

平成 20 年度 博士論文

心血管・腎臓疾患における
新規生理活性物質の役割の検討

東北大学大学院 薬学研究科

医療薬科学専攻 臨床薬学分野

廣瀬 卓男

目次

研究概要	1
緒言.....	7
第 1 章 AM2/IMD 及び(P)RR の遺伝疫学的解析	17
第 1 節 背景.....	17
第 2 節 目的.....	19
第 3 節 方法.....	20
第 1 項 大迫研究	20
第 2 項 身体検査・生化学検査・既往歴.....	21
第 3 項 血圧測定	23
第 4 項 高血圧性臓器障害.....	24
第 5 項 腎機能	29
第 6 項 遺伝子多型解析.....	30
第 7 項 統計解析	39
第 4 節 結果.....	41
第 1 項 AM2/IMD.....	41
第 2 項 (P)RR.....	50
第 3 項 結果の要約	73
第 5 節 考察.....	74
第 1 項 AM2/IMD.....	74
第 2 項 (P)RR.....	78
第 6 節 結論.....	85

第 2 章 心不全,腎不全,高血圧自然発症モデルにおける AM2/IMD,(P)RR, UII/URP/UT-R 系の発現変化の検討	87
第 1 節 背景.....	87
第 2 節 目的.....	88
第 3 節 方法.....	89
第 1 項 実験動物	89
第 2 項 RNA の抽出	91
第 3 項 タンパク質の抽出.....	91
第 4 項 RT-PCR	91
第 5 項 免疫組織学的検討	97
第 6 項 統計解析	100
第 4 節 結果.....	102
第 1 項 AM2/IMD.....	102
第 2 項 (P)RR.....	113
第 3 項 UII/URP/UT-R.....	124
第 4 項 結果の要約	136
第 5 節 考察.....	138
第 1 項 AM2/IMD.....	138
第 2 項 (P)RR.....	143
第 3 項 UII/URP/UT-R.....	147
第 6 節 結論.....	152
総括.....	153

Appendix Data	155
参考文献.....	201
謝辞.....	223

略語集

本文並び図表中に以下の略語を使用した。

略語	英語	日本語
(P)RR	(pro)renin receptor	(プロ)レニン受容体
18S rRNA	18S ribosomal RNA	18S リボソーム RNA
5/6NPX	5/6 nephrectomized	5/6 腎摘腎不全
95%CI	95% confidence interval	95%信頼区間
AAMI	american association of medical instrumentation	米国医療機器振興協会
ABP	ambulatory blood pressure	自由行動下血圧
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	
ACE	angiotensin I converting enzyme	アンジオテンシン I 変換酵素
AGPC	acid guanidinium thiocyanate-phenol/chloroform	
AGT	angiotensinogen	アンジオテンシノーゲン
AM	adrenomedullin	アドレノメデュリン
AM2	adrenomedullin 2	アドレノメデュリン 2
ANCOVA	analysis of covariance	共分散分析
Ang I	angiotensin I	アンジオテンシン I
Ang II	angiotensin II	アンジオテンシン II
ANOVA	analysis of variance	一元配置分散分析
ANP	atrial natriuretic peptide	心房性ナトリウム利尿ペプチド
AT1R	angiotensin II type 1 receptor	アンジオテンシン II 1 型受容体
AT2R	angiotensin II type 2 receptor	アンジオテンシン II 2 型受容体
Bif.	bifurcation	頸動脈分岐部
BMI	body mass index	ボディマス指数
BNP	brain natriuretic peptide	脳性ナトリウム利尿ペプチド
bp	base pair	塩基対
bpm	beat per minuits	
BSA	bovine serum albumin	正常ウシ血清
CBP	casual blood pressure	随時血圧

CCA	common carotid artery	総頸動脈
Ccr	creatinine clearance	クレアチニンクリアランス
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
CGRP	calcitonin gene-related peptide	カルシトニン遺伝子関連ペプチド
CHF	chronic heart failure	慢性心不全
CKD	chronic kidney disease	慢性腎臓病
CQ-PCR	competitive quantitative RT-PCR	競合的定量 RT-PCR
Cre	creatinine	クレアチニン
CRLR	calcitonin receptor-like receptor	カルシトニン受容体様受容体
CRS	competitive reference standard	競合標準物
CycA	cyclophilin-A	サイクロフィリン A
DBP	diastolic blood pressure	拡張期血圧
dbSNP	SNP database	SNP データベース
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	dNTP
DTT	dithiothreitol	ジチオトレイトール(クレーランド試薬)
ECA	external carotid artery	外頸動脈
eGFR	estimated glomerular filtration rate	推定糸球体濾過量
EIA	enzyme immunoassay	酵素免疫測定法
EM	expectation-maximization	期待値最大化
ERK1/2	extracellular regulated kinase 1/2	細胞外調節キナーゼ
ET-1	endothelin-1	エンドセリン 1
EtBr	ethidium bromide	エチジウムブロマイド
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
GFR	glomerular filtration rate	糸球体濾過量

GITC/CsCl	guanidinium isothiocyanate-cesium chloride	
GPR	G-protein coupled receptor	G タンパク質共役型受容体
GSP	gene specific primer	遺伝子特異的プライマー
h	human	ヒト
HbA1c	glycosylated hemoglobin	グルコヘモグロビン
HDL-C	high density lipoprotein-cholesterol	高比重リポタンパクコレステロール
HR	heart rate	脈拍
HRP	handle region peptide	ハンドル領域ペプチド
I/D	insertion/deletion	挿入/欠失多型
ICA	internal carotid artery	内頸動脈
IMT	intima-media thickness	内膜中膜肥厚
INF	infarcted part of LV obtained from CHF rats	CHF ラット左心室梗塞領域
intermedin	intermedin	インターメジン
IP3	inositol 1,4,5-trisphosphate	イノシトール 1,4,5-トリスリン酸
IVS	intervening sequence	介在配列
LIFE 研究	Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension 研究	LIFE 研究
LV	left ventricle	左心室
LVH	left ventricular hypertrophy	左室肥大
m	mouse	マウス
MAP	microtubule-associated protein	微小管関連タンパク質
MAPK	mitogen activated protein kinase	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
MDRD	modification of diet in renal disease	MDRD 式
MRI	magnetic resonance imaging	核磁気共鳴映像法
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸

N-I	non-infarcted part of LV obtained from CHF rats	CHF ラット左心室非梗塞領域
NCBI	national center for biotechnology information	米国立生物工学情報センター
NIH	the National Institutes of Health	米国立衛生研究所
NUP	nested universal primer A	
OR	odds ratio	オッズ比
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝化生理食塩水
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PGK	phosphoglycerokinase	ホスフォグリセロキナーゼ
PLC	phospholipase C	ホスホリパーゼ C
r	rat	ラット
RACE	the rapid amplification of cDNA ends	cDNA 末端高速増殖法
RAMP	receptor activity-modifying protein	受容体活性調節タンパク質
RAS	renin-angiotensin system	レニン-アンジオテンシン系
RFLP	restriction fragment length polymorphism	切断断片長多型
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RPL32	ribosomal protein L32	リボソームタンパク質 L32
RT	reverse transcriptase	逆転写酵素
RV	right ventricle	右心室
SBP	systolic blood pressure	収縮期血圧
SD	standard deviation	標準偏差
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SEM	standard error	標準誤差
SHR	spontaneously hypertensive rat	高血圧自然発症ラット

SHR-sp	stroke prone spontaneously hypertensive rats	脳卒中易発症高血圧自然発症ラット
SMDRD	simplified modification of diet in renal disease	MDRD 簡易式
SNP	single nucleotide polymorphism	一塩基多型
SO	sham operated	偽手術
TC	total cholesterol	総コレステロール
TCS	dye terminator cycle sequencing	
TG	triglyceride	トリグリセリド
TGF- β	transforming growth factor- β	形質転換増殖因子 β
Tr	pufferfish	フグ
UII	urotensin II	ウロテンシン II
UPM	universal primer mix A	汎用プライマー混合液 A
URP	urotensin II-related peptide	ウロテンシン II 関連ペプチド
UTR	untranslated region	非翻訳領域
UT-R	urotensin II receptor	ウロテンシン II 受容体
WKY	Wistar-Kyoto rat	ウイスター-キョウト ラット
WMH	white matter hyperintensity	白質病変
β 2-MG	β 2-microglobulin	ベータ 2-ミクログロブリン
β -act	β -actin	ベータ-アクチン
β -GN	β -glucuronidase	ベータ-グルクロニダーゼ

博士論文の基礎となる論文

本研究の研究成果は以下の公表論文として学術誌に投稿した。

Hirose T, Mori N, Totsune K, Morimoto R, Maejima T, Kawamura T, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzuki M, Takahashi K, Imai Y. Increased gene expression of (pro)renin receptor in hearts and kidneys of rats with congestive heart failure. *Am J Physiol-Heart C*. Received, Feb. 23. 2009. (Manuscript #: H-00179-2009)

Hirose T, Mori N, Totsune K, Morimoto R, Maejima T, Kawamura T, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzuki M, Takahashi K, Imai Y. Increased expression of (pro)renin receptor in the kidneys of rats with chronic renal failure. *Am J Physiol-Renal*. Received, Feb. 16. 2009. (Manuscript #: F-00091-2009)

Hirose T, Takahashi K, Mori N, Nakayama T, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzuki M, Totsune K, Imai Y. Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1. *Peptides* 2009 Feb; in press. (doi:10.1016/j.peptides.2009.02.009).

Hirose T, Hasimoto M, Totsune K, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Sugimoto K, Katsuya T, Ohkubo T, Hashimoto J, Rakugi H, Takahashi K, Imai Y. Association of (pro)renin receptor gene polymorphism with blood

pressure in Japanese men: the Ohasama study. *Am J Hypertens* 2009 Jan; Epub ahead print. (doi:10.1038/ajh.2008.357).

Mori N, **Hirose T**, Nakayama T, Ito O, Kanazawa M, Imai Y, Kohzuki M, Takahashi K, Totsune K. Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides* 2009 Feb;30(2):400-408. (doi:10.1016/j.peptides.2008.09.021)

Hirose T, Totsune K, Mori N, Morimoto R, Hashimoto M, Nakashige Y, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Sasano H, Kohzuki M, Takahashi K, Imai Y. Increased expression of adrenomedullin 2/intermedin in rat hearts with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2008 Sep;10(9):840-849. (doi:10.1016/j.ejheart.2008.06.020).

Nakayama T, **Hirose T**, Totsune K, Mori N, Maruyama Y, Maejima T, Minagawa K, Morimoto R, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Kohzuki M, Takahashi K, Imai Y. Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure. *Peptides.* 2008 May;29(5):801-808. (doi:10.1016/j.peptides.2007.12.018).

研究概要

古典的血管作動性生理活性物質として、血管収縮性に作用するアンジオテンシン II やエンドセリン 1, 血管拡張性に作用するナトリウム利尿ペプチド, アドレノメデュリンなどがある。これらの生理活性物質の内、血管収縮性のものは組織障害的に、血管拡張性のものは組織保護的に作用することが知られている。また、分子生物学的手法の発達とヒトを含めた全遺伝子配列の同定に伴い、近年、新しい生理活性物質が多数発見されている。これらの新規生理活性物質の中で、血管拡張性ペプチドホルモンであるアドレノメデュリン 2/インターメジン(AM2/IMD)は臓器保護的に作用すること、(プロ)レニン受容体((P)RR)は古典的なレニン-アンジオテンシン系とプロレニン/(プロ)レニン受容体系の両者を介して血圧調節、組織障害に関与すること、ウロテンシン II (UII)/UII 関連ペプチド(URP)/UII 受容体(UT-R)系はエンドセリン 1 よりも強力な血管収縮作用を示す系であり組織障害性に作用することが示唆されている。しかしながら、これらの新規生理活性物質は同定されてまだ間もないこともあり、その病態生理学的役割は十分に検討されていない。

そこで今回、臓器保護作用の期待される AM2/IMD 及び組織障害作用が示唆される(P)RR, UII/URP/UT-R 系に着目し、

第 1 章：遺伝疫学的解析

第 2 章：疾患モデルにおける遺伝子発現の検討
を行い、心血管・腎臓疾患との関わりを検討した。

第1章では、遺伝疫学的解析として、AM2/IMD 及び(P)RR の遺伝子多型解析を行った。

本遺伝子多型解析は大迫研究の一環として行われた。大迫研究は、1986年に開始された岩手県大迫町一般地域住民を対象とした、高血圧及び循環器疾患に関する長期前向きコホート研究である。大迫研究参加者のうち、血圧測定事業及び遺伝子解析プロジェクトに対する同意が得られた住民 1826 名より、身体的特徴、生化学検査値、降圧薬服用の有無、疾患既往歴、血圧値、遺伝子型、その他必須項目に関する情報に欠損のない住民を遺伝子多型解析の対象とした。

AM2/IMD の遺伝子多型解析は、AM2/IMD 遺伝子の翻訳領域に位置する挿入/欠失(I/D)多型(rs3840963)について心血管疾患及び腎臓障害等を主体として各種表現型との関連を検討した。AM2/IMD はタンパク質分解により AM2/IMD₁₋₄₇, AM2/IMD₈₋₄₇, AM2/IMD₁₋₅₃ の3つのペプチド断片を生じるが、AM2/IMD I/D 多型のD型では切断配列の消失により AM2/IMD₁₋₅₃ が産生されないと予想される。解析対象者は、896名であり、I/D 多型の頻度は、II型が545名(60.8%)、ID型が307名(34.3%)、DD型が44名(4.9%)であった。II型、ID型、DD型の3群に分け比較したところ、AM2/IMD I/D 多型は、自由行動下血圧と関連し、DD型所持者で血圧値が有意に高くなっていた。また、この関連は各種危険因子で補正後も残った。更に、このI/D多型は腎機能の指標である糸球体濾過量、尿タンパクとも関連し、DD型所持者で腎機能が低下していた。また、糸球体濾過量と尿タンパクから定義される慢性腎臓病についても、AM2/IMD I/D 多型は有意に関連し、DD型所持者では、慢性腎臓病を有するオッズ比が3.6倍(95%CI: 1.5-8.1, $P = 0.003$)となっていた。以上の結果より、AM2/IMD I/D 多型において、DD型所持者ではAM2/IMDの組織保護作用が弱まり、血圧が上昇しやすく、腎機能が低下しやすい可能性が示唆された。

(P)RR の遺伝子多型解析では、まず、プロモーター領域及びエクソン近傍領

域について一塩基多型を同定した。大迫一般地域住民の女性 60 名について、直接シーケンス法により塩基配列を確認したところ、(P)RR 遺伝子から 11 個の一塩基多型が同定され、この検出された 11 個の SNP から 3 個の完全な連鎖不平衡領域が推定された。この 3 個の完全な連鎖不平衡領域より -782A>G (rs2968915), IVS5+169C>T (rs5918007), +1513A>G (rs6609080)を選出し表現型との関連解析を行った。また、(P)RR 遺伝子は X 染色体上に存在するため、男女別々に表現型との関連解析を行った。関連解析の結果、性特異的な関連が認められた。男性において、IVS5+169C>T が自由行動下血圧と関連し、T アレル所持者で血圧値が高値であった。一方、女性において、+1513A>G が高血圧性臓器障害と関連した。GG 型所持者で左室肥大(AA 型 8.3%, AG 型 16.3%, GG 型 26.7%, $P = 0.02$), 脳ラクナ梗塞(AA 型 23.9%, AG 型 25.5%, GG 型 60.0%, $P = 0.02$)を有する対象が多かった。また、単変量解析により左室肥大及びラクナ梗塞と有意な関連を示した因子で補正した多重ロジスティック回帰分析において、AA 群と比較して、AG 群では左室肥大を有するオッズ比が 2.3 倍(95%CI: 1.2-4.2, $P = 0.01$), ラクナ梗塞を有するオッズ比が 1.1 倍(95%CI : 0.6-1.8, $P = 0.8$)であり、GG 群では左室肥大を有するオッズ比が 3.1 倍(95%CI: 0.7-4.2, $P = 0.1$), ラクナ梗塞を有するオッズ比が 4.4 倍(95%CI: 1.4-14.8, $P = 0.01$)であった。以上より、(P)RR の遺伝子多型は、性ホルモン等の性特異的な制御や形質と相互に影響し合い、性特異的に血圧値、高血圧性臓器障害に関与している可能性が示唆された。

本研究は、ヒトにおいて AM2/IMD 遺伝子及び(P)RR 遺伝子の遺伝子多型と血圧値や腎機能などの表現型との関連を示した最初の研究である。AM2/IMD, (P)RR は臓器障害治療の新たな標的となることが期待される。

第2章では、心不全、腎不全、高血圧の動物実験モデルを作成し、AM2/IMD、(P)RR、UII/URP/UT-Rの心臓、腎臓における遺伝子レベル・タンパク質レベルの発現変化を検討した。

疾患モデルの作製にはWKYを用い、心不全モデルは左冠動脈結紮により、腎不全モデルは右腎の2/3と全左腎を結紮することにより作製した。また、高血圧モデルとして高血圧自然発症ラットを使用し、対象としてWKYを用いた。mRNA発現の定量には競合的RT-PCR法を用い、タンパク質発現は免疫組織染色により確認した。

AM2/IMDのmRNA発現は、CHFラット心臓において上昇していた。5/6NPXラットでは、急性腎不全期(術後3日目)、慢性腎不全期(術後56日目)においてAM2/IMD mRNAの発現量は減少していたが、代償性肥大期(術後14日目)では、偽手術群と同程度まで代償されていた。また、免疫組織染色により、心筋線維、血管平滑筋、腎尿細管にAM2/IMD様免疫反応性が認められ、5/6NPXラットの尿細管は偽手術群に比べ染色性が強くなっていた。

(P)RRのmRNA発現はCHFラットの心臓、腎臓及び5/6NPXラットの慢性腎不全期の腎臓において上昇していた。一方、SHRの心房、腎臓では(P)RR mRNAの発現が減少していた。免疫組織染色により、心筋線維、血管平滑筋、血管内皮、腎尿細管に(P)RR様免疫反応性が認められ、CHFラット腎臓及び5/6NPXラット腎臓の尿細管で(P)RR様免疫反応性が強くなっていた。

UII、URP、UT-RのmRNA発現は、CHFラットの心臓においてUIIとURPの発現が上昇し、5/6NPXラットの慢性腎不全期腎臓において、UII、URP、UT-Rの発現が上昇していた。SHRでは、血圧の上昇の認められない5週齢ではSHRとWKY間でUII/URP/UT-R系のmRNA発現に差は認められなかったが、血圧上昇の認められる12週齢SHRでは心臓でUII、UT-RのmRNA発現が上昇し、腎臓でURP、UT-RのmRNA発現が上昇していた。URP様免疫反応性及びUT-R

様免疫反応性が心筋線維, 血管平滑筋, 血管内皮細胞, 腎尿細管で認められた。一方, UII 様免疫反応性は殆ど認められなかった。

以上より, AM2/IMD, (P)RR, UII/URP/UT-R 系のいずれにおいても, 心不全, 腎不全, 高血圧といった循環器系疾患に関係する病態において, その発現が変化していた。これらの新規生理活性物質が心不全, 腎不全, 高血圧という病態において何らかの病態生理学的役割を担っている可能性が示唆された。

本研究により, これら新規生理活性物質が生体内でも重要な生理学的役割を担っている可能性が高いことが明らかとなった。今後, AM2/IMD, (P)RR, UII/URP/UT-R 系の病態生理学的意義を解明していくために, より詳細な検討が必要である。本研究はさらに, これら新規生理活性物質のアゴニスト・アンタゴニストの開発は, 心血管・腎臓疾患の予防・治療に新たな戦略を創出する可能性が高いことを示した。

緒言

古典的血管作動性生理活性物質として、血管収縮性に作用するアンジオテンシン II (Ang II; angiotensin II)やエンドセリン 1 (ET-1; endothelin-1), 血管拡張性に作用するナトリウム利尿ペプチド, アドレノメデュリン(AM; adrenomedullin)などがあげられる。これらの生理活性物質の内、血管収縮性のものは組織障害的に、血管拡張性のものは組織保護的に作用することが知られている。

近年、アドレノメデュリン 2/intermedin (AM2/IMD; adrenomedullin 2/intermedin), (プロ)レニン受容体((P)RR; (pro)renin receptor), グレリンなど、新しい血管作動性生理活性物質が多く発見・同定されている。しかしながら、これらの生理活性物質は発見されてまだ間もないこともあり、その病態生理学的な役割について十分な検討はなされていない。本研究では、これらの新規生理活性物質の内、血管拡張性ペプチドの代表である AM と似た構造を持っている AM2/IMD, 血管収縮性因子の主要な系であるレニン-アンジオテンシン系(RAS; renin-angiotensin system)の新規構成因子(P)RR, ET-1 よりも強力な血管収縮作用を持ち、これまで発見されている中で最も強力な血管収縮性ペプチドと言われているウロテンシン II (UII; urotensin II)及び、その相同性ペプチドである UII 関連ペプチド(URP; urotensin II-related peptide)に着目した。これらの新規生理活性物質の病態生理学的な役割を明らかにすることを最終目的として、本研究では、遺伝子多型解析(第 1 章)と実験モデルにおける発現の検討(第 2 章)を行った。

AM2/IMD

AM2/IMD は, カルシトニン, CGRP (calcitonin gene-related peptide), アミリン, AM から構成される CGRP ファミリーに属する新規ペプチドである (Figure I) [1-4]. CGRP ファミリーのペプチドは, 中枢神経組織と同様, 様々な末梢組織に広く分布しており, 強力な血管拡張作用(CGRP, AM), 栄養吸収抑制(amylin), 骨の再吸収の抑制(calcitonin)等の様々な生理作用を示す. 最近, 2つの研究グループが, 遺伝子データベース検索により, ほぼ同時にこのファミリーに属するペプチドを発見し, それぞれインターメジン(IMD [1])及びアドレノメデュリン 2 (AM2 [2])と名付けた. そして, reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)により, AM2/IMD がマウスの様々な組

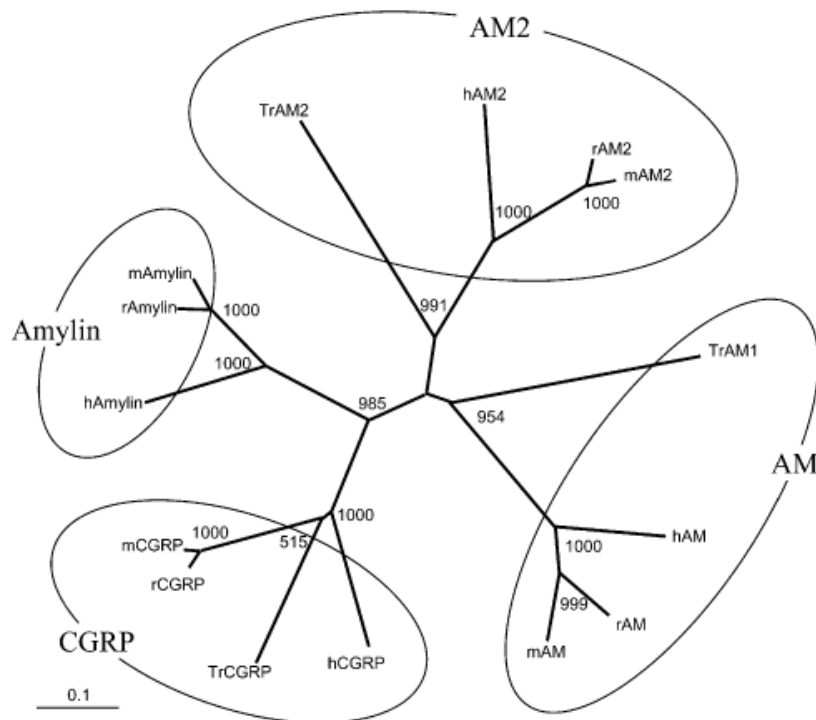


Figure I. CGRP ファミリーの系統樹. AM: アドレノメデュリン, CGRP: カルシトニン関連ペプチド, h:ヒト, r:ラット, m:マウス, Tr:フグ. (Takei et al. 2004. [3]より)

織に広範に分布していることが明らかになった[2]. また, マウス及びヒトにおける免疫組織化学的手法を用いた検討により, 心臓, 腎臓での AM2/IMD 様免疫反応の存在が報告されている[3, 5, 6].

CGRP, AM, AM2/IMD は, calcitonin receptor-like receptor (CRLR)と receptor activity-modifying proteins (RAMPs)の複合体と結合し, シグナル伝達を行う(Figure II) [1, 2, 7]. AM2/IMD は非選択的に 3 種類の CRLR/RAMP 複合体に結合する. 一方, CGRP は CRLR/RAMP1 に優先的に, AM は CRLR/RAMP2, CRLR/RAMP3 に優先的に結合する[1]. また, AM2/IMD は,

- AM と CGRP と同様に, cAMP 産生を促進し, 強力な血管拡張作用を示す [1, 2]

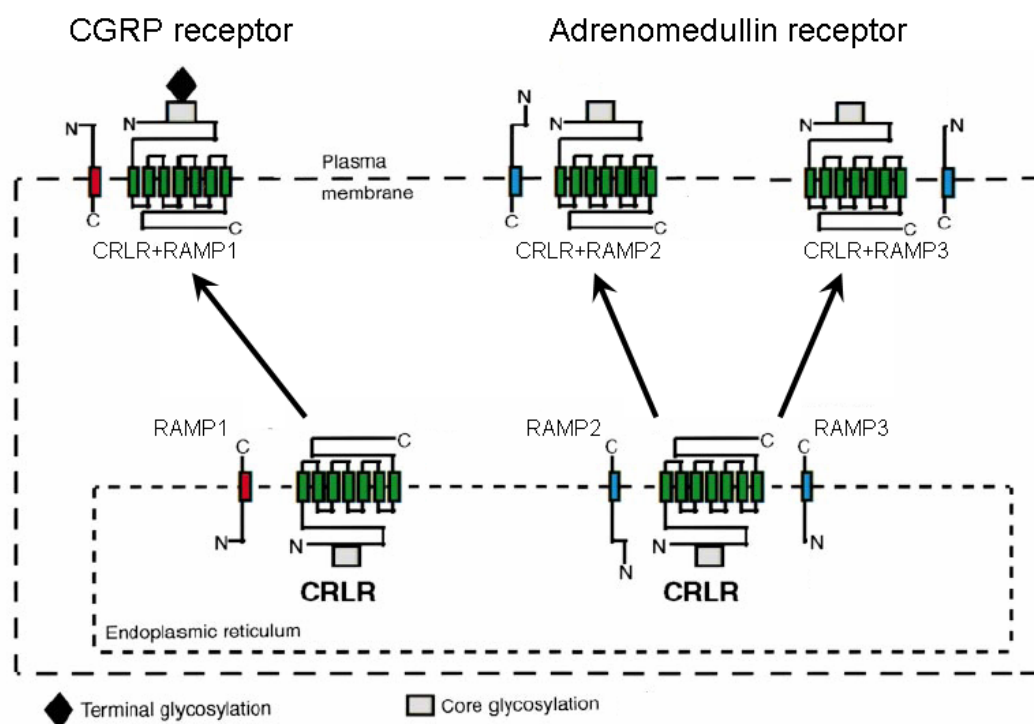


Figure II. CGRP ファミリーの受容体構成因子. CRLR と RAMP1 は CGRP 受容体を形成し, CRLR と RAMP2 及び CRLR と RAMP3 は AM 受容体を形成する. (McLatchie et al. 1998. [7]より一部改変)

- AM2/IMD の静脈内投与は、動脈圧を低下させる[1, 3, 8]
- この作用は一部 CGRP アンタゴニストや AM アンタゴニストで抑制される[1]
- AM2/IMD は肺動脈収縮を増大させたラットモデルにおいて、一酸化窒素(NO)依存性により肺動脈抵抗を減少させる[9]
- AM2/IMD の腎臓内投与は全身系の血圧を有意に低下させることなく、水利尿、ナトリウム利尿を示す[10]

ことが先行研究により報告されている。

これらの先行研究により、AM2/IMD は全身循環や血圧恒常性維持のための新規調節因子である可能性が示唆され、AM のように、心血管、腎臓疾患における病態生理に組織保護的に作用している可能性が示唆される。

(P)RR

RAS は、哺乳類において血圧調節、Na・水などの電解質バランスを調節する重要な内分泌調節機構である[11-13]。また、RAS の活性化は、成長・学習・記憶などの生理的過程や組織の成長と密接に関係している。しかし、RAS の過剰な活性化は、炎症や血管壁肥大、血管リモデリング、線維化、肥満などあらゆる疾患の進行を促進することが知られている。RAS の主な構成因子として、レニン、アンジオテンシノーゲン(AGT; angiotensinogen)、アンジオテンシン I 変換酵素(ACE; angiotensin I converting enzyme)、アンジオテンシン I (Ang I; angiotensin I)、Ang II、アンジオテンシン II 1 型受容体 (AT1R; angiotensin II type 1 receptor)、アンジオテンシン II 2 型受容体 (AT2R; angiotensin II type 2 receptor)が存在している(Figure III)。

AGT は、主に肝臓で合成され循環血中に放出され、レニンにより Ang I に変換される。Ang I は生理的に不活性であり、主に肺や腎血管内皮細胞の細胞膜上

に存在する ACE により Ang II に変換される。Ang II は、主に血管平滑筋や心、腎、副腎皮質、肝、脳等の各組織の細胞膜上に分布している AT1R と結合し、種々の生理活性を示す。Ang II は血管平滑筋の AT1R に結合し、強い血管収縮作用を示す。また、Ang II は腎尿細管に存在する Na⁺チャネルを直接的に活性化することで Na⁺の再吸収を促進する。更に、副腎皮質からのアルドステロン合成分泌を刺激することで抗利尿作用を示す。このように、循環血中における RAS は昇圧作用を示し、この経路は循環 RAS と呼ばれる。循環 RAS は古くから研究されている循環ホルモン系であり、主に血行動態の調節及び維持に関与していると考えられている。

近年、レニンまたはプロレニンに特異的に結合する受容体として(P)RR が同定され、注目を浴びている[14-18]。(P)RR は、1996年に Nguyen らによってその存在が初めて提唱され[14], 2002年にヒトの腎メサンギウム細胞からその

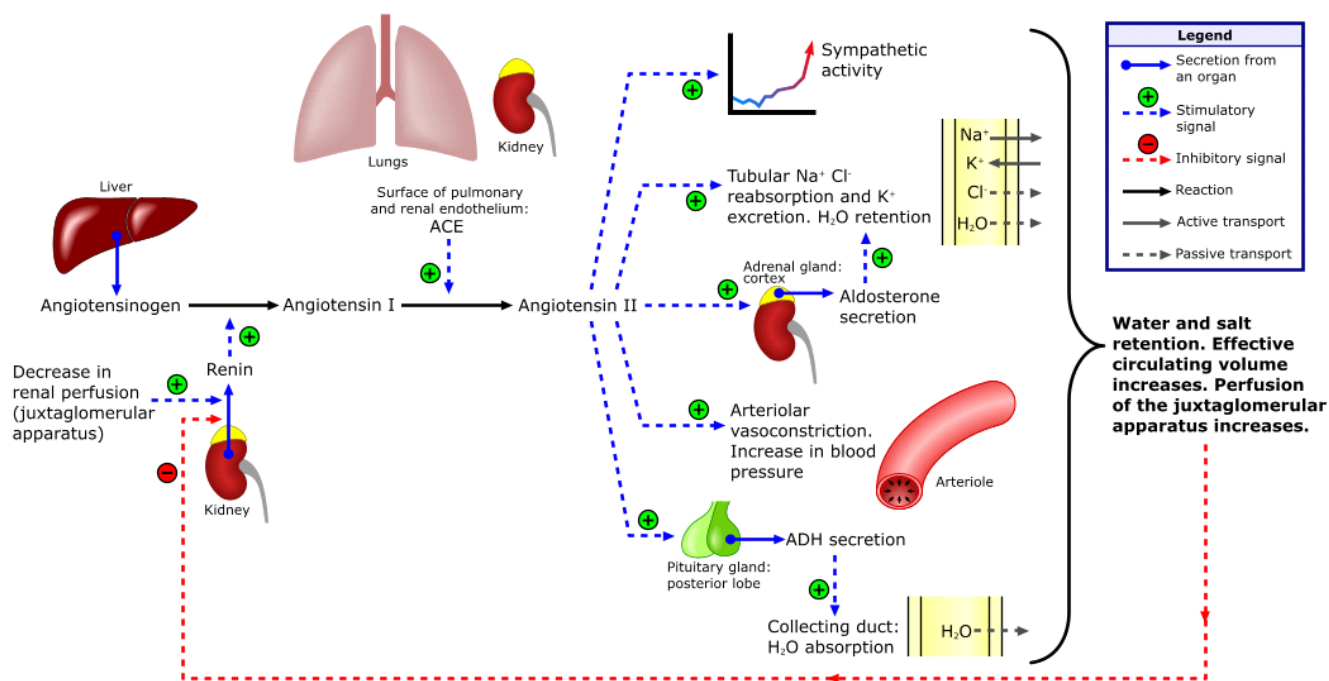


Figure III. レニン-アンジオテンシン系(RAS).

(http://en.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotensin_system より)

cDNA (complementary deoxyribonucleic acid)がとられ、クローニングされた[15]. ヒト(P)RR遺伝子は、性染色体であるX染色体p11.4に存在する。(P)RRは、350個のアミノ酸からなる一回膜貫通型の受容体である。ヒトにおいて、(P)RRのmRNA (messenger ribonucleic acid)は脳、心、肝、腎、脾及び胎盤に、タンパク質は糸球体メサンジウム細胞及び腎皮質動脈・冠状動脈の平滑筋細胞の細胞膜上に発現していることが確認されている[15]. また、(P)RRは以下に述べるような非常に興味深い作用をもつことが知られている。

- (P)RRは、プロレニンと結合しその立体構造を変化させることにより、非タンパク分解的な活性化をもたらす[15, 19]
- レニンまたはプロレニンと結合した(P)RRは、細胞内シグナル伝達系を介し、extracellular regulated kinase 1/2 (ERK1/2)を活性化することにより、細胞障害シグナルであるtransforming growth factor- β (TGF- β)を産生する[15, 20, 21]

すなわち、(P)RRはRASの活性化及びRASとは独立した細胞障害性因子の産生を行っている(Figure IV)。そして、(P)RRはその発現分布及び特異的な作用から、RASの新たな構成因子として注目されている。血管壁細胞膜上に発現している(P)RRは、循環血中に存在するプロレニンを活性化させることにより、

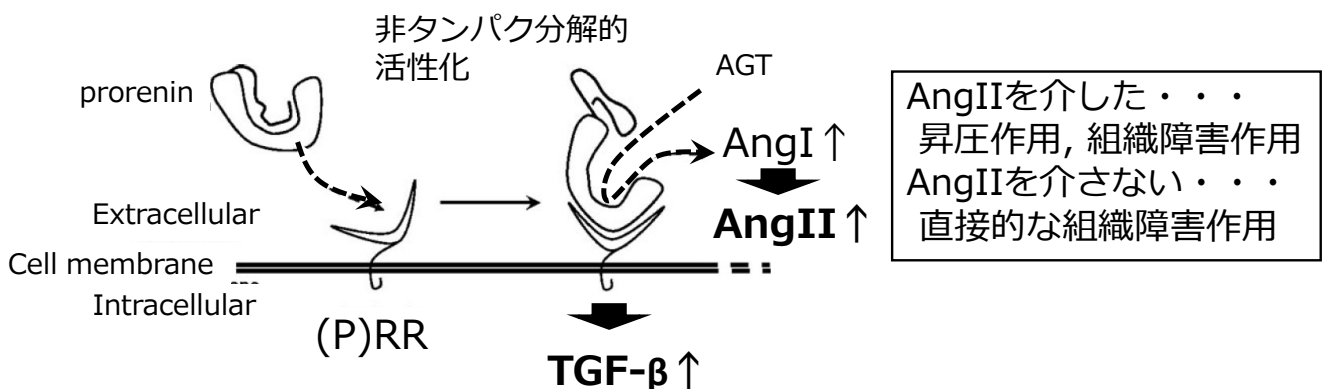


Figure IV. (P)RRによるプロレニンの活性化. (Danser et al. 2006. [16])

循環 RAS を亢進させると考えられる。また、各組織の細胞膜上に発現している (P)RR は、組織において独自に産生されるプロレニンを活性化させることにより、組織 RAS を亢進させると考えられる。このような (P)RR を介した全身的な RAS の亢進から、(P)RR は高血圧をはじめ種々の循環器病態に関与していることが示唆される。更に、(P)RR 自身の活性化が RAS とは独立した経路による組織障害作用を示し、組織 RAS の亢進と共に各組織における障害を助長していると考えられる。

これまで、モデル動物を用いた先行研究において、(P)RR と種々の循環器病態との関連の検討がなされている。ヒト(P)RR 遺伝子を過剰発現させた遺伝子組換えラットにおいて、血管平滑筋細胞の増殖、収縮期血圧及び数の上昇が確認されている[22]。また、同研究において、腎機能及び血漿レニン濃度は正常であったが、血漿アルドステロン濃度及びアルドステロン/レニン比が高値であったことも報告されている。別の遺伝子組換えラットにおける研究では、ヒトの(P)RR 遺伝子を過剰発現させたラットで糸球体硬化の進行が確認されている[23]。更に、(P)RR とレニンまたはプロレニンとの結合を阻害する物質である Handle region peptide (HRP)を用いた研究では、HRP による(P)RR の阻害が高血圧及び糖尿病等に付随する心臓及び腎臓障害の進行を抑制したことが報告されている[23-35]。ヒトにおける研究では、(P)RR 遺伝子のエクソン 4 に存在する変異(c.321C>T, p.D107D)が X 連鎖性の精神遅滞及びてんかん(XMRE)の発症に関与していることが報告されており、(P)RR は脳内において神経細胞の成長に関与している可能性が示されている[36, 37]。

UII/URP/UII receptor (UT-R)系

UII は、1967 年に Bern らによりハゼの尾部下垂体から単離された環状ペプチドである(Figure V) [38, 39]。当初、このペプチドは無脊椎動物である腹足

類から軟骨魚や硬骨魚のみに存在していると考えられていた。しかし、コイ UII cDNA がクローニングされたこと[40]により、ヒト[41]を含めた様々な脊椎動物においてクローニングされることとなった。

UII は、血管作動性ペプチドであり[41, 42]、その血管収縮作用は ET-1 に比べ、その 1/10 の濃度で同程度の作用を示し、現在同定されている血管収縮性物質中で最も強力である[43]。一方、このペプチドはラット小血管やヒト抵抗血管において、内皮由来過分極因子や一酸化窒素を介した血管拡張作用も示す[44, 45]。そして、心臓における陽性変力作用[46]、血管平滑筋増殖刺激作用[47, 48]、ラット灌流膵臓でのインスリン放出抑制[49]等も報告されている。更に、ヒトの生体における UII 濃度は、慢性腎不全患者や心不全患者[50]、透析患者[51]、

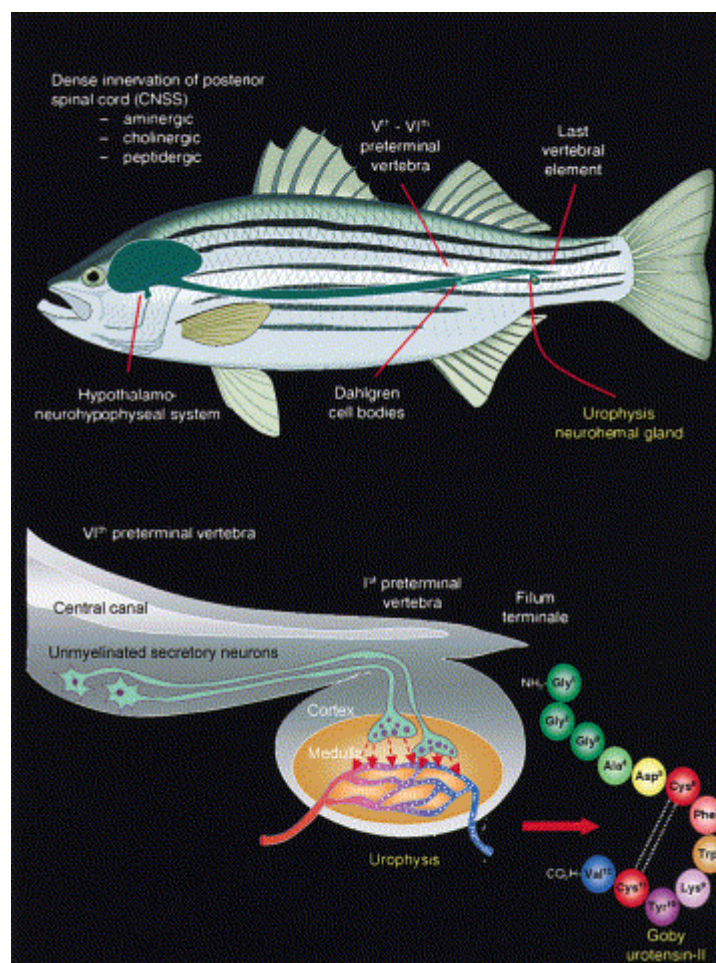


Figure V. UII 及び尾部下垂体. (Pharmatical NEWS vol. 7, 2000 より)

糖尿病患者[52]で上昇することが報告されている。また, UII はオーファンレセプターである GPR14 (G-protein coupled receptor 14), 最近では UT-R (UII receptor)と呼ばれる受容体のリガンドであることが報告されている[41]. UT-R は電位依存性 Ca^{2+} チャネル/イノシトール 1,4,5-トリスリン酸(IP₃; inositol 1,4,5-trisphosphate)/ホスホリパーゼ C (PLC; phospholipase C)系を介して細胞内 Ca^{2+} を増加させ, 血管収縮作用を示す[53, 54]. 一方, 血管拡張作用は一酸化窒素の産生を介している[44]. また UII による細胞増殖作用は IP₃, PLC, 及び Ca^{2+} チャネルが関与し, GPR/PLC/Src tyrosine kinase/mitogen activated protein kinase (MAPK)経路を介していると考えられている[48, 55-57]. UII と UT-R の mRNA は, 多種の腫瘍細胞[58, 59]や心臓, 腎臓, 血管組織を含む多くの末梢器官において発現している[41, 51]. 従って, UII は循環器系疾患において重要な役割を担っている可能性が強く示唆される。

近年, UII に類似した免疫応答性を持つペプチドホルモンとして, URP がラットの脳から単離された[60]. URP は 8 個のアミノ酸配列から構成され, C 末

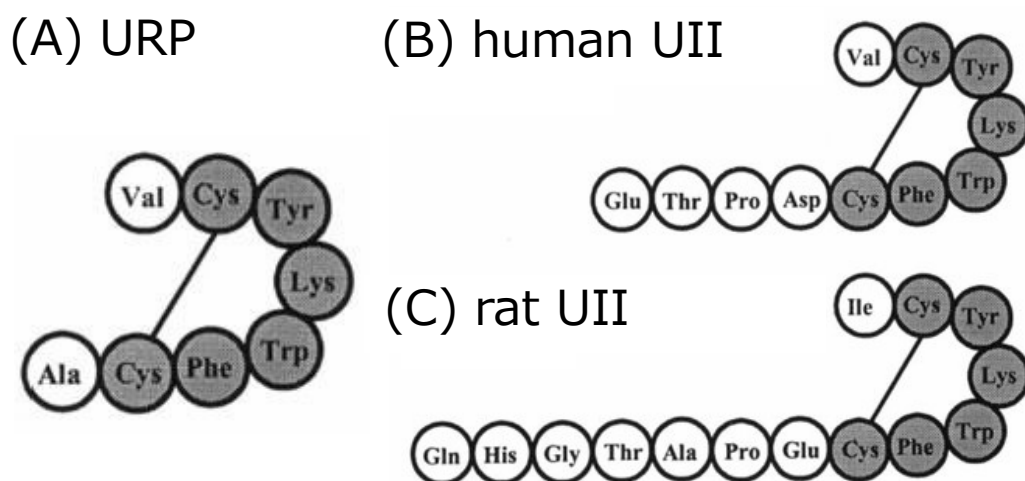


Figure VI. UII 及び URP のアミノ酸配列. (A)ヒト/ラット URP, (B)ヒト UII, (C)ラット UII. 影付きのアミノ酸(CPWKYC)が共通配列.

端の6個のアミノ酸配列がUⅡと共通しており、UⅡ同様にUT-Rに結合し、その生理作用を表す(Figure VI)。またUT-Rへの親和性はURPの方がUⅡよりも強いが、血管に対する作用はURPの方がUⅡよりも弱いと考えられている[60, 61]。

血管収縮性ペプチドの代表といえるAng IIやET-1が血管収縮作用の他に細胞増殖作用を含む多彩な生理作用を有し、心臓血管・腎臓障害の発症及び進展に関与している[11-13, 62]。Ang II受容体拮抗薬は高血圧症治療薬として、ET-1受容体拮抗薬は肺性高血圧症治療薬として臨床応用されているが、臨床の場ではAng II受容体拮抗薬は心臓・腎臓保護作用[63]を、ET-1受容体拮抗薬は心臓保護作用[64]を期待されて使用されている。したがって、Ang IIやET-1と共通する生理作用を有しているUⅡ及びURPはAng IIやET-1と同様に、循環器系疾患治療薬のターゲットとなり得ると考えられる。実際、UⅡはヒト血中に存在し、腎不全、心不全、糖尿病などの病態で血中濃度が上昇することが報告された[50, 51, 65]。しかしURPは発見されて間もないということもあり、URPの生理機能の検討やURPとUⅡ及びUT-Rとの関連の検討はまだ十分に行われているとは言い難く、これからの研究課題である。

第1章 AM2/IMD 及び(P)RR の遺伝疫学的解析

第1節 背景

高血圧は、心疾患や脳卒中等の脳心血管疾患の大きな危険因子であることがこれまで多くの研究により明らかにされている[66-68]。しかしながら、高血圧は環境因子と遺伝因子が複雑に絡み合って発症する多因子疾患であり、その原因の特定は困難である。近年、種々の研究により食事、運動、飲酒及び喫煙等の生活習慣が高血圧の発症に強く関与することが明らかになり、生活習慣の是正が高血圧治療の第一歩と考えられている[69-71]。その一方で、遺伝因子が高血圧の発症に与える影響に関しても多くの研究が成されており、遺伝的要因も高血圧の原因を考える上で重要であるといえる[72, 73]。

高血圧の原因遺伝子の探索は、ヒト全染色体の塩基配列の解読[74-76]等、近年の分子生物学の進歩を背景にして大きく前進している。1990年代に単一遺伝子の異常による遺伝性高血圧症が次々と明らかにされ、本態性高血圧症における遺伝性因子も注目されている。高血圧に関係すると考えられる候補遺伝子は数多く、また、発見された遺伝子多型が生理的变化を及ぼすとしてもその変化は軽微であり、*in vitro* あるいは動物モデルを用いた基礎研究のみで候補遺伝子を同定することは困難である。そこで、ヒトの集団の中で統計学的処理を行い、遺伝子、特に遺伝子多型が血圧値などの病態に及ぼす影響を検討する手法が高血圧研究における遺伝子解析方法の主流となっている。しかしながら、これまでは黒色人種や白色人種を対象とした研究が多く、日本人を対象とした研究は少ない。遺伝子多型の種類や頻度には人種差が存在するため、日本人におけるデータの集積が重要である。

AM ファミリーは、現在注目されている高血圧候補遺伝子の1つである。AM は、血管拡張性ペプチドホルモンであり、臓器保護的に作用することが知られている[77-80]。AM の遺伝子多型は、高血圧[81, 82]、尿タンパク[83]、腎不

全[84], 心疾患[79, 85]といった表現型との関連が報告されている。また, AM 及び AM2/IMD の受容体構成因子である CRLR の遺伝子多型も高血圧との関連が報告されている[86]。よって, AM と構造の似た, AM2/IMD も血圧調節に関与すると予想されるが, これまで, AM2/IMD の遺伝子多型と表現型との関連の報告はない。

血圧の制御において, RAS は主要な役割を担っており, RAS の過剰亢進がしばしば高血圧の原因となる。その原因の一つに遺伝子多型があり, RAS の遺伝子多型と血圧表現型との関連が広く検討されている。中でも, AGT M235T, ACE I/D, AT1R 1166A/C, AT2R 1675A/G 及びアルドステロン合成酵素遺伝子である CYP11B2 における -344C/T は特に注目されている遺伝子多型であり, 高血圧や臓器障害, 降圧薬に対する耐性等と関連していることがこれまでに報告されている[73, 87-91]。本研究者が所属する研究室においても, これら RAS の遺伝子多型と種々の循環器疾患との関連を検討し, その結果を報告している[92-98]。また, (P)RR はプロレニンの活性化を介した RAS の活性化を担い, 先行研究において血圧調節への関与が示唆されている[22]。更に, ゲノムワイド関連解析により, (P)RR 遺伝子が含まれる染色体 Xp11 領域に拡張期血圧との連鎖が認められている(maximum likelihood score 2.41) [99]。従って, (P)RR 遺伝子は高血圧に関する有力な候補遺伝子と予想されるが, (P)RR 遺伝子の遺伝子多型と高血圧の関連を検討した報告は未だない。

第2節 目的

AM2/IMD

AM2/IMD の遺伝子多型と血圧値，臓器障害，特に腎機能との関連を検討する。

(P)RR

(P)RR の遺伝子多型と血圧値及び高血圧性臓器障害との関連を検討する。

- (P)RR における遺伝子多型の検出
- (P)RR の遺伝子多型と血圧値及び高血圧性臓器障害との関連検討

以上を本章の目的とし，AM2/IMD と(P)RR の遺伝子多型解析を行った。

第3節 方法

第1項 大迫研究

本研究は、大迫研究の一環として行われた。大迫研究は、1986年に開始された岩手県稗貫郡大迫町(現・岩手県花巻市大迫町)の一般地域住民を対象とした、高血圧及び循環器疾患に関する長期前向きコホート研究である[100-102]。大迫町は盛岡市の南東 30 km、仙台市の北 130 km に位置する北上山地に囲まれた農村であり、行政的に内川目、外川目、亀ヶ森、大迫の 4 地区に分かれている(Figure 1-1)。青壮年層の多くは盛岡市内あるいは同町内の企業に勤務しながら果樹栽培を営む兼業農家に属している。2004年における人口は 6871 人である。

大迫研究の一環として、血圧測定事業及び MRI 検診が行われている。血圧測定事業は大迫研究開始時から行われており、40 歳以上の住民を対象に自由行動下血圧(ABP; ambulatory blood pressure)の測定を実施している[66, 93, 100, 101, 103-107]。一方、MRI 検診は 1992 年から開始され、55 歳以上の住民を対象に頭部核磁気共鳴映像法(MRI; magnetic resonance imaging)、頸動脈超

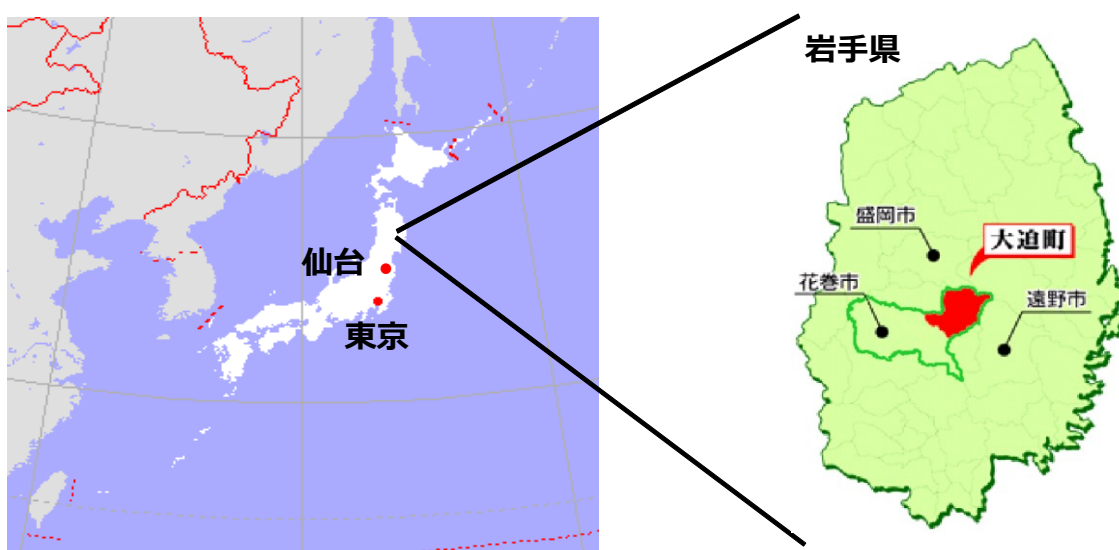


Figure 1-1. 岩手県花巻市大迫町の位置.

音波検査を含む高血圧性臓器障害及び脳心血管疾患の危険因子に関する調査を実施している[108-110].

本研究では, 血圧測定事業及び MRI 検診時に得られたデータを使用しており, 血圧測定事業におけるデータは 1988 年から 2003 年までのものを使用し, MRI 検診におけるデータは 1992 年から 2004 年までのものを使用した.

本研究は, 東北大学大学院医学系研究科倫理委員会及び岩手県花巻市大迫町保健課により承認されたプロトコルに基づき行われた. 全ての対象者に血圧測定事業及び遺伝子解析プロジェクトに関して十分な説明を行い, 書面による同意を得た上で実施された.

第 2 項 身体検査・生化学検査・既往歴

身体検査

検診の際に体重及び身長を測定した. また, 体重及び身長より定義される body mass index (BMI)は以下の式を用いて算出した.

$$\text{BMI} = (\text{体重}) / (\text{身長})^2 \text{ (kg/m}^2\text{)}$$

生化学検査

検診の際に対象者から採取した末梢血より, 全自動測定装置を使用して測定した. 総コレステロール(TC; total cholesterol), 随時トリグリセリド(TG; triglyceride), 高比重リポタンパクコレステロール(HDL-C; high density lipoprotein-cholesterol), 血清ナトリウム濃度(Na), 血清カリウム濃度(K), 血清クレアチニン濃度(Cre; creatinine), 血糖, ヘモグロビン A1c (HbA_{1c}; glycosylated hemoglobin)等を測定した.

血清クレアチニン濃度は, 2001 年 7 月までは Jaffe 法を用いて測定し, 2001 年 7 月以降は酵素法を用いて測定した. 血清クレアチニン値が 2.0 mg/dL 未満

であるとき、Jaffe 法で測定された血清クレアチニン濃度は、酵素法と比べ約 0.2 mg/dL 高値であることが示されている[111]。従って、酵素法による測定値には 0.2 mg/dL を加算して Jaffe 法による値に変換した。

喫煙、飲酒習慣、高血圧・高脂血症・糖尿病治療の有無、また、高脂血症・糖尿病・脳心血管疾患の既往歴に関するデータは、検診の際に行われた問診による聞き取り調査及び大迫病院診療録より得られた。

高脂血症

高脂血症の既往は、日本動脈硬化学会「動脈硬化性疾患診療ガイドライン 2002 年版」[112]に基づき、検診時の採血データにおいて総コレステロール 220 mg/dL 以上の者、検診時の問診で高脂血症薬服用を自己申告した者、検診時の問診で高脂血症の既往を自己申告した者、または大迫病院診療録において高脂血症既往歴の記載があった者と定義した。

糖尿病

糖尿病の既往は、日本糖尿病学会「科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン」[113]に基づき、検診時の採血データにおいて随時血糖値 200 mg/dL 以上または HbA_{1c} 6.5%以上の者、検診時の問診で糖尿病治療を自己申告した者、検診時の問診で糖尿病の既往を自己申告した者、または大迫病院診療録において糖尿病既往の記載があった者と定義した。

脳心血管疾患

脳心血管疾患既往者は、検診時の問診で心房細動既往、心疾患既往、または脳心血管疾患既往を自己申告した者、検診時の心電図検査において心房細動が認められた者、または大迫病院診療録において脳心血管疾患既往歴の記載があ

った者とした。

第3項 血圧測定

自由行動下血圧(ABP)

ABP は、平日(月から金曜日)の午前中に保健師が各対象者宅を訪問し血圧計の装着を行った。翌日の同時刻に再び保健師が各対象者宅を訪問し、脱着及び血圧計の回収を行った。測定装置は、カフ-オシロメトリック方式の自動血圧計 ABPM630 (Nippon Colin, Komaki, Japan)を使用した[66, 93, 100, 101, 103-107]。対象者は起床・就寝時刻を含む血圧測定中の行動記録を付け、この行動記録に基づき覚醒時間及び睡眠時間を定めた。覚醒時間における ABP の平均を昼間 ABP (昼間 ABP)、睡眠時間における ABP の平均を夜間 ABP (夜間 ABP) 及び 24 時間全体における ABP の平均を 24 時間 ABP (24-h ABP)と定義した。収縮期血圧及び拡張期血圧それぞれについて 24h ABP, 昼間 ABP 及び夜間 ABP を算出し、解析に使用した。昼間測定回数 12 回未満及び夜間測定回数 6 回未満の者は解析対象から除外した。

随時血圧(CBP)

随時血圧(CBP; casual blood pressure)は、検診の際に座位で少なくとも 2 分間の安静の後に繰り返し 2 回測定し、この 2 回の測定の平均値とした。測定装置は、1992 年から 1996 年までの間は水銀血圧計を用い、1997 年から 2002 年 9 月までの間はカフ-オシロメトリック方式の半自動血圧測定機器 USM700F (UEDA Electronic Works, Tokyo, Japan)を用い、2002 年 10 月以降はカフ-オシロメトリック方式の半自動血圧計 HEM907 (Omron Healthcare, Kyoto, Japan) [114]を用いた。

高血圧

高血圧は、日本高血圧学会「高血圧治療ガイドライン 2004」[69]に従い、24-h ABP と降圧薬服用の有無で定義した。24-h ABP の収縮期血圧 135 mmHg 以上の者または拡張期血圧 80 mmHg 以上の者または降圧薬服用者を高血圧者とした。

第4項 高血圧性臓器障害

左室肥大(LVH)

左室肥大(LVH; left ventricular hypertrophy)は標準十二誘導心電図から定義した。標準十二誘導心電図測定は、パーティーションに囲まれた静かな空間で仰臥位になり熟練した保健師が測定した。R波の aVL 誘導(RaVL), V5 誘導(RV5), 及びV6 誘導(RV6)とS波のV1 誘導(SV1)及びV3 誘導(SV3)が0.5 mm (0.05 mV)の目盛りまで計測された。得られた心電図から QRS 幅, SV1, SV3, RV5/6 (RV5 と RV6 のうち大きい方), 及び RaVL の電位を算出した。QRS 幅, SV1 及び RV5/6 は心電計の自動計測にから求め, SV3 及び RaVL は熟練した研究者が計測した。

LVH は、Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension (LIFE)研究の基準[115]に従い、Sokolow-Lyon voltage criteria [116]及び Cornell voltage duration product criteria [117-119]の2種の基準(下式)の内、両方またはいずれか一方を満たす場合と定義した。

Sokolow-Lyon voltage criteria

$$SV1 + RV5/6 > 3.5 \text{ (mV)}$$

Cornell voltage duration product criteria

$$\text{男性 : } (SV3 + RaVL) \times QRS > 244 \text{ (mV} \cdot \text{msec)}$$

$$\text{女性 : } (SV3 + RaVL + 0.6) \times QRS > 244 \text{ (mV} \cdot \text{msec)}$$

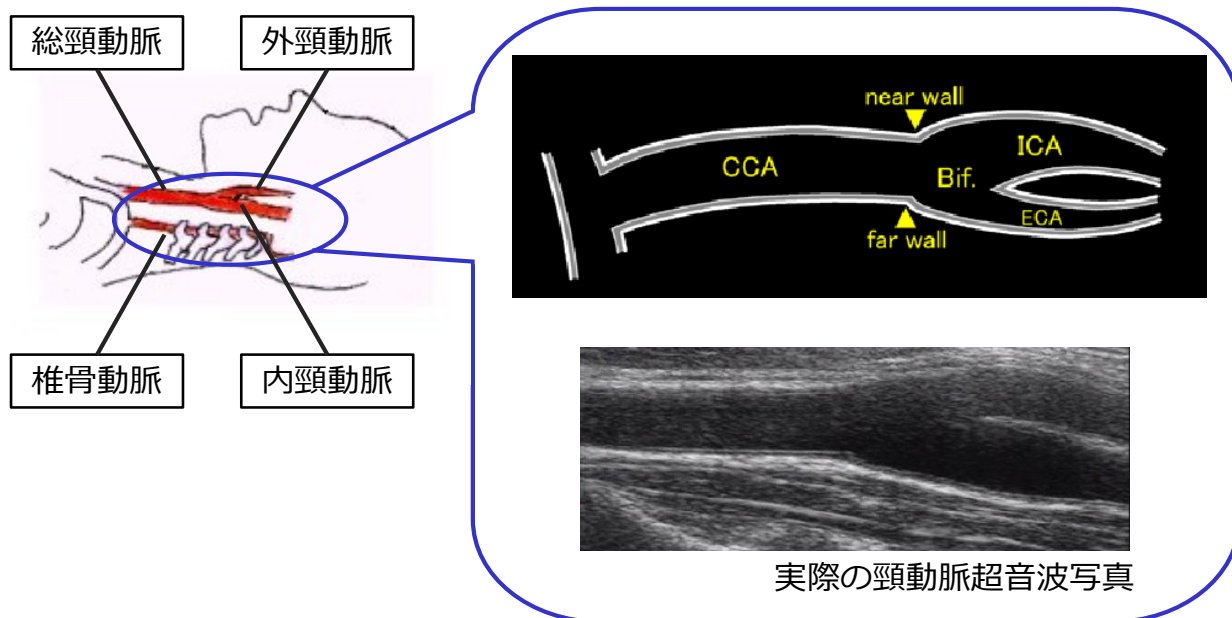
内膜中膜壁厚(IMT)・プラーク

内膜中膜壁厚(IMT; intima-media thickness)及びプラークは、頸動脈超音波検査から定義した。頸動脈超音波検査は、6名の熟練した医師により標準化された方法に基づいて行われた。超音波断層装置 Toshiba Sonolayer SSA-250A (Toshiba Corp., Tokyo, Japan)及び7.5 MHz アニュラアレイ型 Bモード超音波プローブ(エコー距離分解能 0.25 mm)を用い、座位で頸部頸動脈を測定した(Figure 1-2(A))。IMT はプラークによる肥厚を除外した各領域での最大の内膜中膜複合体の厚さと定義し、プラークは変曲点を持つ限局性隆起病変と定義した(Figure 1-2(B)) [120]。IMT の測定は、左右の総頸動脈における近位壁及び遠位壁を各々3方向(前斜位, 側方位, 後斜位)から観察し、各壁において頸動脈分岐部からおよそ1 cm 心臓側での最大IMTを検出した。本研究では、先行研究に準じて左右の総頸動脈の近位壁及び遠位壁の計4点における最大IMTの平均(mean IMT)を算出し、解析対象とした[121]。なお、上記4点における測定値に欠損がある場合は、残りの測定点における測定値のみを用いて平均値を算出した。プラークは、左右の総頸動脈、分岐部、内頸動脈及び外頸動脈各々の近位壁及び遠位壁の計16点で観察され、左右頸動脈全体での有無に関して解析を行った。

無症候性脳血管障害

無症候性脳血管障害として、MRI 撮影画像よりラクナ梗塞と脳白質病変(WMH; white matter hyperintensity)を定義した。MRI撮影は0.5 Tのスピーンエコー法により、T1強調水平断面画像、T2強調水平断面画像を10 mm厚スライスで撮影した[122]。脳実質、脳室の大きさについて最も安定した評価が可能であったモンロー孔を通る大脳基底核レベルのスライス及びそれより1スライス頭頂側にある側脳室体部を通るスライスの合計2スライスを使用した

(A)



(B)

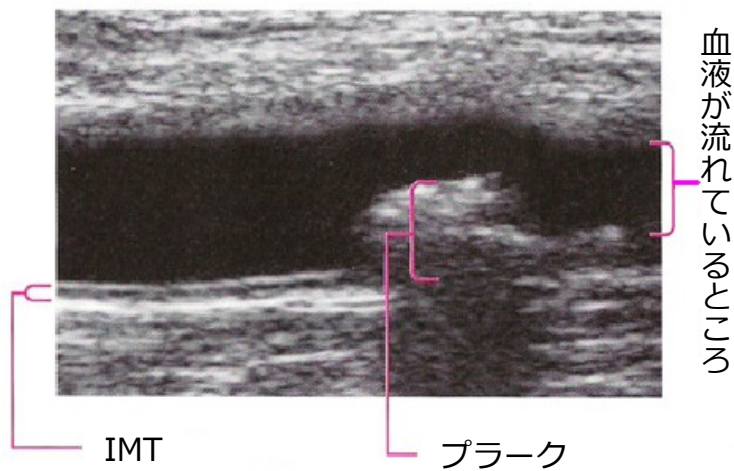
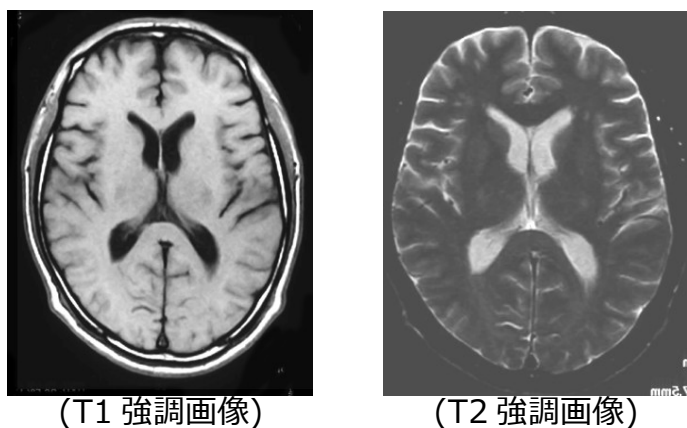


Figure 1-2. 頸動脈超音波検査. (A) 頸部頸動脈(写真：早期動脈硬化研究会ホームページ <http://www.imt-ca.com/>より引用). (B) IMT 及びプラーク(写真：おばな内科クリニックホームページ <http://homepage3.nifty.com/obanamo/>より引用). CCA, 総頸動脈; Bif., 分岐部; ICA, 内頸動脈; ECA, 外頸動脈, near wall, 近位壁; far wall, 遠位壁; IMT, 内膜中膜壁厚.

(Figure 1-3). ラクナ梗塞は T1 強調画像で低信号域, かつ T2 強調画像で高信号域を示す, 直径 3 mm 以上 15 mm 以下の病変と定義し, その有無について解析を行った(Figure 1-4(A)). WMH は T2 強調画像でのみ認められる高信号域と定義し, Fazekas の分類に基づき Grade 0, Grade 1, Grade 2 及び Grade 3 の 4 群に分類した(Figure 1-4(B)) [123]. 本研究では, その有無(Grade 0 vs. Grade 1-3)について解析を行った.

ラクナ梗塞及び WMH は, 対象者の臨床情報が匿名化された状態で脳外科専門医 1 名及び同医の下でトレーニングを受けた研究者 4 名により評価された. 評価が一致しなかったものに関しては, 再度協議の上, 最終評価を行った.

(A) モンロー孔を通る大脳基底核のスライス



(B) (A)より 1 スライス頭頂側にある側脳室体部を通るスライス

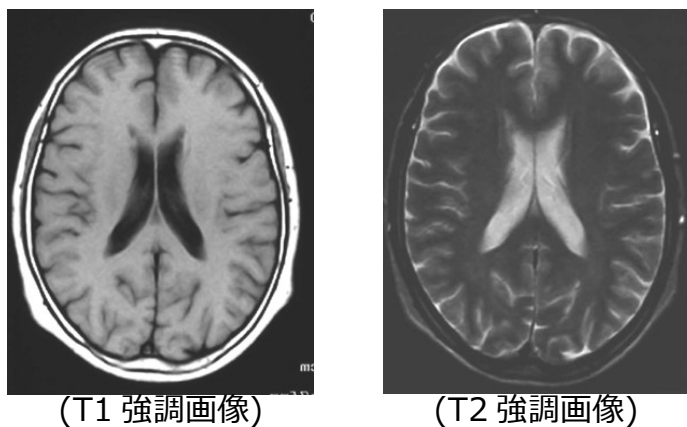
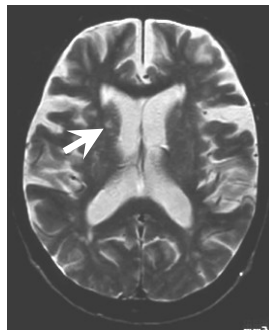


Figure 1-3. 使用した MRI スライス(代表例).

(A) ラクナ梗塞



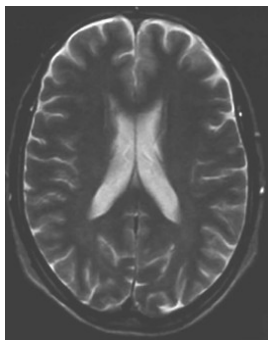
(T1 強調画像)



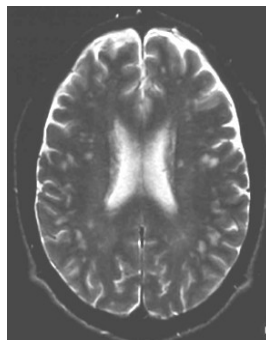
(T2 強調画像)

定義：T1 強調画像で低信号域，T2 強調画像で高信号域を示す直径 3mm 以上 15mm 以下の病変 (矢印の部位).

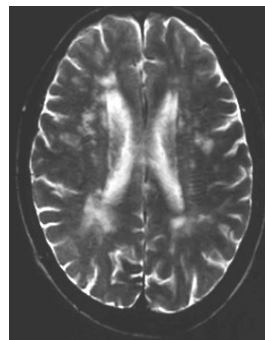
(B) 脳白質病変(WMH)



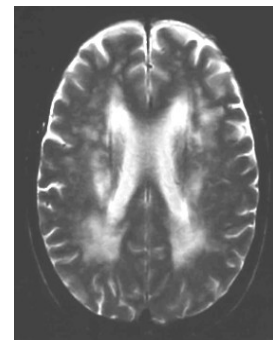
Grade 0



Grade 1



Grade 2



Grade 3

定義：T2 強調画像でのみ認められる高信号域(Grade 1-3).

Grade 0：病変を認めないもの.

Grade 1：孤立性点状病変を認めるもの.

Grade 2：早期融合病変を認めるもの.

Grade 3：融合病変を認めるもの.

(Fazekas の分類[123])

Figure 1-4. 無症候性脳血管障害.

第5項 腎機能

糸球体濾過量(GFR)

糸球体濾過量(GFR; glomerular filtration rate)の測定のゴールドスタンダードはイヌリンクリアランスである。しかしイヌリンクリアランスの測定は煩雑なため、臨床的には GFR 推定値(estimated GFR; eGFR)が用いられている。eGFR は、血清クレアチニン値から MDRD 簡易式(simplified modification of diet in renal disease; SMDRD 式)を用いて算出した[124, 125].

$$\begin{aligned} \text{男性 : eGFR}_{\text{SMDRD}} (\text{mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2) \\ &= 186.3 \times \text{Cre}^{-1.154} \times \text{年齢}^{-0.203} \\ \text{女性 : eGFR}_{\text{SMDRD}} (\text{mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2) \\ &= 186.3 \times \text{Cre}^{-1.154} \times \text{年齢}^{-0.203} \times 0.742 \end{aligned}$$

クレアチンクリアランス(Ccr)

クレアチンクリアランス(Ccr; creatinine clearance)は、血清クレアチニン値から、体表面積(DuBois 式[126])で補正した Cockcroft-Gault 式を用いて算出した[127, 128].

$$\begin{aligned} \text{Ccr} (\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2) &= \text{CCr}' \times 1.73 / (\text{体表面積}) \\ \text{男性 : Ccr}' (\text{mL}/\text{min}) \\ &= [(140 - \text{年齢}) \times \text{体重}] / (72 \times \text{Cr}) \\ \text{女性 : Ccr}' (\text{mL}/\text{min}) \\ &= \{[(140 - \text{年齢}) \times \text{体重}] / (72 \times \text{Cr})\} \times 0.85 \\ (\text{体表面積}) (\text{m}^2) &= (\text{体重})^{0.425} \times (\text{身長})^{0.725} \times 0.007184 \end{aligned}$$

Table 1-1. CKD の定義(日本腎臓学会[129])

1. 尿異常, 画像診断, 血液, 病理で腎障害の存在が明らか
—特に尿タンパクの存在が重要—
2. GFR <60 mL/min/1.73 m²
1., 2.のいずれか, または両方が 3 か月以上持続する

慢性腎臓病(CKD)

慢性腎臓病(CKD; chronic kidney disease)は, 日本腎臓学会「CKD 診療ガイド」(Table 1-1) [129]に基づき, GFR 60 mL/min/1.73m² 未満または尿タンパク陽性とした。

第6項 遺伝子多型解析

DNA 検体

大迫研究参加者で遺伝子解析に対する同意が得られた住民 1826 名の末梢白血球よりゲノム DNA を抽出した。抽出した各 DNA 検体を 10 ng/μL に調整し, 遺伝子多型解析に用いた。また, 解析結果にバイアスが掛かるのを防ぐため, 研究者には DNA 検体の起源は伏せられている。

AM2/IMD

National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)の single nucleotide polymorphism database (dbSNP)には, プロモーター領域及び非翻訳領域を含む AM2/IMD 遺伝子領域(22q13.33, 10.0 kbp)に 20 個以上の SNP が登録されていた。これらの SNP の内, AM2/IMD の翻訳領域に存在する rs3840963 挿入(insertion)・欠失(deletion)多型 (AM2/IMD I/D 多型)を, AM2/IMD 遺伝子多型解析の対象とした。AM2/IMD

I/D 多型は, 18 base pair (bp)の I/D 多型であり, 成熟ペプチドの 5'側近傍に位置している(Figure 1-5).

dbSNP には AM2/IMD I/D 多型の頻度の記載がないため, まず, 直接シーケンス法により AM2/IMD I/D 多型の存在を確認し, その後, PCR-polyacrylamide gel electrophoresis (PCR-PAGE)法を用いて全対象の遺伝子型を決定した.

1. AM2/IMD I/D 多型の確認

直接シーケンス法により AM2/IMD I/D 多型を確認した. まず, PCR により対象領域を増幅した. 使用した primer を Table 1-2(A)に示す. PCR 反応溶液は, 10 ng 鋳型ゲノム DNA, 5x Colorless GoTaq Reaction buffer, deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) Mix, forward/reverse primer, GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), 滅菌水で総量 20 μ L と

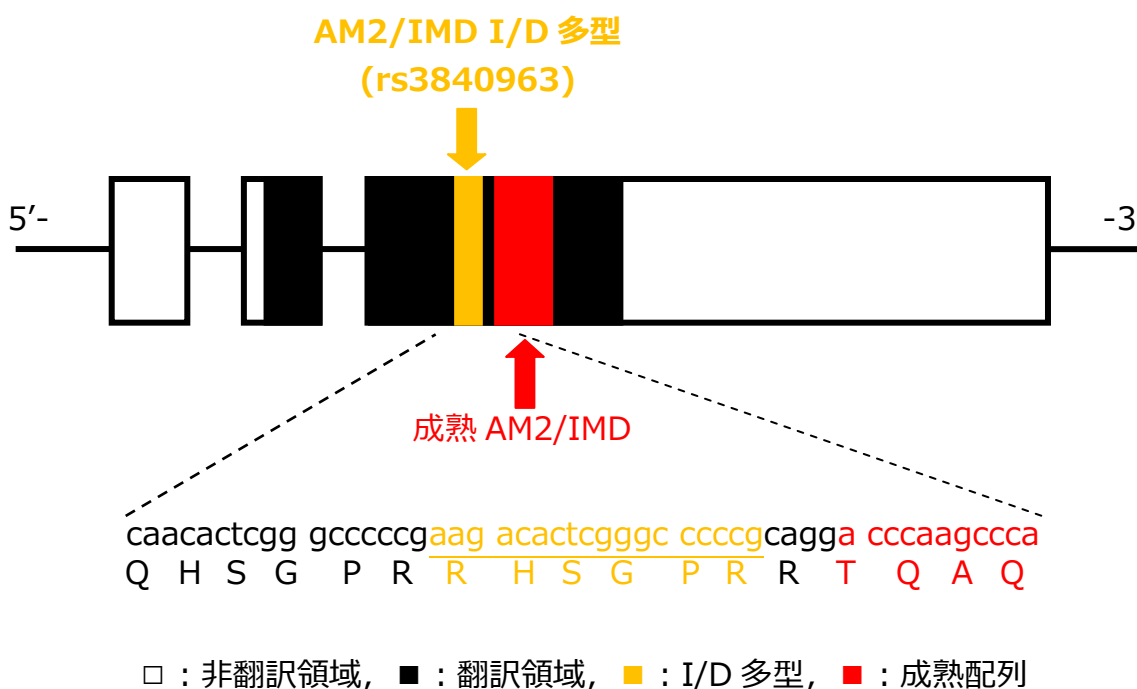


Figure 1-5. ヒト AM2/IMD 遺伝子(22q13.33, 10.0 kbp).

Table 1-2. AM2/IMD の遺伝子多型解析で使した primer 配列.

Primer type	Sequence (5'-3')	PCR 産物*
(A) 直接シーケンス		
Forward	GGCCTGGCCCCTGTTATG	614 bp
Reverse	GGAGGGGCCACTTCTGGCCAGTT	596 bp
(B) PCR-PAGE		
Forward	GGTGGCCGCCAACACTCG	120 bp
Reverse	CAGGCGGTGGCTGAGATTCTG	102 bp

* PCR 産物は、上段が AM2/IMD I 型の bp、下段が AM2/IMD D 型の bp を示している。

した(Table 1-3). PCR は、hot start で反応を開始し、94°C で 2 分間熱処理した後、94°C・15 秒 - 66°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 30 cycles を行い、72°C で 5 分間熱処理して反応を終了した。得られた PCR 産物を spin column (PCR purification kit; BIONEX, Seoul, Korea)で精製した。

精製した PCR 産物をテンプレートとして、Dye Terminator Cycle Sequencing (TCS)反応(BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit; Applied Biosystems, Foster, CA)を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol に従った(反応溶液 20 µL: Table 1-4. 反応条件: 96°C・1 分, 96°C・10 秒 - 50°C・5 秒 - 72°C・4 分 x 25 cycles)。

TCS 反応産物は、エタノール/EDTA/NaOAc 沈殿法により精製した。TCS 産物に 125 mM EDTA 2 µL 及び 3 M 酢酸ナトリウム 2 µL を加え軽く攪拌した後、95%エタノール 50 µL を加えた。氷上に 10 分間静置し、13000 rpm で 20 分間遠心した。上清を除いた後、75%エタノール 400 µL を加え軽く攪拌し、更に 13000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。その後、上清を除き、風乾した。

Table 1-3. AM2/IMD 遺伝子多型解析で使用した PCR 反応溶液.

10 ng/μL 鋳型ゲノム DNA	1.0 μL
5x Colorless GoTaq Reaction Buffer	4.0 μL
10 mM dNTPs Mix	0.4 μL
10 μM forward primer	0.5 μL
10 μM reverse primer	0.5 μL
滅菌水	15.5 μL
10 U/μL GoTaq DNA polymerase	0.1 μL
総量	20.0 μL

Table 1-4. TCS 反応溶液.

5'-/3'-RACE PCR 産物(テンプレート)	8.0 μL
2.5x Ready Reaction Premix	2.0 μL
5x BigDye Sequencing Buffer	3.0 μL
3.2 pmol primer	1.0 μL
滅菌水	適量
総量	20.0 μL

精製・風乾後, TCS 産物を Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Foster, CA) 15 μL に溶解し, 96°C で 2 分間加熱処理を行い, 氷中で 5 分間冷却し, シークエンス用測定サンプルとした. この測定サンプルを Autosequencer (ABI PRISM 3100; Applied Biosystems, Foster, CA) で測定し, それぞれの PCR 産物の配列を確認した.

2. AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型の決定

PCR-PAGE 法により AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型の決定した. Table 1-2(B) に示した primer, Table 1-3 に示した反応溶液を使用し, PCR により対象領域

を増幅した。PCR は, hot start で反応を開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 65°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 32 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して反応を終了した。

PAGE には 7.5%ポリアクリルアミドゲルを使用した。PCR 産物を 100 V で 60 分間電気泳動し, Ethidium Bromide (EtBr)で染色した後, 蛍光検出器 (FluorChem; Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA)で目的配列の増幅を確認した。AM2/IMD II 型では 120 bp に 1 本のシグナルが観察され, DD 型では 102 bp に 1 本のシグナルが観察され, ID 型では 120 bp と 102 bp に 2 本のシグナルが観察される。

(P)RR

NCBI dbSNP には, プロモーター領域及び非翻訳領域を含めた(P)RR 遺伝子領域(Xp11.4, 24.7 kbp)に 70 個以上の SNP が登録されていた(Figure 1-6)。この内, 翻訳領域に存在するものは 7 個あり, 特にアミノ酸置換を伴う SNP は F30L, P43A, P90A, A290P と 4 個登録されていたが, 日本人の頻度に関する記載はなかった。よって, まず, 少数の対象で(P)RR における遺伝子多型の検出を行い, その後, 検出された多型について全対象で遺伝子型を決定した。

1. (P)RR 遺伝子多型の検出

大迫研究参加者で遺伝子解析に対する同意が得られた住民 1826 名より, 女性 60 名を無作為に抽出し対象とした。(P)RR 遺伝子が X 染色体に存在するため, 遺伝子多型の検出の対象は女性に限った。(P)RR 遺伝子のプロモーター(約 2 kbp)及び各エクソン領域を解析対象とし, 直接シーケンス法により遺伝子多型の検出を行った(Figure 1-6)。解析対象とした領域を含むように primer を作製し, 各領域を PCR で増幅し, PAGE により目的配列の増幅を確認した。PCR

反応溶液は、10 ng 鋳型ゲノム DNA, 10x PCR buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 0.01% gelatin), MgCl₂, dNTPs Mix, forward primer, reverse primer, GoTaq DNA Polymerase, 滅菌水で総量 20 μL とした (Table 1-5). PCR は, hot start で反応を開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 58 or 64°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 32 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して反応を終了した. 各 primer のアニーリング温度は Table 1-6 に示す. PAGE には 5%ポリアクリルアミドゲルを使用し, 100V で 45 分間電気泳動を行った. 染色には EtBr を使用し, 蛍光検出器 (FluorChem) で目的配列の増幅を確認した.

得られた PCR 産物について, “AM2/IMD I/D 多型の確認 (p.31)” と同様の手順で Autosequencer により配列を確認し, 遺伝子多型を検出した.

2. 遺伝子型の決定

“1. (P)RR 遺伝子多型の検出” において検出された SNP の内, 各連鎖不平衡領域

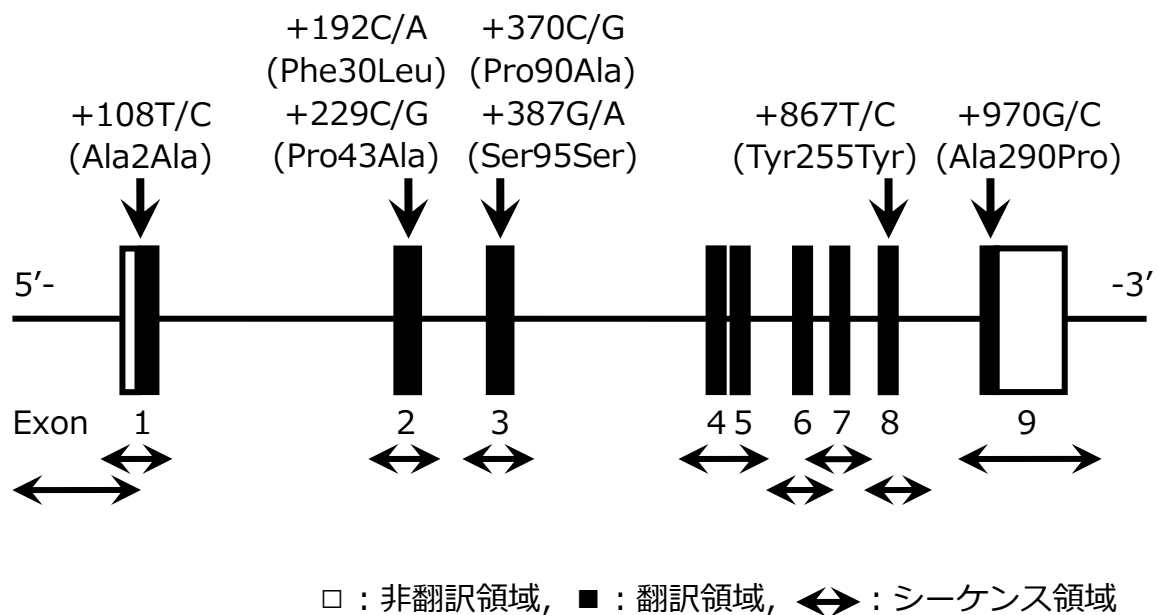


Figure 1-6. (P)RR 遺伝子 (Xp11.4, 24.7 kbp) とシーケンス領域.

Table 1-5. (P)RR 遺伝子多型解析で使用した PCR 反応溶液.

10 ng/μL 鋳型ゲノム DNA	1.0 μL
10x PCR Buffer	2.0 μL
10 mM MgCl ₂	4.0 μL
10 mM dNTPs Mix	0.4 μL
10 μM forward primer	0.5 μL
10 μM reverse primer	0.5 μL
滅菌水	11.5 μL
10 U/μL GoTaq DNA polymerase	0.1 μL
総量	20.0 μL

域から SNP をそれぞれ 1 個(-782A>G, intervening sequence (IVS)5 +169C>T, +1513A>G)選出し, 遺伝子型を決定した.

-782A>G は前述の“(P)RR 遺伝子多型の検出(p.34)”と同条件で, 直接シーケンス法により遺伝子型を決定した.

IVS5+169C>T は, PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)法により遺伝子型を決定した(Table 1-6).“(P)RR 遺伝子多型の検出(p.34)”と同様の条件で PCR を行い, 制限酵素 Fok I (TaKaRa, Otsu, Japan) で切断した. 制限酵素処理は, PCR 産物, 10x M Buffer (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol (DTT), 500 mM NaCl), 0.1% BSA, FokI, 滅菌水で総量 20 μL とした反応溶液で(Table 1-7(A)), 37°C で 1 時間インキュベーションを行った. 切断後, 5%ポリアクリルアミドを使用した PAGE により RFLP 産物中に含まれる DNA の断片長を確認し, 遺伝子型を決定した. IVS5+169C>T 多型において, C 型(男性), CC 型(女性)では 775 bp と 119 bp に 2 本のシグナルが観察され, T 型(男性), TT 型(女性)では 884 bp に 1 本のシグナルが観察され, TC 型(女性)では 884 bp, 775 bp, 119 bp に 3 本のシグナルが観察される.

Table 1-6. (P)RR の遺伝子多型解析で使用した primer 配列.

領域	Sequence (5'-3')	T _{ann}	PCR 産物
Promoter*			
Forward	CAAGAGGGAAACTTCGTCTCA	58°C	1806 bp
Reverse	CCGCTTTCTCCACCAATC		
Exon 1			
Forward	GACTTTTCAATCGCTGCCTACC	64°C	659 bp
Reverse	GCTGCGACTCAATCCCAGTTC		
Exon 2			
Forward	TTAGGACTCAGCATTTTGACCAGT	64°C	488 bp
Reverse	TCAAATTCCTGGGTTCAACTGAG		
Exon 3			
Forward	CCTTGTCAGTGTCATCTCAGAACC	64°C	440 bp
Reverse	ACAGAGAACAGCCAAGCCTCAG		
Exon 4, 5 [†]			
Forward	CATGATGGGAGATACAGACTTGGC	58°C	895 bp
Reverse	CACTAAAGAAGAATCTACCCCAGC		
Exon 6			
Forward	AACCACTGGAGAACTTGGATGCTT	58°C	579 bp
Reverse	TGTTCTTACGCCCAGGCTTGTGTT		
Exon 7			
Forward	GAGATTCGTGTTGGATTTATCAGA	58°C	666 bp
Reverse	TTGCACTTAATACCACTGAACTGT		
Exon 8			
Forward	TGCATAAAATGATAAGTAGGAGGT	58°C	800 bp
Reverse	GCTAGAAAAGCAGAGCCCATAGGA		
Exon 9 [‡]			
Forward	TAGCTGTTATGCCACTTATGAAGA	58°C	1341 bp
Reverse	CAGGAGGCAGCGAGAATAAACAA		

T_{ann}: アニール温度. * -782A>G の遺伝子型決定に使用. † IVS5+169 C>T の遺伝子型決定に使用. ‡ +1513A>G の遺伝子型決定に使用.

Table 1-7. (P)RR PCR産物の制限酵素処理で使用した反応溶液.**(A) IVS5+169C>T を含む領域の PCR 産物**

PCR 産物	10.00 μ L
10x M Buffer	2.00 μ L
0.1% BSA	2.00 μ L
滅菌水	5.95 μ L
10 U/ μ L FokI	0.05 μ L
総量	20.00 μ L

(B) +1513A>G を含む領域の PCR 産物

PCR 産物	4.00 μ L
10x NE Buffer 2	2.00 μ L
滅菌水	13.95 μ L
10 U/ μ L BsmI	0.05 μ L
総量	20.00 μ L

+1513A>G も, IVS5+169C>T と同様に PCR-RFLP 法により遺伝子型を決定した(Table 1-6).“(P)RR 遺伝子多型の検出(p.34)”と同様の条件で PCR を行い, 制限酵素 BsmI (New England Biolabs, Ipswich, MA)で切断した. 制限酵素処理は, PCR 産物, 10x NE Buffer 2 (100 mM Tris-HCl (pH 7.9), 100 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10 mM DTT), BsmI, 滅菌水で総量 20 μ L とした反応溶液で(Table 1-7(B)),60°Cで1時間インキュベーションを行った. 切断後, 5%ポリアクリルアミドを使用した PAGE により RFLP 産物中に含まれる DNA の断片長を確認し, 遺伝子型を決定した. +1513A>G 多型において, A 型(男性),AA 型(女性)では 673 bp と 668 bp に 2 本のシグナルが観察され, G 型(男性), GG 型(女性)では 1341 bp に 1 本のシグナルが観察され, AG 型(女性)では 1341 bp, 673 bp, 668 bp に 3 本のシグナルが観察される.

第7項 統計解析

統計解析には、SAS version 9.0.1 (SAS Institute, Cary, NC)及び JMP version 5.0.1 (SAS Institute, Cary, NC)を使用した。値は平均(mean) ± 標準偏差(SD; standard deviation)で示した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。それぞれの統計量の詳細は、Appendix Data “cDNA 全長配列の確認 (p.166)” に記載した。

Hardy-Weinberg 平衡

Hardy-Weinberg 平衡とは完全な自由婚が行なわれた場合に達成される遺伝子型の配分であり、近親婚や亜集団間での排他的結婚などが存在すると Hardy-Weinberg 平衡からのずれが生じるため、Hardy-Weinberg 平衡は遺伝子型データの正当性を評価するためにもしばしば有用である。もし、ある集団から採取された遺伝子型のデータが Hardy-Weinberg 平衡からあまりにずれている場合は測定の誤りや、仮説の誤りの可能性を検討する必要がある。よって、本研究で遺伝子型を決定した各 SNP について Hardy-Weinberg 平衡が成立するかを検定した。

連鎖不平衡解析

連鎖不平衡とは、連鎖する 2 つ以上の遺伝子座で観察され、異なる遺伝子座間における対立遺伝子の分配が独立ではない現象、すなわち、ハプロタイプ頻度が各遺伝子座におけるアレル頻度を乗して得られる頻度からずれている現象である。連鎖不平衡の強さを表す尺度としては、連鎖不平衡係数 D や D を規格化した D' 値及び r^2 値等が存在する。現実的な状況(最初の不完全な連鎖不平衡、再起突然変異)では、連鎖不平衡の尺度すべてが不完全であるため、 D' 値、 r^2 値の両者を用いた。 D' 値、 r^2 値は、Expectation-Maximization (EM)アルゴリズム

を使用した最尤推定法により推定した。

関連解析

関連解析には, student t -test, χ^2 検定, 一元配置分散分析(ANOVA; analysis of variance), 共分散分析(ANCOVA; analysis of covariance), scheffe 法による多重比較, 一般線形回帰式, 重回帰式等を適宜用いた。

第4節 結果

第1項 AM2/IMD

AM2/IMD I/D 多型の確認

直接シーケンス法により, AM2/IMD I/D 多型の塩基配列を確認した. II 型を持つ対象の塩基配列では, 挿入塩基配列の 18 bp のシグナルが確認された (Figure 1-7(A)). ID 型を持つ対象の塩基配列では, 18 bp が挿入されている塩基配列と欠失している塩基配列が重なっていた (Figure 1-7(B)). DD 型を持つ対象の塩基配列では, この 18 bp のシグナルが欠失していた (Figure 1-7(C)).

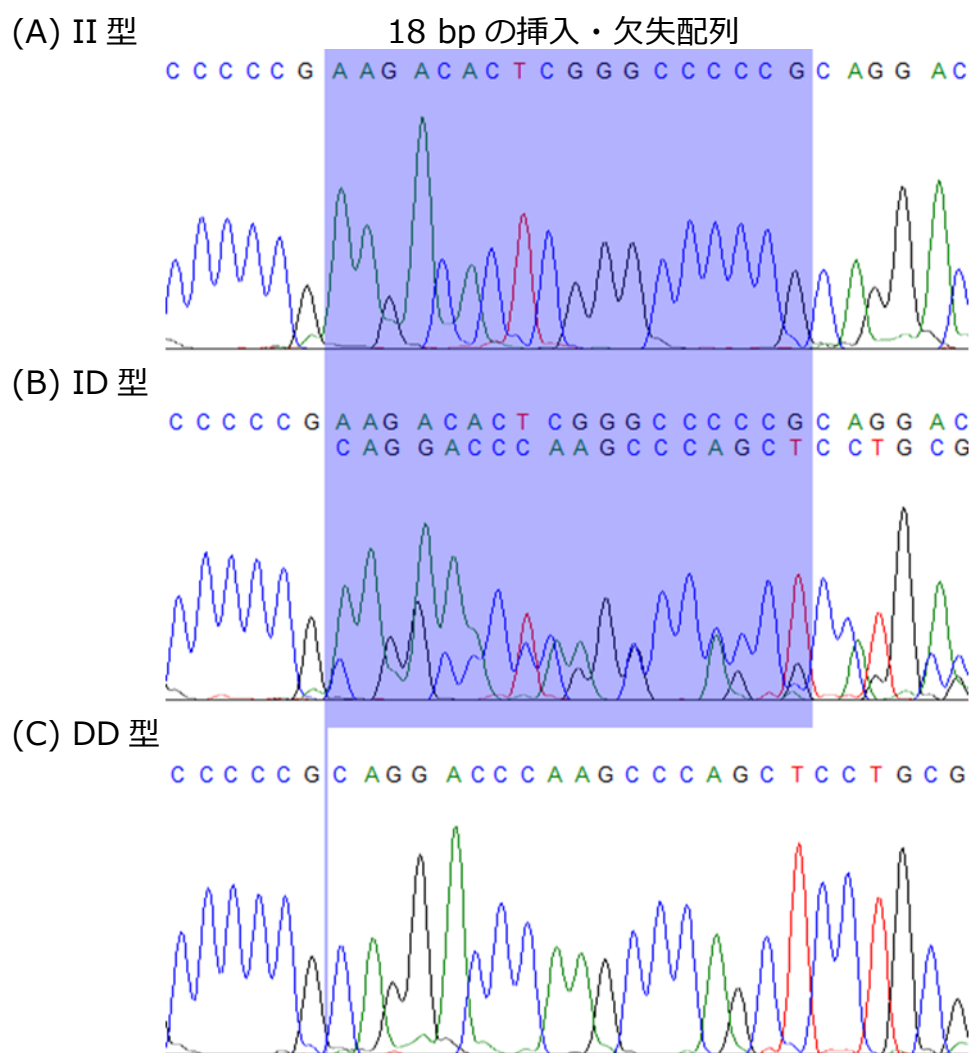


Figure 1-7. AM2/IMD I/D 多型(直接シーケンス法).

AM2/IMD の前駆体は 148 アミノ酸残基より構成され、タンパク質分解により AM2/IMD₁₋₄₇, AM2/IMD₈₋₄₇, AM2/IMD₁₋₅₃ の 3 つのペプチド断片を生じる。しかし、AM2/IMD I/D 多型の D 型では AM2/IMD₁₋₅₃ の 5'末端を構成する “RHSGPR” の 6 個のアミノ酸残基が消失していた (Figure 1-8)

(A) プレプロ AM2/IMD のアミノ酸配列

I 型 1 MARIPTAALG C ISLLCLQLP GSLSRSLGGD PRPVKPREPP ARSPSSSLQP 50

D 型 1 MARIPTAALG C ISLLCLQLP GSLSRSLGGD PRPVKPREPP ARSPSSSLQP 50

I 型 41 RHPAPRPVWV KLHRALQAQR GAGLAPVMGQ PLRDGGRQHS GPRRHSGPRR 100

D 型 41 RHPAPRPVWV KLHRALQAQR GAGLAPVMGQ PLRDGGRQHS GPRR----- 94

I 型 101 TQAQLLRVGC LGTCQVQNLS HRLWQLMGPA GRQDSAPVDP SSPHSYG 147

D 型 95 TQAQLLRVGC LGTCQVQNLS HRLWQLMGPA GRQDSAPVDP SSPHSYG 141

RR or R : 切断配列

(B) 成熟 AM2/IMD のアミノ酸配列

hAM2/IMD₁₋₅₃: HSGPRRTQAQ LLRVGCVLGT CQVQNLSHRL WQLMGPAGRQ DSAPVDPSSP HSY

hAM2/IMD₁₋₄₇: TQAQ LLRVGCVLGT CQVQNLSHRL WQLMGPAGRQ DSAPVDPSSP HSY

hAM2/IMD₈₋₄₇: VGCVLGT CQVQNLSHRL WQLMGPAGRQ DSAPVDPSSP HSY

Figure 1-8. ヒト AM2/IMD のアミノ酸配列.

AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型頻度

PCR-PAGE により, II 型で 120 bp に 1 本のシグナルが確認され, DD 型では 102 bp に 1 本のシグナルが観察され, ID 型では 120 bp と 102 bp に 2 本のシグナルが観察された(Figure 1-9).

大迫研究参加者のうち血圧測定事業及び遺伝子解析プロジェクトに対する同意が得られた住民 1826 名より, 身体的特徴, 生化学検査値, 降圧薬服用の有無, 疾患既往歴, 血圧値, AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型, その他必須項目に関する情報に欠損のない 896 名を AM2/IMD 遺伝子多型解析の対象とした. また, 本対象者の ABP の平均測定回数は, 24-h: 44.5 回, 昼間: 29.7 回, 夜間: 14.7 回であった.

II 型, ID 型, DD 型の各遺伝子型の頻度はそれぞれ 545/896 (60.8%), 307/896 (34.3%), 44/896 (4.9%)であった. 対立遺伝子頻度は, I アレルが 1397/1792 (78.0%), D アレルが 395/1792 (22.0%)であった(Table 1-8). また, AM2/IMD I/D 多型は, Hardy-Weinberg 平衡を満たしていた($P = 0.9$).

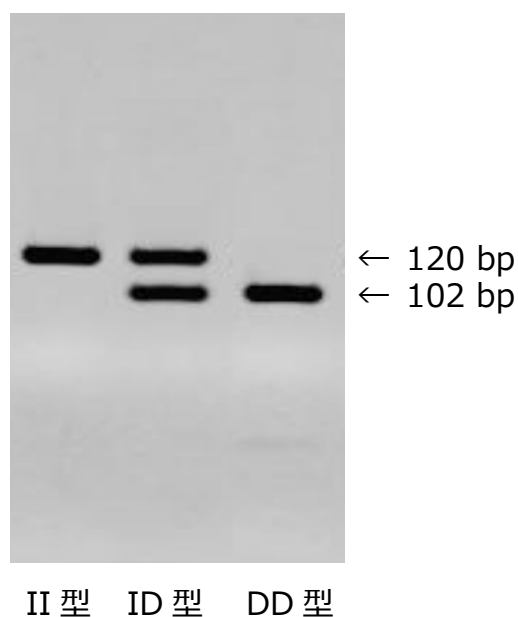


Figure 1-9. AM2/IMD I/D 多型(PCR-PAGE 法).

Table 1-8. 全対象者におけるAM2/IMD I/D多型の遺伝子型頻度($n = 896$), 対立遺伝子頻度($n' = 896 \times 2 = 1792$).

遺伝子型頻度	n (%)
II 型	545 (60.8)
ID 型	307 (34.3)
DD 型	44 (4.9)
対立遺伝子頻度	n' (%)
I アレル	1397 (78.0)
D アレル	395 (22.0)

表現型との関連解析

1. 対象者背景

AM2/IMD I/D多型の遺伝子型毎の対象者896名の背景をTable 1-9に示す。この表に示す対象者背景にII型, ID型, DD型の3群間で有意な差が認められる項目はなかった。

2. AM2/IMD I/D多型の遺伝子型による血圧値の比較

AM2/IMD I/D多型の3群間で遺伝子型と血圧値との関連をANOVAにより検討した(Table 1-10)。ABPは24-h収縮期血圧($P = 0.009$)・拡張期血圧($P = 0.001$), 昼間収縮期血圧($P = 0.001$)・拡張期血圧($P < 0.001$)がDD型で有意に高値を示した。ANCOVAにより, 年齢, 性別, BMI, 降圧薬服用の有無で補正した後もこの有意差は残った(24-h収縮期血圧: $P = 0.012$, 24-h拡張期血圧: $P = 0.001$, 昼間収縮期血圧: $P = 0.05$, 昼間拡張期血圧: $P < 0.001$)。また, 夜間収縮期血圧($P = 0.3$)・拡張期血圧($P = 0.06$)は有意ではなかったものの, DD群で高い傾向を示した。脈拍は3群間で有意差はなかった。一方, CBPは収縮期血圧($P = 0.3$), 拡張期血圧($P = 0.5$)のいずれも3群間において有意な差は認められなかった。

Table 1-9. AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型毎の対象者背景.

	II 型 (n = 545)	ID 型 (n = 307)	DD 型 (n = 44)	P value
年齢, 歳	59.5 ± 9.5	58.9 ± 9.7	58.9 ± 9.0	0.6
性別, 男性%	29.5	29.3	22.7	0.6
BMI, kg/m ²	23.5 ± 3.0	23.7 ± 3.1	24.3 ± 2.8	0.2
喫煙習慣, %	14.5	15.6	11.4	0.4
飲酒習慣, %	8.3	12.1	9.1	0.3
高血圧, %	36.3	42.7	50.0	0.06
降圧薬服用, %	24.6	31.6	38.6	0.1
高脂血症, %	21.1	19.2	20.5	0.8
糖尿病, %	14.7	16.0	9.1	0.7
脳心血管疾患, %	9.1	7.8	8.3	0.9

連続変数は平均値±標準偏差で表記.

BMI: Body Mass Index.

3. AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型による腎機能の比較

AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型 3 群間で腎機能指標値を ANOVA により比較した(Table 1-11). 腎機能が低下すると, 血清中の尿酸, 尿素窒素, クレアチニン濃度は上昇し, 腎臓の濾過機能(eGFR, Ccr)は低下する.

AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型 3 群間において, クレアチニン及び eGFR の値に有意な差が認められた(クレアチニン: $P < 0.001$, eGFR: $P < 0.001$). DD 型でクレアチニンは高値を, eGFR は低値を示した. ANCOVA により, 年齢, 性別, BMI, 降圧薬服用の有無で補正した後も, クレアチニン($P < 0.001$), eGFR ($P < 0.001$)は有意であった. また, 尿素窒素($P = 0.2$), Ccr ($P = 0.1$)の値は DD 型で低い傾向がみられたが有意ではなかった. 一方, 尿酸は 3 群間で有意差が認められなかった($P = 0.4$).

Table 1-10. AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型毎の血圧値.

	II 型 (n = 545)	ID 型 (n = 307)	DD 型 (n = 44)	P value	Adjusted P value*
24-h ABP					
SBP, mmHg	121.8 ± 12.7	122.7 ± 12.3	127.9 ± 16.7	0.009	0.02
DBP, mmHg	71.2 ± 7.5	72.4 ± 7.2	75.3 ± 9.2	<0.001	0.002
HR, bpm	68.6 ± 7.0	68.8 ± 7.0	68.8 ± 7.3	0.9	
昼間 ABP					
SBP, mmHg	127.5 ± 13.5	128.4 ± 13.3	135.4 ± 17.7	0.001	0.005
DBP, mmHg	75.3 ± 8.2	76.6 ± 7.9	80.5 ± 9.7	<0.001	<0.001
HR, bpm	73.6 ± 7.7	73.8 ± 7.9	73.8 ± 8.0	0.9	
夜間 ABP					
SBP, mmHg	110.1 ± 13.5	110.8 ± 12.6	113.2 ± 17.1	0.3	
DBP, mmHg	62.9 ± 7.7	63.9 ± 7.2	65.1 ± 9.4	0.06	
HR, bpm	58.6 ± 7.0	58.9 ± 6.8	59.2 ± 7.3	0.8	
CBP					
SBP, mmHg	131.5 ± 16.6	132.0 ± 16.8	133.0 ± 17.3	0.8	
DBP, mmHg	74.1 ± 9.9	74.5 ± 10.2	74.5 ± 10.0	0.8	

連続変数は平均値±標準偏差で表記.

* 年齢, 性別, BMI, 降圧薬服用の有無で補正(ANCOVA).

ABP: 自由行動下血圧, SBP: 収縮期血圧, DBP: 拡張期血圧, HR: 脈拍, bpm: beat per minuits, CBP: 随時血圧.

Table 1-11. AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型毎の腎機能指標.

	II 型 (n = 545)	ID 型 (n = 307)	DD 型 (n = 44)	<i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value*
尿酸, mg/dL	4.3 ± 1.3	4.4 ± 1.2	4.3 ± 1.9	0.4	
尿素窒素, mg/dL	15.7 ± 3.5	15.1 ± 3.9	14.8 ± 3.7	0.2	
クレアチニン, mg/dL	0.84 ± 0.2	0.84 ± 0.1	0.97 ± 0.4	<0.001	<0.001
eGFR, mL/min/1.73m ²	83.2 ± 16.1	83.4 ± 16.9	72.7 ± 15.3	<0.001	<0.001
Ccr, mL/min/1.73m ²	66.3 ± 18.0	66.6 ± 18.1	60.5 ± 17.3	0.1	

連続変数は平均値±標準偏差で表記.

* 年齢, 性別, BMI, 降圧薬服用の有無で補正(ANCOVA).

eGFR: 糸球体濾過率, Ccr: クレアチニンクリアランス.

Table 1-12. AM2/IMD I/D 多型の遺伝子型毎の慢性腎臓病頻度.

	II 型 (n = 545)	ID 型 (n = 307)	DD 型 (n = 44)	<i>P</i> value
尿タンパク, %	2.2	2.6	11.4	0.002
eGFR < 60, %	4.2	4.9	13.6	0.02
慢性腎臓病, %	6.2	7.2	20.5	0.002

慢性腎臓病: 尿タンパク陽性または eGFR 60 未満.

eGFR: 糸球体濾過率.

さらに, 尿タンパク及び GFR 60 未満 2 つのカテゴリーを元に定義される慢性腎臓病と遺伝子型との関連を 3 群間で検討した(Table 1-12). その結果, 尿タンパク及び eGFR 60 未満どちらの項目においても有意差が認められた. DD 群で尿タンパク陽性者及び腎機能低下者の割合が高くなっていた. 加えて, 慢性腎臓病の頻度は DD 型で有意に高かった($P = 0.002$).

Table 1-13. 腎機能による補正後の AM2/IMD I/D 多型と ABP の関連.

	<i>P</i> value	Adjusted 1 <i>P</i> value	Adjusted 2 <i>P</i> value
24-h ABP			
SBP	0.009	0.02	0.03
DBP	0.001	0.002	0.002
昼間 ABP			
SBP	0.001	0.005	0.006
DBP	<0.001	<0.001	<0.001
夜間 ABP			
SBP	0.3		
DBP	0.06		

Adjusted 1: 年齢, 性別, BMI, 降圧薬服用の有無で補正(ANCOVA)
Adjusted 2: Adjusted 1 + 慢性腎臓病の有無で補正(ANCOVA).

4. 血圧値と腎機能の関連

今回 DD 型で血圧上昇と腎機能低下が共に見られた。AM2/IMD I/D 多型と血圧値、腎機能との関連が独立した事象であるか否かを検討した。まず、血圧値について、補正項目に慢性腎臓病を加えて ANCOVA を行った。先に示した結果 (Table 1-10)と同様に、ABP の 24-h 収縮期血圧・拡張期血圧、昼間収縮期血圧・拡張期血圧において有意差が認められ、I/D 多型と血圧表現型との関連は慢性腎臓病と独立していた (Table 1-13)。

また、AM2/IMD I/D 多型が血圧値と独立して腎機能低下と関連しているかを多重ロジスティック回帰分析で検討した。慢性腎臓病について、各種危険因子 (年齢, 性別, BMI, 降圧薬服用の有無, 24-h ABP) で補正した多重ロジスティック回帰分析を行った。その結果、II 群に比べて、DD 群は慢性腎臓病を有する

オッズ比(OR; odds ratio)が 3.6 (95%信頼区間(95%CI; 95% confidence interval) : 1.5-8.1, $P = 0.003$)と高値であり, AM2/IMD I/D 多型と慢性腎臓病は血圧値と独立して関連していた(Figure 1-10).

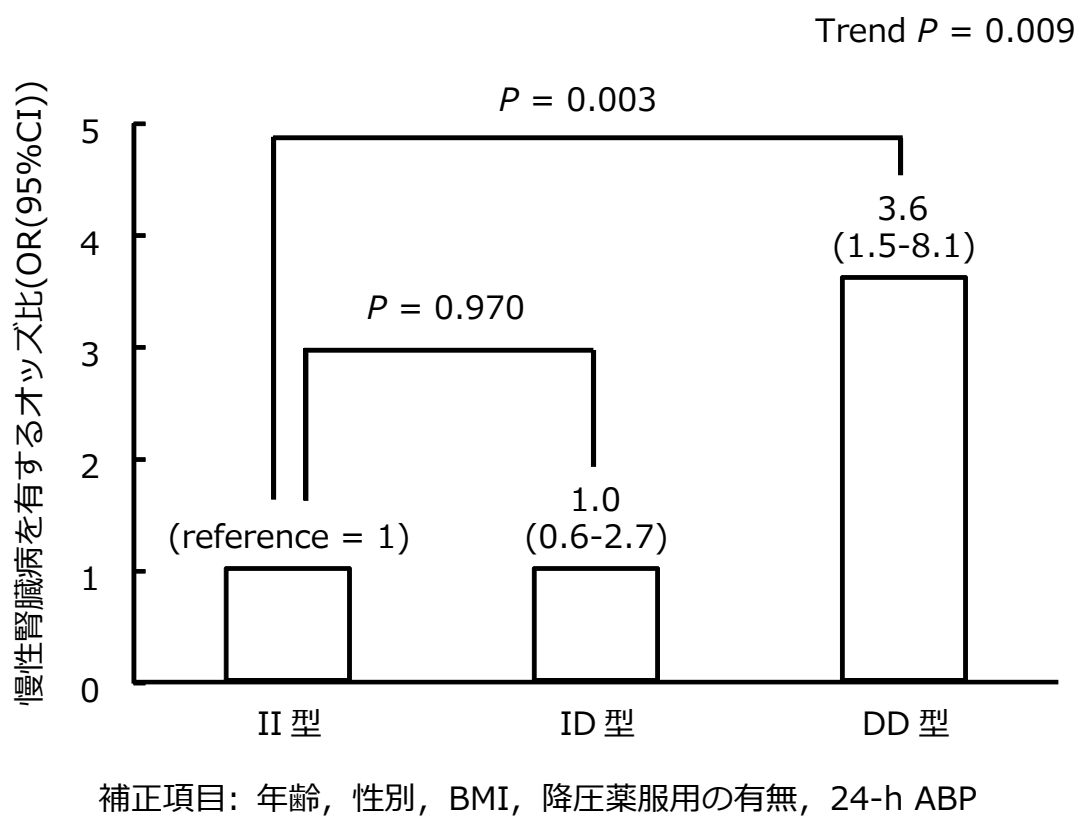


Figure 1-10. 慢性腎臓病を有するオッズ比.

第2項 (P)RR

(P)RR 遺伝子多型の検出

直接シーケンス法により塩基配列を確認した領域には 11 個の SNP が存在していた(Figure 1-11, Table 1-14). $-1507C>A$, $-1024T>C$, $-782A>G$ はプロモーター領域に, $IVS5+45C>G$, $IVS5+169C>T$, $IVS5+1006G>A$ はイントロン 5 に, $+867T>C$ はエクソン 8 に, $+1421A>T$, $+1513A>G$, $+1916A>G$, $+1964T>C$ は 3' 端非翻訳領域に位置していた. このうち $-1024T>C$ 及び $IVS5+1006G>A$ は NCBI dbSNP に未登録のものであったが, マイナーアレルの頻度がそれぞれ 1.7% (2/120), 1.7% (2/120) と非常に低値であった. $+867T>C$ は唯一エクソン領域から検出された SNP であるが, アミノ酸置換を伴わない SNP (c.867T>C, p.Y255Y) であった. また, いずれの SNP も Hardy-Weinberg の平衡を満たしていた.

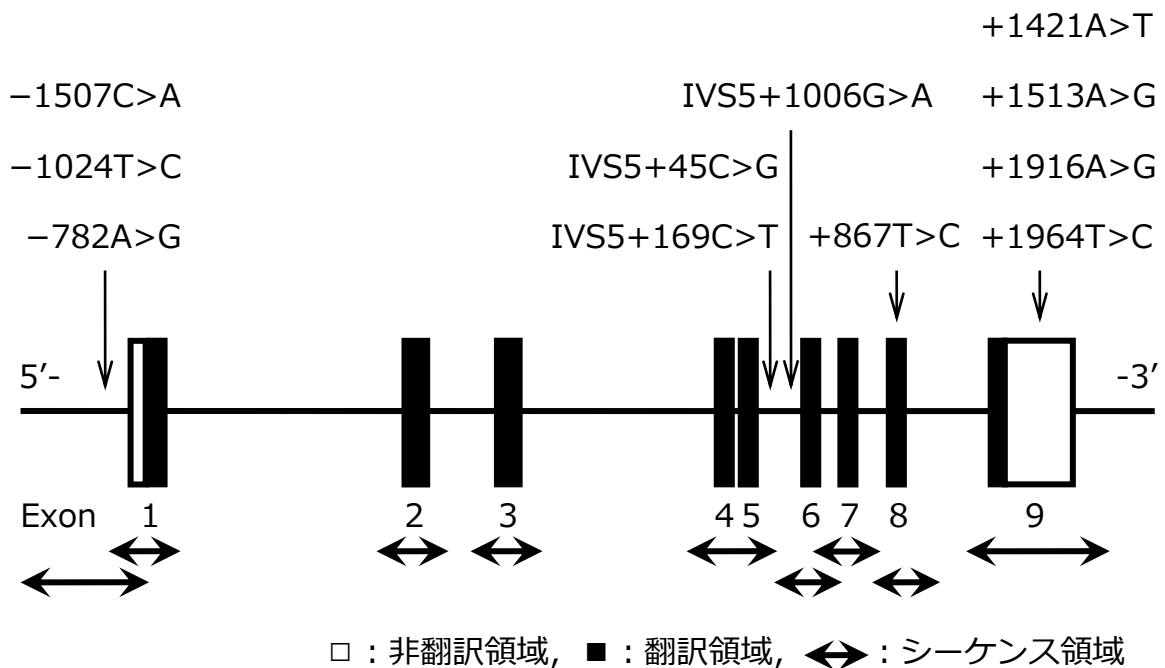


Figure 1-11. 検出された遺伝子多型(女性 60 名).

Table 1-14. 検出された遺伝子多型の位置及び頻度(女性 60 名).

No.	領域	位置*	NCBI SNP No.	頻度(%) [†]
1	プロモーター	-1507C>A	rs2971599	86.7/13.3
2		-1024T>C	-	98.3/1.7
3		-782A>G	rs2968915	86.7/13.3
4	Intron 5	IVS5+45C>G	rs3112299	88.3/11.7
5		IVS5+169C>T	rs5918007	88.3/11.7
6		IVS5+1006G>A	-	98.3/1.7
7	Exon 8	+867T>C	rs5963811	73.3/26.7
8	Exon 9	+1421A>T	rs5963816	73.3/26.7
9	(3'-UTR)	+1513A>G	rs6609080	73.3/26.7
10		+1916A>G	rs10536	73.3/26.7
11		+1964T>C	rs1060063	73.3/26.7

* +1 = mRNA 転写開始点, † 対立遺伝子頻度(メジャー/マイナー).

reference sequence: NT_079573

IVS: 介在配列, 3'-UTR: 3'端非翻訳領域.

連鎖不平衡解析

検出された 11 種の SNP 間で連鎖不平衡解析を行った(Figure 1-12). -1507C>A と -782A>G が完全な連鎖不平衡($D' = 1.00$, $r^2 = 1.00$)を成していた. また, IVS5+45C>G と IVS5+169C>T, +867T>C から +1964T>C も同様にそれぞれ完全な連鎖不平衡($D' = 1.00$, $r^2 = 1.00$)を成していた. -1507C>A (-782A>G)と IVS5+45C>G (IVS5+169C>T)の間には完全ではないが, 強い連鎖不平衡($D' = 1.00$, $r^2 = 0.86$)が確認された. IVS5+45C>G (IVS5+169C>T)と +867T>C (+1421A>T, +1513A>G, +1916A>G, +1964T>C)の間には弱い連鎖不平衡($D' = 1.00$, $r^2 = 0.05$)が確認された.

以上より、今回解析した(P)RR 遺伝子領域には 11 個の SNP が存在し、これらの SNP は 3 つの完全に連鎖した領域を構成していると推測された。

従って、推定された 3 種の完全な連鎖不平衡領域からそれぞれ-782A>G, IVS5+169C>T, +1513A>G を選出し、以下の関連解析の対象とした。

血圧値との関連解析

1. 対象者背景

大迫研究参加者のうち血圧測定事業及び遺伝子解析プロジェクトに対する同意が得られた住民 1826 名より、身体的特徴、降圧薬服用の有無、疾患既往歴、血圧値、遺伝子型、その他必須項目に関する情報に欠損のない 1112 名(男性 357 名、女性 755 名、平均年齢 58.9 歳)を解析対象とした。また、(P)RR 遺伝子は X 染色体上に存在し、X 染色体の本数は男女で異なるため、男女別に解析を行った。対象者の ABP の平均測定回数は、24-h : 44.4 回、昼間 : 29.6 回、夜間 : 14.8 回であった。

対象者背景を Table 1-15 に示す。平均年齢は、男性で 61.1 歳、女性で 57.8 歳であり、男性で有意に高値であった($P < 0.001$)。飲酒習慣、喫煙習慣及び降圧薬服用者の割合も同様に男性で有意に高値であった。高血圧の割合は、男性で 51.0%、女性で 36.4%であり、男性で有意に高値であった($P < 0.001$)。また、糖尿病及び脳心血管既往歴は男性で有意に高値であったが、BMI 及び高脂血症は女性で有意に高値であった。腎機能の指標である Ccr は、男女間で有意な差は認められなかった。血圧値はいずれも男性で有意に高値であった($P < 0.001$)、心拍数は女性で有意に高値であった($P = 0.001$)。

Table 1-15. 対象者背景(n = 1112).

	男性 (n = 357)	女性 (n = 755)	P value
背景因子			
年齢, 歳	61.1 ± 9.6	57.8 ± 10.2	<0.001
BMI, kg/m ²	23.3 ± 2.8	23.9 ± 3.2	0.01
喫煙習慣, %	45.1	2.5	<0.001
飲酒習慣, %	35.9	5.4	<0.001
高血圧, %	51.0	35.6	<0.001
降圧薬服用, %	36.7	27.7	0.002
高脂血症, %	15.4	22.8	0.004
糖尿病, %	21.0	14.4	0.007
脳心血管疾患, %	13.7	6.1	<0.001
Ccr, mL/min/1.73m ²	75.4 ± 19.8	77.6 ± 18.2	0.08
24-h ABP			
SBP, mmHg	125.8 ± 12.3	120.5 ± 12.8	<0.001
DBP, mmHg	74.4 ± 7.2	70.4 ± 7.5	<0.001
HR, bpm	67.5 ± 7.9	69.3 ± 6.6	0.001
CBP			
SBP, mmHg	136.6 ± 17.5	130.0 ± 16.8	<0.001
DBP, mmHg	76.8 ± 10.7	73.4 ± 9.6	<0.001

連続変数は平均値±標準偏差で表記.

BMI: Body Mass Index, Ccr: クレアチンクリアランス, ABP: 自由行動下血圧, SBP: 収縮期血圧, DBP: 拡張期血圧, HR: 脈拍, bpm: beat per minuits, CBP: 随時血圧.

2. (P)RR 遺伝子多型の遺伝子型

-782A>G は、直接シーケンス法により遺伝子型を決定した。-782A>G の波形パターンを Figure 1-13 に示す。A 型及び AA 型では A の波形、G 型及び GG 型では G の波形、AG 型では A と G の波形の重なりが観察された。

IVS5+169C>T, +1513A>G は PCR-RFLP 法により遺伝子型の決定した。IVS5+169C>T, +1513A>G における DNA 切断断片長の泳動パターンを Figure 1-14 に示す。IVS5+169C>T では、T 型及び TT 型では 894 bp に 1 本、C 型及び CC 型では 775 bp, 119 bp に 2 本、CT 型では 894 bp, 775 bp, 119 bp に 3 本のシグナルが認められた(Figure 1-14(A))。+1513A>G では、G 型及び GG 型では 1341 bp に 1 本、A 型及び AA 型では 673 bp ~ 668 bp に 1 本、AG 型では 1341 bp, 673-668 bp に 2 本のシグナルが認められた(Figure 1-14(B))。

全対象者 1112 名における-782A>G, IVS5+169C>T, +1513A>G の遺伝子型頻度を Table 1-16 に示す。-782A>G のアレルの頻度(A アレル/G アレル)は、男性で 88.6%/13.4%, 女性で 87.8%/12.2%であった。IVS5+169C>T のアレルの頻度(C アレル/T アレル)は、男性で 86.8%/13.2%, 女性で 87.5%/12.5%であった。+1513A>G のアレルの頻度(A アレル/G アレル)は、男性で 76.8%/23.2%, 女性で 77.2%/22.8%であった。いずれの SNP も、対立遺伝子の頻度は男女で同様であり、女性において Hardy-Weinberg の平衡を満たしていた(-782A>G: $P = 0.1$, IVS5+169C>T: $P = 0.3$, +1513A>G : $P = 0.5$)。

3. 血圧値との関連解析

本解析では、2 つの性別(男性, 女性), 3 個の SNP (-782A>G, IVS5+169C>T, +1513A>G), 8 つの血圧表現型(24-h ABP 収縮期・拡張期, 昼間 ABP 収縮期・

Table 1-16. 全対象者における(P)RR 遺伝子多型の遺伝子型頻度(n = 1112), 対立遺伝子頻度(n' = 1112 × 2 = 2224).

	遺伝子型頻度			対立遺伝子頻度	
-782A>G	AA	AG	GG	A	G
男性	-	-	-	309 (86.6)	48 (13.4)
女性	587 (77.7)	152 (20.1)	16 (2.1)	1326 (87.8)	184 (12.2)
IVS5+169C>T	CC	CT	TT	C	T
男性	-	-	-	310 (86.8)	47 (13.2)
女性	582 (77.1)	158 (20.9)	15 (2.0)	1322 (87.5)	188 (12.5)
+1513A>G	AA	AG	GG	A	G
男性	-	-	-	274 (76.8)	83 (23.2)
女性	447 (59.2)	272 (36.0)	36 (4.8)	1166 (77.2)	344 (22.8)

男性: n = 357, n' = 357 × 2 = 714. 女性: n = 755, n' = 755 × 2 = 1510.
(P)RR 遺伝子がX染色体上に存在するため, 男性の遺伝子型頻度は存在しない.
IVS: 介在配列.

拡張期, 夜間 ABP 収縮期・拡張期, 随時血圧収縮期・拡張期)について, 計 48 (= 2 × 3 × 8)回の統計解析を行っている. よって, Bonferroni 法による補正を用いて, $P < 0.001$ (= $0.05/48$)を統計学的有意水準とした.

IVS5+169C>T は, 男性において, 24-h ABP の収縮期血圧・拡張期血圧, 夜間 ABP の収縮期血圧・拡張期血圧が T 群で高値を示し, Bonferroni 法による補正後も有意であった. 昼間 ABP の収縮期血圧・拡張期血圧は境界域($P = 0.001-0.05$)であった(Table 1-17). また, 夜間 ABP の収縮期血圧・拡張期血圧は, 年齢, BMI, 降圧薬服用, 糖尿病既往, 脳心血管疾患既往, 喫煙習慣, 飲酒習慣で補正後も有意であった. 高血圧者の割合は T 型で高い傾向が認められたが, 有意な差は認められなかった(C 型: 49.4%, T 型: 61.7%, $P = 0.1$). 一方, CBP に有意な差は認められなかった.

Table 1-17. (P)RR 遺伝子多型と血圧値との関連(SNP : IVS+169C>T, 男性 : n = 357, 女性 : n = 755).

	C (n = 310)	T (n = 47)	Adjusted		CC (n = 582)	CT (n = 158)	TT (n = 15)	Adjusted	
			P	P*				P	P*
背景因子									
年齢, 歳	60.7 ± 9.6	63.4 ± 9.5	0.07	–	58.2 ± 9.9	56.3 ± 11.2	58.7 ± 10.6	0.09	–
BMI, kg/m ²	23.3 ± 2.8	23.3 ± 2.6	1	–	23.9 ± 3.2	23.7 ± 3.3	23.9 ± 2.1	0.8	–
喫煙習慣, %	44.2	51.1	0.4	–	2.6	2.5	0	0.7	–
飲酒習慣, %	34.8	42.6	0.3	–	5.3	5.7	6.7	1	–
高血圧, %	49.4	61.7	0.1	–	34.9	37.3	46.7	0.6	–
降圧薬服用, %	35.2	46.8	0.1	–	27.0	29.1	40.0	0.5	–
高脂血症, %	14.8	19.2	0.5	–	23.0	22.2	20.0	0.9	–
糖尿病, %	20.0	27.7	0.2	–	14.4	11.4	46.7	0.006	–
脳心血管疾患, %	13.9	12.8	0.8	–	6.0	6.3	6.7	1	–
ABP									
24-h SBP, mmHg	125.0 ± 11.8	131.4 ± 14.6	<0.001	0.006	120.6 ± 12.7	119.7 ± 12.8	125.0 ± 14.2	0.3	–
24-h DBP, mmHg	73.9 ± 6.9	77.7 ± 8.3	<0.001	0.003	70.5 ± 7.6	70.1 ± 7.1	71.0 ± 7.5	0.8	–
Daytime SBP, mmHg	130.5 ± 12.6	136.5 ± 16.2	0.004	0.02	126.6 ± 14.0	125.3 ± 13.5	131.3 ± 17.3	0.2	–
Daytime DBP, mmHg	78.0 ± 7.5	81.4 ± 9.2	0.006	0.02	74.7 ± 8.5	74.1 ± 7.6	75.2 ± 9.6	0.7	–
Nighttime SBP, mmHg	114.4 ± 12.8	121.5 ± 14.6	<0.001	<0.001	108.3 ± 13.0	108.2 ± 13.8	113.1 ± 12.2	0.4	–
Nighttime DBP, mmHg	66.1 ± 7.1	70.4 ± 7.7	<0.001	<0.001	61.9 ± 7.4	61.7 ± 7.5	63.1 ± 6.0	0.8	–
CBP									
SBP, mmHg	136.4 ± 17.0	138.0 ± 20.4	0.5	–	130.2 ± 17.0	128.8 ± 16.4	134.7 ± 12.6	0.4	–
DBP, mmHg	76.9 ± 10.6	75.8 ± 11.5	0.5	–	73.5 ± 9.7	72.5 ± 9.1	78.3 ± 12.1	0.07	–

連続変数は平均値±標準偏差で表記。P < 0.001 (=0.5/48, Bonferroni 法による補正)を統計学的有意水準とした。

*年齢, BMI, 降圧薬服用, 糖尿病既往, 脳心血管疾患既往, 喫煙習慣, 飲酒習慣で補正(ANCOVA)。

BMI: body mass index, ABP: 自由行動下血圧, SBP: 収縮期血圧, DBP: 拡張期血圧, CBP: 随時血圧。

-782A>G は, IVS5+169C>T と同様の傾向が認められたが, P 値は境界域であった. +1513A>G は, 遺伝子型による高血圧者の割合及び血圧値に有意な差は認められなかった(Appendix Data "Table S4(p.178)").

一方, 女性で同様の解析を行ったが, いずれの SNP も, 遺伝子型別の高血圧者の割合及び血圧値に有意な差は認められなかった(-782A>G: Table S4(A), IVS5+169C>T : Table 1-17, +1513A>G : Table S4(B)).

4. 重回帰分析

(P)RR 遺伝子の SNP の内, IVS5+169C>T が男性において ABP と有意に関連していた. IVS5+169C>T の ABP への独立した寄与を推定するため, 重回帰分析を行った. 重回帰式には, 年齢, BMI, 降圧薬服用, 糖尿病既往, 脳心血管疾患既往, 喫煙習慣, 飲酒習慣を共変量として用いた.

その結果, IVS5+169C>T は夜間 ABP の収縮期($\beta = 5.754, P < 0.001$)・拡張期($\beta = 3.822, P < 0.001$)と独立して有意に関連していた(Table 1-18). 一方, 24-h ABP 収縮期($\beta = 5.023, P = 0.006$)・拡張期($\beta = 3.272, P = 0.003$), 昼間収縮期($\beta = 4.510, P = 0.02$)・拡張期($\beta = 2.864, P = 0.02$)との関連は境界域であった(Appendix Data "Table S5(p.181)").

Table 1-18(A). 重回歸分析(夜間 SBP)

因子	β	<i>P</i> value
年齡, per year	0.699	<0.001
BMI, per kg/m ²	0.789	<0.001
降圧薬服用, 無 = 0, 有 = 1	3.865	0.01
糖尿病, 無 = 0, 有 = 1	-0.049	0.9
脳心血管疾患, 無 = 0, 有 = 1	3.392	0.1
喫煙習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	1.145	0.4
飲酒習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	-1.567	0.3
IVS5+169C>T, C型 = 0, T型 = 1	5.754	<0.001

IVS: 介在配列, BMI: body mass index.

Table 1-18(B). 重回歸分析(夜間 DBP)

因子	β	<i>P</i> value
年齡, per year	0.110	0.2
BMI, per kg/m ²	0.430	0.1
降圧薬服用, 無 = 0, 有 = 1	2.005	0.02
糖尿病, 無 = 0, 有 = 1	0.016	1
脳心血管疾患, 無 = 0, 有 = 1	1.345	0.3
喫煙習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	0.531	0.5
飲酒習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	0.356	0.7
IVS5+169C>T, C型 = 0, T型 = 1	3.822	<0.001

IVS: 介在配列, BMI: body mass index.

高血圧性臓器障害との関連解析

1. 対象者背景

大迫研究の一環として行われた MRI 検診のデータを使用した。大迫研究参加者のうち遺伝子解析プロジェクトに対する同意が得られた住民より、身体的特徴、降圧薬服用の有無、疾患既往歴、生化学検査値、血圧値、心電図、頸動脈超音波検査、頭部 MRI 検査、遺伝子型、その他必須項目に関する情報に欠損のない 556 名(男性 158 名, 女性 398 名, 平均年齢 66.2 歳)を対象者とした。対象者の ABP の平均測定回数は、24-h : 43.1 回, 昼間 : 27.9 回, 夜間 : 15.2 回であった。

対象者背景を Table 1-19 に示す。平均年齢は男性で 66.5 歳, 女性で 66.1 歳であり, BMI は, 男性で 23.5 kg/m², 女性で 23.8 kg/m² であり, 男女で有意な差は認められなかった。喫煙習慣, 飲酒習慣, 高血圧の割合は男性で有意に高値であった。降圧薬服用率は, 男性で 42.4%, 女性で 38.7% であり, 男女で有意な差は認められなかった。糖尿病は男女で有意な差は認められず, 高脂血症は女性で有意に高値であり, 心疾患既往は男性で有意に高値であった。腎機能の指標である Ccr は男女間で有意な差は認められなかった。血圧値(24-h ABP)は, 収縮期血圧は男女で有意な差は認められなかったが, 拡張期血圧は男性で有意に高値であった。一方, 心拍数は女性で有意に高値であった。

高血圧性臓器障害の内, mean IMT, プラークを有する割合が男性で優位に高値であった。一方, LVH, ラクナ梗塞, WMH を有する割合は, 男女で有意な差は認められなかった。

Table 1-19. 対象者背景(n = 556).

	男性 (n = 158)	女性 (n = 398)	P value
背景因子			
年齢, 歳	66.5 ± 5.9	66.1 ± 6.2	0.4
BMI, kg/m ²	23.5 ± 2.9	23.8 ± 2.9	0.3
喫煙習慣, %	36.7	1.8	<0.001
飲酒習慣, %	71.5	9.8	<0.001
高血圧, %	58.9	47.2	0.01
降圧薬服用, %	42.4	38.7	0.4
高脂血症, %	14.6	30.7	<0.001
糖尿病, %	15.8	12.3	0.3
脳心血管疾患, %	21.5	10.8	<0.001
Ccr, mL/min/1.73m ²	75.4 ± 19.8	77.6 ± 18.2	0.001
高血圧性臓器障害			
LVH,	16.5	15.1	0.7
mean IMT, mm	0.77 ± 0.16	0.73 ± 0.15	0.006
プラーク, %	48.4	32.0	<0.001
ラクナ梗塞,	33.1	25.7	0.08
WMH,	40.8	42.1	0.8
24-h ABP			
SBP, mmHg	126.4 ± 11.8	124.6 ± 12.7	0.1
DBP, mmHg	74.5 ± 6.7	72.0 ± 7.1	<0.001
HR, bpm	67.5 ± 7.9	69.3 ± 6.6	0.001
CBP			
SBP, mmHg	146.3 ± 22.5	146.0 ± 22.3	0.9
DBP, mmHg	80.8 ± 12.0	79.0 ± 11.2	0.09

連続変数は平均値±標準偏差で表記.

BMI: Body Mass Index, Ccr: クレアチンクリアランス, LVH: 左室肥大, IMT: 内膜中膜壁厚, WMH: 脳白質病変, ABP: 自由行動下血圧, SBP: 収縮期血圧, DBP: 拡張期血圧, HR: 脈拍, bpm: beat per minuits, CBP: 随時血圧.

2. LVH

各 SNP の遺伝子型別の LVH 頻度を Table 1-20 に示す。いずれの SNP も遺伝子型別の LVH 頻度に有意な差は認められなかった。

女性において同様の解析を行った結果を Table 1-21 に示す。-782A>G 及び IVS5+169C>T は、遺伝子型と LVH 頻度との間に有意な関連は認められなかったが、+1513A>G の遺伝子型と LVH 頻度との間に有意な関連が認められた。G アレルの保有数の増加に伴い、LVH 頻度の上昇していた(AA 型：10.9%、AG 型：20.3%、GG 型：26.7%、 $P = 0.03$)。また、G アレルの有無による 2 群間比較を行ったところ、G アレル保有者(AG 型+GG 型)群で LVH 頻度が有意に高値を示した(AA 型：10.9%、AG 型+GG 型：20.8%、 $P = 0.006$)。

女性における+1513A>G の遺伝子型別の対象者背景、血圧値及び生化学検査値を Table 1-22 に示す。年齢、BMI、飲酒・喫煙習慣、降圧薬服用率、各種疾患既往歴、腎機能(Ccr)を含め検査値に有意な差は認められなかった。

次に、本集団における LVH の危険因子を探るために、女性において LVH の有無による比較を行った(Table 1-23)。LVH 有の群で年齢($P < 0.001$)、24-h ABP 収縮期($P < 0.001$)、24-h ABP 拡張期($P = 0.01$)、随時血圧収縮期($P = 0.03$)が有意に高値であった。降圧薬服用率は、LVH 有の群で高値の傾向が認められた($P = 0.05$)。一方、糖尿病者の割合は LVH 有の群で有意に低値であった($P = 0.04$)。

従って、年齢、BMI、降圧薬服用、糖尿病、24-h ABP 収縮期血圧を補正項目として、+1513A>G の遺伝子型別の LVH を有するオッズ比及び 95%CI を算出した(Figure 1-15)。その結果、遺伝子型別 3 群間における解析では、LVH を有するオッズ比に有意な差が認められた(Trend $P = 0.03$)。また、AA 群と比較して、AG 群で LVH を有するオッズ比が有意に高値であった(OR: 2.3, 95%CI: 1.2-4.2, $P = 0.01$)。GG 群では LVH を有するオッズ比は高値を示したものの、

Table 1-20. 各 SNP の遺伝子型別の LVH 頻度(男性: n = 158).

-782A>G	A (n = 138)	G (n = 20)	<i>P</i> value
LVH, %	13.0	10.0	0.7
IVS5+169C>T	C (n = 139)	T (n = 19)	<i>P</i> value
LVH, %	12.9	10.5	0.8
+1513A>G	A (n = 119)	G (n = 39)	<i>P</i> value
LVH, %	13.4	10.3	0.6

LVH: 左室肥大.

Table 1-21. 各 SNP の遺伝子型別の LVH 頻度(女性: n = 398).

-782A>G	AA (n = 313)	AG (n = 75)	GG (n = 10)	<i>P</i> value
LVH, %	12.1	11.8	11.1	1
IVS5+169C>T	CC (n = 311)	CT (n = 80)	TT (n = 7)	<i>P</i> value
LVH, %	9.4	11.3	14.3	0.8
+1513A>G	AA (n = 230)	AG (n = 153)	GG (n = 15)	<i>P</i> value
LVH, %	10.9	20.3	26.7	0.03

LVH: 左室肥大.

有意ではなかった(OR: 3.1, 95%CI: 0.7-4.2, $P = 0.1$). 更に, G アレルの有無による 2 群間で同様の解析を行ったところ, AA 群と比較して G アレル保有者(AG+GG)群で LVH を有するオッズ比が有意に高値であった(OR: 2.2, 95%CI: 1.2-4.1, $P = 0.008$).

Table 1-22. 女性における+1513A>G 遺伝子型毎の表現型(n = 398).

+1513A>G	AA 型 (n = 230)	AG 型 (n = 153)	GG 型 (n = 15)	P value
背景因子				
年齢, 歳	65.9 ± 6.1	66.2 ± 6.2	67.7 ± 7.7	0.5
BMI, kg/m ²	24.0 ± 2.9	23.6 ± 2.9	23.2 ± 3.2	0.3
喫煙習慣, %	2.2	1.3	0	0.6
飲酒習慣, %	10.0	8.5	20.0	0.4
高血圧, %	46.1	48.4	53.3	0.8
降圧薬服用, %	38.3	38.6	46.7	0.8
高脂血症, %	32.2	29.4	20.0	0.5
糖尿病, %	13.0	11.8	6.7	0.7
脳心血管疾患, %	7.0	8.5	0	0.3
Ccr, mL/min/1.73m ²	72.8 ± 20.5	70.8 ± 15.3	68.7 ± 20.5	0.5
24-h ABP				
SBP, mmHg	124.4 ± 13.0	124.6 ± 11.3	128.5 ± 20.3	0.5
DBP, mmHg	72.0 ± 7.3	71.7 ± 6.4	75.0 ± 10.7	0.2
HR, bpm	68.8 ± 7.1	68.4 ± 6.6	67.5 ± 9.0	0.7
生化学検査値				
TC, mg/dL	207.9 ± 32.8	205.8 ± 33.8	189.2 ± 34.2	0.1
TG, mg/dL	130.2 ± 64.7	124.7 ± 59.5	126.6 ± 62.7	0.7
血清 Na, mEq/L	142.3 ± 1.70	142.4 ± 1.90	142.3 ± 1.60	0.7
血清 K, mEq/L	4.55 ± 0.55	4.62 ± 0.57	4.64 ± 0.55	0.4
血清 Cre, mg/dL	0.79 ± 0.15	0.79 ± 0.16	0.80 ± 0.15	0.9

連続変数は平均値±標準偏差で表記.

BMI: Body Mass Index, Ccr: クレアチンクリアランス, ABP: 自由行動下血圧, SBP: 収縮期血圧, DBP: 拡張期血圧, HR: 脈拍, bpm: beat per minuits, TC: 総コレステロール, TG: トリグリセリド, Cre: クレアチニン.

Table 1-23. 女性における LVH の有無による比較(n = 398).

	LVH 無 (n = 338)	LVH 有 (n = 60)	P value
背景因子			
年齢, 歳	65.6 ± 5.9	69.0 ± 6.8	<0.001
BMI, kg/m ²	23.9 ± 2.9	23.6 ± 3.2	0.5
喫煙習慣, %	1.5	3.3	0.4
飲酒習慣, %	10.1	8.3	0.7
高血圧, %	45.3	58.3	0.06
降圧薬服用, %	36.7	50.0	0.05
高脂血症, %	30.5	31.7	0.9
糖尿病, %	13.6	5.0	0.04
脳心血管疾患, %	9.5	18.3	0.06
Ccr, mL/min/1.73m ²	72.3 ± 18.4	69.3 ± 19.6	0.2
24-h ABP			
SBP, mmHg	123.4 ± 12.1	131.6 ± 14.1	<0.001
DBP, mmHg	71.6 ± 6.9	74.1 ± 8.2	0.01
HR, bpm	68.7 ± 7.0	68.1 ± 7.0	0.5
CBP			
SBP, mmHg	144.8 ± 21.0	153.4 ± 27.8	0.03
DBP, mmHg	79.0 ± 10.8	78.7 ± 13.5	0.8

連続変数は平均値±標準偏差で表記.

LVH: 左室肥大, BMI: Body Mass Index, Ccr: クレアチンクリアランス, ABP: 自由行動下血圧, SBP: 収縮期血圧, DBP: 拡張期血圧, HR: 脈拍, bpm: beat per minuits, CBP: 随時血圧.

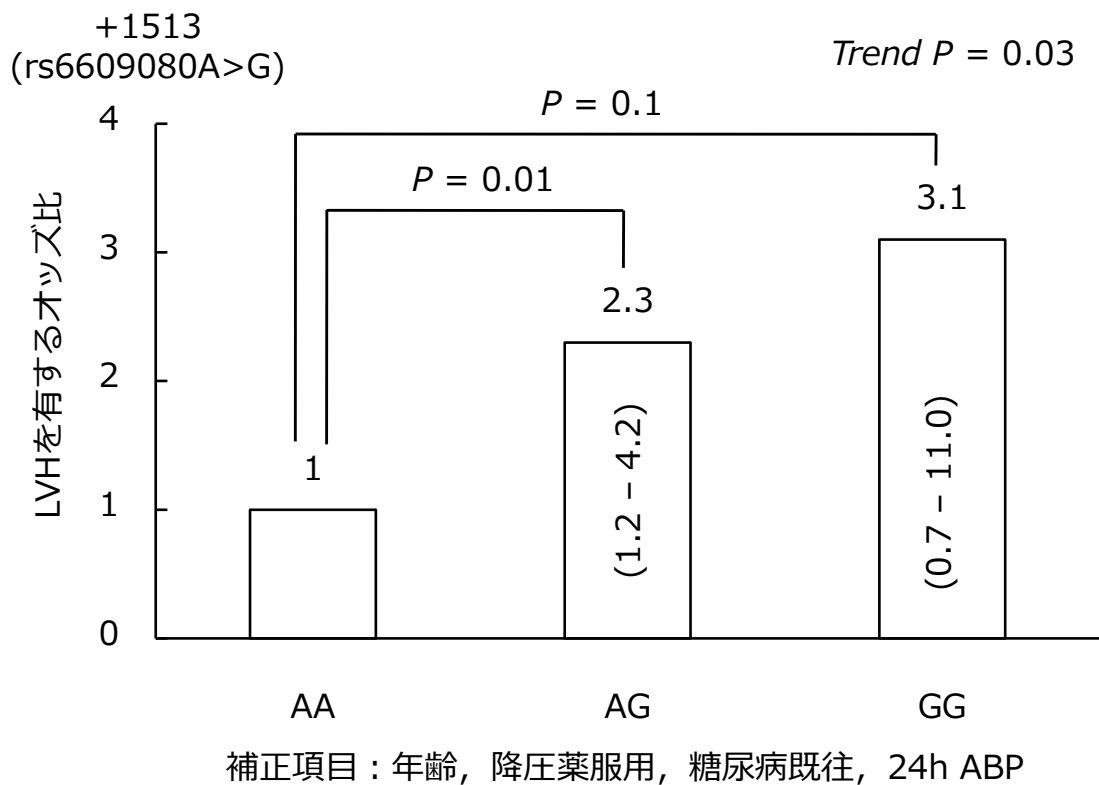


Figure 1-15. 女性における+1513A>G 遺伝子型別の LVH を有するオッズ比.

3. 頸動脈病変

男性において各 SNP の遺伝子型別に mean IMT 及びプラーク保有者の割合を比較した結果，これらに有意な差は認められなかった(Table 1-24).

女性においても同様の解析を行ったが，遺伝子型別の mean IMT 及びプラーク保有者の割合に有意な差は認められなかった(Table 1-25). 単変量解析においていずれの SNP に関しても頸動脈病変との関連が認められなかったため，多変量解析は行わなかった.

Table 1-24. 各 SNP の遺伝子型別の頸動脈病変頻度(男性: n = 158).

-782A>G	A (n = 138)	G (n = 20)	P value
mean IMT, mm	0.76 ± 0.16	0.81 ± 0.16	0.2
プラーク, %	46.4	63.2	0.2
IVS5+169C>T	C (n = 139)	T (n = 19)	P value
mean IMT, mm	0.76 ± 0.16	0.81 ± 0.17	0.2
プラーク, %	47.5	55.6	0.5
+1513A>G	A (n = 119)	G (n = 39)	P value
mean IMT, mm	0.78 ± 0.17	0.75 ± 0.11	0.4
プラーク, %	46.7	54.1	0.4

連続変数は平均値±標準偏差で表記.
IMT: 中膜内膜壁厚.

Table 1-25. 各 SNP の遺伝子型別の頸動脈病変頻度(女性: n = 398).

-782A>G	AA (n = 313)	AG (n = 75)	GG (n = 10)	P value
mean IMT, mm	0.73 ± 0.15	0.75 ± 0.13	0.74 ± 0.14	0.9
プラーク, %	32.6	30.6	22.2	0.8
IVS5+169C>T	CC (n = 311)	CT (n = 80)	TT (n = 7)	P value
mean IMT, mm	0.73 ± 0.15	0.74 ± 0.14	0.76 ± 0.10	0.7
プラーク, %	32.6	29.9	28.6	0.9
+1513A>G	AA (n = 230)	AG (n = 153)	GG (n = 15)	P value
mean IMT, mm	0.73 ± 0.14	0.72 ± 0.15	0.76 ± 0.23	0.5
プラーク, %	33.3	30.3	26.7	0.8

連続変数は平均値±標準偏差で表記.
IMT: 中膜内膜壁厚.

4. 無症候性脳血管障害

男性における各 SNP の遺伝子型別のラクナ梗塞及び WMH 保有者の割合を Table 1-26 に示す。いずれの SNP においても遺伝子型別のラクナ梗塞及び WMH 保有率に有意な差は認められなかった。

女性において同様の解析を行った結果を Table 1-27 に示す。-782A>G 及び IVS5+169C>T に関しては、遺伝子型とラクナ梗塞及び WMH との間に有意な関連は認められなかったが、+1513A>G の遺伝子型とラクナ梗塞保有率との間に有意な関連が認められた。AA 群及び AG 群と比較して GG 群でラクナ梗塞保有率が有意に高値であった (AA: 23.1%, AG: 23.8%, GG: 60.0%, $P = 0.008$)。WMH 保有率には有意な差は認められなかった。

次に、本集団における LVH の危険因子を探るために、女性においてラクナ梗塞の有無による比較を行った (Table 1-28)。ラクナ梗塞有の群で年齢 ($P < 0.001$)、高血圧 ($P < 0.001$)、降圧薬服用率 ($P < 0.001$)、24-h ABP 収縮期 ($P < 0.001$)、24-h ABP 拡張期 ($P = 0.004$) が有意に高値であった。一方、Ccr ($P = 0.002$) はラクナ梗塞有の群で有意に低値であった。

従って、年齢、降圧薬服用、Ccr、24-h ABP 収縮期血圧を補正項目として、+1513A>G の遺伝子型別のラクナ梗塞有するオッズ比 (OR) 及び 95%CI を算出した (Figure 1-16)。その結果、遺伝子型別 3 群間における解析では、ラクナ梗塞を有するオッズ比に有意な差が認められた (Trend $P = 0.02$)。また、AA 群と比較して、AG 群ではほぼ同等であった (OR : 1.1, 95% CI : 0.6-1.8, $P = 0.8$) が、GG 群ではラクナ梗塞を有するオッズ比が有意に高値を示した (OR: 4.4, 95%CI: 1.4-14.8, $P = 0.01$)。

Table 1-26. 各 SNP の遺伝子型別の LVH 頻度(男性: n = 158).

-782A>G	A (n = 138)	G (n = 20)	P value
ラクナ梗塞, %	33.3	30.0	0.8
WMH, %	42.0	30.0	0.3
IVS5+169C>T	C (n = 139)	T (n = 19)	P value
ラクナ梗塞, %	33.8	26.3	0.5
WMH, %	41.7	31.6	0.4
+1513A>G	A (n = 119)	G (n = 39)	P value
ラクナ梗塞, %	31.1	38.5	0.4
WMH, %	39.5	43.6	0.7

WMH: 脳白質病変.

Table 1-27. 各 SNP の遺伝子型別の LVH 頻度(女性: n = 398).

-782A>G	AA (n = 313)	AG (n = 75)	GG (n = 10)	P value
ラクナ梗塞, %	26.5	22.4	33.3	0.7
WMH, %	42.2	42.1	33.3	0.9
IVS5+169C>T	CC (n = 311)	CT (n = 80)	TT (n = 7)	P value
ラクナ梗塞, %	26.0	26.3	14.3	0.8
WMH, %	41.2	45.0	37.5	0.8
+1513A>G	AA (n = 230)	AG (n = 153)	GG (n = 15)	P value
ラクナ梗塞, %	23.9	25.5	60.0	0.008
WMH, %	41.3	41.2	60.0	0.4

WMH: 脳白質病変.

Table 1-28. 女性におけるラクナ梗塞の有無による比較(n = 398).

	ラクナ梗塞無 (n = 295)	ラクナ梗塞有 (n = 103)	P value
背景因子			
年齢, 歳	64.8 ± 5.7	69.7 ± 6.2	<0.001
BMI, kg/m ²	23.9 ± 1.7	23.6 ± 2.9	0.4
喫煙習慣, %	1.4	2.9	0.3
飲酒習慣, %	9.8	9.7	1
高血圧, %	41.4	64.1	<0.001
降圧薬服用, %	33.2	54.4	<0.001
高脂血症, %	31.9	27.2	0.4
糖尿病, %	11.5	14.6	0.4
脳心血管疾患, %	9.5	14.6	0.2
Ccr, mL/min/1.73m ²	73.6 ± 18.9	67.0 ± 17.0	0.002
24-h ABP			
SBP, mmHg	123.1 ± 11.9	129.0 ± 14.0	<0.001
DBP, mmHg	71.4 ± 6.9	73.8 ± 7.4	0.004
HR, bpm	68.6 ± 6.6	68.7 ± 7.9	0.8
CBP			
SBP, mmHg	145.1 ± 21.3	144.3 ± 21.8	0.8
DBP, mmHg	78.8 ± 10.8	77.1 ± 10.2	0.2

連続変数は平均値±標準偏差で表記.

LVH: 左室肥大, BMI: Body Mass Index, Ccr: クレアチンクリアランス, ABP: 自由行動下血圧, SBP: 収縮期血圧, DBP: 拡張期血圧, HR: 脈拍, bpm: beat per minuits, CBP: 随時血圧.

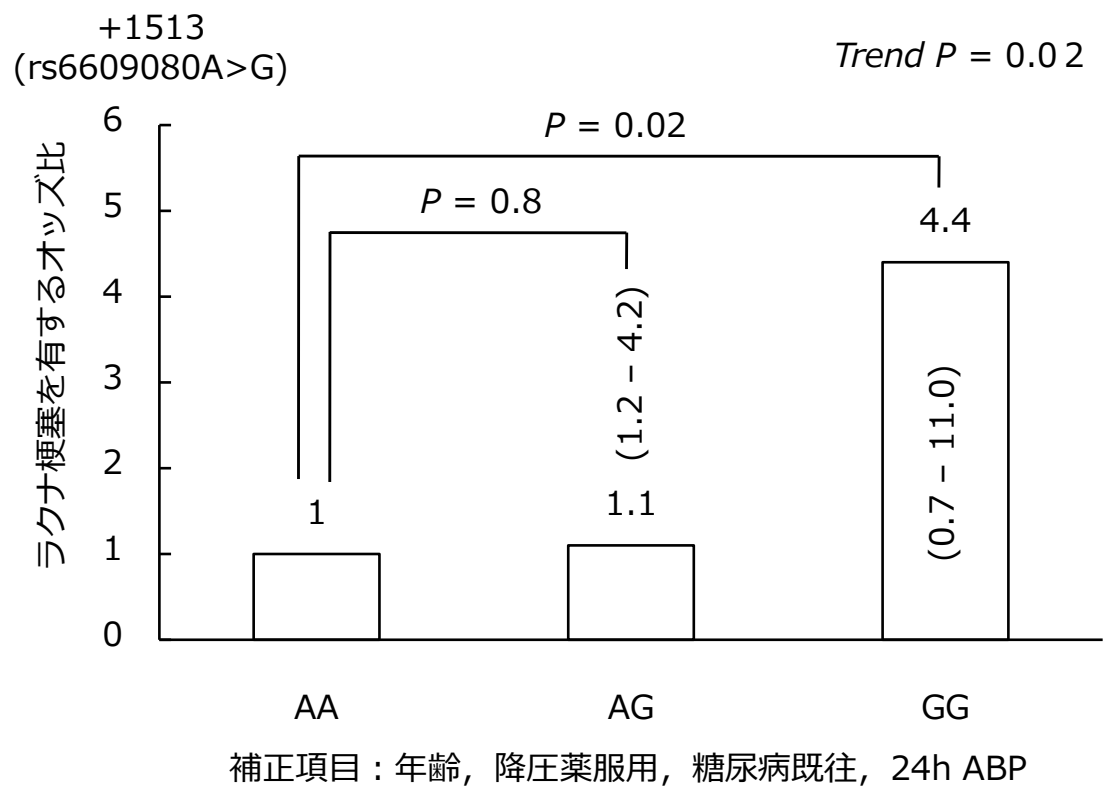


Figure 1-16. 女性における+1513A>G 遺伝子型別のラクナ梗塞を有するオッズ比.

第3項 結果の要約

AM2/IMD

1. 血管拡張性物質であり、臓器保護性に働くと考えられる AM2/IMD 遺伝子の I/D 多型(rs3840963)は、
 - 24-h ABP, 昼間 ABP と関連し、DD 型で血圧値が高値であった。
 - 糸球体濾過量, 尿タンパクと関連し、DD 型で腎機能が低下していた。
2. AM2/IMD I/D 多型は、腎機能指標(CKD)を含む各種危険因子と独立して 24-h ABP と関連した。
3. AM2/IMD I/D 多型は、血圧値を含む各種危険因子と独立して慢性腎臓病と関連した。

(P)RR

1. 大迫町一般地域住民女性 60 名のシーケンスより、血管収縮性因子で、組織障害性に働くと考えられる(P)RR 遺伝子に 11 個の SNP が同定された。
2. 連鎖不平衡解析の結果、検出された 11 個の SNP から 3 個の完全な連鎖不平衡領域が推定された。
3. 3 個の完全な連鎖不平衡領域より -782A>G (rs2968915), IVS5+169C>T (rs5918007), +1513A>G (rs6609080)を選出し、関連解析を行ったところ、
 - 男性において、IVS5+169C>T が ABP と関連し、T アレル所持者で血圧が高値であった。
 - 女性において、+1513A>G が LVH, ラクナ梗塞と関連し、G アレル所持者で LVH, ラクナ梗塞のリスクが増加していた。

第5節 考察

第1項 AM2/IMD

AM2/IMD 遺伝子 I/D 多型と血圧値との関連

岩手県大迫一般地域住民 896 名において、AM2/IMD 遺伝子 rs3840963 I/D 多型の遺伝子型を決定し、血圧値、腎機能との関連の検討を行った。AM2/IMD I/D 多型の頻度は、II 型が 545 名(60.8%)、ID 型が 307 名(34.3%)、DD 型が 44 名(4.9%)であった。II 型群、ID 型群、DD 型群の 3 群に分け比較したところ、24 時間及び昼間 ABP の収縮期及び拡張期が DD 群で有意に高値を示した。この関連は、年齢、性別、BMI、降圧薬服用の有無で補正後も有意であった。従って、本研究で確認された AM2/IMD I/D 多型と血圧表現型との関連は補正を行った危険因子と独立していると考えられる。

AM2/IMD は CRLR-RAMP を介して血管拡張作用を示すこと[1, 2, 8, 10, 130]、AM2/IMD をラット脳室内に投与すると AM2/IMD が脳内に広範に作用し、オキシトシン系を賦活化することが報告されている[131]。また、マウスにおいて AM2/IMD は心筋の陽性変力作用を有していること[132]、ラットにおいて肺血管抵抗を減少させることが報告されている[9]。これら AM2/IMD の生理作用に関する先行研究の結果と今回の研究結果とを照合すると、DD 群では、AM2/IMD の作用が減弱している可能性が示唆される。

AM2/IMD 遺伝子 I/D 多型と腎機能との関連

AM2/IMD I/D 多型と腎機能との関連解析では、DD 群でクレアチニンが有意に高値を示し、GFR が有意に低値を示した。この関連は、年齢、性別、BMI、降圧薬服用で補正後も有意であった。更に、尿タンパク及び GFR 60 mL/min/1.73m² 未満の 2 つのカテゴリーにより定義される CKD は、DD 群で CKD 頻度が有意に高値であった。よって、DD 型所持者では腎機能が低下し易

いことが示唆される。

AMの長期投与が Dahl 食塩感受性ラットにおいて尿タンパクや糸球体ろ過量などの腎機能の改善，及び腎臓の繊維化を促進する TGF- β などの遺伝子発現を抑制することが報告されている[133]。さらに AM の遺伝子導入治療は高血圧モデル動物において，腎糸球体硬化，腎間質の繊維化などの組織障害を抑制することが報告されている[77, 134]。これらのことから AM は腎臓保護的に働いている因子であることが示唆される。

一方，AM2/IMD をラット腎動脈に投与すると腎血流量の増大，尿量の増加を惹起するということが報告されている[10, 135, 136]。また，AM と同じ CRLR-RAMP 系を介して作用する AM2/IMD は AM 同様，腎臓に対して保護的に働いていると考えられる。本研究において，DD 群では AM2/IMD の作用の減弱により腎機能の低下が見られ，その結果として腎糸球体からタンパク質の漏出が起きたことが考えられる。従って，血圧値と同様に，腎機能との関連から DD 群においては AM2/IMD の作用が減弱している可能性が示唆される。

今回 DD 群で血圧上昇と腎機能低下がみられた。さらに，CKD を含む各種危険因子で補正した後も AM2/IMD 遺伝子 I/D 多型と血圧値は有意に関連し，24-h ABP の収縮期を含む各種危険因子での補正した後も AM2/IMD 遺伝子 I/D 多型と CKD は有意に関連していた。従って，AM2/IMD I/D 多型は血圧値と腎機能に互いに独立して関連していると考えられる。

メカニズム

AM2/IMD の前駆体は 148 アミノ酸残基より構成され，タンパク質分解により AM2/IMD₁₋₄₇，AM2/IMD₈₋₄₇，AM2/IMD₁₋₅₃ の 3 つのペプチド断片を生じる可能性が報告されている[1, 4, 137-140]。AM2/IMD₁₋₅₃ の脳室内投与は AM2/IMD₁₋₄₇，AM2/IMD₈₋₄₇ と比較して全身血圧や脈圧上昇などの生理作用が

強く現れること[1, 4, 137-140], また, AM2/IMD₁₋₅₃ はラット心臓において冠動脈血流量を増加させ, 虚血状態や再灌流からの心筋障害に対して保護的に働くことが報告されている[8, 137-141].

DD 群では Figure 1-8 (p.42)に示すように AM2/IMD₁₋₅₃ の 5'末端を構成する "HSGPRR" の 6 個のアミノ酸残基が消失する. このため, DD 群では AM2/IMD₁₋₄₇, AM2/IMD₈₋₄₇ のみが生成され, AM2/IMD₁₋₅₃ は生成されないと考えられる. また, この欠失により, AM2/IMD₁₋₄₇ の N 末端側切断配列近傍のアミノ酸配列の変化も生じる. AM2/IMD₁₋₅₃ の消失及び AM2/IMD₁₋₄₇ の N 末端側切断配列の構造変化により, DD 群では生成される AM2/IMD の作用に変化が生じ, 心血管や腎臓での保護作用が弱まり, 血圧上昇や腎障害を起こしている可能性が示唆される. しかしながら, 本研究は疫学的研究であり, 現段階では AM2/IMD の血中濃度の測定などの生理実験を行っていないので, 正常人において AM2/IMD₁₋₅₃ がどの程度の役割を果たしているのか, また, AM2/IMD₁₋₅₃ が実際に DD 群で消失しているか否かを含め, メカニズムについては更なる検討が必要である.

AM2/IMD の作用

AM2/IMD はラットの心臓において冠動脈血流量を増加させ, 虚血状態や再灌流からの心筋障害に対して保護的に働くことが報告されている[140, 141]. しかし, 今回心疾患既往歴において 3 群間に有意な差は認められなかった. 本研究の対象者は一般地域住民であるため, 治療による修飾がある. そのため, 遺伝子多型の影響を検出できなかった可能性も考えられる.

AM2/IMD と同じ CGRP ファミリーペプチドである AM の遺伝子多型は, 高血圧[81, 82], 尿タンパク[83], 腎不全[84], 心疾患[79, 85]といった表現型との関連が報告されている. また, AM 及び AM2/IMD の受容体構成因子であ

る CRLR の遺伝子多型にも高血圧との関連が報告されている[86]。従って、CGRP ファミリーに属するペプチドホルモンは協調して循環調節機構や臓器保護作用に関与している可能性が考えられる。

AM2/IMD のような血管拡張性ペプチドには他にも心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP; atrial natriuretic peptide), 脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP; brain natriuretic peptide)といったペプチドホルモンがある。ANP, BNP は血管拡張作用の他にもナトリウム利尿作用, RAS 系抑制作用, 心肥大抑制などを含む多彩な生理作用を有しており, 心血管・腎臓障害の発症・進展に関与していることが知られている。

先行研究において ANP, BNP 遺伝子多型は様々な表現型との関連が報告されている。ANP 遺伝子多型は血圧と関連することや[142-151], 腎障害[152-155], 心疾患[156]と関連することが報告されている。また, BNP 遺伝子多型は高血圧[157], 2 型糖尿病[158]と関連することが報告されている。

実際に ANP は臨床の場で, 遺伝子組み換えヒト ANP 製剤(カルペリチド)が急性心不全治療薬として応用されており, 急性期血行動態改善作用を期待されて実際に使用されている。また, BNP は日本においては治療薬としてではなく, 心不全の診断と重症度評価のマーカーとして用いられている。従って, ANP, BNP と共通する生理作用を持つ AM2/IMD もまた, ANP, BNP と同様に循環器疾患治療・診断薬開発のターゲットとなり得る。

本研究の限界

本研究の限界点として, 本研究が疫学的観察研究であることがあげられる。観察研究の対象は, 一般住民であるため, 心血管疾患の遺伝的影響があったとしても降圧薬服用などの治療を自由に受けることができ, 遺伝的影響のない人と比較した時, 差が認められなくなってしまう可能性が考えられる。よって,

基礎実験により遺伝子変化と生理学的・生化学的作用との関係を解析し、さらに臨床的な生理変化も合わせて検討することが必要になると考えられる。現在、世界的にAM2/IMD のノックアウトマウスを作製する試みやAM2/IMD を用いたさまざまな生理実験が行われている。しかしながら、AM2/IMD はきわめて抗原性が低く特異的な抗体の作成は困難であり、血中に存在する AM2/IMD を測定するラジオイムノアッセイまたは ELISA 等は未だ実用化されていない。今後、AM2/IMD 特異的抗体による測定系が確立されることにより、その血中動態が明らかとなり、ヒトの病態に対する AM2/IMD の寄与・役割の詳細が明らかとなることが期待される。

第2項 (P)RR

(P)RR 遺伝子多型

(P)RR 遺伝子より 11 個の SNP が検出され、10 個は非翻訳領域に、1 個は翻訳領域に存在していた。これらの SNP の内、9 個の SNP は NCBI dbSNP に既に登録されており、2 個の SNP は新しい SNP であった。また、NCBI dbSNP に登録されていた、(P)RR 遺伝子のアミノ酸置換を伴う 4 個の SNP は確認されなかった。NCBI dbSNP では、これらの SNP の頻度は不明または非常に低いとされている。日本人におけるこれらの SNP の頻度に関する記載はないが、本結果からは、非常に低値であると考えられる。+867T>C は、翻訳領域から唯一検出された遺伝子多型であるが、アミノ酸置換を伴うものではなく受容体機能への影響は考えにくい。また、先行研究において(P)RR 遺伝子のエクソン 4 に存在するサイレント変異(c.321C>T, p.D107D)が XMRE との連鎖が報告されている[37]。しかしながら、本研究で対象とした女性 60 名においては確認されなかった。この一塩基変異は単一家系解析により発見されたものであり、普遍的に存在するものではないと考えられる。

IVS5+169C>T 多型と男性における ABP との関連

RAS は昇圧系の亢進のみならず、交感神経の活性化や血管組織の障害等を介しても血圧上昇を引き起こすため、降圧治療における重要な標的とされている[11-13]。一方、(P)RR によるプロレニンの活性化は RAS の亢進を介して血圧上昇を引き起こし得る。また、(P)RR には RAS とは独立した組織障害作用が確認されており、この作用もまた血圧上昇の原因となり得る。実際に、遺伝子組換えラットにおける先行研究では、ヒト(P)RR の過剰発現が血圧上昇を引き起こし、同時にアルドステロン濃度が高値を示したことが確認されている[22]。

本研究で解析対象とした 3 個の SNP は、男女いずれにおいても高血圧との関連は認められなかった。しかしながら、男性において IVS5+169C>T の T 群で ABP が有意に高値を示した。先行研究における ACE I/D 多型(収縮期血圧で 3.4mmHg, [159])や AGT M235T 多型(収縮期で 1.4mmHg, [91])といった高血圧関連遺伝子多型と血圧値の関連と比較した時、24-h ABP 収縮期における 6.4 mmHg という血圧値の違いは顕著である。加えて、-782A>G と血圧にも弱い関連が認められた。-782A>G は IVS5+169C>T と比較的強い連鎖不平衡状態にあり、IVS5+169C>T の ABP との関連が-782A>G の ABP との関連に影響を与えたと考えられる。

IVS5+169C>T の ABP との関連は血圧変化の危険因子で補正後も有意であった。一方、CBP との間には有意な関連は認められなかった。CBP は、往々にして本質的な血圧値を反映せず、物理的または、精神的なストレスや環境の影響を受け易い。ABP は CBP と比較して再現性が高く、白衣効果の除去により測定者の「真」の血圧を示すと考えられている[160]。ABP との関連が認められたことは、IVS5+169C>T が本質的な血圧調節に影響を与え、高血圧性臓器障害に関与していることを示唆している。

加えて、IVS5+169C>T は、24-h ABP や昼間 ABP より夜間 ABP により強

く関連していた。(P)RR は中枢で広範に発現しており、HRP により(P)RR をブロックするとレニン誘発性に神経活性が減弱することが報告されている[161]. IVS5+169C>T が夜間 ABP により強く関連することに関して、中枢における(P)RR が何らかの役割をしている可能性が考えられる。また、いくつかの先行研究により、夜間血圧が昼間血圧より高血圧性臓器障害の予防・診断に有用であることが示されている[162-164]. 従って、夜間血圧が上昇する IVS5+169T アレル所持者では、心血管イベントや臓器障害の進展が起きやすい可能性が考えられる。

+1513A>G 多型と女性における高血圧性臓器障害との関連

LVH、頸動脈病変及び無症候性脳血管障害は、主に高血圧に付随して起こる臓器障害である[69]. しかしながら、これら臓器障害の発症には高血圧以外の因子も大きく関与していると考えられている。RAS は各組織において独自に組織構造及び機能の調節を行っているが、この組織 RAS の過剰亢進は血圧とは独立して組織障害性に働くことが明らかにされている[165, 166]. 組織 RAS の亢進は、心組織で組織の線維化及び左室リモデリングを介して心機能を低下させ、頸動脈では血管壁の線維化、炎症及びリモデリングを介して血管壁の肥厚及びプラークの形成を促進する。脳組織においても同様に、微小血管及び脳実質の障害によりラクナ梗塞の形成や WMH の進展に関与する。

一方、(P)RR は RAS を活性化することで臓器障害の進展を助長すると考えられている[15]. また、(P)RR には RAS とは独立した組織障害作用が知られており、これもまた臓器障害の進展に関与し得る[15, 21]. 先行研究において、ヒト(P)RR を過剰発現させた遺伝子組換えラットで腎糸球体硬化の促進が認められている[23]. また、(P)RR の阻害物質である HRP を用いた研究では、病態モデル動物において HRP が心筋線維化、腎糸球体硬化及び糖尿病性腎症の進行を

強く抑制したことが報告されている[24, 27, 28, 167, 168]. 更に, 一部の先行研究では, 遺伝子組み換えラット及び糖尿病マウスにおいて HRP が ACE 阻害薬よりも強い臓器障害抑制効果を示したことも確認されている[23, 167]. これらの結果から, (P)RR は臓器障害の発症及びその進行に強く関与し, 臓器障害治療の新たな標的となる可能性を秘めていると考えられる.

本研究では, 女性において+1513A>G と LVH との間に有意な関連が認められた. 本結果は, ラットにおいて HRP が心筋線維化を強く抑制したという先行研究の結果[28]と矛盾しないものであった. また, 女性において同 SNP はラクナ梗塞との関連も認められた. (P)RR と無症候性脳血管障害との関連を検討した報告はないが, 先行研究において(P)RR の脳神経細胞の成長への関与が示唆されている[37, 161].

また, 女性において+1513A>G と血圧との間に有意な関連は認められなかったこと, 一方, 収縮期血圧で補正後も+1513A>G と LVH 及びラクナ梗塞との間に有意な関連が認められたことから, (P)RR は血圧非依存的に LVH 及びラクナ梗塞に関与していると考えられる. すなわち, (P)RR の血圧非依存的な組織障害作用が臓器障害の進展に強く関与している. 一方, (P)RR は組織 RAS の活性化作用と RAS と独立した組織障害作用を併せ持つ[15]. 本研究からは, この二つの作用のうちどちらがより臓器障害の進展に関与しているかは明らかではないが, 先行研究において, HRP が ACE 阻害薬よりも強い臓器保護作用を示したことを考慮すると, (P)RR の RAS 非依存的な作用が臓器障害に関してより重要であると考えられる. しかしながら, 臓器障害の進展に対する組織 RAS の重要性も十分に証明されている[11-13, 165, 166, 169-176]. 従って, (P)RR を含めた RAS の抑制が臓器障害治療を考える上で重要であるといえる.

性差

本研究において、(P)RR 遺伝子の IVS5+169C>T 多型は男性における ABP と関連し、+1513A>G 多型は女性における高血圧性臓器障害と関連していた。本研究では、何故、(P)RR 遺伝子の SNP が男性と女性において異なる影響を示すか不明である。可能性として、第一に、「Lyon 仮説[177, 178]」と呼ばれる X 染色体のランダムな不活性化が影響しているのかもしれない。また、女性においては IVS5+169C>T の TT 型遺伝子の保有者が非常に少なく、統計学的に有意差が検出されにくいこともその原因として考えられる。第二に、性ホルモンの影響があげられる。RAS はテストステロンやエストロゲンといった性ホルモンにより性特異的な制御を受けていることが報告されている[179]。更に先行研究において、RAS 構成因子の遺伝子多型が性特異的な関連を示すことが報告されている[90]。よって、(P)RR の発現調節、発現制御等に、これらの性ホルモンが影響を与えている可能性が考えられる。第三に、この性特異的な関連は、年齢、BMI、降圧薬使用、高血圧有病率、心血管疾患既往歴といった本研究における男性と女性の臨床特性の大きな違いにより説明されるかもしれない。しかしながら、この問題を明らかにするには他人種やより大きなコホートで検討するなど更なる検討が必要である。

メカニズム

IVS5+169C>T はイントロン 5 に存在し、同領域の IVS5+45C>G と完全な連鎖不平衡を成していた。IVS5+45C>G 及び IVS5+169C>T はいずれもイントロンに存在する SNP であるため、受容体機能への直接的な影響は考えにくい。しかしながら、イントロンに存在する遺伝子多型であっても表現系との関連が認められているものは多数報告されており、これらは転写制御やスプライシングへの関与により遺伝子の発現調節に影響を与えられている

[180-182]. また, 先行研究において, ヒト(P)RR 遺伝子のエクソン 4 におけるサイレント変異(c.321C>T, p.D107D)により, エクソン 4 が欠損する(P)RR の発現を亢進し, この変異型(P)RR はレニンと結合して正常受容体と同等の酵素活性を示すが, ERK1/2 の活性は弱まると報告されている[37]. 本研究においても RACE PCR により, エクソン 4 が欠損したスプライス変異及びエクソン 4 とエクソン 5 の両方が同時に欠損したスプライス変異の存在が確認されている(Appendix Data “cDNA 全長配列の確認(p.159)”). IVS5+45C>G 及び IVS5+169C>T は(P)RR 遺伝子のエクソン 5 とイントロン 5 の結合部位のすぐ下流に位置していた. よって, これらの SNP がスプライシング活性に影響し, エクソン 4 とエクソン 5 近傍領域でのスプライシング変異を誘導している可能性が考えられる. IVS5+169T アレル保持者では, 変異型(P)RR 発現の亢進により, 結果的に活性レニンの産生量が亢進することにより血圧が上昇している可能性が考えられる.

+1513A>G は 3'-UTR に存在し, エクソン 8 の+867T>C, 3'-UTR の +1421A>T, +1916A>G 及び+1964T>C と完全な連鎖不平衡を成していた. +867T>C は翻訳領域から検出された唯一の多型であるがサイレント多型であり, 受容体機能に直接的な影響を与え得るものではなかった. このため, これら連鎖 SNP のいずれか, または連鎖型そのものが(P)RR の発現調節に関与している可能性が考えられる. 一般に, 遺伝子の 3'-UTR には転写後調節タンパク質の結合部位が存在することが知られている. 先行研究において, AT1R の 3'-UTR に存在する SNP が転写後調節への関与を介して受容体タンパク質の発現を変化させていることが示されている[183]. また, 同領域には mRNA の分解に関与するタンパク質の結合部位が存在することも報告されている[184-187]. これらより, (P)RR 遺伝子の 3'-UTR に存在する SNP は(P)RR の発現に影響を与えている可能性が考えられる.

これらのメカニズムと性ホルモン等による性特異的な制御や形質が相互に影響し合い(P)RR 遺伝子多型の性特異的な影響が現れたと考えられる。しかしながら、本研究は疫学的検討であり、詳細なメカニズムの解明には更なる基礎研究が必要である。

本研究の限界

本研究には、いくつかの限界がある。第一に、本研究は日本人のみを対象とした横断研究である。このため、他人種における再検討や、臓器障害発症との関連を検討することが可能な縦断研究の実施必要である。第二に、血漿レニン活性や血漿アルドステロン濃度等のRASの活性を示す生化学値と(P)RR 遺伝子多型との関連の検討を行っていない。第三に、(P)RR 遺伝子多型の機能解析を行っていない。これらの問題を明らかにするためには、更なる検討が必要である。

第6節 結論

血管拡張性物質であり，臓器保護性に働くと考えられる AM2/IMD は血圧値と腎機能にそれぞれ独立して関連していた．また，血管収縮性因子で，組織障害性に働くと考えられる(P)RR は，男性において IVS5+169C>T が ABP と，女性において+1513A>G が左室肥大及びラクナ梗塞と関連していた．

本研究は，ヒトにおいて AM2/IMD 遺伝子及び(P)RR 遺伝子の遺伝子多型と血圧値や腎機能などの表現型との関連を示した最初の研究である．AM2/IMD, (P)RR は臓器障害治療の新たな標的となることが期待されており，今後，ヒトにおける研究成果の集積が求められる．

第2章 心不全, 腎不全, 高血圧自然発症モデルにおける AM2/IMD, (P)RR, UII/URP/UT-R 系の発現変化の検討

第1節 背景

第1章の遺伝疫学的解析より AM2/IMD と(P)RR の遺伝子多型が心血管, 腎臓障害に関与する可能性が示唆された. しかし, これまでの先行研究の多くは AM2/IMD の投与実験や(P)RR を介した作用が病態へ関連するメカニズムを検討した研究, (P)RR 阻害物質の病態に対する効果を検討した研究などであり, AM2/IMD や(P)RR そのものが病態によってどのように発現変化を起こしているかを検討した基礎的な研究は少ない. AM2/IMD や(P)RR の病態における発現変化についてより詳しく解明することが必要である.

また, UII/URP/UT-R 系もまた, ET-1 よりも強力な血管収縮系であるにも関わらず, 病態によってどのように発現変化を起こしているかを検討した基礎的な研究は少ない.

第2節 目的

遺伝子多型解析において、血圧値、高血圧性臓器障害、腎機能に関連した AM2/IMD, (P)RR 及び強力な血管収縮作用を持つ UII/URP/UT-R 系について、心不全モデル、腎不全モデルを作製し、また、高血圧自然発症モデルを使用し、各モデルにおける心臓、血管、腎臓及びその他の臓器での発現変化を遺伝子レベル・タンパク質レベルで検討する。

第3節 方法

第1項 実験動物

実験動物の取り扱いは、国立大学法人東北大学により作成された「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」及び、the National Institutes of Health (NIH) guide for the Care and Use of Laboratory Animals に基づいて行った。

組織分布

50 mg/kg ペントバルビタール麻酔下、10 週齢 Wistar-Kyoto ラット(WKY) (雄性: 250-260 g, n = 3, 雌性: 200-210 g, n = 3, Charles River Japan, Tsukuba, Japan)から中枢及び末梢組織で摘出した。摘出した組織は、前頭葉、小脳、中脳・橋、脊髄、下垂体、視床下部、海馬、線条体、嗅球、心房、心室、大動脈、肺、胃、肝臓、膵臓、小腸、大腸、腎臓、副腎、胸腺、脾臓、精巣、卵巣、前脛骨筋、褐色脂肪組織、白色脂肪組織である。褐色脂肪組織は肩甲骨間より、白色脂肪組織は生殖器周囲より摘出した。卵巣及び大動脈のみ雌ラットより摘出し、残りの組織は雄ラットより摘出した。摘出後、直ちに液体窒素で凍結し、RNA 抽出を行うまで -80°C で保存した。

心不全モデル

心不全(CHF; chronic heart failure)ラットは先行研究に準じ[188-191], 左冠動脈を結紮することにより作製した(Appendix Data “実験動物(p.183)”). 術後 8 週後、麻酔下で心房、心室、腎臓を摘出した。摘出の際、偽手術(SO; Sham-operation)ラット(n = 6)及びCHF ラット(n = 8)共に心室は右心室と左心室に分けた。さらに、CHF ラットでは左心室を非梗塞領域と梗塞領域に分けた。梗塞領域は、肉眼的に薄く硬い部分とその周囲とし、境界領域は梗塞領

域に分類した。摘出後、一部を染色用に残し、直ちに液体窒素で凍結し、RNA抽出を行うまで -80°C で保存した。染色用の組織は10%ホルマリンで固定した後、パラフィンに包埋した。

5/6 腎摘腎不全モデル

5/6NPX (5/6 nephrectomized)ラットは先行研究に準じ[192-194]、右腎の2/3 と全左腎を結紮することにより作製した(Appendix Data “実験動物 (p.183)”)。SO ラット、5/6NPX ラット共に、術後3日、14日、56日において、麻酔下、腎臓を摘出した。5/6NPX ラットにおいて、術後3日目は急性腎不全期、14日目は代償性腎肥大極大期、56日目は慢性腎不全期に当たる。サンプル数は、全て $n = 6$ である。摘出後、一部を染色用に残し、直ちに液体窒素で凍結し、RNA抽出を行うまで -80°C で保存した。染色用の組織は10%ホルマリンで固定した後、パラフィンに包埋した。

高血圧自然発症モデル

高血圧モデルは高血圧自然発症ラット(SHR; spontaneously hypertensive rat)を使用し、対照として同週齢WKYを用いた。50 mg/kg ペントバルビタール麻酔下、5、8、12、16週齢雄性SHR及びWKYの心房、心室、腎臓を摘出した。摘出後、直ちに液体窒素で凍結し、RNA抽出を行うまで -80°C で保存した。サンプル数は、全て $n = 6$ である。

加えて、8週齢のSHR及びWKYラットにおいてその腎臓を髄質内層、髄質外層、皮質、糸球体に分画した。分画後、直ちに液体窒素で凍結し、RNA抽出まで -80°C で保存した。

第2項 RNAの抽出

RNAの抽出は, acid guanidinium thiocyanate-phenol/chloroform (AGPC) 法[195-197]及び guanidinium isothiocyanate-caesium chloride (GITC/CsCl) 法[198]を用いた. AGPC 法による RNA 抽出は組織分布用 RNA サンプルの抽出に, GITC/CsCl 法による RNA 抽出は定量的 RT-PCR 用 RNA サンプルの抽出にそれぞれ用いた(Appendix Data “RNA 抽出(p.187)”). 抽出後, total RNA 溶液 1 μ L を滅菌水で 100 倍に希釈し, RNA 濃度を吸光光度計で測定した. total RNA 溶液は, 逆転写反応を行うまで -80°C で保存した.

第3項 タンパク質の抽出

タンパク質の抽出は先行研究[199]に準じて行った. まず, 組織を 3 mL の抽出溶液(pH 7.7, 10 mmol/L KCl, 250 mmol/L スクロース, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride)に加え, 直ちにホモジナイズした. このホモジネート溶液を 3000 g で 5 分間遠心した後, 上清を遠心チューブ (Falcon 2059)に移した. さらに 9000 g で 15 分間遠心した後, 上清をチューブに移しタンパク質溶液とした. サンプルのタンパク質濃度は Bradford 法 [200]を用いて測定した. その際, スタンダードとしてウシ γ グロブリンを用いた. この溶液は, 直ちに液体窒素で凍結し, sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE を行うまで -80°C で保存した.

第4項 RT-PCR

逆転写反応

逆転写反応は先行研究[188-190, 192, 201, 202]に準じた. total RNA 4 μ g を含む 8 μ L total RNA 溶液(Table 2-1(A))を 65°C で 5 分間インキュベートした後, 氷上で急冷した. 次いで, 反応組成液(Table 2-1(B))を 37°C で 2 分間

Table 2-1. 逆転写反応溶液.

(A) total RNA 溶液		
total RNA		4 µg
滅菌水		適量
総量		8 µL
(B) 反応組成液		
5x Buffer		4 µL
500 µg/mL oligo-dT ₁₂₋₁₈		1 µL
10mM dNTPs Mix		2 µL
滅菌水		1 µL
ReverTra Ace		4 µL
総量		12 µL
(C) 逆転写反応溶液		
(A) total RNA 溶液		8 µL
(B) 反応組成液		12 µL
総量		20 µL

インキュベートした後, 400 units Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (ReverTra Ace, TOYOBO, Osaka, Japan)を加え急冷した. この反応組成液を total RNA 溶液に加え, 総量 20 µL (200 ng/µL total RNA, Table 2-1(C))として 42°C で 60 分間インキュベートした. インキュベート後, 95°C で 5 分熱処理して MuMLV-RTase を失活させ, 滅菌水 30 µL を加え, 1st strand cDNA 溶液(80 ng/µL total RNA)とし, PCR を行うまで -30°C で保存した.

組織分布

AM2/IMD, (P)RR, UII/URP/UT-R, それぞれ系を構成するペプチドについて, ラット中枢及び末梢組織におけるそれらの mRNA の発現を確認した. 組織

Table 2-2. 組織分布で使用した PCR 反応溶液.

80 ng/μL 1st strand cDNA 溶液	1.00 μL
10x PCR Buffer	2.00 μL
10 mM MgCl ₂	4.00 μL
10 mM dNTPs Mix	0.40 μL
10 μM forward primer	0.50 μL
10 μM reverse primer	0.50 μL
滅菌水	11.52 μL
10 U/μL GoTaq DNA polymerase	0.08 μL
総量	20.0 μL

分布用に抽出した各組織より作製した 1st strand cDNA 溶液を用い, 総量 20 μL (Table 2-2)で 30 サイクル(UII, URP のみ 40 サイクル)の PCR を行った. primer 及び反応条件は, 後述する“定量的 RT-PCR”と同様に行った. 内標準として, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を使用した.

定量的 RT-PCR

先行研究に準じ, 定量的 RT-PCR により mRNA 発現量を定量した[188-190, 201-205]. 定量的 RT-PCR には, 目的とするペプチドの cDNA 配列を増幅する primer と同一の primer で増幅する塩基数の異なる mutant DNA (competitive reference standard (CRS)-DNA)を使用し, PCR を競合させる方法を用いた(CQ-PCR; competitive quantitative RT-PCR, Appendix Data “CQ-PCR(p.189)”).

1. AM2/IMD

心不全モデル, 5/6 腎摘腎不全モデル, 高血圧自然発症モデルにおいて,

Table 2-3. CQ-PCR で使用した PCR 反応溶液.

80 ng/ μ L 1st strand cDNA 溶液	1.00 μ L
CRS-DNA (Arbitrary units)	2.00 μ L
10x PCR Buffer	2.00 μ L
10 mM MgCl ₂	4.00 μ L
10 mM dNTPs Mix	0.40 μ L
10 μ M forward primer	0.50 μ L
10 μ M reverse primer	0.50 μ L
滅菌水	9.52 μ L
10 U/ μ L GoTaq DNA polymerase	0.08 μ L
総量	20.0 μ L

AM2/IMD, AM, CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3 の CQ-PCR を行った. それぞれの mRNA 発現量は, 内標準物質の mRNA 発現量で除することにより標準化した. 内標準物質として使用される housekeeping gene も虚血や肥大等の組織障害・構造変化により, その mRNA 発現量が変わるため, それぞれのモデル毎に選択した(Appendix Data "Housekeeping gene(p.192)"). 心不全モデルでは ribosomal protein L32 (RPL32) の mRNA 発現量が最も安定していたため RPL32 を内標準物質とした. 一方, 5/6 腎摘腎不全モデル, 高血圧自然発症モデルでは, housekeeping gene 間で明確な差が認められなかったため汎用されている GAPDH を内標準物質とした.

AM2/IMD, AM, CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3 の CRS-DNA は, mutant DNA 作製法またはその変法を用いて作製した. それぞれの CRS-DNA の長さ, CQ-PCR に使用した primer を Table 2-4 に示す. Table 2-3 の反応溶液を使用して CQ-PCR を行った(Appendix Data "CQ-PCR の反応条件(p.194)").

Table 2-4. AM2/IMD の CQ-PCR で使用した primer 配列.

Gene	Sequence (5'-3')	cDNA/CRS*	GenBank
Adrenomedullin 2/intermedin			
Forward	CAGACAACAGACGCAGCCCAG	648 bp	NM_201416
Reverse	GGCCCCTGTTGGTGCTGAATC	/372 bp	
Adrenomedullin			
Forward	TCAGCAGGGTATCGGAGCATC	806 bp	NM_012715
Reverse	GGCAAGGCAGTGGCTCAGAC	/533 bp	
Calcitonin receptor-like receptor			
Forward	GCAGCAGAGTCGGAAGAAGG	533 bp	NM_012717
Reverse	GCCACTGCCGTGAGGTGA	/395 bp	
Receptor activity-modifying protein 1			
Forward	GCTGCTGGCTCATCATCTCT	415 bp	NM_031645
Reverse	CACCTGGGACACCTACACGA	/323 bp	
Receptor activity-modifying protein 2			
Forward	GCAACTGGACTTTGATTAGCAG	194 bp	NM_031646
Reverse	GGCCAGAAGCACATCCTCT	/154 bp	
Receptor activity-modifying protein 3			
Forward	ACCTGTCGGAGTTCATCGTGTA	147 bp	NM_020100
Reverse	CCACAGTGCAGTTGGAAAAGAA	/111 bp	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase			
Forward	GTGAAGGTCGGTGTGAACGGATT	984 bp	NM_017008
Reverse	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	/721 bp	
Ribosomal protein L32			
Forward	AAGTTCATCAGGCACCCAGTC	279 bp	NM_013226
Reverse	GATGGCTTTTCGGTTCTTAG	/219 bp	

* PCR 産物の長さ(上段 : cDNA 由来, 下段 : CRS-DNA 由来).

Table 2-5. (P)RR の CQ-PCR で使用した primer 配列.

Gene	Sequence (5'-3')	cDNA/CRS*	GenBank
(Pro)renin receptor			
Forward	CCATGGCTGTGCTTGTCGTTCTC	958 bp	AB188298
Reverse	AAGGCCAAGCCAGTCATAATCCAC	/765 bp	
Renin			
Forward	CGAGGTGCTAAAGGAGGAAGTG	551 bp	NM_012642
Reverse	ACCCGATGCGATTGTTATGC	/401 bp	

* PCR 産物の長さ(上段 : cDNA 由来, 下段 : CRS-DNA 由来).

2. (P)RR

心不全モデル, 5/6 腎摘腎不全モデル, 高血圧自然発症モデルにおいて, (P)RR, renin の CQ-PCR を行った. それぞれの mRNA 発現量は, 内標準物質の mRNA 発現量で除することにより標準化した. 内標準物質は, “1. AM2/IMD (p.93)”と同様に, 心不全モデルでは RPL32 を, 5/6 腎摘腎不全モデル, 高血圧自然発症モデルでは, GAPDH を使用した.

(P)RR, renin の CRS-DNA は, mutant DNA 作製法またはその変法を用いて作製した. Table 2-5 の CRS-DNA, primer, Table 2-3 の反応溶液を使用して CQ-PCR を行った(Appendix Data “CQ-PCR の反応条件(p.194)”).

3. UII/URP/UT-R

心不全モデル, 5/6 腎摘腎不全モデル, 高血圧自然発症モデルにおいて, UII, URP, URP, ET-1 の CQ-PCR を行った. それぞれの mRNA 発現量は, 内標準物質の mRNA 発現量で除することにより標準化した. 内標準物質は, “2. AM2/IMD (p.93)”と同様に, 心不全モデルでは RPL32 を, 5/6 腎摘腎不全モデル, 高血圧自然発症モデルでは, GAPDH を使用した.

Table 2-6. UII/URP/UT-R の CQ-PCR で使用した primer 配列.

Gene	Sequence (5'-3')	cDNA/CRS*	GenBank
Urotensin II			
Forward	GGAAGCCTAGGCCAGGCAGATC	247 bp	NM_019160
Reverse	TGGCACGATTTTTCTTCAAGCATCT	/165 bp	
Urotensin II-related peptide			
Forward	AAAGAGTGCTGAGCCGTCCAATG	404 bp	NM_198133
Reverse	GCAGACTTCAGGCGAGCATACAAC	/321 bp	
Urotensin II receptor			
Forward	GGTGTTCATCGGGGCAGTGCTCTC	877 bp	NM_047345
Reverse	TCCCTGGGCTGTGGCAACTACTA	/731 bp	
Endothelin-1			
Forward	CTCTCTGCTGTTTGTGGCTTTC	586 bp	NM_012548
Reverse	TCAATGTGCTCGGTTGTGTATC	/401 bp	

* PCR 産物の長さ(上段 : cDNA 由来, 下段 : CRS-DNA 由来).

UII, URP, URP, ET-1 の CRS-DNA は, mutant DNA 作製法またはその変法を用いて作製した. Table 2-5 の CRS-DNA, primer, Table 2-3 の反応溶液を使用して CQ-PCR を行った(Appendix Data "CQ-PCR の反応条件(p.194)").

第5項 免疫組織学的検討

抗体

1. AM2/IMD

東北大学大学院医学系研究科内分泌応用医科学分野教授 高橋 和広先生より提供された抗 AM2/IMD 血清を使用した. この抗 AM2/IMD 血清は, 合成ヒト AM2/IMD₁₇₋₄₇ (ヒト AM2/IMD₁₋₄₇ の 17-47 残基の 30 残基からなる合成アミノ酸(カスタム合成), Qiagen, Valencia, CA)を抗原としてウサギに免疫する

ことで作製した。また、抗 AM2/IMD 血清の特性については、先行研究[5, 206]に記載されている。AM, CGRP, calcitonin, amylin 等の他のペプチドとの交差性は 0.001%以下であった(Appendix Data “抗体の特性(p.196)”)。

2. (P)RR

(P)RR に対する抗体は、合成ヒト(P)RR₂₂₄₋₂₃₇ (ヒト(P)RR の 224-237 残基の 14 残基からなる合成アミノ酸(カスタム合成); TaKaRa, Otsu, Japan)を抗原としてウサギに免疫することで作製した(Appendix Data “抗体の特性(p.196)”)。ヒト(P)RR の 224-237 残基のアミノ酸配列は、ラット(P)RR の 223-236 残基のアミノ酸配列と 100%の相同性を持っている。

また、ウエスタンブロットの内標準として、抗 α -tubulin マウスモノクローナル抗体 (sc-5286; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を用いた。

3. UII/URP/UT-R

市販の抗 UII ウサギ血清(14365-v; Peptide Institute, Osaka, Japan), 抗 URP ウサギ血清(H-071-17; Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA), 抗 UT-R ヤギ IgG (sc-10194; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を使用した。

ウエスタンブロット

5/6 腎摘腎不全モデルにおける(P)RR タンパク質の発現を検討するためにウエスタンブロットを行った。

ウエスタンブロットは先行研究に準じ行った[199]。SDS-PAGE (12% SDS polyacrylamide gel, 2 時間・150 V)を行った後、転写バッファー(25 mmol/L Tris HCl, 192 mmol/L グリシン, 20%メタノール)を用いてニトロセルロース

メンブレンにタンパク質を電氣的(4°C・1時間・100 V)に転写した。転写したメンブレンを, TSBT-20 バッファー(10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.08% Tween 20, 10%脱脂粉乳)でブロッキングした(4°C・overnight)後, 一次抗体と2時間反応させた。TSBT-20 バッファーで数回洗浄した後, 二次抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)と1時間反応させた。TSBT-20 バッファーで数回洗浄した後, キット(ECL; Amersham, Arlington Heights, IL)を用いて発色させた。

一次抗体として, 抗(P)RR 血清(1:4000), 抗 α -tubulin マウスモノクローナル抗体(1:200)を使用した。シグナル強度の計測には Scion Image Beta 4.02 for Windows 95 to XP software を使用し, (P)RR のシグナル強度を α -tubulin のシグナル強度で除することで標準化した。

免疫組織染色

病態モデルの各組織における AM2/IMD, (P)RR, UII/URP/UT-R のタンパク質発現を確認するために免疫組織染色を行った。

免疫組織染色は Vector ABC kit (vector Laboratories, Burlingame, CA)を用いた ABC 法により行い, 先行研究に準じた[5, 6, 206-208]。1.5 μ m の組織のパラフィン切片を脱パラフィンし, キシレンからエタノールに水和した後, 内在性ペルオキシダーゼ活性を除去するため 0.3% H_2O_2 を含んだメタノールで30 分間インキュベートした。エタノール濃度を段階的に下げて水和し, phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4)で3 回洗浄した後, 非特異的染色の予防のため切片にブロッキング用正常血清(1:20)を滴下し30 分間反応させた。ブロッキング用正常血清には, 二次抗体を作製した動物と同じ動物種の血清を用いた。ブロッキング後, PBS (pH 7.4)で3 回洗浄した切片に一次抗体を滴下して4°Cで20 時間インキュベートした。PBS で3 回洗浄した後, ビオチン標識

した二次抗体(1:400)を室温で 30 分間インキュベートした。ビオチン標識した二次抗体として、一次抗体を作製した動物種の IgG に対する抗体でビオチン標識された抗体を使用した。PBS で 3 回洗浄した後、ABC 試薬(アビジン、ペルオキシダーゼ標識ビオチン)で 30 分間インキュベートした。これらの切片は 3,3'-diaminobenzidine solution (0.01 mol/L 3,3'-diaminobenzidine in 0.05 mol/L Tris-HCl buffer (pH 7.6) and 0.006% H₂O₂)で浸水することで可視化した。使用した一次抗体の条件を Table 2-7 に示す。

第 6 項 統計解析

統計解析には、R version 2.8.1 (a language for data analysis and graphics [209]; Vienna, Austria)を使用し、検定には student *t*-test, ANOVA, scheffe 法による多重比較等を適宜用い、推定には一般線形回帰式を用いた。値は平均 (mean) ± 標準誤差(SEM; standard error)で示し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

Table 2-7. 免疫組織染色で使用した一次抗体.

Adrenomedulin 2/intermedin (ウサギ血清, 自家抗体)

希釈倍率 : 1:2000

ブロッキング: 正常ヤギ血清

コントロール: 正常ウサギ血清

二次抗体 : ビオチン化抗ウサギ IgG (ヤギ)

(Pro)renin receptor (ウサギ血清, 自家抗体)

希釈倍率 : 1:500

ブロッキング: 正常ヤギ血清

コントロール: 正常ウサギ血清

二次抗体 : ビオチン化抗ウサギ IgG (ヤギ)

UII (ウサギ血清, Peptide Institute)

希釈倍率 : 1:1000

ブロッキング: 正常ヤギ血清

コントロール: 正常ウサギ血清

二次抗体 : ビオチン化抗ウサギ IgG (ヤギ)

URP (ウサギ血清, Phoenix Pharmaceuticals)

希釈倍率 : 1:1000

ブロッキング: 正常ヤギ血清

コントロール: 正常ウサギ血清

二次抗体 : ビオチン化抗ウサギ IgG (ヤギ)

UT-R (ヤギ IgG, Santa Cruz)

希釈倍率 : 1:100

ブロッキング: 正常ウサギ血清

コントロール: 正常ヤギ IgG

二次抗体 : ビオチン化抗ヤギ IgG (ウサギ)

第4節 結果

第1項 AM2/IMD

組織分布

Figure 2-1 に AM2/IMD, AM, CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3, 内標準 (GAPDH) の mRNA の発現分布を示す。PCR により目的のシグナルが得られ、シーケンスにより目的の cDNA 配列であることが確認された。

30 サイクルの RT-PCR では、強い AM2/IMD mRNA の発現が腎臓、脾臓、胃、卵巣で認められた。また、一部の中枢(小脳、下垂体、視床下部)及び末梢組織(副腎、肝臓、小腸、大腸、肺、食道、胸腺、精巣、眼)において弱い発現が認められた。更に、35 サイクルの RT-PCR を行ったところ、AM2/IMD mRNA の発現が今回検討した全ての中枢及び末梢組織で確認された(data not shown)。

一方、AM, CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3 の mRNA の発現は、30 サイクルの RT-PCR で今回検討した全ての中枢及び末梢組織で認められた。

定量的 RT-PCR

1. 心不全モデル

CHF ラットにおける AM2/IMD mRNA の発現量は、SO ラットと比較して、心房で約 2.8 倍($P < 0.001$), 右心室で約 1.7 倍($P = 0.01$), 左心室非梗塞領域で約 1.7 倍($P = 0.02$), 左心室梗塞領域で約 2.5 倍($P < 0.001$)と有意に上昇していた(Figure 2-2(A))。また、腎臓における AM2/IMD mRNA の発現量は、心臓に比べ、約一万倍と著しく高値を示した。しかし、CHF ラットと SO ラット間で AM2/IMD mRNA の発現量に変化はなかった($P = 0.8$)。

心臓において AM mRNA は、AM2/IMD mRNA より豊富に存在していたが、CHF ラットでの mRNA 発現量の亢進は AM2/IMD 程顕著ではなかった。CHF ラットにおける AM mRNA の発現量は、SO ラットと比較して、心房で約 1.4



Figure 2-1. AM2/IMD, AM, CRLR, RAMP1~3 の mRNA の組織分布.

倍($P = 0.04$), 右心室で約 1.3 倍($P = 0.007$), 左心室非梗塞領域で約 1.6 倍($P = 0.03$), 左心室梗塞領域で約 1.9 倍($P < 0.001$)と有意に上昇していた(Figure 2-2(B)). 腎臓における AM mRNA の発現は, 心臓の約 1/2 であり, AM2/IMD mRNA 程の顕著な差は認められなかった. また, 腎臓では CHF ラットと SO ラット間に AM mRNA の発現量の変化は認められなかった($P = 0.09$).

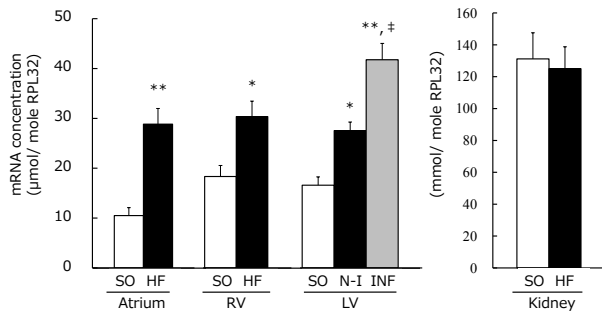
CHF ラットにおける CRLR mRNA の発現量は, SO ラットと比較して, 心房で約 1.5 倍($P = 0.02$), 左心室梗塞領域で約 1.5 倍($P = 0.01$)と有意に上昇していた(Figure 2-2(C)). RAMP1 mRNA の発現量は, SO ラットと比較して, 心房で約 1.9 倍($P < 0.001$), 右心室で約 1.4 倍($P = 0.01$), 左心室梗塞領域で約 2.6 倍($P < 0.001$)と有意に上昇していた(Figure 2-2(D)). RAMP2 mRNA の発現量は, SO ラットと比較して, 心房で約 1.3 倍($P < 0.001$), 左心室梗塞領域で約 1.8 倍($P = 0.008$)と有意に上昇していた(Figure 2-2(E)). RAMP3 mRNA の発現量は, SO ラットと比較して, 左心室梗塞領域で約 1.6 倍($P = 0.03$)と有意に上昇していた(Figure 2-2(F)).

2. 5/6 腎摘腎不全モデル

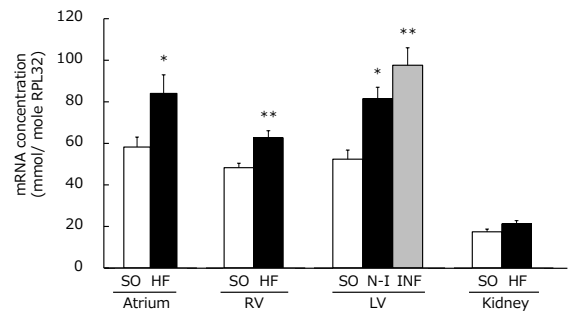
Figure 2-3 に 5/6 腎摘腎不全モデル腎臓における AM2/IMD, AM 及び受容体構成因子の mRNA 発現量を示す.

5/6NPX ラットにおける AM2/IMD mRNA 発現量は, SO ラットと比べ, 急性腎不全期の術後 3 日目(約 55%, $P = 0.002$)と慢性腎不全期の術後 56 日目(約 27%, $P < 0.001$)で有意に低値を示した(Figure 2-3(A)). 一方, 代償性肥大期の術後 14 日目(約 92%, $P = 0.6$)では有意な差はなかった. また, 5/6NPX ラット間において, 代償性肥大期(術後 14 日目)に比べ, 慢性腎不全期(術後 56 日目)の AM2/IMD mRNA 発現量が有意に減少していた(約 18%, $P = 0.001$). 腎臓における AM2/IMD mRNA は, AM mRNA より豊富に存在していた.

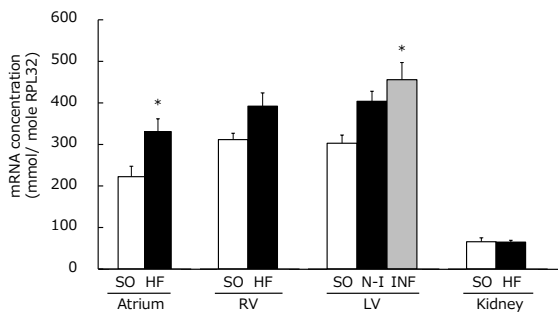
(A) AM2/IMD



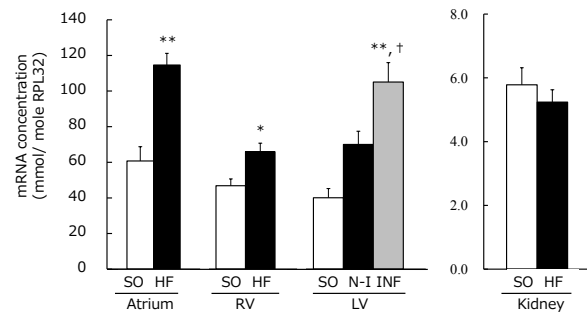
(B) AM



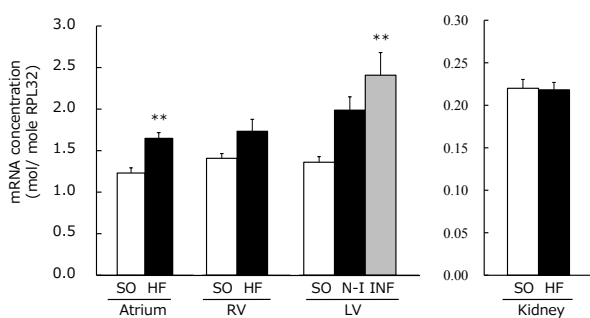
(C) CRLR



(D) RAMP1



(E) RAMP2



(F) RAMP3

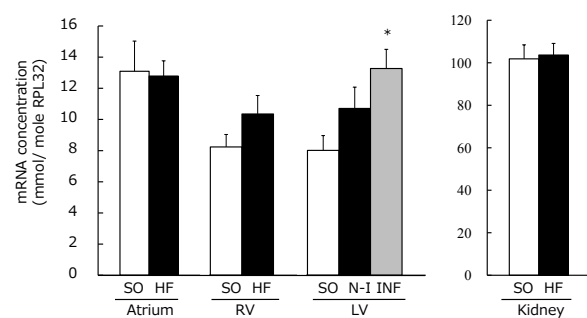


Figure 2-2. 心不全モデル(CHF)ラット及び偽手術(SO)ラットの心臓, 腎臓における AM2/IMD, AM, CRLR, RAMP1~3 の mRNA 発現. N-I:CHF ラット左心室非梗塞領域, INF:CHF ラット梗塞領域, RV:右心室, LV:左心室. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs SO ラット; † $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$, vs N-I.

5/6NPX ラットにおける AM mRNA 発現量は、SO ラットと比べ、術後 3 日目(約 46%, $P < 0.001$)で有意に減少し、術後 56 日目(約 2.0 倍, $P = 0.003$)では有意に増加していた(Figure 2-3(B)). 一方、術後 14 日目(約 1.0 倍, $P = 0.001$)では有意な差はなかった。また、5/6NPX ラット間において、術後 14 日目に比べ、術後 56 日目の AM mRNA 発現量が有意に増加していた(約 1.7 倍, $P = 0.003$).

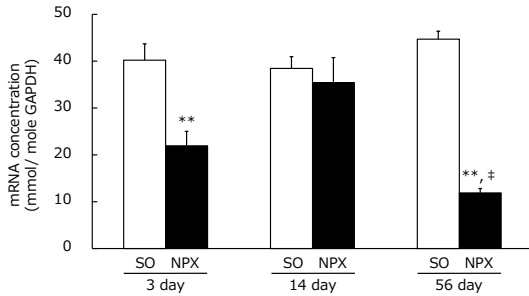
5/6NPX ラットにおける CRLR, RAMP1, RAMP2 の mRNA 発現量は、SO ラットと比べ、術後 3 日目(CRLR : 約 1.6 倍, RAMP1 : 約 9.0 倍, RAMP2 : 約 2.4 倍), 14 日目(CRLR : 約 1.9 倍, RAMP1 : 約 10.8 倍, RAMP2 : 約 1.5 倍), 56 日目(CRLR : 約 2.1 倍, RAMP1 : 約 26.4 倍, RAMP2 : 約 2.8 倍)で有意に増加していた(Figure 2-3(C)-(E)). 一方、RAMP3 mRNA 発現量は、いずれの段階においても有意な差は認められなかった(Figure 2-3(F)).

3. 高血圧自然発症モデル

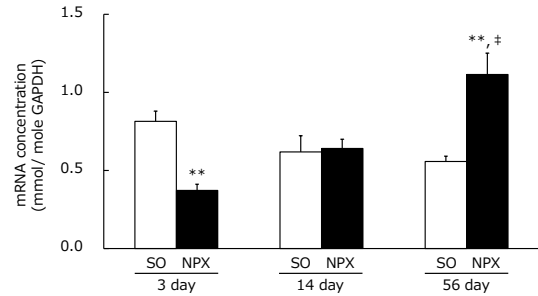
SHR 及び WKY の心臓では AM2/IMD mRNA の発現に有意な差は認められなかった(WKY 心房 : $23.8 \pm 6.3 \mu\text{mol/mole GAPDH}$, SHR 心房 : $28.4 \pm 8.7 \mu\text{mol/mole GAPDH}$, $P = 0.9$, WKY 心室 : $6.2 \pm 0.7 \mu\text{mol/mole GAPDH}$, SHR 心室 : $7.8 \pm 1.3 \mu\text{mol/mole GAPDH}$, $P = 0.6$).

一方、SHR 腎臓、WKY 腎臓間では AM2/IMD mRNA の発現量に差が認められた(Figure 2-4(A)). SHR における AM2/IMD mRNA の発現量は、WKY に比べ、腎臓組織の各分画で有意に減少していた(腎髄質内層:約 34%, $P < 0.001$, 腎髄質外層 : 約 27%, $P < 0.001$, 腎皮質 : 約 58%, $P < 0.001$, 糸球体 : 約 53%, $P < 0.001$). また、WKY と SHR どちらにおいても腎皮質における AM2/IMD の mRNA 発現量が他の 2 分画(腎髄質内層, 外層)比べ有意に高値であった。糸球体における AM2/IMD の発現量に、他の分画と顕著な差は認めら

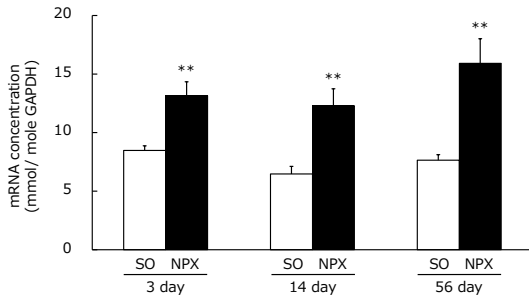
(A) AM2/IMD



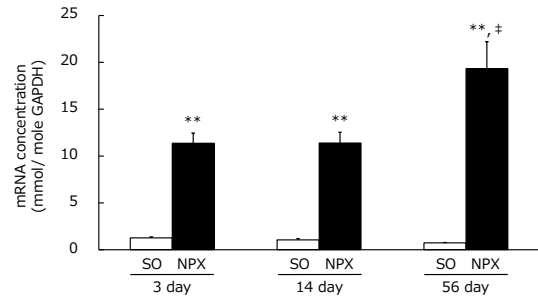
(B) AM



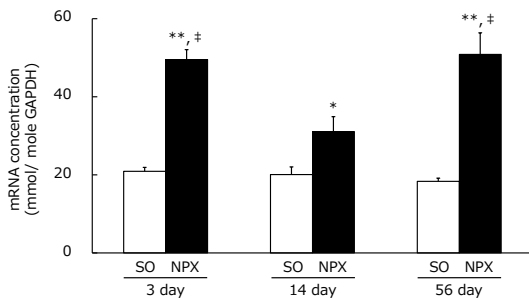
(C) CRLR



(D) RAMP1



(E) RAMP2



(F) RAMP3

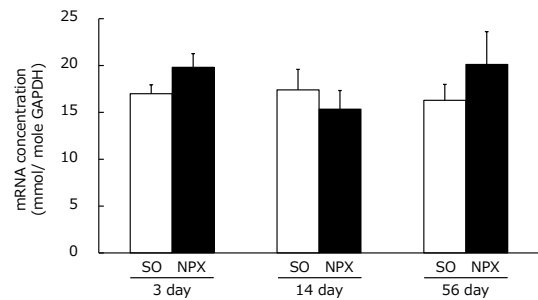
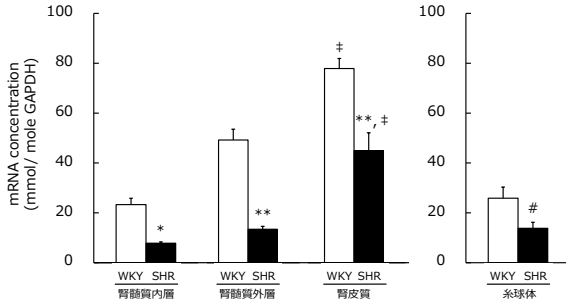


Figure 2-3. 5/6 腎摘腎不全(5/6NPX)モデル及び偽手術(SO)ラットの腎臓における AM2/IMD, AM, CRLR, RAMP1~3 の mRNA 発現. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 同週齢 SO ラット; † $P < 0.01$, vs 5/6NPX ラット術後 14 日目.

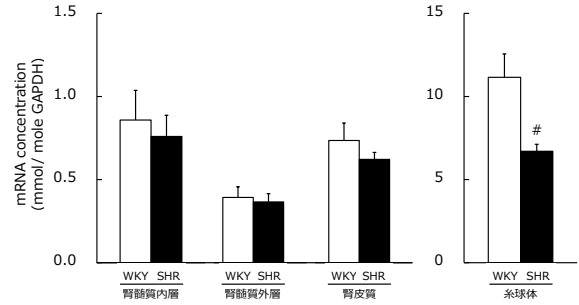
れなかった。

腎臓分画における AM 及び受容体構成因子の mRNA 発現パターンは、AM2/IMD mRNA の発現パターンと大きく異なっていた(Figure 2-4(B)-(F)). 特に、糸球体における AM 及び受容体構成因子の mRNA 発現量は、他の分画の発現量の約 10 倍となっていた。また、腎臓組織の 3 分画(腎髄質内層、腎髄質外層、腎皮質)では、WKY と SHR 間で mRNA の発現量に有意な差は認められなかったが、SHR の糸球体における AM (約 60%, $P = 0.01$), CRLR (約 56%, $P = 0.04$), RAMP2 (約 65%, $P = 0.03$)の mRNA 発現量は、WKY に比較して有意に減少していた。

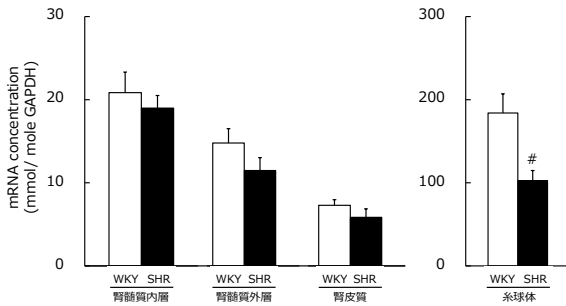
(A) AM2/IMD



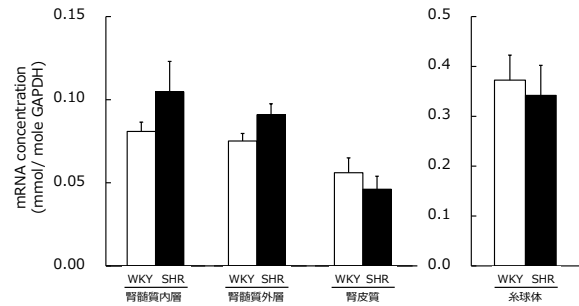
(B) AM



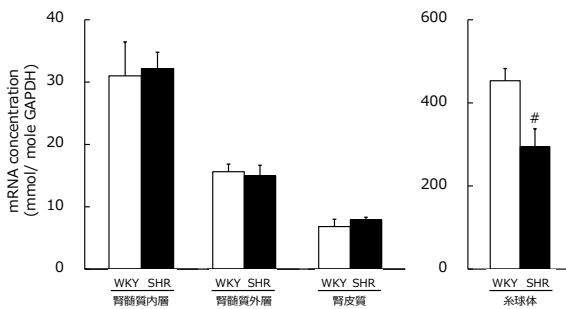
(C) CRLR



(D) RAMP1



(E) RAMP2



(F) RAMP3

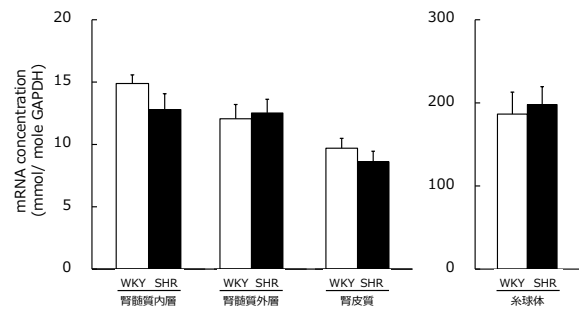


Figure 2-4. 高血圧自然発症モデル(SHR)及び対象ラット(WKY)の腎臓分画におけるAM2/IMD, AM, CRLR, RAMP1~3のmRNA発現. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs WKY (同分画); † $P < 0.01$, vs 他の分画; # $P < 0.05$, vs WKY (糸球体).

免疫組織学的検討

1. 心不全モデル

SO ラット(Figure 2-5(A), (C), (E), (I)), CHF ラット(Figure 2-5(B), (D), (F), (G), (H), (I))共に, 心筋線維で AM2/IMD 様免疫反応性が広範に認められた. SO ラットにおいて心膜側の内側で帯状に免疫反応性の弱い領域が認められ(Figure 2-5(A), (C), (E)), この領域は CHF モデルにおいて拡大していた(Figure 2-5(B), (D), (F)). また, 梗塞領域では, 線維化した梗塞壁は染色が弱く, この線維化した部分を挟み込むように生き残っている心筋細胞に免疫反応性が認められた(Figure 2-5(G), (H)). 血管については, SO ラットで血管平滑筋に弱い免疫反応性が認められ(Figure 2-5(I)), CHF モデルで AM2/IMD 様免疫反応性が増強していた(Figure 2-5(J)).

2. 5/6 腎摘腎不全モデル

術後 56 日目の 5/6NPX ラット(Figure 2-6(B), (D), (F))及び同週齢 SO ラット(Figure 2-6(A), (C), (E))の共に, 近位尿細管, 遠位尿細管, 集合管で AM2/IMD 様免疫反応性が広範に認められた. また, SO ラットに比べ, 5/6NPX ラットの遠位尿細管で AM2/IMD 様免疫反応性が増強していた. 腎動脈では, SO ラット(Figure 2-6(G)), 5/6NPX ラット(Figure 2-6(H))共に, AM2/IMD 様免疫反応性がまばらに血管平滑筋で認められた. 糸球体では, 5/6NPX ラット(Figure 2-6(J))でまばらに AM2/IMD 様免疫反応性が認められたが, SO ラット(Figure 2-6(I))では AM2/IMD 様免疫反応性が認められなかった.

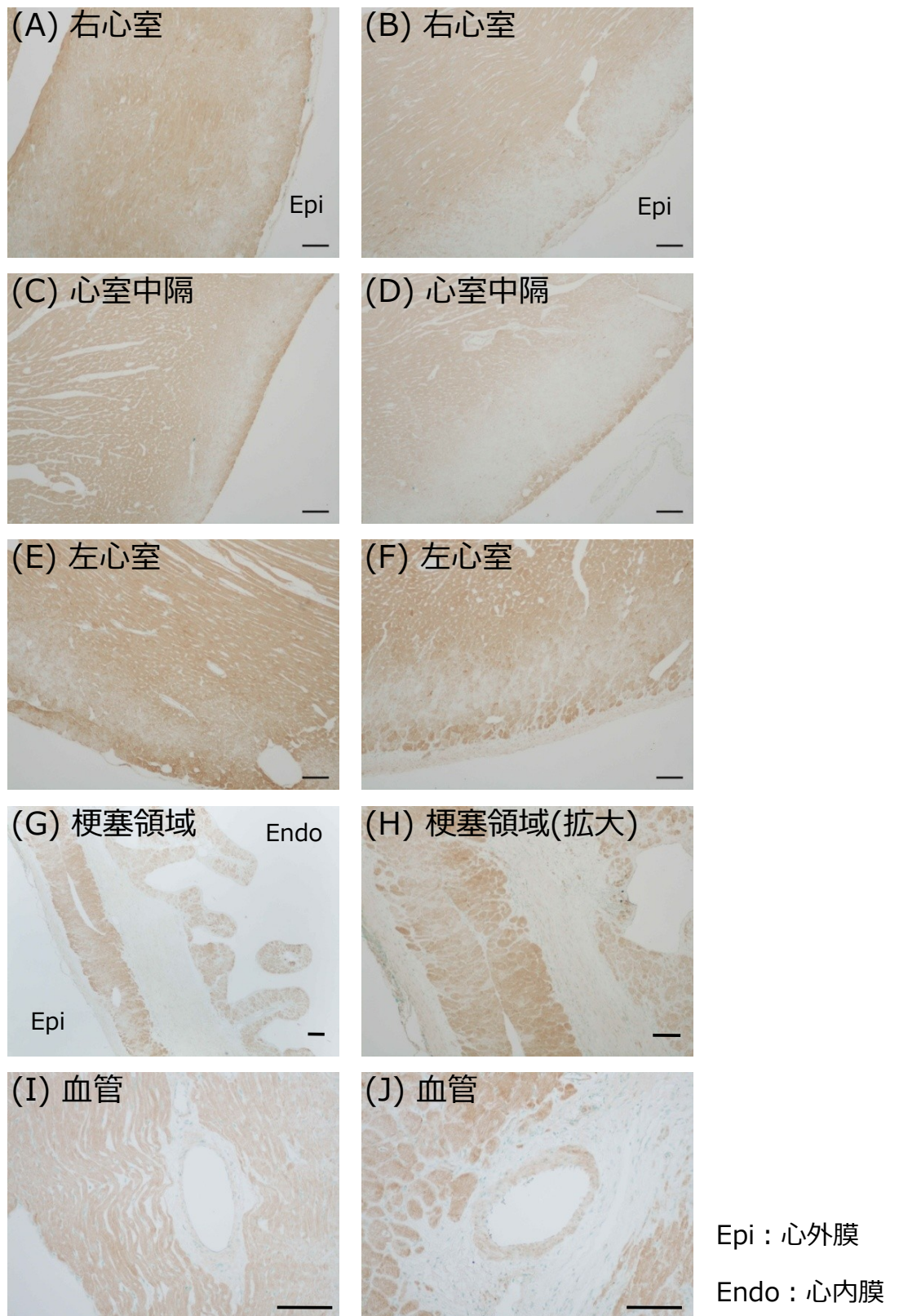


Figure 2-5. 心不全(CHF)モデル及び偽手術(SO)ラットの心臓におけるAM2/IMDの免疫染色. (A), (C), (E), (I) : SOラット, (B), (D), (F), (G), (H), (I) : CHFラット. Bar = 100 μ m.

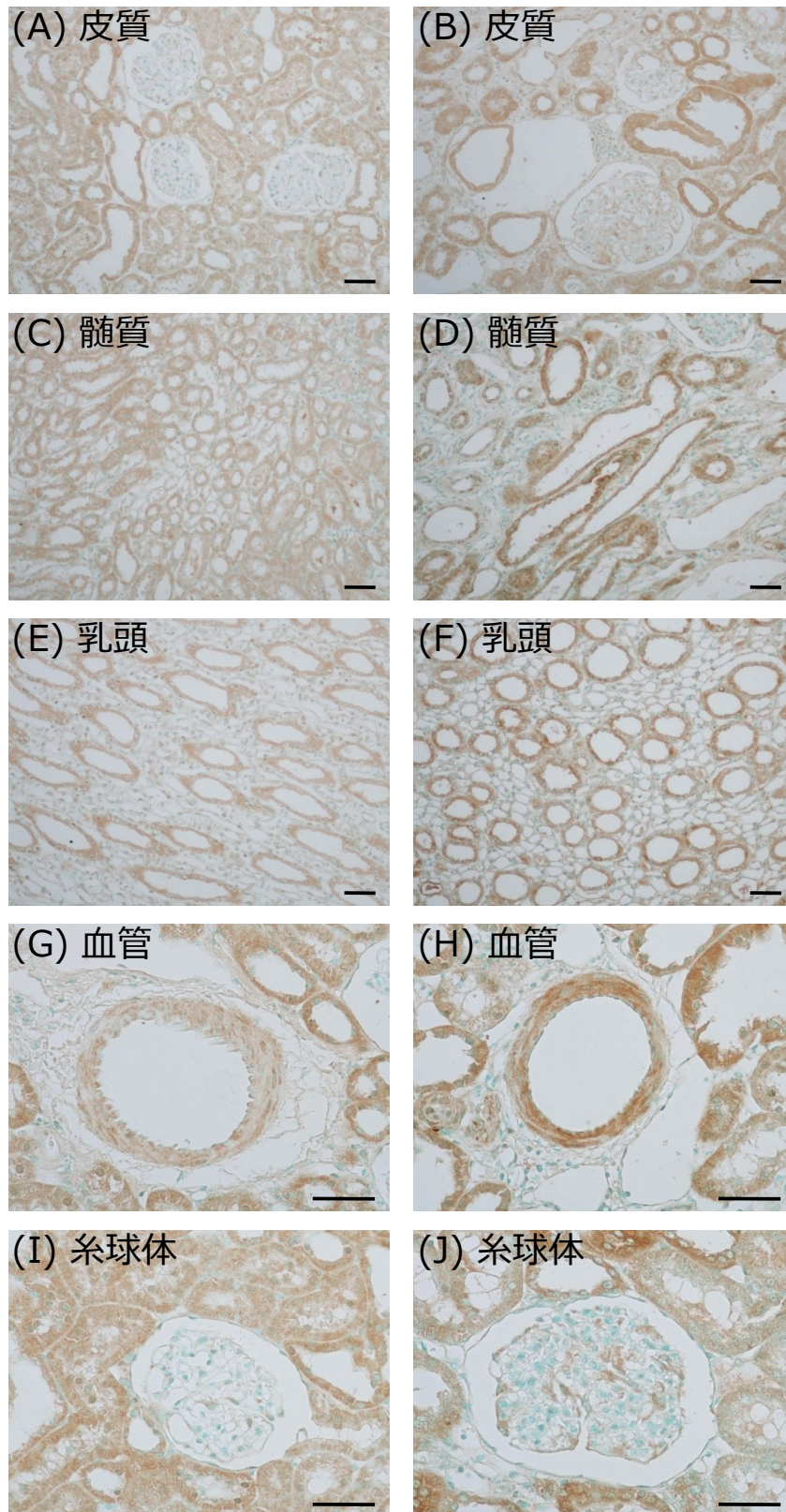


Figure 2-6. 5/6 腎摘腎不全(5/6NPX)モデル及び偽手術(SO)ラットの腎臓における AM2/IMD の免疫染色. (A), (C), (E), (G), (I) : SO ラット, (B), (D), (F), (H), (I) : 5/6NPX ラット. Bar = 50 μ m.

第2項 (P)RR

組織分布

Figure 2-7 に(P)RR, renin, 内標準(GAPDH)の mRNA の発現分布を示す。PCR により目的のシグナルが得られ,シーケンスにより(P)RR と renin の cDNA 配列の一部であることが確認された。

(P)RR mRNA の発現が今回検討した全ての中枢及び末梢組織で認められた。特に中枢組織では, 検討を行った全ての組織(前頭葉, 小脳, 中脳・橋, 脊髄, 下垂体, 視床下部, 海馬, 線条体)において, (P)RR mRNA の強い発現が認められた。末梢組織では, 中枢組織に比べ, (P)RR mRNA の発現は全般に弱い, RAS に関連の強い組織である, 腎臓, 副腎, 肺において比較的強い発現が認められた。また, 男性生殖器である精巣にはあまり強く発現していなかったが, 女性生殖器である卵巣において強い発現しており, 性特異的な発現が認められた。褐色脂肪細胞, 白色脂肪細胞の両脂肪細胞においても(P)RR mRNA の発現が認められた。

一方, renin mRNA の発現は, 一部の組織に限局していた。Renin mRNA の強い発現が, renin の主要な産生細胞である腎臓において認められた。また, 生殖細胞である精巣及び卵巣においても比較的強い renin mRNA の発現が認められた。心臓や肺及び中枢組織といった他の組織における renin mRNA の発現は非常に弱く, 殆どシグナルが確認されなかった。

定量的 RT-PCR

1. 心不全モデル

CHF ラットにおける(P)RR mRNA の発現量は, SO ラットと比較して, 心房で約 1.6 倍($P = 0.002$), 右心室で約 1.4 倍($P = 0.008$), 左心室非梗塞領域で約 1.7 倍($P = 0.002$), 左心室梗塞領域で約 1.8 倍($P < 0.001$)と有意に上昇し

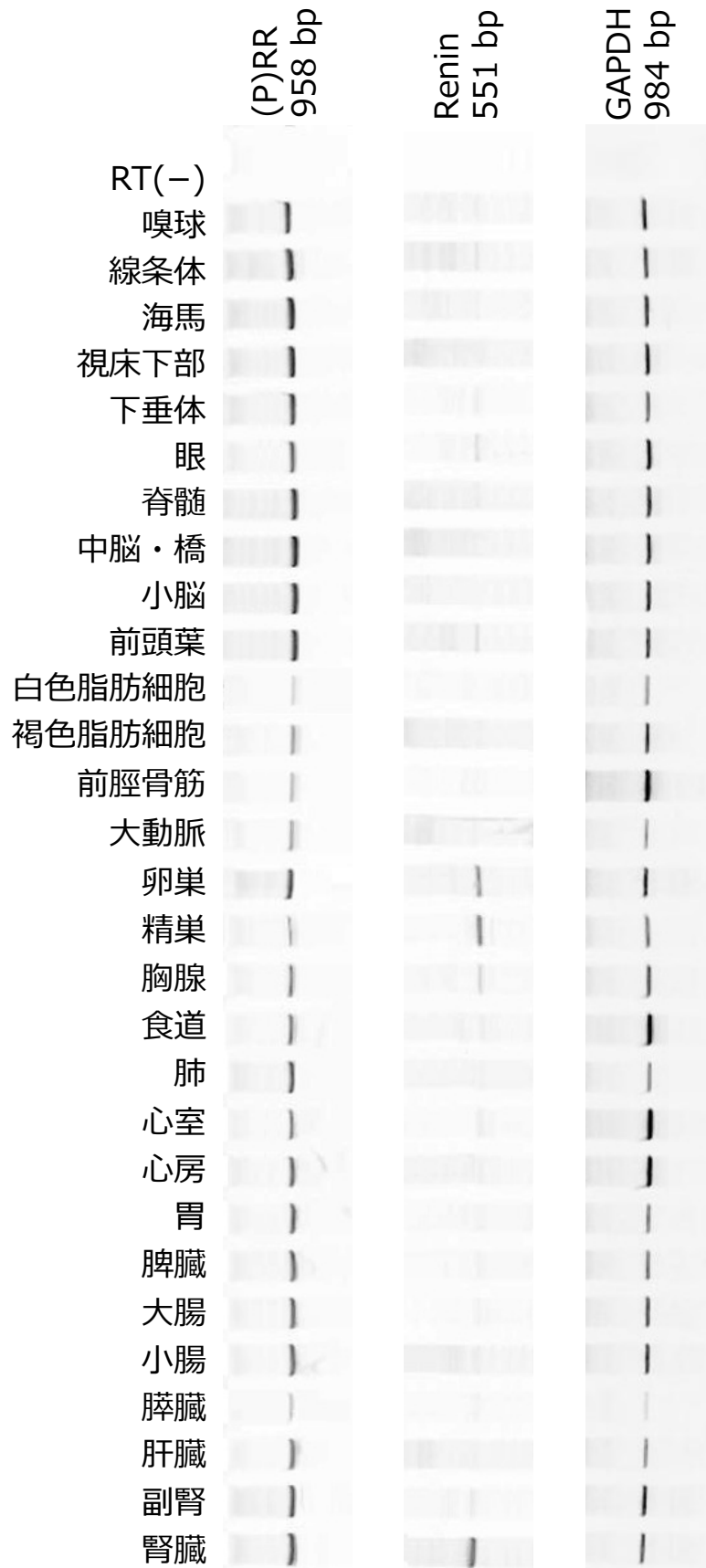


Figure 2-7. (P)RR 及び renin の mRNA の組織分布.

ていた(Figure 2-8(A)). 左心室の非梗塞領域と梗塞領域間に有意な差は認められなかった(約 1.2 倍, $P = 0.6$). また, 腎臓における(P)RR mRNA の発現量は, 心臓と同程度であり, SO ラットに比べ CHF ラットで有意に高値を示した(約 1.2 倍, $P < 0.001$).

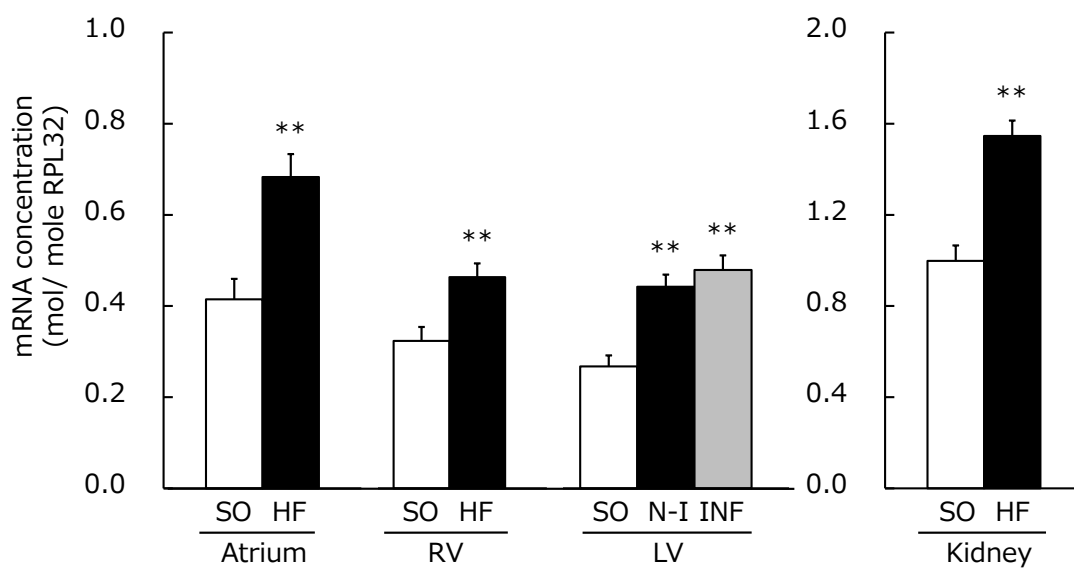
心不全モデルの心臓, 腎臓における renin の mRNA 発現は, (P)RR と同様の傾向を示した(Figure 2-8(B)). CHF ラットにおける renin mRNA の発現量は, SO ラットと比較して, 心房で約 1.9 倍($P = 0.004$), 右心室で約 2.1 倍($P < 0.001$), 左心室非梗塞領域で約 1.9 倍($P = 0.001$), 左心室梗塞領域で約 2.2 倍($P < 0.001$), 腎臓で約 1.2 倍($P = 0.03$)と有意に上昇していた. しかし, (P)RR mRNA が心臓と腎臓で同程度発現していたのとは異なり, 心臓における renin mRNA の発現量は腎臓での発現量の約 1/100 であった.

2. 5/6 腎摘腎不全モデル

5/6NPX ラットにおける(P)RR mRNA 発現量は, SO ラットと比べ, 慢性腎不全期の術後 56 日目(約 1.6 倍, $P = 0.001$)で有意に高値を示した(Figure 2-9(A)). 一方, 術後 3 日目(約 91%, $P = 0.4$), 術後 14 日目(約 96%, $P = 0.7$)では有意な差はなかった. また, 5/6NPX ラット間において, 術後 56 日目の(P)RR mRNA 発現量は, 術後 3 日目(約 1.8 倍, $P < 0.001$), 術後 14 日目(約 1.6 倍, $P = 0.001$)に比べ有意に増加していた.

5/6NPX ラットにおける renin mRNA 発現量は, SO ラットと比べ, 術後 3 日目(約 57%, $P < 0.001$), 術後 14 日目(約 46%, $P < 0.001$), 術後 56 日目(約 46%, $P < 0.001$)では有意に減少していた(Figure 2-9(B)). 術後, SO ラット, 5/6NPX ラット共に, 経過日数が経つにつれ, renin mRNA の発現量が有意に減少していた.

(A) (P)RR



(B) Renin

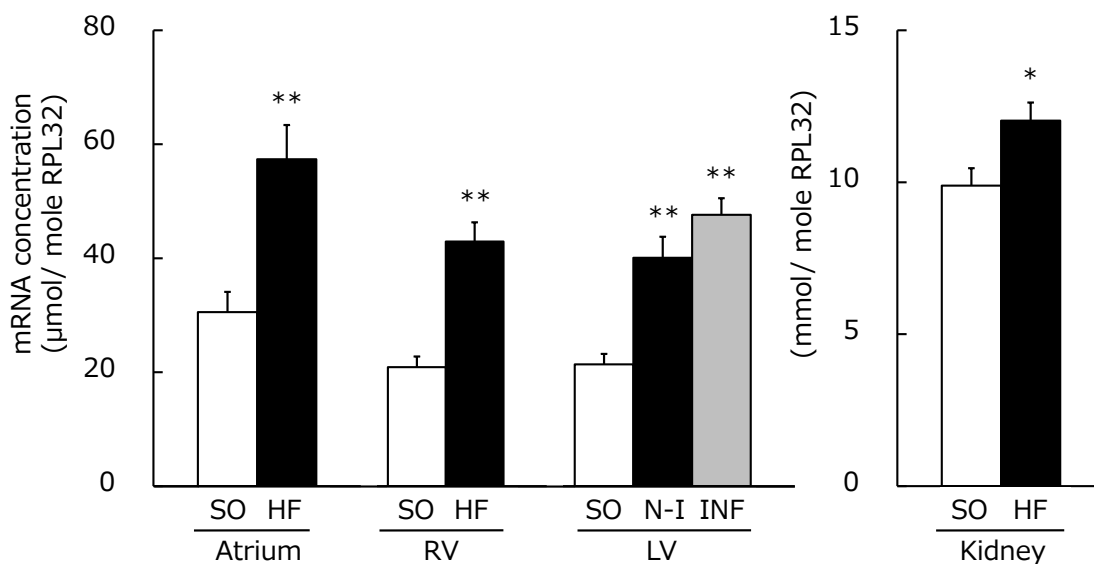
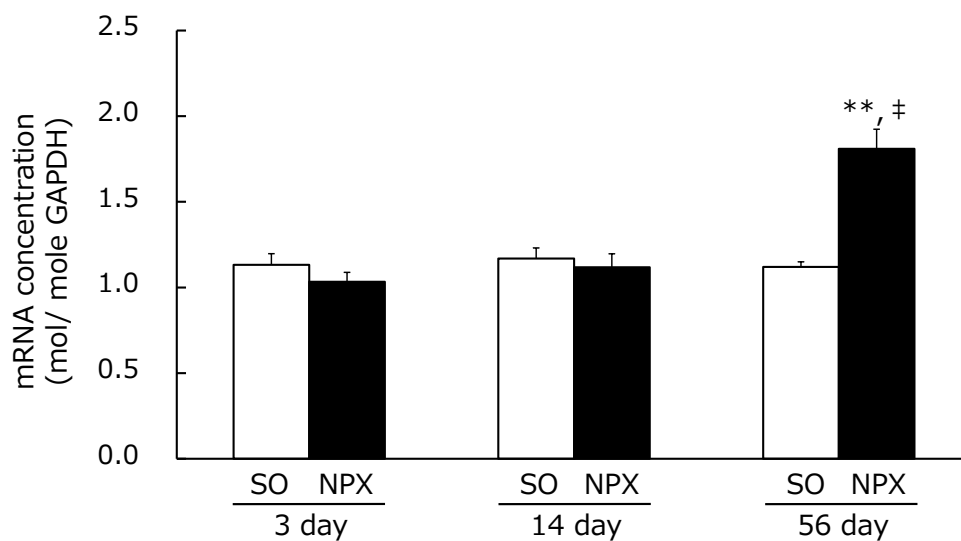


Figure 2-8. 心不全(CHF)モデル及び偽手術(SO)ラットの心臓, 腎臓における (P)RR 及び renin のmRNA 発現. N-I:CHF ラット左心室非梗塞領域, INF:CHF ラット梗塞領域, RV:右心室, LV:左心室. ** $P < 0.01$, vs SO ラット.

(A) (P)RR



(B) Renin

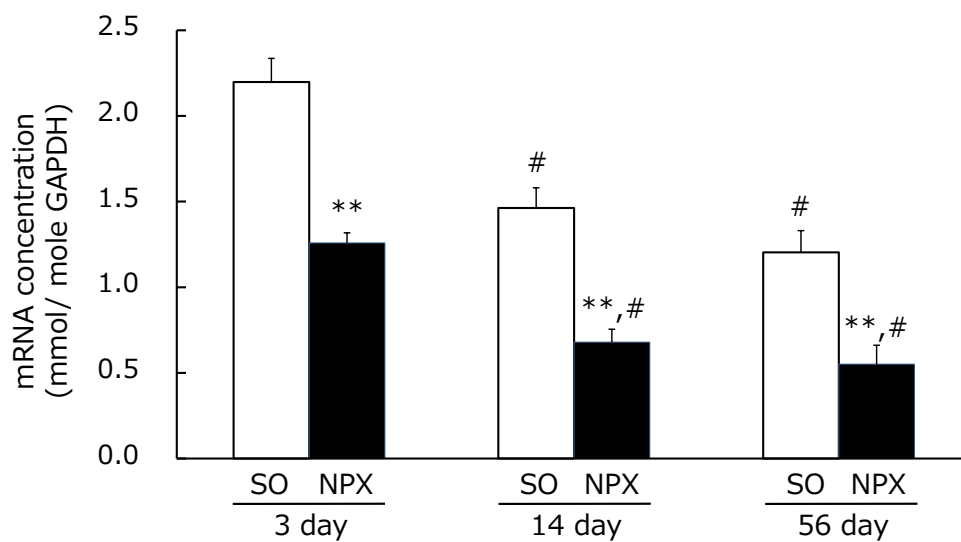


Figure 2-9. 5/6 腎摘腎不全(5/6NPX)モデル及び偽手術(SO)ラットの腎臓における(P)RR及びreninのmRNA発現. ** $P < 0.01$, vs 同週齢SOラット; † $P < 0.01$, vs 5/6NPXラット術後3日目, 14日目; # $P < 0.01$, vs 術後3日目.

3. 高血圧自然発症モデル

血圧値に差の認められない5週齢のSHR及びWKYの心臓,腎臓では,(P)RRとreninのmRNA発現量に有意な差は認められなかった。

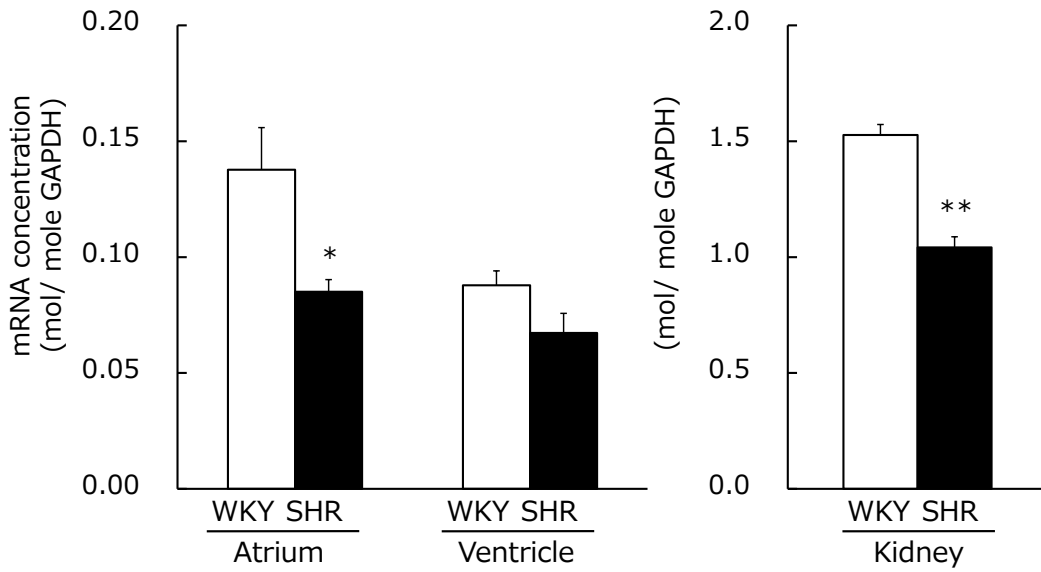
血圧値に差が認められる12週齢のSHR及びWKYの心臓,腎臓における(P)RRとreninのmRNA発現量をFigure 2-10に示す。12週齢SHRにおける(P)RR mRNAの発現量は,WKYに比べ,心房(約64%, $P = 0.04$),腎臓(約68%, $P = 0.002$)で有意に減少していた。一方,心室(約79%, $P = 0.2$)では,WKYとSHR間に有意な差は認められなかった。

Renin mRNAの発現量は,12週齢SHR腎臓で,同週齢WKYの腎臓に比べ,有意に低値となっていた(約56%, $P = 0.002$)。一方,心房(約70%, $P = 0.2$),心室(約1.0倍, $P = 1$)に有意な差は認められなかった。

ウエスタンブロット

Figure 2-11に5/6腎摘腎不全モデル術後56日目の腎臓における(P)RRタンパク質の発現量を示す。(P)RRタンパク質の発現量は, α -tubulinの発現量で標準化することにより相対量を求めた(単位:arbitrary units (= (P)RRのシグナル強度/ α -tubulinのシグナル強度))。SOラットに比べ,5/6NPXラットにおいて,(P)RRの発現は約7.9倍(SOラット: 0.65 ± 0.04 AU,5/6NPXラット: 5.14 ± 2.46 AU, $P = 0.02$)と有意に高値を示した。

(A) (P)RR



(B) Renin

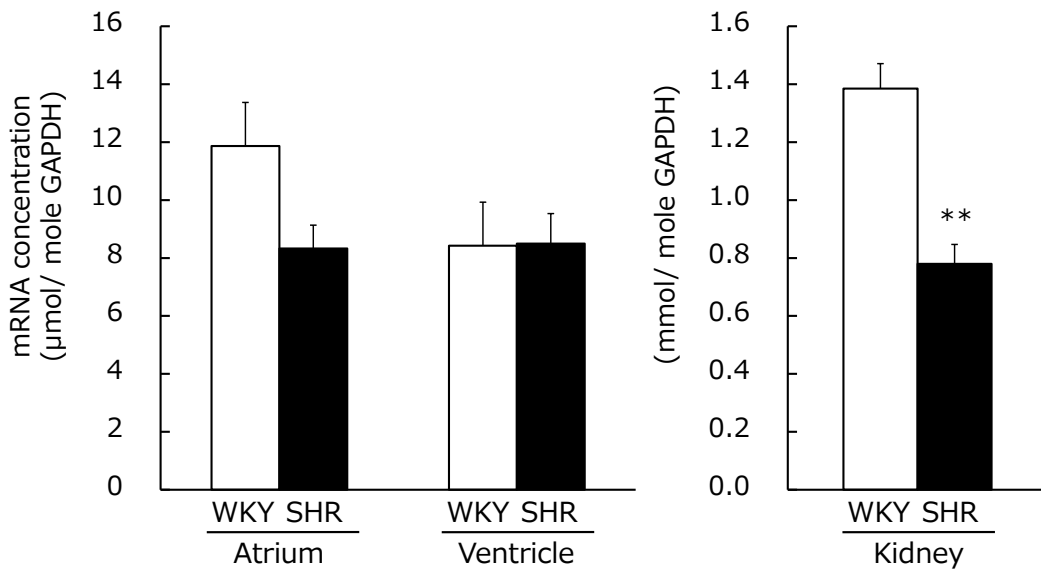


Figure 2-10. 12 週齢高血圧自然発症モデル(SHR)及び対象ラット(WKY)の心臓, 腎臓における(P)RR 及び renin mRNA 発現. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs WKY.

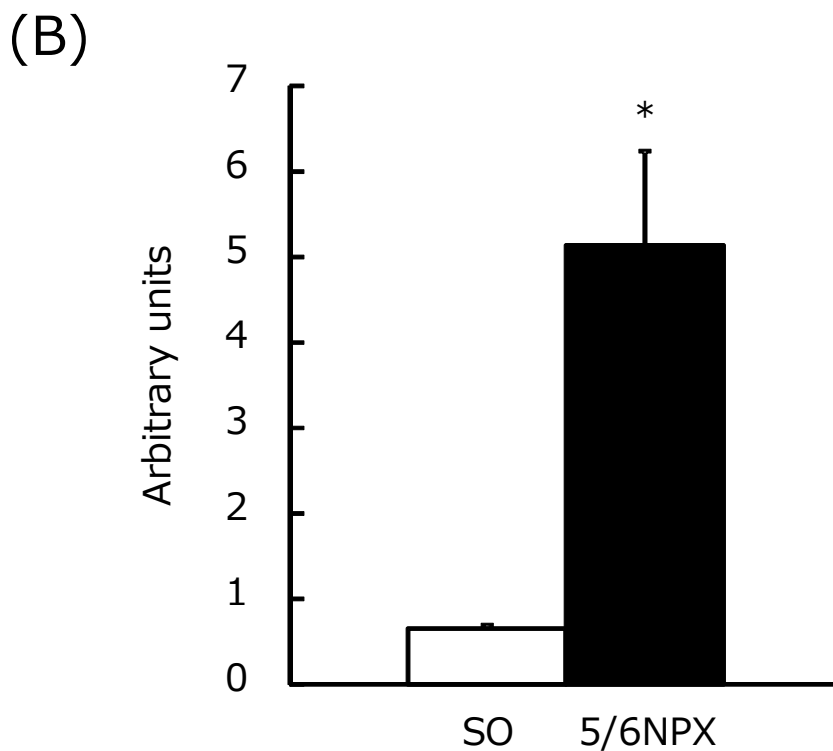
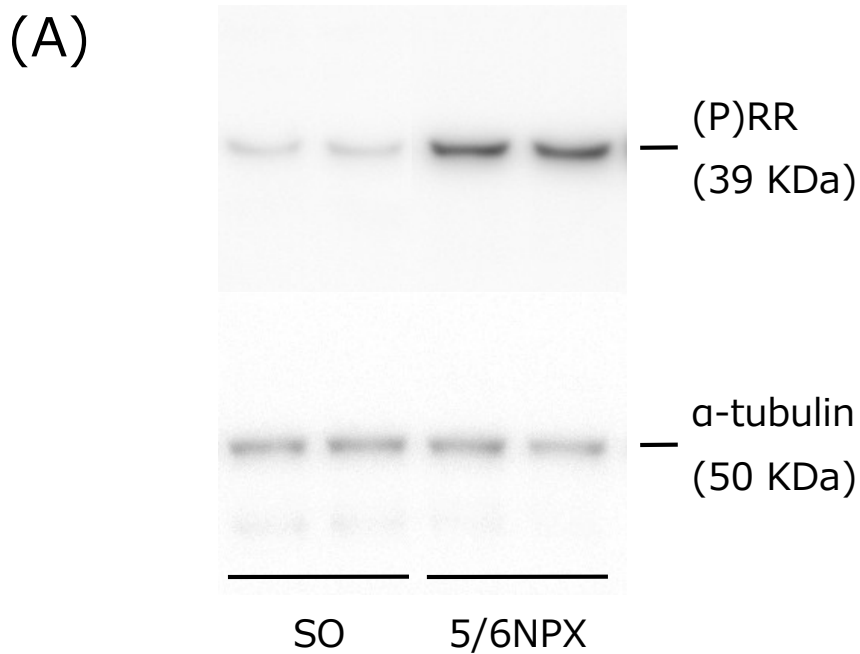


Figure 2-11. 術後 56 日の 5/6 腎摘腎不全(5/6NPX)モデル及び偽手術(SO)ラットの腎臓における(P)RR のウエスタンブロット. (A) : (P)RR と α -tubulin の代表的なシグナル, (B) : (P)RR の蛋白質発現量. Arbitrary units = (P)RR のシグナル強度/ α -tubulin のシグナル強度. * $P < 0.05$ vs SO ラット.

免疫組織学的検討

1. 心不全モデル

SO ラット(Figure 2-12(A), (C), (E)), CHF ラット(Figure 2-12(B), (D), (F))共に, 心筋線維で(P)RR 様免疫反応性が広範に認められた. SO ラット(Figure 2-12(E)), CHF ラット(Figure 2-12(F))共に, 心血管の血管平滑筋と血管内皮細胞に(P)RR 様免疫反応性が認められた. また, 梗塞領域では, 線維化した梗塞壁は染色が弱く, この線維化した部分の周囲に存在する生き残っている心筋細胞に免疫反応性が認められた(Figure 2-12(D)).

CHF モデル腎臓において, SO ラット(Figure 2-12(G)), CHF ラット(Figure 2-12(H))共に, 腎尿細管で(P)RR 様免疫反応性が広範に認められた. 腎動脈においても, 心血管と同じく, SO ラット(Figure 2-12(G)), CHF ラット(Figure 2-12(H))共に血管平滑筋と血管内皮細胞に(P)RR 様免疫反応性が認められた. 特に強い免疫反応性が, CHF ラットの遠位尿細管において認められた(Figure 2-12(H)). 糸球体は, SO ラット(Figure 2-12(G)), CHF ラット(Figure 2-12(H))共にまばらに染まっていた.

2. 5/6 腎摘腎不全モデル

術後 56 日目の 5/6NPX ラット(Figure 2-13(B), (D), (F))及び同週齢の SO ラット(Figure 2-13(A), (C), (E))共に, 尿細管で(P)RR 様免疫反応性が広範に認められた. また, SO ラットに比べ, 5/6NPX ラットの遠位尿細管で(P)RR 様免疫反応性が増強していた. 腎動脈では, SO ラット(Figure 2-13(G)), 5/6NPX ラット(Figure 2-13(H))共に, 免疫反応性が血管平滑筋及び血管内皮細胞で認められた. 糸球体は, 5/6NPX ラット(Figure 2-13(J))で弱い(P)RR 様免疫反応性が認められたが, SO ラット(Figure 2-13(I))では(P)RR 様免疫反応性が認められなかった.

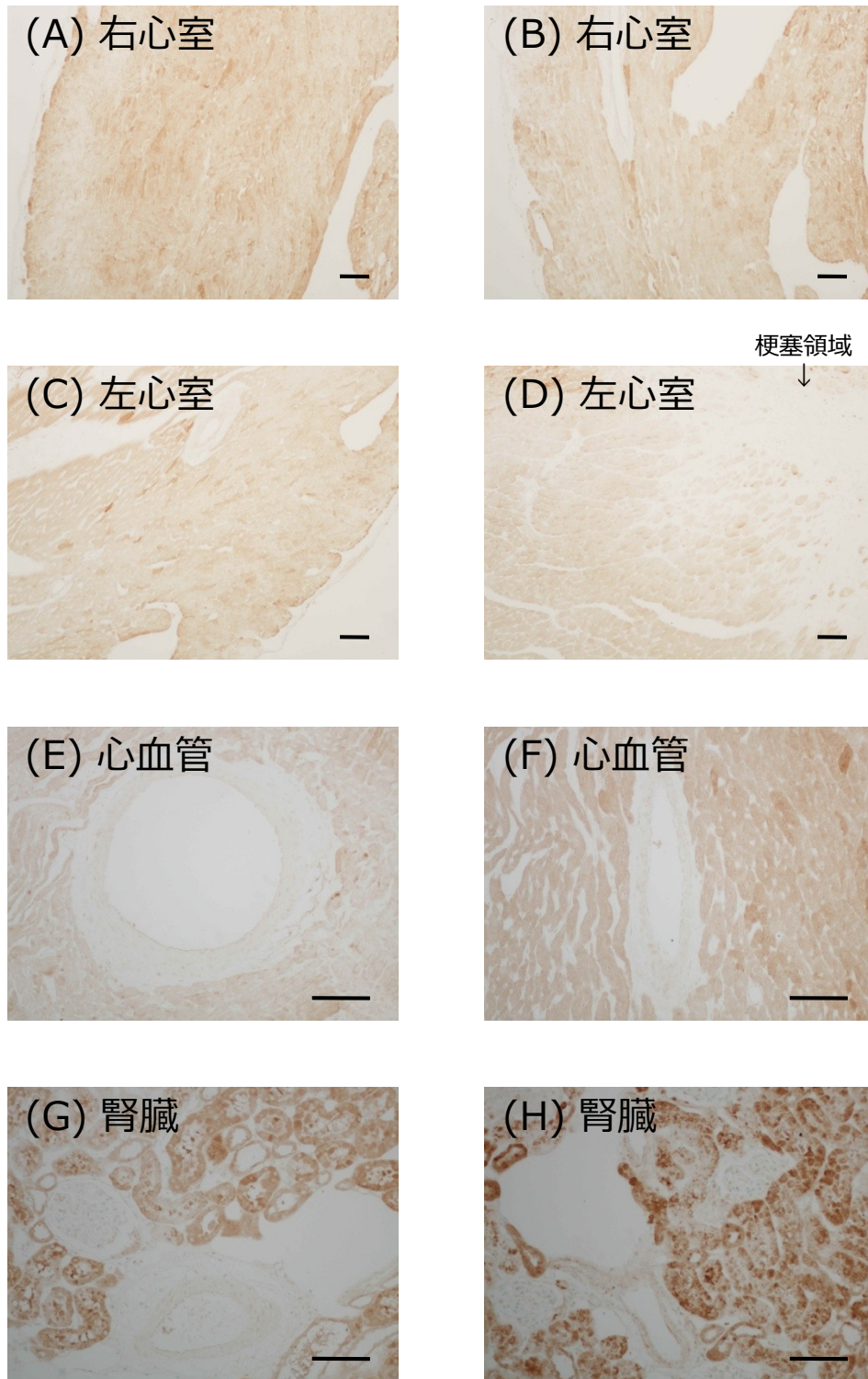


Figure 2-12. 心不全(CHF)モデル及び偽手術(SO)ラットの心臓・腎臓における(P)RRの免疫染色. (A), (C), (E), (G) : SO ラット, (B), (D), (F), (H) : CHF ラット. Bar = 100 μ m.

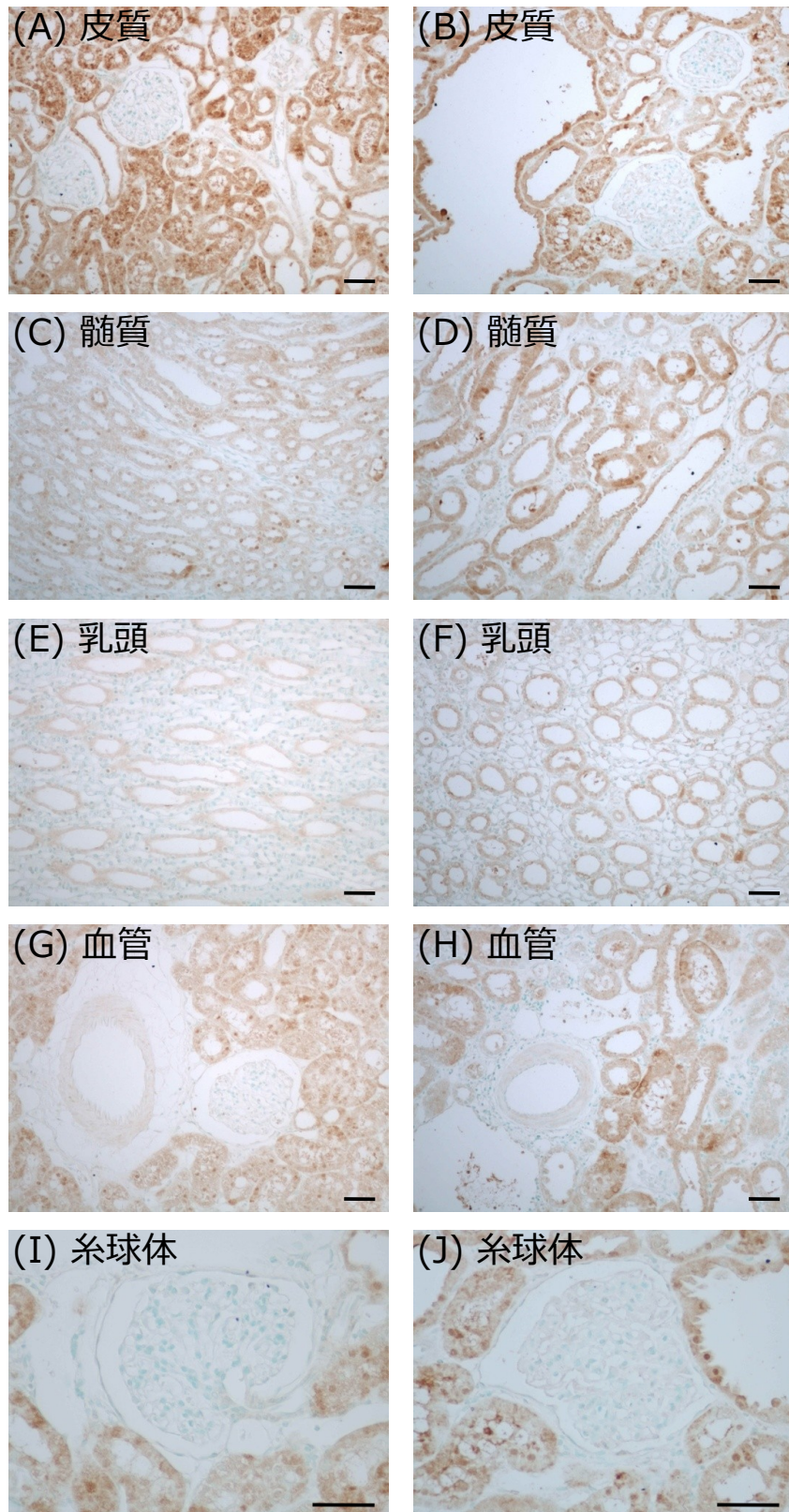


Figure 2-13. 5/6 腎摘腎不全(5/6NPX)モデル及び偽手術(SO)ラットの腎臓における(P)RR の免疫染色. (A), (C), (E), (G), (I) : SO ラット, (B), (D), (F), (H), (I) : 5/6NPX ラット. Bar = 50 μ m.

第3項 UII/URP/UT-R

組織分布

Figure 2-14 に UII, URP, ET-1, 内標準(GAPDH)の mRNA の遺伝子発現を示す。UT-R の遺伝子配列にはイントロンが存在せず, 一部の mRNA 発現が弱い組織でゲノム DNA 由来のシグナルと mRNA 由来のシグナルを分離することが不可能であった。そのため, UT-R の mRNA の発現分布は示していない。また, PCR により得られた目的のシグナルは, シーケンス解析により UII, URP, UT-R, ET-1 の cDNA 配列の一部であることが確認された。

UII mRNA の発現が今回検討した全ての組織で認められた。特に, 副腎, 小腸, 胸腺, 精巣及び中枢組織で強い発現が認められた。

URP mRNA の発現が今回検討した全ての組織で認められた。末梢組織に比べ, 中枢組織における URP mRNA の遺伝子発現は弱かった。末梢組織, 特に, 脾臓, 小腸, 胸腺, 精巣で強い発現が認められた。

ET-1 mRNA の発現が今回検討した全ての組織で認められた。特に, 肺, 大動脈及び中枢組織で強い発現が認められた。UII や URP と比べ, 組織間の mRNA 発現のばらつきが小さかった。

加えて, UII, URP, ET-1 のいずれも, 褐色脂肪細胞, 白色脂肪細胞の両脂肪細胞で mRNA の発現が認められた。

定量的 RT-PCR

1. 心不全モデル

CHF ラットにおける UII mRNA の発現量は, SO ラットと比較して, 左心室梗塞領域で約 1.8 倍($P = 0.02$)と有意に上昇していた(Figure 2-15(A))。一方, 心房, 右心室, 左心室非梗塞領域, 腎臓では, SO ラットと CHF ラット間に有意な差は認められなかった。



Figure 2-14. UII, URP, ET-1 の mRNA の組織分布.

CHF ラットにおける URP mRNA の発現量は、SO ラットと比較して、心房で約 1.9 倍($P = 0.008$), 右心室で約 2.2 倍($P = 0.02$), 左心室梗塞領域で約 2.9 倍($P < 0.001$)と有意に上昇していた(Figure 2-15(B)). 一方, 左心室非梗塞領域, 腎臓では, 有意な差は認められなかった.

UT-R の cDNA 配列にはイントロンが存在しないため, CQ-PCR を行うとゲノム DNA 由来のシグナルも計測してしまう. 従って, 逆転写酵素を入れずに逆転写反応を行った 1st strand cDNA を用いて UT-R の CQ-PCR を行い, ゲノム

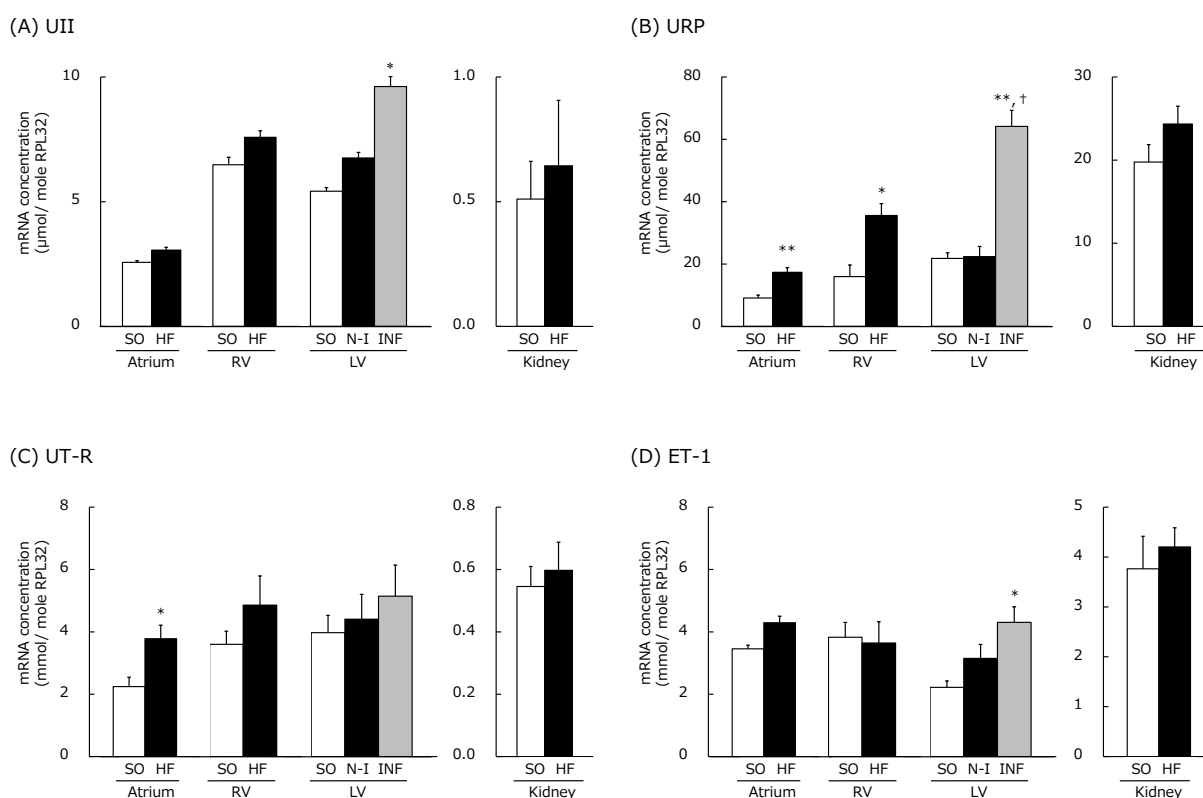


Figure 2-15. 心不全(CHF)モデル及び偽手術(SO)ラットの心臓, 腎臓における UII, URP, UT-R, ET-1 の mRNA 発現. N-I:CHF ラット左心室非梗塞領域, INF:CHF ラット梗塞領域, RV:右心室, LV:左心室. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs SO ラット; † $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$, vs N-I.

DNA を定量した。その結果、心臓、腎臓におけるゲノム DNA 由来の cDNA 量は mRNA 由来の cDNA 量の 1/10 以下であり、無視できるレベルであることが判明した。CHF ラットにおける UT-R mRNA の発現量は、SO ラットと比較して、心房で約 1.7 倍($P = 0.04$)と有意に上昇していた(Figure 2-15(C))。一方、他の部位では、有意な差は認められなかった。

ET-1 mRNA の発現量は、SO ラットと比較して、左心室梗塞領域で約 1.9 倍($P = 0.02$)と有意に上昇していた(Figure 2-15(D))。

2. 5/6 腎摘腎不全モデル

Figure 2-16 に 5/6 腎摘腎不全モデルにおける UII, URP, UT-R, ET-1 の mRNA 発現量を示す。

5/6NPX ラットにおける UII mRNA 発現量は、SO ラットと比べ、慢性腎不全期の術後 56 日目(約 2.4 倍, $P = 0.01$)で有意に高値を示した(Figure 2-3(A))。一方、術後 3 日目、術後 14 日目では有意な差はなかった。

5/6NPX ラットにおける URP mRNA 発現量は、SO ラットと比べ、慢性腎不全期の術後 56 日目(約 6.5 倍, $P < 0.001$)で有意に高値を示した(Figure 2-3(B))。一方、術後 3 日目、術後 14 日目では有意な差はなかった。URP の mRNA 発現量は、UII mRNA の 100 倍以上であった。

UT-R 及び ET-1 も同様に術後 56 日目の mRNA 発現量が有意に高値を示した(UT-R : 約 11.9 倍, $P < 0.001$, ET-1 : 約 3.4 倍, $P = 0.02$)。

また、SO ラット、5/6NPX ラットのそれぞれで、術後 3 日目、術後 14 日目、術後 56 日目の UII, URP, UT-R, ET-1 の mRNA 発現量を比較したところ、5/6NPX ラットにおいて、術後 56 日の UII, URP, UT-R, ET-1 の mRNA 発現量が、術後 3 日目、14 日目に比べ有意に高くなっていた。

3. 高血圧自然発症モデル

Figure 2-17 に高血圧自然発症モデルにおける UII, URP, UT-R, ET-1 の mRNA 発現量を示す。WKY と SHR の血圧が等しい 5 週齢と高血圧を発症している 12 週齢において、mRNA の発現量を比較した。

UII mRNA の発現量は、12 週齢 SHR の心房で、同週齢の WKY と比較して約 1.9 倍($P = 0.03$)と有意に上昇していた(Figure 2-17(A))。しかし、5 週齢においては、WKY と SHR 間で UII mRNA の発現量に有意な差は認められなかった。

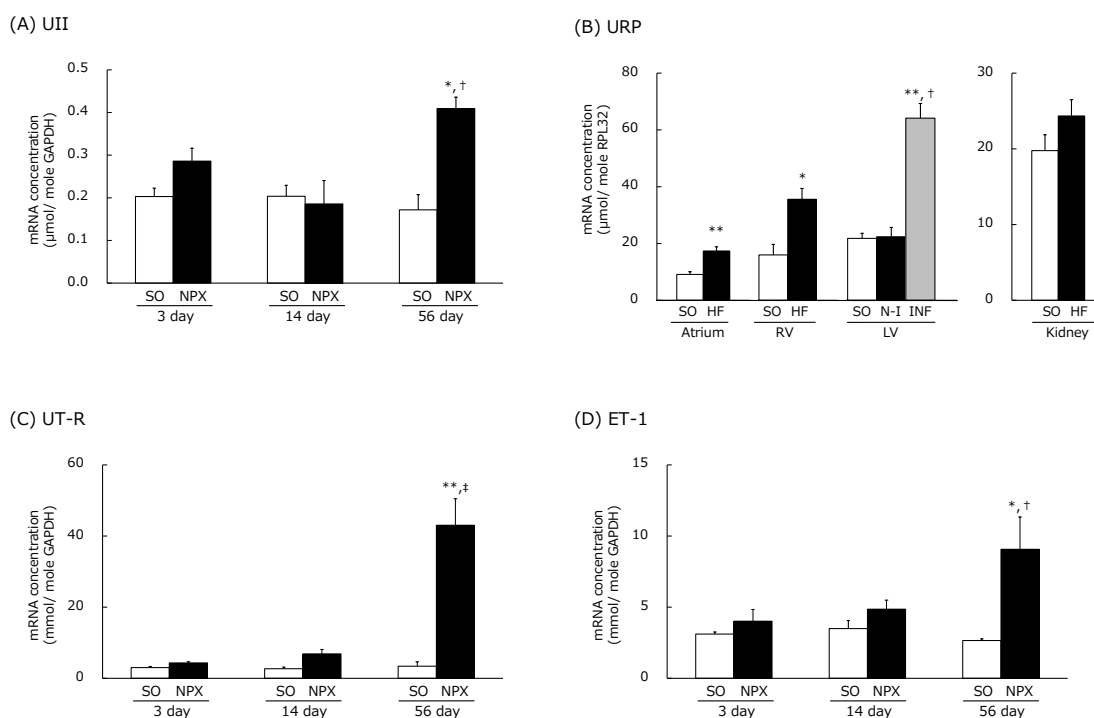


Figure 2-16. 5/6 腎摘腎不全(5/6NPX)モデル及び偽手術(SO)ラットの腎臓における UII, URP, UT-R, ET-1 の mRNA 発現。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 同週齢 SO ラット; † $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$, vs 5/6NPX ラット術後 3 日目及び術後 14 日目。

URP mRNA の発現量は、5 週齢及び 12 週齢 SHR の腎臓で、同週齢の WKY と比較して、それぞれ約 2.3 倍($P < 0.001$), 約 1.8 倍($P = 0.005$)と有意に上昇していた(Figure 2-17(B)). また、UT-R mRNA の発現量は、12 週齢 SHR の各組織(心房, 心室, 腎臓)において、同週齢 WKY と比較して、有意に上昇していた(Figure 2-17(C)).

一方、ET-1 mRNA は、12 週齢 SHR の心房, 腎臓において、同週齢 WKY と比較して、有意に減少していた(Figure 2-17(D)). 5 週齢の各組織及び 12 週齢の心室においては、有意な差は認められなかった。

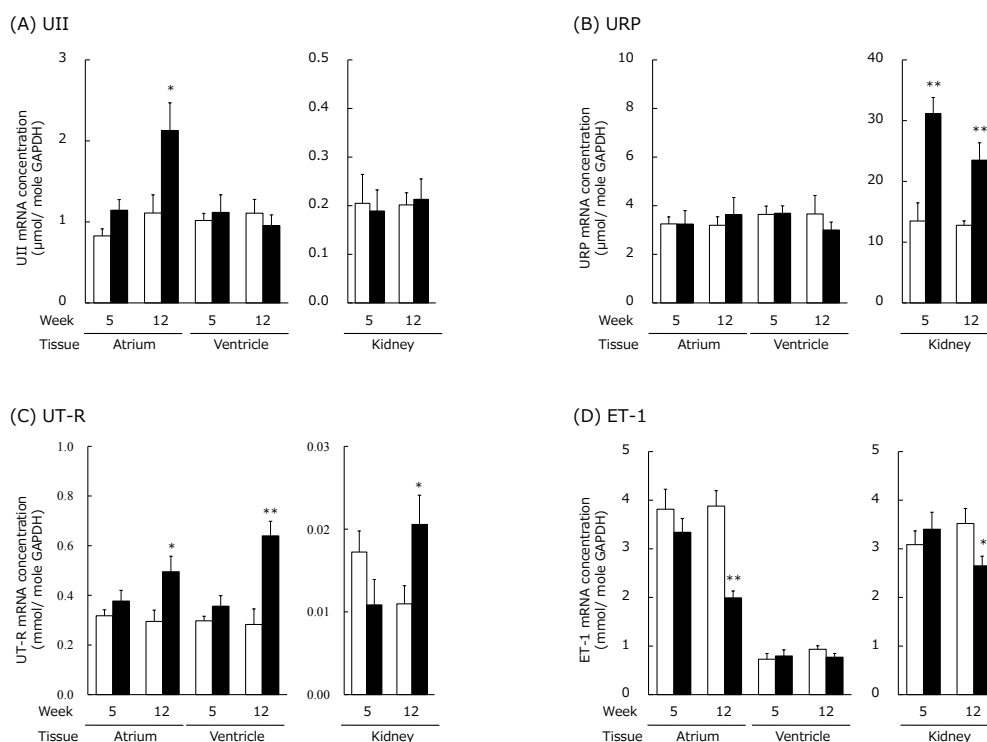


Figure 2-17. 5 週齢及び 12 週齢血圧自然発症モデル(SHR)及び対象ラット (WKY)の心臓, 腎臓における UII, URP, UT-R, ET-1 mRNA 発現. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 同週齢 WKY.

免疫組織学的検討

1. 心不全モデル

SO ラット(Figure 2-18(A), (B)), CHF ラット(Figure 2-18(C), (D))共に, 心筋線維で URP 様免疫反応性が認められた. CHF ラットでは, 心筋線維で URP 様免疫反応性が広範に認められたが(Figure 2-18(C), (D)), SO ラットでは心内膜, 心外膜の両心膜側内側に帯状に免疫反応性の弱い領域が認められた(Figure 2-18(A), (B)). SO ラットの心血管では URP 様免疫反応性が認められなかったが(Figure 2-18(A)), CHF ラットの心血管では弱い URP 様免疫反応性が認められた(Figure 2-18(C)). 梗塞領域では線維化した梗塞壁では免疫反応性が認められなかったが, この線維化した部分の周囲に存在する心筋細胞で URP 様免疫反応性が認められた(Figure 2-18(D)). 正常ウサギ血清を用いたネガティブコントロールでは, 免疫反応性が認められなかった(Figure 2-18(E), (F)). ラット心臓において, UII 様免疫反応性は非常に弱く, SO ラットと CHF ラットの両者において免疫反応性が認められなかった(data not shown).

Figure 2-19 に心不全モデル心臓における UT-R の免疫組織染色の結果を示す. SO ラット(Figure 2-19(A), (B)), CHF ラット(Figure 2-19(C), (D))共に, 心筋線維で URP 様免疫反応性が認められた. UT-R 様免疫反応性の染色性と同じく, CHF ラットでは, 心筋線維で UT-R 様免疫反応性が広範に認められたが(Figure 2-19(C), (D)), SO ラットでは心内膜, 心外膜の両心膜側内側に帯状に免疫反応性の弱い領域が認められた(Figure 2-19(A), (B)). SO ラットと CHF ラット共に, 心血管で弱い UT-R 様免疫反応性が認められた(Figure 2-19(A), (C), (D)). 梗塞領域では線維化した梗塞壁では免疫反応性が認められなかったが, この線維化した部分の周囲に存在する心筋細胞及び心血管で UT-R 様免疫反応性が認められた(Figure 2-19(D)). 正常ヤギ IgG では, 免疫反応性が認められなかった(Figure 2-19(E), (F)).

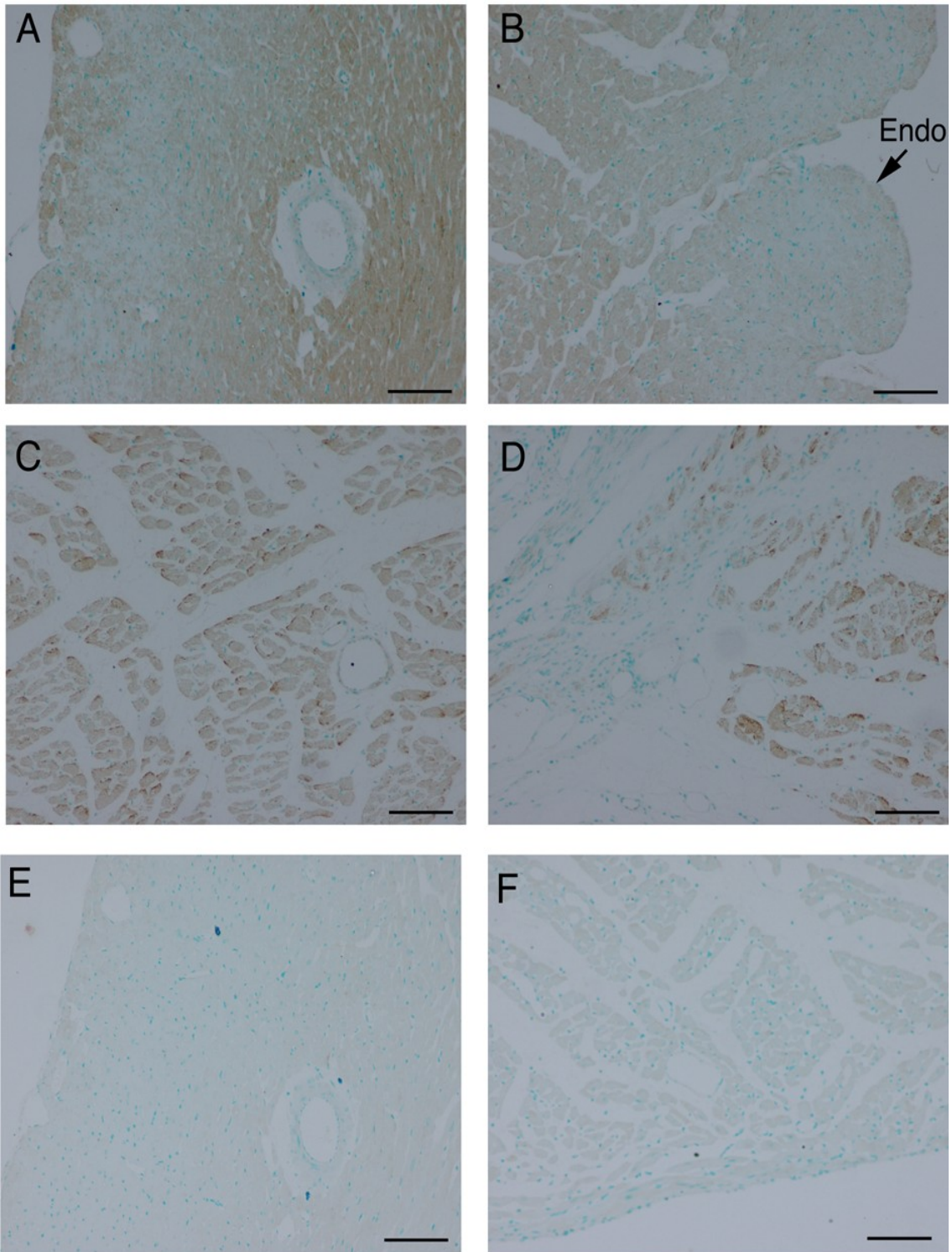


Figure 2-18. 心不全(CHF)モデルび偽手術(SO)ラットの心臓におけるURPの免疫染色. (A), (B) : SO ラット+抗 URP 血清, (C), (D) : CHF ラット+抗 URP 血清, (E) : SO ラット+正常ウサギ血清, (F) : CHF ラット+正常ウサギ血清. Bar = 100 μ m.

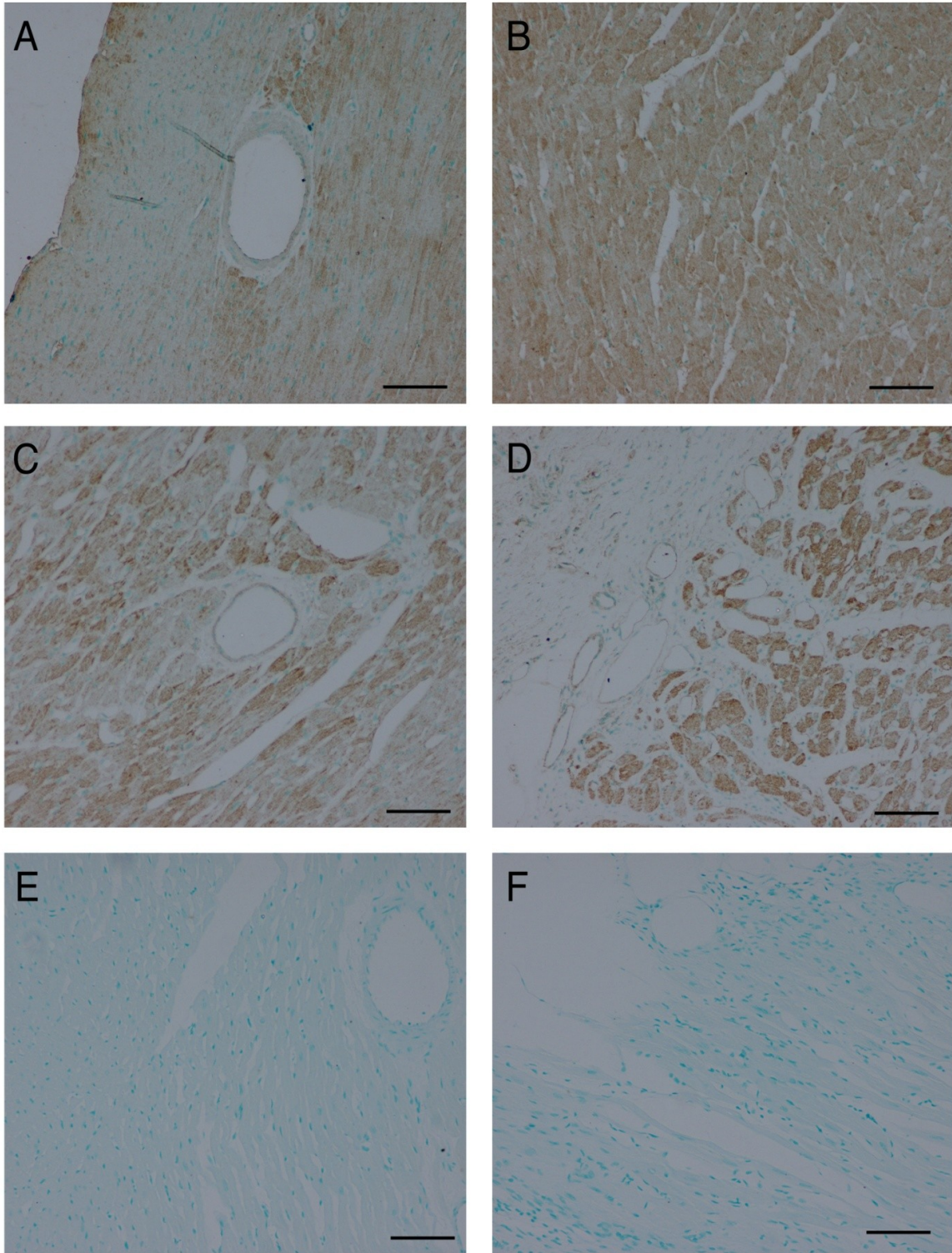


Figure 2-19. 心不全(CHF)モデルび偽手術(SO)ラットの心臓における UT-R の免疫染色. (A), (B) : SO ラット+抗 UT-R IgG, (C), (D) : CHF ラット+抗 UT-R IgG, (E) : SO ラット+正常ヤギ IgG, (F) : CHF ラット+正常ヤギ IgG. Bar = 100 μ m.

2. 5/6 腎摘腎不全モデル

Figure 2-20 に 5/6 腎摘腎不全モデル腎臓における URP の免疫組織染色の結果を示す。SO ラット(Figure 2-20(A), (E)), 5/6NPX ラット(Figure 2-20(B), (F))共に, URP 様免疫反応性が腎尿細管, 血管平滑筋, 血管内皮細胞において認められた。URP 様免疫反応性が, 殆どの尿細管で広範に認められた(Figure 2-20(A)-(D))。特に, 遠位尿細管において, 強い URP 様免疫反応性が認められた(Figure 2-20(D))。糸球体の多くは URP 様免疫反応性を認めなかったが(Figure 2-20(A), (E)), いくつかの糸球体においてまばらな URP 様免疫反応性が認められた(Figure 2-20(B))。URP 様免疫反応性の染色パターン, 染色性に, SO ラットと 5/6NPX ラット間で差は認められなかった。一方, 心臓と同様に, UII 様免疫反応性は非常に弱く, SO ラットと CHF ラットの両者の尿細管と血管平滑筋が弱く染色されただけであった(data not shown)。

Figure 2-21 に 5/6 腎摘腎不全モデル腎臓における UT-R の免疫組織染色の結果を示す。SO ラット(Figure 2-21(A), (E)), 5/6NPX ラット(Figure 2-21(B), (F))共に, UT-R 様免疫反応性が腎尿細管, 血管内皮細胞において認められた。特に強い UT-R 様免疫反応性が遠位尿細管において認められた。糸球体に UT-R 様免疫反応性を認められなかった(Figure 2-21(A), (B))。URP 様免疫反応性の染色パターン, 染色性に, SO ラットと 5/6NPX ラット間で差は認められなかった。

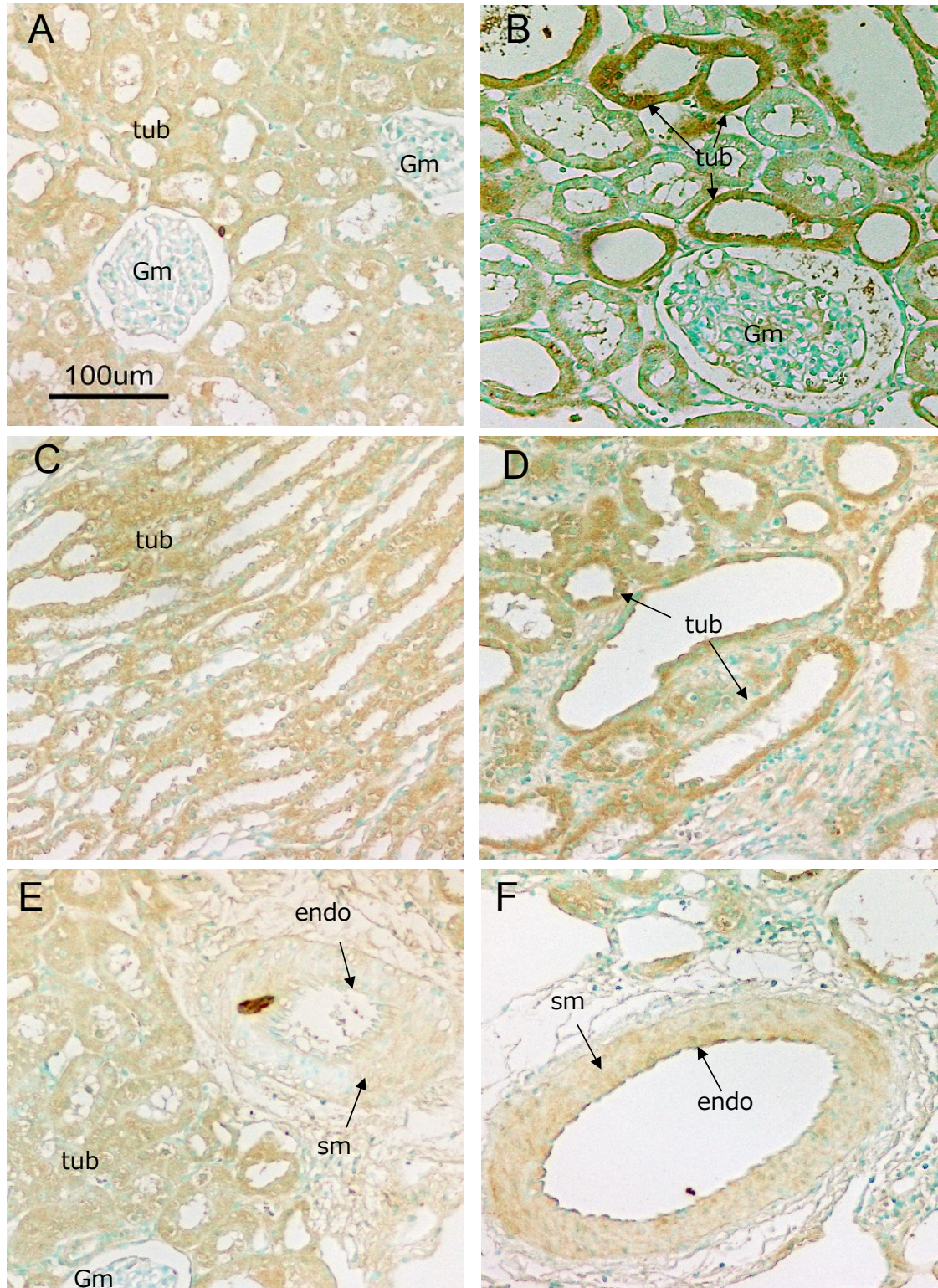


Figure 2-20. 5/6 腎摘腎不全(5/6NPX)モデルび偽手術(SO)ラットの腎臓におけるURPの免疫染色。(A), (C), (E), (G): SOラット, (B), (D), (F): 5/6NPXラット. tub:尿細管, Gm:糸球体, sm:血管平滑筋, endo:血管内皮細胞, Bar = 100 µm.

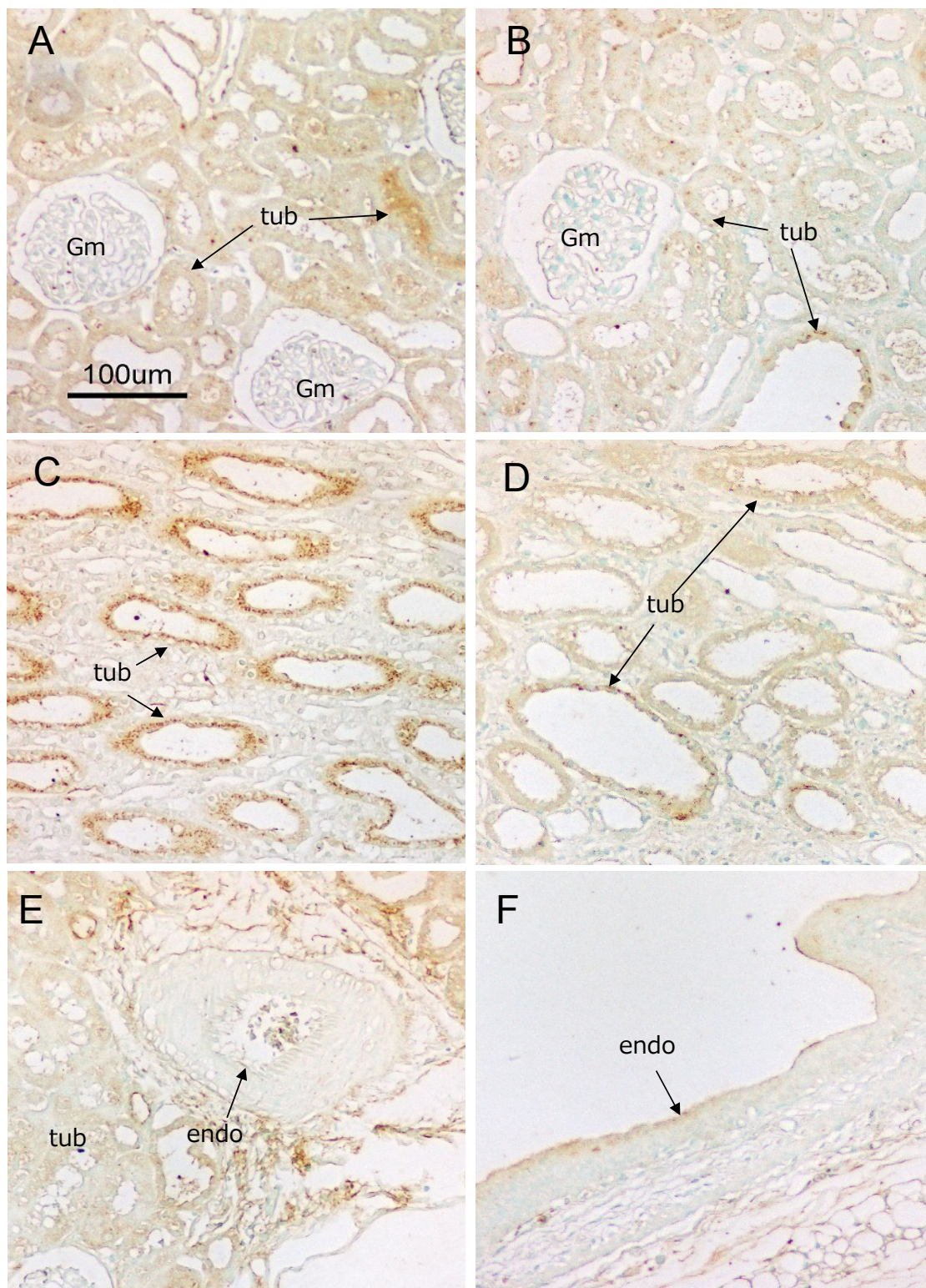


Figure 2-21. 5/6 腎摘腎不全(5/6NPX)モデルび偽手術(SO)ラットの腎臓における UT-R の免疫染色. (A), (C), (E) : SO ラット, (B), (D), (F) : 5/6NPX ラット. tub:尿細管, Gm:糸球体, sm:血管平滑筋, endo:血管内皮細胞, Bar = 100 µm.

第4項 結果の要約

AM2/IMD

- AM2/IMD mRNA は、腎臓や胃等の一部の組織で強く発現していた。
- CHF ラット心臓において、AM2/IMD mRNA の発現が上昇していた。
- 5/6NPX ラットの急性腎不全期(術後3日目)、慢性腎不全期(術後56日目)、SHR の腎臓において AM2/IMD mRNA の発現が減少していた。
- 免疫組織染色により、心筋線維、血管平滑筋、腎尿細管に AM2/IMD 様免疫反応性が認められた。
- SO ラットに比べ、5/6NPX ラットの尿細管が強く染色された。

(P)RR

- (P)RR mRNA は、今回検討した全ての組織で発現が認められ、中枢組織では強い発現が認められた。
- CHF ラットの心臓、腎臓及び 5/6NPX ラットの慢性腎不全期(術後56日目)の腎臓において、(P)RR mRNA の発現が上昇していた。
- SHR の心房、腎臓において(P)RR mRNA の発現が減少していた。
- 免疫組織染色により、心筋線維、血管平滑筋、血管内皮、腎尿細管に(P)RR 様免疫反応性が認められた。
- CHF ラット腎臓及び 5/6NPX ラット腎臓の尿細管で(P)RR 様免疫染色反応性が強く染色された。
- ウェスタンブロットにより、5/6NPX ラット腎臓で(P)RR タンパク質の発現亢進が認められた。

UII/URP/UT-R

- UII, URP mRNA の発現が今回検討した全ての組織で認められた。
- CHF ラットの心臓において, UII と URP の mRNA 発現が亢進していた。
- 5/6NPX ラットの慢性腎不全期(術後 56 日目)の腎臓において, UII, URP, UT-R の mRNA 発現が亢進していた。
- 高血圧自然発症モデルにおいて, 血圧の上昇が認められない 5 週齢では SHR と WKY 間で UII/URP/UT-R 系の mRNA 発現に差は認められなかったが, 血圧上昇を認める 12 週齢 SHR では心臓で UII, UT-R の mRNA 発現が上昇し, 腎臓で URP, UT-R の mRNA 発現が上昇していた。
- URP 様免疫染色反応性が心筋線維, 血管平滑筋, 血管内皮細胞, 腎尿細管で認められた。
- UT-R 様免疫染色反応性が心筋線維, 血管平滑筋, 血管内皮細胞, 腎尿細管で認められた。
- ラットでは UII 様免疫染色反応性は殆ど認められなかった。

第5節 考察

第1項 AM2/IMD

組織分布

本研究は、AM2/IMD mRNA はほとんどの臓器に低濃度で発現しているが、限られた一部の臓器において高発現分布していることを示した。AM2/IMD の発現分布は、AM や CRLR/RAMP 系の発現と様式が異なっていた。AM や CRLR/RAMP 系の発現は先行研究の通り多くの組織に広汎に分布していた [210-212]。本研究で見られた AM2/IMD mRNA の発現分布は、ヒト [5, 6]、マウス [2] での mRNA の発現分布や、Taylor らの報告によるラットでの結果 [213]、我々が報告したヒトでの結果である、腎臓、胃、下垂体、視床下部に高い IR-AM2/IMD が見られるという結果 [5, 6] と一致している。AM2/IMD は血漿中に存在することが、ヒト [5] 及びラット [214-216] で報告されているが、この血中 AM2/IMD がどの組織から放出されているかは未だ決定されていない。今回、腎臓や胃、下垂体に mRNA の高発現が認められ、これらの臓器が血漿 AM2/IMD の分泌に関与している可能性が示唆された。

心不全モデル

ラット心臓における AM2/IMD の遺伝子発現が心不全時に増加することが初めて示された。イソプロテレノールにより引き起こされるラット心筋肥大モデルにおいて、AM2/IMD の遺伝子発現が増加することが報告されているが [8]、これまでのところ、心不全モデル動物の心臓、腎臓における AM2/IMD の発現についての報告はない。我々は、AM と受容体構成因子 (CRLR, RAMP1~3) の心臓での発現が上昇することも明らかにし、これは先行研究と一致している [190, 217-219]。心不全心における AM2/IMD mRNA の発現亢進は AM mRNA の亢進より顕著であるが、その発現パターンは AM2/IMD と AM で似通ってい

た。心不全における AM2/IMD, AM, 受容体構成因子の発現上昇は, autocrine, paracrine として, 失われた心筋機能を代償する適応反応によると考えられる。

血行力学によるストレスや, 虚血, 炎症性サイトカインは AM の発現を誘導することが知られている。梗塞に伴う心不全の直接的な血行力学の代償や, 付随して起こる冠状動脈虚血, サイトカイン濃度の上昇が, 心臓における AM mRNA の発現量を上昇させていると考えられる。一方, これらの刺激やストレスにより AM2/IMD 発現が誘導されるという報告は未だない。そこで, 血圧による負荷が AM2/IMD の発現に与える影響を確認するため, WKY と SHR の心臓において AM2/IMD mRNA の発現を検討し, WKY と SHR の心臓では, AM2/IMD mRNA の発現量が変化していないこと明らかにした。従って, 血圧高負荷ではなく, 心不全それ自体が, 肥大性心筋組織における AM2/IMD mRNA の発現, 産生を上昇させているものと考えられた。

心不全ラット腎臓において, AM2/IMD, AM, 受容体構成因子の mRNA 発現量に有意な変化は認められなかった。よって, 心不全における腎血行力学的変化は AM2/IMD を含めた腎臓における AM 系の発現に影響を与えないと考えられる。

5/6 腎摘腎不全モデル

AM2/IMD mRNA の発現は, 5/6 腎摘ラットの術後 3 日目, 56 日目において減少していたが, 術後 14 日目では SO ラットと同等となっていた。Fujisawa らは, AM2/IMD の腎動脈投与により, 尿量と尿中ナトリウム排泄量が増加することを報告している [10]。従って, 腎内で産生される AM2/IMD は autocrine/paracrine 的にそのナトリウム利尿効果を介し, 水・電解質代謝機構の役割の一部を担っている可能性が考えられる。

腎臓内の AM2/IMD mRNA 発現に影響を与える要因については, 圧力負荷,

容量負荷、腎障害に伴う反応性負荷等が考えられるが、これらに関する既存の研究報告はない。心不全モデルの結果より、単純な容量負荷は腎臓における AM2/IMD mRNA の発現調節に寄与していないと考えられる。また、免疫組織染色の結果より、腎臓における AM2/IMD の主たる発現部位は腎尿細管であるが、5/6NPX ラット腎臓においては腎尿細管の染色性が相対的に高くなっていた。これは、AM2/IMD が、腎尿細管における水・電解質輸送の過負荷が発生している慢性腎疾患という病態において、代償性に発現が誘導されている可能性を示唆している。一方、AM2/IMD の mRNA 発現量は 5/6NPX において減少していた。この結果は染色の結果と一見矛盾している。この矛盾は、腎臓の繊維化に伴って有効残存ネフロン数が減少したことにより、個々のネフロンでの AM2/IMD の発現は増加しているが、全体としては発現が減少したと考えることで説明できよう。しかしながら、この矛盾を説明するには、更に検討が必要と思われる。

5/6 腎摘腎不全モデルにおいて、受容体系は増加傾向を示したが、その中で、RAMP1 mRNA の発現亢進が 10 倍を超え、最も顕著に強くなっていた。この結果は、尿管閉塞モデルにおける閉塞腎臓において、RAMP1 が顕著に亢進し、RAMP2 と CRLR が有意に亢進するが RAMP3 は変化しないという Nagae らの報告と一致する[212]。RAMPs は、CRLR と共発現することにより受容体として作用し、CRLR/RAMP1 に対する親和性は AM2/IMD の方が AM より高い。従って、腎疾患においては AM2/IMD-RAMP1 を介した系が AM-RAMP2、AM-RAMP3 を介した系より重要な役割を担っている可能性が示唆される。

高血圧自然発症モデル

SHR での腎内 AM2 の発現の低下は、5/6 腎摘腎不全モデルの場合と同じく腎障害に伴うものと考えられる。一方、SHR も 5/6 腎摘腎不全モデルも、腎臓障

害の他に血圧が上昇するモデルである。従って、血圧の上昇そのものが直接的に AM2/IMD の発現を低下させている可能性も考えられる。今回我々は血圧を抑制した場合の AM2/IMD の発現を検討していない。よって、この可能性は更に詳細に調べる必要があり、今後の検討課題としたい。

免疫組織染色

心不全モデルにおいて心筋組織、血管平滑筋に AM2/IMD 様免疫反応が認められた。このラット心臓血管系における AM2/IMD 様免疫反応の陽性反応は、マウス[3]やヒト[5, 6]における発現と一致している。RT-PCR により CHF ラット心室において AM2/IMD mRNA の発現増加が認められたが、CHF ラットの心外膜下や心内膜下の領域は弱く染まっただけであった。これらの領域における AM2/IMD は、心不全によるストレスに付随して分泌されてしまっている可能性が考えられる。そして、このことがこれらの領域における AM2/IMD 様免疫反応の減弱を反映していると考えられる。Hagner らは、免疫組織化学的手法により、CRLR と RAMPs が血管系でくまなく染まり、CRLR が主に内皮領域に発現していることを報告している[220]。従って、心不全の心筋から分泌された AM2/IMD は、血管内皮細胞における CRLR/RAMPs 系を活性化することを介して心血管調節因子としての役割を担っていると思われる。

腎尿細管において AM2/IMD 様免疫反応が認められた。これは、我々のヒトにおける先行研究[5, 6]とは一致するが、Takei らによるマウスでの結果[3]とは異なり、一部 AM2/IMD の発現に種差が存在するのかもしれない。PCR によると、AM2/IMD は皮質に多く発現していた。免疫染色によると、主として尿細管が強く染まっており、特に近位尿細管が染まっていた。近位尿細管は皮質に多く位置するので、これらの結果は互いに一致していると思われる。

AM2/IMD の作用

心不全における AM2/IMD 上昇の病態生理学的役割は、AM や CGRP と同様に、その血管保護作用に関連しているように見える。AM と CGRP は強力な内因性の心保護作用及び腎保護作用を有する物質であるというエビデンスが蓄積されている。ペプチドまたは遺伝子発現による AM 及び CGRP の投与は、高血圧や虚血性心疾患、心不全、腎不全といった心血管疾患の新たな予防・治療戦略となっている[77-80]。AM や CGRP の心保護作用は CRLR/RAMPs 系を介している[221]。Yang らは、ラット心臓での心筋虚血・再還流障害モデルにおいて AM2/IMD が心保護作用を示すことを明らかにした[137, 139, 140]。AM2/IMD のこれらの心保護作用は、CRLR/RAMPs 系を介し、cAMP による情報伝達系を介する CGRP や AM のそれと似通っている[1, 80]。よって、AM2/IMD は、CGRP 受容体と AM 受容体の両方に作用することにより心保護作用を示し、心血管疾患の新たな予防・治療標的となり得るものと思われる。

腎内 AM2/IMD の発現は病態によりそれぞれ異なって調節されている。我々の研究結果は、腎内 AM2/IMD は病態に対して counter-regulatory peptide として作用していることを示唆している。しかし、腎内 AM2/AM system は、その産生部位が主として尿細管であり、残存ネフロンの絶対数が減少する病態すなわち SHR や慢性腎不全においては代償すること自体が不可能となり、一度始まった腎障害が止まることなく進行する一因となっている可能性が生じる。腎保護作用があると期待される AM2/IMD またはそのアゴニストは腎障害の進行を止める新しい治療薬となる可能性が示唆され、その開発が望まれる。

更に、いくつかの報告により、AM2/IMD には、特に視床下部、下垂体において、CRLR/RAMPs 系によらない他の受容体系が働いている可能性が指摘されている[214]。即ち、AM2/IMD が細胞内 cAMP 濃度を上昇させると共に、ラット、ヒトにおいて CGRP 依存的に分泌される成長因子を上昇させる[1, 3, 222]とい

う当初の報告とは異なり，Taylor らはラットにおいて AM2/IMD が成長ホルモン分泌を阻害することを明らかにした[214]．この作用は CRLR/RAMPs 系によるとは考えにくいとしている．末梢組織における未同定の AM2/IMD 特異的受容体の存在についての報告は未だない．従って，AM2/IMD の心保護作用が CRLR/RAMPs 系を介したもののなのか，AM2/IMD の未知の受容体系を介したもののなのかは現時点で不明であり，これを明らかとするには更なる検討が必要である．

第 2 項 (P)RR

組織分布

ラット各組織における(P)RR mRNA の発現を，RT-PCR 法により検討した．中枢組織では，今回検討した全ての組織（前頭葉，小脳，中脳・橋，脊髄，下垂体，視床下部，海馬）で(P)RR mRNA の強い発現が認められ，中枢組織のほぼ全ての組織において普遍的に分布している可能性が示唆された．この結果は，Nguyen らによるヒトを対象とした研究と一致している[15]．中枢組織における RAS は，細胞成長，細胞死，神経内分泌調節，認知機能に重要であり[223, 224]，中枢組織における(P)RR の発現は，(P)RR が認知機能及び脳の発達に対して重要な役割を果たしている可能性を示唆している．

末梢組織においても今回検討した全ての組織で(P)RR の発現が認められた．ラットにおける(P)RR mRNA の発現は，ヒト[15]と同様に，腎臓，副腎及び肺での発現が比較的強く認められ，発現様式もほぼ同様であった．よって，ヒトとラットの間で発現様式に種族差は存在しないことが示唆された．また，(P)RR mRNA の発現は精巣で弱く，卵巣で強く発現していることが確認され，性特異的な発現様式であることが示唆された．

心不全モデル

ラット心臓, 腎臓における(P)RR の遺伝子発現が心不全時に増加することが初めて示された. 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHR-sp; stroke prone spontaneously hypertensive rats)の心臓, 腎臓において, (P)RR の遺伝子発現が増加することが報告されているが[28, 167], これまでのところ, CHF モデル動物の心臓, 腎臓における(P)RR の発現についての報告はない. 先行研究において, 心不全モデルラット心臓で renin mRNA 及び ACE mRNA の増加することが報告されている[225-228]. 加えて, (P)RR と結合したプロレニン, プロセグメントの切断無しにアンジオテンシン I 産生能を獲得し[15, 229, 230], レニン, プロレニンが結合した(P)RR は, 直接的に ERK1/2 系を活性化[15, 21]. これらを合わせて考えると, (P)RR の発現が上昇することは, 心臓障害, 組織 RAS の亢進に寄与していると考えられる.

更に, CHF ラット腎臓における(P)RR mRNA の発現量は, SO ラットと比較して有意に上昇していた. 先行研究において, 腎臓におけるレニン mRNA も CHF ラットで SO ラットに比べ上昇していると報告されている. 心不全に付随する血行動態の変化が腎臓の(P)RR mRNA の発現量を上昇させていると考えられる. うっ血性心不全時には, 腎臓でも血液の流れが悪くなることにより負荷が発生する. 腎血流量の減少の結果, 腎臓ではレニン分泌により RAS が活性化し, さらにアルドステロンを介して, 腎臓での Na 及び水分貯留が生じることになり, 全体として心不全の悪循環に陥ることになる. よって, 本研究で認められた(P)RR の発現の増加を考慮すると, 心不全時の腎臓における(P)RR の亢進は, 循環 RAS 亢進を介して心臓障害に関与している可能性が考えられる.

5/6 腎摘腎不全モデル

術後 3 日目の急性腎不全期, 術後 14 日目の腎臓の代償性肥大期においては,

5/6NPX ラットと SO ラットとの間に(P)RR mRNA の発現に差は認められなかったが、術後 56 日目の慢性腎不全期において 5/6NPX ラットで(P)RR mRNA の発現が SO ラットと比べて約 1.6 倍に増加していた。また、ウエスタンブロットにより、(P)RR タンパク質も慢性腎不全期に増加していることが確認された。従来、慢性腎疾患時における腎組織の障害の進行に関して、RAS すなわち Ang II による AT1R を介した作用の過剰亢進が主なメカニズムであるとされてきた。しかし、循環血液中の Ang II 濃度は必ずしも腎局所の濃度を反映せず、多くの慢性腎疾患において PRA 及び Ang II 濃度は正常または低値であると報告されている。また、腎垂全摘モデルラットで検討した先行研究によると、腎臓における renin mRNA 及び AGT mRNA の増加は認められず、むしろ経時的に減少すると報告されている[231]。そして、renin mRNA の減少は、本研究でも確認された。よって、慢性腎疾患時の腎臓組織において RAS の亢進を示す所見は得られておらず、このことから、腎障害の進行には RAS の亢進以外のメカニズムが関与していると考えられる。本研究において腎不全時における(P)RR の発現の上昇が確認されたことから、(P)RR を介した直接的な作用による腎障害の進行が、上記の RAS の亢進とは異なった腎障害進行のメカニズムの 1 つとなっていることが推察される。また、慢性腎不全時に(P)RR の発現が増加することの生理学的意義を考えた時、renin の発現が減少していることに対する代償応答となっている可能性も考えられる。

高血圧自然発症モデル

SHR の心房、腎臓において(P)RR mRNA の発現が WKY と比較して減少していた。このことから、高血圧時には、心房及び腎臓において(P)RR の発現が減少していることが示された。しかしながら、Ichihara らによる先行研究の結果では、心臓及び腎臓における(P)RR mRNA の発現が高血圧ラットにおいて増加

することを報告している[27, 28]. このような正反対の結果を示した要因として、本研究で使用した高血圧モデルラットが SHR であったのに対し先行研究では SHR-sp であったことが考えられる. SHR-sp は、急速な高血圧進展により脳卒中病変を発生させる亜系として SHR から分離されたラットであり、一般に、急激かつ高度な高血圧進展に伴う心血管系疾患の病態モデルとして利用される. 従って、血圧上昇という圧負荷の上昇自体は(P)RR の発現を抑制し、一方、組織障害に対する代償性応答として(P)RR の発現の上昇が起こると考えられる. しかし、その詳細は不明であり、HRP のような(P)RR のアンタゴニストを用いた実験等により、更に詳細に検討する必要がある.

免疫組織染色

免疫組織化学的手法により、心臓、腎臓において(P)RR 様免疫反応が認められた. 心臓では、心筋組織、血管平滑筋、血管内皮において(P)RR 様免疫反応が認められた. CQ-PCR により CHF ラット心室において(P)RR mRNA の発現増加が認められた. よって、心不全の心筋における(P)RR の発現増加は、心臓における RAS 系を活性化することにより、心不全に伴う心肥大に関与していると考えられる. 加えて、腎臓では、腎尿細管、腎血管平滑筋、腎血管内皮において(P)RR 様免疫反応が認められた. CHF ラット腎臓では、腎尿細管の染色性が相対的に高くなっており、5/6NPX ラット腎臓では糸球体において(P)RR 様免疫反応性が認められた. RAS は、ナトリウム・水などの電解質バランスを調節する重要な内分泌系である. 従って我々の免疫染色の結果は、(P)RR が RAS の構成因子として、ナトリウム利尿効果を介し水・電解質を調節する役割を担っている可能性を示唆している. この役割は、腎尿細管における水・電解質輸送の過負荷が発生している心不全や腎不全という病態において特に重要である可能性が示唆される.

(P)RR の作用

Renin/prorenin と(P)RR の結合により生じる組織障害のメカニズムとして、現在以下の二つの経路が考えられる。一つ目は、Ang II と AT1R を介した経路であり、これは renin/prorenin の AGT に対する酵素活性が上昇することにより亢進される。二つ目は、RAS と独立した、renin/prorenin の結合による(P)RR を介した直接的な経路である。これは、ERK1/2 の活性化による細胞内シグナル伝達系を活性化させることで結果的に組織の線維化につながる[15, 21]。したがって、心不全や慢性腎不全時に生じている組織障害の進行においても、以上のメカニズムが働いていると考えられる。いくつかの先行研究により、(P)RR を介した作用と組織の線維化との関係が示されている。最近、renin/prorenin の(P)RR への結合を阻害するペプチドとして合成された、prorenin の前方部分領域と同じ配列を持つ“decoy” peptide と呼ばれる HRP の組織保護作用が報告されている[23, 24, 26-29, 31, 167]。HRP を投与することで、ラットの糖尿病性腎症が抑制されること[24]、MAP kinase の活性が抑制され、かつ糖尿病マウスの糸球体硬化が抑制されること[167]、高血圧自然発症ラットの糸球体硬化が抑制されること[23, 27]等が報告されている。そのため、(P)RR をターゲットとした活性化阻害ペプチドである HRP が、組織障害に対する治療薬として現在注目されている[232]。今後、この HRP 等の(P)RR 阻害薬を用いた研究を行うことにより、(P)RR と組織障害との関係が明らかとなっていくものと予想される。

第3項 UII/URP/UT-R

組織分布

本研究では、UII, URP, ET-1 mRNA が WKY の殆ど全ての組織で発現していることを示した。UII, URP, ET-1 は、これらの組織において paracrine,

autocrine 因子として作用している可能性が高い。興味深いことに, UII, URP, ET-1 は, 褐色脂肪細胞, 白色脂肪細胞においても発現しており, これらの組織においても paracrine, autocrine 因子として作用していると考えられる。

心不全モデル

心不全モデル心臓において, URP の mRNA 発現が上昇していた。URP mRNA の発現量の上昇は, UII や ET-1 mRNA の発現量の上昇より顕著であった。また, 心臓での URP 発現量は UII より多く, ラット心臓における UT-R の主要なリガンドが URP である可能性が示唆された。

先行研究では, ヒト心不全患者において血漿中 UII 濃度が上昇するという報告[65, 233, 234]や, ヒト心不全患者の心筋で UII, UT-R mRNA の濃度が上昇し, 特に末期心不全患者の心筋では UII の結合部位が顕著に増加していることが報告[50]されている。一方で, ヒト心不全患者において血漿中 UII 濃度は変化せず, 心不全患者の心房, 心室で UII mRNA の発現に変化がなかったという報告[235, 236]もあり, UII の心不全時における発現変化に関する報告は一定していない。実験動物にラットを用いた先行研究では, Tazanidis らが心筋梗塞を起こしたラットの心臓で UT-R mRNA の発現が約 1.8 倍に上昇し, UII, UT-R のタンパク質レベルでの発現も上昇したことを確認している[237]。

心不全モデルを用いた本研究の結果から, UII/URP/UT-R 系が心不全に伴う心筋細胞の増殖・繊維化や心筋の肥大に深く関与していること, また, ラットにおいては, 心不全には UII よりもむしろ URP が寄与している可能性が示唆された。

5/6 腎摘腎不全モデル

腎不全モデル腎臓において URP と UT-R の発現が亢進していた。これは, 腎

臓 UII/URP/UT-R 系が慢性腎不全の腎臓において亢進し、慢性腎疾患の腎臓において重要な病態生理学的役割を担っているの可能性を示唆している。腎臓において、URP は UII より発現量が多く、ラット腎臓における UT-R の主要なリガンドは URP であると思われる。

本研究において、URP と UII, UT-R の発現亢進は、5/6 腎摘ラットの術後 56 日目において認められた。しかしながら、代償的な腎臓の肥大は、腎摘ラットの術後の更に早い段階で認められ、5/6 腎摘出後 4 日目から始まり、14 日目に肥大が極大となることが知られている。これらの事実は、腎臓における UII 系の亢進は腎肥大応答の主要なメディエーターとは考えにくいことを示唆している。

免疫組織染色により、URP と UT-R の免疫反応性が腎尿細管において認められた。これらの所見は、URP が腎尿細管における水・電解質輸送を調節する autocrine・paracrine としての役割をなっている可能性を示唆している。URP のこの役割は、腎尿細管での水・電解質輸送の過負荷が発生している慢性腎不全の腎臓において重要な意味を持つものと思われる。これらの所見は、魚類における水・電解質輸送調節に関与する尾部下垂体から魚類 UII が分泌されているという重要な生理作用を連想させる[39]。

高血圧自然発症モデル

高血圧を発症した 12 週齢 SHR において、同週齢 WKY と比べ、心房における UII、腎臓における URP、心房、心室、腎臓における UT-R の mRNA 発現量が上昇していた。血圧の上昇が認められない 5 週齢の SHR と WKY 間では、UII、URP、UT-R、ET-1 の mRNA 発現量は変わらなかった。よって、UII、URP、UT-R は血圧により発現制御を受けおり、血圧の上昇により mRNA 発現が上昇したと考えられる。また、心房の UII と腎臓の URP の発現が SHR においてそ

それぞれ上昇していたのが興味深い。UII と URP は高血圧において異なった病態生理学的役割を担っている可能性が示唆された。

腎臓における UII の発現量が慢性腎疾患のラットの腎臓では亢進したが, SHR の腎臓では亢進していないかった。腎臓での UII 遺伝子の発現は, 血圧上昇ではなく, 生体内水分量の増加のような慢性腎疾患に伴うストレスにより誘導され, 一方, URP 遺伝子の発現は, これら両者の刺激により誘導されていることが示唆される。

UII 系の発現とは異なり, ET-1 の mRNA 発現は, 血圧の上昇した SHR の心臓, 腎臓で減少していた。先行研究では, 腎臓における ET-1 mRNA の発現が SHR で減少するか[238], 変化しない[239-241]ことが報告されている。一方, 腎臓における ET-1 mRNA 発現は, SHR-SP [242, 243], DOCA-salt 感受性高血圧ラット[240, 244, 245], DOCA-salt 付加 SHR [246, 247]といった重篤な高血圧ラットにおいて上昇している。よって, 腎臓における ET-1 の発現は, 重症高血圧時には組織障害により増加していると考えられる。更に, これらの結果は, 心臓, 腎臓での ET-1 と UII 系構成因子の遺伝子発現は, 高血圧において異なった調節を受けていることを示唆している。

免疫組織染色

心不全モデルの心臓, 5/6 腎摘腎不全モデルの腎臓での免疫染色により, URP と UT-R が心筋細胞, 血管平滑筋, 血管内皮細胞, 腎尿細管に存在することが示された。この結果は先行研究の結果と同様であった[50, 248]。従って, URP や UII は心臓や腎臓において, UT-R を介し autocrine または paracrine として作用していると考えられる。UII と URP は共通の受容体に結合するため, URP は UII と似た様々な生理作用を有することが報告されている[60, 61, 249, 250]。UII/URP/UT-R 系の亢進は, これらの様々な生理作用を介し, 心臓, 腎

臓における線維化の病態生理に関連していると考えられる。

UII/URP/UT-R 系の作用

UII は血管平滑筋の増殖と繊維化を促進する(9,10)。URP のマイトジェン作用は未だ報告されていないが、URP が心不全、腎不全、高血圧の心臓、腎臓において、繊維芽細胞や平滑筋細胞、メサンジウム細胞といった細胞の増殖を促進するのはあり得ることと思われる。心臓、腎臓における UII/URP/UT-R 系の発現亢進は、高血圧や慢性腎疾患におけるメサンジウム細胞のような細胞の増殖に関与している可能性が考えられる。

先行研究では、腎不全や心不全、高血圧、糖尿病といった、心血管疾患及び腎疾患における UII の病態生理学的役割が検討されている[51, 52, 65, 251-255]。一方、UII/URP/UT-R 系が心疾患、腎疾患において保護的に作用するのか、障害性に作用するのかについては、議論の的となっている。UII 受容体アンタゴニスト、palosuran は、糖尿病ラットにおいて腎機能を改善し[256]、糖尿病性腎症の患者において 24 時間尿中アルブミン排泄量を減少させる[257]。この報告は、UII 系を遮断することは、糖尿病性腎症に対して治療効果があることを示している。一方、Zoccali らは、血漿 UII 濃度は、心血管系イベントを起こしていない患者より、心血管疾患を起こした患者において有意に低下していることを報告している[258]。彼らは、UII は終末期腎障害の心血管系イベント発症の逆予測因子であるとし、そして、UII は必然的に血管障害性のペプチドではないとしている。従って、UII/URP/UT-R 系が組織障害に対し、保護的に作用するか、障害性に作用するかを解明するためには、腎疾患モデル動物における UII アンタゴニストの長期間投与試験が必要と考える。

第6節 結論

AM2/IMD, (P)RR, UII/URP/UT-R 系のいずれにおいても, 心不全, 腎不全, 高血圧といった循環器系疾患に関係する病態において, その発現が変化していた。これらの新規生理活性物質が心不全, 腎不全, 高血圧という病態において何らかの役割を担っている可能性が示唆された。これら新規生理活性物質のアゴニスト・アンタゴニストの開発は, 心血管・腎臓疾患の予防・治療に新たな戦略を創出する可能性がある。

総括

本研究では、新規生理活性物質 AM2/IMD, (P)RR, UII/URP/UT-R について、その遺伝子多型と病態モデルにおける発現について検討した。

第1章の遺伝疫学的解析では、AM2/IMD 遺伝子と(P)RR 遺伝子の遺伝子多型について解析を行った。その結果、AM2/IMD の翻訳領域に I/D 多型が存在し、DD 群で血圧値が高く、腎障害の頻度が高いことを発見した。また、(P)RR 遺伝子の IVS5+169C>T 多型では、男性において T アレル群で血圧が高値を示した。一方、+1513A>G 多型では、女性において、AG 群、GG 群で AA 群に比べ、高血圧性臓器障害を有する割合が増加していた。AM2/IMD, (P)RR が臓器障害治療の新たな標的となる可能性が示唆された。

第2章のラットを用いた解析では、AM2/IMD, (P)RR, UII/URP/UT-R 系のいずれにおいても、心不全、腎不全、高血圧といった循環器系疾患に関係する病態において、その発現が変化していた。これらの新規生理活性物質が心不全、腎不全、高血圧という病態において何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

本研究により、これら新規生理活性物質が生体内でも重要な役割を担っている可能性が高いことが明らかとなった。しかしながら、AM2/IMD, (P)RR, UII/URP/UT-R 系の病態生理学的意義を解明するためには、今後より詳細な検討が必要である。また、病態分子標的治療への応用についてのさらなる研究の発展が期待される。

Appendix Data

測定機器の精度	157
cDNA 全長配列の確認	159
統計学的手法	166
(P)RR 遺伝子多型と血圧値の関連(追加データ)	177
実験動物	183
RNA 抽出	187
CQ-PCR	189
Housekeeping gene	192
CQ-PCR の反応条件	194
抗体の特性	196

測定機器の精度

1. 血圧計

血圧計の精度に関する米国医療機器振興協会(AAMI; American Association of Medical Instrumentation)の基準では、聴診法との同時測定による血圧値と比較して平均格差が ± 5 mmHg 以内、標準偏差が ± 8 mmHg 以内を許容範囲としている[259]。本研究で用いた血圧計は AAMI の基準を満たしており、疫学的検討に用い得ることが明らかにされている[100, 114]。

2. LVH

LIFE 研究を含めた先行研究において、Sokolow-Lyon voltage criteria 及び Cornell voltage duration product criteria 各々を単独で LVH の基準とした場合、検屍解剖での左室筋重量の比較において、両基準とも特異度は約 95%、感度は約 30%から 40%であったが、両基準を組み合わせた場合、特異度は減少することなく感度が 10%以上増加したと報告されている[260-262]。さらに、LIFE 研究における心電図上 LVH を有する者は、70%以上で心エコー上の解剖学的 LVH を有することが報告されている[263]。

3. 頸動脈病変

IMT 測定に関する精度検定を対象者 29 名に対して行った[110]。観測者内一致度を検定するため、6 名の観測者がそれぞれ 4 から 21 名の対象者の IMT を 2 回測定した。観測者内における 2 回の測定の変動係数は 6.3%、相関係数(r)は $r = 0.91$, $P < 0.001$ であった(差: 0.035 ± 0.035 mm)。また観測者間一致度の検定のため、6 名の観測者の中から無作為に 4 組のペアを作り、各ペア内で同一対象者の IMT を一定の順番に測定した。観測者間における変動係数は 11.9%、相関係数(r)は $r = 0.62$, $P < 0.001$ であった(差: 0.085 ± 0.062 mm)。

これらの結果は、本研究の IMT 測定の再現性が高く、先行研究[121-124]と同程度であり、疫学研究に用い得ることを示している。

4. 無症候性脳血管障害

測定者間及び測定者内一致度検定を対象者 111 名に対して行った。測定者間一致度は、ラクナ梗塞 $\kappa = 0.70-0.78$ 、WMH $\kappa = 0.68-0.79$ 、測定者内一致度は、ラクナ梗塞 $\kappa = 0.73-0.84$ 、WMH $\kappa = 0.78-0.84$ であり、いずれも良好であった。

cDNA 全長配列の確認

NCBI GenBank には, ヒト AM2/IMD cDNA 配列として 2 つのエクソンからなる 4246 bp が登録されている(NM_024866). また, ヒト(P)RR cDNA 配列として 9 つのエクソンからなる 2044 bp が登録されている(NM_005765). ヒト AM 2/IMD cDNA 及びヒト(P)RR cDNA の全長配列を確認するため, cDNA 末端高速増殖法(RACE; the rapid amplification of cDNA ends)を用いた[264]. RACE には, BD SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)を使用した.

1. 5'-/3'-RACE-Ready cDNAs

BD SMART RACE cDNA Amplification Kit User マニュアルに従い RACE 用の逆転写反応を行い, 5'-/3'-RACE-Ready cDNA 溶液を作製した.

5'-RACE-Ready cDNA pre 溶液として, 0.5 mL 反应用チューブに total RNA, キット付属の特異的 oligo(dT) 5'-primer (5'-(T)₂₅VN-3': 5'-CDS, 10 μM), オリゴヌクレオチド (5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3': SMART II A オリゴヌクレオチド, 10 μM)を加え, 滅菌水で全量を 5 μL とした溶液を作製した(Table S1(A)). 3'-RACE-Ready cDNA pre 溶液として, 0.5 mL 反应用チューブに total RNA, キット付属の特異的 oligo(dT) 3'-primer (5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAG TAC(T)₃₀VN-3': 3'-CDS, 10 μM)を加え, 滅菌水で全量を 5 μL とした溶液を作製した(Table S1(B)).

5'-/3'-RACE-Ready cDNA pre 溶液を 70°C で 2 分間インキュベートした後, BD PowerScript Reverse Transcriptase (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)の反応組成液(5x First Strand buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 30 mM MgCl₂), DTT, dNTPs Mix, PowerScript Reverse Transcriptase)を加え, 滅菌水で全量を 10 μL とした(Table S1(C)). エアーインキュベーター(EYELA

Table S1. 5′-/3′-RACE-Ready cDNA 反応溶液.

(A) 5′-RACE-Ready cDNA pre 溶液	
total RNA	1 μg
10 μM 5′-CDS primer	1 μL
10 μM SMART II A オリゴヌクレオチド	1 μL
滅菌水	適量
総量	5 μL
(B) 3′-RACE-Ready cDNA pre 溶液	
total RNA	1 μL
10 μM 3′-CDS primer	1 μL
滅菌水	適量
総量	5 μL
(C) 5′-/3′-RACE-Ready cDNA 反応溶液	
5′-/3′-RACE-Ready cDNA pre 溶液	5 μL
5x First Strand buffer	2 μL
20mM DTT	1 μL
10mM dNTPs Mix	1 μL
PowerScript Reverse Transcriptase	1 μL
総量	10 μL

SLI-220, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)で、42°Cで1.5時間インキュベートした後、Tricine-EDTA Buffer (10 mM Tricine-KOH (pH 8.5), 1.0 mM EDTA) 100 μLを加え、72°Cで7分加熱した後、急冷してBD PowerScript Reverse Transcriptaseを失活させ、5′-/3′-RACE-Ready cDNA 溶液とした。5′-/3′-RACE-Ready cDNA 溶液は、反応を行うまで−30°Cで保存した。

2. 5′-/3′-RACE PCR

GenBankに登録されているヒトAM2/IMD cDNA 配列(NM_024866), ヒト(P)RR cDNA 配列(NM_005765)を基に5′-RACE PCR用 primer 及び3′-RACE

Table S2. 5′-/3′-RACE PCR で使用した primer 配列

Primer type	Sequence (5′-3′)	T _{ann}
Universal Primer A Mix (UPM)		
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG CAGTGGTATCAACGCAGCGT	
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
Nested Universal Primer A (NUP)		
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
Adrenomedullin 2/intermedin		
5′-RACE GSP1	GGAGGGGCCACTTCTGGCCAGTT	66°C
5′-RACE GSP2	TGGGGTCCACAGGAGCTGAG	64°C
3′-RACE GSP1	CCATGGCCCGGATCCCGACG	66°C
3′-RACE GSP2	GGTGGCCGCCAACACTCG	64°C
(Pro)renin receptor		
5′-RACE GSP1	ACCAGGGATGTGTCGAATGATTTGA	68°C
5′-RACE GSP2	AAGGCCAAGCCAGTCATAATCCAC	68°C
3′-RACE GSP1	CCATGGCTGTGCTTGTCTGTTCTC	68°C
3′-RACE GSP2	CCTCCCTCATAGAAGACAAGGAC	68°C

T_{ann}: アニール温度.

PCR 用 primer を作製した(Table S2). 5′-/3′-RACE PCR には, BD Advantage 2 PCR Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)を使用し, PCR 産物の特異性を上げるために 2 段 Nested-PCR 法を用いた.

1 段目の 5′-/3′-RACE PCR は 10x BD Advantage 2 PCR Buffer (400 mM Tricine-KOH (pH 8.7), 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37.5 µg/mL bovine serum albumin (BSA), 0.05% Tween 20, 0.05% Nonidet-P40), 10 mM dNTPs Mix, 50x Advantage 2 Polymerase Mix からなる反応組成液と 5′-/3′-RACE-Ready cDNA 溶液, gene specific primer 1 (GSP1), キット付属 anchor primer mix (Universal Primer Mix A (UPM)): 2 µM Long primer と 10 µM short primer の混合溶液), 滅菌水で総量 20 µL とし(Table S3(A)),

Table S3. 5′-/3′-RACE PCR 反応溶液.**(A) 1st 5′-/3′-RACE PCR 反応溶液**

10x Advantage 2 PCR Buffer	2.0 μL
10mM dNTPs Mix	0.4 μL
50x Advantage 2 Polymerase Mix	0.4 μL
5′-/3′-RACE-Ready cDNA 溶液	1.0 μL
10 μM GSP1	0.5 μL
UPM	0.5 μL
滅菌水	適量
総量	20.0 μL

(B) 2nd 5′-/3′-RACE PCR 反応溶液

10x Advantage 2 PCR Buffer	2.0 μL
10mM dNTPs Mix	0.4 μL
50x Advantage 2 Polymerase Mix	0.4 μL
1st 5′-/3′-RACE PCR 反応溶液(200 倍希釈)	1.0 μL
10 μM GSP2	0.5 μL
10 μM NUP	0.5 μL
滅菌水	適量
総量	20.0 μL

Touchdown PCR 法[265, 266]で行った。Touchdown PCR は、hot start で反応を開始し、94°C で 2 分間熱処理した後、94°C・5 秒 - 72°C・3 分 x 5 cycles, 94°C・5 秒 - 70°C・10 秒 - 72°C・3 分 x 5 cycles, 94°C・5 秒 - 66 or 68°C・10 秒 - 72°C・3 min x 30 cycles を行い、72°C で 5 分間熱処理して反応を終了した。

2 段目の 5′-/3′-RACE PCR は 1 段目と同様の反応組成液及び 1 段目の 5′-/3′-RACE PCR 反応溶液を 200 倍希釈した溶液, nested GSP (GSP2), キット付属 nested anchor primer (NUP; Nested Universal Primer A), 滅菌水で総量 20 μL として PCR を行った(Table S3(B)). Nested-PCR は、hot start

で反応を開始し, 94°C・5 秒 - 64 or 68°C・15 秒 - 72°C・2 min x 30 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して反応を終了した.

3. cDNA 配列の決定

2.0% agarose gel 電気泳動(60 V・120 min)と EtBr 染色により現れた 2 段目の 5'-/3'-RACE PCR 産物の特異的シグナルを切り出し, QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA)を用いて精製した. 精製は, QIAEX II Handbook の QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol に従った. 精製した 5'-/3'-RACE PCR 産物をテンプレートとして, TCS 反応, エタノール/EDTA/NaOAc 沈殿法による精製, Autosequencer による配列確認を “AM2/IMD I/D 多型の確認(p.31)”と同様の条件で行い, それぞれの cDNA 配列を確認した.

4. AM2/IMD の遺伝子構造

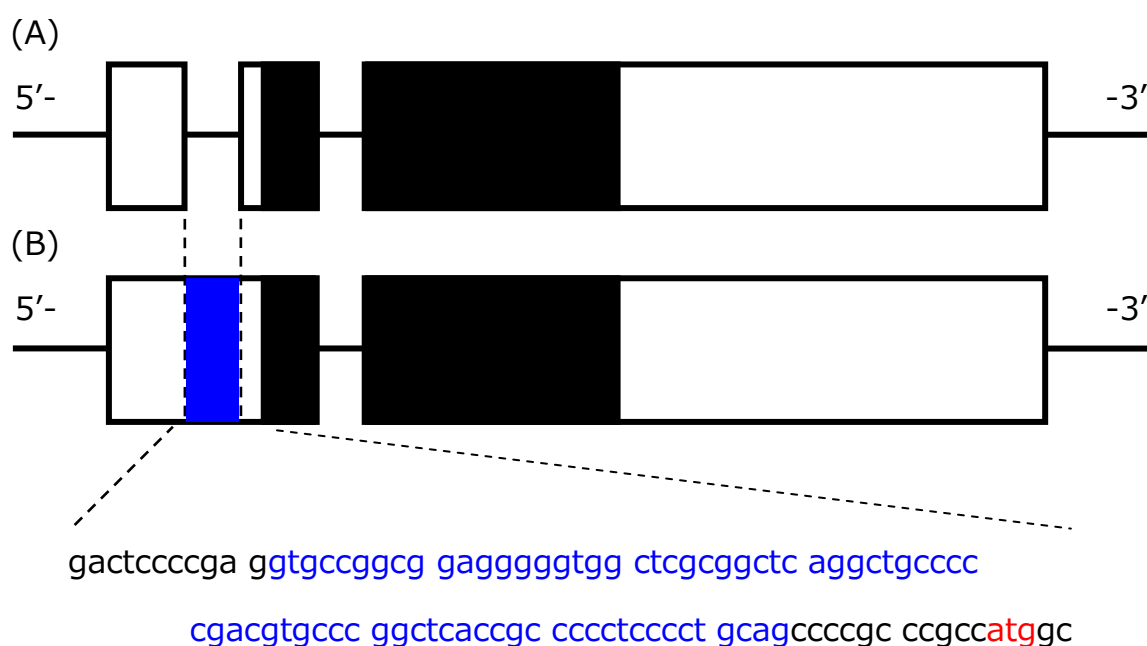
5'-/3'-RACE PCR により, AM2/IMD cDNA 4183 bp が得られた. AM2/IMD 遺伝子は, 3 つエクソンから構成されていた(Figure S1(A)). 一方, GenBank に登録されている AM2/IMD cDNA 配列(NM_024866)は, イントロン 1 (63 bp)が開裂していない 2 つのエクソンから構成されていた(Figure S1(B)). 今回, シーケンス法により配列を確認した RACE PCR 産物中にイントロン 1 が開裂していない配列(Figure S1(B))は存在しなかった.

5. (P)RR の遺伝子構造

5'-/3'-RACE PCR の結果, (P)RR cDNA 2092 bp が得られた. GenBank に登録されている cDNA 配列(NM_005765)と比較すると, RACE PCR の cDNA 配列は 5'端側 58 bp が未登録の cDNA 配列であったが, 他の配列は NM_005765

の cDNA 配列と一致した。この新規配列を含め、5'端非翻訳領域にイントロンは存在していなかった。

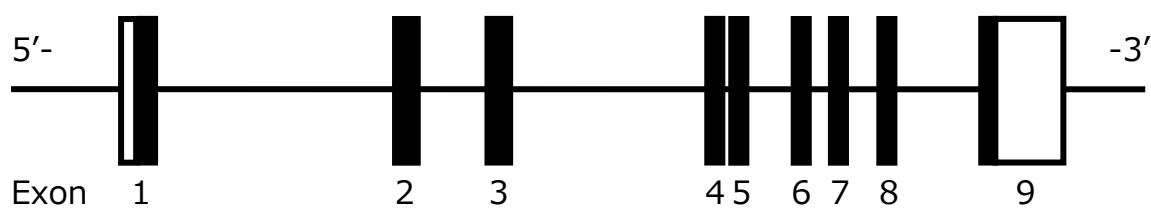
(P)RR cDNA は、9つのエクソンから構成されていた(Figure S2(A))。また、(P)RR cDNA 配列にはスプライス変異が存在し、エクソン 2 (131 bp)が欠失している cDNA (Figure S2(B))、エクソン 4 (96 bp)が欠失している cDNA (Figure S2(C))、エクソン 4・5 (96 + 138 = 234 bp)が欠失している cDNA (Figure S2(D))が確認された。エクソン 2 が欠失する cDNA 配列では、エクソン 3 の途中で終止コドンが入るため、翻訳により 22 残基からなるアミノ酸が生じる可能性がある。エクソン 4 またはエクソン 4・5 が欠失する cDNA 配列では、終止コドンの位置は正常(P)RR cDNA 配列と変わらず、それぞれ 32 残基、78 残基のアミノ酸が欠失する(P)RR が生じる。



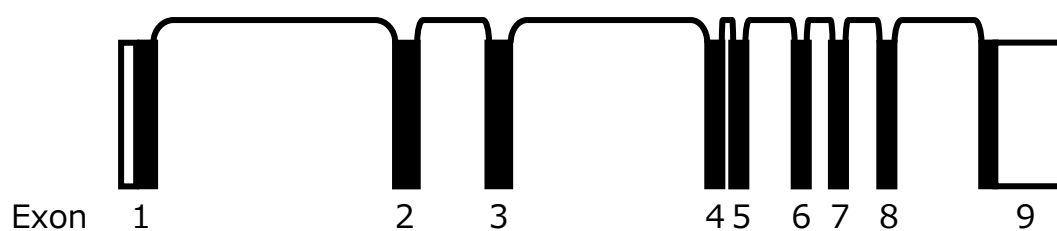
□ : 非翻訳領域, ■ : 翻訳領域, ■ : イントロン 1, atg : 転写開始コドン

Figure S1. ヒト AM2/IMD cDNA 配列. (A) RACE PCR より得られた cDNA 配列. (B) GenBank に登録されている cDNA 配列(NM_024866).

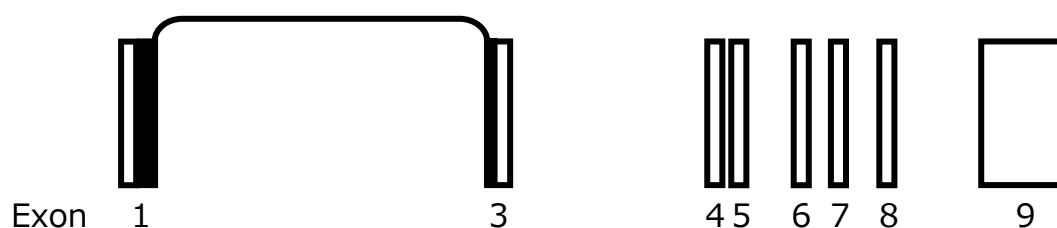
ヒト(P)RR cDNA 配列(Xp11.4)



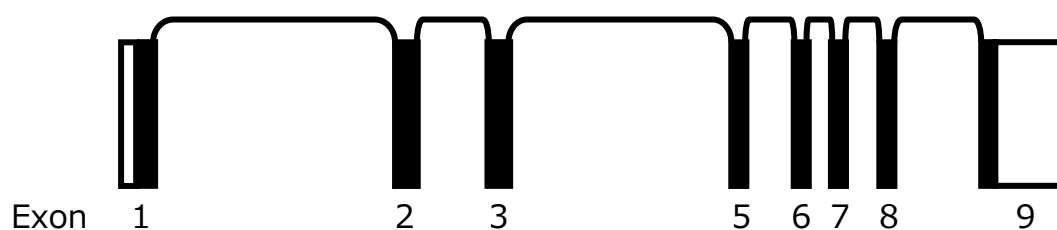
(A) 正常(P)RR cDNA (アミノ酸 350 残基)



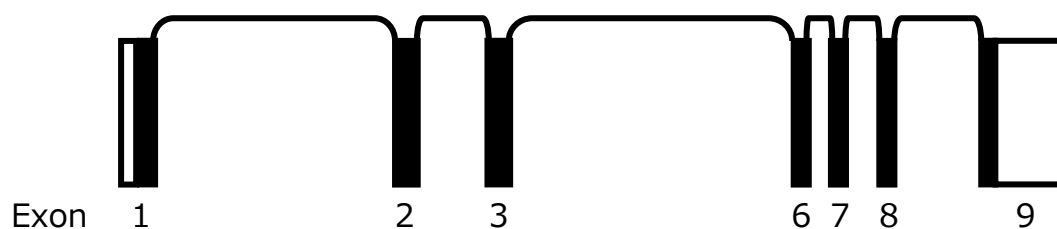
(B) (P)RR cDNA - exon 2 (131 bp)の欠失(アミノ酸 22 残基)



(C) (P)RR cDNA - exon 4 (96 bp)の欠失(アミノ酸 318 残基)



(D) 正常(P)RR cDNA - exon 4, 5 (234 bp)の欠失(アミノ酸 272 残基)



□ : 非翻訳領域, ■ : 翻訳領域

Figure S2. ヒト(P)RR cDNA 配列のスプライス変異.

統計学的手法

1. Hardy-Weinberg 平衡

SNP などのように 2 つの対立遺伝子(アレル A とアレル a)が存在し, ある集団におけるそれぞれの対立遺伝子頻度を p, q とすると, $p + q = 1$ が成立する. AA ホモ接合体群, Aa ヘテロ接合体群, aa ホモ接合体群の遺伝子型頻度はそれぞれ $p^2, 2pq, q^2$ ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$)となる. 対立遺伝子頻度と遺伝子型頻度にこの単純な関係 (Hardy-Weinberg 分布) が成り立つ集団を, Hardy-Weinberg 平衡にあるという.

Hardy-Weinberg 平衡とは完全な自由婚が行なわれた場合に達成される遺伝子型の配分であり, 近親婚や亜集団間での排他的結婚などが存在すると Hardy-Weinberg 平衡からのずれが生じる. しかし, Hardy-Weinberg 平衡からのずれがあっても, その後の自由婚により一代で Hardy-Weinberg 平衡が達成される. 従って, Hardy-Weinberg 平衡は遺伝子型データの正当性を評価するためにもしばしば有用である. もし, ある集団から採取された遺伝子型のデータが Hardy-Weinberg 平衡からあまりにずれている場合は測定の誤りや, 仮説の誤りの可能性を検討する必要がある.

本研究における観測対象は各 SNP における遺伝子型頻度のみであり, 一つの基準で 3 個のカテゴリ(野生型ホモ接合体, ヘテロ接合体, 変異型ホモ接合体)に分類されるため, 検定は一元分類による χ^2 検定で行った. 対象者(総数 n)におけ遺伝子型頻度の実測度数が野生型ホモ接合体群で α , ヘテロ接合体群で β , 変異型ホモ接合体群で γ の時($n = \alpha + \beta + \gamma$), 対立遺伝子頻度を野生型アレルが a , 変異型アレルが b とする($a + b = 1$)と,

$$a = (2\alpha + \beta) / 2n$$

$$b = (\beta + 2\gamma) / 2n$$

であり, 遺伝子型頻度の期待度数は, 野生型ホモ接合体群が $a^2 \times n$, ヘテロ接

合体群が $2ab \times n$, 変異型ホモ接合体群が $b^2 \times n$ となるので, それぞれの値を求め以下の式に代入し,

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{期待度数} - \text{実測度数})^2}{\text{期待度数}} < \chi_2^2(0.05) = 5.991$$

なら, 「期待度数と実測度数には差が無い」という帰無仮説は棄却できない. すなわち, Hardy-Weinberg 平衡が統計学的に成立し, Hardy-Weinberg 平衡を乱す要因がないとした.

2. 連鎖不平衡

連鎖不平衡とは, 連鎖する 2 つ以上の遺伝子座で観察され, 異なる遺伝子座間における対立遺伝子の分配が独立ではない現象, すなわち, ハプロタイプ頻度が各遺伝子座におけるアレル頻度を乗して得られる頻度からずれている現象である. 連鎖不平衡の強さを表す尺度としては, 連鎖不平衡係数 D や D を規格化した D' 値及び r^2 値等が存在する.

連鎖不平衡係数 D は, ハプロタイプ頻度が各遺伝子座における対立遺伝子座におけるアレル頻度を乗して得られる頻度からのずれを示すものである. 遺伝子座 1 の対立遺伝子を a, b , 遺伝子座 2 の対立遺伝子を c, d とし, アレル頻度をそれぞれ $P_a, P_b (= 1 - P_a), P_c, P_d (= 1 - P_c)$ とする. この時, 染色体が各遺伝子座におけるどの対立遺伝子を持つかにより, $a-c, a-d, b-c, b-d$ の 4 種類のハプロタイプが存在する可能性があり, 各ハプロタイプ頻度を $P_{ac}, P_{ad}, P_{bc}, P_{bd}$ とする. ここで, $P_{ac} + P_{ad} + P_{bc} + P_{bd} = 1$ であり, 各アレル頻度は,

$$P_a = P_{ac} + P_{ad}, P_b = P_{bc} + P_{bd}$$

$$P_c = P_{ac} + P_{bc}, P_d = P_{ad} + P_{bd}$$

と表される. このアレル頻度は, 集団の中の頻度ではなく, サンプルから推定されたものである. 仮に, 連鎖不平衡が存在しない場合には, 各ハプロタイプ

頻度は各遺伝子座のアレル頻度の積で与えられ, $P_{ac} = P_a P_c$ 等が成立する. しかし, 連鎖不平衡が存在する場合にはこれらの等式は成立せず, このずれを連鎖不平衡係数 D と呼ぶ. D を用いるとハプロタイプ頻度とアレル頻度との関係は,

$$P_{ac} = P_a P_c + D, P_{ad} = P_a P_d + D$$

$$P_{bc} = P_b P_c + D, P_{bd} = P_b P_d + D$$

となる. また, D は次式でも与えられる.

$$D = P_{ac} P_{bd} - P_{ad} P_{bc}$$

連鎖不平衡がない場合には, $D = 0$ であり, $D > 0$ の場合を「正の連鎖不平衡」若しくは「正の相関」と呼び, $D < 0$ の場合を「負の連鎖不平衡」若しくは「負の相関」と呼ぶ. ハプロタイプ頻度及びアレル頻度は 0 から 1 の間の範囲にあるので, D はある限られた範囲内の値をとる. D が取り得る値の下限值 D_{\min} 及び上限値 D_{\max} は以下のようなになる.

$$D_{\min} = \max(-P_a P_c, -P_b P_d) = (-1) \times \min(P_a P_c, P_b P_d)$$

$$D_{\max} = \min(P_a P_c, P_b P_d)$$

このように D の取り得る範囲が限定されていることから, 連鎖不平衡係数を規格化し, 以下の D' で表現する.

$$D' = \begin{cases} D/D_{\max} & \text{if } D > 0 \\ D/D_{\min} & \text{if } D < 0 \end{cases}$$

理想的条件(最初の単一突然変異, 疾患座位とマーカー座位での再起突然変異がない)では, D' 値はマーカーと疾患遺伝子座との遺伝的距離のみに依存することから, 尺度として最適な性質を持っている. しかし, D' 値は遺伝子座の片方あるいは両方の多型の頻度が極めて小さいとき高い値($D' = 1$)となり, 連鎖不平衡と考えるには不適當な事象も連鎖不平衡としてしまう.

r^2 値はしばしば ρ^2 , Δ^2 とともに記述される統計量であり, 次式で定義される.

$$r^2 = \frac{D^2}{P_a P_b P_c P_d}$$

ここである集団からのサンプルについて、各遺伝子座の2つの対立遺伝子を成分とする2×2表を考える。2×2表の各要素は、各ハプロタイプの個数である。ハプロタイプ*i*について、実際に観察された数を*n_i*、予想値を*ne_i*とすると、

$$ne_{ac} = nP_a P_c, ne_{ac} = nP_a P_c, ne_{ac} = nP_a P_c, ne_{ac} = nP_a P_c$$

となる。この2×2表について度数の χ^2 検定を行うと、

$$\chi^2 = \sum_i^{\text{haplotype}} \frac{(n_i - ne_i)^2}{ne_i} = nr^2$$

となり、 r^2 は χ^2/n と等しい統計量である。ここで、*n*は染色体の総数であり、サンプル人数は*n/2*で表される。この統計量は非常によく用いられるが、最適条件に置いてさえ、この期待値は遺伝距離だけではなくマーカーのアレル頻度に依存する。

この他にしばしば用いられる連鎖不平衡の尺度としては、

$$\delta = \frac{D}{(P_{ac} - P_{ad})P_{bd}}$$

$$d = \frac{D}{(P_{ac} + P_{bc}) \times (P_{ad} + P_{bd})}$$

$$Q = \frac{D}{P_{ac} P_{bd} + P_{ad} P_{bc}}$$

等がある。しかし、より現実的な状況(最初の不完全な連鎖不平衡、再起突然変異)では、連鎖不平衡の尺度すべてが不完全であり、どの尺度もすべての場合でうまくいかない。

3. ハプロタイプ

ハプロタイプとは、連鎖する複数の座位の対立遺伝子のうち、1つの配偶子に存在するものの組み合わせである。この組み合わせは、減数分裂での組換えがない限り保存される。組換えが起きると新たなハプロタイプが形成され、それが配偶子により次世代に伝えられ、次の組換えが起きるまで変化しない。

各個体のハプロタイプの決定は困難であり、仮に1人の個体の遺伝子型すべてが決定されたとしてもハプロタイプが決定されるとは限らない。それは、遺伝子型が通常はもう一方染色体上の対立遺伝子と混合した状態でしか識別できないからである。世代交代で一塊となって移動することを考慮し、親族の遺伝子型を決定することにより、その個体のハプロタイプを確定することが可能である。しかし、本研究で用いた対象では、家系情報が存在しないためこの方法で個体のハプロタイプを決定することはできない。このような家系情報がない集団においても、EM アルゴリズムを使用することにより、ハプロタイプ頻度を推定することができる。EM アルゴリズムとは、完全なデータが得られたという仮想的な状況での尤度を用いて、反復的な手順で不完全データに対する最尤推定量を計算する手法である。2つの SNP におけるハプロタイプ頻度の EM アルゴリズムによる推定は、以下ようになる。遺伝子座 1 の対立遺伝子を a, b, 遺伝子座 2 の対立遺伝子を c, d とする。この 2 つの遺伝子座において、遺伝子型は aacc, aacd, aadd, abcc, abcd, abdd, bbcc, bbcd, bbdd の 9 種類であり、ハプロタイプは ac, ad, bc, bd の 4 種類である。不完全データは 9 種類の遺伝子型を持つ個人数 ($n_{aacc}, n_{aacd}, n_{aadd}, n_{abcc}, n_{abcd}, n_{abdd}, n_{bbcc}, n_{bbcd}, n_{bbdd}$, $S = \sum n_{ij}$) であり、完全データは 4 種類のハプロタイプ頻度 ($P_{ac}, P_{ad}, P_{bc}, P_{bd}$) である。不完全データ(遺伝子型)から完全データ(ハプロタイプ)を推定するにあたり、不完全データは 2 種類に分けられる(特定の haplotype の本数を確率的に決定する「非確定的ハプロタイプ数」、特定のハプロタイプの本数を一

意的に決定する「確定的ハプロタイプ数」). 前者にあたるのは n_{abcd} の 1 種類であり, 後者にあたるのは残りの 8 種類である. EM アルゴリズムでは非確定的ハプロタイプ数を 4 種類のハプロタイプに均等に分配し, 確定的ハプロタイプ数と合算し, その値を基にハプロタイプ頻度の初期推定値を算出する. ハプロタイプ頻度の初期推定値をそれぞれ $P_{ac0}, P_{ad0}, P_{bc0}, P_{bd0}$ とすると,

$$P_{ac0} = (4n_{aacc} + 2n_{aacd} + 2n_{abcc} + n_{abcd}) / 4S$$

$$P_{ad0} = (4n_{aadd} + 2n_{aacd} + 2n_{abdd} + n_{abcd}) / 4S$$

$$P_{bc0} = (4n_{bbcc} + 2n_{abcc} + 2n_{bbcd} + n_{abcd}) / 4S$$

$$P_{bd0} = (4n_{bbdd} + 2n_{abdd} + 2n_{bbcd} + n_{abcd}) / 4S$$

となる. ついで, そのハプロタイプ頻度の初期推定値を基に, 非確定的ハプロタイプ数を分配し, 新たなハプロタイプ頻度の推定値を得る. ついで, そのハプロタイプ頻度の推定値を基に非確定的ハプロタイプ数の再分配を行う. この作業を m 回繰り返した時のハプロタイプ頻度の推定値をそれぞれ $P_{acm}, P_{adm}, P_{bcm}, P_{bdm}$ とすると,

$$P_{acm} = \left(n_{aacc} + n_{aacd} + n_{abcc} + \frac{P_{acm-1}P_{bdm-1}}{P_{acm-1}P_{bdm-1} + P_{adm-1}P_{bcm-1}} n_{abcd} \right) / S$$

$$P_{adm} = \left(n_{aadd} + n_{abdd} + n_{abdd} + \frac{P_{adm-1}P_{bcm-1}}{P_{acm-1}P_{bdm-1} + P_{adm-1}P_{bcm-1}} n_{abcd} \right) / S$$

$$P_{bcm} = \left(n_{bbcc} + n_{abcc} + n_{bbcd} + \frac{P_{adm-1}P_{bcm-1}}{P_{acm-1}P_{bdm-1} + P_{adm-1}P_{bcm-1}} n_{abcd} \right) / S$$

$$P_{acm} = \left(n_{bbdd} + n_{bbcd} + n_{abdd} + \frac{P_{acm-1}P_{bdm-1}}{P_{acm-1}P_{bdm-1} + P_{adm-1}P_{bcm-1}} n_{abcd} \right) / S$$

となる. そして, この作業を繰り返すとハプロタイプ頻度は収束し, その収束推定値は現実のデータとの整合性が高い.

4. ANOVA

ANOVA は 3 群以上の集合の分散が等しいとみなせる場合、平均値(母平均)がすべて等しいかどうかを検定する手法である。

帰無仮説(H_0)は「各群で差がない」、対立仮説(H_1)は「各群で差がある」と仮定し、有意水準を α とする。群の数を k 、全ケース数を n 、第 j 群のケース数を n_j 、全体の平均値を \bar{X} 、第 j 群における平均値を \bar{X}_j とし ($j=1, 2, \dots, k; \sum n_j = n$)、群間変動と群内変動の偏差平方和と自由度を求める。

群間変動

$$\text{平方和}(S_A): S_A = \sum_{j=1}^k n_j (\bar{X}_j - \bar{X})^2$$

$$\text{自由度}(df_A): df_A = k - 1$$

群内変動

$$\text{平方和}(S_E): S_E = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2$$

$$\text{自由度}(df_E): df_E = n - k$$

この値を基に、平均平方(平方和を自由度で割った値)を計算し、分散比 F を求める。

$$\text{群間平均平方}(V_A): V_A = S_A / df_A$$

$$\text{群内平均平方}(V_E): V_E = S_E / df_E$$

$$F \text{ 値}(F_0): F_0 = V_A / V_E$$

検定統計量 F_0 は、第 1 自由度が $df_A (= k - 1)$ 、第 2 自由度が $df_E (= n - k)$ の F 分布に従うので、有意確立(P)を $P = \Pr(F \geq F_0)$ とすると、

$P > \alpha$ で帰無仮説を採択する：「各群の母平均値は等しくないとはいえない」

$P \leq \alpha$ で帰無仮説を棄却する：「各群の母平均値は等しくない」

5. ANCOVA

ANCOVA は共変量で調整した各群の平均値に差があるかどうか検定する手法である。

帰無仮説(H_0)は「各群で差がない」、対立仮説(H_1)は「各群で差がある」と仮定し、有意水準を α とする。独立変数 (共変量) を X , 従属変数を Y とし、 k 群において、各群のケース数を n_i , 全ケース数を $n = \sum n_i$, また、全体の平均値を \bar{X} , \bar{Y} , 各群の平均値を \bar{X}_j , \bar{Y}_j とし、 $S_{T(Y)}$, $S_{T(X)}$ を変数 Y , X の全体の平方和, SP を全体の積和としたとき,

$$S_{T(Y)} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 - \sum_{j=1}^k n_j (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2$$

= Y の群内平方和 + Y の群間平方和

$$S_{T(X)} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X})^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 - \sum_{j=1}^k n_j (\bar{X}_j - \bar{X})^2$$

= X の群内平方和 + X の群間平方和

$$SP_T = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X})^2 (Y_{ij} - \bar{Y})^2$$

$$= \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 - \sum_{j=1}^k n_j (\bar{X}_j - \bar{X})^2 (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2$$

= $SP_A + SP_E =$ 群内平方和 + 群間平方和

独立変数で調整された従属変数の推定誤差平方和を以下のように定義すると、全データに基づく回帰直線からの変動

$$S'_{T(Y)} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_{ij}^T)^2 = S_{T(Y)} - \frac{SP_T^2}{S_{T(X)}}$$

$$\bar{Y}_{ij}^T = a_T X_{ij} + b_T, a_T = \frac{SP_T}{S_{T(X)}}, b_T = \bar{Y} - a_T \bar{X}$$

全群に共通な傾きと各群ごとの切片を持つ回帰直線からの変動

$$S'_{E(Y)} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_{ij}^E)^2 = S_{E(Y)} - \frac{SP_E^2}{S_{E(X)}}$$

$$\bar{Y}_{ij}^E = a_E X_{ij} + b_E, a_E = \frac{SP_E}{S_{E(X)}}, b_E = \bar{Y} - a_E \bar{X}$$

各群ごとのデータに基づく回帰直線からの変動

$$S'_{E(Y)_j} = \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_{ij})^2, (j = 1, 2, \dots, k)$$

$$\bar{Y}_{ij} = a_j X_{ij} + b_j, a_j = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2 (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2}{\sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2}, b_j = \bar{Y}_j - a_j \bar{X}_j$$

各群の回帰の差に起因する変動

$$S'_{A(Y)} = S'_{T(Y)} + S'_{E(Y)}$$

群間の推定平方和（平均回帰に基づく推定誤差）は、各群の推定誤差の和と各群の回帰の差に分解でき、それぞれの推定誤差平方和と自由度を求める。

各群の回帰の差

$$\text{推定誤差平方和}(S'_A): S'_A = S'_{E(Y)} - \sum_{j=1}^k S'_{E(Y)_j}$$

$$\text{自由度}(df'_A): df'_A = k - 1$$

各群の推定誤差の和

$$\text{推定誤差平方和}(S'_E): S'_E = \sum_{j=1}^k S'_{E(Y)_j}$$

$$\text{自由度}(df'_E): df'_E = n - 2k$$

この値を基に、推定誤差分散(推定誤差平方和を自由度で割ったもの)を計算し、分散比 F を求める。

$$\text{各群の回帰の差}(MS_A): MS_A = S'_A / df'_A$$

$$\text{各群の推定誤差の和}(MS_E): MS_E = S'_E / df'_E$$

$$F \text{ 値}(F_0): F_0 = MS_A / MS_E$$

検定統計量 F_0 は、第 1 自由度が $df_A (= k - 1)$ 、第 2 自由度が $df_E (= n - 2k)$ の F 分布に従うので、有意確立(P)を $P = \Pr(F \geq F_0)$ とすると、

$P > \alpha$ で帰無仮説を採択する：

「独立変数によって調整された各群の従属変数の平均値（調整済み平均値）に差があるとはいえない」

$P \leq \alpha$ で帰無仮説を棄却する：

「調整済み平均値に差がある」

6. Bonferroni 法による補正

有意水準 α' のそれぞれ独立な検定を r 回行ったとすると、1 回の検定で正しい判断を行う確率が $1 - \alpha'$ なので、 r 回の検定で正しい判断を行う確率は、 $(1 - \alpha')^r$ となる。よって、正しい判断を行わない(第 1 種の過誤の)確率は、

$$1 - (1 - \alpha')^r \doteq 1 - (1 - r\alpha') = r\alpha' \quad (\alpha' \doteq 0)$$

となる。これが、 r 回の検定全体での有意水準となる。よって、検定全体での有意水準を α にするには、1 回の検定の有意水準を $\alpha' = \alpha/r$ にする(有意水準 α を検定回数で割る)。これをボンフェローニ補正という。しかし、多重比較における検定は独立な検定ではないので、この補正は厳しすぎ(保守的)て、有意な組み合わせが見つからない恐れがある。

7. 重回帰分析

重回帰分析は、いくつかの変数(独立変数)に基づいて、別の変数(従属変数)を予測する手法である。

有効ケース数を n とする。従属変数を Y 、 p 個の独立変数を X_i ($i = 1, 2, \dots, p$) とすると、従属変数の予測値 \bar{Y} は、重回帰式

$$\bar{Y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_pX_p$$

により求められる。実測値 Y_i と予測値 \bar{Y}_i の残差 (e_i) の合計 $Q = \sum e_i$ を最小にする定数項 b_0 、独立変数に掛けられる重み b_i (偏回帰係数) を求める。残差は正負の符号を持つので、その 2 乗和が最小になるようにする(最小二乗法)。即ち、

$$Q = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n \{Y_i - (b_0 + b_1 X_{i1} + b_2 X_{i2} + \dots + b_p X_{ip})\}^2$$

を $b_0, b_1, b_2, \dots, b_p$ で偏微分して 0 とし、連立方程式(正規方程式)を解くことにより、定数項 b_0 、偏回帰係数 b_i を求める。

8. ロジスティック回帰分析

ロジスティック回帰分析は、2 値変数(ある事象があったか無かったかのよう な 0/1 型のデータ)において、その値を予測する手法である。

ある事象が発生する確率を P としたとき、 $P/(1 - P)$ はオッズ比、その対数をとった $\log \{P/(1 - P)\}$ はロジットまたは対数オッズ比と呼ばれる。ロジットが独立変数の線形結合式で表せるとするのがロジスティック回帰分析である。

$$\log \left(\frac{P}{1 - P} \right) = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_p X_p$$

より、この式を変形すると

$$P = \frac{1}{1 + \exp\{-(b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_p X_p)\}} \quad (0 \leq P \leq 1)$$

となり、ロジスティック関数が得られる。定数項 b_0 、偏回帰係数 b_i は最尤法によって求める。

(P)RR 遺伝子多型と血圧値の関連(追加データ)

1. ANOVA

IVS5+169C>T は、男性において、24-h ABP の収縮期血圧・拡張期血圧、夜間 ABP の収縮期血圧・拡張期血圧が T 群で高値を示し、Bonferroni 法による補正後も有意であった。昼間 ABP の収縮期血圧・拡張期血圧は境界域($P = 0.001 - 0.05$)であった(Table 1-17(p.58))。また、夜間 ABP の収縮期血圧・拡張期血圧は、年齢、BMI、降圧薬服用、糖尿病既往、脳心血管疾患既往、喫煙習慣、飲酒習慣で補正後も有意であった。高血圧者の割合は T 型で高い傾向が認められたが、有意な差は認められなかった(C型: 49.4%, T型: 61.7%, $P = 0.1$)。一方、CBP に有意な差は認められなかった。

-782A>G は、IVS5+169C>T と同様の傾向が認められたが、P 値は境界域であった(Table S4(A))。+1513A>G は、遺伝子型による高血圧者の割合及び血圧値に有意な差は認められなかった(Table S4(B))。

一方、女性で同様の解析を行ったが、いずれの SNP も、遺伝子型別の高血圧者の割合及び血圧値に有意な差は認められなかった(-782A>G: Table S4(A), IVS5+169C>T : Table 1-17, +1513A>G : Table S4(B))。

Table S4(A). (P)RR 遺伝子多型と血圧値との関連(SNP : -782A>G, 男性 : n = 357, 女性 : n = 755).

	A (n = 309)	G (n = 48)	Adjusted		AA (n = 587)	AG (n = 152)	GG (n = 16)	Adjusted	
			P	P*				P	P*
背景因子									
年齢, 歳	60.7 ± 9.6	63.5 ± 9.5	0.05	–	58.1 ± 9.9	56.8 ± 10.9	57.2 ± 12.4	0.4	–
BMI, kg/m ²	23.3 ± 2.8	23.4 ± 2.7	1	–	23.9 ± 3.2	23.8 ± 3.4	24.1 ± 2.2	0.9	–
喫煙習慣, %	44.7	47.9	0.7	–	2.6	2.6	0	0.7	–
飲酒習慣, %	35.0	41.7	0.4	–	5.5	4.6	12.5	0.5	–
高血圧, %	49.8	58.3	0.3	–	35.4	34.2	56.3	0.2	–
降圧薬服用, %	35.6	43.8	0.3	–	27.4	27.0	43.8	0.4	–
高脂血症, %	15.2	16.7	0.8	–	23.0	23.0	12.5	0.6	–
糖尿病, %	19.4	31.3	0.07	–	14.5	12.5	31.3	0.2	–
脳心血管疾患, %	14.2	10.4	0.5	–	6.0	6.6	6.3	1	–
ABP									
24-h SBP, mmHg	125.2 ± 11.9	129.7 ± 14.2	0.02	0.06	119.7 ± 12.8	119.3 ± 12.4	123.1 ± 13.9	0.4	–
24-h DBP, mmHg	74.1 ± 7.0	76.5 ± 7.7	0.03	0.06	70.6 ± 7.6	69.7 ± 7.0	71.0 ± 7.6	0.4	–
Daytime SBP, mmHg	130.7 ± 12.8	134.9 ± 15.6	0.04	0.1	126.8 ± 14.0	124.8 ± 13.2	128.9 ± 15.9	0.2	–
Daytime DBP, mmHg	78.2 ± 7.7	80.3 ± 8.7	0.08	–	74.8 ± 8.5	73.7 ± 7.5	74.9 ± 8.4	0.3	–
Nighttime SBP, mmHg	114.7 ± 12.9	120.0 ± 14.9	0.01	0.02	108.3 ± 13.1	108.1 ± 13.5	111.8 ± 13.1	0.6	–
Nighttime DBP, mmHg	66.3 ± 7.3	69.2 ± 7.3	0.01	0.02	61.9 ± 7.5	61.7 ± 7.4	63.2 ± 7.2	0.7	–
CBP									
SBP, mmHg	136.5 ± 17.1	137.1 ± 19.9	0.8	–	130.2 ± 17.0	128.8 ± 16.2	132.3 ± 10.4	0.5	–
DBP, mmHg	77.0 ± 10.6	75.4 ± 11.3	0.3	–	73.6 ± 9.7	72.4 ± 9.0	74.8 ± 10.7	0.3	–

連続変数は平均値±標準偏差で表記。P < 0.001 (=0.5/48, Bonferroni 法による補正)を統計学的有意水準とした。

*年齢, BMI, 降圧薬服用, 糖尿病既往, 脳心血管疾患既往, 喫煙習慣, 飲酒習慣で補正(ANCOVA)。

BMI: body mass index, ABP: 自由行動下血圧, SBP: 収縮期血圧, DBP: 拡張期血圧, CBP: 随時血圧。

Table S4(B). (P)RR 遺伝子多型と血圧値との関連(SNP : +1513A>G, 男性 : n = 357, 女性 : n = 755).

	A (n = 309)	G (n = 48)	Adjusted		AA (n = 587)	AG (n = 152)	GG (n = 16)	Adjusted	
			P	P*				P	P*
背景因子									
年齢, 歳	61.0 ± 9.6	61.3 ± 9.7	0.8	–	57.8 ± 9.9	57.9 ± 10.5	57.7 ± 11.7	1	–
BMI, kg/m ²	23.3 ± 2.8	23.6 ± 3.0	0.3	–	23.8 ± 3.2	23.9 ± 3.2	24.3 ± 3.5	0.6	–
喫煙習慣, %	44.2	48.2	0.5	–	2.7	2.2	2.8	0.9	–
飲酒習慣, %	32.5	47.0	0.02	–	4.3	7.4	5.6	0.2	–
高血圧, %	51.1	50.6	0.9	–	34.5	36.8	41.7	0.6	–
降圧薬服用, %	36.5	37.4	0.9	–	27.3	27.6	33.3	0.7	–
高脂血症, %	14.6	18.1	0.4	–	23.3	22.8	16.7	0.6	–
糖尿病, %	23.0	14.5	0.08	–	16.6	11.4	11.1	0.1	–
脳心血管疾患, %	13.5	14.5	0.8	–	5.2	7.2	5.6	0.4	–
ABP									
24-h SBP, mmHg	125.8 ± 12.7	125.9 ± 11.1	0.9	–	119.7 ± 12.7	121.7 ± 12.9	121.1 ± 13.0	0.1	–
24-h DBP, mmHg	74.4 ± 7.3	74.5 ± 6.8	1	–	70.0 ± 7.5	71.0 ± 7.4	70.7 ± 7.7	0.2	–
Daytime SBP, mmHg	131.3 ± 13.7	131.3 ± 11.4	1	–	125.5 ± 13.8	127.9 ± 14.1	126.9 ± 14.2	0.09	–
Daytime DBP, mmHg	78.5 ± 8.1	78.5 ± 7.2	0.9	–	74.1 ± 8.3	75.5 ± 8.2	74.7 ± 9.0	0.1	–
Nighttime SBP, mmHg	115.2 ± 13.6	115.9 ± 12.2	0.6	–	107.6 ± 13.1	109.4 ± 13.0	110.1 ± 15.2	0.2	–
Nighttime DBP, mmHg	66.6 ± 7.4	67.0 ± 7.2	0.6	–	61.6 ± 7.5	62.2 ± 7.2	62.7 ± 7.9	0.5	–
CBP									
SBP, mmHg	136.0 ± 18.2	138.5 ± 14.9	0.2	–	129.4 ± 16.7	130.6 ± 16.9	132.8 ± 16.4	0.4	–
DBP, mmHg	76.6 ± 10.8	77.3 ± 10.5	0.6	–	73.1 ± 9.4	73.5 ± 9.8	76.3 ± 11.0	0.2	–

連続変数は平均値±標準偏差で表記。P < 0.001 (=0.5/48, Bonferroni 法による補正)を統計学的有意水準とした。

*年齢, BMI, 降圧薬服用, 糖尿病既往, 脳心血管疾患既往, 喫煙習慣, 飲酒習慣で補正(ANCOVA)。

BMI: body mass index, ABP: 自由行動下血圧, SBP: 収縮期血圧, DBP: 拡張期血圧, CBP: 随時血圧。

2. 重回帰分析

IVS5+169C>T は夜間 ABP の収縮期($\beta = 5.754, P < 0.001$)・拡張期($\beta = 3.822, P < 0.001$)と独立して有意に関連していた(Table 1-18(p.60)). 一方, 24-h ABP 収縮期($\beta = 5.023, P = 0.006, \text{Table S5(A)}$)・拡張期($\beta = 3.272, P = 0.003, \text{Table S5(B)}$), 昼間収縮期($\beta = 4.510, P = 0.02, \text{Table S5(C)}$)・拡張期($\beta = 2.864, P = 0.02, \text{Table S5(D)}$)との関連は境界域であった.

Table S5(A). 重回帰分析(24-h SBP)

因子	β	<i>P</i> value
年齢, per year	0.494	<0.001
BMI, per kg/m ²	1.120	0.01
降圧薬服用, 無 = 0, 有 = 1	4.459	0.001
糖尿病, 無 = 0, 有 = 1	0.157	0.9
脳心血管疾患, 無 = 0, 有 = 1	2.851	0.1
喫煙習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	3.312	0.009
飲酒習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	-0.149	0.9
IVS5+169C>T, C型 = 0, T型 = 1	5.023	0.006

IVS: 介在配列, BMI: body mass index.

Table S5(B). 重回帰分析(24-h DBP)

因子	β	<i>P</i> value
年齢, per year	-0.013	0.9
BMI, per kg/m ²	0.574	0.03
降圧薬服用, 無 = 0, 有 = 1	2.423	0.003
糖尿病, 無 = 0, 有 = 1	0.025	1
脳心血管疾患, 無 = 0, 有 = 1	1.767	0.2
喫煙習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	1.967	0.009
飲酒習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	1.037	0.2
IVS5+169C>T, C型 = 0, T型 = 1	3.272	0.003

IVS: 介在配列, BMI: body mass index.

Table S5(C). 重回帰分析(昼間 SBP)

因子	β	<i>P</i> value
年齢, per year	0.462	0.002
BMI, per kg/m ²	1.368	0.005
降圧薬服用, 無 = 0, 有 = 1	4.390	0.004
糖尿病, 無 = 0, 有 = 1	0.021	1
脳心血管疾患, 無 = 0, 有 = 1	2.569	0.2
喫煙習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	4.444	0.001
飲酒習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	0.727	0.6
IVS5+169C>T, C型 = 0, T型 = 1	4.510	0.02

IVS: 介在配列, BMI: body mass index.

Table S5 (D). 重回帰分析(昼間 SBP)

因子	β	<i>P</i> value
年齢, per year	-0.024	0.8
BMI, per kg/m ²	0.707	0.02
降圧薬服用, 無 = 0, 有 = 1	2.429	0.007
糖尿病, 無 = 0, 有 = 1	-0.107	0.9
脳心血管疾患, 無 = 0, 有 = 1	1.537	0.2
喫煙習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	2.675	0.001
飲酒習慣, 無・やめた = 0, 有 = 1	1.474	0.1
IVS5+169C>T, C型 = 0, T型 = 1	2.864	0.02

IVS: 介在配列, BMI: body mass index.

実験動物

1. 心不全モデル

CHF ラットを作製するため、50 mg/kg ペントバルビタール麻酔下、8 週齢雄性 WKY 35 匹(体重 180-208 g)の左胸郭を切開し、心臓を取り出し、肺動脈と左心耳の間の左冠状動脈を結紮した。結紮後、心臓を胸腔内に戻し、胸郭を縫合した。偽手術群(SO ラット, n = 6)は左冠状動脈の結紮以外は CHF ラットと同様の施術をした。術後組織摘出までの間、昼夜 12 時間毎で湿度(30 ± 10%)、温度(22 ± 2°C)が一定に保たれている部屋で通常のラットケージを用い、通常食で自由に飲水出来る環境で飼育した。組織摘出の前日、全てのラットの血圧測定と心エコー検査を行った。術後 8 週後、麻酔下で心房、心室、腎臓を摘出した。摘出の際、SO ラット及び CHF ラット共に心室は右心室と左心室に分け、CHF ラットでは左心室を非梗塞領域と梗塞領域に分けた。梗塞領域は、肉眼的に薄く硬い部分とその周囲とし、境界領域は梗塞領域に分類した。また、組織摘出と同時に採血を行い、BNP を測定した(SRL, Tokyo, Japan)。

摘出した心房、右心室、左心室非梗塞領域、左心室梗塞領域、腎臓は一部を染色用に残し、直ちに液体窒素で凍結し、RNA 抽出を行うまで-80°C で保存した。また、染色用の組織は 10%ホルマリンで固定した後、パラフィンに包埋した。

左冠状動脈を結紮による CHF ラットの作製は不安定であるため、以下の基準を満たすものを CHF ラットとした。

1. 左冠状動脈結紮後 8 週間生存している
2. Haematoxylin-eosin 染色により梗塞領域を判別し、梗塞領域が左心室の 30%を超える

3. 心エコー検査及び血漿 BNP 濃度が, SO ラットの平均 \pm 2SD の範囲を超える

今回左冠状動脈結紮を行った 35 匹の内, 27 匹がこの基準を満たしていなかった(死亡: 11 匹, 梗塞領域が 30%以下または左室駆出率が正常: 14 匹, 血漿 BNP 濃度が正常: 2 匹). 残りの基準を満たす 8 匹を CHF ラットとした.

Table S6 に心不全モデルにおける SO ラット(n = 6)と CHF ラット(n = 8) の特性を示す. CHF ラットにおいて, 梗塞領域の左心室に対して占める割合は, 8 匹の平均で 35%であった. また, CHF ラットでは, SO ラットと比べ血漿 BNP 濃度は約 2.0 倍となり, 心重量は 1.3 倍, 肺重量は 1.7 倍, 収縮期左室内径は約 1.6 倍, 拡張期左室内径は 1.2 倍と有意に高値であった(いずれの項目も

Table S6. SO ラット(n = 6)と CHF ラット(n = 8)の特性.

ラット	SO ラット	CHF ラット	P value
体重, g	328 \pm 3	318 \pm 5	0.1
心重量, g	1.23 \pm 0.08	1.54 \pm 0.06	0.007
心重量/体重 $\times 10^3$	3.73 \pm 0.15	4.89 \pm 0.26	0.003
肺重量, g	1.44 \pm 0.05	2.39 \pm 0.26	0.003
肺重量/体重 $\times 10^3$	4.37 \pm 0.11	7.49 \pm 0.81	0.002
平均動脈圧, mmHg	108 \pm 2	93 \pm 4	<0.001
心拍数, bpm	238 \pm 4	240 \pm 8	0.9
収縮期左室内径, mm	4.65 \pm 0.22	7.93 \pm 0.25	<0.001
拡張期左室内径, mm	7.68 \pm 0.25	9.72 \pm 0.21	0.001
左室駆出率, %	77.7 \pm 1.4	45.1 \pm 4.1	<0.001
左室短縮率, %	39.7 \pm 1.2	18.5 \pm 2.0	<0.001
血漿 BNP 濃度, pg/mL	75 \pm 3	146 \pm 12	<0.001

連続変数は平均値 \pm 標準誤差で表記.

bpm: beat per minuits, BNP: 脳性ナトリウム利尿ペプチド.

$P < 0.01$). 一方, SO ラットに比べ, CHF ラットの平均動脈圧は約 86%, 左室駆出率は約 56%, 左室短縮率は約 46%と有意に減少していた(いずれの項目も $P < 0.01$).

2. 5/6 腎摘腎不全モデル

ジエチルエーテル麻酔下, 8 週齢雄性 WKY ラット(体重 210-242 g)の右側腹膜を切開し, 右腎を取り出し, 右腎の上極側 1/3 と下極側 1/3 を結紮した. 結紮後, 右腎を腹腔内に戻し, 腹膜を縫合した. 1 週間後, 左側腹膜を切開し, 左腎を取り出し, 左腎の血管及び尿管をまとめて結紮し, 5/6NPX ラットを作製した. 偽手術群(SO ラット, 体重 208-242 g)は, 両側腹部切開, 腎臓の剥離及び切開部の縫合のみを行った. 術後, 組織摘出までの間, 通常のラットケージで 3 日, 14 日及び 56 日間飼育した. 5/6NPX ラットにおいて, 術後 3 日目は急性腎不全期, 14 日目は代償性腎肥大極大期, 56 日目は慢性腎不全期である. SO ラット, 5/6NPX ラット共に, 術後 3 日, 14 日, 56 日において, 麻酔下, 腎臓を摘出した. サンプル数は, 全て $n = 6$ である. 摘出後, 一部を染色用に残し, 直ちに液体窒素で凍結し, RNA 抽出を行うまで -80°C で保存した. 染色用の組織は 10%ホルマリンで固定した後, パラフィンに包埋した.

Table S7 に 5/6 腎摘腎不全モデル術後 56 日(慢性腎不全期)における SO ラット($n = 6$)と 5/6NPX ラット($n = 6$)の特性を示す. 5/6NPX ラットでは, SO ラットと比べ平均動脈圧, 血清クレアチニンは約 4.7 倍となり, 尿素窒素は約 8.2 倍と有意に高値であった(いずれの項目も $P < 0.01$). 一方, SO ラットに比べ, 5/6NPX ラットの体重は約 56%, 尿中クレアチニンは約 10%と有意に減少していた(いずれの項目も $P < 0.01$). SO ラット, 5/6NPX ラット間で心拍数に有意な差は認められなかった.

Table S7. SO ラット(n = 6)と 5/6NPX ラット(n = 6)の特性.

ラット	SO ラット	5/6NPX ラット	P value
体重, g	336 ± 5	188 ± 2	<0.001
平均動脈圧, mmHg	135 ± 5	192 ± 8	<0.001
心拍数, bpm	286 ± 9	302 ± 16	0.5
血清 Cre, mg/dL	0.43 ± 0.07	2.03 ± 0.14	<0.001
尿中 Cre, mg/dL	118 ± 17	12 ± 1	<0.001
尿素窒素, mg/dL	21 ± 2	168 ± 21	<0.001

連続変数は平均値±標準誤差で表記.

bpm: beat per minuits, Cre: クレアチニン.

3. 高血圧自然発症モデル

高血圧モデルは SHR を使用し, 対照として同週齢 WKY を用いた. 50 mg/kg ペントバルビタール麻酔下, 5, 8, 12, 16 週齢雄性 SHR 及び WKY の心房, 心室, 腎臓を摘出した. 摘出後, 直ちに液体窒素で凍結し, RNA 抽出を行うまで-80°C で保存した. サンプル数は, 全て n = 6 である.

加えて, 8 週齢の SHR 及び WKY においてその腎臓を髄質内層, 髄質外層, 皮質, 糸球体に分画した. 分画方法は先行研究に準じた[199, 267]. まず, 摘出した腎臓を肉眼的に髄質内層, 髄質外層, 皮質に分画した. 皮質の一部を 180 µm, 100 µm, 70 µm の網目に通し, 氷冷生理食塩水でよく洗い, 70 µm の網目上の残留物を集め糸球体とした. 分画後, 直ちに液体窒素で凍結し, RNA 抽出まで-80°C で保存した.

SHR と WKY の血圧値を比較すると, 5 週齢では両者の間に有意な差が認められなかった. 一方, 8 週齢, 12 週齢, 16 週齢では有意な血圧の上昇が確認された.

RNA 抽出

1. AGPC 法

AGPC 法では, TRIzol 試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用した。凍結組織片(0.1~0.5 g)を TRIzol 試薬 1 mL に加え, 直ちにホモジナイズした。このホモジネート溶液を室温で約 5 分間静置した後, 3000 rpm で 10 分間遠心した。次いで, 上清を 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し, クロロホルム 200 μ L を加え軽く攪拌し, 室温で 2~3 分間静置した後, 15000 rpm \cdot 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。遠心後, 上清を氷上の 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し, イソプロパノール 500 μ L を加え攪拌し, 室温に 10 分間静置した後, 15000 rpm \cdot 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心した。遠心後, 上清を完全に取り除き, 氷温の 75% エタノール 1 mL を加え, vortex で沈殿が割れるまでよく攪拌した。7500 rpm \cdot 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心した後, 上清を完全に取り除き, 室温で約 10 分, ペレットの色が白色から透明に変わるまで風乾した。風乾したペレットを滅菌水で溶出し total RNA 溶液とした。total RNA 溶液 1 μ L を滅菌水で 100 倍に希釈した後, RNA 濃度を吸光光度計(BioPhotometer; Eppendorf AG, Hamburg, Germany)で測定した。total RNA 溶液は, 逆転写反応を行うまで-80 $^{\circ}$ C で保存した。

2. GITC/CsCl 法

GITC/CsCl 法では, GITC/CsCl 溶液及び超遠心機(XL-90 Ultracentrifuge; Beckman Instruments, Palo Alto, CA)を使用した。液体窒素を入れた乳鉢の中に凍結組織(0.5~1 g)を入れ, 乳棒で叩き完全に粉碎した。粉碎後, 50 mL ファルコンチューブに移し, 液体窒素を完全に蒸発させ, GITC 溶液(4M Guanidinium isothiocyanate, 25 mM Sodium-citrate, 0.7% β -mercaptoethanol) 8 mL を加え, 直ちにホモジナイズした。ホモジネート溶液を遠心チ

チューブ(Falcon 2059; Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)に移し, 10% サルコシル液 0.4 mL を加え転倒攪拌後, 9000 rpm・18°Cで10分間遠心(SRX-201; TOMY, Tokyo, Japan)した。遠心後, 上清を CsCl 溶液(5.7 mM Cesium chloride, 25 mM NaOAc) 4mLが入った超遠心用チューブ(Polyallomer centrifuge tubes 14 x 89 mm; Beckman Instruments, Palo Alto, CA)に移し重さを揃え, Swing Rotor (SW41Ti, Beckman Instruments, Palo Alto, CA)にセットし, 32000rpm・18°Cで15時間超遠心した。超遠心後, GITC/CsCl 溶液を完全に取り除き, ペレットを75%エタノールで洗浄し風乾した。10 mM TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0) 100 μ Lで4回溶出(計400 μ L)し, 氷冷した1.5 mLエッペンドルフチューブに移した。チューブを65°Cで10分間加熱しRNAを完全に溶解させた後, 急冷した。このtotal RNA 溶液に3 M NaOAc 40 μ L 及び氷冷した100%エタノール1 mLを加え-80°CでovernightしRNAを析出させた。

翌日, total RNA 溶液を13000 rpm・4°Cで30分間遠心した後, 沈殿したペレットを氷冷した75%エタノール1 mLで洗い, 13000 rpm・4°Cで10分間遠心した。遠心後, エタノールを完全に取り除き, 室温で約10分, ペレットの色が白色から透明に変わるまで風乾した。AGPC 法の場合と同様に風乾したペレットを滅菌水に溶かし, total RNA 溶液とした。total RNA 溶液1 μ Lを滅菌水で100倍に希釈した後, RNAの濃度を吸光光度計で測定した。total RNA 溶液は, 逆転写反応を行うまで-80°Cで保存した。

CQ-PCR

一定量の 1st strand cDNA に対し, CRS-DNA を倍数希釈系列で加えることにより PCR 産物を競合させた(Figure S3(A)). そして, 濃度未知の目的とするペプチドの cDNA 由来のシグナル強度と CRS-DNA 由来のシグナル強度を計測した. X 軸に CRS-DNA の濃度, Y 軸に CRS-DNA と wild-type cDNA のシグナル強度の比を両対数グラフにプロットすると直線式が得られる(Figure S3(B)). 即ち,

$$\log (OD_{CRS} / OD_{sample}) = a \times \log C_{CRS} + b$$

OD_{CRS} : CRS-DNA のシグナル強度

OD_{sample} : 濃度未知の目的とするサンプルのシグナル強度

C_{CRS} : CRS-DNA の濃度

a, b : 係数

となる. シグナル強度は PCR 産物の量(= (鋳型となるサンプルの量) $\times 2^{(PCR \text{ サイクル数})}$)に正比例するので, CRS-DNA の濃度と濃度未知の目的とするサンプルの濃度が等しくなる時, シグナル強度が釣り合う($OD_{CRS} = OD_{sample}$). よって, 濃度未知の目的とするサンプルの濃度を C_{sample} とすると,

$$\log (OD_{CRS} / OD_{sample}) = a \times \log C_{sample} + b$$

$$\log 1 =$$

$$0 =$$

より, $b = -a \times \log C_{sample}$ となり,

$$\log (OD_{CRS} / OD_{sample}) = a \times (\log C_{CRS} - \log C_{sample})$$

$$= a \times \log C_{CRS} / C_{sample}$$

から,

$$C_{sample} = (OD_{sample} / OD_{CRS})^{(1/a)} \times C_{CRS}$$

の関係が得られ, 直線回帰・最小二乗法によるモデル式($y = a + b \times x + \varepsilon$, ε :

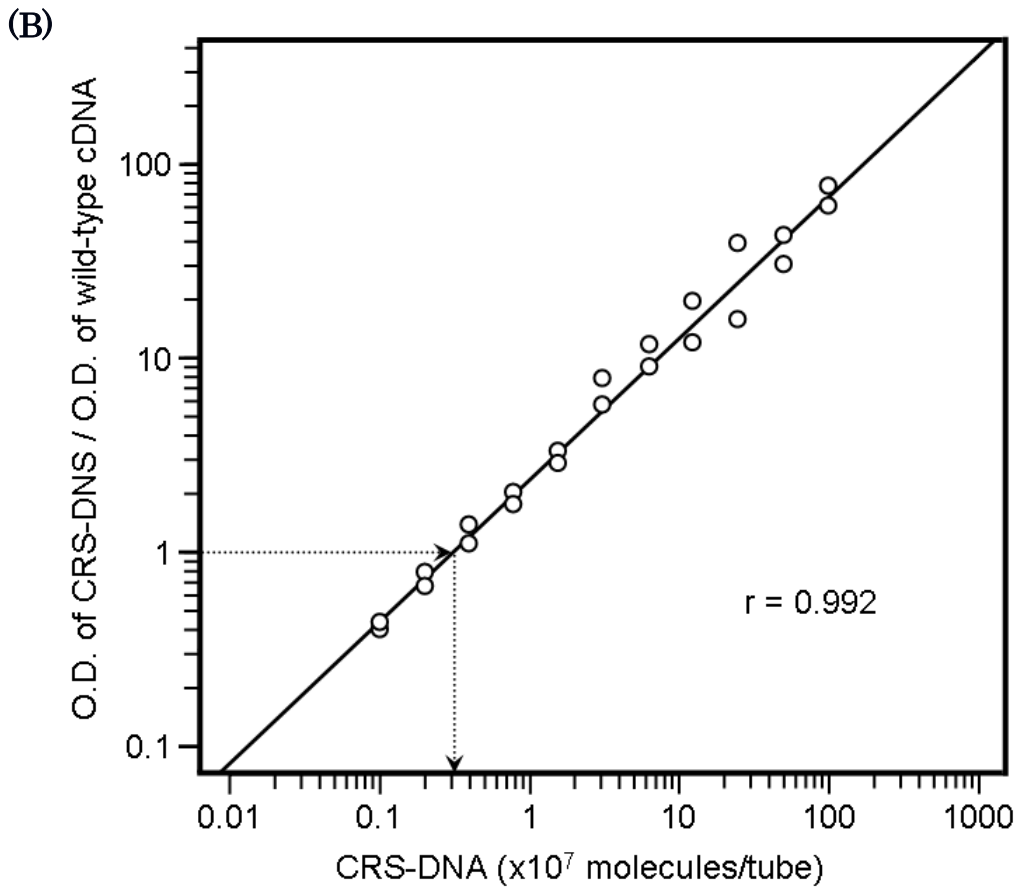
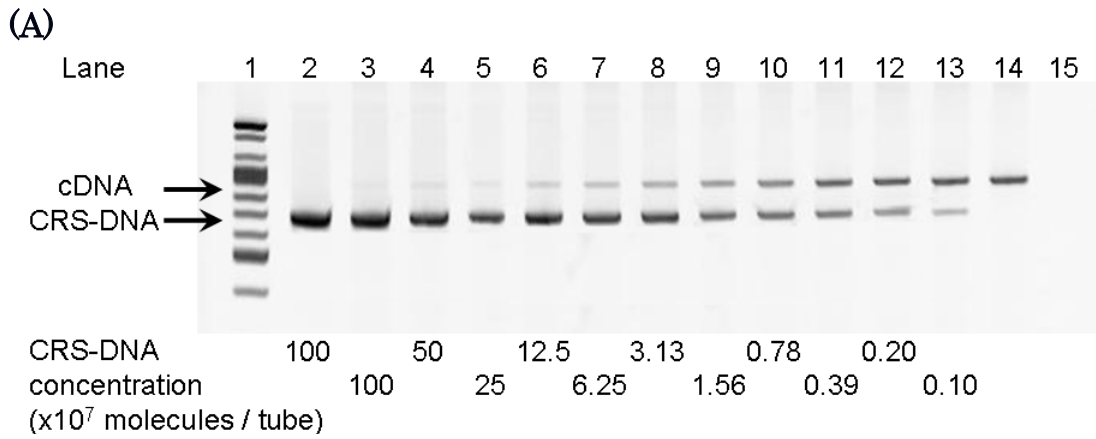


Figure S3. CQ-PCR の概要. (A) : CQ-PCR で得られるシグナル. (B) : シグナルから得られる両対数プロット.

誤差項)による推定から傾き a を決定することにより, 目的のペプチドの mRNA 発現量(C_{sample})を決定できる.

この関係を利用し, CRS-DNA を一定($= C'_{\text{CRS}}$)とし, 1st strand cDNA を倍数希釈系で加えると,

$$\log (OD'_{\text{sample}} / OD'_{\text{CRS}}) = a' \times \log C'_{\text{sample}} + b'$$

の関係が成り立ち,

$$C'_{\text{sample}} = (OD'_{\text{sample}} / OD'_{\text{CRS}})^{(1/a')} \times C'_{\text{CRS}}$$

の関係式が得られる. この式において, C'_{CRS} は一定であるため, 傾き(a')が決定されれば, シグナル強度の比からサンプルの濃度が決定される. よって, 傾きを決定するテンプレートにより傾きを決定してしまえば, 複数のサンプルの濃度を一度に決定できる.

CRS-DNA は, PCR の際に偶然得られる mutant DNA, 若しくは先行研究[268, 269]に準じた mutant DNA の作製法とその変法により作製した mutant DNA から作製した. これらの mutant DNA を 2% agarose gel 電気泳動(60 V · 120 min)した後, 目的バンド部位を切り出し精製した. この mutant DNA をサブクローニング (vector: pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI), Competent Cell: JM109 Competent Cells (Promega, Madison, WI))し, plasmid DNA を得て, この plasmid DNA を CRS-DNA とした.

シグナル強度の計測には Scion Image Beta 4.02 for Windows 95 to XP software (Scion Corp., Frederick, MD)を使用した. EtBr の DNA への隣接塩基対間挿入 (intercalation) は最隣接排除の原理に従い, 同一分子数でも PCR 産物の塩基数によりシグナル強度が異なる. この補正には, Menzo らの補正式 [270]を用いた.

Housekeeping gene

Housekeeping gene の mRNA 発現量は内標準として使用される。現在，糖からのエネルギー産生に関与するタンパク質，GAPDH や，タンパク質や小器官の保持に関与する線維タンパク質， β -actin (β -act)が housekeeping gene として広範に用いられている。しかし，これら housekeeping gene も虚血や肥大等の組織障害・構造変化により，その mRNA 発現量が変わるため，それぞれの実験系に適した housekeeping gene を選択することが重要であると報告されている[271-278]。従って，我々は，心不全モデル，5/6 腎摘腎不全モデル，高血圧自然発症モデルにおいて，GAPDH， β -actin を含む 8 種類の housekeeping gene (β -act, β -glucuronidase (β -GN), β 2-microglobulin (β 2-MG), cyclophilin-A (CycA), GAPDH, phosphoglycerokinase (PGK), RPL32, 18S ribosomal RNA (18S rRNA))について mRNA 発現量を定量した。

GAPDH, β -act の CRS-DNA は，RT-PCR を行った際偶然得られた mutant DNA を使用した。 β -GN, β 2-MG, CycA, PGK, RPL32, 18S rRNA の CQ-DNA は，mutant DNA 作製法の変法を用いて作製した。シーケンスにより得られたそれぞれの CQ-DNA の長さ，CQ-PCR に使用した primer を Table S8 に示す。CQ-PCR は，Table 2-3 の反応溶液を用い，PCR は，hot start で反応を開始し，94°C で 2 分間熱処理した後，94°C・15 秒 - 54°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 25 cycles を行い，72°C で 5 分間熱処理して反応を終了した。

心不全モデルで housekeeping gene の mRNA 発現量が変わっていた。その中で最も安定していたのが RPL32 であった。一方，5/6 腎摘腎不全モデル，高血圧自然発症モデルでは housekeeping gene 間に顕著な差は認められなかった。以上より，心不全モデルでは内標準物質として RPL32 を使用し，5/6 腎摘腎不全モデル，高血圧自然発症モデルでは汎用されている GAPDH を使用した。

Table S8. Housekeeping gene の CQ-PCR で使用した primer 配列.

Gene	Sequence (5'-3')	cDNA/CRS*	GenBank
β -actin			
Forward	TCCTAGCACCATGAAGATC	190 bp	NM_031144
Reverse	AAACGCAGCTCAGTAACAG	/314 bp	
β -glucuronidase			
Forward	CGGTCGTGATGTGGTCTG	657 bp	NM_017015
Reverse	CTGCGGTGAGGTAGTCGTAG	/479 bp	
β 2-microglobulin			
Forward	ATCTTTCTGGTGCTTGCTC	447 bp	NM_012512
Reverse	TGGTGTGCTCATTGCTATTC	/382 bp	
Cyclophilin-A			
Forward	TCAACCCCACCGTGTTTC	515 bp	NM_017101
Reverse	TAAATGCCCGCAAGTC	/411 bp	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase			
Forward	GTGAAGGTCGGTGTGAACGGATT	984 bp	NM_017008
Reverse	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	/721 bp	
Phosphoglycerokinase			
Forward	GAGGGTGGACTTCAATGTTC	1076 bp	NM_053291
Reverse	AGCAAGTGGCGGTGTCTC	/789 bp	
Ribosomal protein L32			
Forward	AAGTTCATCAGGCACCAGTC	279 bp	NM_013226
Reverse	GATGGCTTTTCGGTTCTTAG	/219 bp	
18S ribosomal RNA			
Forward	CGTCCCCCAACTTCTTAGAG	420 bp	X01117
Reverse	CACCTACGGAAACCTTGTTAC	/576 bp	

* PCR 産物の長さ(上段 : cDNA 由来, 下段 : CRS-DNA 由来).

CQ-PCR の反応条件

1. AM2/IMD

- AM2/IMD (心臓):

hot start で開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 66°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 40 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

- AM2/IMD (腎臓):

hot start で開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 66°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 25 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

- AM, CRLR, RAMP1, RAMP2, RAMP3 (心臓, 腎臓):

hot start で開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 61°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 30 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

2. (P)RR

- (P)RR (心臓, 腎臓):

hot start で開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 68°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 25 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

- Renin (心臓):

hot start で開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 66°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 40 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

- Renin (腎臓):

hot start で開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 66°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 25 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

3. UII/URP/UT-R 系

- UII (心臓, 腎臓):

hot start で開始し, 96°C で 2 分間熱処理した後, 95°C・15 秒 - 66°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 55 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

- URP (心臓, 腎臓):

hot start で開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 67°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 40 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

- UT-R (心臓, 腎臓):

hot start で開始し, 96°C で 2 分間熱処理した後, 96°C・15 秒 - 68°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 38 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

- ET-1 (心臓, 腎臓):

hot start で開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 60°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 30 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

4. Housekeeping gene

- GAPDH, RPL32 (心臓及び腎臓):

hot start で開始し, 94°C で 2 分間熱処理した後, 94°C・15 秒 - 54°C・30 秒 - 72°C・1 分 x 25 cycles を行い, 72°C で 5 分間熱処理して終了.

また, 全ての cDNA 由来 PCR 産物, CRS-DNA 由来 PCR 産物について, “AM2/IMD I/D 多型の確認(p.41)”と同様の条件で直接シーケンスを行い, GenBank に登録されている cDNA 配列と比較し, 配列が一致していることを確認した.

抗体の特性

1. 抗 AM2/IMD 血清

抗 AM2/IMD 血清及び抗(P)RR 血清の特異性を確認するために吸収試験(免疫組織染色)を行った。抗 AM2/IMD 血清の吸収試験ではラット AM2/IMD (4422-s, Peptide Institute), ヒト AM2/IMD (4421-s, Peptide Institute), ラット AM (4281-s, Peptide Institute), ヒト AM (4278-s, Peptide Institute) を 4°C で 20 時間抗 AM2/IMD 血清に吸収させた。

正常ラット心臓, 腎臓において, AM2/IMD 様免疫反応性が認められた(Figure S4(A), (D)). ラット AM2/IMD またはヒト AM2/IMD を吸収させた抗 AM2/IMD 血清では, AM2/IMD 様免疫反応性の減弱が認められた(Figure S4(B), (E)). 一方, ラット AM またはヒト AM を吸収させた抗 AM2/IMD 血清では, 免疫反

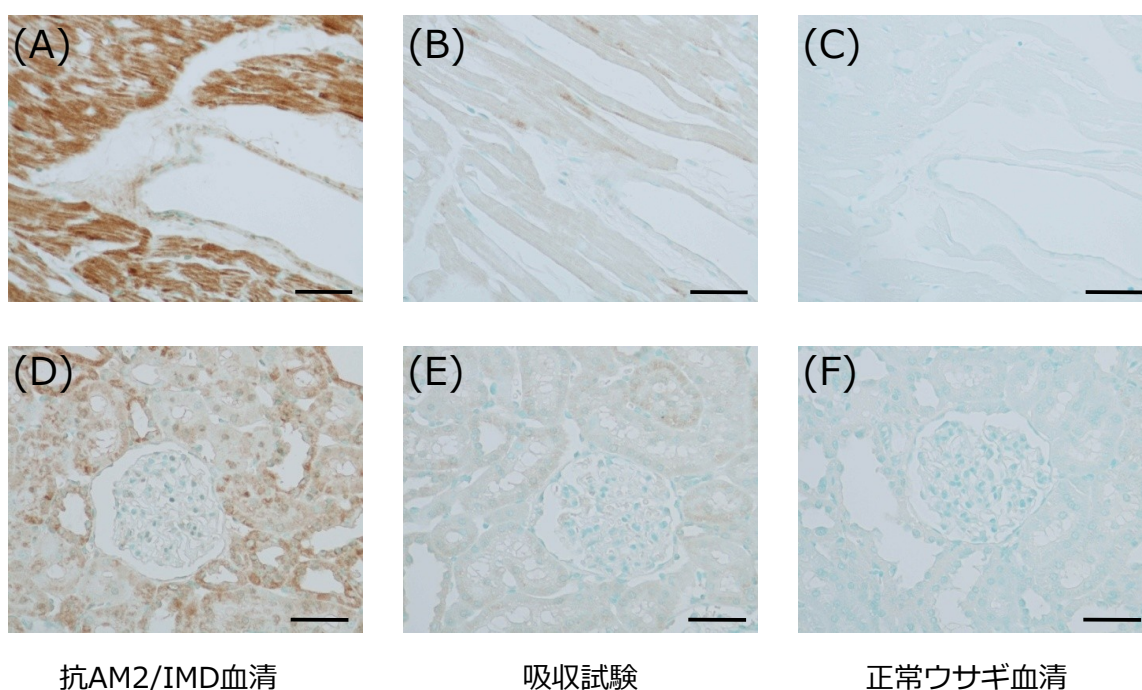


Figure S4. 抗 AM2/IMD 血清の吸収試験. (A)-(C) : 心臓, (D)-(F) : 腎臓.

Bar = 50 μ m.

応性の減弱は認められなかった。また、一次抗体として正常ウサギ血清を用いた免疫組織染色では、ラット心臓、腎臓に非特異的な免疫反応は認められなかった(Figure S4(C), (F))。

2. 抗(P)RR 血清

ヒト(P)RR₂₂₄₋₂₃₇の初回感作から80日後、麻酔下頸動脈採血により全採血を行い、抗(P)RR 血清を得た。そして、抗(P)RR 血清の特性を enzyme immunoassay (EIA), 吸収試験(ウエスタンブロット, 免疫組織染色)により確認した。

• EIA

まず、抗原(ヒト(P)RR₂₂₄₋₂₃₇)をグルタルアルデヒドによりアルデヒド処理したアミノプレートへ投入し(500 ng/well), 共有結合により固層化した。このプレートを PBS で 3 回洗浄し, Blocker Casein in PBS (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を加え, 20°C で 1 時間反応させてブロッキングした。PBS で 3 回洗浄した後, 抗(P)RR 血清または正常ウサギ血清を Blocker Casein in PBS で 10^1 - 10^8 に希釈(10 倍希釈系列)して加え, 20°C で 1 時間反応させた(一次反応)。PBS で 3 回洗浄した後, 抗ウサギ IgG 抗体(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を Blocker Casein in PBS で 1:2000 に希釈して加え, 20°C で 1 時間反応させた(二次反応)。PBS で 4 回洗浄した後, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS; Pierce Biotechnology, Rockford, IL)を用いて室温で 15 分間発色した。150 mM シュウ酸により発色反応を停止し, 405 nm の吸光度を測定し, 抗体価を確認した。

EIA による結合試験の結果を Figure S5 に示す。EIA の結果, 血清の希釈倍率 10^{-1} - 10^{-5} において, 抗(P)RR 血清の抗体価の上昇が確認された。また, 抗

(P)RR 血清を作製したウサギから、初回感作前に採血した血清を用いて EIA を行ったが、抗体価の上昇は確認されなかった。

• 吸収試験

抗(P)RR 血清の吸収試験ではヒト(P)RR₂₂₄₋₂₃₇ (この 14 残基のアミノ酸配列はラット(P)RR₂₂₃₋₂₃₆ と 100%の相同性を持っている), 合成ヒト(P)RR₂₁₄₋₂₄₁ (ヒト(P)RR の 214-241 残基の 28 残基からなる合成アミノ酸(カスタム合成), Thermo Fisher Scientific, Sedanstrasse, Germany)を(P)RR 血清に 4°C で 20 時間吸収させた。

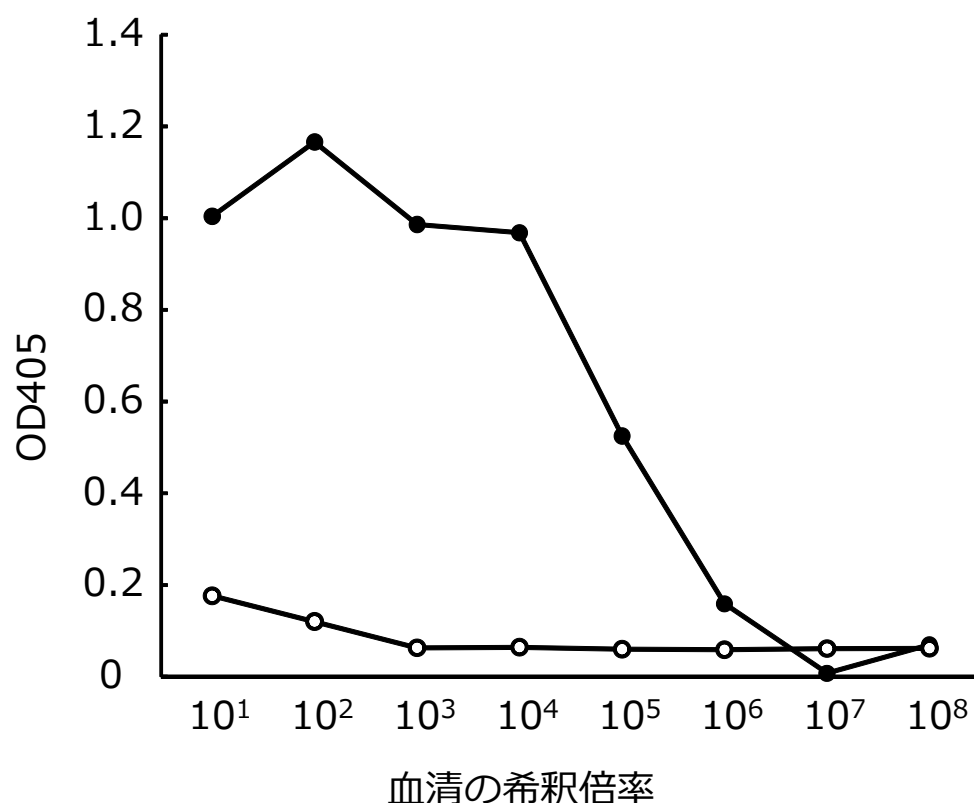


Figure S5. EIA による抗(P)RR 血清の結合試験.

● : 抗(P)RR 血清, ○ : 正常ウサギ血清(同一ウサギの初回感作前の血清).

Figure S6 にラット心臓, 腎臓における抗(P)RR 血清の吸収試験(ウエスタンブロット)の結果を示す. ウエスタンブロットにより, 正常ラット心臓, 腎臓において, 約 39 kDa に(P)RR のシグナルが確認された. また, このシグナルは, 抗(P)RR 血清にヒト(P)RR₂₂₄₋₂₃₇ を吸収させることにより減弱した.

Figure S7 にラット心臓, 腎臓における抗(P)RR 血清の吸収試験(免疫組織染色)の結果を示す. 正常ラット心臓, 腎臓において, (P)RR 様免疫反応性が認められた(Figure S7(A), (D)). ウエスタンブロットにおける吸収試験と同様に, ヒト(P)RR₂₂₄₋₂₃₇ またはヒト(P)RR₂₁₄₋₂₄₁ を吸収させた抗(P)RR 血清では, (P)RR 様免疫反応性の減弱が認められた(Figure S7(B), (E)). また, 一次抗体として正常ウサギ血清(抗(P)RR 血清を作製したウサギの免疫前の血清)を用いた免疫組織染色では, ラット心臓, 腎臓に非特異的な免疫反応は認められなかった(Figure S7(C), (F)).

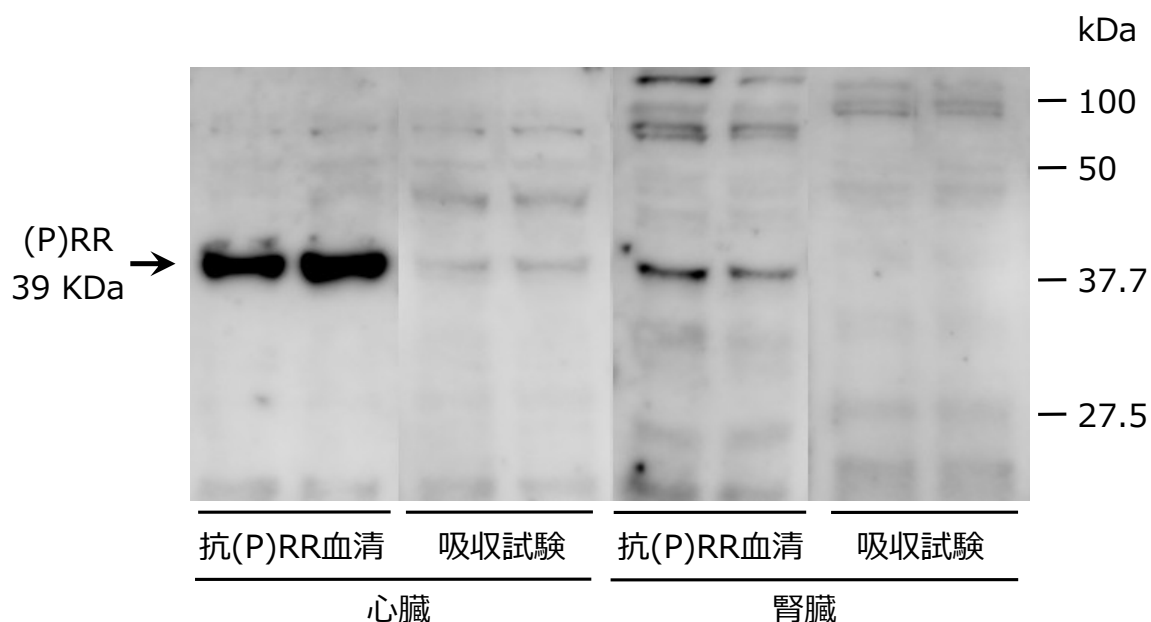


Figure S6. 抗(P)RR 血清の吸収試験(ウエスタンブロット).

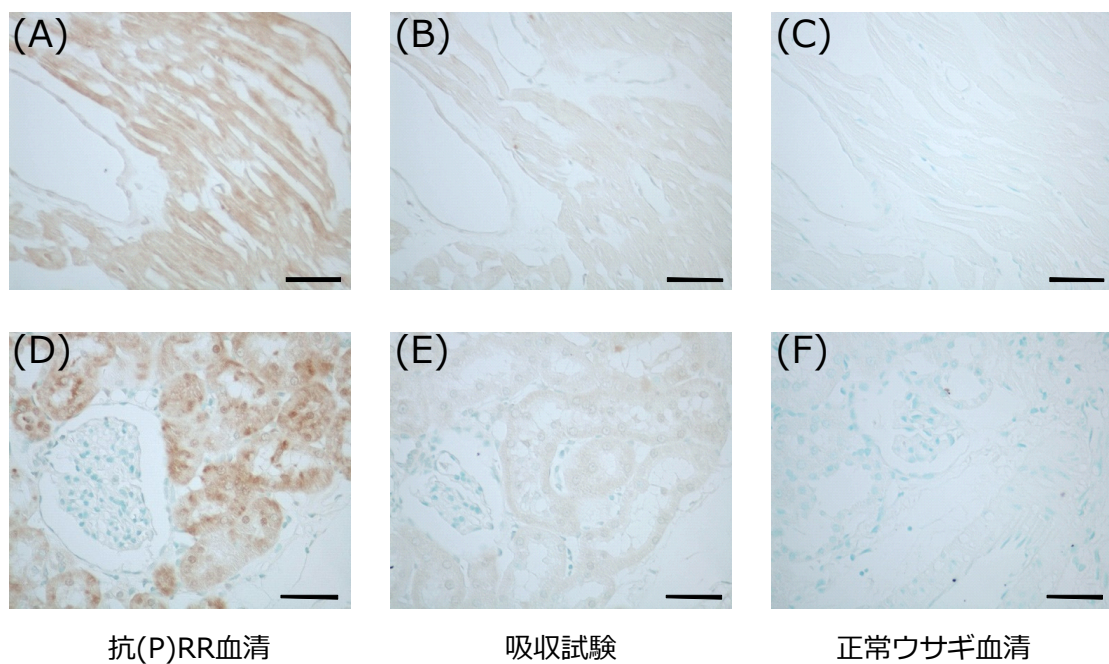


Figure S7. 抗(P)RR 血清の吸収試験(免疫組織染色). (A)-(C):心臓, (D)-(F):腎臓. Bar = 50 μ m.

参考文献

1. Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY. Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 2004; 279:7264-7274.
2. Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett* 2004; 556:53-58.
3. Takei Y, Hyodo S, Katafuchi T, Minamino N. Novel fish-derived adrenomedullin in mammals: structure and possible function. *Peptides* 2004; 25:1643-1656.
4. Chang CL, Roh J, Hsu SY. Intermedin, a novel calcitonin family peptide that exists in teleosts as well as in mammals: a comparison with other calcitonin/intermedin family peptides in vertebrates. *Peptides* 2004; 25:1633-1642.
5. Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Suzuki T, Sasano H, et al. Expression of adrenomedullin2/intermedin in human brain, heart, and kidney. *Peptides* 2007; 28:1095-1103.
6. Takahashi K, Kikuchi K, Maruyama Y, Urabe T, Nakajima K, Sasano H, et al. Immunocytochemical localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney. *Peptides* 2006; 27:1383-1389.
7. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998; 393:333-339.
8. Pan CS, Yang JH, Cai DY, Zhao J, Gerns H, Yang J, et al. Cardiovascular effects of newly discovered peptide intermedin/adrenomedullin 2. *Peptides* 2005; 26:1640-1646.
9. Burak Kandilci H, Gumusel B, Wasserman A, Witriol N, Lippert H. Intermedin/adrenomedullin-2 dilates the rat pulmonary vascular bed: dependence on CGRP receptors and nitric oxide release. *Peptides* 2006; 27:1390-1396.
10. Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Takei Y, Miura K, Shoukouji T, et al. Renal effects of a new member of adrenomedullin family, adrenomedullin2, in rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 497:75-80.
11. Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, et al. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol* 2001; 88:1L-20L.
12. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 2000;

- 52:11-34.
13. Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens* 1999; 12:205S-213S.
 14. Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney Int* 1996; 50:1897-1903.
 15. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109:1417-1427.
 16. Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension* 2005; 46:1069-1076.
 17. Nguyen G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int* 2006; 69:1503-1506.
 18. Nguyen G, Contrepas A. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8:127-132.
 19. Danser AH. Prorenin: back into the arena. *Hypertension* 2006; 47:824-826.
 20. Huang Y, Noble NA, Zhang J, Xu C, Border WA. Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. *Kidney Int* 2007; 72:45-52.
 21. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int* 2006; 69:105-113.
 22. Burcklé CA, Jan Danser AH, Muller DN, Garrelts IM, Gasc JM, Popova E, et al. Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension* 2006; 47:552-556.
 23. Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M, Takemitsu T, Nabi AH, Uddin MN, et al. Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1789-1795.
 24. Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, Suzuki F, Nakagawa T, Tada Y, et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest* 2004; 114:1128-1135.
 25. Ichihara A, Kaneshiro Y, Suzuki F. Prorenin receptor blockers: effects on cardiovascular complications of diabetes and hypertension. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15:1137-1139.
 26. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Itoh H. The (pro)renin receptor and the kidney. *Semin Nephrol* 2007; 27:524-528.
 27. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Nakagawa T, Nishiyama A, et al. Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:2495-2503.
 28. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, et al.

- Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension* 2006; 47:894-900.
29. Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Kaneshiro Y, Itoh H. Involvement of (pro)renin receptor in the glomerular filtration barrier. *J Mol Med* 2008; 86:629-635.
 30. Krebs C, Weber M, Steinmetz O, Meyer-Schwesinger C, Stahl R, Danser AH, et al. Effect of (pro)renin receptor inhibition by a decoy peptide on renal damage in the clipped kidney of Goldblatt rats. *Kidney Int* 2008; 74:823-824.
 31. Nurun NA, Uddin NM, Nakagawa T, Iwata H, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. Role of "handle" region of prorenin prosegment in the non-proteolytic activation of prorenin by binding to membrane anchored (pro)renin receptor. *Front Biosci* 2007; 12:4810-4817.
 32. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Koto T, Shinoda H, Noda K, et al. Role of nonproteolytically activated prorenin in pathologic, but not physiologic, retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:422-429.
 33. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Tsubota K, Itoh H, Ishida S. Pathologic roles of prorenin and (pro)renin receptor in the eye. *Front Biosci* 2008; 13:3884-3895.
 34. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Yamashiro K, Koto T, Shinoda H, et al. Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by inhibiting nonproteolytic activation of prorenin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:2686-2692.
 35. Uddin MN, Nabi AH, Nakagawa T, Ichihara A, Inagami T, Suzuki F. Non-proteolytic activation of prorenin: activation by (pro)renin receptor and its inhibition by a prorenin prosegment, "decoy peptide". *Front Biosci* 2008; 13:745-753.
 36. Hedera P, Alvarado D, Beydoun A, Fink JK. Novel mental retardation-epilepsy syndrome linked to Xp21.1-p11.4. *Ann Neurol* 2002; 51:45-50.
 37. Ramser J, Abidi FE, Burckle CA, Lenski C, Toriello H, Wen G, et al. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum Mol Genet* 2005; 14:1019-1027.
 38. Bern HA, Lederis K. A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *J Endocrinol* 1969; 45:Suppl:xi-xii.
 39. Bern HA, Pearson D, Larson BA, Nishioka RS. Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent Prog Horm Res* 1985; 41:533-552.
 40. Ohsako S, Ishida I, Ichikawa T, Deguchi T. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding precursors of urotensin II-alpha and -gamma. *J Neurosci* 1986; 6:2730-2735.

41. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401:282-286.
42. Douglas SA, Ohlstein EH. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10:229-237.
43. Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, et al. Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* 2000; 131:1262-1274.
44. Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R. Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* 2000; 130:1865-1870.
45. Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, et al. Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H925-928.
46. Russell FD, Molenaar P, O'Brien DM. Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart in vitro. *Br J Pharmacol* 2001; 132:5-9.
47. Sauzeau V, Le Mellionec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 2001; 88:1102-1104.
48. Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. Synergistic effect of urotensin II with mildly oxidized LDL on DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2001; 104:16-18.
49. Silvestre RA, Rodriguez-Gallardo J, Egido EM, Marco J. Inhibition of insulin release by urotensin II--a study on the perfused rat pancreas. *Horm Metab Res* 2001; 33:379-381.
50. Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Giaid A. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* 2002; 359:1990-1997.
51. Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, et al. Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* 2001; 358:810-811.
52. Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S, Murakami O. Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 2003; 104:1-5.
53. Saetrum Opgaard O, Nothacker H, Ehlert FJ, Krause DN. Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol* 2000; 406:265-271.

54. Rossowski WJ, Cheng BL, Taylor JE, Datta R, Coy DH. Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2002; 438:159-170.
55. Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. Synergistic effect of urotensin II with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. *J Hypertens* 2001; 19:2191-2196.
56. Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW, Nayler O. Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* 2002; 22:155-168.
57. Tamura K, Okazaki M, Tamura M, Isozumi K, Tasaki H, Nakashima Y. Urotensin II-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in cultured vascular smooth muscle cells: involvement of cell adhesion-mediated integrin signaling. *Life Sci* 2003; 72:1049-1060.
58. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Noshiro T, Hayashi Y, Shibahara S. Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II. *Peptides* 2003; 24:301-306.
59. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S. Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* 2001; 22:1175-1179.
60. Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, et al. Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:860-868.
61. Prosser HC, Leprince J, Vaudry H, Richards AM, Forster ME, Pemberton CJ. Cardiovascular effects of native and non-native urotensin II and urotensin II-related peptide on rat and salmon hearts. *Peptides* 2006; 27:3261-3268.
62. Goto K. Basic and therapeutic relevance of endothelin-mediated regulation. *Biol Pharm Bull* 2001; 24:1219-1230.
63. Morimoto S, Yano Y, Maki K, Sawada K. Renal and vascular protective effects of telmisartan in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2006; 29:567-572.
64. Tostes RC, Muscara MN. Endothelin receptor antagonists: another potential alternative for cardiovascular diseases. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; 5:287-301.
65. Richards AM, Nicholls MG, Lainchbury JG, Fisher S, Yandle TG. Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet* 2002; 360:545-546.
66. Ohkubo T, Imai Y, Tsuji I, Nagai K, Watanabe N, Minami N, et al. Prediction of mortality by ambulatory blood pressure monitoring versus screening blood

- pressure measurements: a pilot study in Ohasama. *J Hypertens* 1997; 15:357-364.
67. Lawes CM, Rodgers A, Bennett DA, Parag V, Suh I, Ueshima H, MacMahon S. Blood pressure and cardiovascular disease in the Asia Pacific region. *J Hypertens* 2003; 21:707-716.
 68. Lida M, Ueda K, Okayama A, Kodama K, Sawai K, Shibata S, et al. Impact of elevated blood pressure on mortality from all causes, cardiovascular diseases, heart disease and stroke among Japanese: 14 year follow-up of randomly selected population from Japanese -- Nippon data 80. *J Hum Hypertens* 2003; 17:851-857.
 69. Guidelines Subcommittee of the Japanese Society of Hypertension. Japanese Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension (JSH 2004). *Hypertens Res* 2006; 29:S1-105.
 70. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289:2560-2572.
 71. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007; 25:1105-1187.
 72. Cowley AW, Jr. The genetic dissection of essential hypertension. *Nat Rev Genet* 2006; 7:829-840.
 73. Marteau JB, Zaiou M, Siest G, Visvikis-Siest S. Genetic determinants of blood pressure regulation. *J Hypertens* 2005; 23:2127-2143.
 74. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431:931-945.
 75. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860-921.
 76. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304-1351.
 77. Dobrzynski E, Wang C, Chao J, Chao L. Adrenomedullin gene delivery attenuates hypertension, cardiac remodeling, and renal injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 36:995-1001.
 78. Hamid SA, Baxter GF. Adrenomedullin: regulator of systemic and cardiac homeostasis in acute myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2005; 105:95-112.
 79. Ishimitsu T, Ono H, Minami J, Matsuoka H. Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders. *Pharmacol Ther*

- 2006; 111:909-927.
80. Kato K, Yin H, Agata J, Yoshida H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H1506-1514.
 81. Ishimitsu T, Hosoya K, Tsukada K, Minami J, Futoh Y, Ono H, et al. Microsatellite DNA polymorphism of human adrenomedullin gene in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Hypertension* 2001; 38:9-12.
 82. Li Y, Staessen JA, Li LH, Gao PJ, Thijs L, Brand E, et al. Blood pressure and urinary sodium excretion in relation to the A-1984G adrenomedullin polymorphism in a Chinese population. *Kidney Int* 2006; 69:1153-1158.
 83. Kobayashi Y, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Kokubun S, Soma M. Haplotype-based case-control study revealing an association between the adrenomedullin gene and proteinuria in subjects with essential hypertension. *Hypertens Res* 2005; 28:229-236.
 84. Ishimitsu T, Tsukada K, Minami J, Ono H, Ohru M, Hino J, et al. Microsatellite DNA polymorphism of human adrenomedullin gene in type 2 diabetic patients with renal failure. *Kidney Int* 2003; 63:2230-2235.
 85. Ishimitsu T, Tsukada K, Minami J, Ono H, Matsuoka H. Variations of human adrenomedullin gene and its relation to cardiovascular diseases. *Hypertens Res* 2003; 26 Suppl:S129-134.
 86. Sano M, Kuroi N, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Soma M, Kokubun S. Association study of calcitonin-receptor-like receptor gene in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2005; 18:403-408.
 87. Wang JG, Staessen JA. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol* 2000; 410:289-302.
 88. Ge D, Zhu H, Huang Y, Treiber FA, Harshfield GA, Snieder H, Dong Y. Multilocus analyses of Renin-Angiotensin-aldosterone system gene variants on blood pressure at rest and during behavioral stress in young normotensive subjects. *Hypertension* 2007; 49:107-112.
 89. Lee KB, Kim UK, Lee CC. Association of the ACE gene polymorphism with the progression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Korean Med Sci* 2000; 15:431-435.
 90. Mansego ML, Redon J, Marin R, Gonzalez-Albert V, Martin-Escudero JC, Fabia MJ, et al. Renin polymorphisms and haplotypes are associated with blood pressure levels and hypertension risk in postmenopausal women. *J Hypertens* 2008; 26:230-237.
 91. van Rijn MJ, Bos MJ, Isaacs A, Yazdanpanah M, Arias-Vasquez A, Stricker BH, et al. Polymorphisms of the renin-angiotensin system are associated with blood pressure, atherosclerosis and cerebral white matter pathology. *J*

- Neurol Neurosurg Psychiatry 2007; 78:1083-1087.
92. Fujiwara T, Katsuya T, Matsubara M, Mikami T, Ishikawa K, Kikuya M, et al. T+31C polymorphism of angiotensinogen gene and nocturnal blood pressure decline: the Ohasama study. *Am J Hypertens* 2002; 15:628-632.
 93. Kikuya M, Sugimoto K, Katsuya T, Suzuki M, Sato T, Funahashi J, et al. A/C1166 gene polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor (AT1) and ambulatory blood pressure: the Ohasama Study. *Hypertens Res* 2003; 26:141-145.
 94. Matsubara M, Kikuya M, Ohkubo T, Metoki H, Omori F, Fujiwara T, et al. Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-334T polymorphism, ambulatory blood pressure and nocturnal decline in blood pressure in the general Japanese population: the Ohasama Study. *J Hypertens* 2001; 19:2179-2184.
 95. Matsubara M, Metoki H, Katsuya T, Kikuya M, Suzuki M, Michimata M, et al. T+31C polymorphism (M235T) of the angiotensinogen gene and home blood pressure in the Japanese general population: the Ohasama Study. *Hypertens Res* 2003; 26:47-52.
 96. Matsubara M, Omori F, Fujita S, Metoki H, Kikuya M, Fujiwara T, et al. Haplotypes of aldosterone synthase (CYP11B2) gene in the general population of Japan: the Ohasama study. *Clin Exp Hypertens* 2001; 23:603-610.
 97. Matsubara M, Sato T, Nishimura T, Suzuki M, Kikuya M, Metoki H, et al. CYP11B2 polymorphisms and home blood pressure in a population-based cohort in Japanese: the Ohasama study. *Hypertens Res* 2004; 27:1-6.
 98. Matsubara M, Suzuki M, Fujiwara T, Kikuya M, Metoki H, Michimata M, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and hypertension: the Ohasama study. *J Hypertens* 2002; 20:1121-1126.
 99. Perola M, Kainulainen K, Pajukanta P, Terwilliger JD, Hiekkalinna T, Ellonen P, et al. Genome-wide scan of predisposing loci for increased diastolic blood pressure in Finnish siblings. *J Hypertens* 2000; 18:1579-1585.
 100. Imai Y, Abe K, Sasaki S, Minami N, Munakata M, Sekino H, et al. Determination of clinical accuracy and nocturnal blood pressure pattern by new portable device for monitoring indirect ambulatory blood pressure. *Am J Hypertens* 1990; 3:293-301.
 101. Imai Y, Nagai K, Sakuma M, Sakuma H, Nakatsuka H, Satoh H, et al. Ambulatory blood pressure of adults in Ohasama, Japan. *Hypertension* 1993; 22:900-912.
 102. Imai Y, Satoh H, Nagai K, Sakuma M, Sakuma H, Minami N, et al. Characteristics of a community-based distribution of home blood pressure in Ohasama in northern Japan. *J Hypertens* 1993; 11:1441-1449.
 103. Asai T, Ohkubo T, Katsuya T, Higaki J, Fu Y, Fukuda M, et al. Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the

- Ohasama Study. Hypertension 2001; 38:1321-1324.
104. Imai Y, Tsuji I, Nagai K, Sakuma M, Ohkubo T, Watanabe N, et al. Ambulatory blood pressure monitoring in evaluating the prevalence of hypertension in adults in Ohasama, a rural Japanese community. Hypertens Res 1996; 19:207-212.
 105. Imai Y, Ohkubo T. Ambulatory blood pressure normality: experience in the Ohasama Study. Blood Press Monit 1998; 3:185-188.
 106. Ohkubo T, Hozawa A, Nagai K, Kikuya M, Tsuji I, Ito S, et al. Prediction of stroke by ambulatory blood pressure monitoring versus screening blood pressure measurements in a general population: the Ohasama study. J Hypertens 2000; 18:847-854.
 107. Ohkubo T, Imai Y, Tsuji I, Nagai K, Ito S, Satoh H, Hisamichi S. Reference values for 24-hour ambulatory blood pressure monitoring based on a prognostic criterion: the Ohasama Study. Hypertension 1998; 32:255-259.
 108. Aono Y, Ohkubo T, Kikuya M, Hara A, Kondo T, Obara T, et al. Plasma fibrinogen, ambulatory blood pressure, and silent cerebrovascular lesions: the Ohasama study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27:963-968.
 109. Hara A, Ohkubo T, Kikuya M, Shintani Y, Obara T, Metoki H, et al. Detection of carotid atherosclerosis in individuals with masked hypertension and white-coat hypertension by self-measured blood pressure at home: the Ohasama study. J Hypertens 2007; 25:321-327.
 110. Shintani Y, Kikuya M, Hara A, Ohkubo T, Metoki H, Asayama K, et al. Ambulatory blood pressure, blood pressure variability and the prevalence of carotid artery alteration: the Ohasama study. J Hypertens 2007; 25:1704-1710.
 111. Horio M, Orita Y. Comparison of Jaffe rate assay and enzymatic method for the measurement of creatinine clearance. Nippon Jinzo Gakkai Shi 1996; 38:296-299.
 112. 日本動脈硬化学会. 動脈硬化性疾患診療ガイドライン 2002 年版. 2002.
 113. 日本糖尿病学会. 科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン. 2004.
 114. White WB, Anwar YA. Evaluation of the overall efficacy of the Omron office digital blood pressure HEM-907 monitor in adults. Blood Press Monit 2001; 6:107-110.
 115. Dahlof B, Devereux R, de Faire U, Fyhrquist F, Hedner T, Ibsen H, et al. The Losartan Intervention For Endpoint reduction (LIFE) in Hypertension study: rationale, design, and methods. The LIFE Study Group. Am J Hypertens 1997; 10:705-713.
 116. Sokolow M, Lyon TP. The ventricular complex in left ventricular hypertrophy as obtained by unipolar precordial and limb leads. Am Heart J 1949; 37:161-186.
 117. Molloy TJ, Okin PM, Devereux RB, Kligfield P. Electrocardiographic detection

- of left ventricular hypertrophy by the simple QRS voltage-duration product. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:1180-1186.
118. Okin PM, Roman MJ, Devereux RB, Kligfield P. Gender differences and the electrocardiogram in left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 1995; 25:242-249.
 119. Okin PM, Roman MJ, Devereux RB, Kligfield P. Electrocardiographic identification of increased left ventricular mass by simple voltage-duration products. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:417-423.
 120. Nagai Y, Matsumoto M, Metter EJ. The carotid artery as a noninvasive window for cardiovascular risk in apparently healthy individuals. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28:1231-1238.
 121. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 96:1432-1437.
 122. Takami S, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, et al. Gene polymorphism of the renin-angiotensin system associates with risk for lacunar infarction. The Ohasama study. *Am J Hypertens* 2000; 13:121-127.
 123. Fazekas F, Kleinert R, Offenbacher H, Schmidt R, Kleinert G, Payer F, et al. Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology* 1993; 43:1683-1689.
 124. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130:461-470.
 125. Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GJ. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:155A.
 126. DuBois D, DuBois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Arch Intern Med* 1916; 17:863-871.
 127. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16:31-41.
 128. Gault MH, Longerich LL, Harnett JD, Wesolowski C. Predicting glomerular function from adjusted serum creatinine. *Nephron* 1992; 62:249-256.
 129. 日本腎臓学会. CKD 診療ガイド. 東京医学社; 2007.
 130. Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM. Hemodynamic, hormonal, and renal actions of adrenomedullin-2 in normal conscious sheep. *Endocrinology* 2006; 147:1871-1877.
 131. Hashimoto H, Hyodo S, Kawasaki M, Mera T, Chen L, Soya A, et al. Centrally administered adrenomedullin 2 activates hypothalamic oxytocin-secreting neurons, causing elevated plasma oxytocin level in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E753-761.

- 132.** Dong F, Taylor MM, Samson WK, Ren J. Intermedin (adrenomedullin-2) enhances cardiac contractile function via a protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathway in murine ventricular myocytes. *J Appl Physiol* 2006; 101:778-784.
- 133.** Nishikimi T, Yoshihara F, Horinaka S, Kobayashi N, Mori Y, Tadokoro K, et al. Chronic administration of adrenomedullin attenuates transition from left ventricular hypertrophy to heart failure in rats. *Hypertension* 2003; 42:1034-1041.
- 134.** Zhang JJ, Yoshida H, Chao L, Chao J. Human adrenomedullin gene delivery protects against cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage in hypertensive dahl salt-sensitive rats. *Hum Gene Ther* 2000; 11:1817-1827.
- 135.** Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Miura K, Shokoji T, Nishiyama A, et al. Roles of adrenomedullin 2 in regulating the cardiovascular and sympathetic nervous systems in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H1120-1127.
- 136.** Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Miura K, Nishiyama A, Kimura S, Abe Y. Effects of adrenomedullin 2 on regional hemodynamics in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 558:128-132.
- 137.** Jia YX, Yang JH, Pan CS, Geng B, Zhang J, Xiao Y, et al. Intermedin1-53 protects the heart against isoproterenol-induced ischemic injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 549:117-123.
- 138.** Ren YS, Yang JH, Zhang J, Pan CS, Yang J, Zhao J, et al. Intermedin 1-53 in central nervous system elevates arterial blood pressure in rats. *Peptides* 2006; 27:74-79.
- 139.** Yang JH, Jia YX, Pan CS, Zhao J, Ouyang M, Yang J, et al. Effects of intermedin(1-53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327:713-719.
- 140.** Yang JH, Qi YF, Jia YX, Pan CS, Zhao J, Yang J, et al. Protective effects of intermedin/adrenomedullin2 on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Peptides* 2005; 26:501-507.
- 141.** Yang JH, Pan CS, Jia YX, Zhang J, Zhao J, Pang YZ, et al. Intermedin1-53 activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341:567-572.
- 142.** Barley J, Carter ND, Cruickshank JK, Jeffery S, Smith A, Charlett A, Webb DJ. Renin and atrial natriuretic peptide restriction fragment length polymorphisms: association with ethnicity and blood pressure. *J Hypertens* 1991; 9:993-996.
- 143.** Daniel HI, Munroe PB, Kamdar SM, Lawson M, Lavender P, Forgy P, Caulfield MJ. The atrial natriuretic peptide gene and essential hypertension in African-Caribbeans from St Vincent and the Grenadines. *J Hum Hypertens* 1997; 11:113-117.

144. Schorr U, Beige J, Ringel J, Turan S, Kreutz R, Distler A, Sharma AM. Hpa II polymorphism of the atrial natriuretic peptide gene and the blood pressure response to salt intake in normotensive men. *J Hypertens* 1997; 15:715-718.
145. Cheung BM, Leung R, Shiu S, Tan KC, Lau CP, Kumana CR. HpaII polymorphism in the atrial natriuretic peptide gene and hypertension. *Am J Hypertens* 1999; 12:524-527.
146. Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, Salvi F, Serenelli M, Spagnolo D, Cola G, et al. A novel promoter variant of the natriuretic peptide clearance receptor gene is associated with lower atrial natriuretic peptide and higher blood pressure in obese hypertensives. *J Hypertens* 1999; 17:1301-1305.
147. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Genetic analysis of the atrial natriuretic peptide gene in essential hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2000; 98:251-258.
148. Rahmutula D, Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Kunimoto M, Uwabo J, et al. Association study between the variants of the human ANP gene and essential hypertension. *Hypertens Res* 2001; 24:291-294.
149. Nkeh B, Tiago A, Candy GP, Woodiwiss AJ, Badenhorst D, Luker F, et al. Association between an atrial natriuretic peptide gene polymorphism and normal blood pressure in subjects of African ancestry. *Cardiovasc J S Afr* 2002; 13:97-101.
150. Zhang S, Mao G, Zhang Y, Tang G, Wen Y, Hong X, et al. Association between human atrial natriuretic peptide Val7Met polymorphism and baseline blood pressure, plasma trough irbesartan concentrations, and the antihypertensive efficacy of irbesartan in rural Chinese patients with essential hypertension. *Clin Ther* 2005; 27:1774-1784.
151. Rubattu S, Evangelista A, Barbato D, Barba G, Stanzione R, Iacone R, et al. Atrial natriuretic peptide (ANP) gene promoter variant and increased susceptibility to early development of hypertension in humans. *J Hum Hypertens* 2007; 21:822-824.
152. Nannipieri M, Penno G, Pucci L, Colhoun H, Motti C, Bertacca A, et al. Pronatriodilatin gene polymorphisms, microvascular permeability, and diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1530-1541.
153. Nannipieri M, Manganiello M, Pezzatini A, De Bellis A, Seghieri G, Ferrannini E. Polymorphisms in the hANP (human atrial natriuretic peptide) gene, albuminuria, and hypertension. *Hypertension* 2001; 37:1416-1422.
154. Nannipieri M, Posadas R, Williams K, Politi E, Gonzales-Villalpando C, Stern MP, Ferrannini E. Association between polymorphisms of the atrial natriuretic peptide gene and proteinuria: a population-based study. *Diabetologia* 2003; 46:429-432.

- 155.** Roussel R, Tregouet DA, Hadjadj S, Jeunemaitre X, Marre M. Investigation of the human ANP gene in type 1 diabetic nephropathy: case-control and follow-up studies. *Diabetes* 2004; 53:1394-1398.
- 156.** Rubattu S, Bigatti G, Evangelista A, Lanzani C, Stanzione R, Zagato L, et al. Association of atrial natriuretic peptide and type a natriuretic peptide receptor gene polymorphisms with left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:499-505.
- 157.** Kosuge K, Soma M, Nakayama T, Aoi N, Sato M, Izumi Y, Matsumoto K. A novel variable number of tandem repeat of the natriuretic peptide precursor B gene's 5'-flanking region is associated with essential hypertension among Japanese females. *Int J Med Sci* 2007; 4:146-152.
- 158.** Meirhaeghe A, Sandhu MS, McCarthy MI, de Groote P, Cottel D, Arveiler D, et al. Association between the T-381C polymorphism of the brain natriuretic peptide gene and risk of type 2 diabetes in human populations. *Hum Mol Genet* 2007; 16:1343-1350.
- 159.** Higaki J, Baba S, Katsuya T, Sato N, Ishikawa K, Mannami T, et al. Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in Japanese men : the Suita Study. *Circulation* 2000; 101:2060-2065.
- 160.** Pickering TG, Shimbo D, Haas D. Ambulatory blood-pressure monitoring. *N Engl J Med* 2006; 354:2368-2374.
- 161.** Shan Z, Cuadra AE, Sumners C, Raizada MK. Characterization of a functional (pro)renin receptor in rat brain neurons. *Exp Physiol* 2008; 93:701-708.
- 162.** Staessen JA, Thijs L, Fagard R, O'Brien ET, Clement D, de Leeuw PW, et al. Predicting cardiovascular risk using conventional vs ambulatory blood pressure in older patients with systolic hypertension. *Systolic Hypertension in Europe Trial Investigators. JAMA* 1999; 282:539-546.
- 163.** Kikuya M, Ohkubo T, Asayama K, Metoki H, Obara T, Saito S, et al. Ambulatory blood pressure and 10-year risk of cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Ohasama study. *Hypertension* 2005; 45:240-245.
- 164.** Sega R, Facchetti R, Bombelli M, Cesana G, Corrao G, Grassi G, Mancia G. Prognostic value of ambulatory and home blood pressures compared with office blood pressure in the general population: follow-up results from the Pressioni Arteriose Monitorate e Loro Associazioni (PAMELA) study. *Circulation* 2005; 111:1777-1783.
- 165.** Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86:747-803.
- 166.** Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001; 79:76-102.

- 167.** Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, et al. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:1950-1961.
- 168.** Inagami T, Ichihara A. Prorenin/renin receptor, signals, and therapeutic efficacy of receptor blocker in end-organ damage. *Curr Hypertens Rep* 2007; 9:474-479.
- 169.** Naber CK, Siffert W. Genetics of human arterial hypertension. *Minerva Med* 2004; 95:347-356.
- 170.** Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003; 144:2179-2183.
- 171.** Jin D, Takai S, Shiota N, Miyazaki M. Roles of vascular angiotensin converting enzyme and chymase in two-kidney, one clip hypertensive hamsters. *J Hypertens* 1998; 16:657-664.
- 172.** Hayek T, Pavlotzky E, Hamoud S, Coleman R, Keidar S, Aviram M, Kaplan M. Tissue angiotensin-converting-enzyme (ACE) deficiency leads to a reduction in oxidative stress and in atherosclerosis: studies in ACE-knockout mice type 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:2090-2096.
- 173.** Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 1990; 259:H324-332.
- 174.** Yamagishi H, Kim S, Nishikimi T, Takeuchi K, Takeda T. Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodelling in myocardial-infarcted rats. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25:1369-1380.
- 175.** Davisson RL, Ding Y, Stec DE, Catterall JF, Sigmund CD. Novel mechanism of hypertension revealed by cell-specific targeting of human angiotensinogen in transgenic mice. *Physiol Genomics* 1999; 1:3-9.
- 176.** Lavoie JL, Lake-Bruse KD, Sigmund CD. Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286:F965-971.
- 177.** Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190:372-373.
- 178.** Lyon MF. The Lyon and the LINE hypothesis. *Semin Cell Dev Biol* 2003; 14:313-318.
- 179.** Fischer M, Baessler A, Schunkert H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2002; 53:672-677.
- 180.** Warnecke C, Willich T, Holzmeister J, Bottari SP, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Efficient transcription of the human angiotensin II type 2 receptor gene requires intronic sequence elements. *Biochem J* 1999; 340 (Pt 1):17-24.
- 181.** Mizuiri S, Hemmi H, Kumanomidou H, Iwamoto M, Miyagi M, Sakai K, et al.

- Angiotensin-converting enzyme (ACE) I/D genotype and renal ACE gene expression. *Kidney Int* 2001; 60:1124-1130.
- 182.** Knöll A, Schunkert H, Reichwald K, Danser AH, Bauer D, Platzer M, et al. Human renin binding protein: complete genomic sequence and association of an intronic T/C polymorphism with the prorenin level in males. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1527-1534.
- 183.** Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am J Hum Genet* 2007; 81:405-413.
- 184.** Bag J. Feedback inhibition of poly(A)-binding protein mRNA translation. A possible mechanism of translation arrest by stalled 40 S ribosomal subunits. *J Biol Chem* 2001; 276:47352-47360.
- 185.** D'Orso I, Frasch AC. Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. *J Biol Chem* 2001; 276:15783-15793.
- 186.** Bag J, Wu J. Translational control of poly(A)-binding protein expression. *Eur J Biochem* 1996; 237:143-152.
- 187.** Vakalopoulou E, Schaack J, Shenk T. A 32-kilodalton protein binds to AU-rich domains in the 3' untranslated regions of rapidly degraded mRNAs. *Mol Cell Biol* 1991; 11:3355-3364.
- 188.** Hirose T, Totsune K, Mori N, Morimoto R, Hashimoto M, Nakashige Y, et al. Increased expression of adrenomedullin 2/intermedin in rat hearts with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008; 10:840-849.
- 189.** Nakayama T, Hirose T, Totsune K, Mori N, Maruyama Y, Maejima T, et al. Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure. *Peptides* 2008; 29:801-808.
- 190.** Totsune K, Takahashi K, Mackenzie HS, Murakami O, Arihara Z, Sone M, et al. Increased gene expression of adrenomedullin and adrenomedullin-receptor complexes, receptor-activity modifying protein (RAMP)2 and calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) in the hearts of rats with congestive heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2000; 99:541-546.
- 191.** Zhang PL, Mackenzie HS, Totsune K, Troy JL, Brenner BM. Renal effects of high-dose natriuretic peptide receptor blockade in rats with congestive heart failure. *Circ Res* 1995; 77:1240-1245.
- 192.** Mori N, Hirose T, Nakayama T, Ito O, Kanazawa M, Imai Y, et al. Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides* 2008.
- 193.** Kanazawa M, Kawamura T, Li L, Sasaki Y, Matsumoto K, Kataoka H, et al.

- Combination of exercise and enalapril enhances renoprotective and peripheral effects in rats with renal ablation. *Am J Hypertens* 2006; 19:80-86.
- 194.** Perez-Ruiz L, Ros-Lopez S, Cardus A, Fernandez E, Valdivielso JM. A forgotten method to induce experimental chronic renal failure in the rat by ligation of the renal parenchyma. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 103:e126-130.
 - 195.** Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.
 - 196.** Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15:532-534, 536-537.
 - 197.** Simms D, Cizdziel PE, Chomczynski P. TRIZOL: A new reagent for optimal single- step isolation of RNA. *Focus* 1993; 15:99-103.
 - 198.** Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18:5294-5299.
 - 199.** Ishizuka T, Ito O, Tan L, Ogawa S, Kohzuki M, Omata K, et al. Regulation of cytochrome P-450 4A activity by peroxisome proliferator-activated receptors in the rat kidney. *Hypertens Res* 2003; 26:929-936.
 - 200.** Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
 - 201.** Totsune K, Mackenzie HS, Totsune H, Troy JL, Lytton J, Brenner BM. Upregulation of atrial natriuretic peptide gene expression in remnant kidney of rats with reduced renal mass. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:1613-1619.
 - 202.** Totsune K, Takahashi K, Mackenzie HS, Arihara Z, Satoh F, Sone M, et al. Adrenomedullin and its receptor complexes in remnant kidneys of rats with renal mass ablation: decreased expression of calcitonin receptor-like receptor and receptor-activity modifying protein-3. *Peptides* 2001; 22:1933-1937.
 - 203.** Kato S, Luyckx VA, Ots M, Lee KW, Ziai F, Troy JL, et al. Renin-angiotensin blockade lowers MCP-1 expression in diabetic rats. *Kidney Int* 1999; 56:1037-1048.
 - 204.** Taal MW, Chertow GM, Rennke HG, Gurnani A, Jiang T, Shahsafaei A, et al. Mechanisms underlying renoprotection during renin-angiotensin system blockade. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F343-355.
 - 205.** Taal MW, Zandi-Nejad K, Weening B, Shahsafaei A, Kato S, Lee KW, et al. Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 2000; 58:1664-1676.

- 206.** Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Hirose T, Totsune K, Imai Y, et al. Expression of adrenomedullin 2/intermedin in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. *J Endocrinol* 2008; 198:175-183.
- 207.** Satoh F, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Ohneda M, et al. Immunocytochemical localization of adrenomedullin-like immunoreactivity in the human hypothalamus and the adrenal gland. *Neurosci Lett* 1996; 203:207-210.
- 208.** Takahashi K, Totsune K, Saruta M, Fukuda T, Suzuki T, Hirose T, et al. Expression of urocortin 3/stresscopin in human adrenal glands and adrenal tumors. *Peptides* 2006; 27:178-182.
- 209.** Ihaka R, Gentleman R. R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 1996; 5:299-314.
- 210.** Cottrell GS, Roosterman D, Marvizon JC, Song B, Wick E, Pikiros S, et al. Localization of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in enteric neurons, dorsal root ganglia, and the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 2005; 490:239-255.
- 211.** Kitamura K, Kangawa K, Eto T. Adrenomedullin and PAMP: discovery, structures, and cardiovascular functions. *Microsc Res Tech* 2002; 57:3-13.
- 212.** Nagae T, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Yahata K, Kasahara M, et al. Rat receptor-activity-modifying proteins (RAMPs) for adrenomedullin/CGRP receptor: cloning and upregulation in obstructive nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270:89-93.
- 213.** Taylor MM, Bagley SL, Samson WK. Intermedin/adrenomedullin-2 acts within central nervous system to elevate blood pressure and inhibit food and water intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R919-927.
- 214.** Taylor MM, Bagley SL, Samson WK. Intermedin/Adrenomedullin-2 inhibits growth hormone release from cultured, primary anterior pituitary cells. *Endocrinology* 2006; 147:859-864.
- 215.** Bell D, McDermott BJ. Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1:S247-262.
- 216.** Bell D, Zhao Y, McCoy FP, Devine AB, McDermott BJ. Differential effects of an anti-oxidant intervention on cardiomyocyte expression of adrenomedullin and intermedin and their receptor components in chronic nitric oxide deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20:269-282.
- 217.** Cueille C, Pidoux E, de Vernejoul MC, Ventura-Clapier R, Garel JM. Increased myocardial expression of RAMP1 and RAMP3 in rats with chronic heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294:340-346.
- 218.** Øie E, Vinge LE, Andersen GO, Yndestad A, Krobert KA, Sandberg C, et al. RAMP2 and RAMP3 mRNA levels are increased in failing rat cardiomyocytes and associated with increased responsiveness to adrenomedullin. *J Mol Cell*

- Cardiol 2005; 38:145-151.
- 219.** Romppanen H, Marttila M, Magga J, Vuolteenaho O, Kinnunen P, Szokodi I, Ruskoaho H. Adrenomedullin gene expression in the rat heart is stimulated by acute pressure overload: blunted effect in experimental hypertension. *Endocrinology* 1997; 138:2636-2639.
 - 220.** Hagner S, Stahl U, Knoblauch B, McGregor GP, Lang RE. Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 2002; 310:41-50.
 - 221.** Fischer JA, Muff R, Born W. Functional relevance of G-protein-coupled-receptor-associated proteins, exemplified by receptor-activity-modifying proteins (RAMPs). *Biochem Soc Trans* 2002; 30:455-460.
 - 222.** Nakamura Y, Shimatsu A, Murabe H, Mizuta H, Ihara C, Nakao K. Calcitonin gene-related peptide as a GH secretagogue in human and rat pituitary somatotrophs. *Brain Res* 1998; 807:203-207.
 - 223.** Bader M, Ganten D. It's renin in the brain: transgenic animals elucidate the brain renin-angiotensin system. *Circ Res* 2002; 90:8-10.
 - 224.** McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:901-918.
 - 225.** Passier RC, Smits JF, Verluyten MJ, Daemen MJ. Expression and localization of renin and angiotensinogen in rat heart after myocardial infarction. *Am J Physiol* 1996; 271:H1040-1048.
 - 226.** Pieruzzi F, Abassi ZA, Keiser HR. Expression of renin-angiotensin system components in the heart, kidneys, and lungs of rats with experimental heart failure. *Circulation* 1995; 92:3105-3112.
 - 227.** Wollert KC, Drexler H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43:838-849.
 - 228.** Finckh M, Hellmann W, Ganten D, Furtwangler A, Allgeier J, Boltz M, Holtz J. Enhanced cardiac angiotensinogen gene expression and angiotensin converting enzyme activity in tachypacing-induced heart failure in rats. *Basic Res Cardiol* 1991; 86:303-316.
 - 229.** Batenburg WW, Krop M, Garrelds IM, de Vries R, de Bruin RJ, Burckle CA, et al. Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. *J Hypertens* 2007; 25:2441-2453.
 - 230.** Nabi AH, Kageshima A, Uddin MN, Nakagawa T, Park EY, Suzuki F. Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system. *Int J Mol Med* 2006; 18:483-488.

231. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Manivel JC, Rosenberg ME. Renin expression in renal ablation. *Hypertension* 1992; 20:483-490.
232. Hayashi M. Development of new therapies, including regeneration of the kidney, for chronic kidney diseases. *Clin Exp Nephrol* 2006; 10:99-101.
233. Ng LL, Loke I, O'Brien RJ, Squire IB, Davies JE. Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation* 2002; 106:2877-2880.
234. Russell FD, Meyers D, Galbraith AJ, Bett N, Toth I, Kearns P, Molenaar P. Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:H1576-1581.
235. Dschietzig T, Bartsch C, Pregla R, Zurbrugg HR, Armbruster FP, Richter C, et al. Plasma levels and cardiovascular gene expression of urotensin-II in human heart failure. *Regul Pept* 2002; 110:33-38.
236. Kruger S, Graf J, Kunz D, Stickel T, Merx MW, Hanrath P, Janssens U. Urotensin II in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2005; 7:475-478.
237. Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, et al. Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res* 2003; 93:246-253.
238. Hughes AK, Cline RC, Kohan DE. Alterations in renal endothelin-1 production in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1992; 20:666-673.
239. Deng LY, Schiffrin EL. Endothelin-1 gene expression in blood vessels and kidney of spontaneously hypertensive rats (SHR), L-NAME-treated SHR, and renovascular hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1:S380-383.
240. Lariviere R, Day R, Schiffrin EL. Increased expression of endothelin-1 gene in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 1993; 21:916-920.
241. Lariviere R, Sventek P, Schiffrin EL. Expression of endothelin-1 gene in blood vessels of adult spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1995; 56:1889-1896.
242. Tanabe A, Naruse M, Seki T, Adachi C, Yoshimoto T, Imaki T, et al. Gene expression of endothelin-1 and endothelial-type nitric oxide synthase in cardiovascular tissues of stroke-prone spontaneously hypertensive rats/Izm: effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor aracepril. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1:S395-398.
243. Naruse M, Tanabe A, Seki T, Adachi C, Yoshimoto T, Mishina N, et al. Effects of two calcium channel blockers on messenger RNA expression of endothelin-1 and nitric oxide synthase in cardiovascular tissue of hypertensive rats. *J Hypertens* 1999; 17:53-60.
244. Day R, Lariviere R, Schiffrin EL. In situ hybridization shows increased endothelin-1 mRNA levels in endothelial cells of blood vessels of

- deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1995; 8:294-300.
- 245.** Lariviere R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1993; 21:294-300.
- 246.** Schiffrin EL, Lariviere R, Li JS, Sventek P, Touyz RM. Deoxycorticosterone acetate plus salt induces overexpression of vascular endothelin-1 and severe vascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 25:769-773.
- 247.** Schiffrin EL, Lariviere R, Li JS, Sventek P, Touyz RM. Endothelin-1 gene expression and vascular hypertrophy in DOCA-salt hypertension compared to spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1995; 22:S188-190.
- 248.** Maguire JJ, Kuc RE, Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* 2008; 29:735-742.
- 249.** Chatenet D, Dubessy C, Leprince J, Boularan C, Carlier L, Segalas-Milazzo I, et al. Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* 2004; 25:1819-1830.
- 250.** Mori M, Fujino M. Urotensin II-related peptide, the endogenous ligand for the urotensin II receptor in the rat brain. *Peptides* 2004; 25:1815-1818.
- 251.** Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Murakami O, Ito S, et al. Elevated plasma levels of immunoreactive urotensin II and its increased urinary excretion in patients with Type 2 diabetes mellitus: association with progress of diabetic nephropathy. *Peptides* 2004; 25:1809-1814.
- 252.** Langham RG, Kelly DJ, Gow RM, Zhang Y, Dowling JK, Thomson NM, Gilbert RE. Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2004; 44:826-831.
- 253.** Gruson D, Rousseau MF, Ahn SA, van Linden F, Ketelslegers JM. Circulating urotensin II levels in moderate to severe congestive heart failure: its relations with myocardial function and well established neurohormonal markers. *Peptides* 2006; 27:1527-1531.
- 254.** Cheung BM, Leung R, Man YB, Wong LY. Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J Hypertens* 2004; 22:1341-1344.
- 255.** Ashton N. Renal and vascular actions of urotensin II. *Kidney Int* 2006; 70:624-629.
- 256.** Clozel M, Hess P, Qiu C, Ding SS, Rey M. The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316:1115-1121.
- 257.** Sidharta PN, Wagner FD, Bohnemeier H, Jungnik A, Halabi A, Krahenbuhl S, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the urotensin II receptor

- antagonist palosuran in macroalbuminuric, diabetic patients. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80:246-256.
- 258.** Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Pizzini P, Malatino L. Urotensin II is an inverse predictor of incident cardiovascular events in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2006; 69:1253-1258.
- 259.** Association for the Advancement of Medical Instrumentation. American national standards for electronic or automated sphygmomanometers. Washington DC. AAMI Analysis and Review. 1987.
- 260.** Dahlof B, Devereux RB, Julius S, Kjeldsen SE, Beevers G, de Faire U, et al. Characteristics of 9194 patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study. *Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension*. *Hypertension* 1998; 32:989-997.
- 261.** Casale PN, Devereux RB, Alonso DR, Campo E, Kligfield P. Improved sex-specific criteria of left ventricular hypertrophy for clinical and computer interpretation of electrocardiograms: validation with autopsy findings. *Circulation* 1987; 75:565-572.
- 262.** Norman JE, Jr., Levy D. Improved electrocardiographic detection of echocardiographic left ventricular hypertrophy: results of a correlated data base approach. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1022-1029.
- 263.** Devereux RB, Bella J, Boman K, Gerds E, Nieminen MS, Rokkedal J, et al. Echocardiographic left ventricular geometry in hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy: The LIFE Study. *Blood Press* 2001; 10:74-82.
- 264.** Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:8998-9002.
- 265.** Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:4008.
- 266.** Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl* 1995; 4:S185-194.
- 267.** Stec DE, Flasch A, Roman RJ, White JA. Distribution of cytochrome P-450 4A and 4F isoforms along the nephron in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284:F95-102.
- 268.** Celi FS, Zenilman ME, Shuldiner AR. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:1047.
- 269.** Jin CF, Mata M, Fink DJ. Rapid construction of deleted DNA fragments for use as internal standards in competitive PCR. *PCR Methods Appl* 1994; 3:252-255.
- 270.** Menzo S, Bagnarelli P, Giacca M, Manzin A, Varaldo PE, Clementi M. Absolute

- quantitation of viremia in human immunodeficiency virus infection by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1752-1757.
- 271.** Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259:523-526.
- 272.** Matyas JR, Huang D, Adams ME. A comparison of various "housekeeping" probes for northern analysis of normal and osteoarthritic articular cartilage RNA. *Connect Tissue Res* 1999; 40:163-172.
- 273.** Bettegowda A, Patel OV, Ireland JJ, Smith GW. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev* 2006; 73:267-278.
- 274.** Sturzenbaum SR, Kille P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 130:281-289.
- 275.** Al-Bader MD, Al-Sarraf HA. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 156:38-45.
- 276.** Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M, et al. Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *J Biochem Biophys Methods* 2007; 70:481-486.
- 277.** Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 2003; 19:362-365.
- 278.** de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 2005; 85:154-159.

謝辞

本研究の遂行及び博士論文の作成に当たり、親身に御指導御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学・医学系研究科臨床薬学分野教授 今井 潤先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究の全ての面において、終始多大なる御指導を賜りました東北大学大学院薬学研究科臨床薬学分野准教授 戸恒 和人先生に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、終始有益な御助言御協力を賜りました東北大学医学系研究科内分泌応用医科学分野教授 高橋 和広先生に心より感謝申し上げます。

本稿を御査読賜りました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野教授 榎本 武美先生、同細胞情報学分野教授 中畑 則道先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり、共同研究者として、全ての面で御指導御協力を賜りました東北大学大学院医学系研究科内部障害学分野助教 森 信芳先生、同腎・高血圧・内分泌科大学院生 森本 玲先生に深く感謝申し上げます。

遺伝子解析にあたり、御指導御協力賜りました、大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学教授 樂木 宏実先生、臨床遺伝子治療学特任准教授 勝谷 友宏先生、大阪府立急性期・総合医療センター院長 荻原 俊男先生、愛媛大学大学院医学系研究科加齢制御内科学講座教授 三木 哲郎先生、同准教授 小原 克彦先生、統合医科学講座講師 田原 康玄先生に感謝いたします。

本研究の継続にあたり、御指導御支援を頂きました岩手県立中央病院附属大迫地域診療センターセンター長 星 晴久先生はじめスタッフの皆様、大迫総合支所保健福祉部の皆様に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、サンプルの提供、実験手技の教示、実験機器の利用にて御協力を賜りました東北大学大学院医学系研究科病理診断学分野教授 笹野 公伸先生、同病理診断学分野の皆様、同腎・高血圧・内分泌科実験技官 菊池 久美さん、同共通機器室のスタッフの皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、貴重な御助言、御協力を頂きました、東北大学大学院薬学研究科医薬開発構想寄附講座准教授 橋本 潤一郎先生、同准教授 大久保 孝義先生、同臨床薬学分野及び同医薬開発構想寄附講座、同 21st COE program "CRESCENDO"の教職員並びに大学院生、学部学生の皆様に厚く御礼申し上げます。