

多検体ヒトゲノム解析による閉経後女性の 心血管疾患発症リスク因子の同定と基礎的検討

東京大学大学院医学系研究科

助教 上田 和孝

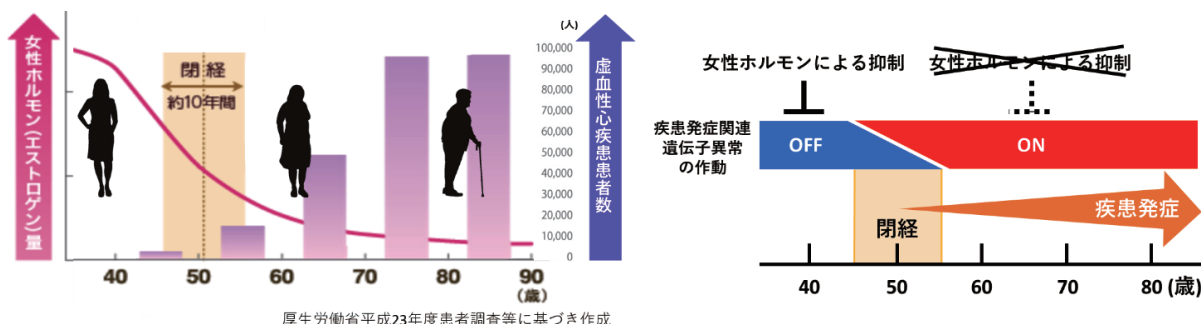
(共同研究者)

理化学研究所 チームリーダー 伊藤 薫
東京大学 大学院生 安達 裕助
東京大学 大学院生 大谷 明

はじめに

女性における心筋梗塞等の心血管疾患の年代別罹患率は中年以降急速に増加する。その背景には、閉経による女性ホルモン消退をスイッチとする、特定の遺伝的素因の発動メカニズムが存在する可能性がある。本研究は、全国最大規模の心筋梗塞患者のゲノムワイド関連解析 (GWAS) をはじめとする高度なオミックス解析と、最新の遺伝子工学技術を駆使した動物実験による病態解析により、遺伝的背景から生じる女性特有の動脈硬化発症のメカニズムを包括的に理解し、個々の女性の心血管疾患に対する新たな予防・治療ターゲットの創出を目的とする。

患者の診療に大規模臨床試験で得られたエビデンスを活用する時代となり約四半世紀が経過し、近年では、患者の遺伝子情報等から、疾患の罹患しやすさや薬剤反応性などを予測して個々に最適な医療を提供する「精密医療“precision medicine”」「個別化医療“personalized medicine”」が可能な新時代に入った。本研究は高度なオミックス解析と動物実験による病態解析を有機的に統合し、女性特有の遺伝的背景から生じる心血管疾患発症のメカニズムを包括的に理解することによって、個々の女性の心血管疾患に対する新たな予防・治療ターゲットの創出につながる基盤形成を目指している。

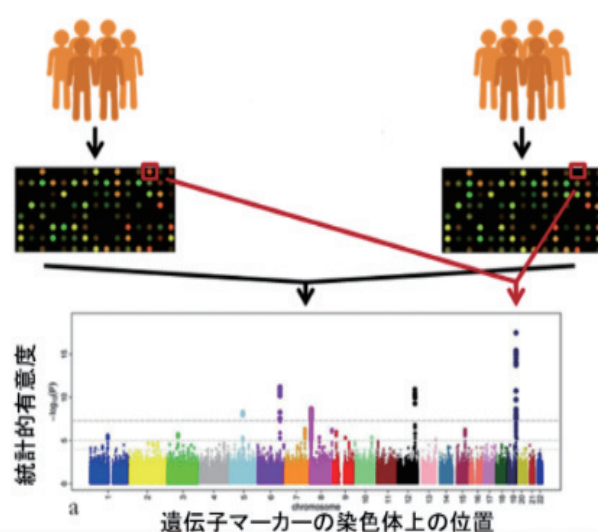


結 果

《計画1》

多検体ヒトゲノム情報を用いた閉経後心筋梗塞発症リスクに関わる遺伝子異常の同定

共同研究者である伊藤薫が在籍する理化学研究所は、バイオバンクジャパンから得られた男女合わせて約1万3千人の心筋梗塞患者と、約13万人の非心筋梗塞患者の全国最大規模のゲノム情報を保有しており、これらのゲノム情報はすでに解読済みである。現在、共同研究者である理化学研究所の伊藤薫らとともに、これらのゲノム情報を用いて各性別におけるゲノムワイド関連解析（GWAS）を行っており、本解析によって、女性の心筋梗塞発症に特徴的な遺伝子異常を探索する。

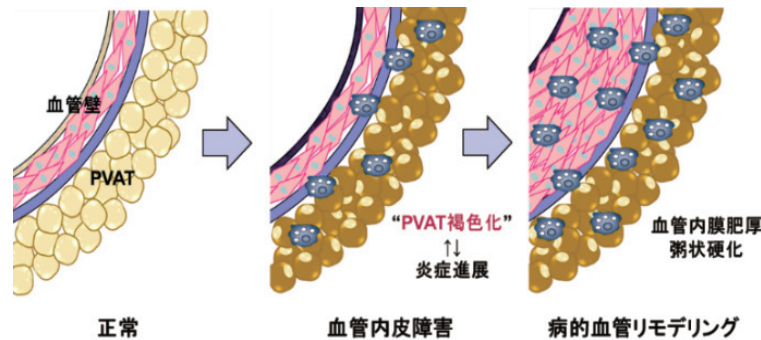


上記検討により見出した候補遺伝子の生体での役割については、CRISPR-Cas9などの遺伝子工学的手法を用いて明らかにする。申請者らは心臓、血管内皮・平滑筋、脂肪などの組織特異的に標的遺伝子をノックアウトできるマウスを所有しており、心血管疾患病態モデルとして心筋梗塞・心不全・動脈硬化・大動脈瘤などの作製技術に習熟している。作成したマウス組織サンプルを用いて生理学的・分子生物学的検討を加え、遺伝子異常がもたらす閉経後の心疾患発症リスクとそのメカニズムを明らかにし、個々の患者に最適な医療を提供する個別化医療の実現を見据えたターゲット因子の同定を目指す。

《計画2》

動脈硬化形成における血管周囲脂肪（PVAT）褐色化メカニズムの分子生物学的解明

心血管疾患発症の背景には動脈硬化が存在する。動脈周囲には血管周囲脂肪組織（perivascular adipose tissue；PVAT）とよばれる脂肪組織が存在する。申請者は、メス閉経後モデルマウスを用いて行った網羅的遺伝子プロファイリングによって、内皮傷害を受けた血管では、褐色脂肪組織に特徴的に発現する遺伝子群が顕著に増加しており、「PVAT



の褐色化」ともいえる特徴的な現象が生じていることを発見した。さらに、血管傷害後のPVATには、褐色化部位に一致してマクロファージ等の炎症細胞が著明に浸潤し、TNF α やIL-6といった炎症性サイトカインが増加していることを突き止めた。

本研究では、血管内皮傷害後の炎症と血管リモデリング反応におけるPVAT褐色化の役割、およびエストロゲンによる血管保護作用と褐色化の関係性を明らかにすることを目的に、病理学、分子生物学、遺伝子工学、バイオインフォマティクス等の様々なアプローチ法を用いて解析を行っている。

(1) PVAT初代培養系の確立と、炎症-褐色化の直接的関係性の検討

私たちは、PVAT組織からstromal vascular fraction (SVF) を抽出し、不死化遺伝子の導入を行うことで、PVAT-SVFの培養系を確立した。この細胞に脂肪分化刺激を加えると、明確な脂肪分化誘導が得られた。また、甲状腺ホルモン等による褐色脂肪刺激によりUCPIをはじめとする各種褐色脂肪マーカーの上昇が確認された。褐色脂肪分化させたPVAT-SVFの培養上清をマクロファージのcell lineであるRAW264.7細胞に加えると、炎症性サイトカインの発現が著明に抑制された。さらに、RAW264.7細胞の増殖能は通常の培地を用いた場合に比べて大きく抑制された。以上から褐色化したPVAT-SVFから分泌される何らかの因子がマクロファージの増殖を抑制していることが分かった。

(2) in vivo siRNA導入技術によるPVAT褐色化制御が動脈硬化に与える影響の検討

生体におけるPVAT局所での遺伝子発現の抑制のために、pluronic gelを用いたsiRNAの導入法を確立した。脂肪褐色化に必要な因子であるPRDM16のsiRNAをpluronic gelに混ぜたうえでマウス大腿動脈周囲に塗布し、3日後のPVAT組織を採取して解析したところ、PRDM16の発現が90%抑制されていた。本モデルを用いてワイヤーによる血管傷害を生じさせ、2週間後に評価を行った。siPRDM16を導入した群では、血管傷害後の血管内膜肥厚が増悪していた。このことから、PVATの褐色化は血管傷害後の血管リモデリングを適正化して病的反応を抑制していることが分かった。

(3) エストロゲンシグナルとPVATの関係

エストロゲンの作用を抑制するためのメスマウスの卵巣を摘出し、大腿動脈の血管傷害を加えたところ、PVATへのマクロファージの集積が著明に増加した。エストロゲンシグナルは何らかの形でPVATへのマクロファージ集積を抑制する作用を持つことが示唆された。

考 察

以上の検討から、血管周囲に存在する脂肪組織であるPVATは血管傷害後に褐色化することでマクロファージを介した炎症を適正化することで、過剰なりモデリング反応を抑制していることが示唆された。今後さらに検討を進め、女性特有の遺伝的背景から生じる心血管疾患発症のメカニズムを探索し、これまでにない「閉経後女性の心血管疾患に対する個別化医療」の実現に向けた質の高い研究成果を挙げることを目指す。

要 約

女性における心筋梗塞等の心血管疾患の年代別罹患率は中年以降急速に増加する。その背景には、閉経による女性ホルモン消退をスイッチとする、特定の遺伝的素因の発動メカニズムが存在する可能性がある。本研究は、全国最大規模の心筋梗塞患者のゲノムワイド関連解析 (GWAS) をはじめとする高度なオミックス解析と、最新の遺伝子工学技術を駆使した動物実験による病態解析により、遺伝的背景から生じる女性特有の動脈硬化発症のメカニズムを包括的に理解し、個々の女性の心血管疾患に対する新たな予防・治療ターゲットの創出を目的として開始された。

GWAS解析については、女性の心筋梗塞発症に特徴的な遺伝子異常を見出すべく、現在共同研究者である理化学研究所の伊藤薫らとともに、これらのゲノム情報を用いて解析を進めている。動物実験については、血管周囲に存在する脂肪組織であるPVATは血管傷害後に褐色化することでマクロファージを介した炎症を適正化することで、過剰なりモデリング反応を抑制しており、エストロゲンはこのPVATを舞台とする炎症制御メカニズムに関わっている可能性が示唆される結果を得た。今後さらに検討を進め、女性特有の遺伝的背景から生じる心血管疾患発症のメカニズムを明らかにしたい。

文 献

1. Fukuma N, Takimoto E, **Ueda K**, Liu P, Tajima M, Otsu Y, Kariya T, Harada M, Toko H, Koga K, Blanton RM Jr, Karas RH, Komuro I. Estrogen Receptor- α Non-Nuclear Signaling Confers Cardioprotection and Is Essential to cGMP-PDE5 Inhibition Efficacy. *JACC Basic Transl Sci.* 4;5(3):282-295. 2020
2. **Ueda K**, Toko H, Komuro I. Endothelial Cell-Derived Angiocrines Elicit Physiological Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circulation.* 28;139 (22) :2585-2587. 2019
3. Koyama S, **Ito K**, Terao C, Akiyama M, Horikoshi M, Momozawa Y, Matsunaga H, Ieki H, Ozaki K, Onouchi Y, Takahashi A, Nomura S, Morita H, Akazawa H, Kim C, Seo JS, Higasa K, Iwasaki M, Yamaji T, Sawada N, Tsugane S, Koyama T, Ikezaki H, Takashima N, Tanaka K, Arisawa K, Kuriki K, Naito M, Wakai K, Suna S, Sakata Y, Sato H, Hori M, Sakata Y, Matsuda K, Murakami Y, Aburatani

- H, Kubo M, Matsuda F, Kamatani Y, Komuro I. Population-specific and trans-ancestry genome-wide analyses identify distinct and shared genetic risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2020 in press
4. Matsunaga H, **Ito K**, Akiyama M, Takahashi A, Koyama S, Nomura S, Ieki H, Ozaki K, Onouchi Y, Sakaue S, Suna S, Ogishima S, Yamamoto M, Hozawa A, Satoh M, Sasaki M, Yamaji T, Sawada N, Iwasaki M, Tsugane S, Tanaka K, Arisawa K, Ikezaki H, Takashima N, Naito M, Wakai K, Tanaka H, Sakata Y, Morita H, Sakata Y, Matsuda K, Murakami Y, Akazawa H, Kubo M, Kamatani Y, Komuro I. Transethnic Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies Identifies Three New Loci and Characterizes Population-Specific Differences for Coronary Artery Disease. *Circ Genom Precis Med.* 13 (3) : e002670. 2020