《鍵概念》

生活習慣病と遺伝子 —脳梗塞のゲノムワイド関連研究—

九州大学大学院医学研究院環境医学 秦淳* 清原裕*

Lifestyle-related Diseases and Genes: Genome-wide Association Study for Ischemic Stroke

*Jun Hata, **Yutaka Kiyohara
*Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

キーワード

脳梗塞	ischemic stroke
一塩基多型	single nucleotide polymorphism, SNP
ゲノムワイド関連研究	genome-wide association study, GWAS
コホート研究	cohort study
久山町研究	the Hisayama Study

Ⅰ はじめに

生活習慣病は複数の環境要因と遺伝要因が組み合わさることにより発症する多因子疾患である。従って，生活習慣病に対する的確な予防法・治療法を開発するためには，環境要因と遺伝要因について十分な理解が必要である。

脳卒中はわが国の死因の第 3 位を占める代表的な生活習慣病で，死に至らずとも運動機能や認知機能に障害を残すため，医学的，社会的に重要な疾病である。脳卒中のうち最も頻度の高い脳梗塞については，高血圧，糖尿病，脂質異常症，肥満などの疾患に加え，喫煙，多量飲酒，運動不足などの生活要因が代表的な環境要因として知られている。一方，脳梗塞の遺伝要因については十分解明されているとは言えず，脳梗塞の発症に関連する具体的な遺伝子はほとんど知られていない。

そこで本稿では，福岡県久山町における生活習慣病の疫学調査（久山町研究）を基盤とした脳梗塞の関連遺伝子研究について，その成果を紹介する。

Ⅱ 遺伝子多型とゲノムワイド関連研究（GWAS）

ヒトの生殖細胞には 23 本の染色体から構成されるゲノムが存在する。その主成分である DNA は，アデニン（A），グアニン（G），シトシン（C），チミン（T）の 4 種類の塩基がリン酸と糖（デオキシリボース）を介して鎖状に連なった物質である。ヒトの遺伝情報は基本的に DNA 上の塩基配列として記録され，4 種類の塩基が遺伝情報を記述する文字に相当する。ヒトゲノム全体には約 30 億文字（塩基対）分の遺伝情報が含まれ，2 万を超える遺伝子が記録されている。

ゲノム上の塩基配列は個体間で若干の違いが見られる。塩基配列の違いが 1%以上の頻度で存在しているものを多型と呼ぶが，特に 1 つの塩基のみが他の塩基に置き換わっているものを一塩基多型（single nucleotide

polymorphism，SNP）という。例えば，ある遺伝子の塩基配列のうち，特定の塩基が G と A の 2 種類あるような場合が SNP である。通常は父親と母親に由来する 2 つの相同染色体が存在するため，個体レベルでみると GG 型，GA 型，AA 型の 3 つの遺伝子型が存在することになる。

遺伝子は生体内でさまざまな機能を担う蛋白の設計図である。遺伝子多型により蛋白を構成するアミノ酸の配列が変化する場合があり，また蛋白の量が変化する場合もある。このような蛋白の質的ないし量的な変化によって，疾患への罹りやすさに影響を与える場合があると考えられている。

近年，ヒトゲノムの塩基配列の全貌が解読され，ゲノム全体に分布する遺伝子多型のデータベースが整備された。さらに，DNA 解析技術の急速な進歩により，多数の DNA サンプルに対して多数の遺伝子多型を高速に解読することが可能となった。そのため，現在のゲノム研究では，患者と健常者の集団から集めた多数の DNA サンプルを用いて，ゲノム全体に分布する多数の遺伝子多型を網羅的に分析して関連遺伝子を同定する手法（ゲノムワイド関連研究，genome-wide association study, GWAS）が主流となっている。

Ⅲ　久山町研究を基盤とした脳梗塞の GWAS

久山町研究は福岡県久山町（人口約 8,400 人）の住民を対象とした生活習慣病全般にわたる疫学研究であり，1961 年に創設された。本研究では，2002 年に文部科学省リーディングプロジェクトの指定を受け，脳梗塞の関連遺伝子を探索するための GWAS を実施した（図 1）。脳梗塞患者群として，九州大学病院を含む福岡県内 7 つの医療機関を受診した 40 歳以上の脳梗塞患者 1,112 名を登録した。また，対照群として久山町の 2002 年の 40 歳以上の健診受診者から心血管病の既往のない 1,112 名を選択した。

まず GWAS の第 1 段階として，一部の DNA サンプル（患者群 188 名，対照者群 188 名）を対象に全ゲノムに分布する 52,608 ヶ所の SNP の解読を行い，患者群と対照群における SNP

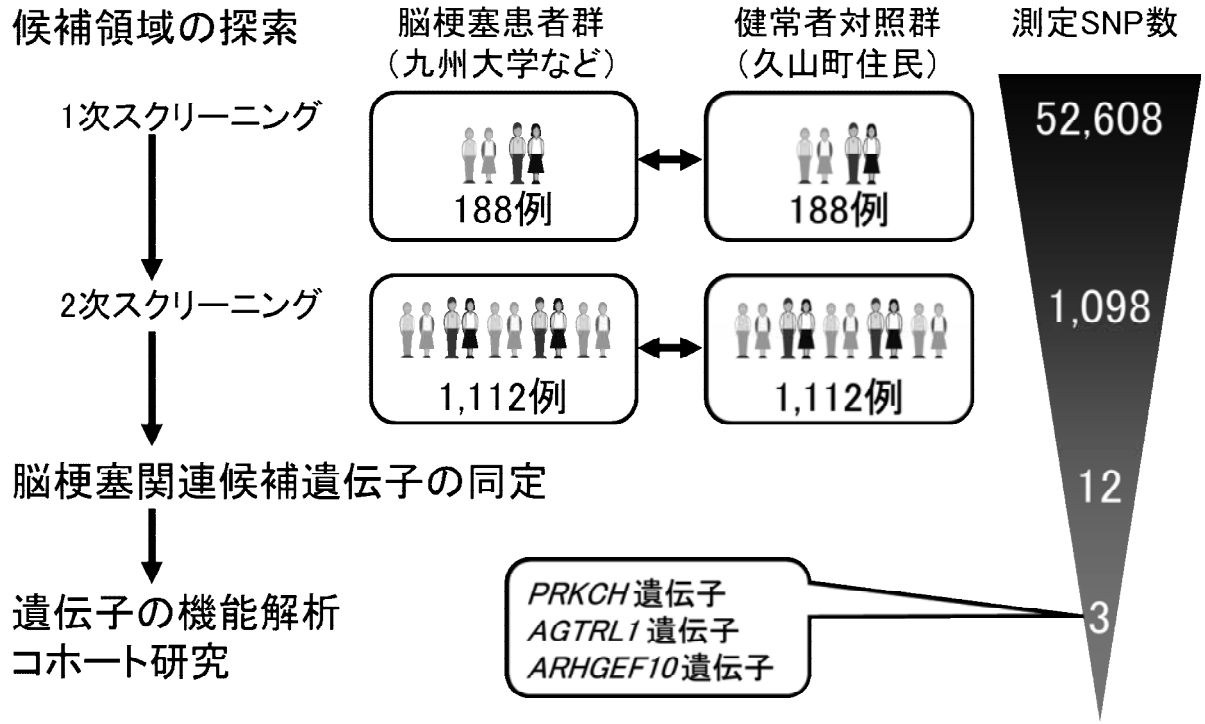

図1　久山町研究を基盤とした脳梗塞のゲノムワイド関連研究

の分布を比較した。その結果, 脳梗塞と P＜0.01 の関連を認めた SNP を 1,098 ヶ所同定した。次に第 2 段階として，全ての対象者の DNA サンプルを用いて第 1 段階で同定された SNP と脳梗塞との関連を検討した。さらに連鎖不平衡解析など詳細な検討を行った結果，*PRKCH*[1)]，*AGTRL1*[2)]，*ARHGEF10*[3)]と呼ばれる 3 つの遺伝子を新規の脳梗塞関連遺伝子として同定した。

Ⅳ　プロテインキナーゼ C エータ（PKCη）

GWAS の結果, rs2230500 と呼ばれる SNP はラクナ梗塞（脳梗塞のうち日本人で最も多いタイプ）と比較的強い関連を認めた[1)]。この SNP は *PRKCH* 遺伝子の塩基配列の 1425 番目に存在し，G 型と A 型の 2 種類がある。A 型の頻度がラクナ梗塞の患者群で 23.6%，対照群で 15.7%であったことから，A 型の遺伝子を有する者ではより脳梗塞になりやすいと考えられる。

この遺伝子によってプロテインキナーゼＣエータ（PKCη）と呼ばれる蛋白が合成されるが，G 型の場合には PKCη の 374 番目のアミノ酸がバリンとなるのに対して, A 型ではこのアミノ酸がイソロイシンに置き換わる。つまり，SNP によって PKCη の蛋白構造が質的に変化することになる。

PKCη は細胞内の情報伝達を担う酵素のひとつである。分子生物学的実験により 2 種類の PKCη の機能を比較したところ, イソロイシン型の PKCη はバリン型に比べ酵素活性が高いことが判明した[1)]。また，冠動脈の病理組織を用いた免疫組織染色によると，PKCη は動脈硬化病変（血管内皮細胞，マクロファージ）に発現し, 動脈硬化の進行に伴いその量が増加することがわかった（図２）[1)]。今後，さらに研究が進むことにより, 動脈硬化や脳梗塞の新たな発症機序が解明されるものと期待される。

Ⅴ　アペリン受容体（APJ）

GWAS で同定された SNP rs9943582 は *AGTRL1* 遺伝子の発現を調整する部位（プロモーター）に位置し，G 型が脳梗塞になりやすい

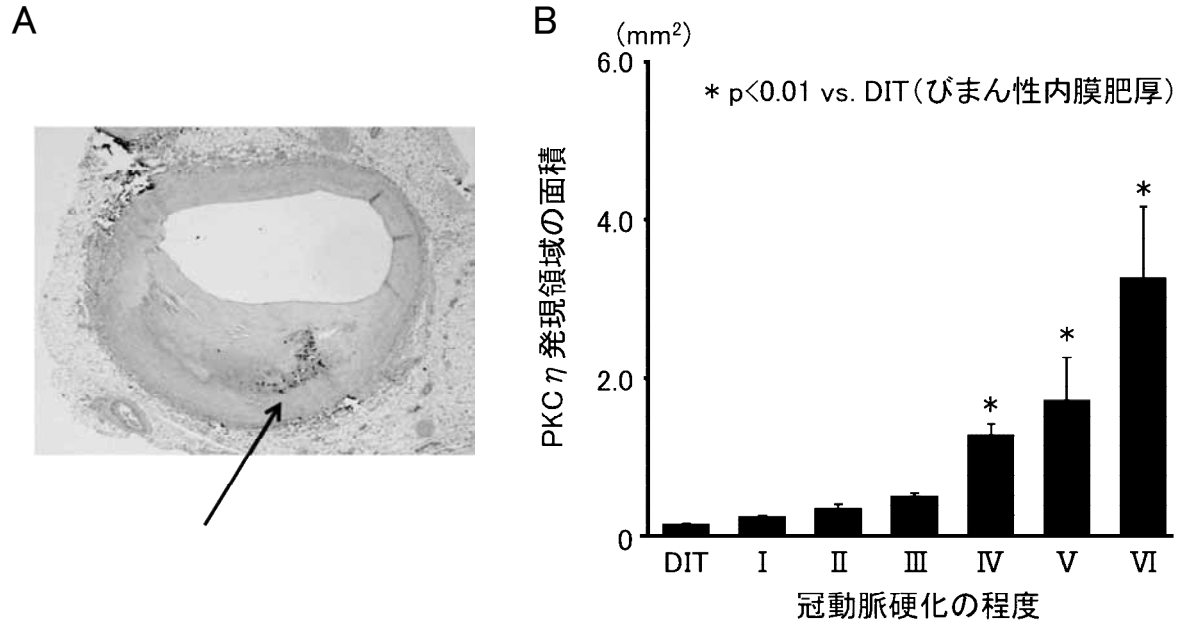

図2　PKCηの免疫組織染色（久山町剖検例）
(A) 冠動脈病変におけるPKCη免疫組織染色. 矢印は動脈硬化巣に発現したPKCηを示す. (B) 冠動脈硬化の程度（American Heart Association分類）とPKCη発現領域の面積との関係.

（文献2より改変引用）

タイプ, A 型が脳梗塞になりにくいタイプであった[2)]。

この遺伝子は，アペリン受容体（APJ）と呼ばれる蛋白をコードしている。分子生物学的実験により，この SNP が G 型であれば転写因子 Sp1 が結合しやすく，A 型の場合にはほとんど結合しないことが明らかとなった[2)]。従って，A 型と比べ G 型ではより多くの APJ が合成される可能性がある。

APJ は中枢神経系や血管系に発現し, 血圧との関連性が知られている。また，アポリポ蛋白 E（ApoE）ノックアウトマウスを用いた動物実験の報告[4)]によると，高脂肪食摂取により生じる動脈硬化は APJ のノックアウトにより著明に抑制された。我々の研究結果と組み合わせて考えると，G 型の SNP を有する者では APJ が多く発現し, 血圧の変化や動脈硬化の促進が起こりやすくなり, 脳梗塞の発症につながると考えられる。

Ⅵ Rho グアニンヌクレオチド交換因子 10（RhoGEF10）

GWAS により脳梗塞のうち動脈硬化を原因とするタイプ（ラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞）と関連する SNP として，*ARHGEF10* 遺伝子上に存在する rs4376531 を同定した[3)]。

この遺伝子は, Rho グアニンヌクレオチド交換因子 10（RhoGEF10）と呼ばれる蛋白をコードしている。分子生物学的実験により，この SNP が脳梗塞になりやすい G 型の場合には脳梗塞になりにくい C 型と比べ，転写因子 Sp1 の結合能が高いことが示された[3)]。従って，RhoGEF10 は，G 型の SNP を有する場合により多く合成される可能性がある。また，RhoGEF10 は動脈硬化との関与が知られている RhoA を特異的に活性化する作用を有することが実験的に示された[3)]。従って，G 型の SNP を有する者では RhoGEF10 が高発現し，RhoA の活性化を介して動脈硬化を引き起こし、脳梗塞になりやすくなると考えられる。

Ⅶ 久山町のコホート研究による再検証

1988 年に久山町の循環器健診を受診した住民のうち DNA サンプルを有する 1642 名を 2002 年までの 14 年間追跡したところ, *PRKCH* 遺伝子の SNP rs2230500 の遺伝子型が AA 型の群では、GG 型の群と比べ有意に脳梗塞発症のリスクが高かった（性年齢調整ハザード比 2.83，95%信頼区間 1.11-7.22，P=0.03）（図３）[1)]。

同様の解析を他の 2 つの遺伝子の SNP について行った。*AGTRL1* 遺伝子の SNP が GG 型の群では、GA 型や AA 型の群と比べて脳梗塞になりやすいことが判明した（ハザード比 2.00, 95%信頼区間 1.22-3.29, P=0.006）[2)]。また *ARHGEF10* 遺伝子の SNP が CG 型または GG 型の群では，CC 型の群と比べ脳梗塞発症のリスクが有意に高かった（ハザード比 1.79，95%信頼区間 1.05-3.04，P=0.03）[3)]。

以上のことから、GWAS の患者対照研究で同定された 3 つの脳梗塞関連遺伝子の SNP は、それぞれ将来の脳梗塞発症を予測する上で有用な遺伝マーカーである可能性がある。

Ⅷ おわりに

ヒトゲノム研究の進展や DNA 解析技術の進歩により, 新規の脳梗塞関連遺伝子が明らかにされつつある。しかし，GWAS の目標は，関連遺伝子の探索のみならず, 新たに発見された遺伝子を手がかりに脳梗塞の治療法や予防法を開発することにある。今後の研究の進展により, 個人の遺伝的素因に合わせたきめ細かな脳梗塞の治療や予防が可能になると期待される。

文献

1) Kubo M, Hata J, Ninomiya T, Matsuda K, Yonemoto K, Nakano T, Matsushita T, Yamazaki K, Ohnishi Y, Saito S, Kitazono T, Ibayashi S, Sueishi K, Iida M, Nakamura Y, Kiyohara Y: A nonsynonymous SNP in *PRKCH* (protein kinase C η) increases the

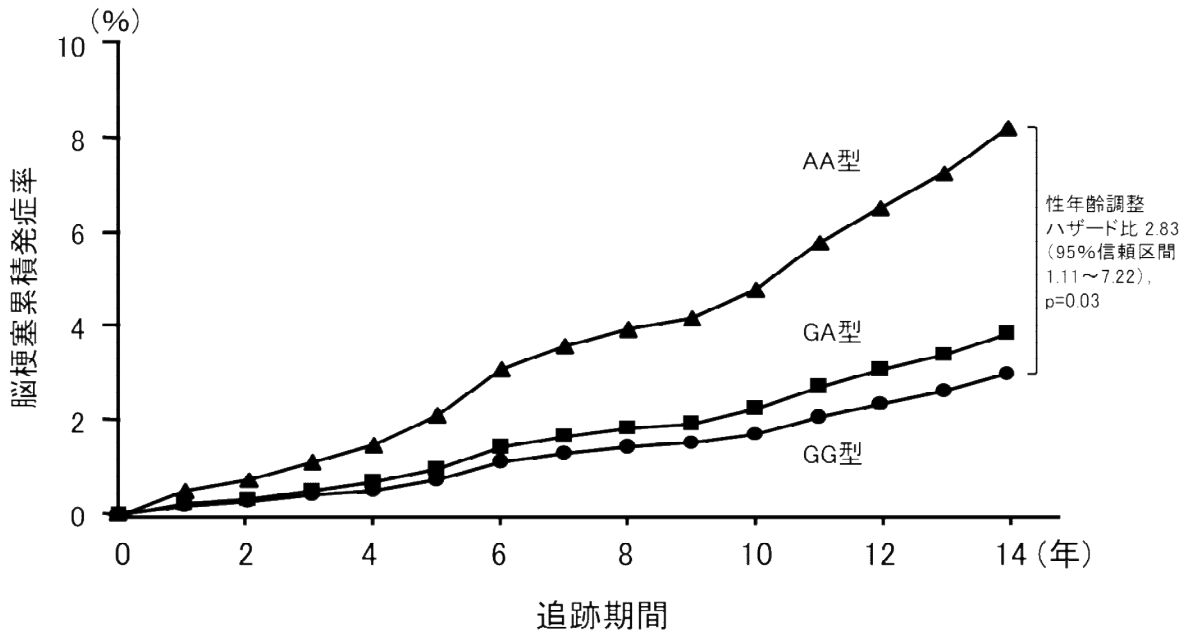

図3 *PRKCH* 遺伝子のSNP rs2230500と脳梗塞発症の関係
（久山町男女1,642名，40歳以上，追跡14年，1988～2002年，性年齢調整）
（文献2より改変引用）

risk of cerebral infarction, Nat Genet, 39:212-217, 2007

2) Hata J, Matsuda K, Ninomiya T, Yonemoto K, Matsushita T, Ohnishi Y, Saito S, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M, Kiyohara Y, Nakamura Y, Kubo M: Functional SNP in an Sp1-binding site of *AGTRL1* gene is associated with susceptibility to brain infarction, Hum Mol Genet,16:630-639, 2007

3) Matsushita T, Ashikawa K, Yonemoto K, Hirakawa Y, Hata J, Amitani H, Doi Y, Ninomiya T, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M, Nakamura Y, Kiyohara Y, Kubo M: Functional SNP of *ARHGEF10* confers risk of atherothrombotic stroke, Hum Mol Genet, 19:1137-1146, 2010

4) Hashimoto T, Kihara M, Imai N, Yoshida S, Shimoyamada H, Yasuzaki H, Ishida J, Toya Y, Kiuchi Y, Hirawa N, Tamura K, Yazawa T, Kitamura H, Fukamizu A, Umemura S: Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis, Am J Pathol, 171:1705-1712, 2007