

カルパイン関連遺伝子
(*CAPN1* 遺伝子、*CAPN2* 遺伝子)
と妊娠高血圧症候群との関連解析 (要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系産婦人科学専攻

中山 琢生

修了年 2016 年

指導教員 山本 樹生

【緒言】

妊娠高血圧症候群 (pregnancy induced hypertension PIH) は妊娠 20 週以降、分娩後 12 週までに高血圧が見られる場合、または高血圧に蛋白尿を伴う場合のいずれかで、かつこれらの症状が単なる妊娠の偶発合併症によらないものと定義される。

PIH は多くの病態、病因論が展開されているが、two step theory が提唱されてから、その病態形成が明らかになってきた。¹ まず step 1 として妊娠前半期に胎盤機能不全が形成され、胎盤虚血が生じ、螺旋動脈のリモデリング (胎盤での螺旋動脈と絨毛細胞への置換) 不全が起こる。² Step 2 として障害を受けた胎盤から胎盤由来細胞塊や s FLT-1 などの抗血管新生因子が母体血中に流入し、母体での炎症反応や血管内皮障害が起こり PIH の病態を形成すると考えられている。³

本研究では PIH の病態である胎盤形成不全に関与すると考えられているカルパイン分子に着目した。

カルパインとは Ca 依存性のシステインプロテアーゼ (タンパク分解酵素) で 15 種類の触媒サブユニットと 2 種の制御サブユニットがあり、触媒サブユニット 1 つと制御サブユニット 1 つで 2 量体を形成している。

触媒サブユニットは組織特異的な 6 種と、非特異的な 9 種があり、非特異的な触媒サブユニットをもつカルパインの内、機能解析の進んでいるものが μ -カルパイン、m-カルパインの 2 つである。

μ -カルパイン、m-カルパインの触媒サブユニットはそれぞれ *CAPN1* 遺伝子、*CAPN2* 遺伝子から産生される。この 2 つのカルパインは同一の制御サブユニットを持ち、それが *CAPNS 1* 遺伝子から産生される。⁴

発生学的な分野でのカルパインの研究では、*CAPNS1* ノックアウトマウスは胎盤形成不全から胎生 10.5 日周辺で胎生致死となったことから μ -カルパイン、m-カルパインが胎児発育に重要であることが示唆された。⁵ また *CAPN1* ノックアウトマウスは血小板凝集低下は血餅退縮などの凝固系異常をきたすが、発育自体は正常であった。⁶ 一方で *CAPN2* ノックアウトマウスは胎盤形成不全から胎生 2.5 日周辺での胎生致死となった。⁷ また胎盤特異的に *CAPN2* 遺伝子を発現するコンディショナル *CAPN2* 欠損マウスの胎児は生存することが報告されている。⁸

前述のように PIH は胎盤形成不全が背景にあるものと考えられており、*CAPN1* 遺伝子、*CAPN2* 遺伝子は胎盤形成に関与するものと考えられた。しかし今日まで PIH と *CAPN1* 遺伝子、*CAPN2* 遺伝子の関連解析の研究は行われていない。

本研究の目的は妊娠高血圧症候群と *CAPN1* 遺伝子および *CAPN2* 遺伝子内の SNP を遺伝子マーカーとして、個々の SNP あるいはハプロタイプを用いた関連解析を実施し PIH の疾患感受性遺伝子を検出することである。

【方法】

(1) 対象

平成 18 年から平成 27 年までに当院受診した PIH 群 167 人、control 群 266 人を対象とした。

CAPN1 遺伝子、*CAPN2* 遺伝子において、今回対象とし SNP で遺伝型が決定できなかったものは解析から外した。また PIH 群は日本妊娠高血圧学会ガイドラインに準拠し PE 群、GH 群の 2 群に分けて解析を行った。その結果 *CAPN1* 遺伝子の関連解析では PE 群 109 例、GH 群 19 例、control 群 202 例、*CAPN2* 遺伝子の関連解析では PE 群 81 例、GH 14 例、control 177 例として検討をおこなった。

(2) 対象遺伝子と SNP

CAPN1 遺伝子は第 11 遺伝子の長腕に存在する全長 30,792 塩基、Exon 数 24 の遺伝子である。*CAPN2* 遺伝子は第 1 染色体の長腕に存在する全長 74,426 塩基、Exon 数 23 の遺伝子である。SNP の選択は The HapMap database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から、*CAPN1* 遺伝子、*CAPN2* 遺伝子内で Minor Allel Frequency (MAF: 頻度の少ないほうの Allel の頻度) が 0.05 以上の SNP を対象として選択した (Table 3)。

CAPN1 遺伝子内の rs10895991、rs625750、rs2271448 を、*CAPN2* 遺伝子内の rs1892077、rs1153968、rs9804140、rs17599、rs1153954 を選択した (Figure. 2、Figure 3)。

また選択した SNP の全ては、The HapMap database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上から [D'] のデータを元に 1 つのハプロタイプブロックに入っていることを確認した。

(3) DNA の抽出および TaqMan® PCR 法

DNA の抽出は被験者の末梢血を採血し、血液中の白血球からフェノール・クロロフォルム抽出法にて DNA を抽出した。

TaqMan® PCR 法を用いて SNP 遺伝型を決定 (Genotyping) した。

The Sequence Detection System (SDS) 7700 使用し、SDS v 1.6.3 software package (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) にて各遺伝型をプレート毎に解析した。

(4) 統計学的解析

統計学的解析について、各群間の有意差検定は Mann-Whitney U test を用いて行った。相関関係の解析は χ^2 検定にて検討した。GraphPad Prism6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて解析し、P 値 < 0.05 をもって有意差ありとした。

ハプロタイプを用いた関連解析は SNPalyze (Windows 版) Ver3.23 (ダイナコム, 横浜,

日本)を使用し、頻度 0.01 未満のハプロタイプは除外した。P 値<0.05 を有意差ありとした。

【結果】

ハプロタイプを用いたの関連解析を行うため、各遺伝子においてすべての SNP の遺伝型が決定できなかったものを除外したところ *CAPN1* 遺伝子についての関連解析では control 群 202 人、PIH 群 128 人 (PE 群 109 人、GH 群 19 人)、*CAPN2* 遺伝子についての関連解析では control 群 177 人、PIH 群 95 人 (PE 群 81 人、GH 群 14 人) での検討となった。

1) 個々の SNP を用いた関連解析

個々の SNP が Hardy-Weinberg 平衡は合致しているか確認したところ、rs1153968 は Hardy-Weinberg 平衡には合致していなかった (P 値=0.0192)。そのほかの SNP は Hardy-Weinberg 平衡には合致していた。

個々の SNP 毎の検討では *CAPN1* 遺伝子についての関連解析ではどの SNP も有意差は認めなかった。

CAPN2 遺伝子の GH 群と control 群との比較において rs1153968 の Recessive model において有意差を認めたが、rs1153968 は Hardy-Weinberg 平衡には合致していなかったことから有意なものとは考えにくい。そのほかの個々の SNP 毎の検討では有意差は認められなかった。

2)ハプロタイプを用いた関連解析

ハプロタイプを用いた関連解析を行う前に、個々の SNP 間における pair-wise 連鎖不平衡解析を行った。もし r square が 0.5 以上である場合、2つの SNP のうち1つのみハプロタイプを用いた関連解析に使用することになるが、今回そのような SNP は認めず、除外すべき SNP なく解析を行った。

CAPN1 遺伝子 rs10895991-rs625750-rs2271448 のハプロタイプの解析では全体で control 群と PIH 群との間で有意差を認めた (P 値<0.01)。PIH では C-C-C の頻度が有意に高く (P 値=0.013)、C-C-T は有意に頻度が高かった (P 値=0.025)。

CAPN2 遺伝子 rs1892077-rs98041140-rs17599-rs1153954 のハプロタイプの解析では全体で control 群と PIH 群との間で有意差を認めた (P 値=0.036)。PIH では G-A-A-T の頻度が有意に低く (P 値<0.001)、G-A-C-T は有意に頻度が高く (P 値=0.007)、G-G-A-A は有意に頻度が高かった (P 値=0.007)。

【考察】

現在までにカルパイン関連遺伝子に関してのハプロタイプの関連解析の研究は少なく、今回の研究で採り上げた *CAPN1* 遺伝子、*CAPN2* 遺伝子に関しては、*CAPN1* 遺伝子

と鳥や牛の肉質や筋肉についての解析^{9,10}といったものしか確認できなかった。

一方でタンパク質レベルでのカルパインの研究は進んでおり、緒言に記載したように多くの病態、疾患との関連が示唆されている。 μ -カルパイン、 m -カルパインと周産期に関する報告も多く、**B**群溶連菌感染マウスにおける胎盤にて m -カルパインの発現が亢進すること¹¹、習慣性流産患者と control 群の比較で、脱落膜上皮細胞において μ -カルパインは発現が亢進し、 m -カルパインやカルパスタチンでは発現に差を認めなかったこと¹²などが報告されている。これらの報告から **PIH** にカルパイン-カルパスタチン系が関与していると思われる。

今回の研究結果から **PIH** と *CAPN 1* 遺伝子、*CAPN 2* 遺伝子の **SNP** の関連解析を行い、*CAPN 1* 遺伝子、*CAPN 2* 遺伝子が **PIH** の遺伝子マーカーになりえることを世界で初めて報告した。今後の展望としては *CAPNS1* 遺伝子やカルパスタチン遺伝子の関連解析でも有意差を認められれば、これらを併用することで **PIH** のマーカーとして使用できる可能性が考えられる。

【まとめ】

本研究にて、*CAPN1* 遺伝子 rs10895991-rs625750-rs2271448 のハプロタイプにおいて、**PIH** で **C-C-C** と **C-C-T** の頻度が有意に高いことと、*CAPN2* 遺伝子 rs1892077-rs98041140-rs17599-rs1153954 のハプロタイプにおいて、**PIH** で **G-A-A-T** が有意に低く、**G-A-C-T**、**G-G-A-A** は有意に高いことがわかった。

今回の研究の成果は **PIH** を発症しやすいハプロタイプを保有する患者に対し、発症予防と早期発見、早期治療に役立てることが出来、胎児および母体のリスク軽減につながると考える。本研究が周産期予後の改善の一助になることを期待する。

引用文献

1. Roberts JM. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Seminars in perinatology* 2000;24:24-8.
2. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, et al. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *British journal of obstetrics and gynaecology* 1991;98:648-55.
3. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592-4.
4. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiological reviews* 2003;83:731-801.
5. Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C, Williams K, Greer PA. Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Molecular and cellular biology* 2000;20:4474-81.
6. Azam M, Andrabi SS, Sahr KE, Kamath L, Kuliopulos A, Chishti AH. Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Molecular and cellular biology* 2001;21:2213-20.
7. Dutt P, Croall DE, Arthur JS, et al. m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC developmental biology* 2006;6:3.
8. Takano J, Mihira N, Fujioka R, Hosoki E, Chishti AH, Saido TC. Vital role of the calpain-calpastatin system for placental-integrity-dependent embryonic survival. *Molecular and cellular biology* 2011;31:4097-106.
9. Shu JT, Zhang M, Shan YJ, Xu WJ, Chen KW, Li HF. Analysis of the genetic effects of CAPN1 gene polymorphisms on chicken meat tenderness. *Genetics and molecular research : GMR* 2015;14:1393-403.
10. Cushman RA, Tait RG, Jr., McNeel AK, et al. A polymorphism in myostatin influences puberty but not fertility in beef heifers, whereas micro-calpain affects first calf birth weight. *Journal of animal science* 2015;93:117-26.
11. Equils O, Moffatt-Blue C, Ishikawa TO, Simmons CF, Ilievski V, Hirsch E. Pretreatment with pancaspase inhibitor (Z-VAD-FMK) delays but does not prevent intraperitoneal heat-killed group B *Streptococcus*-induced preterm delivery in a pregnant mouse model. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* 2009;2009:749432.
12. Kumagai K, Ozaki Y, Nakanishi T, et al. Role of mu-calpain in human decidua for recurrent miscarriage. *American journal of reproductive immunology* 2008;59:339-46.