

論文題目 Genetic Variations of Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Promoter Regions and their Associations with Susceptibility to Myocardial Infarction

和訳 マトリックス・メタロプロテアーゼ-1,-3 遺伝子多型と心筋梗塞
罹患の相関研究

指導教官 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程 内科学専攻

氏名 野尻 剛史

近年、個人個人の遺伝子多型に基づいた、＜個別化医療 (personalized medicine)＞の必要性が唱えられている。糖尿病、高血圧、動脈硬化などの＜ありふれた病気 (common disease)＞は、遺伝的背景が存在するものの、メンデルの法則に従わず、多数の遺伝子とその発症に関係すると考えられている。そのため多因子遺伝性疾患 (polygenic disease) ともいわれる。したがって、予防医学的な観点からは、こうした疾患感受性に関わる遺伝子多型を多数解明することがまず必要である。

また、一つの薬剤を投与しても、そのレスポンスには個人差があり、また少なからず副作用の問題が存在する。こうした薬剤効果や副作用にも、遺伝子多型の関与が近年指摘されてきている。薬剤効果や副作用に関係する遺伝子多型が多数同定されれば、効率的な薬剤投与が可能となる。

こうしたゲノム医科学の発展には、患者の同意に基づいた遺伝子解析用検体の採取が必要であり、また、臨床情報を蓄積することも必要である。このような研究主旨に基づき、本院の循環器内科では、心臓カテーテル検査を施行した患者の末梢血より遺伝子解析用検体を採取保存し、またこれらの患者の臨床データを、データベースとして構築している。採取された遺伝子解析用検体は、循環器内科とは独立した医療情報部にて二重の乱数化処理を施すことにより、個人情報保護の徹底に努めている。私も循環器内科におけるデータベースの構築に従事してきた。

動脈硬化病変の形成に関わる生理活性物質のひとつとして、近年、matrix metalloproteinases (MMPs) の関与が指摘されている。MMPs は、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックス蛋白の分解作用を有する蛋白分解酵素であり、少なくとも 15 種類以上の類似遺伝子が遺伝子ファミリーを構成する。そのなかで、matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) は細胞外マトリックスのなかで最もポピュラーな構成成分である I 型コラーゲンを分解する。一方で matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) は、細胞外マトリックスの幅広い構成成分に対して分解活性を持つ。Matrix metalloproteinases (MMPs) は動脈硬化病変において発現が亢進することが知られている。動脈硬化病変は、マクロファージの泡沫化や血管平滑筋細胞の内膜への遊走により形成され、表面を繊維性被膜で被われている。PDGF や TNF- α などの動脈硬化病変で発現が亢進するサイトカインは、マクロファージや血管平滑筋における MMPs の発現を亢進させることが知られている。発現が亢進した MMPs は血管平滑筋細胞の内膜への遊走を促進し、また、プラーク表面の繊維性被膜を分解することによりプラークの破綻 (plaque rupture) を惹起することが示されている。動脈硬化病変プラークの破綻は、急性冠症候群 (acute coronary syndrome) の病理学的機序の中心をなすことから、MMPs は心筋梗塞発症に深く関わっていることが推察される。

近年、MMP-1 と MMP-3 のプロモーター領域において、遺伝子発現の調節に影響を与える遺伝子多型が報告された。Rutter らは、MMP-1 遺伝子の転写開始点から 1607 塩基上流に、グアニンの挿入欠損による 1G/2G 多型が存在することを報告した。2G allele は転写因子の ets-1 による調節を受け、1G allele よりも高い転写活性を有する。一方で Henney らは、MMP-3 のプロモーター領域において、転写開始点から 1171 塩基上流にアデニンの挿入欠損による 5A/6A 遺伝子多型が存在し、レポーターアッセイにより、5A allele が 6A allele よりも高い転写活性を有することを報告した。

そこで私は、これらの MMP 遺伝子多型が本邦において冠動脈疾患とりわけ心筋梗塞と相関し、有用な遺伝子マーカーとなりうるかにつき、患者対照比較研究を行った。

疾患群として、当院循環器内科に入院した 320 人の冠動脈疾患 (coronary artery disease; CAD) の患者を用いた。このうち 164 人は心筋梗塞 (myocardial infarction; MI) の既往を有する患者であった。対照群としては、朝日成人病研究所の外来に通院する患者で、運動負荷試験により冠動脈疾患が除外された 335 人の群を

用いた。遺伝子のタイピングは蛍光プローブを用いて解離温度の差異を検出する melting curve analysis 法にて行った。

その結果、まず MMP-3 5A/6A 多型に関しては、5A allele の頻度は MI 群のほうが対照群と比較して有意に高率であった (MI vs control 0.18 vs 0.12; $P < 0.05$)。また、5A allele の保有者率の比較 (5A/5A, 5A/6A vs 6A/6A) においても、MI 群の方が対照群よりもより高率であった (MI vs control 33% vs 23%; $P < 0.05$)。しかしながら、MI の既往のない CAD 患者群 (non-CAD group) を対照群と比較すると、アリル頻度、genotype ともに有意差は認められなかった。さらに冠危険因子を独立変数として多変量解析を行ったところ、5A allele の保有は MI の罹患に関して独立した危険因子であった (相対危険度 1.67; 95%信頼区間 1.02~2.74; $P < 0.05$)。こうした傾向を確認するために、心臓血管研究所より 302 人の心筋梗塞の患者を recruit し、同様の結果を確認した。

一方で、MMP-1 1G/2G 多型は、アリル頻度、genotype ともに疾患群と対照群の比較で有意差が認められなかった。

ところで、MMP-3 と MMP-1 はともに、第 11 番染色体長腕 22 領域に存在することが知られている。しかも両者の距離はおよそ 40KB~50KB と、ほぼ近傍に存在する。そのため、MMP-3 5A/6A 多型と MMP-1 1G/2G 多型の間には連鎖不平衡が存在することが予想された。そこで私はこれらの多型の組み合わせ解析を行ったが、予想どおり、MMP-3 5A allele と MMP-1 1G allele の間に強い連鎖不平衡が認められた (連鎖不平衡係数は、対照群、MI 群でそれぞれ、0.84、0.91、0.97)。さらに、これらの遺伝子多型の連鎖に基づいてハプロタイプ解析を行ったところ、5A-1G ハプロタイプは MI 群の方が対照群よりも統計的有意差を持って高頻度であった (MI vs control 0.17 vs 0.11; $P < 0.01$)。したがって、5A-1G ハプロタイプは、心筋梗塞罹患に関して、有用な遺伝子マーカーとなることが示唆された。

MMP-3 5A/6A 遺伝子多型の 5A allele が MI の罹患と関係するという私の結果は、神戸大学によりなされた本邦における先行報告と一致するものである。一方で、今回の私の検討では、5A allele は non-MI CAD との相関は認められなかった。なぜ、5A allele は MI のみと相関し、non-MI CAD とは相関しないのであろうか？ MMP-3 はヒトの動脈硬化で発現が亢進し、プラークの破綻との関連が示唆されている。5A allele は 6A allele よりも転写活性が高いので、5A allele が MI の発症と関連することは論理的整合性がある。一方で、MMP-3 ノックア

ウトマウスをアポ E ノックアウトマウスと交配させた最近の報告によれば、むしろコントロールマウスに比べて動脈硬化病変が進行しており、動脈硬化の大きさという点についてみれば、従来の考え方と異なり、むしろ MMP-3 によって動脈硬化が縮退することが指摘されている。私が今回行った患者対照比較試験においても、MMP-3 が動脈硬化病変の大きさの進行よりもむしろ、プラークの破綻を介した MI の発症に関係する可能性を示唆していると考えられる。

つぎに、今回の私の検討では、MMP-1 プロモーター 1G/2G 多型は、CAD や MI の罹患と相関を示さなかった。2G allele は 1G allele よりも高い転写活性を有し、欧米や本邦の患者対照研究において、悪性腫瘍の罹患や進行と相関が示されている。従って、MMP-1 は動脈化病変よりもむしろ、悪性腫瘍罹患と関係するものと考えられる。

最後に、今回私は、MMP-3 の 5A allele と MMP-1 の 1G allele が、本邦人において、強い連鎖不平衡を形成することを見いだした。MMP-3 と MMP-1 は第 11 番染色体において、その間の距離が 40~50KB と極めて近傍に存在するため、これらの遺伝子多型が連鎖不平衡を形成することは妥当と考えられた。むしろ興味深いことは、MMP-3 プロモーターの高い転写活性と関係する 5A allele が、MMP-1 プロモーターの低い転写活性と関係する 1G allele と連鎖不平衡を形成することである。このことから、MMPs の発現バランスは、全体として調節を受けるメカニズムが働いてきた可能性があることが推察される。また、ハプロタイプ解析を行った結果、5A-1G ハプロタイプが MI 罹患の有用なマーカーとなることが認められた。第 11 番染色体長腕 22 領域には MMP 遺伝子が多数存在し、遺伝子クラスターを形成しているため、5A-1G ハプロタイプは MI 罹患に関係する他の MMP 遺伝子多型とも連鎖している可能性があり、今後の検討が必要である。

以上、私が行った患者対照研究の結果、第 1 に、MMP-3 5A/6A 多型の 5A allele が心筋梗塞罹患の独立した危険因子となりうること、第 2 に、MMP-3 5A/6A 多型の 5A allele が MMP-1 1G/2G 多型の 1G allele と強い連鎖不平衡を形成すること、また第 3 に、5A-1G ハプロタイプが心筋梗塞罹患に関して有用な遺伝子マーカーとなりうることが示唆された。