

# 心不全における個別化適正医療の展開 —遺伝子多型解析を応用したβ遮断薬の 効率的・効果的治療戦略の確立—

岡本 洋

IRYO Vol. 64 No. 7 (443-449) 2010

**要旨**

β遮断薬は、心収縮性を低下させるため、心不全での使用は禁忌とされてきた。しかし、多くの大規模臨床試験の結果、際だった生命予後改善効果が示され、心不全治療に欠くことのできない重要な薬剤とされ、心不全ガイドラインでは、禁忌がなければすべての心不全患者に対し、β遮断薬投与が推奨されている。一方で、重大な問題点を抱えている。一つには、β遮断薬の反応性には個人差が認められ反応性の判定に数カ月の期間を要すること、もう一つは、非反応群への投与は、β遮断薬の陰性変力作用のために心不全を悪化させる危険性が高いことである。この問題点を解決するには、β遮断薬の導入前に治療反応性を予測する個別化適正医療の確立が不可欠である。本稿では、心不全におけるβ遮断薬治療を概説する。その中で、拡張型心筋症患者を対象として、薬物への反応性を考慮し、約200の遺伝子多型解析の結果を示し、心不全における、個別化適正医療の可能性を探りたい。

**キーワード** 個別化適正医療, 心不全, β遮断薬, 遺伝子多型**はじめに**

循環器領域は疾患としての裾野が広い为患者数も多く、また、専門的かつ緊急的対応が要請される。中でも、心不全は、高血圧、糖尿病の経過中、さらには拡張型心筋症、急性心筋梗塞などに基づき発症することが多く、いったん発症すると循環不全や不整脈管理に高度で緊急的な医療が求められる。最近の心不全の特徴は、第一に患者数が年々増加し、高齢者の割合が高くなっていることである。Framing-

ham 研究<sup>1)</sup>によると、心不全の90%が65歳以上で、逆に65歳以上の10%で心不全罹患の既往があるとされる。高齢者が多いため、必然的に多臓器合併症が増えることになる。第二に、死亡率は悪性腫瘍と同等で、生命予後が悪い。欧米では年間死亡率10-30%とされる。しかも、高齢者ほど死亡率が高くなる。第三に基礎疾患が時代と共に大きく変化し、急性心筋梗塞の割合は欧米ほどではないものの増加傾向で、弁膜疾患に関しては従来のリウマチ性弁膜症は激減し、代わりに動脈硬化性大動脈弁狭窄症が増えてい

国立病院機構北海道医療センター 循環器内科  
別刷請求先：岡本 洋 国立病院機構北海道医療センター 循環器内科  
〒063-0005 札幌市西区山の手5条7丁目1番1号  
(平成21年10月13日受付, 平成22年2月12日受理)

Tailored β Blocker Therapeutic Strategy for Heart Failure by Using Genetic Polymorphisms  
Hiroshi Okamoto, NHO Hokkaido Medical Center  
Key Words: tailor-made medicine, heart failure, beta-blocker, gene polymorphism

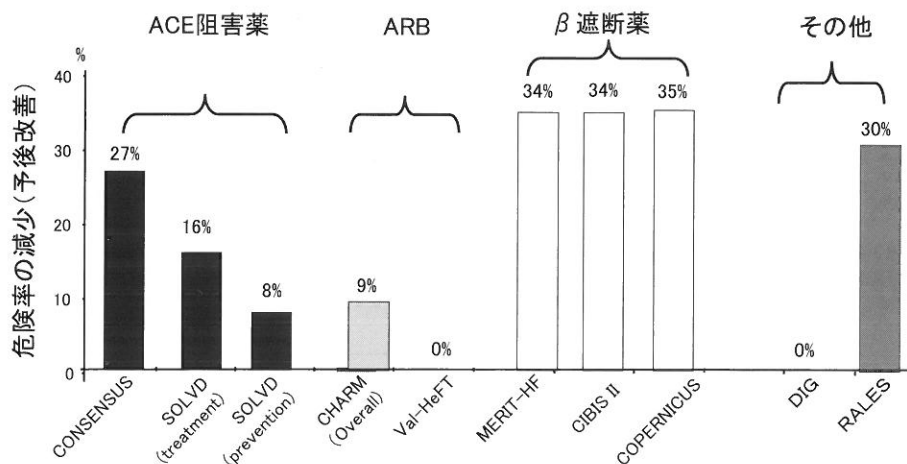


図1 慢性心不全あるいは収縮不全患者を対象とした代表的大規模臨床試験

試験薬毎の各臨床試験名と試験薬の予後改善効果。いずれもランダム化プラセボ対象比較試験，その他；DIG試験ではジゴキシン，RALES試験ではアルダクトンが試験薬。ACE阻害薬：アンジオテンシン変換酵素阻害薬，ARB：アンジオテンシン受容体拮抗薬（文献3，4，5より）。

る。また，呼吸困難で救急搬送される高血圧や心房細動をともなう高齢女性などで，収縮機能は正常な拡張不全が心不全全体の30-40%を占め注目されている<sup>2)</sup>。治療面では，1980年代から心機能などの Surrogate endpointではなく，生命予後という True endpoint を指標としたランダム化臨床試験の成績が報告され，その結果に基づいた治療（EBM）が指向され，多くのガイドラインが作成され，治療方法全体が体系化された。EBMの展開は，心不全の病態や治療に対する見方を変えたともいえる。顕著な例として心不全におけるβ遮断薬に対する考え方の変化がある。

### 心不全とβ遮断薬

β遮断薬は，心収縮性を低下させるため，心不全での使用は禁忌とされていた。今でも禁忌とされている薬剤がほとんどである。しかし，最近のMERIT-HF<sup>3)</sup>，CIBIS-II<sup>4)</sup>，COPERNICUS<sup>5)</sup>という一連の大規模臨床試験の結果，心不全において際だって大きな生命予後改善効果が示された（図1）。一方で，静注強心薬を含めジギタリス以外の強心薬の中・長期的投与は，すべて生命予後を悪化させるという結果が臨床試験によって示され，可能な限り早期に強心薬を離脱することが求められる。心不全の治療および病態に関して，したがって，急性期，短期的に心収縮性を増強することは，血行動態の改善には有効であるが，中・長期的な強心薬の使用は，

やせ馬を鞭打つごとく，致死的不整脈発生などを助長し生命予後を悪化させる。むしろ，過剰な神経・体液性因子を効率的に抑制することが，最終的には心収縮性の改善にも寄与し，予後改善にもつながると理解されるようになった。心不全ガイドライン<sup>6)</sup>では，禁忌がなければすべての心不全患者において，β遮断薬投与が推奨されている。一方，β遮断薬投与によっても反応性が悪い，悪化さえする non-あるいは bad-responder が存在し，その割合は予想外に多い。したがって，EBMに基づくガイドラインでは，禁忌がなければすべての心不全患者に対し，β遮断薬を選択する。しかしながら，反応不良例や悪化例への対処に関して明確な対応は示されていない。個々の患者に応じた診断・治療体系，薬物への反応性に対する個体差などを考慮した考え方，いわゆるテーラーメイド医療が必要とされる所以でもある。

### 心不全におけるβ遮断薬反応性と薬剤反応性を規定する因子

β遮断薬への反応性は，個々の患者でどのように異なるのか，自験例で検討した。心不全の基礎疾患として拡張型心筋症136例（平均57±13歳，男性103例，女性33例，初診時NYHA II，III度73%）を対象に，心エコー図上，%FS（左室内径短縮率）の改善5%以上増加を responder，5%以内あるいは減少を non-responder（他の多くのレポートで同様

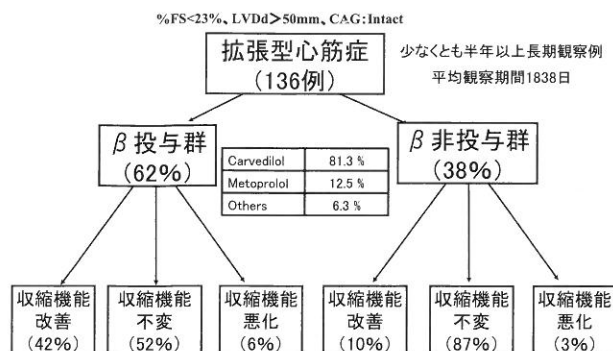


図2 β遮断薬による収縮機能の変化

拡張型心筋症患者136例におけるβ遮断薬投与・非投与別の収縮機能改善とその比率。主投与薬剤はcarvedilol (80%以上) (文献7より)。

の基準が採用されているため) とし解析した。その結果、平均約5年間の経過観察中、β遮断薬投与群ではresponder 36.3%, non-responder 63.6%で、非投与群と比較すると収縮性改善例が高頻度で認められた(図2)。心機能の改善は、臨床症状の改善、血漿 ANP, BNP 値の低下と相関したが、必ずしも投与前の心機能、心拍数、血漿 ANP, BNP 値、MIBG 心筋シンチグラムの早期、晚期イメージング、ウォッシュアウト比とは相関せず、長期的に responder を予測することは困難であった。また、心機能改善群、非改善群における死亡はそれぞれ、1例、11例とβ遮断薬投与による responder 群で有意な予後改善が示された。さらに、responder 群で心機能、心拍数、血漿 ANP, BNP 値の有意な改善が観察された。投与されているβ遮断薬は主に2剤であり、血漿中 metoprolol および carvedilol の平均薬剤血中濃度は、responder 群 non-responder 群の間で差を認めなかった。以上の結果、β遮断薬への反応性には個人差があり、responder 36.3% という数値は、実際に多くの改善例をまのあたりにし、実感からするとまだ低い。以前に拡張型心筋症は悪化例が多く生命予後の悪い疾患の代表でもあったことを考え合わせると隔世の感すらある。

β遮断薬は正常な心臓では心拍数を下げ収縮力を弱めるが、不全心では機能を改善する。なぜだろうか？ 既報からβ遮断薬反応性に影響を与える因子を探ると表1<sup>7)</sup>のようになる。総じて、心筋障害や線維化の程度が軽く、障害が可逆性であり、交感神経活性の過度な活性化が心不全発症・進展に寄与している場合に反応性が良好と考えられる。

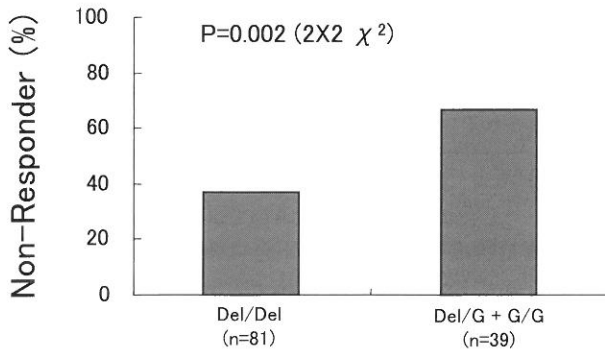
本来、交感神経系活性化—カテコラミン産生—β

表1 β遮断薬が有効な症例とは？

β遮断薬反応性に影響を与える因子と報告者、雑誌、報告年。2002年以降、遺伝子多型と薬剤反応性との関係が報告されているが、本文中で示した(文献7より)。

- ① Biopsyで心筋線維化軽度の方がGood  
— (Yamadaほか, J Am Coll Cardiol, 1993<sup>8)</sup>)
- ② 虚血性心疾患による心不全はPoor Respond  
— (Bristowほか, Circulation, 1994<sup>9)</sup>)
- ③ 投与前の心機能で収縮期圧, LVEDPが高い方がGood  
— (Eichhornほか, J Am Coll Cardiol, 1995<sup>10)</sup>)
- ④ MIBGの心筋集積変化率良好な症例の方がGood  
— (Suwaほか, Am Heart J, 1997<sup>11)</sup>)
- ⑤ 強心薬に反応(ドブタミン負荷エコーなど)する方がGood  
— (Boersmaほか, JAMA, 2001<sup>12)</sup>)
- ⑥ BiopsyでβMHC↓, エネルギー効率改善, CERCα2a↑ Good  
— (Bristowほか, N Engl J Med, 2002<sup>13)</sup>)
- ⑦ 心拍数低下する方が生命予後が良い。  
— (McAlisterほか, Ann Intern Med, 2009<sup>14)</sup>)

受容体活性化—cAMP・Aキナーゼ(PKA)の活性化—リアノジン受容体(RyR)、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネル、フォスフォランバンリン酸化—細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇という経路で心筋の収縮力が増強する。心不全では交感神経系が活性化され、重症になるにつれ血漿中ノルアドレナリン濃度は増加し、増加の程度は重症度、予後とも相関する。一方で、β1受容体数は減少し、情報伝達系のカップリング効率も低下する。フォルスコリンでβ受容体の触媒蛋白であるアデニルル—サイクレーズ(AC)を直接刺激しても産生されるcAMPは減少し、ACにカップリングする抑制性G蛋白(Gi)が増加する。逆にβ受容体をリン酸化するGタンパク関連キナーゼ(GRKs)は増加している。したがって、心不全時には心筋β受容体数の減少によるdown regulationやレセプターの脱感作、さらには、受容体以降の情報伝達系にも抑制がかかってβ受容体刺激に対する反応性が低下することになる。さらに、不全心ではRyRが不安定化し、RyRに結合するFKBP 12.6などの機能低下も生じ、細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度は拡張期から増加、収縮期の上昇の程度も低い。Marksらによると、β遮断薬投与によりRyRやFKBP 12.6の機能回復が生じ、一連のカルシウム



		Non-res	Res	合計
OPN G-156Del	Del/Del	30	51	81
	Del/G	26	12	38
	G/G	0	1	1
	total	56	64	120

図3 オステオポンチン G-156Del 遺伝子多型のアレル別薬剤反応性

Non-res : non-responder, Res : responder,

Del : Guanine (G) の欠失遺伝子型

オステオポンチン (OPN) : 炎症性サイトカイン、接着分子

OPN G-156Del 遺伝子多型の性別解析では、男性のみで有意、G-156は線維芽細胞増殖に重要な RUNX2 結合部位で BMP, FGF, TGFβ など細胞成長因子の反応性を規定かつ性決定因子 SRY の結合部位 (文献20) より。

シグナル伝達機構が改善し、細胞の収縮性が回復する<sup>15)</sup>。viable な細胞が多ければ多いほど、次第に心臓全体の心筋収縮性も改善することになる。β 遮断薬の作用機序として、その他に心拍数の低下、陰性変力作用による心筋酸素需要の抑制、拡張時間の延長による拡張機能の改善、交感神経・レニンアンジオテンシン系抑制による血管拡張作用、カテコラミンによる心筋障害の抑制、抗不整脈作用、β 受容体と G 蛋白の脱共役現象改善、抗酸化作用など多くの機序が指摘されている。β 遮断薬の作用機序は、明らかではないが、単一なものではなく、複合的な機序が想定されている。

### β遮断薬のPharmacogenomics(→450pを参照)

β 遮断薬に対する反応の個体差・人種差を説明するために Pharmacogenomics を利用した解析がなされている。β 遮断薬の多くは脂溶性であり、ほとんどはチトクローム P450 (CYP) で代謝され、不活性体に変換される。CYP 2D6 遺伝子は22染色体上にあり60種類以上の遺伝子多型 (SNP) が報告さ

れ、その約半数で薬物代謝が変化する。たとえば CYP 2D6 \*10における C100T 変異ではアミノ酸置換をとらない CYP 2D6 安定性が低下するが、変異をホモに有するヒトではβ 遮断薬代謝が遅延し、常用量でも血漿中濃度が高値となる。CYP 2D6 \*10変異には人種差があり、変異を有する人は欧米白人では約5%程度であるのに対し、日本人は38%と多い<sup>15)</sup>。つまり、日本人では同じ用量を服用しても血中濃度が高くなりやすいことになる。Pharmacokinetics (→451pを参照) は人種差や個人差が生ずる理由の一つかも知れない。

受容体レベルでは、β1 受容体 Ser49Gly と Arg389Gly の遺伝子多型が知られ、前者はGs coupling site に存在する145番目の塩基置換で、変異誘導細胞では Agonist affinity や AC 活性が増加し、β1 受容体の脱感作や、down regulation がもたらされる<sup>16)</sup>。一方、Arg389Gly 多型では、AC 活性が1/3程度に低下すること、細胞レベルや遺伝子変異過剰発現動物では cAMP 産生や収縮性が増加することが知られる<sup>17)</sup>。また、Gly389では心筋細胞肥大や線維化が進展することが知られる。Arg389は Gly389よりβ 遮断薬に対する反応が過大で、COPERNICUS 試験<sup>9)</sup>で、Arg389では carvedilol 投与により収縮性の指標である駆出率が平均25%から34%と9%増加したのに比し、Gly389では変化が認められなかった<sup>18)</sup>。β1 と β2 受容体比は通常70対30程度であるが、心不全では、1対1とβ2 受容体の比重が増す。また、β2 受容体は pre-synaptic にノルエピネフリン遊離を増強するほか、post-synaptic に心筋細胞、線維芽細胞、血管系細胞に分布する。β2 受容体では、Arg16Gly と Glu27Gly 多型がよく知られ、変異型である Gly16では、agonist 刺激に対する抵抗性を有し、血管反応性が保持され、運動耐容能がよい。β2 受容体 Gln27では、agonist 刺激に対し脱感作されやすく、carvedilol に対する反応性が悪いことが知られる<sup>19)</sup>。Pharmacokinetics や Pharmacodynamics (→451pを参照) 関連遺伝子だけではなく、このほか多くの遺伝子がβ 遮断薬反応性に関わる。

### β 遮断薬反応性に関する遺伝子多型解析

拡張型心筋症を対象としてβ 遮断薬反応性に関する遺伝子多型解析を行った。対象とした遺伝子は74、β1 受容体 Ser49Gly、β2 受容体 Arg16Gly、

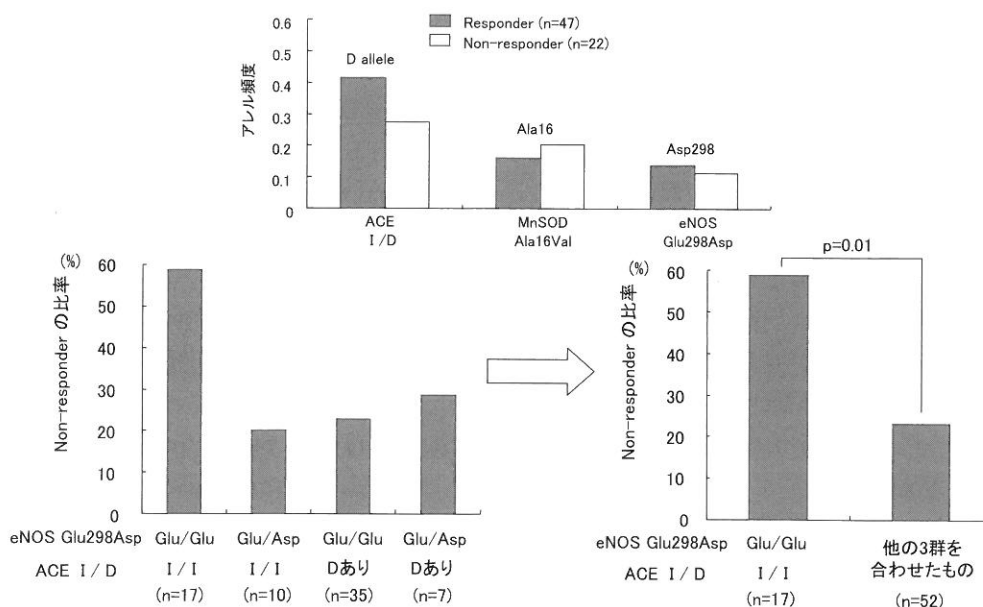


図4 ACEI/D多型, SOD, NOS3遺伝子のβ遮断薬反応性への相乗的効果

ACEI/D: アンジオテンシン変換酵素遺伝子挿入/欠失遺伝子多型

SOD: マンガンスーパーオキシドディスムターゼ (活性酸素の電子授受を行う酵素) 遺伝子

NOS3: 血管内皮型NO (一酸化窒素) 合成酵素遺伝子

β遮断薬反応性は、レニン・アンジオテンシン系、活性酸素、血管内皮拡張性に関わる遺伝子の相乗的影響下にある (文献18) 19) より)。

Glu27Gln, β3受容体 Arg64Gly, ACEI/D多型, SOD, NOS3遺伝子, CYP2D6変異を含めた約200種類について多型解析を行った。その結果、欧米の報告とは異なり、β受容体遺伝子関連については、有意な差を見いだすことができなかった。ノルエピネフリントランスポーター (NET) -182CC型の患者では、NET-182Tアレル保有患者に比べ左室駆出率の改善がみられなかった。一方、α受容体<sub>2C</sub>AR Del322-325多型は左室駆出率の改善に影響を与えなかった。両遺伝子多型の組み合わせを考慮した場合、NET-182CC/α<sub>2C</sub>AR Ins/Ins遺伝子型の患者では、それ以外の遺伝子型の患者に比べ左室駆出率の改善度が低く、NET T-182Cおよびα<sub>2C</sub>Del322-325の同時判定により、心不全治療におけるβ遮断薬反応性の予測精度が向上することが示唆された<sup>20)</sup>。また、オステオポンチン (OPN) は炎症性サイトカインかつ接着分子としての側面を有するが、心筋リモデリング過程、ことに線維化形成過程を反映する。OPN G-156Del遺伝子多型を有する群では、オッズ比3.4でβ遮断薬反応性と強く相関し、β遮断薬反応性を強く規定すると考えられた (図3)<sup>21)</sup>。β遮断薬 responder群でACEDアレル頻度、MnSOD遺伝子変異の増加を認めた (図4)。したがって、β遮断薬の投与量における著しい個体差は



図5 遺伝子多型判定を応用した治療アルゴリズム  
遺伝子 (数種類の多型解析の組み合わせ) チップを用いた簡便な治療アルゴリズム (図中遺伝子多型は本文に従い例示した)

遺伝的素因に基づく薬物動態的あるいは薬力学的な個体差だけでなく、原疾患の病態や重症度に関わる遺伝子の関与が想定され、相乗的に反応性に影響すると考えられた。現在までにβ遮断薬反応性を規定する遺伝子多型に関する情報が得られた。神経・体液性因子、酸化ストレス亢進したより重症患者ほど responderが多い傾向を示し、各遺伝子のアレル数から多型をスコア化すると80%以上の感度、特



異度で $\beta$ 遮断薬の反応性を予測でき、数個の遺伝子多型の組み合わせによって治療アルゴリズムを作成することができることが示された(図5)。しかしながら、母集団の違いや人種差を乗り越え標準的な指標となりうるかどうか、スコアが低い、反応性が悪いと予測される患者にどう対処すべきか、診断用遺伝子チップの作成と実用化など、今後の課題も明らかとなってきた。簡便に $\beta$ 遮断薬反応性や副作用をあらかじめ知ることができれば、個別化適正医療を確立でき、ひいては膨張する医療費の抑制にもつながるといふ医療経済学的効果も期待でき、きわめて有意義と考えられる。

### おわりに

心不全における個別化適正医療について、 $\beta$ 遮断薬を例に取り上げ概説した。21世紀は「ポストゲノム時代」といわれる。ヒト・ゲノムプロジェクトの結果、ヒトの蛋白形成に関わる重要な遺伝子は予想外に少なく2万2千程度であること、発生段階から老年に至るまでの遺伝子発現プロファイルの変化が明らかになったこと、個人の特異性を規定している遺伝子多型の染色体上の頻度と分布が明らかになったことなど、トランスレーショナル・リサーチによる医学・医療の将来に与えるインパクトは計り知れない<sup>22)</sup>。遺伝子多型の存在理由は不明な点が多い。今後、遺伝子チップなどを応用した医療展開に期待される。急性心筋梗塞患者で、phenotypeとしての冠動脈病変や心機能を評価しながら、同時に、genotypeとして、薬剤等に対する生体反応性や発症関連遺伝子を知り、インターベンションの適応やデバイスの選択、あるいは、使用薬剤や投与量を調整できる時代が近いことを予感する。また、日本循環器学会、日本心不全学会の後援を得て、心不全領域では日本国内初の医師主導型臨床試験であるJ-CHF試験(慢性心不全における $\beta$ 遮断薬による治療法確立のための大規模臨床試験)のサブ・スタディとしても遺伝子多型解析の前向き検討を行っている。標準化と個別化、異なった意味合いに捉えられがちな用語であるが、少なくとも医療の世界では、臨床試験によるEBMと個別化適正医療とは車の両輪として、今後の展開が大いに期待される。

### [文献]

- 1) Levy D, Kenchaiah S, Larson MG et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 1397-402.
- 2) Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH. Diastolic heart failure—abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med* 2004; 350: 1953-9.
- 3) MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999; 353: 2001-7.
- 4) CIBIS II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999; 353: 9-13.
- 5) Packer M, Coats AJ, Fowler MB et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 344: 1651-8.
- 6) Hunt SA, Abraham WT, Chin MH et al. Focused Update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult. *Circulation* 2009; 119: 2-40.
- 7) 岡本 洋, 南畝晋平, 東 純一. 心不全における遺伝子多型. *日臨* 2007; 65 (増4心不全上); 278-4.
- 8) Yamada T, Fukunami M, Ohmori M et al. Which subgroup of patients with dilated cardiomyopathy would benefit from long-term beta-blocker therapy? A histologic viewpoint. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21: 628-33.
- 9) Bristow MR, O'Connell JB, Gilbert EM et al. Dose-response of chronic beta-blocker treatment in heart failure from either idiopathic dilated or ischemic cardiomyopathy. *Bucindolol Investigators. Circulation* 1994; 89: 1632-42.
- 10) Eichhorn EJ, Heesch CM, Risser RC et al. Predictors of systolic and diastolic improvement in patients with dilated cardiomyopathy treated with metoprolol. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 154-62.
- 11) Suwa M, Otake Y, Monguchi A et al. Iodine-123

- metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy for prediction of response to beta-blocker therapy in patients with dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1997 ; 134 : 1141.
- 12) Boersma E , Poldermans D, Bax JJ et al. Predictors of cardiac events after major vascular surgery : Role of clinical characteristics, dobutamine echocardiography, and beta-blocker therapy. *JAMA* 2001 ; 285 : 1865-73.
- 13) Lowes BD, Gilbert EM, Abraham WT et al. Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 1357-65.
- 14) McAlister FA, Wiebe N, Ezekowitz JA et al. Meta-analysis : Beta-Blocker Dose, Heart Rate Reduction, and Death in Patients With Heart Failure. *Ann Intern Med* 2009 ; 150 : 784-94.
- 15) Huang J, Chuang SK, Cheng CL et al. Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers in Chinese subjects of major CYP 2 D 6 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 1999 ; 65 : 402.
- 16) Levin MC, Marullo S, Muntaner O et al. The myocardium-protective Gly-49 variant of the  $\beta$  1 -adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitisation and down-regulation. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 30429.
- 17) Mialet Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN et al.  $\beta$  1 -adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1300-5 .
- 18) Nonen S, Okamoto H, Akino M et al. No positive association between adrenergic receptor variants of alpha2cDel322-325, beta1Ser49, beta1 Arg389 and the risk for heart failure in the Japanese population. *Br J Clin Pharmacol* 2005 ; 60 : 414-7 .
- 19) Nonen S, Okamoto H, Fujio Y et al. Polymorphisms of norepinephrine transporter and adrenergic receptor alpha1D are associated with the response to beta-blockers in dilated cardiomyopathy. *Pharmacogenomics J* 2008 ; 8 : 78-84.
- 20) Sehnert AJ, Daniels SE, Elashoff M et al. Lack of association between adrenergic receptor genotypes and survival in heart failure patients treated with carvedilol or metoprolol. *J Am Coll Cardiol* 2008 ; 52 : 644-51.
- 21) Okamoto H, Nonen S, Fujio Y et al. The Association of Osteopontin with Cardiac Fibrosis and the Responsiveness to Beta-blockers in Patients with Heart Failure. *Circulation* 2008 ; 118 : s995.
- 22) Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000 ; 405 : 847-56.