Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

The 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial cell nitric oxide synthase gene and ischemic stroke in a Japanese population

矢橋, 良嗣

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
1999-03-31

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲1986

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001986

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）	矢橋良嗣（やはしよしつぐ）　（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	博い第1230号
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
学位授与の日付	平成11年３月31日
学位論文題目	The 27−bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial cell nitric oxide synthase gene and ischemic stroke in a Japanese population （日本人における血管内皮型一酸化窒素合成酵素遺伝子のイントロン４内の27塩基対の繰り返し配列多型性と脳梗塞）
審査委員	主査　教授　松尾雅文 教授　住野公昭　　教授　中村　肇

論文内容の要旨

（はじめに）

血管内皮細胞に存在する血管内皮型一酸化窒素合成酵素（ecNOS）によって合成される血管内皮由来の一酸化窒素（NO）は血管系において血管弛緩作用や抗血栓作用を示し，動脈硬化あるいは高血圧との関係が指摘されている。

ecNOS 遺伝子は第７番染色体長腕に位置し（７q35−36）し，いくつかの多型性を有している。そのうちイントロン４に存在する27塩基対の繰り返し配列の多型性（５回／４回）と冠動脈疾患発症との間に関連性があるとの報告がある。これは，血管障害の発生とこの多型性との間に何らかの関連性があることを示唆するものである。今回，日本人脳梗塞患者においてこの多型性を解析し，脳梗塞との関連性について検討した。

（対象と方法）

対象：　頭部 CT，MRI あるいは MR アンギオにて脳梗塞と診断された脳梗塞患者群127人で，このうちアテローム血栓性梗塞18人，ラクナ梗塞58人，無症候性脳梗塞51人からなっている。対照は脳梗塞と診断されていない91人で，ともに兵庫県淡路島の北淡町に住んでいる。

方法：　クエン酸加全血球より salt/chloroform 法にて抽出したゲノム DNA を鋳型として，PCR 法により ecNOS 遺伝子のイントロン４の27塩基対の繰り返し配列領域を増幅した。PCR 産物を５％ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い，エチジウムブロマイドで染色した後，紫外線照射器を用いてバンドを確認した。

４回繰り返し（393−bp）をアレル a，５回繰り返し（420−bp）をアレル b として，b／b・b／a・a／a の３つの遺伝子型に分類した。

統計解析については，異なる群の間での遺伝子型の分布あるいはアレルの頻度は χ^2検定で比較し，二つの群の間での平均値の比較には対応のない t 検定を用い，$p<0.05$を統計学的に有意差ありとした。

（結果）

脳梗塞患者群と正常群の間で，背景について比較したが，年齢・性別・喫煙歴の有無・脳梗塞あるいは突然死の家族歴の有無，ヘマトクリット値・総コレステロール値・HDL－コレステロール値に，有意差は認めなかった。

脳梗塞の発症とecNOS遺伝子の多型性との関連性を調べるために，脳梗塞患者群と正常群の間で遺伝子型の分布とアレルの頻度を比較した。脳梗塞患者群では遺伝子型b／bが73.2%，b／aが26.0%，a／aが0.8%，正常群では遺伝子型b／bが73.6%，b／aが26.4%，a／aが0.0%で，遺伝子型の分布に有意差は認めなかった。また，脳梗塞患者群ではアレルbが0.862，アレルaが0.138，正常群ではアレルbが0.868，アレルaが0.132で，アレルの頻度にも有意差は認めなかった。

また，ecNOS遺伝子のイントロン4に存在する27塩基対の繰り返し配列の多型性と冠動脈疾患との間に関連性があるとの報告において，喫煙歴が環境因子としてこの多型性に影響を与えることもあわせて報告されていることと，脳梗塞のリスク因子として喫煙歴が重要であることから，脳梗塞における喫煙歴の有無とecNOS遺伝子の多型性との関連性を調べるために，喫煙歴を有する群と有しない群それぞれにおいて，脳梗塞患者群と正常群の間で遺伝子型の分布とアレルの頻度を比較した。喫煙歴を有する群において，脳梗塞患者群では遺伝子型b／bが61.7%，b／aが36.2%，a／aが2.1%，正常群では遺伝子型b／bが75.8%，b／aが24.2%，a／aが0.0%で，遺伝子型の分布に有意差は認めなかった。また，脳梗塞患者群ではアレルbが0.798，アレルaが0.202，正常群ではアレルbが0.879，アレルaが0.121で，アレルの頻度にも有意差は認めなかった。

喫煙歴を有しない群において，脳梗塞患者群では遺伝子型b／bが80.0%，b／aが20.0%，a／aが0.0%，正常群では遺伝子型b／bが72.4%，b／aが27.6%，a／aが0.0%で，遺伝子型の分布に有意差は認めなかった。また，脳梗塞患者群ではアレルbが0.90，アレルaが0.10，正常群ではアレルb 0.862，アレルaが0.138で，アレルの頻度にも有意差は認めなかった。

脳梗塞のタイプとecNOS遺伝子の多型性との関連性を調べるために，脳梗塞の各タイプの間で遺伝子型の分布とアレルの頻度を比較した。アテローム血栓性梗塞群では遺伝子型b／bが77.8%，b/aが22.2%，a／aが0.0%，ラクナ梗塞群では遺伝子型b／bが74.1%，b／aが24.1%，a／aが1.7%，無症候性脳梗塞群では遺伝子型b／bが70.6%，b／aが29.4%，a／aが0.0%で，遺伝子型の分布に有意差は認めなかった。また，アテローム血栓性梗塞群ではアレルbが0.889，アレルaが0.111，ラクナ梗塞群ではアレルbが0.862，アレルaが0.138，無症候性脳梗塞群ではアレルbが0.853，アレルaが0.147で，アレルの頻度にも有意差は認めなかった。

（考察）

今回の我々の研究では，脳梗塞患者群と正常群との間あるいは脳梗塞の各タイプの間においてecNOS遺伝子のイントロン4に存在する27塩基対の繰り返し配列の多型性に有意差は認められなかった。そのため，ecNOS遺伝子のイントロン4に存在する27塩基対の繰り返し配列の多型性と脳梗塞との間に明らかな関連性を見い出すことができず，この多型性が脳血管疾患の発症の遺伝的リスク因子である証拠を示すことはできなかった。

この様に，ecNOS遺伝子のイントロン4に存在する27塩基対の繰り返し配列の多型性と冠動脈疾患との間に関連性があるとの報告がありながら，この多型性と脳梗塞との間に明らかな関連性を見い出すことができなかった。これは，冠動脈においてはNOによる血流のコントロールにecNOSのみが関与しているのに対して，脳血管ではecNOSと神経細胞型一酸化窒素合成酵素（ncNOS）の2つが関与しているために，ecNOS遺伝子のイントロン4に存在する27塩基対の繰り返し配列の多型性とだけでは脳梗塞との関連性が明らかにならなかったと考えられる。

論文審査の結果の要旨

血管内皮の一酸化窒素（NO）は，血管の平滑筋を弛緩させ，血管の拡張をもたらす。このNOはL－アルギニンよりNO合成酵素の作用を受け合成される。NO合成酵素をコードする遺伝子は3種類あり，組織特異的に発現している。その中で血管内皮に発現するNO合成酵素はendothelial NO synthase（eNOS）と呼ばれる。このeNOS遺伝子の配列中には多くの遺伝子多型が存在し，それぞれの多型と血管障害との関連が解析されてきた。この中で，イントロン4の中に存在する27塩基からなる繰り返し配列の繰り返し数と冠動脈疾患との発生との関連が報告されている。

研究者はeNOS遺伝子の多型と血管障害との関連に注目し，日本人の脳梗塞患者とeNOS遺伝子の27塩基対の繰り返し配列の多型との関連を解析した。

兵庫県の淡路島の北淡町に住む住民で，CT, MRIなどで検出された様々な程度の脳梗塞をもつ患者127例を対象とした。そして，同地域の住民で脳梗塞の無い91例を対象とした。いずれも，インフォームドコンセントを得て検査を実施した。

まず，脳梗塞群と正常者群の両群間の性別・喫煙歴を調べ，両群間の差を調べたが，両群で差は認められなかった。血液化学検査で総コレステロール・HDL－コレステロール値などを調べ，両群でその値を比較したが両群間に有意な差は認められなかった。

そこで，遺伝学的バックグラウンドを解析するため血液検査時に採決した血液よりDNAを抽出し，eNOS遺伝子のイントロン4内に存在する27塩基からなる繰り返し繰り返し数を解析した。これには，この多型領域をPCR増幅後，増幅産物をポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動で分離し，そのサイズにより27塩基の繰り返し数を同定した。

今回の検索においては，電気泳動上認められるパターンは2種のみであった。この2種の増幅産物はそのサイズから，27塩基の繰り返し配列の繰り返し数が4回と5回のものと判定された。そして，27塩基の4回の繰り返したものをアレルaとし，5回繰り返したものをアレルbとした。脳梗塞患者群と正常者群の間で，遺伝子型のa／a，a／b，b／bあるいはアレルのaとbそれぞれの出現頻度について比較した。両群間では，遺伝子型・アレルの分布のいずれにおいても有為な差は認められなかった。さらに，脳梗塞群をアテローム血栓性梗塞，ラクナ梗塞および無症候性脳梗塞に分けそれぞれのグループ間で遺伝型とアレル頻度を比較したが，各グループ間でこれらの値に有意な差は見られなかった。

これらの結果は，これまでの報告と異なりeNOS遺伝子多型と脳梗塞には関連がないことを示した。今後，日本人の脳梗塞の予知において新たなDNAマーカーを採用する必要があることを示唆した。

本研究は，脳梗塞について，その遺伝的背景を研究したものであるが，従来ほとんど行われなかったeNOS遺伝型多型との関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める。