

平成21年 5月 18日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590872  
 研究課題名 (和文)： 高血圧症における性差の分子遺伝学的背景の解明  
 - エストロゲン関連遺伝子群の役割 -  
 研究課題名 (英文)： The genetic perspective of the estrogen related genes to hypertension

研究代表者  
 中山 智祥 (NAKAYAMA TOMOHIRO)  
 日本大学・医学部・教授  
 研究者番号：00339334

## 研究成果の概要：

解析した遺伝子は、エストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子、エストロゲン受容体  $\beta$  遺伝子、FSH 受容体遺伝子、アロマターゼ遺伝子の他、CYP17 関連の遺伝子群や extracellular superoxide dismutase gene などである。単なる一塩基多型(SNPs)を用いた関連解析にとどまらず、ハプロタイプを構築した後にそれを用いた関連解析も行った。これらの成果はすべて世界で初めて報告する高血圧症感受性遺伝子・遺伝子型あるいはハプロタイプであり高い新規性をアピールできた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管病態学、性差医療、高血圧症、エストロゲン、アロマターゼ、卵胞刺激ホルモン受容体、遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの医学・医療は、女性の妊娠・出産や月経・女性器障害に関わる産婦人科の分野を除いてほとんどが男性をモデルとした研究で発展してきた。しかし現在では女性と男性とでは生物学的にも社会学的にも性差があり、診断・治療においても考慮しなければならないことがわかってきた。そこで昨今、性差医療の必要性が叫ばれるようになって

た。性差医療 (Gender-specific Medicine) とは男女比が圧倒的にどちらかに傾いている病態、発症率はほぼ同じでも男女間で臨床的に差を見るもの、いまだ生理的、生物学的解明が男性または女性で遅れている病態、社会的な男女の地位と健康の関連などに関する研究を勧めその結果を疾病の診断、治療法、予防措置へ反映することを目的とした医療改革をいう (天野恵子、総合臨床 2, 2006)。時代背景として 1960 年代のサリドマイド事

件などの教訓から米国食品・医薬品局 (FDA) が妊娠の可能性のある女性を薬の治験に参加させることは望ましくないとのガイダンスを出したことに端を発する。その後十数年、多くの臨床試験が男性をモデルとしてなされ、その研究結果が女性にも当てはめられた。しかしあまりにも少ない女性の健康に関するデータに疑問がもたれ 1986 年米国 National Institute of Health (NIH) は女性および少数民族・人種を調査研究の対象に含むことを義務付ける通達を公布し、1990 年 NIH の中に女性における疾病の予防、診断、治療の向上と、関連する基礎研究を支援する目的で Office of Research on Women's Health-ORWH が開設されここに性差医療が幕を開けた。

(2) 循環器疾患は非常に性差のはっきりしている分野であり、世界においては性差医療のパイオニアの多くは循環器医である。閉経前の女性において虚血性心疾患の発症率が低いのはよく知られた事実 (Mosca L, Circulation 109, 2004) であり多くの研究からエストロゲンのもつ心血管系への直接的、間接的保護作用が明らかになっている (Mendelsohn ME, N Engle J Med 340, 1999)。エストロゲンは脂質代謝、血圧、糖代謝といった冠危険因子に対する作用を介しての間接作用に加えて、血管に直接作用し、血管トーンや内皮細胞や血管平滑筋細胞などの血管構成細胞の動態も調節している。血管からの一酸化窒素 (NO) の産生促進、血中 PAI-I の抑制、Lp(a) 産生抑制、接着因子の発現抑制など動脈硬化の発生・進展を抑制する作用が認められている。しかしなぜ、性差が検出されたのか、理論的に説明できないものも少なくなく、特に本態性高血圧症においては感受性遺伝子単離の段階でつまづいている状態であった。

## 2. 研究の目的

(1) 本申請者らはこれまでに本態性高血圧症、脳梗塞、虚血性心疾患といった循環器系の多因子遺伝性疾患を中心に 13 年以上前からサンプルを収集し始め主に関連解析で疾患感受性遺伝子検索を行ってきた。その結果、明らかに性差を呈する結果がいくつかの候補遺伝子で陽性に出た経験がある。また妊娠高血圧症候群 (2004 年妊娠中毒症から改名) での関連解析を通して、妊娠高血圧症候群は本態性高血圧症と病態や遺伝的背景が類似している可能性があることを報告した。

しかし関連解析では常に疑陽性の問題が付きまとい、特にサンプル数の少なさに基づくことが指摘されている。本研究代表者の関連解析では疾患群 200 症例と非疾患コントロール群 200 例規模を使用することが多い。こ

れらの群を男女別に分けると、もっと数は少なくなり、サンプル数として充分ではないと指摘を受けることも少なくない。そこで本研究代表者が参画しているミレニアム・ゲノム・プロジェクトを通じて多施設で収集したサンプルを用いることで 1,000 症例と 1,000 コントロール間で行う関連解析を施行することができ、男女とも十分な数で解析した結果、性差によって疾患感受性遺伝子を確認することができた。そのきっかけとなった研究が Follicle-stimulating hormone (FSH) 受容体遺伝子と本態性高血圧症との関連解析である。この報告はミレニアム・ゲノム・プロジェクトで具体的な候補遺伝子名が挙げられた初の論文となった。これはメスの FSHR 遺伝子ノックアウトマウスが高血圧症を呈した報告 (Hypertension. 2003;42:761-767) をもとに研究を開始した。まず本研究代表者のサンプルで 235 名の本態性高血圧症と 237 名の正常血圧を対象とし一塩基多型 (SNP) を用いて関連解析や連鎖不平衡 (LD) 解析を踏まえたハプロタイプを用いた関連解析を行なった。その結果 5' 非翻訳領域の SNP が女性で有意差を呈したので、さらにミレニアム・ゲノム・プロジェクトサンプルで 1,035 名の本態性高血圧症と 1,058 名の正常血圧で検討した結果、同様に有意差が出た。この SNP を含む上流領域の転写活性測定によって転写活性が低下しているタイプは女性高血圧症に多くエストロゲンレベルが低いことがわかった。ノックアウトマウスの表現型と一致する結果は女性高齢者高血圧症を説明する一因と考えられる。

(2) そこで循環器疾患を中心に性差医療に役に立つような遺伝的背景および生活習慣での危険因子の情報を提供するという全体の大きな構想を着想した。今回の研究課題申請に当たっての具体的な目的は本態性高血圧症における性差医療実現に向けて、エストロゲン合成・代謝に関係する遺伝的背景因子、臨床所見および生活習慣に関わる因子から特に閉経後女性を中心にした高血圧症発症の危険因子を検出することである。

## 3. 研究の方法

(1) 平成 19 年度の研究計画概要  
初年度は主に本態性高血圧症患者様のサンプルを追加して収集、順次臨床データの蓄積、解析予定遺伝子の多型選択、遺伝子型の決定を行う。

### ① サンプル収集

これまでに本申請者の所属施設で収集した本態性高血圧症のサンプルで関連解析に使用可能なものは約 300 症例 (男:女=200:100) でコントロールも約 300 例 (男:女=200:100) である。ミレニアムゲノムプロジェクトで収

集したサンプルは約 1,000 症例（男：女=700:300）でコントロールも約 1,000 例（男：女=700:300）である。現時点で女性のサンプル数が少ないので、これに追加して収集を継続し、収集と同時に DNA を抽出する。

## ② 臨床データの蓄積

これまで記録してきた臨床データである性別、年齢、高血圧家族歴、収縮期血圧、拡張期血圧、脈拍数、Body mass index、総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール、尿酸、血糖、喫煙歴、飲酒歴はそのまま継続する。その他に蓄尿による電解質測定（特に尿中ナトリウム排泄、尿タンパク）、採血では血中総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール、血糖、尿酸、クレアチニン、ヘモグロビン A1c、レクチン、アディポネクチン、レニン活性、アンジオテンシン II、BNP、テストステロン、エストロゲン、デヒドロアンドロステンジオンサルフェートの測定を行う。

## ③ 解析予定遺伝子の多型選択

エストロゲンの合成や代謝に関わる遺伝子を対象とする。

これら遺伝子の遺伝子構造と多型情報を National Center for Biotechnology Information (NCBI) single nucleotide polymorphism (SNP) database 及び Applied Biosystems・Celera Discovery System database で確認・参照し、頻度の低い方のアレルの頻度 (minor allele frequency) が 20% 以上の SNP を選択し遺伝子型決定を行う (minor allele frequency が 20%以上程度に高いものは遺伝子マーカーとして適しているため)。

## ④ 遺伝子型の決定

すでに収集済みサンプルについて遺伝子型を決定する。一塩基多型 (SNP) については TaqMan PCR 法にて遺伝子型を決定する。PCR カクテルは TaqMan PCR 用 Universal master mix を用い、機器は医学部内リサーチセンター内の Applied Biosystems 社製シーケンシングシステム PRISM 7700 を使用する。マイクロサテライト多型については Applied Biosystems 社製ジェネティックアナライザー PRISM3700 の Fragment 解析によって遺伝子型を決定する。不明瞭な遺伝子型結果については適宜 PRISM 3700 で sequencing 法を行う。ハプロタイプ構築については Software として申請者がすでに所有している SNPalyze software (Dynacom 社 横浜) と Arlequin (<http://lgb.unige.ch/arlequin/>) が利用可能である。多重ロジスティック回帰分析によって重要な危険因子を割り出す。本研究によって得られたデータそれぞれを交絡因子として多重ロジスティック回帰分析することでおのおの因子がどれくらいの統計的信頼

区間を持って関係しているかを解析し重要な危険因子を割り出す。また各表現型に関連する遺伝子型について相互作用順序を同定するソフトウェアとして Ritchie ら (Am J Hum Genet 2001;69:138-147) により提唱された Multifactor Dimensionality Reduction (MDR)法 (以下のホームページからダウンロード可能、<http://www.igm.hokudai.ac.jp/crg/articles/index.php?e=3>) を適用する。

## (2) 平成 20 年度の研究計画概要

本年度は 19 年度に追加して収集したサンプルについて追加して遺伝子型の決定を行い臨床データのインプット、統計解析とまとめを行う。本研究結果を広く世に知らせ性差医療の発展に尽力する。

### ① 遺伝子型の決定

前年度に収集したサンプルについて抽出後、遺伝子型を決定する。方法論は前年度に同じ

### ② 臨床データのインプット

前年度に収集したサンプルについて測定すべき臨床データ集め、データシートにインプットする。

### ③ 統計解析とまとめ

本研究によって得られたデータを統計解析することによって有意差をもつ危険因子を割り出し、その相互作用順序を同定する。遺伝要因が遺伝子発現に影響を及ぼすものであれば、発現実験を行う。

### ④ 発表と論文化

本研究結果は人間個々の Quality of Life に直結し、性差医療にとって重要なデータとなるため積極的に学会発表し、論文化を行う。また医療者のみならず日本人一般住民に対してデータの公表・説明を行い、性差医療の現状と今後の発展に寄与したい。

## 4. 研究成果

(1) 平成 19 年度から平成 20 年度の 2 年間にを行った本研究では収集したサンプルは抽出・データインプットを含めて解析可能なサンプルが本態性高血圧症約 500 症例、コントロールも約 500 例である。臨床の場で本研究に参加同意いただいた方には高血圧家族歴を詳細に聴取するよう留意するとともにテストステロン、エストロゲン、デヒドロアンドロステンジオンサルフェート等を測定した。このようなサンプルおよびデータ収集のおかげで今まで以上に詳細な関連解析が可能となった。

(2) 解析した遺伝子は、エストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子、エストロゲン受容体  $\beta$  遺伝子、FSH 受容体遺伝子、アロマトーゼ遺伝子の他、CYPB 関連の遺伝子群や extracellular superoxide dismutase gene についても解析

した。単なる一塩基多型(SNPs)を用いた関連解析にとどまらず、ハプロタイプを構築した後それをを用いた関連解析も行った。ハプロタイプ構築についてはSNPAlyze softwareを用い、より感度の高い解析を可能とした。また個々のSNPを用いた解析で、genotypeで有意差が出た場合に、複数の交絡因子を用いてロジスティック回帰分析を行い、特異度を上げたデータを出した。これらの成果はすべて世界で初めて報告する高血圧症感受性遺伝子・遺伝子型、あるいはハプロタイプであり高い新規性をアピールできた。

(3) 研究分担者同士は学会・研究会の参加時のみならず本研究のために進捗状況や研究結果を話し合い、また新規知識の獲得や技術習得をするべく互いに意見交換し本研究のスムーズな進行に努めることができた。

(4) この研究の成果によって高血圧症における性差の分子遺伝学的背景の解明に学問的な前進がもたらされたといえる。

#### 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2件)

1. Katsuya T, Ogihara T: Hypertension and risk stratification. *Hypertension Research* 31(7):1271-1273, 2008, 査読有
2. Mashimo Y, Suzuki Y, Hatori K, Tabara Y, Miki T, Tokunaga K, Katsuya T, Ogihara T, Yamada M, Takahashi N, Makita Y, Nakayama T, Soma M, Hirawa N, Umemura S, Ohkubo T, Imai Y, Hata A: Association of TNFRSF4 gene polymorphisms with essential hypertension. *Journal of Hypertension* 26(5):902-913, 2008, 査読有

[学会発表] (計16件)

1. 永沼高廣、中山智祥、佐藤直之、付 真彦、相馬正義、青井則子、山口 舞、宇佐美論：細胞外スーパーオキシドジスムターゼ(EC-SOD) 遺伝子と脳梗塞との関連解析。BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、神戸、2008.12.9-12 (Poster 12.12)
2. 中山智祥、付 真彦、佐藤直之、泉 洋一、笠巻祐二、進藤敦司、太田昌克、相馬正義、青井則子、佐藤三佳乃、小沢友紀雄、マー イートン：20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) 産生に係わる変換酵素 CYP4F2 遺伝子と心筋梗塞との関連解析。BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、神戸、2008.12.9-12 (Poster 12.12)
3. 永沼高廣、中山智祥、佐藤直之、付 真彦、相馬正義、青井則子、山口 舞、宇佐美論：細胞外スーパーオキシドジスムターゼ

(EC-SOD) 遺伝子と本態性高血圧症との関連解析。第15回 日本遺伝子診療学会大会、仙台、2008.8.1-8.2(Oral 8.2)

4. 中山智祥、付 真彦、佐藤直之、青井則子、佐藤三佳乃、泉 洋一、笠巻祐二、進藤敦司、太田昌克、相馬正義、松本紘一、小沢友紀雄、マー イートン：ハプロタイプを用いたCYP4A11 遺伝子と脳梗塞との関連解析。第15回 日本遺伝子診療学会大会、仙台、2008.8.1-8.2(Oral 8.2)
5. 中山智祥、付 真彦、佐藤直之、泉 洋一、相馬 正義、青井則子、佐藤三佳乃、松本紘一、小沢友紀雄：ハプロタイプを用いたCYP4F2 遺伝子と本態性高血圧症との関連解析。第51回 日本腎臓学会学術総会、福岡、2008.5.30-6.1
6. 中山智祥、青井則子、中山智祥、Zhenyan Fu、佐藤直之、泉 洋一、相馬正義、青井則子、佐藤三佳乃、松本紘一、小沢友紀雄、Yitong Ma：ハプロタイプを用いたCYP4F2 遺伝子と脳梗塞との関連解析。第81回 日本内分泌学会学術総会、青森、2008.5.16-5.18
7. Nakayama T, Aoi N, Sato N, Sato M, Soma M, Izumi Y: Haplotype-based case-control study of the receptor (calcitonin) activity modifying protein (RAMP)1 gene and essential hypertension. 第72回 日本循環器学会総会・学術集会、福岡、2008.3.28-30 Poster
8. Fu Z, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Shindo A, Ohta M, Soma M, Aoi N, Sato M, Yukio Ozawa, Yitong Ma: A haplotype of CYP4A11 gene associated with essential hypertension in Japanese men. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会) 横浜、2007.12.11-15 (Poster)
9. 羽田公、相馬正義、中山智祥、菱木三佳乃、青井則子、小菅琴子、松本紘一：本態性高血圧症とレニン・アンジオテンシン系遺伝子多型との関連解析および遺伝子間相互作用の検討。第11回 日本心血管内分泌代謝学会、東京、2007.11.16-17 (Poster)
10. 中山智祥、Zhenyan Fu、佐藤直之、泉 洋一、笠巻祐二、進藤敦史、太田昌克、相馬正義、青井則子、佐藤三佳乃：ハプロタイプを用いたCYP4A11 遺伝子と心筋梗塞との関連解析。第11回 日本心血管内分泌代謝学会、東京、2007.11.16-17 (Oral)
11. Fu Z, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kasamaki Y, Shindo A, Ohta M, Soma M, Aoi N, Sato M, Yukio Ozawa, Yitong Ma: A haplotype of CYP4A11 gene associated with essential hypertension in Japanese men. 第

- 30 回 日本高血圧学会総会、沖縄、2007.10.25-27 (Oral)
12. 中山智祥、青井則子、佐藤三佳乃、佐藤直之、Zhenyan Fu、泉 洋一、相馬正義、松本 紘一：カルシトニン遺伝子関連ペプチドを構成する調節タンパクをコードするRAMP1 遺伝子と本態性高血圧症との関連解析。第 30 回 日本高血圧学会総会、沖縄、2007.10.25-27 (Poster)
13. 上野高浩、相馬正義、田原康玄、徳永勝士、田平和宣、中山智祥、松本太郎、福田 昇、松本紘一、勝谷友宏、荻原俊男、蒔田芳男、羽田明、山田美智子、高橋規郎、平和伸仁、梅村敏、三木哲郎：Fatty Acid Binding Protein 3 遺伝子の本態性高血圧症との関連（ミレニアムプロジェクト）。第 30 回 日本高血圧学会総会、沖縄、2007.10.25-27 (Poster)
14. 青井則子、中山智祥、相馬正義、上保二郎、菱木三佳乃、小菅琴子、羽毛田公、佐藤直之、泉 洋一、松本紘一：インスリン様成長因子 1 (IGF1) 遺伝子多型と本態性高血圧症との関連解析。第 30 回 日本高血圧学会総会、沖縄、2007.10.25-27 (Poster)
15. 田村正明、中山智祥、佐藤伊知朗、山本樹生：エストロゲン受容体 $\alpha$ と妊娠高血圧症候群との関連性について。第 59 回 日本産婦人科学会総会学術講演会、京都、2007.4.14-17 (高得点演題に選定された。)
16. 中山智祥、三木哲郎、勝谷友宏、荻原俊男、山田美智子、平和伸仁、梅村敏、相馬正義、田原康玄、羽田 明、蒔田芳男、高橋規郎、黒井信宏、佐野守彦：Follicle stimulating hormone受容体(FSHR)遺伝子と本態性高血圧症(EH)との関連解析。第 104 回 日本内科学会学術講演会、大阪、2007.4.3-4.5

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 智祥 (NAKAYAMA TOMOHIRO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：00339334

### (2) 研究分担者

田原 康玄 (TABARA YASUHIRO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00268749

三木 哲郎 (MIKI TETSUROU)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：0174003

勝谷 友宏 (KATSUTANI TOMOHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：30311757

### (3) 連携研究者

なし