The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification and characterization of OSBPL10. : genome-wide association study of peripheral arterial disease
Author(s)	郡山, 弘
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58103
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【18】

氏　　名	郡（こおり）　山（やま）　弘（ひろし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４１４８　号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 8 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Identification and characterization of *OSBPL10*.-genome-wide association study of peripheral arterial disease- （ゲノムワイド関連解析による閉塞性動脈硬化症疾患感受性遺伝子OSBPL10の同定とその機能解析）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　楽木　宏実 （副査） 教　授　小室　一成　　教　授　下村伊一郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔　目　　的　〕

高齢化と糖尿病罹患者の急激な増加に伴い、閉塞性動脈硬化症(Peripheral Arterial Disease(PAD))による社会的損失が急増している。近年、ゲノムワイド関連解析による大規模スタディにより、脳梗塞や心筋梗塞などのcommonな多因子遺伝性疾患の疾患感受性遺伝子が同定されているが、閉塞性動脈硬化症の成因や治療反応性を規定する疾患関連遺伝子は未だ不明である。疾患感受性遺伝子の機能を明らかにすることができれば、末梢血管疾患特有の病態の解明ひいてはより効果的な治療法の開発に資することとなると考えられる。そこで我々は日本人集団に対してSNPsを用いたゲノムワイド関連解析を行うことにより閉塞性動脈硬化症の疾患感受性遺伝子を同定し、その遺伝子の機能を解析することを目的とした。

〔　方法ならびに成績　〕

全国より集めた日本人サンプルより、一次スクリーニングとしてPAD群195例を抽出し、対照群1,358例とともに、222,285 SNPsについて網羅的にタイピングを行った。両群の比較により得られた有意差上位2,696 SNPsについて、二次スクリーニングとしてPAD群699例と、対照群1,540例との比較解析を行った。両スクリーニングの結果を総じて、最も強い関連が*OSBPL10*遺伝子のintronic SNP rs1902341に認められた（$P = 4.7\times10^{-7}$, OR = 1.31, 95% CI 1.18－1.46）。また*OSBPL10*遺伝子には他にも関連を示すSNPsが複数存在した(rs2045298, $P=2.7\times10^{-5}$, rs2168422, $P=2.1\times10^{-5}$, rs6779621, $P=2.7\times10^{-6}$)。他にも*CSMD1*遺伝子のintronic SNP rs2554503 (P = 5.7×10-5, OR = 1.32, 95% CI 1.15－1.51)などいくつかのPADとの関連を示すSNPsが同定された。

以上の結果から、最も強い関連を示した*OSBPL10*遺伝子について次に機能解析を行った。まずヒト各組織のNorthern blottingにより発現パターンを解析した。その結果OSBPL10は心臓、腎臓、肺、胎盤など、血管が比較的豊富な臓器で強い発現を認めた。心臓の分画のNorthern blottingでは、大動脈に最も強い発現を認めた。培養細胞に対しwestern blottingを行ったところ、ヒト血管平滑筋細胞（HASMC）の発現は弱かったが、ヒト血管内皮細胞（HAEC）で強い発現を認めた。抗OSBPL10抗体を用いて免疫染色を行ったところOSBPL10はHAECの小胞体に局在することが確認された。OSBPL10転写産物をクローニングし、HAECに発現させた。その結果、過剰発現したOSBPL10は微小管および小胞体に局在し、両者の形態変化を引き起こした。

血管内皮細胞は*in vitro*において酸化コレステロールであるオキシステロールの添加などにより小胞体ストレスが誘導されること、また動脈硬化性病変で小胞体ストレスが生じていることなどが明らかになってきている。そこで次に小胞体ストレスにおけるOSBPL10の関与について検討した。まず血管内皮細胞の培養液にオキシステロール（7-ketocholesterol）やツニカマイシンを添加、あるいは低酸素刺激を行ったところ、OSBPL10の発現上昇が認められた。次にOSBPL10を未刺激のHAECに過剰発現させたところ、小胞体ストレスが誘導され、下流の現象であるオートファジーも誘導された。siRNAを用いてOSBPL10をノックダウンしたHAECに、7-ketocholesterolやツニカマイシン処理を行ったところ小胞体ストレスやオートファジーの有意な抑制は認めなかった。これらの結果からOSBPL10は小胞体ストレスにさらされた血管内皮細胞において、微小管依存的なストレス応答に関与している可能性が示唆されたが、小胞体ストレス経路自体に必須ではないと考えられた。

〔　総　　括　〕

以上の結果から、日本人集団におけるゲノムワイド関連解析により、*OSBPL10*遺伝子が閉塞性動脈硬化症の疾患関連遺伝子であることが示唆された。またOSBPL10はヒト血管内皮細胞（HAEC）で高い発現を認め、小胞体および微小管上に局在し、血管内皮細胞における小胞体ストレスに関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

閉塞性動脈硬化症の成因や治療反応性を規定する疾患関連遺伝子は未だ不明である。そこで閉塞性動脈硬化症発症の遺伝的背景を明らかにするため、日本人集団に対してSNPsを用いたゲノムワイド関連解析を行った。

閉塞性動脈硬化症群913例と、対照群1500例に対し、222,285SNPsについて網羅的にタイピングを行い、両群の比較により疾患関連SNPsを同定した。また同定された疾患関連遺伝子につき機能解析を行った。

ゲノムワイド関連解析の結果、最も小さいＰ値を示した上位3つのSNPs (rs1902341, $P=4.7\times10^{-7}$, rs2168422, $P=2.1\times10^{-5}$, rs6779621, $P=2.7\times10^{-6}$)はいずれもOSBPL10遺伝子の第5イントロンに存在していた。

発現解析の結果OSBPL10は血管内皮細胞で高い発現を認めた。血管内皮細胞をツニカマイシン処理や低酸素処理することによりOSBPL10の発現上昇が認められた。OSBPL10をヒト大動脈血管内皮細胞に過剰発現させたところ、チューブリンと共局在し、チューブリンの重合状態を安定化することが明らかになった。これらの結果からOSBPL10は小胞体ストレスにさらされた血管内皮細胞において、微小管依存的なストレス応答に関与している可能性が示唆された。

上記の研究成果は学位の授与に値すると考えられる。