい遺伝的背景をもっている人は、加齢や高血圧、肥満といった環境因子に暴露されると過剰な心肥大反応を起こし、心血管疾患を高率に発症するリスクが高いことが予想される。そこで私は因果関係の明らかな「遺伝子が原因で表現型が結果」という大原則に立ち戻って、GWASによる心肥大感受性遺伝子を探索することとした。

これまで心肥大に関係する遺伝子としてACE, GNB3, IGF, NPYなどが報告されてきたが再現性がとれていない。これまで報告された心肥大に関係するGWAS研究は、心エコーの計測値や心電図形質を対象として、心肥大群とコントロール群に分けたケース・コントロール研究としてデザインされており(Hong KW, European Heart Journal 2012)、高齢の高血圧患者 SNP 遺伝型データを利用して研究に限られ(Arnett DK, BMC Medical Genetics 2009, Shah S., Circulation Cardiovascular Genetics 2011)、本研究のように健康人を対象とした左室肥大の程度(左室の重量)に対するGWAS研究は過去に報告をみない。臨床的に左室肥大の程度(左室の重量)を予測する方法として、心電図と心エコーが用いられている。特に、心電図は、簡便で非侵襲的であり、健康診断、あるいは日常診療でも広く用いられている。心電図では、Sokolow-Lyon 基準、すなわちRV5+SV1 35mm が最も一般的に用いられている。しかし、RV5とSV1が心肥大の指標として同様に妥当か、双方の和を求める根拠に関してはほとんど議論されていない。RV5では左室自由壁におかれたV5誘導電極に近づいてくる左室の起電力を直接測定しており、一方でSV1では左室自由壁を心内膜側から心外膜側に伝わっていく電気的興奮、すなわち右室側におかれたV1誘導の電極からみると遠ざかっていく電気活動をみ

ている。また、心電図は体表から記録するものであるため、肥満などによる影響を強く受ける（肥満があると記録される心電図の電位が小さくなる）ことが予想される。そこで、Japan PGx Data Science Consortium (JPDSC) に記録されている約 3,000 人の臨床データ、心電図データをもとに、RV5, SV1, RV5+SV1 と収縮期血圧、BMI や体重との関係を調べてみた。その結果、血圧との相関係数は RV5 が最も高く、SV1 や RV5+SV1 は RV5 と比較して低いことが分かった。また、BMI や体重との相関係数を調べた結果、BMI や体重に最も影響（負の相関）を受けるのは SV1 で、RV5 が最も影響を受けない事が分かった。重回帰分析の結果、説明変数として、年齢、性別、収縮期血圧、BMI が RV5, SV1, RV5+SV1 に統計学的に有意な影響を及ぼすことが分かったため、これらの説明因子で補正をかけた後の RV5, SV1, RV5+SV1 値（すなわち環境要因を補正した値 = 遺伝要因が濃縮された値）に対してゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study:GWAS)を行った。その結果、p 値 5×10^{-8} を超える Genome wide significance な SNP も同定された。候補遺伝子に関しては、韓国データ Korea Association Resource (KARE [n = 6805]) dataset に replication を依頼し、replication がとれた遺伝子に関しては、日本と韓国のデータを併せてメタ解析を行う。その結果、新規遺伝子座が見つかった場合は、次世代シーケンサーを用いた疾患関連遺伝子の探索、遺伝子操作マウスを用いた遺伝子表現型連関の検証を行う。

2. 研究の目的

心不全の intermediate phenotype として、過去 25 年間以上心肥大の分子機序の関する分子生物学的研究がなされてきたが、創薬の対象となる真の心肥大原因遺伝子は見つからない。左室肥大の程度（左室の重量）は、年齢、性別、血圧、BMI などの環境因子と遺伝因子によって規定されている。左室肥大をおこしやすい遺伝的背景をもっている人は、加齢や高血圧、肥満といった環境因子に暴露されると過剰な心肥大反応を起こし、心血管疾患を高率に発症するリスクが高いことが予想される。本研究では、因果関係の明らかな「遺伝子が原因で表現型が結果」という大原則に立ち戻って、ゲノムワイド関連解析(GWAS)による心肥大感受性遺伝子を探査することを目的とする。

3. 研究の方法

Japan PGx Data Science Consortium (JPDSC) に記録されている約 3,000 人の日本人健常者の臨床データ、心電図データ、約 250 万個の SNP 遺伝型データをもとに年齢、性別、収縮期血圧、BMI が説明変数として補正をかけた後の RV5, SV1, RV5+SV1 値（すなわち環境要因を補正した値 = 遺伝要因が濃縮され

た値）に対してゲノムワイド関連解析(GWAS)を行う。候補遺伝子に関しては、韓国データ Korea Association Resource (KARE [n = 6805]) に replication を依頼し、replication がとれた遺伝子に関しては、日本と韓国のデータを併せてメタ解析を行う。その結果、Genome-wide significant な新規遺伝子座が見つかった場合は、次世代シーケンサーを用いた疾患関連遺伝子の探索、さらに遺伝子操作マウスを用いた遺伝子表現型連関の検証を行う。

4. 研究成果

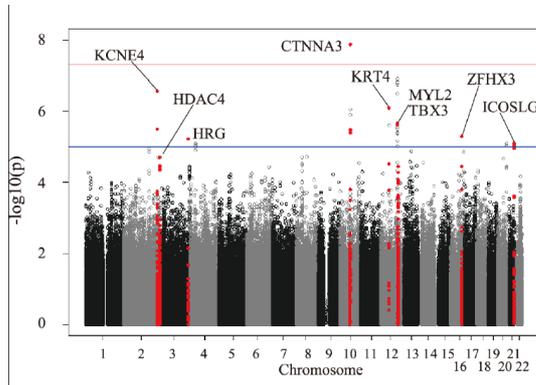
左室肥大は、心不全への共通最終経路であるだけでなく、突然死や心筋梗塞の発症にも関与していることが知られている。左心室の重量は、量的な形質であり、個人個人間のバリエーションが大きく、環境要因と遺伝要因によって規定されている。左心室の重量を規定している遺伝要因の解明は、遺伝的に左室肥大を起こしやすい患者に早期から重点的に治療介入することによって、左室肥大への進展を抑制し心不全の発症を抑制する先制医療を可能にすることから、臨床的価値が高い。

臨床的に左心室の肥大を診断する方法として、心電図は決して精度の高い測定法ではないものの簡便さから汎用されている。心電図によって診断された左室肥大が、予後予測因子として有用であることも証明されている。

左室肥大の心電図診断基準の内、最も広く知られているのは Sokolow-Lyon の診断基準 [RV5(6)+SV1 $\geq 35\text{mm}$] であるが、V5 誘導の R 波の高さ (RV5) と V1 誘導の S 波の深さ (SV1) を合計する統計学的な根拠は明らかでない。

我々は、日本 PGx データサイエンスコンソーシアム (JPDSC) の 2994 例のデータを用いて、まず、RV5, SV1 に影響を与える非遺伝的要因（年齢、性別、BMI、HR、収縮期血圧、拡張期血圧、血清 K 濃度、血清 Ca 濃度、地域性）について重回帰分析を行った。その結果、RV5 では、年齢、性別、BMI、収縮期血圧が、SV1 では、年齢、性別、BMI、収縮期血圧、RV5+SV1 では、年齢、性別、BMI、HR、収縮期血圧の影響が強いことが分かった。

次に、これらの環境因子で補正した RV5, SV1, RV5 + SV1（環境要因による影響を補正して遺伝要因による影響が濃縮された値）に対してゲノムワイド関連解析(GWAS)を行った（図）。RV5 に関連している SNPs と SV1 に関連している SNPs がまったく異なることが分かった。特に、RV5 に関連 ($p < 1 \times 10^{-5}$) している SNPs が多く、RV5 は、遺伝因子による影響を強く受けていることを発見した。



大変興味深いことにRV5に関連しているSNPsは、これまで、動物実験で心肥大との関連が指摘されていた遺伝子 (Tbx3, Zfx3, Hdac4, Kcne4) やヒトの心筋症の患者で点突然変異が見つかる遺伝子 (Ctnna3, Myl2) 上に濃縮されていた。

JPDSC を用いた研究で発見された RV5 関連 SNPs が、日本人の他の集団からのサンプルでも再現性が確認できるか否かを長浜予防コホート研究 (Nagahama Prospective Cohort Study) のデータを用いて検証した。その結果、TBX3 遺伝子上の SNP rs7301743 だけ再現性が取れた。

JPDSC、Nagahama Prospective Cohort Study 2つのデータセットを用いて、メタ解析を行った。その結果、TBX3 上の SNP rs7301743 は、 $p=7.635 \times 10^{-8}$ で、minor allele が一つ入るごとに、RV5 が 0.1mV 減高する傾向にあることが分かった。

この結果は、健康日本人において、RV5 で表現される左心室の重量は、TBX3 上の SNP rs7301743 に点変異が入るごとに、減少する傾向があることが明らかになった。

SNP rs7301743 は、TBX3 遺伝子のプロモーター上に位置するが、点変異が TBX3 遺伝子の発現に対して、どのような影響を与えるのか、今後の検討を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Motoaki Sano, Shigeo Kamitsuji, Naoyuki Kamatani, Yasuharu Tabara, Takahisa Kawaguchi, Fumihiko Matsuda, Hiroyuki Yamagishi, Keiichi Fukuda, and Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium (JPDSC) Genome-wide association study of absolute QRS voltage identifies common variants of TBX3 as genetic determinants of left ventricular mass in a healthy Japanese population. PLOS ONE, 11(5):e0155550, 2016 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. 佐野元昭

循環器病学の近未来を語ろう Towards a personalized heart failure medicine
第80回日本循環器病学会(プレナリセッション) 仙台国際センター(宮城県仙台市)
2016年3月19日

2. 佐野元昭

心筋リモデリング・リバーシリモデリングに対する治療 CVMW2015(合同シンポジウム) 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015年12月10日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

<http://www.cpnet.med.keio.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 元昭 (Sano Motoaki)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 30265798

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし