

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790711

研究課題名（和文） 全ゲノム解析による心房細動感受性遺伝子の同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of atrial fibrillation-associated loci through genomewide association study

研究代表者

江花 有亮（EBANA YUSUKE）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：60517043

研究成果の概要（和文）：

心房細動に関連する遺伝領域として第4染色体長腕25を同定した。機能解析の結果、この領域内にはエンハンサー、サイレンサー機能を示唆する所見が得られた。周辺の遺伝子を cis 制御することで心房細動感受性に関連していると考えられた。また臨床研究として、肺静脈隔離術という心房細動に対するカテーテル治療の効果判定を行った。リスクアレルを持つ症例では再発が有意に高いことが判明し、これらを踏まえた臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We identified 4q25 as an atrial fibrillation (AF) associated locus. Functional analyses revealed that this genetic region has enhancer and silencer function, which indicates that the cis-regulatory elements make genes in the neighborhood activated or silent, and finally that they confer the AF susceptibility. Next, as clinical study, we investigated whether the efficacy rate of pulmonary vein isolation (namely, catheter ablation for AF) depended on this SNP allele. The risk allele homozygotic carriers recurred more frequently than others. These findings might lead to clinical practice in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：心房細動、SNP、GWAS

1. 研究開始当初の背景

心房細動（AF）は最も頻度の高い持続性不整脈の1つである。その有病率は加齢とともに増加し、自覚症状の原因となる他、心機

能の低下や心原性塞栓症の原因ともなるため、その病態の解明や治療方法・予防方法などの確立が望まれている。近年ではAFが特定の遺伝情報が発症に関与している可能性

を示しており、遺伝子多型のひとつである一塩基多型 (SNP) を用いて、全ゲノムを網羅した大規模臨床研究 (GWAS) を行い、新たな AF 感受性遺伝子を同定している。今後はその機能解析をすることで AF の病態を明らかにすることが本研究計画の最終目標である。

AF に関して日本人においても SNP 解析を用いた GWAS が行われ、複数の AF に関連する遺伝子座が浮上してきた。その中には既報で同定された領域も含まれており、極めて高い再現性を認めている。同定された SNP は第 4 染色体長腕 (4q25) に位置している。ところがその周辺領域にはタンパク質をコードする遺伝子が存在しない。

この場合、2 つの可能性が考えられる。ひとつは周辺の遺伝子へのエンハンサー、サイレンサーなどの cis 制御機構をになっていること、そしてもうひとつはまだ同定されていないタンパク質非コード RNA が存在していることである。実際、米国の National center for biotechnology information のデータベース上には LOC729063 という仮想遺伝子の存在が示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 基礎研究

4q25 領域にはタンパク質をコードする遺伝子が存在しない。これはこの領域が cis 制御機構を持つという可能性があるため、その解析を行うことを目的とする。

また LOC729063 遺伝子について、存在の有無を確認する。

(2) 臨床研究

SNP 解析を通して AF の起こりやすさや治療選択について、意思決定の一助となるシステムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

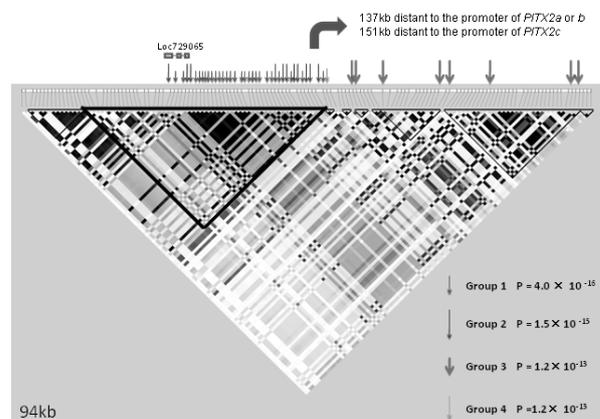
(1) 基礎研究

同定された SNP は 4q25 領域のマーカー SNP であるので、機能的な SNP を同定する必要がある。そこでシーケンスで確認し、同定された SNP の周辺配列をレポーター・アッセイで転写制御の有無を調べる。続いて結合する DNA 結合タンパク質を同定する。

(2) 臨床研究

東京医科歯科大学医学部附属病院との共同研究で肺静脈隔離術を受けた AF 症例を集めて、DNA を genotyping する。治療を受けた日から前向きに再発の有無を調べ、 Kaplan-Meier 検定を行う。

4. 研究成果



(1) 基礎研究

①4q25 のシーケンス

24 人の AF 症例についてシーケンス解析したところ、155 の variant が存在した。それらについて、188 人のサンプルを genotyping し、連鎖不平衡ブロックを作成した (図 1)。

その結果、タグ SNP が 23 同定された。

②タグ SNP の解析

すべてのタグ SNP を相関解析したところ、上位 2 つのタグ SNP は強い相関を認めた。それら 2 つのタグ SNP と連鎖不平衡にある SNP は 33 個存在した。

③転写活性の有無

33 の SNP の周辺領域をクロマチン免疫沈降法で確認したところ、2 つの SNP の周辺でエンハンサー、サイレンサーの可能性が示唆された。そこで周辺配列を入れてレポーターアッセイを行ったところ、それぞれエンハンサー、サイレンサー機能を裏付ける転写活性の亢進・低下を認めた。

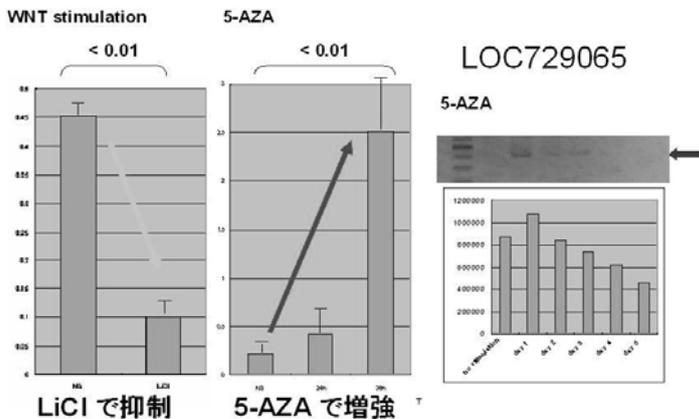
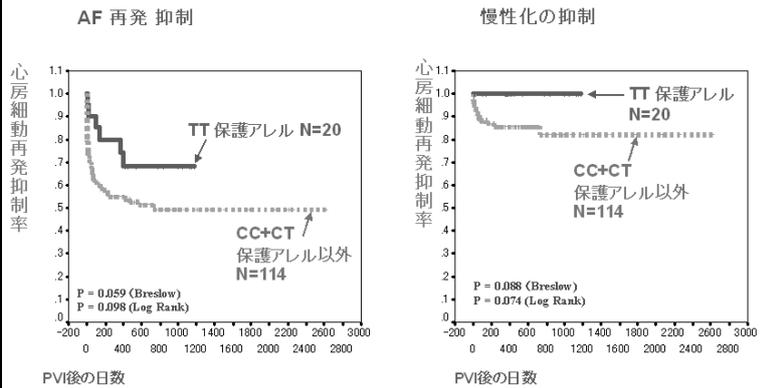
④LOC729063 の解析

ヒト心臓組織から抽出した総 RNA から cDNA を合成し、RT-PCR を施行したところ、以下のように LOC729063 のバンドが検出された。既報から間葉系幹細胞 (HMSC) に 5-アザシチジンを添加することで心筋への分化が誘導されるということで、HMSC に 5-アザシチジンを投与し、リアルタイム PCR で確認したところ、発現が上昇していることが分かった。この仮想遺伝子をノザンブロットティングで確定し、Rapid amplification of cDNA end (RACE) 法で配列確認する必要があると考えられた。

(2) 臨床研究

肺静脈隔離術を受けた AF 症例 168 人について、半年以上の観察を行い、 Kaplan-Meier 検定を行ったところ、リスクアレルを持つ症例においてはリスクアレルを持たない症例に比べて、術後の再発率が高いことが確認された。また AF の慢性化率も高く、本研究を通して、AF のカテーテル・アブレーションの治療選択に際して、SNP 解析をすることで再発率の予測に役立つ可能性が考えられた。

現在は他施設において同様の検定を行い、リプリケーション研究としている。



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)
該当なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
江花有亮 (Yusuke Ebana)

研究者番号 : 60517043