

平成21年 4月 7日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18209023
 研究課題名（和文）ゲノム全領域関連解析による脳血栓のオーダーメイド予防システムの開発
 研究課題名（英文）Development of the personalized prevention system for ischemic stroke by a genome-wide association study
 研究代表者 山田 芳司(Yamada Yoshiji)
 三重大学・生命科学研究支援センター・教授
 研究者番号：90333286

研究成果の概要：

候補遺伝子アプローチによる300遺伝子多型の関連解析を行い、IL6 遺伝子-572G→C、ABCA1 遺伝子-14C→T、IRAK1 遺伝子 A→C、C→T (Ser532Leu)、ROS1 遺伝子 G→C (Cys2229Ser) が脳血栓の発症に、IL6 遺伝子-572G→C、LIMK1 遺伝子-428G→A が脳出血の発症に、UCP3 遺伝子-55C→T、TNF 遺伝子-863C→A、KIAA0319L 遺伝子 G→A (Gly243Asp)、CYP3A4 遺伝子 13989A→G (Ile118Val) がくも膜下出血の発症にそれぞれ関連することを見出した。次に、3つの独立した集団で合計6341例（脳血栓992例および対照5349例）についてゲノム全領域関連解析を行い、脳血栓発症と強く関連する CELSR1 遺伝子と2個の SNPs、A→G (Thr2268Ala, rs6007897) および A→G (Ile2107Val, rs4044210) を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	19,500,000	5,850,000	25,350,000
2007年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
総計	37,700,000	11,310,000	49,010,000

研究分野：生活習慣病のゲノム疫学・機能ゲノム科学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ゲノム・関連解析・オーダーメイド予防・脳血管障害・アテローム血栓性脳梗塞・脳血栓・脳出血・くも膜下出血

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害（脳梗塞、脳出血、くも膜下出血）は死亡率が高く、後遺症も重篤であり、また延命の為に医療費は高額であるばかりか、家族の介護負担も大きい。我が国の脳血

管障害の患者総数は約137万人であり、毎年約13万人（脳梗塞61%、脳出血25%、くも膜下出血11%、その他3%）が脳血管障害により死亡している（厚生労働省の統計）。脳血管障害は欧米諸国および日本において、心疾患や悪性腫瘍に続き第3位の死因である。近年、医療技術の

発達により脳血管障害発症後の治療法は格段に進歩したが、予防対策は未だ十分とは言えない。また塩分制限など従来の予防法は集団を対象としたものであり、必ずしも個人にあてはまるものではない。高齢化社会を迎えた我が国においては、脳血管障害の発症に関連する遺伝子多型を確定し、オーダーメイド予防を積極的に推進することが個人や家族のみならず社会的にも重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SNP チップを用いたゲノム全領域関連解析によりアテローム血栓性脳梗塞（脳血栓）の発症に強く関連する遺伝子多型群を決定し、それらの多型群に加え年齢・性別および従来の脳血管障害危険因子（高血圧・糖尿病・高脂血症・肥満・喫煙など）を包括した脳血栓のオーダーメイド予防システムを開発することにある。本システムにより、個人の「将来における発症リスク」を予測し、リスクの高い場合は禁煙などの生活習慣の改善や高血圧・糖尿病などの危険因子の早期治療を行い、個人にとって最適な脳血栓の一次・二次予防法の選択、即ち「脳血栓のオーダーメイド予防」を実現することが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

研究代表者らは、岐阜県・青森県・群馬県・東京都で合計 10,000 例の集団において、205 遺伝子 300 多型と生活習慣病との関連について大規模関連解析を行い、各疾患の発症に関連する遺伝子多型を同定した。さらに脳血栓および心筋梗塞に関して、SNP チップを用いたゲノム全領域関連解析を行った。

(1) 脳血管障害のオーダーメイド予防システムの開発

研究代表者らは、脳血栓、脳出血、くも膜下出血に関して多数の候補遺伝子多型群に

よる大規模関連解析を行い、各疾患の発症と有意な関連を示す多型群を同定した。さらにそれらの多型群に加え従来の脳血管障害危険因子

（高血圧・糖尿病・高脂血症・喫煙・肥満）および年齢・性別を包括した脳血栓・脳出血・くも膜下出血のオーダーメイド予防システムを開発した。本システムにより個人の発症リスクを予測し、リスクの高い症例については禁煙などの生活習慣の改善や高血圧・糖尿病・高脂血症などの危険因子の早期治療を積極的に行い、脳血栓・脳出血・くも膜下出血のオーダーメイド予防を推進したいと考えている。

初回の解析における対象は 3151 例であり、脳血管障害 1141 例（脳血栓 636 例、脳出血 282 例、くも膜下出血 223 例）、対照 2010 例であった。2 回目の解析における対象は 3432 例であり、脳血管障害 1362 例（脳血栓 822 例、脳出血 333 例、くも膜下出血 207 例）、対照 2070 例であった。脳血管障害の確定診断は頭部 CT または MRI によって行った。脳血栓については心原性脳塞栓症例、ラクーナ梗塞のみの症例、心房細動症例を除外した。脳出血については、出血性脳梗塞症例、脳腫瘍や外傷性による脳出血症例、動静脈奇形による脳出血症例、ワーファリン服用症例を除外した。また対照は、脳血管障害やその他の脳疾患、冠動脈疾患あるいはその他の動脈硬化性疾患や血栓性・塞栓性・出血性疾患の既往が無い症例とした。筆者らは公的データベースから血管生物学（高血圧、動脈硬化症、血管攣縮、動脈瘤など）、血小板機能、白血球・リンパ球・単球-マクロファージの機能、凝固・線溶系カスケード、神経学的因子（血圧・循環・内分泌機能調節など）、脂質・グルコース・ホモシステイン代謝、およびその他の代謝因子に関する包括的な観点に基づき、脳血栓・脳出血・くも膜下出血発症との関連が推定される 200 遺伝子を選択し、さらにそれらの遺伝子に存在する多型の中で、エクソンやプロモーター領域ま

たはイントロンのスプライシング部位に位置し、遺伝子発現またはタンパク質の機能に影響を与える可能性が推定される多型を中心に 300 多型を抜粋した。300 多型の遺伝子型は、PCR とアリル特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いたサスペンション・アレイ・テクノロジー (Luminex 100; Luminex, Austin, TX) によって解析した。

(2) 脳血栓のゲノム全領域関連解析

脳血栓の発症に関連する遺伝子多型を同定するために、ゲノム全領域の約 52 万個の SNPs を同時に解析できる 500K SNP チップ (GeneChip Mapping 500K Set, Affymetrix) を用いてゲノム全領域関連解析を行った。500K SNP チップによって得られた約 52 万個の遺伝子型情報を脳血栓症例と対照との間でカイ 2 乗検定で解析し、脳血栓発症との関連が強い順に多型をランク付けし、 $P < 1.0 \times 10^{-20}$ の SNPs を抽出した。また、脳血栓のゲノム全領域関連解析では、3 つの独立した集団、対象集団 A (脳血栓 131 例・対照 135 例、病院受診者)、対象集団 B (脳血栓 790 例・対照 3435 例、病院受診者)、対象集団 C (脳血栓 71 例・対照 1779 例、地域住民) で合計 6341 例 (脳血栓 992 例および対照 5349 例) について解析し、対象集団 A で行った SNP チップによるゲノム全領域関連解析の結果を対象集団 B および対象集団 C において検証した。

4. 研究成果

(1) 脳血管障害のオーダーメイド予防システムの開発

202 遺伝子多型についての関連解析において、年齢・性別・body mass index・喫煙頻度および高血圧・糖尿病・高脂血症の罹患頻度を補正した多項ロジスティック回帰分析の結果、8 多型が脳血栓と、9 多型が脳出血と、10 多型がくも膜下出血とそれぞれ関連した

($P < 0.05$)。とりわけ interleukin 6 遺伝子 -572G→C 多型は脳血栓および脳出血の両者と有意に ($P < 0.001$) 関連した。また、uncoupling protein 3 遺伝子 -55C→T 多型、tumor necrosis factor 遺伝子 -863C→A 多型および KIAA0319-like 遺伝子 G→A (Gly243Asp) 多型がくも膜下出血と有意に ($P < 0.001$) 関連した。次に、98 遺伝子多型について関連解析を行い、ATP-binding cassette, sub-family A, member 1 遺伝子 -14C→T 多型、interleukin-1 receptor-associated kinase 1 遺伝子 A→C 多型、C→T (Ser532Leu) 多型、c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase 遺伝子 G→C (Cys2229Ser) 多型が脳血栓の発症に、LIM domain kinase 1 遺伝子 -428G→A 多型が脳出血の発症に、cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4 遺伝子 13989A→G (Ile118Val) 多型がくも膜下出血の発症にそれぞれ関連することを見出した。

研究代表者らは、上述のゲノム疫学研究においてステップワイズ変数増加法による解析で疾患発症と有意 ($P < 0.05$) に関連した遺伝子多型群および年齢・性別・喫煙・肥満・高血圧・糖尿病・高脂血症を独立因子 (交絡因子) とし、脳血栓、脳出血またはくも膜下出血を従属因子として多項ロジスティック回帰分析を行い、各因子について P 値、オッズ比、95%信頼区間を各疾患について算出した。さらに個々の症例における発症予測確率 (prediction probability) を算出し、脳血栓、脳出血、およびくも膜下出血のオーダーメイド予防システムを開発した。本システムにより生活習慣の改善や危険因子の治療効果のシミュレーションを行うことが可能となり、脳血管障害のオーダーメイド予防に貢献できると考えている。

(2) 脳梗塞のゲノム全領域関連解析

対象集団 A (脳血栓 131 例・対照 135 例、病院受診者) について SNP チップを用いたゲノム全領域関連解析を行い、脳血栓発症と強く関連す

る ($P < 1.0 \times 10^{-20}$) SNPsを100個抽出した。次にこの100 SNPsについて対象集団B(病院受診者)中の脳血栓705例・対照3426例において関連解析を行い、脳血栓に関連するSNPsを3個検出した。これらのSNPsについて脳血栓96例でそれぞれの連鎖不平衡ブロックのシーケンスを行い、エクソンに位置する nonsynonymous (アミノ酸の置換を伴う) SNPs を3個 (このうち2個はタグSNPs) および synonymous SNP (タグSNP) を1個検出した。これらの4個のSNPsについて、対象集団B(脳血栓790例・対照3435例、病院受診者)において関連解析を行い、3個のSNPsが疾患発症に関連することを認めた。これらのSNPsについてさらに対象集団C(脳血栓71例・対照1779例、地域住民)において関連解析を行い、脳血栓発症と強く関連するcadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (CELSR1) 遺伝子の2個のSNPs、A→G (Thr2268Ala, rs6007897) およびA→G (Ile2107Val, rs4044210) を同定した。これらのSNPsはアレル頻度のカイ2乗検定ではいずれも $P = 0.0001$ であり、年齢・性別・喫煙頻度および高血圧・糖尿病・高脂血症の罹患頻度を補正した多項ロジスティック回帰分析ではA→G (Thr2268Ala) が $P = 0.0006$ (オッズ比1.85、95% 信頼区間1.29-2.61)、A→G (Ile2107Val) が $P = 0.0010$ (オッズ比1.78、95% 信頼区間1.25-2.50) であった。CELSR1は、カドヘリンスーパーファミリー、フラミンゴサブファミリーに属する膜タンパク質であり、マウスでは脳に発現し、発生に重要な役割を果たす。エクソン17のA→G (Ile210Val) はホルモン受容体領域に位置する。今までにCELSR1遺伝子とヒト疾患との関連については報告が無く、またCELSR1遺伝子多型の機能と脳血栓の病態との関連についても不明である。今後は、ゲノム全領域関連解析のデータを基に、脳血栓発症に関連する

SNPsをさらに探索し、より精度の高いオーダーメイド予防システムを開発する予定である。

脳血管障害に関連する遺伝因子の解明は世界的に急速な勢いで進行している。これらのアプローチは疾患の病態を解明し、オーダーメイド医療の実現に結びつくと期待されている。さらに遺伝子情報に基づく創薬も既に始まっており、その有効性が報告されている。脳血管障害感受性遺伝子の解明により、個人の遺伝要因に応じた疾患の新しい予防法や治療法が開発される日も近いと考えられる。将来は、病院、クリニックまたは健診センターなどにおいて、希望者に対して従来の危険因子と遺伝子多型に関する検査を行い、脳血管障害の発症リスクを予測することが可能になるであろう。結果については、医師や遺伝カウンセラーなどがカウンセリングを行い、とりわけリスクが高い場合には、禁煙などの生活習慣の改善や、高血圧・糖尿病・脂質代謝異常などの危険因子の早期治療により発症予測確率がどれだけ減少するかを明確にし、個人個人に適した脳血管障害のオーダーメイド予防を積極的に推進することが可能になると考えられる。特に脳血管障害の家族歴のある人への適用が有効である。また、遺伝子多型の機能と病態との関連についてのエビデンスが蓄積されれば、個々の多型情報により積極的な予防を行うことも可能になる。脳血管障害のゲノム疫学研究によりさらに多くのエビデンスが蓄積され、それに基づいたオーダーメイド医療が臨床の場で行われる日もそれほど遠くないと思われる。その成果、高齢者の健康長寿、QOL向上、ねたきり防止ならびに医療費削減など医学的・社会的に大きく貢献することが期待できる。

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 61件)

1. Yoshiji Yamada, Noriyuki Fuku, Masashi Tanaka,

Yukitoshi Aoyagi, Motoji Sawabe, Norifumi Metoki, Hidemi Yoshida, Kei Satoh, Kimihiko Kato, Sachiro Watanabe, Yoshinori Nozawa, Aki Hasegawa, Toshio Kojima. Identification of *CELSR1* as a susceptibility gene for ischemic stroke in Japanese individuals by a genome-wide association study. *Atherosclerosis* (in press) 査読有

2. Yoshiji Yamada, Norifumi Metoki, Hidemi Yoshida, Kei Satoh, Kimihiko Kato, Takeshi Hibino, Kiyoshi Yokoi, Sachiro Watanabe, Sahoko Ichihara, Yukitoshi Aoyagi, Akitomo Yasunaga, Hyuntae Park, Masashi Tanaka, Yoshinori Nozawa. Genetic factors for ischemic and hemorrhagic stroke in Japanese individuals. *Stroke* 2008;39:2211-2218. 査読有

3. Yoshiji Yamada, Kimihiko Kato, Mitsutoshi Oguri, Tetsuo Fujimaki, Kiyoshi Yokoi, Hitoshi Matsuo, Sachiro Watanabe, Norifumi Metoki, Hidemi Yoshida, Kei Satoh, Sahoko Ichihara, Yukitoshi Aoyagi, Akitomo Yasunaga, Hyuntae Park, Masashi Tanaka, Yoshinori Nozawa. Genetic risk for myocardial infarction determined by polymorphisms of candidate genes in Japanese individuals. *J Med Genet* 2008;45:216-221. 査読有

4. Noriyuki Fuku, Kyong Soo Park, Yoshiji Yamada, Yutaka Nishigaki, Young Min Cho, Hitoshi Matsuo, Tomonori Segawa, Sachiro Watanabe, Kimihiko Kato, Kiyoshi Yokoi, Yoshinori Nozawa, Hong Kyu Lee, Masashi Tanaka. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. *Am J Hum Genet* 2007;80:407-415. 査読有

5. Yoshiji Yamada, Norifumi Metoki, Hidemi Yoshida, Kei Satoh, Sahoko Ichihara, Kimihiko Kato, Takashi Kameyama, Kiyoshi Yokoi, Hitoshi Matsuo, Tomonori Segawa, Sachiro

Watanabe, Yoshinori Nozawa. Genetic risk for ischemic and hemorrhagic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1920-1925. 査読有

[学会発表] (計 75 件)

1. Yoshiji Yamada. Identification of the genetic risk for myocardial infarction and ischemic stroke by candidate gene approach and genome-wide association study. The 11th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium, Seoul, Korea, October 31, 2008.

2. Yoshiji Yamada. Prediction of genetic risk for myocardial infarction and stroke. 12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine, Crete, Greece, October 11-13, 2007.

3. Yoshiji Yamada. Prediction of the genetic risk for myocardial infarction and stroke. 5th Congress of Asian Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases, Jeju, Korea, April 12-15, 2006.

4. Yoshiji Yamada : Identification of Genetic Factors and Development of Genetic Risk Diagnosis Systems for Cardiovascular Diseases. 第70回記念日本循環器学会総会・学術集会「日本心臓財団佐藤賞」受賞講演、名古屋、平成18年3月

[図書] (計 7 件)

1. Yoshiji Yamada, Sahoko Ichihara, Tamotsu Nishida. Genetics of Stroke. In Dhavendra Kumar, Perry Elliot, eds. *Clinical Cardiovascular Genetics: Principle and Practice*. New York: Oxford University Press (in press).

2. Yoshiji Yamada, Sahoko Ichihara, Tamotsu Nishida. Genetics of coronary heart disease. In Dhavendra Kumar, Perry Elliot, eds. *Clinical Cardiovascular Genetics: Principle and Practice*. New York: Oxford University Press (in press).

3. Yoshiji Yamada, Sahoko Ichihara, Masaharu Takemura. Human functional genomics and proteomics. In: Dhavendra Kumar, David Weatherall,

eds. Genomics and Clinical Medicine. New York: Oxford University Press; p31-43, 2008.

4. Yoshiji Yamada. Osteoporosis and related phenotypes. In Dhavendra Kumar, David Weatherall, eds. Genomics and Clinical Medicine. New York: Oxford University Press; p529-543, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 18 件）

1. 発明者：山田芳司、小島俊男、村上和美

出願人：三重大学、理化学研究所

脳梗塞の遺伝的リスク検出法（特願 2009-011495）

2. 発明者：山田芳司、野澤義則、武安岳史

出願人：山田芳司、G&G サイエンス株式会社、財団法人岐阜県国際バイオ研究所
心筋梗塞の遺伝的リスク検出法（特願 2006-288908、特開 2007-228958）

3. 発明者：山田芳司、野澤義則、岡田英樹

出願人：山田芳司、G&G サイエンス株式会社、財団法人岐阜県国際バイオ研究所
脳血管障害の遺伝的リスク検出法（特願 2006-244526、特開 2007-215537）

○取得状況（計 4 件）

1. 発明者：山田芳司、横田充弘

出願人：財団法人名古屋産業科学研究所、財団法人岐阜県国際バイオ研究所
心筋梗塞のリスク診断方法（特許第 4143756 号）

2. 発明者：山田芳司、横田充弘

出願人：財団法人名古屋産業科学研究所、財団法人岐阜県国際バイオ研究所
高血圧のリスク診断方法（特許第 4140329 号）

3. 発明者：山田芳司、横田充弘

出願人：財団法人名古屋産業科学研究所、財団法人岐阜県国際バイオ研究所
冠動脈攣縮のリスク診断方法（特許第 4129910 号）

4. 発明者：山田芳司、横田充弘

出願人：財団法人名古屋産業科学研究所、財団法人岐阜県国際バイオ研究所
冠動脈形成術後再狭窄のリスク診断方法（特許第 4129908 号）

〔その他〕

1. クオルセイバー有限責任事業組合（QOL Saviour Limited Liability Partnership）設立、リサーチディレクター（兼任）就任（平成 17 年 10 月、<http://www.gandgscience.co.jp/QOL/index.html>、<http://www.genomarker.jp/>）

2. 三重大学疾患ゲノム研究センター設立（平成 20 年 9 月、<http://www.mie-u.ac.jp/research/>）

3. 生命科学研究支援センターヒト機能ゲノミクス部門ホームページ
（<http://www.lsrc.mie-u.ac.jp/human/>）

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 芳司（YAMADA YOSHIJI）
三重大学・生命科学研究支援センター・教授
研究者番号：90333286

(2)研究分担者

市原 佐保子（ICHIHARA SAHOKO）
三重大学・生命科学研究支援センター・助教
研究者番号：20378326

(3)連携研究者

小島 俊男（KOJIMA TOSHIO）
独立行政法人理化学研究所・基盤研究所・
チームリーダー