

閉塞性動脈硬化症のゲノムワイド関連解析

著者	松倉 満
学位授与年月日	2016-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00073802

論文の内容の要旨

論文題目： 閉塞性動脈硬化症のゲノムワイド関連解析

氏名 松倉 満

閉塞性動脈硬化症 (Arteriosclerosis obliterans; ASO)は動脈硬化による両側総腸骨動脈以下の下肢を栄養する動脈の狭窄もしくは閉塞と定義され末梢動脈疾患 (Peripheral Arterial Disease; PAD)と総称されている。ASO は多数の環境因子と遺伝学的因子が疾患発症に関係する生活習慣病の一種であり、家系解析から遺伝率は 0.58 と比較的高い数値が報告されているが、候補遺伝子解析、linkage analysis では明らかな責任遺伝子領域は同定されなかった。解析手法として既存の知見を考慮しないノンパラメトリックな方法が有効と考えられたため、本研究で我々は一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP)を使用したゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study; GWAS)を施行した。

GWAS は各人種の全ゲノム塩基配列が明らかになったことで可能になった手法であり、全染色体の SNPs を検定して疾患に関係した領域を検出する手法である。家系情報を考慮するパラメトリック解析では候補領域を絞り込むのに限界がある疾患に有効と考えられている。本研究は文部科学省主導のバイオバンクジャパン計画の一部門として理化学研究所 統合生命医科学研究センターと共同で行った。解析したサンプルは同計画で収集された DNA サンプルの他に、Replication study では東京大学、東京医科大学及び関連病院で収集した ASO 患者サンプルを使用した。患者群サンプルの全ゲノムタイピングにはイルミナ社 HumanHap610-Quad ビーズチップを使用して行い、対照群サンプルのタイピングには HumanHap550v3 を使用した。

GWAS では ASO 患者群 (n=785)と対照群 (n=3,383)を対象に全ゲノムタイピングを行い、497,509 SNPs を対象にクオリティフィルター (call rate of ≥ 0.99 in

both cases and controls and Hardy-Weinberg equilibrium test $P \geq 1.0 \times 10^{-6}$ in controls) を適用して、フィルターをパスした 431,666 SNPs について解析を行った。GWAS ではゲノムワイド有意性 ($p < 1.2 \times 10^{-7}$)を満たす SNPs は存在しなかったため、Cochrane-Armitage 検定による関連解析の結果 p 値が低かった順に 500 SNPs を選択して GWAS と独立した患者群サンプル ($n=1,150$)と対照群サンプル ($n=16,752$)を使用して Replication study を行った。 $p < 1.0 \times 10^{-4}$ を満たした 13 SNPs に関しては更に患者群サンプル ($n=1,229$)を追加して解析を行った。

GWAS と Replication study の結果を統合して、ゲノムワイド有意性を満たす SNPs を *IPO5/RAP2A* (rs9584669), *EDNRA* (rs6842241) 及び *HDAC9* (rs2074633) 遺伝子領域に検出した (combined $P = 6.8 \times 10^{-14}$, 5.3×10^{-9} and 8.8×10^{-8})。交絡因子の可能性を確認するため年齢、性別、及び古典的な危険因子である、糖尿病、高血圧、喫煙歴、高脂血症との関係を解析した。結果として 3 SNPs 全てに関連因子を認めなかった。EIGENSTAT によるサンプルの主成分解析で、今回使用したサンプルは全て日本人であることを確認した他に、ゲノムコントロール法で GWAS サンプルの階層化を検証した。以上の結果を総合して、今回特定した 3 SNPs は従来のリスクファクターに依存しない ASO 独自の遺伝的因子であると判断した。

最も統計学的に有意であった rs9584669 は第 13 染色体上の *IPO5/RAP2A* 遺伝子間領域に位置しており、詳細な SNP 地図作成と *in vitro* の機能解析で隣接する遺伝子のどちらに影響を及ぼしているかを精査した。SNP 地図作成は計 96 名の患者サンプルを対象に行い、rs9584669 前後の約 100kb 領域 (chromosome position (NCBI build 38); 97,658,003-97,758,002)を対象にサンガーシーケンスを施行して、総計 249 SNPs を検出した。連鎖不平衡解析を行い 24 tag SNPs に絞り GWAS で使用した患者群サンプル ($n=750$)と対照群サンプル ($n=2405$)をタイピングした結果、rs9584669 が最も統計学的に有意な tag SNP であることが明らかになった。13q32.2 染色体領域の rs9584669 を含む 7 SNPs はいずれもタンパク質のアミノ酸配列の変化に関わらなかったため、続いてレポーター遺伝子解析を行った。リアルタイム PCR で *IPO5/RAP2A* 両遺伝子の mRNA 発現を血管平滑

筋細胞で確認できたため、ヒト大動脈平滑筋細胞を使用した Dual Reporter Luciferase Assay を施行した。IPO5/RAP2A 両遺伝子の H3K27Ac 配列を組み込んだベクターを使用して、上記 7 SNPs のルシフェラーゼ活性をアレル間で解析した結果、rs9584669 のリスクアレルは非リスクアレルと比較して有意に IPO5 の転写活性を低下させた。遺伝子 RAP2A の H3K27Ac 配列を対象とした実験ではアレル間に発現の差は認めなかった。この結果より我々は rs9584669 の領域が何らかの形で物理的に IPO5 遺伝子のエンハンサーもしくはリプレッサー領域に干渉して、転写抑制因子として作用する可能性があるかと判断した。

IPO5 遺伝子の転写産物である Importin-5 (IPO5) は importin beta family の一つであり、細胞質の特に核膜孔に主として局在している。IPO5 はタンパク分泌のエンハンサーの役割を持ち、アポリポプロテイン A-1 (apo A-1) 分泌を促進することが報告されている。apo A-1 は高比重リポタンパク (HDL) の主要な構成成分であり、末梢組織から肝臓へのコレステロール輸送を担っている (reverse cholesterol transport pathway)。Apo A-1 はコレステロール輸送タンパクを介する経路とスカベンジャー B1 受容体を介する経路で、HDL 粒子内のコレステロール量を調整している。上記過程により HDL は血管内膜のプラーク蓄積を抑制している。中小径動脈の動脈硬化性変化が ASO の本態であり、HDL 機能は病態進展に重要な役割を果たしていると考えられる。

第 4 染色体に検出された rs6842241 は A 型エンドセリン受容体遺伝子 (EDNRA) の 5' 末端領域に位置している。EDNRA はエンドセリン-1 に対する受容体をコードしている。エンドセリン-1 は長時間持続する血管収縮と炎症誘発作用を有するペプチドであり、血管平滑筋細胞の活性化を仲介すると共に特に動脈硬化部位で発現上昇を認める。このためエンドセリン-1 は動脈硬化に伴う慢性炎症のメカニズムに関係していると考えられている。rs6842241 のリスクアレルは EDNRA の機能的変異を起こすことが冠動脈疾患、脳動脈瘤、虚血性脳疾患といった他の動脈硬化関連疾患で示されている。

第 7 染色体に検出された rs2074633 はヒストンデアセチラーゼ-9 (HDAC9) をコードする HDAC9 遺伝子の近傍に存在していた。HDAC は転写で生じる反応を修

飾する複合タンパク体であり、転写過程の制御と細胞周期の進行に非常に重要な役割を果たしている。*HDAC9* の遺伝子変異は虚血性脳疾患、頸動脈の硬化性変化、冠動脈疾患と関連があることが報告されている。

日本人を対象とした心血管病変の GWAS の報告は少ないが、冠動脈疾患に関して疾患関連遺伝子として *LTA*、*LGALS2*、*PSMA6*、*BRAP* が報告されている。しかし今回の解析ではいずれも ASO との関連は認めなかった。日本人以外の多人種を対象とした心筋梗塞、腹部大動脈瘤、脳動脈瘤患者の GWAS では 9p21 領域の SNP (rs10757278、rs10811161) が疾患に有意に関連すると報告されているが、本研究で同染色体領域はゲノムワイド有意性を満たさなかった。また 41,692 名のヨーロッパ人を対象とした GWAS で同領域の rs10757269 が ABI 低下に関係すると報告されているが、本研究では同 SNP は疾患に有意な関連を認めなかった。

本研究の限界として人種間の遺伝的多様性を考慮すると、日本人以外の人種で我々の研究結果を検証する必要がある他に、比較的少数のサンプル数で初回の GWAS を施行したため、疾患に関係している SNP を見逃した可能性がある。他にボンフェローニ補正に基づきゲノムワイド有意水準を規定したため、偽陰性となった SNPs が存在する可能性は否定できない点、replication cohort として BBJ サンプルを使用しているため、independent cohort ではない点が限界として挙げられる。またアレル頻度の低い SNPs や構造多型についての検討は不十分である。また今回解析した ASO 患者は間欠性跛行から重症虚血肢まで様々な病期の患者が含まれており、病期に応じて遺伝学的危険因子が若干異なる可能性はあったが、検出力の関係で解析結果を病期で分類することは行わなかった。

閉塞性動脈硬化症の疾患関連遺伝子領域の報告は世界的にも稀少であり、今回明らかになった遺伝学的リスク因子と関連分子カスケードの知見は病態メカニズム解明に貢献すると考えられる。