

＜シンポジウム 1—2＞脳血管障害：基礎と臨床の最前線

脳血管障害の分子疫学：

久山町研究と福岡脳卒中データベース研究 (FSR)

北園 孝成¹⁾ 久保 充明²⁾ 秦 淳³⁾
井林 雪郎⁴⁾ 清原 裕³⁾ 飯田 三雄⁴⁾

(臨床神経, 48 : 892—895, 2008)

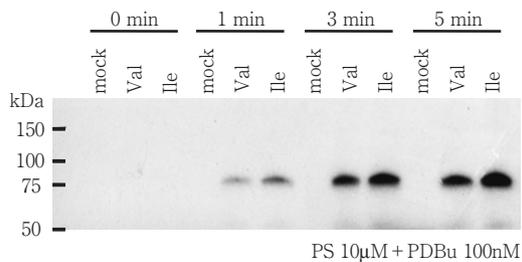
Key words : 脳梗塞, 一塩基多型, タンパクリン酸化酵素C η , NAD(P)Hオキシダーゼ

はじめに

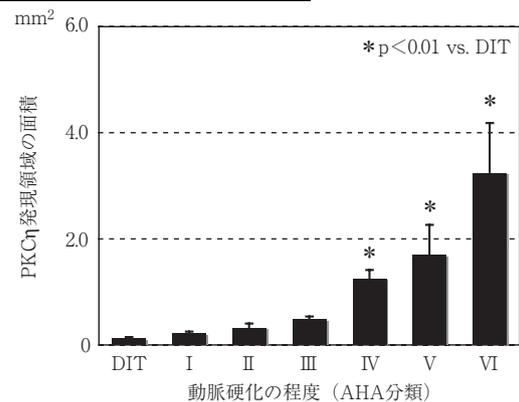
脳血管障害は遺伝的要因に加えてさまざまな環境要因が複雑に組み合わさって発症する多因子疾患であり, その遺伝的要因

を解明するためには, 環境要因をふくめた多くの因子を勘案する必要がある。久山町研究では, 人口約 8,000 人の福岡県糟屋郡久山町において, 40 歳以上の住民を対象とし, 1961 年から心血管病の疫学研究をおこなっている。また, われわれは脳卒中診療の根拠となるべきエビデンスを構築することを目的

(a) PKC η 自己リン酸化



(b) 動脈硬化巣におけるPKC η の発現



(c) Val374Ile 多型別にみた脳梗塞累積発症率

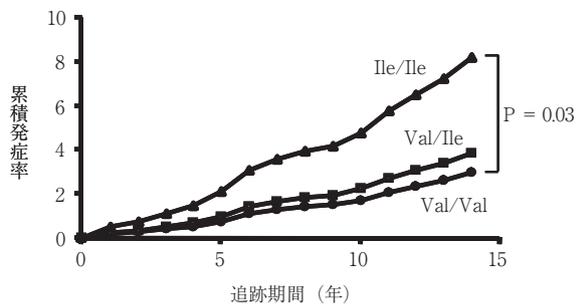


Fig. 1 脳梗塞のゲノムワイド関連解析：PRKCH 遺伝子

イソロイシン型の protein kinase C η は, 自己リン酸化活性が強かった (a). protein kinase C η は冠状動脈硬化巣に強く発現し動脈硬化の程度と相関していた (b). さらに, イソロイシンのホモである Ile/Ile 型は Val/Val 型や Val/Ile 型に比して有意に脳梗塞発症率が高かった (c). 文献1より改変引用。

¹⁾九州大学病院腎・高血圧・脳血管内科〔〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1〕

²⁾理化学研究所遺伝子多型センター遺伝子多型タイピング研究支援グループ

³⁾九州大学大学院医学研究院環境医学

⁴⁾同 医学研究院病態機能内科学

(受付日：2008年5月16日)

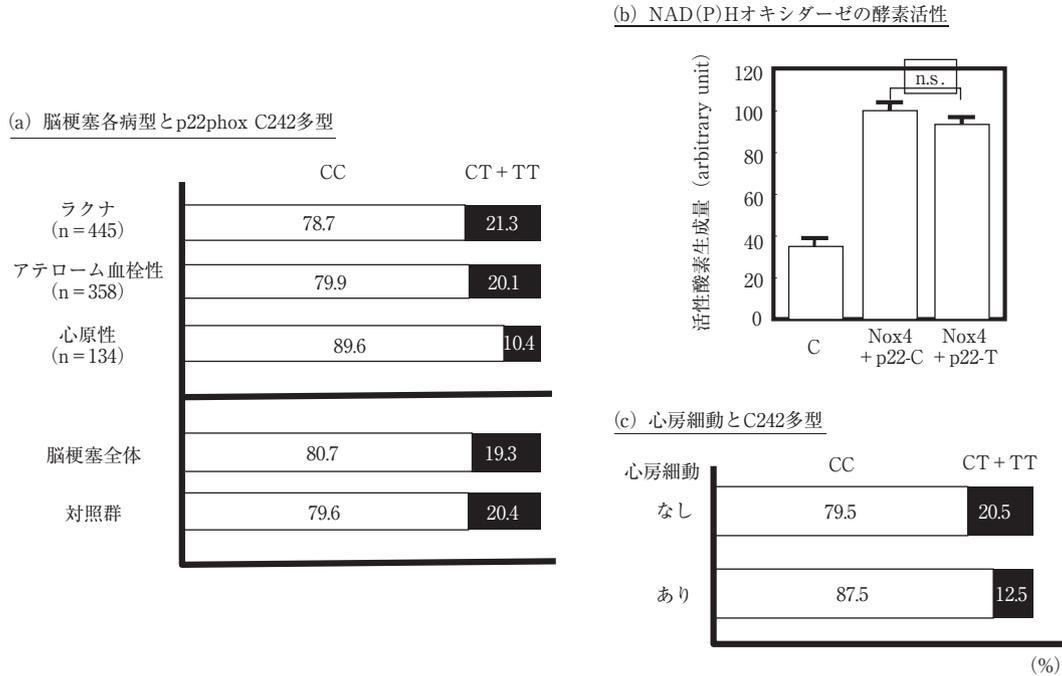


Fig. 2 脳梗塞の候補遺伝子解析；p22phox のC242T 多型

ラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞ではアレル頻度に有意な差がなかったが心原性脳塞栓症では T アレルの頻度が対照と比して有意に低かった (a)。COS 細胞を用いて p22phox の両アレルを強制発現させても、NAD (P) H オキシダーゼ活性に有意な差を認めなかった (b)。一方、T アレルの存在は心房細動の発症抑制に関与する可能性が示唆された (c)。文献 3 より改変引用。

に、福岡県の 8 施設を対象に多施設共通脳卒中データベースシステムを開発した。本データベース (The Fukuoka Stroke Registry ; FSR) は、発症 7 日以内の脳卒中急性期症例全例を対象とし、文書による同意をえたのちに、急性期臨床データとその後の予後調査をおこなうとともにゲノム DNA を収集している。われわれは 2002 年から 2003 年におこなわれた久山町ゲノム疫学研究参加者と FSR で収集した脳梗塞患者の血液サンプルをもちいて、脳梗塞関連遺伝子の探索研究をおこなった。

1. ゲノムワイド関連解析

患者と対照の計 2,252 名のサンプルをもちいて二段階でゲノムワイド関連解析をおこなった。一次スクリーニングでは患者と対照それぞれ 188 名のサンプルをもちいて、ゲノム全体に分布する 52,608 カ所の SNPs のタイピングをおこなった。その結果、P 値が 0.01 未満と関連の可能性を示した 1,098 SNPs を検出し、二次スクリーニングの対象 SNPs とした。二次スクリーニングでは患者と対照それぞれ 1,126 名のサンプルについてタイピングをおこない、P 値が 0.0001 未満と強い関連を示した 10 個のマーカー SNPs をみいだした。

10 個のマーカー SNPs から最初に候補遺伝子として同定したものは、protein kinase Cη をコードする PRKCH 遺伝子である¹⁾。本遺伝子のエクソン 9 に存在する 1,425 番目の G が A に変異する SNP によって ATP 結合部位に位置する

374 番目のバリンがイソロイシンへアミノ酸置換し、酵素活性に影響をおよぼすことが推測された。実際にバリン型に比してイソロイシン型の protein kinase Cη は自己リン酸化や myelin basic protein のリン酸化活性が強いことが明らかになった (Fig.1(a))。また、protein kinase Cη は冠状動脈硬化巣に強く発現することをみとめ、動脈硬化の程度が強くなるほど、発現領域が広がることもみいだした (Fig.1(b))。さらに、久山町第 3 集団 1,642 名をもちいて、各アレル毎に 15 年間の脳梗塞累積発症率を検討したところ、イソロイシンのホモである Ile/Ile 型は Val/Val 型や Val/Ile 型に比して、有意に脳梗塞発症率が高いことをみいだした (Fig.1(c))。以上のことより、PRKCH 遺伝子は新たな脳梗塞関連遺伝子であることが示唆された。

次に同定した遺伝子は 7 回膜貫通型 G タンパク共役受容体 APJ をコードする AGTRL1 遺伝子である²⁾。APJ は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、中枢神経系に発現する受容体であり、アペリンと結合して血圧調節や神経伝達に関与することが知られている。今回発見した SNP は AGTRL1 遺伝子のプロモーター領域に存在する -15G/A 多型である。A アレルでは G アレルに比して、転写因子 Sp1 による転写活性が有意に高いことをみいだしており、転写レベルでの変化が動脈硬化の進展に関与している可能性が示唆された。

II. 候補遺伝子解析

一方、心血管病に関連することが報告されている既知の SNP に関する候補遺伝子解析もおこなっている。われわれが最初に着目した遺伝子多型は活性酸素生成酵素 NAD (P) H オキシダーゼの膜タンパクである p22phox の C242T 多型である³⁾。本 SNP もアミノ酸をヒスチジンからチロシンに変異させることが知られており、酵素活性との関連も報告されている。これまでに2つのグループが本多型と脳梗塞発症に関してことなる結果を報告していた。今回の検討ではラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞ではアレル頻度に有意な差がないことをみいだした (Fig. 2 (a))。実際に COS 細胞をもちいて p22phox の両アレルを強制発現させてみても、NAD (P) H オキシダーゼ活性に有意な差をみとめなかった (Fig. 2 (b))。しかしながら、心原性脳塞栓症では T アレルの頻度が対照と比して有意に低かった (Fig. 2 (a))。T アレルの存在は心房細動の発症抑制に関与する可能性があり (Fig. 2 (c))、これが心原性脳塞栓症の発症に予防的に作用する可能性が推測された。

その他に lymphotoxin-alpha⁴⁾ や sorbin and SH3-domain-containing-1 (SORBS1)⁵⁾ など多くの候補遺伝子について解析をおこなっている。

終わりに

久山町研究の参加住民を対照とし、福岡脳卒中データベース研究 (FSR) の登録患者を症例として、脳梗塞関連遺伝子の探索研究をおこなってきた。ゲノムワイド研究によって、まったく新しい脳梗塞関連遺伝子を見いだすとともに、候補遺伝子解析によってこれまで報告された多型に関する検証をおこなうことができる。今後も疫学研究と臨床研究をタイアップさせて、脳梗塞に関連する詳細なゲノム疫学研究を展開したい。

共同研究者

二宮利治, 谷崎弓裕, 今村 剛 (九州大学大学院医学研究院環境

医学), 吾郷哲朗, 鴨打正浩, 黒田淳哉, 大星博明, 石川英一, 湧川葉子, 後藤聖司, 吉村壮平 (九州大学病院 腎・高血圧・脳血管内科), 杉森 宏 (九州大学病院 救急部), 中野敏昭, 居石克夫 (九州大学大学院病理病態学), 中村祐輔 (東京大学医学研究所), 岡田 靖, 湧川佳幸, 牧原典子 (国立病院機構九州医療センター), 中根 博, 熊井康敬 (国立病院機構福岡東医療センター), 豊田一則 (国立循環器病センター), 長尾哲彦 (原土井病院), 藤井健一郎, 高田潤一 (福岡赤十字病院), 楠田憲治, 鍵山智子, 萩原のり子, 横山葉子 (誠愛リハビリテーション病院), 尾前 豪, 岸川和裕 (今津赤十字病院), 玉城欣也 (白十字病院), 上床武史 (聖マリア病院), 佐渡島省三, 藤本 茂, 陣内重郎 (新日鐵八幡記念病院)

文 献

- 1) Kubo M, Hata J, Ninomiya T, et al: A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C η) increases the risk of cerebral infarction. *Nat Genet* 2007; 39: 212—217
- 2) Hata J, Matsuda K, Ninomiya T, et al: Functional SNP in an Sp1-binding site of AGTRL1 gene is associated with susceptibility to brain infarction. *Hum Mol Genet* 2007; 15: 630—639
- 3) Kuroda J, Kitazono T, Ago T, et al: NAD (P) H oxidase p22phox C242T polymorphism and ischemic stroke in Japan: the Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. *Eur J Neurol* 2007; 14: 1091—1097
- 4) Hagiwara N, Kitazono T, Kamouchi M, et al: Polymorphisms in the lymphotoxin alpha gene and the risk of ischemic stroke in the Japanese population. The Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. *Cerebrovasc Dis* 2008; 25: 417—422
- 5) Hagiwara N, Kitazono T, Kamouchi M, et al: Polymorphism in the sorbin and SH3-domain containing-1 (SORBS 1) gene and the risk of brain infarction in the Japanese population: the Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. *Eur J Neurol* 2008; 15: 481—486

Abstract**Molecular epidemiology of cerebrovascular diseases;
the Hisayama study and the Fukuoka Stroke Registry (FSR)**

Takanari Kitazono, M.D.¹⁾, Michiaki Kubo, M.D.²⁾, Jun Hata, M.D.³⁾,
Setsuro Ibayashi, M.D.⁴⁾, Yutaka Kiyohara, M.D.³⁾ and Mitsuo Iida, M.D.⁴⁾

¹⁾Department of Nephrology, Hypertension, and Stroke, Kyushu University Hospital

²⁾Laboratory for Genotyping, SNP Research Center, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)

³⁾Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

⁴⁾Department of Medicine and Clinical Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

The underlying pathogenesis of stroke is mediated by a variety of environmental risk factors as well as genetic ones. Thus, we have to evaluate the environmental factors precisely to identify the stroke-related gene polymorphisms. The Hisayama study, an epidemiological study of cardiovascular diseases, was established in 1961 in Hisayama, Japan. In 2002, a screening survey for the genetic study was performed in Hisayama. The Fukuoka Stroke Registry (FSR) is a hospital-based registration of stroke patients. Stroke specialists from eight medical centers in southern Japan have participated in FSR. In the present study, control and case subjects were recruited from the Hisayama study and FSR, respectively.

We performed a genome-wide case-control study and found that a nonsynonymous SNP in PRKCH encoding a member of protein kinase C (PKC η) was significantly associated with brain infarction. As a candidate gene analysis, we investigated the role of NAD (P) H oxidase C242T polymorphism in the development of brain infarction. The C242T polymorphism was not associated with lacunar and atherothrombotic infarction; however, the presence of T-allele may have a protective role in the occurrence of atrial fibrillation and cardioembolic brain infarction. These studies may provide important information for the development of the therapeutic strategies against stroke.

(Clin Neurol, 48: 892—895, 2008)

Key words: brain infarction, single nucleotide polymorphism, protein kinase C η , NAD (P) H oxidase
