

機関番号：22701

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390239

研究課題名 (和文) 新規に同定した3つの本態性高血圧の疾患感受性遺伝子の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of the new three disease-susceptibility genes for essential hypertension

研究代表者

梅村 敏 (UMEMURA SATOSHI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00128589

研究成果の概要 (和文) : 我々はゲノムワイド相関解析 (GWAS) を行い、その新規候補遺伝子の中で3つの遺伝子に着目し多面的解析を行った。

LPIN1 遺伝子はその中でも特に大きくその解析を進め、LPIN1 遺伝子のノックアウトマウスを飼育し、高血圧を示す事を証明した。

その他2つの遺伝子に関しては、ヒト集団で再現性の確認ならびに疾患感受性アレルの同定を行った。

今回の研究により、新規候補遺伝子の高血圧症への関与を示す事が出来た。ただし、機序の解明など、今後の課題である。

研究成果の概要 (英文) : We performed the genome-wide association analysis with using microsatellite markers for essential hypertension and reported the new candidate genes in 2007. For these three years, we studied the new three disease-susceptibility genes for essential hypertension. One of them is LPIN1 gene. The phenotype of the LPIN1 knockout mice showed the high blood pressure, but the mechanism of the lpin1-induced hypertension is still unknown. More works about the examination of the rest candidate genes are left. We were able to show the estimable result for the new candidate genes of essential hypertension, but it is left what we should do still more.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,300,000  | 2,490,000 | 10,790,000 |
| 2009年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 2010年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,300,000 | 4,290,000 | 18,590,000 |

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：本態性高血圧、ゲノム多型、バイオインフォマティクス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの様々な多因子疾患に関わる遺伝子を探索する疾患感受性遺伝子解析として、ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) が、21世紀に入ってから行われ始めた。我々も世界で初めてマイクロサテラ

イトマーカーを用いて、本態性高血圧に対し GWAS の結果を報告した (Hypertension. 2007 Mar;49(3):446-52.)。GWASにより以前の生理学的アプローチと異なる候補遺伝子や候補遺伝子座が同定されたが、いまだにその全貌は明らかでなく、ましてや機能解析は全くな

されていない状況であった。

## 2. 研究の目的

上記背景の中で我々が同定した 19 個の候補遺伝子領域の内、特に機能解析が興味深いと判断した 3 つの遺伝子 (LPIN1, SMOC2, XRCC5) に関して疾患感受性アレルの同定ならびに機能解析を予定した。候補遺伝子アプローチは偽陽性が多く信頼性に疑問を呈されることも少なくない。そのため、我々は約 2200 人の前向きコホート集団に対して上記候補遺伝子の多型をタイピングし中間形質との関連を検討。さらに、表現型解析として遺伝子改変動物を用い信頼性の高い血压データを得て組み合わせることで疾患感受性遺伝子の成因解明を目指した。その中でも特に、odds 比 1.54 を得た LPIN1 遺伝子は、以前よりインスリン抵抗性や内臓脂肪での発現などの報告がみられた。同遺伝子が高血圧に関与する報告は世界で初めてであり、同遺伝子から新たな高血圧発症解明を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 3 つの遺伝子に関して、前向きコホート集団約 2200 人での遺伝子タイピングならびに遺伝統計学的解析を行った。

(2) LPIN1 遺伝子のノックアウトマウスである fld マウスの飼育を行い、繁殖により安定した個体数の確保を行い、その表現型の解析として tail-cuff 法による非観血的血压測定をした。

LPIN1 遺伝子のノックアウトマウス (以下、fld) は The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) から購入し、通常食で飼育し tail-cuff 法により血压値を測定。ホモノックアウトマウス (fld/fld) と対照群にヘテロノックアウトマウス (fld/+), 野生型 (+/+) の 3 群のマウスを比較検討した。

(3) 内分泌臓器としての脂肪組織に着目しヒト内臓脂肪での遺伝子発現量を測定することを計画した。脂肪組織を外科的手術にて採取した。脂肪細胞の保存方法ならびに RNA 化する際の最適な条件検討を行い、プロトコルを作成し DNA 抽出ならびに RNA 抽出を行った。

## 4. 研究成果

(1) 前向きコホート集団でのゲノム多型を診療情報としたデータベースの構築を行っている。特定の感受性アレルが血压値に影響を与えたことを、日本腎臓学会総会ならびに日本高血圧学会で報告した。

(2) ノックアウトマウス 11 匹と対照群 21 匹に対し、異なる週齢で tail-cuff 法で 2-5 回血压測定、平均値をそのマウスのデータとした。収縮期血压に関して、ノックアウトマウス群は平均 134mmHg、対照群は 111mmHg と

P 値 0.01 以下と有意差を認めた。今後、更に個体数を確保した段階で、カテーテル挿入によるテレメトリー式の観血的血压測定法や各臓器の病理学的解析を予定している。

|            | <i>Lpin1</i> <sup>+/+</sup> (n=11) | <i>Lpin1</i> <sup>+/-</sup> (n=10) | <i>Lpin1</i> <sup>-/-</sup> (n=11) |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Weekly age | 15.8±1.8                           | 15.0±1.8                           | 13.8±1.2                           |
| SBP        | 111±3                              | 111±4                              | 134±5                              |
| MBP        | 79±3                               | 81±5                               | 98±6                               |
| DBP        | 63±5                               | 66±6                               | 81±6                               |
| HR         | 660±20                             | 642±16                             | 680±15                             |

† P<0.01 -/- vs +/+, +/-

‡ P<0.05 -/- vs +/+, +/-

§ P<0.05 -/- vs +/+

LPIN1 遺伝子のノックアウトマウスは、対照群に比較して血压が高かった。

(3) 横浜市立大学附属病院において全身麻酔下での手術を行った患者さん 38 人から同意を得て、内臓脂肪ならびに皮下脂肪の一部を採取した。手術を受ける疾患に関しては、全身状態に大きく影響を与えるような進行癌、急性腹症などは除外している。LPIN1 遺伝子以外に脂肪細胞でインスリン抵抗性やメタボリックシンドロームに関与していると報告されている、アンジオテンシノーゲン遺伝子 (AGT), PPAR $\gamma$  遺伝子 (PPARG), アディポネクチンに関する遺伝子 (ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2) も定量した。発現量は定量的 real time RT PCR で測定。

高血圧として加療中の高血圧群 (N=15) と正常血压群 (N=23) の 2 群を比較した。年齢、身長、体重、家族歴、血压値、各種一般採血、遺伝子発現量を比較した。統計学的有意差を認めたのは SBP, ADIPOR1 であり、高血圧群 vs. 正常血压群でそれぞれ 144.7±25.5 mmHg vs. 120.8±16.3 mmHg (p 値 0.001), 7.6±2.3 vs. 10.2±3.6 (p 値 0.02) であった。

【まとめ】 LPIN1 遺伝子に関して今後はアディポサイトカインとの関連を含めた解析が必要である。SMOC2 遺伝子や XRCC5 遺伝子に関しては遺伝子改変動物の作成を試みるも本期間では達成できなかった。表現型解析に課題を残した。

## 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 5 件)

1. Tabara Y, Hirawa N, Umemura S, et al. Common variants in the ATP2B1 gene are associated with susceptibility to hypertension: the Japanese Millennium Genome Project. *Hypertension* (56) 973-980, 2010

2. Wakui H, Tamura K, Umemura S, et al.  
Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II infused mice.  
Am Physiol Renal Physiol , (299)991-1003, 2010

3. Tamura K, Hirawa N, Umemura S, et al.  
Cardiac-specific activation of angiotensin II type 1 receptor associated protein completely suppresses cardiac hypertrophy in chronic angiotensin II infused mice.  
Hypertension(55)1157-64, 2010

4. Mashimo Y, Suzuki Y, Hatori K, Hirawa N, Umemura S, et al.  
Association of TNFRSF4 gene polymorphisms with essential hypertension.  
J Hypertens, 26(5):902-913, 2008

5. Kohara K, Tabara Y, Nakura J, Umemura S, Hirawa N, et al. : Identification of hypertension-susceptibility genes and pathways by a systemic multiple candidate gene approach:the millennium genome project for hypertension.  
Hypertens Res, 31(2):203-212, 2008

[学会発表] (計 7件)

1. 梅村 敏: "ミレニアムゲノムプロジェクト-遺伝子機能をどう解明するか-"

第33回日本高血圧学会学術総会.  
(2010, 10, 15). 福岡

2. 猪子 英俊: "ゲノムワイドな相関解析によるありふれた疾患の遺伝子の同定とゲノム創薬" 第79回日本腎臓学会学術総会. (2010, 05, 15). 横浜

3. Keisuke Yatsu, et al. : "Fine mapping using microsatellite markers and SNPs from the results of the GWAS for essential hypertension" American

society of human genetics, 59th meeting.  
(2009, 10, 22). Honolulu, Hawaii

4. 谷津圭介, 平和伸仁, 梅村敏, など: "本態性高血圧症の新規候補遺伝子 SMOC-2 の高密度 SNP 関連解析" 第31回日本高血圧学会学術総会. (2008, 10, 09). 札幌

5. Keisuke Yatsu: "SNP association analysis on the results of the genome-wide association mapping using microsatellite markers for essential hypertension." International Society of Hypertension 22nd scientific meeting.  
(2008, 06, 19). Berlin, German

6. Satoshi Umemura: "Gene mapping of essential hypertension." International Society of Hypertension 22nd scientific meeting. (2008, 06, 17). Berlin, German

7. 谷津圭介, 平和伸仁, 梅村敏, など: "本態性高血圧症の QTL 解析の結果と遺伝・環境因子相互作用の検討" 第51回日本腎臓学会学術総会. (2008, 05, 30). 福岡

[図書] (計 1件)

谷津圭介, 平和伸仁, 梅村敏: "遺伝性高血圧" 血圧 16. 661-664 (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 敏 (UMEMURA SATOSHI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 00128589

(2)研究分担者

猪子 英俊 (INOKO HIDETOSHI)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：10101932

水木 信久 (MIZUKI NOBUHISA)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90336579

平和 伸仁 (HIRAWA NOBUHITO)  
横浜市立大学・市民総合医療センター  
・准教授  
研究者番号：20315766

田村 功一 (TAMURA KOICHI)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：40285143

岡 晃 (OKA AKIRA)  
東海大学・総合医学研究所・講師  
研究者番号：80384866

谷津 圭介 (YATSU KEISUKE)  
横浜市立大学・市民総合医療センター  
助教  
研究者番号：10457856

(3)連携研究者

( )

研究者番号：