

論文の内容の要旨

論文題目 The Role of Mrf-2/ARID5B in the Pathogenesis
of Cardiovascular Disease
和 訳 心血管病変の発症における Mrf-2/ARID5B の意義
指導教員 永井 良三 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 15 年 4 月入学
医学博士課程
循環器内科専攻
氏名 王国琴

虚血性心疾患の原因となる動脈硬化は、血管内皮障害を始め、マクロファージなどの炎症細胞浸潤・活性化、脂肪（酸化脂質）蓄積、血管平滑筋細胞の活性化、血栓の形成と多彩なプロセスを経て進展する。このような動脈硬化病変の形成において血管平滑筋の分化および脱分化は重要な役割を演ずる。Mrf-2/ARID5B は、この血管平滑筋の分化のキーレギュレーターとして cloning された。Mrf-2 は、様々な細胞の分化や遺伝子発現を調節することが知られている ARID (AT-rich interaction domain) 転写因子ファミリーの一つに属し、AT rich な部位 DNA に結合して転写調節を行うと考えられている。Mrf-2 のノックアウトマウスの研究により、この遺伝子は脂肪分化・肥満にも関与している可能性が示唆されている。以上のことから、Mrf2 遺伝子が、ヒトでも動脈硬化・肥満などの病態に関与している可能性があるのではないかという仮説を立てた。

まず、東京大学医学部附属病院循環器内科における入院した冠動脈疾患（少なくとも一枝以上に 75%以上の有意狭窄をもつもの）症例の 475 例および共同研究機関での健常者 310 例を用いて、本遺伝子全長をカバーするように均等間隔に public database (JSNP(Japanese single nucleotide polymorphisms)および NCBI GeneBank database) から 17 個の SNP を選出し、direct sequencing または TOF-MS にてタイピングを行った。Mrf-2 遺伝子の中ほどの 4 つの SNPs —rs2893880、rs10740055、rs7087507 と rs10761600(5'側から順番に SNP4, SNP5, SNP6, SNP7 と番号付けした) が疾患との関連性が示唆された。アリル頻度でみた場合、SNP4 (G/C 多型) では健常者において G アリルが冠動脈疾患患者より高頻度であり (37.1% vs 32.3%)、遺伝子型で見た場合も健常群では GG : 55 例 (17.8%)、CG : 119 例 (38.5%)、CC : 136 例 (43.7%) であるのに対して、CAD 患者群では GG : 42 例(8.9%)、CG : 222 例 (46.9%)、CC : 209 例 (44.2%)、動脈硬化の発症との強い関連性が認められた ($P=0.0002$)。SNP6 について、アリル頻度の分布では健常群に G アリル有意に患者群より高く (38.5% vs 33.7%, $P=0.0411$)、genotype は健常群では GG:52 例 (16.8%)、AG:134 例 (43.4%)、AA:123 例 (39.8%) であり、動脈硬化患者群では GG が 48

例(10.1%)、AGが224例(47.2%)、AAが203例(42.7%)であり、冠動脈疾患の発症とも強い関連性が認められた($P=0.0058$)。以上の結果から、SNP4のGとSNP6のGが動脈硬化発症に対して保護的に作用する可能性が示された。また、この4つのSNPsは完全に連鎖し、同一のハプロタイプブロック内に存在すると考えられ、ハプロタイプ解析を最尤法にて実施したところ、G-C-G-A(SNP4-5-6-7)というハプロタイプ(健常群:34.1%、患者群:29.9%)が動脈硬化性疾患に関連することも合わせて示された($P=0.04$)。さらに上記SNP4とSNP6では冠動脈疾患発症に保護的に作用すると考えられるG/G遺伝子型を有した場合に、冠動脈の重症度も相対的に低下する傾向が認められた。

次に、今回解析した遺伝子多型が動脈硬化の危険因子自体と関連するかどうか検証するため、健常者310名に関して上述した4つのSNPsと冠危険因子との関連を調べたところ、SNP6は、BMIの25未満群はGアレルの頻度が25以上の群より高く($P=0.010$)、またSNP7ではAアレルを保有するとDMに対して保護的に作用することを示した($P=0.046$)。これは、Mrf2遺伝子のノックアウトマウスにより示された、Mrf2遺伝子と肥満の関係と合致するものである。

さらに、両群での古典的冠危険因子などの交絡因子を補正するため、ロジスティック分析を施行、Mrf-2はBMI、DMを含めた古典的な冠危険因子で補正しても冠動脈疾患との関連が認められた(SNP4:GG/CC+CG 0.004, odds ratio :2.20(95%CI : 1.29-3.77))。しかし、subanalysisでは、SNPは糖尿病や肥満との間に弱いながら関連性が認められており、DMは交絡要因である可能性が考えられたため、DM、肥満を除いた他の冠危険因子(sex, age, smoke, HL, HT)の影響を除外した場合を検討してみた。その場合でも、SNPとCADの間に強い関連も認められたSNP4:GG/CC+CG 0.007, odds ratio :2.00(95%CI : 1.21-3.29))。したがって、すくなくとも、Mrf-2のSNPはこれらの冠危険因子(sex, age, smoke, HL, HT)と独立して冠動脈疾患の発症に関与していると考えられる。

また、冠動脈群及びその対照群の中に糖尿病のない対象に関して、Mrf-2の遺伝子多型と冠動脈疾患との関連性について検討した。その場合でも、強い有意差が認められた(SNP4のCC+CG/GG : $P=0.0035$; SNP6のAA+AG/GG : $P=0.0170$)。従って、Mrf-2と冠動脈疾患との関連性に関して必ずしも糖尿病を介さない経路がある可能性が考えられる。

次に、Mrf-2の遺伝子多型と糖尿病の関連を確認するために、別集団において冠動脈疾患発症と関連のある上記4つのSNPsと糖尿病発症との関連性を検討することとした。対象は、東京大学医学部附属病院糖尿病内科における糖尿病患者500例と広島原爆障害対策協議会においてサンプリングされた健常者500例である。各SNPのアレル分布、genotype分布およびこの4つのSNPsで構成されるハプロタイプは糖尿病発症にも濃厚に関連することが明らかにされた。SNP4(G/C多型)とSNP6(G/A多型)について、冠動脈疾患と同様に、有意に糖尿病の発症

に関連性が認められ ($P=0.0238$ と $P=0.0067$)。また、同じハプロタイプに存在する SNP5 について、アレル頻度の分布は健常群に C アレル 51.5%、A アレル 48.5%、患者群に C アレル 44.7%、A アレル 55.3%、 $P=0.0024$ 、genotype は AA/AC+CC 及び AA/ AC /CC というモデルが有意に糖尿病の発症に関連性が認められた ($P=0.0014$ と $P=0.0056$)。SNP 7 について、アレル頻度は健常群に A アレル 61.7%、T アレル 38.3%、患者群に A アレル 56.4%、T アレル 43.6%、 $P=0.0170$ 、Genotype は TT vs AT+AA 及び TT/AT/AA というモデルでも糖尿病の発症と相関していることが示された ($P=0.0022$ と $P=0.0093$)。ハプロタイプ解析では、C-A-A-T と G-C-G-A(SNP4-5-6-7) という組み合わせが健常群に 32.64%と 32.61%、患者群 35.94%と 30.54%を占め、糖尿病性疾患に関連することも合わせて示された ($P=0.0031$ と $P=0.0478$)。以上から、SNP4,5,6,7 について、G-C-G-A(SNP4-5-6-7)の保有が C-A-A-T の保有より、冠動脈疾患と同様に、糖尿病の発症にも保護的な役割を持っている可能性が考えられた。

さらに、糖尿病発症に関連する液性因子について検討を加えることとした。インスリン抵抗性に関与する HOMA- β 、HOMA-IR、IRI、leptin などについて、検討したが、いずれも Mrf2 遺伝子の相関は示されなかった。しかし、アディポサイトカインのひとつであるアディポネクチンの血中濃度と SNPs の関連を調べたところ、SNP5 は AA(67 例, adiponectin 濃度: 14.341 \pm 8.910)、AC+CC (237 例, adiponectin 濃度: 16.988 \pm 9.855)より高い濃度を示し、有意差が認められた ($P=0.0464$)。アディポネクチンは抗糖尿病作用、抗肥満作用を有し、この血中濃度と糖尿病リスクは逆相関することがよく知られている。したがって、Mrf2 遺伝子の多型が、アディポネクチンの濃度を介して、糖尿病発症に寄与している可能性が考えられた。

以上の結果から、私は Mrf-2 の遺伝子変異およびそのくみあわせからなるハプロタイプが動脈硬化の発症に関与すること、また冠動脈疾患との関連性は、一部は糖尿病を介して、また一部は古典的冠危険因子とは独立した未知の要因を介して、冠動脈の発症に寄与することを本研究において示した。Mrf2 遺伝子は、平滑筋細胞分化や糖尿病など、複数の経路で動脈硬化発症に寄与している可能性があり、動脈硬化の治療においても新しいターゲットとなる可能性がある。さらに、Mrf2 遺伝子の発現が、アディポネクチンの発現を規定しているという仮説は注目に値し、今後さらなる検討を要する。

本論文の限界としては、サンプル数が相対的に少ないことが挙げられ、またかつ前向き研究でない点が挙げられる。今後、Mrf-2 の SNP が冠動脈疾患や糖尿病発症の遺伝的危険因子であるか否かについてはより大規模な集団を用いた prospective 研究での検討が必要と考えている。またこの転写因子の機能について、脂肪分化・血管平滑筋分化および脱分化との関連性について分子生物学的検討を詳細に進める必要があると考えている。