

厚生省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

老年病の発症機構に関する総合的研究

（H11-長寿-020）

主任研究者 三木哲郎（愛媛大学医学部・教授）

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（総括・分担）研究報告書

老年病の発症機構に関する総合的研究

主任研究者 三木哲郎 愛媛大学医学部 教授

老年病の発症機構について総合的な研究を行うため、中四国在住の合計約 3,390 人を対象とし、各個人について、家族歴、生活習慣などの聞き取り調査と、血液生化学検査、血圧などの健診データと、さらに、末梢血白血球由来の高分子量 DNA の遺伝子解析を行った。方法は、血圧の変動などの表現型の検討、SNP (single nucleotide polymorphism) の効率のよいタイピング法の開発、実際の疾患での候補遺伝子多型を用いた患者一対照研究、さらに候補遺伝子の機能を解析するためマウスモデルなどの作成、遺伝子発現領域の解析などである。

三木哲郎 愛媛大学医学部 教授
近藤郁子 愛媛大学医学部 教授
堀内正嗣 愛媛大学医学部 教授
馬場嘉信 徳島大学薬学部 教授

集団の医療情報をデータベースに登録し、遺伝子解析のデータとともに疫学的・統計学的解析を行うことにより、老年病と生活習慣病の発症要因を見つけ出し、最終的に予防法、治療法の開発に役立てる。本研究の遺伝子解析は、所定の倫理問題委員会の審議で承認を得ている。また、個人情報が出漏らないように、個人番号、データの暗号化を行い、医療と遺伝情報を管理する研究者の数を制限し、個人のプライバシーの保護には最善を尽くした。

A. 研究目的

本研究では、遺伝的に隔離した集団が多い中四国地方で、由来の異なるフィールドを利用して、老年病の発症機構について総合的な研究を行うものである。具体的には、成人病検診を行った社員（約 2,700 人）、高齢化率が 40%を越えている島嶼部において、健康調査の終了した住民（約 300 人）、心筋梗塞の患者（約 390 人）の合計約 3,390 人を対象とする。各個人について、家族歴、生活習慣などの聞き取り調査と、血液生化学検査、血圧などの健診データと、さらに、末梢血白血球由来の高分子量 DNA の遺伝子解析を行う。上記の

B. 研究方法

研究方法は、対象となる集団を収集し、血圧の変動などの表現型について検討する。SNP (single nucleotide polymorphism) の効率のよいタイピング法を見出す。候補遺伝子の機能を解析するためマウスモデルなどを作

成することである。

老年病の表現型の解析の例として、体位変化に伴う血圧変化を調べた。起立性低血圧がよく知られているが、血圧が上昇する起立性高血圧も存在する。起立性低血圧は、ふらつきや転倒の原因となり老年者では特に注意が必要である。一般住民における、起立性の血圧調節障害の頻度を検討すると共に、動脈硬化との関連性につき検討した。健常住民を対象とし、降圧薬等の服薬のない 50 歳以上の 205 例を対象として、立位に伴う血圧変化を測定した。起立後、1 分と 3 分に立位の状態で血圧を測定した。さらに、安静臥床時に頸動脈エコーを行い、頸動脈硬化を評価した。

老年病の関連遺伝子解析の例として、心筋梗塞と診断された患者 (390 名) において、虚血性心疾患の遺伝的な発症危険因子を明らかにすることを目的に、5,10-methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子、fatty acid-binding protein 2 (FABP2) 遺伝子、CD14 受容体遺伝子の多型を用いて検索した。

SNP のタイピングにおいては、キャピラリーアレイ電気泳動を用いた DNA シークエンシングによる SNP 解析の方法を確立することを目指した。さらに、半導体集積化技術を応用して、マイクロチップ上にマイクロチャンネルを多数作製し、このマイクロチャンネルを用いた SSCP および SNP 解析に応用した。

遺伝子解析の例として、血管分化、

血管形成等に関与しているアンジオテンシン II タイプ 2 受容体 (AT2 受容体) の機能を調べるために、AT2 受容体遺伝子欠損マウスの解析、AT2 受容体にて調節される血管分化関連因子の同定、クローニング等を行い、それらの血管分化、形成、血管平滑筋及び血管内皮細胞に与える生理作用を検討した。

C. 結果

起立時血圧変動では、立位に伴い前値の 10 % 以上の血圧変動を示す場合を異常と定義すると、1 分後の判定では、約 13 % が起立性低血圧、約 20 % が起立性高血圧と判定された。3 分後の判定では、それぞれ 15 % と 17 % であった。起立 1 分後に血圧低下および血圧上昇を認めたものは、3 分後に有意に前値に戻る変化を示した。起立後の最大血圧変化と頸動脈硬化との間には、65 歳以上の老年者 (n=154) において、J 型の関係が認められた。すなわち、起立に伴い、血圧が低下する場合のみならず、血圧が上昇する場合も頸動脈硬化と関連した。

キャピラリー電気泳動を用いて、SSCP を行う際に最も重要な一塩基多型検出のためのポリマー溶液を種々検討し、数種のポリマーが一塩基多型を検出する際の感度が高いことを見出した。また、キャピラリーアレイ電気泳動による DNA シークエンシングの精度を高めるためにシークエンシング条件の検討を行った。その

結果、電場のグラジエントが効果的であることを明らかにした。

MTHFR 遺伝子の変異型である Val 型の遺伝子頻度は健常者群では 0.36、患者群では 0.39 であった。しかし、患者群では Val 型のホモ接合体は、糖尿病を合併すると明らかに虚血性心疾患の罹患危険率が高くなり、糖尿病の治療不良な患者ほど、虚血性心疾患の発症率の高まることが示された。FABP2 遺伝子では、日本人集団にも Ala54Thr の遺伝子型多型が観察された。患者群における遺伝子型頻度は Ala54 型は 0.65, Thr54 型が 0.35 で、健常者群に比べ有意差はなかった。しかし、高中性脂肪を伴った患者では変異型遺伝子頻度が有意に高かった。CD14 受容体遺伝子の 5' 側のプロモーター領域の遺伝子変異については、遺伝子型と発症との相関は観察されなかった。

AT2 受容体遺伝子発現調節領域に IRF 結合領域が存在し、IRF-1 (Interferon Regulatory Factor-1) は AT2 受容体遺伝子転写活性化因子、IRF-2 (Interferon Regulatory Factor-2) は拮抗的に働く転写抑制因子として働くことを明らかにした。AT2 受容体遺伝子欠損マウスに圧負荷心肥大モデルを作成し、AT2 受容体遺伝子欠損マウスでは冠動脈の肥厚、周囲の線維化が亢進されていることを観察した。

D. 考察

起立性の血圧変化は、健常一般住民を対象とした場合でも、約 30 %に

認められ、比較的頻度が多いと考えられる。また、重度の起立性血圧変化が認められた場合は、その背景に動脈硬化の存在を疑う必要があると考えられる。動脈硬化に伴って圧受容器反射機能障害がおこり、起立時の血圧低下や、逆に交感神経の過剰刺激に対する干渉作用が減弱していることなどがその機序として推察されるが、詳細は不明である。今後、遺伝子解析の結果も加え、総合的に危険因子を探索して行く予定である。

キャピラリー電気泳動およびキャピラリーアレイ電気泳動を用いた SNP 解析は、ほぼ確立しつつあるが、今後、これらの技術については、さらに精度を向上させることが、重要である。マイクロチップによる DNA の解析は、まだ予備的な結果のみしか得ていないが、従来法に比べて百倍以上の高速化を達成している。

従来、動脈効果、糖尿病、肥満、虚血性心疾患などの様々な生活習慣病の発症危険因子は、人種間で異なり、白人では危険因子となる遺伝子型が、日本人では相関しないことがしばしば観察される。このことは、これらの病態の発症には遺伝性素因よりも生活習慣のほうがより大きく関与することが予想される。

AT2 受容体は血管障害、心筋梗塞、心肥大、心不全等の病的状態において高発現し、これら病態の発症、心血管リモデリングに関与していることが示唆されているが、その発現調節に関しては不明である。研究結果

は、現在まで不明であったサイトカインとレニン-アンジオテンシン系のクロストークの解明に貢献するものと期待される。

E. 結論

降圧薬などの服用のない 50 歳以上の健常者を対象として起立に伴う血圧変化を調べた。前値の 10 % 以上の変化を変動異常とすると、1 分後の判定では約 13 % が起立性低血圧、約 20 % が起立性高血圧を示した。3 分後の判定では、それぞれ約 15 %、17 % であった。65 歳以上の老年者においては、起立後の最大血圧変化と頸動脈硬化度に相関が認められた。

SNP 解析のための新しいシステムの開発は、順調に進行しており、来年度中には、キャピラリー電気泳動およびキャピラリーアレイ電気泳動を用いた方法の確立を目指す予定である。また、マイクロチップを用いた DNA 解析技術開発は、予備的なデータでは、大幅な高速化が達成できることが明らかになった。さらに、今後は、マイクロチップを用いた遺伝子多型解析の超高速化を目指して、解析条件の最適化とマイクロチップ設計の最適化に関する研究を進める必要がある。

虚血性心疾患の発症危険因子として 3 つの候補遺伝子の変異遺伝子型について、患者群と健常者群との間で比較した。その結果、両群間での遺伝子頻度、遺伝子型分布に有意差は観察されなかった。しかし、詳細

な検討の結果、MTHFR 遺伝子の変異型である Val 型の保因者が糖尿病を合併すると、健常者に比べて約 3 倍、虚血性疾患が誘発されること等が明らかとなった。

心血管病変における AT2 受容体の特異的発現が心血管病変の発症、リモデリングに重要であり、AT2 受容体の発現にサイトカインが密接に関係している。今後この結果を元に研究を進めていく。

今後、老年病の表現系の評価法、SNP の探索法とタイピング法、責任遺伝子の同定法、さらに、遺伝子変異と遺伝子機能との関係を調べる方法を再発して行く予定である。

起立性血圧変化異常の頻度と動脈硬化との関連性についての研究

三木哲郎（愛媛大学医学部老年医学教授）

降圧薬などの服用のない50歳以上の健常者を対象として起立に伴う血圧変化を調べた。前値の10%以上の変化を変動異常とすると、1分後の判定では約13%が起立性低血圧、約20%が起立性高血圧を示した。3分後の判定では、それぞれ約15%、17%であった。65歳以上の老年人においては、起立後の最大血圧変化と頸動脈硬化度に相関が認められた。

A. 研究目的

体位変化に伴う血圧変化は、起立性低血圧がよく知られているが、血圧が上昇する起立性高血圧も存在する。起立性低血圧は、ふらつきや転倒の原因となり老年人では特に注意が必要である。起立性高血圧は、無症候性脳血管障害や認知機能障害との関連性が報告されており、冠動脈疾患のリスクとなる可能性も報告されている。本研究では、一般住民における、起立性の血圧調節障害の頻度を検討すると共に、動脈硬化との関連性につき検討した。

B. 研究方式

愛媛県A村在住の50歳以上の健常住民を対象とした。降圧薬等の服薬のない205例を対象として、立位に伴う血圧変化を測定した。血圧は、安静臥位において5分以上の間隔をあけて右上腕において2回測定し、その平均を前値とした。起立後、1分と3分に立位の状態で血圧を測定した。血圧測定は、オムロン社製の自動血圧計、HEM-705CPにより測定した。

安静臥床時に頸動脈エコーを行い、頸動脈硬化を評価した。7.5MHzのプロープ

を用いて右の総頸動脈内膜中膜厚を3方向から計測し、その平均値をもとめた。65歳以上の症例において、起立性血圧変化と頸動脈エコーから得られたIMTとの関係を検討した。

C. 研究結果

50歳以上の205例において、前値、1分後、3分後の血圧を全て測定できた。起立1分後の収縮期血圧変化は $+1.6 \pm 10.8$ mmHg、3分後の変化は $+1.0 \pm 10.1$ mmHgであった。立位に伴い前値の10%以上の血圧変動を示す場合を異常と定義すると、1分後の判定では、約13%が起立性低血圧、約20%が起立性高血圧と判定された。3分後の判定では、それぞれ15%と17%であった。起立1分後に血圧低下および血圧上昇を認めたものは、3分後に有意に前値に戻る変化を示した（図1）。1分後の血圧変化は正常であったが、3分後に起立性低血圧、高血圧を示したものがそれぞれ、9%、11%存在した。1分後と3分後の血圧変化度の間には、 $r=0.77$ の有意な正相関が存在したが、回帰直線の傾きは、0.7であり、1分後の血圧変化よりも3分後の血圧変化がより小さいと考

えられた。1分後と3分後を合わせたの最大血圧変化は、 $+2.3 \pm 16.3$ mmHgであり、その最低値は -43.5 mmHgであり、最大値は $+54$ mmHgであった。立ちくらみやふらつきを訴えた者はいなかった。

起立後の最大血圧変化と頸動脈硬化との間には、65歳以上の老年者(n=154)において、J型の関係が認められた(図2)。すなわち、起立に伴い、血圧が低下する場合のみならず、血圧が上昇する場合頸動脈硬化と関連する。

D. 考察

起立性の血圧変化は、健常一般住民を対象とした場合でも、約30%に認められ、比較的頻度が多いと考えられる。その評価は1分後の血圧測定で、変化が捕まえられる場合は、1回の測定で充分であるが、1分後には血圧変化が認められていない場合でも、3分後に血圧変動をきたす者が、約20%存在することから、1分のみならず3分後にも血圧測定をするべきであると考えられる。また、重度の起立性血圧変化が認められた場合は、その背景に動脈硬化の存在を疑う必要があると考えられる。

動脈硬化に伴って圧受容器反射機能障害がおこり、起立時の血圧低下や、逆に交感神経の過剰刺激に対する干渉作用が減弱していることなどがその機序として推察されるが、詳細は不明である。

E. 結論

一般健常住民においても、起立にともなう血圧調節異常、起立性低血圧、起立

性高血圧の頻度は、比較的多い。老年者においては、起立性の血圧変動は動脈硬化の一症状である可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Jiang YN, Kohara K, et al. Low Wall Shear Stress in Carotid Arteries in Subjects with Left Ventricular Hypertrophy. *Am J Hypertens* (in press)
- ② Uemura K, Kohara K, Nakura J, Miki T. Deletion Polymorphism of ACE gene is Associated with Higher Blood Pressure after Hospitalization in Normotensive Subjects. *Hypertens Res* (in press)
- ③ Kohara K, et al. Effect of reflection of arterial pressure wave on carotid circulation in essential hypertension. *Am J Hypertens* 12:1015-1020, 1999.
- ④ Kohara K, et al. Contribution of reflection of pressure wave on central systolic pressure in elderly hypertensive patients. *J Am Geriatr Soc* 47:499, 1999.
- ⑤ Kohara K, et al. Postprandial hypotension is associated with asymptomatic cerebrovascular damage in essential hypertensive patients. *Hypertension* 33:565-568; 1999.

2. 学会発表

- ⑥ Tomita H, Kohara K, et al.

Reflection of pressure wave: its relevance to the conduction time of pressure wave. 第14回 American Society of Hypertension, 1999.

- ⑦ Kohara K, et al. Augmentation of central blood pressure by reflection: effect of age. 第14回 American Society of Hypertension, 1999.
- ⑧ Jiang YN, Kohara K, et al. Carotid wall shear stress in patients with left ventricular hypertrophy. 第14回 American Society of Hypertension, 1999.

G. 知的所有権の取得状況
該当せず

図 1

起立1分後の血圧低下例の
その後の収縮期血圧変化

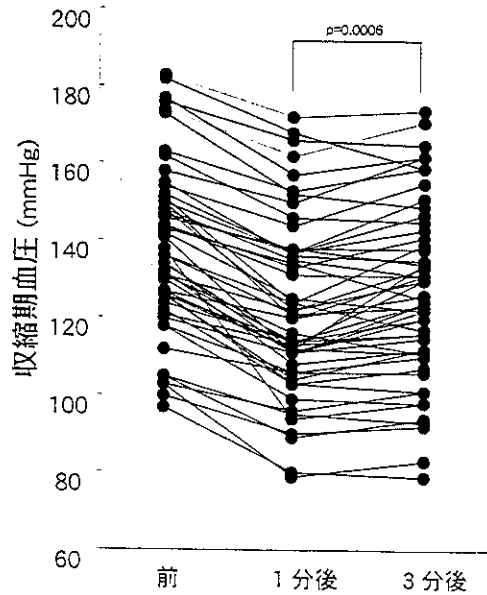
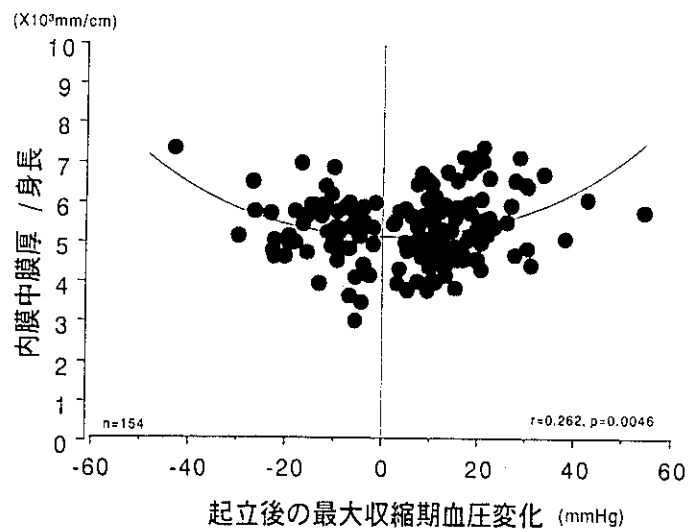


図 2



虚血性心疾患の発症危険因子としての候補遺伝子の遺伝子多型の研究

近藤 郁子 (愛媛大学医学部教授)

虚血性心疾患は動脈硬化症をはじめとする肥満、糖尿病、高血圧などの生活習慣病の発症危険因子を背景に、中高年者に時には致命的な予後をもたらす多因子性疾患である。今回、5,10-methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子の Val 型のホモ接合体は、糖尿病を合併すると明らかに虚血性心疾患の罹患危険率が高くなり、糖尿病の治療不良な患者ほど、虚血性心疾患の発症率の高まることを明らかにした。また、小腸脂肪酸結合蛋白質の変異型ホモ接合体は、野生型ホモ接合体に比べて有意に血中の中性脂肪値が高値であることなどを明らかにした。

A. 研究目的

虚血性心疾患は個人の若い頃からの生活習慣と遺伝性素因の絡み合いによって発症する多因子性疾患である。健康な老後の生活、自立した老後の生活には、精神的、知的機能の維持と共に、身体の運動機能の維持は極めて重要である。脳卒中と共に心筋梗塞は個人の身体活動の制限をもたらす、生活の質を低下させるのみならず、生活の維持のために家族その他の周囲の人々への依存をもたらすことから、本疾患の発症予防は重要な緊急課題である。我々は狭心症発作を来し、心筋梗塞を伴った虚血性心疾患患者における発症要因を明らかにする事を目的に、心血管の形成、機能に関わる遺伝子の変異が虚血性心疾患の発症危険因子となるとの仮説のもとに、候補遺伝子の遺伝子変異の検出方法を確立し、変異遺伝子型の分布、遺伝子頻度を患者と健康対照者の間において検討した。

B. 研究方法

中国地方の国立病院の心臓血管外科において、心臓カテーテル検査を受け、冠状動脈の狭窄と、心筋の壊死と伴い心筋梗塞と診断され、バイパス手術の適応となった患者に、虚血性心疾患の遺伝的な発症危険因子を明らかにすることを目的に遺伝子解析を行う研究について、研究目的、研究方法、予想される結果とその意義、研究中に受ける可能性のある不利益について十分に口頭と書面で説明し、書面で研究参加の同意を得た患者 390 名を研究参加者とした。本研究はヘルシンキ宣言にのっとった臨床医学研究として実験計画を立案し、病院長による医学倫理問題についての審議を経て、研究許可を得て行った。

患者の定期検診時に、血中脂質などの血液生化学検査の採血と同時に、末梢血を 10ml 採血し、ゲノム DNA を抽出した。遺伝子型の同定は既に報告されている遺伝子変異については、文献を参考に、polymerase chain reaction (PCR) 法で、遺伝子解析部分を増幅し、制限酵素で切

断点の後、アガロースゲル電気泳動法で分離し、遺伝子産物の長さを基に遺伝子型を同定した。

C. 研究結果

1) 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子型と虚血性心疾患患者MTHFRの遺伝子型分布と遺伝子頻度は134名の健常者と322名の虚血性心疾患患者集団で有意の差は認められなかった。変異型であるVal型の遺伝子頻度は健常者集団では0.36、患者集団では0.39であった。しかし、患者集団ではVal型のホモ接合体は、糖尿病を合併すると明らかに虚血性心疾患の罹患危険率が高くなり、糖尿病の治療不良な患者ほど、虚血性心疾患の発症率の高まることが示された。Val型のホモ接合体の虚血性心疾患患者の頻度は健常者の約2.47倍で有意に高かった ($p < 0.03$)。また、糖尿病の治療不良の虚血性心疾患患者 (HbA1cが6.9%以上) におけるVal型の遺伝子頻度は良好な治療状態に有る患者に比べて9.6倍高かった ($P < 0.002$)。

2) 小腸脂肪酸結合蛋白質 (fatty acid-binding protein 2: FABP2) の遺伝子型と虚血性心疾患

日本人集団にもAla54Thrの遺伝子型多型が観察された。健常者における遺伝子頻度はAla54型は0.67、Thr54型が0.32であった。虚血性心疾患患者262人における遺伝子型頻度はAla54型は0.65、Thr54型が0.35で、健常者集団と全く同じであった。しかし、患者群を高脂血症の合併有無を検討した結果、高中性脂肪

値を伴った患者では変異型遺伝子頻度が有意に高く、Ala54型ホモ接合体患者における平均中性脂肪酸は 129.25 ± 77.49 mg/dl であったが、Thr54型ホモ接合体患者におけるそれは 169.50 ± 71.23 mg/dl で有意に高かった ($\chi^2 = 2.269$, $df = 101$, $P = 0.025$)。

3) CD14 受容体の遺伝子型と虚血性心疾患

血管内皮細胞の損傷修復に働くことが示唆されているマクロファージ系細胞の産生するCD14の内皮細胞受容体には、5'側のプロモーター領域の遺伝子変異が存在し、遺伝子型によって血中CD14濃度の異なることが報告されている。そこで、遺伝子変異と虚血性心疾患発症との相関を検討した結果、白人では変異型遺伝子は虚血性心疾患の危険因子と報告されている遺伝子型が日本人健常者集団で有意に高値であったが、日本人では遺伝子型と発症との相関は観察されなかった。

D. 考察

従来、白人集団で発症危険因子として報告される遺伝子変異は、しばしば日本人の虚血性心疾患の発症危険因子とはならないことが報告されている。我々の研究でも、様々な候補遺伝子との相関研究を行って来たが、白人集団での虚血性心疾患の発症危険因子となる候補遺伝子は、日本人集団では相関のみられないことが多い。今回検討したMTHFR遺伝子のVal型保因者は、白人集団では血中ホモシステイン濃度が高値となり、血中の葉酸とVitB12濃度の低下を伴う時に、虚血性心疾患の重要な危険因子となることが明らか

にされている。我々の患者群でも葉酸濃度別の MTHFR の遺伝子型分布が異なる事が示唆されている。しかし、糖尿病を持つ虚血性心疾患患者群では MTHFR の Val 型遺伝子頻度が有意に高く、糖尿病の治療効果の不良な者に Val 型の遺伝子頻度の高い事が明らかとなった。MTHFR の Val 型遺伝子のホモ接合体ではホモシステイン値が高値であることから、糖尿病患者における高血糖状態は、ホモシステイン濃度の高値と絡み合って、血管障害を増強する可能性が示唆された。

小腸脂肪酸結合蛋白質は、食物中の脂肪酸の吸収に働く蛋白質である。この遺伝子の機能の亢進は血中脂肪酸の増加を来し、血中中性脂肪濃度を高める事が示されている。血清コレステロール血の亢進は虚血性心疾患の危険因子であるが、中性脂肪値の亢進も独立した危険因子として再認識されつつある。我々の患者群でも FABP2 遺伝子の Thr54 型のホモ接合体では明らかに高い中性脂肪値を示したことから、FABP2 の遺伝子変異は虚血性心疾患の発症危険因子となる事が示唆された。

一方、血管内皮細胞の損傷修復に働くことが示唆される CD14 の内皮細胞受容体の遺伝子型と虚血性心疾患発症との間には相関は観察されなかった。ドイツ人とオランダ人においては危険因子となる報告がみられることから、日本人の生活習慣の欧米化によっては、本遺伝子変異が将来発症危険因子となる可能性が示唆され、今後の追跡が大切であろう。

従来、動脈効果、糖尿病、肥満、虚血性心疾患などの様々な生活習慣病の発症

危険因子は、人種間で異なり、白人では危険因子となる遺伝子型が、日本人では相関しないことがしばしば観察される。このことは、これらの病態の発症には遺伝性素因よりも生活習慣のほうがより大きく関与することが予想される。しかし、日本人の急速な生活習慣の変化によって、白人における遺伝子素因が日本人もの同じ効果をもたらす場合には、CD14 受容体遺伝子のように日本人での変異遺伝子頻度が白人より高い遺伝子もみられることから、虚血性心疾患の危険因子として無視できない。今後、さらに多くの発症危険因子となる候補遺伝子における新しい遺伝子変異の同定、新しい候補遺伝子の同定を行い、さらに多くの危険因子を明らかにすることによって、生活習慣病の発症を予防が可能になれば、自立した健康な老後の生活を確保されるであろう。

E. 結論

虚血性心疾患の発症危険因子として 3 つの候補遺伝子の変異遺伝子型と 262 名の患者群と 160 人の健常者との間で比較した。その結果、両群間での遺伝子頻度、遺伝子型分布に有意差は観察されなかった。しかし、詳細な検討の結果、MTHFR 遺伝子の変異型である Val 型の保因者が糖尿病を合併すると、健常者に比べて約 3 倍、虚血性疾患が誘発されることが明らかとなった。さらに、糖尿病の治療状態の不良な程、Val 型のホモ接合体の患者は虚血性心疾患と伴うことが明らかとなった。また、FABP2 遺伝子の変異は血中中性脂肪酸の値をコントロールすることが示され、FABP2 遺伝子も虚血性心疾患の誘

発危険因子となることが示唆された。

F. 研究発表

1) Mizugishi K, Kuwajima K, Obata K., and Kondo I. An AciI polymorphis in the 3'untranslated region of the hyman phosphomannomutase2 (PMM2) gene. J Hum Genet 1999, 44:266-26.

2) Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Bagun L, Lee JR, Yasuda T, Ikeda S, Hirano R, Terazono H, Crackower MA, Kondo I., et al. The gene mutations in adult-onset type II chitruillinemia encodes a putative carrier protein., Nat Genet 1999, 22:159-163.

3) Mizushima K., Watanabe M, Kondo I., et. al. Analysis of spinocerebellarataxia type 2 gene abd haplotype analysis: (CGG)1-2 polymorphisms and contributiin to founder effect. J Med Genet 1999. 36: 112-114.

4) Obata K, Matsuishi T, Yamashita Y, Fukuda T, Kuwajima K, Horiuchi I, Nagamitsu S, Iwanaga R, Kimura A, Omori I, Endo S, Mori K, and Kondo I. Mutation analysis of the methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) in patients with Rett syndrome. J Med Genet (in press).

2. 学会発表

1) 近藤郁子, その他 虚血性心疾患の危険因子としての MTHFR(5,10-Methylentetrahydrofolate reductas)遺

伝子変異の役割 第6回日本遺伝子診療学会 (平成11年7月)

2) 近藤郁子, その他 虚血性心疾患患者における小腸脂肪酸結合蛋白質2 (FABP2)遺伝子の Ala54Thr 多型と中性脂肪値 第49回日本人類遺伝学会(平成11年11月)

3) 吉村脩, 山縣英久, 近藤郁子 心筋梗塞と遺伝子型多型に関する研究(3報) CD14 受容体遺伝子多型 第70回日本衛生学会 (平成12年3月)

4) 近藤郁子, その他 パーキンソン病と CYO2A6 遺伝子型の相関 第70回日本衛生学会 (平成12年3月)

候補遺伝子機能の解析

堀内正嗣 (愛媛大学医学部教授)

疾患遺伝子の転写制御領域、翻訳領域、イントロン領域、その他の非翻訳領域の遺伝子多型(変異)が候補疾患遺伝子の発現、機能変化に与える影響及びその病態生理学的意義に与える影響を検討する。具体的には、血圧調節、血管発生、分化、老化、リモデリングに密接に関与するアンジオテンシン II タイプ 2 受容体 (AT2 受容体) に焦点を当て、この遺伝子の発現調節機構、病態生理機能解析を遺伝子改変モデル等を利用して行いながら SNP を探す目的の研究も同時に進める。

A. 研究目的

心血管系は胎生期にいち早く分化し、循環を確保して他臓器の形成を促し、個体発生で中心的な役割を担っている。また、変化する血行力学的な負荷に対して、心血管系は肥大や形質転換を行って適応し、その破綻によって心不全や動脈硬化の病態を形成するところとなる。従って心血管系の発生、分化と負荷に対する適応のメカニズムを分子、遺伝子レベルから解明することは病態解明の鍵となると共に、新しい治療法の開発、心血管老化への対応にも必須の課題である。血管壁においては血管平滑筋細胞、血管内皮細胞等が多細胞系として相互に作用しながら形質変換と増殖を来して分化、循環動態の変化に適応している。ところで、アンジオテンシン II は強力な昇圧物質であるだけでなく、生体内で幅広く作用し、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞等の増殖、肥大、分化等細胞の重要な

機能に深く関わっていることが知られて

いる。堀内等が新しくクローン化したアンジオテンシン II タイプ 2 受容体 (AT2 受容体) が胎児期に広範囲、高レベルに発現され、生後、その発現量は急激に減少するが、心筋梗塞、血管傷害等の各種病的状態において発現増加することが最近、明らかになってきた。これに伴い、AT2 受容体の分化、発生並びに病態生理学的な役割が脚光を浴びてきている。更に AT2 受容体は、従来よりその作用がよく知られているアンジオテンシン II タイプ 1 受容体 (AT1 受容体)、増殖因子と拮抗して働くことを明らかにしてきたが、その分子作用機構については不明であり、その解明が待たれている。

血管壁においては AT2 受容体は、血管発生初期に発現開始、後期にピークを示し、生後その発現は急激に減少、血管傷害等、血管病変に伴い、特異的に再発現

する。一方、AT1 受容体は比較的、一定して発現している。これらの結果は、AT2 受容体発現が血管形成の重要な時期にダイナミックに調節され、血管分化、血管形成、血管傷害後のリモデリングに密接に関与していることを示唆している。本研究ではAT2 受容体遺伝子欠損マウスを用い、血管形成、分化、血管障害後リモデリング時におけるアンジオテンシン II の生理作用を分子、細胞、生体レベルで解明すると共に、AT2 受容体にて調節される血管分化関連因子の同定、クローニング、AT2 受容体発現を調節し血管分化を規定している転写調節因子の同定、クローニングを行い、それらの血管分化、形成、血管平滑筋及び血管内皮細胞に与える生理作用を検討する。最終的にはこれら遺伝子を改変したモデル動物を作成することにより血管分化に関連していると推測される、これら遺伝子の生理機能を検討することを目的とする。同時にAT2 受容体遺伝子のSNP を探す目的の研究も同時に進める。

B. 研究方法

野生型、AT2 受容体遺伝子欠損マウス（胎生期 12, 14, 18, 21 日、生後 1, 3, 7, 14, 28 日、3, 6, 12 ヶ月）大動脈、腸間膜動脈を調整し、AT1 受容体、AT2 受容体、血管平滑筋分化マーカー、細胞外基質発現の経時的変化、特異的発現部位を検討。更に、血管のDNA合成能測定、アポトーシスを起こしている細胞の検

出を行う。次に、胎児期AT2 受容体欠損が与える血管径、血管断面積、血管平滑筋容量等の血管の形態的变化への影響を検討する。加えて血管傷害モデルを用い、AT2 受容体の血管リモデリングにおける病態生理学的意義を件討する。加齢による変化も同時に検討していく。

次に、AT2 受容体発現を調節する転写調節因子の同定、クローニング、生理機能解析を行う予定である。胎児期血管分化早期に発現、生後その発現が急激に低下する胎児型AT2 受容体発現を規定する転写調節因子を同定することはAT2 受容体のみでなく、血管分化、形成、老化を調節する他の遺伝子を検索する上にも有用である。胎児期、生後の各時期より血管平滑筋細胞を調整し、AT2 受容体プロモーター領域を種々の長さにカットしたものをルシフェラーゼ発現ベクターに結合したプラスミドを、発現させることによりAT2 受容体の発現を規定する領域を検索、更にDNase フットプリントにより特定する。未知のDNA結合領域が検出されれば、Yeast One-Hybrid 法等を用い、新規転写調節因子をクローニングする。これらの転写調節因子のAT2 受容体発現、血管分化、形成、老化、更には血管リモデリングにおける生理的役割を遺伝子の改変マウスモデルを作成することにより検討していく予定である。

AT2 受容体の血管形成、分化、血管リモデリング、老化における生理学的重要性を確認した後、野生型マウス胎児、遺

伝子欠損マウス胎児大動脈より調整した血管平滑筋細胞、血管内皮細胞を用い、Differential Display 法を行い、血管分化調節遺伝子の同定、クローニングを行う。次に、得られた遺伝子の血管分化、形成さらには血管リモデリングにおける生理的作用を、これらの遺伝子の改変マウスモデルを作成することにより検討していく予定である。AT2 受容体のプロモーターを使用することにより、標的遺伝子の発現を血管分化、形成、リモデリング、血管新生に合わせ時間的、空間的に調整するコンディショナルモデルも可能であると考え、現在その可能性を検討している。

(倫理面への配慮) 愛媛大学医学部動物管理委員会の指針に沿い、動物愛護の倫理に反さないよう最大限の配慮を行う。

C. 研究結果

マウス培養線維芽細胞 R3T3、ラット培養平滑筋細胞を用いて、AT2 受容体発現にインターフェロン (IFN-)、TNF (Tissue Necrosis Factor) 等のサイトカインによって産生される転写調節因子 Interferon Regulatory Factor-1 ((IRF-1) が深く関与している事を報告した。即ち、AT2 受容体遺伝子発現調節領域に IRF 結合領域が存在し、IRF-1 は AT2 受容体遺伝子転写活性化因子、IRF-2 は拮抗的に働く転写抑制因子として働くことを明らかにした。IRF-1、IRF-2 は

サイトカインによって産生が調節されており、細胞増殖、分化に関与している事が知られているが、我々は、血清除去による AT2 受容体発現増強、アポトーシス誘導に IRF-1 が調節因子として働いている事を示した。虚血、炎症、血管傷害などに伴うサイトカイン産生増加、IRF-1 産生により AT2 受容体が発現増加され、血管平滑筋細胞に増殖抑制、肥大抑制、アポトーシス促進、細胞外基質産生阻害などのシグナルが加わることになり血管リモデリングが引き起こされるという仮説を証明するため、AT2 受容体遺伝子欠損マウス、野生型マウス大腿動脈にポリエチレンチューブをカフとして巻き付けることにより内膜肥厚が得られる血管傷害モデルを作成し、この血管傷害モデルで、IFN-、TNF を始め、種々のサイトカインが産生され、IRF-1 の発現増加、続いて野生型マウスでは AT2 受容体の特異的に上昇していること、AT2 受容体遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ、内膜肥厚が増強されていることを確認した。我々は更に、AT2 受容体遺伝子欠損マウスに圧負荷心肥大モデルを作成し、AT2 受容体遺伝子欠損マウスでは冠動脈の肥厚、周囲の線維化が亢進されていることを観察した(投稿中)。

D. 考察

AT2 受容体は、従来よりその作用がよく知られている AT1 受容体と拮抗して働

くことが次第に明らかになるにつれ、AT1 受容体、AT2 受容体の心血管病変における発現バランスが心血管病変の発症、リモデリングに重要であると考えられるようになってきた。AT2 受容体は、通常その発現が心血管系を構成する細胞においては、AT1 受容体に比べて低く、アンジオテンシン II の刺激は AT1 受容体に主として働き、細胞は増殖促進、肥大促進、アポトーシス抑制、細胞外基質産生促進の方向に働く。虚血、炎症、血管傷害、増殖因子の除去などに伴い AT2 受容体が発現され、細胞は増殖抑制、肥大抑制、アポトーシス促進、細胞外基質産生阻害のシグナルが加わることで心臓リモデリングが引き起こされる。上記の我々の研究結果は、AT2 受容体の心臓リモデリングにおける重要性を裏付けるものである。ところで、AT2 受容体は血管障害、心筋梗塞、心肥大、心不全等の病的状態において高発現し、これら病態の発症、心臓リモデリングに関与していることが示唆されているが、その発現調節に関しては不明である。心血管疾患の病態発生、心臓リモデリングにサイトカインが重要な役割を担っていることは従来より知られていたが、その病態生理学的役割、特にレニン-アンジオテンシン系との相互作用については殆ど知られていなかった。我々の研究結果は、現在まで不明であったサイトカインとレニン-アンジオテンシン系のクロストークの解明に貢献する

ものと期待される。

E. 結論

心血管病変における AT2 受容体の特異的発現が心血管病変の発症、リモデリングに重要であり、AT2 受容体の発現にサイトカインが密接に関係している。今後この結果を元に、研究目的に記載したように研究を進めていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著

- ① Cui, T.X., Iwai, M., Hamai, M., Minokoshi, Y., Shimazu, T. and Horiuchi, M.: Aggravation of chemically-induced injury in perfused rat liver by extracellular ATP. *Life Sci.*, (in press)
- ② Akishita, M., Horiuchi, M., Yamada, H., Zhang, L., Shirakami, G., Tamura, K., Ouchi, Y. and Dzau, V.J.: Inflammation influences vascular remodeling through AT2 receptor expression and signaling. *Physiol. Genomics.*, 2, 13-30, 2000
- ③ Horiuchi, M., Hayashida, W., Akishita, M., Yamada, S., Lehtonen, J.Y.A., Tamura, K., Daviet, L., Y.E. Chen., Hamai, M., Cui, T.X., Iwai, M. and Minokoshi, Y.: Interferon- Induced AT2 Receptor Expression in Fibroblasts by Jak/STAT Pathway and Interferon Regulatory Factor-1. *Circ. Res.*, 86, 233-240, 2000
- ④ Akishita, M., Yamada, H., Dzau, V.J. and Horiuchi, M.: Increased vasoconstrictor response of the mouse lacking angiotensin II type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 345-349, 1999
- ⑤ Haque, MS., Minokoshi, Y., Hamai, M.,

- Iwai, M., Horiuchi, M. and Shimazu, T.: Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes*, 48, 1706-1712, 1999
- ⑥ Lehtonen, J.Y.A., Daviet, L., Nahmias, C., Horiuchi, M. and Dzau, V.J.: Analysis of functional domains of angiotensin II type 2 receptor involved in apoptosis. *Mol. Endocrinol.*, 13, 1051-1060, 1999
- ⑦ Yamada, H., Akishita, M., Ito, M., Tamura, K., Daviet, L., Lehtonen, J.Y.A., Dzau, V.J. and Horiuchi, M.: AT2 receptor and vascular smooth muscle cell differentiation in vascular development. *Hypertension*, 33, 1414-1419, 1999
- ⑧ Daviet, L., Lehtonen, J.Y.A., Tamura, K., Horiuchi, M. and Dzau, V.J.: Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J. Biol. Chem.*, 274, 17058-17062, 1999
- ⑨ Lehtonen, J.Y.A., Horiuchi, M., Daviet, L., Akishita, M. and Dzau, V.J.: Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 274, 16901-16906, 1999
- ⑩ Tomita, S., Tomita, N., Yamada, T., Zhang, L., Kaneda, Y., Morishita, R., Ogiwara, T., Dzau, V.J. and Horiuchi, M.: Transcription factor decoy to study the molecular mechanism of negative regulation of renin gene expression in the liver in vivo. *Circ. Res.*, 84, 1059-1066, 1999
- ⑪ Horiuchi, M., Hayashida, W., Akishita, M., Tamura, K., Daviet, L., Lehtonen, J.Y.A. and Dzau, V.J.: Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulate STAT activation by negative cross talk. *Circ. Res.*, 84, 876-882, 1999
- ⑫ Tamura, K., Yokoyama, N., Sumida, Y., Fujita, T., Chiba, E., Tamura, N., Kobayashi, S., Murakami, K., Horiuchi, M. and Umemura, S.: Tissue-specific changes of type 1 angiotensin II receptor and angiotensin-converting enzyme mRNA in angiotensin gene-knockout mice. *J. Endocrinol.*, 160(3), 401-408, 1999
- ⑬ Tamura, K., Chiba, E., Yokoyama, N., Sumida, T., Yabana, M., Tamura, N., Takasaki, I., Takagi, N., Ishii, M., Horiuchi, M. and Umemura, S.: Renin-angiotensin system and fibronectin gene expression in Dahl Iwai salt-sensitive and salt-resistant rats. *J. Hypertens.*, 17, 81-89, 1999
- ⑭ Kondo, H., Horiuchi, M., Hama, J., Kurooka, S., Kamoi, Y., Yamamoto, Y., Watanabe, M., Hidaka, H., Katori, R. and Ishikawa, K.: Alpha-1 adrenergic stimulation induced hypertrophy in protein kinase C down-regulated cultured cardiac myocytes. *Clin. Exp. Hypertens.*, 21, 233-247, 1999
- ⑮ Horiuchi, M., Yamada, T., Akishita, M., Ito, M., Tamura, K. and Dzau, V.J.: Interferon regulatory factors regulate interleukin-1 converting enzyme expression and apoptosis in vascular smooth muscle cell. *Hypertension*, 33, 162-166, 1999
- ⑯ Akishita, M., Ito, M., Lehtonen, J.Y.A., Daviet, L., Dzau, V.J. and Horiuchi, M.: Expression of AT2 receptor developmentally programs ERK activity and influences fetal vascular growth. *J. Clin. Invest.*, 103, 63-71, 1999
- 総説
- ① Horiuchi, M., Lehtonen, J.Y.A. and Daviet, L.: Signaling mechanism of AT2 angiotensin II receptor :

cross-talk between AT1 and AT2 receptors in cell growth. Trends in Endocrinology & Metabolism, 10, 391-396, 1999

- ② Horiuchi, M., Hamai, M., Cui, T.X., Iwai, M. and Minokoshi Y.: Cross Talk between Angiotensin II Type 1 and Type 2 Receptors: Cellular Mechanism of Angiotensin Type 2 Receptor-Mediated Cell Growth Inhibition. Hypertens. Res., 22, 67-74, 1999
- ③ Horiuchi, M., Akishita, M. and Dzau, V.J.: Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the acrdiovascular system. Hypertension, 33, 613-621, 1999

2. 学会発表

- ① Horiuchi, M.: The roles of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiovascular development and remodeling. (Angiotensin in normal and abnormal growth of cardiovascular tissue) Experimental Biology 99 (FASEB meeting), 1999 (April), Washington, DC, USA
- ② T.X. Cui., Hamai, M., Daviet, L., Yamada, S., Minokoshi, Y., Akishita, M., Ouchi, Y., Horiuchi, M.,. Protein tyrosine phosphatase, SHP-1, is pivotal for AT2 receptor-mediated cell growth inhibition (第22回日本高血圧学会総会) 1999 (10月)、香川、日本
- ③ 富田奈留也、森下竜一、富田佐和子、金田安史、檜垣実男、荻原俊男、堀内正嗣：おとり型核酸医薬（デコイ）法を用いたレニン遺伝子発現の組織特異性の解明（第22回日本高血圧学会総会）1999（10月）、香川、日本
- ④ 箕越靖彦、Haque MD Shahidul、志内哲也、嶋津孝、堀内正嗣：グルコース利用に及ぼすレプチンとレキシンの調節作用（第20回日本肥満学会）1999（10月）、東京、日本
- ⑤ Haque MD Shahidul, Minokoshi, Y., Shiuchi, T., Shimazu, T., Horiuchi,

M.: Microinjection of orexin into the ventromedial hypothalamus enhances glucose uptake perferentially in skeletal muscles. (第20回日本肥満学会) 1999 (10月)、東京、日本

- ⑥ Tomita, N., Morishita, R., Tomita, S., Dzau, V.J., Horiuchi, M.: In vivo renin gene expression in the liver by transcription factor decoy resulted in blood pressure increase. 503 rd Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Pressure Research, American Heart Association, 1999 (September), Orlando, USA

G. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得
無し
- 2. 実用新案登録
無し
- 3. その他
無し

遺伝子型のタイピング技術の開発

馬場 嘉信 (徳島大学薬学部教授)

多数サンプルの遺伝子多型を同時にかつ高精度・高感度で計測できる超高速遺伝子情報計測システムを構築するために、キャピラリーアレイ電気泳動による SNPs (single nucleotide polymorphisms) 解析を行い、DNA シークエンシングおよび SSCP (single strand conformation polymorphism) による高速 SNPs 解析の技術を確立した。さらに、半導体微細加工技術を応用したマイクロチップ技術による超高速 DNA 解析技術の開発に成功し、DNA 解析を 1 分以内に達成できることを明らかにした。さらに、現在、SNPs 解析への応用を検討中である。

A. 研究目的

愛媛県下の約 3,400 人の遺伝子多型を高速解析するための新しい超高速遺伝子情報計測システムを開発することを目的とする。特に、今回の解析においては、SNPs の検出による老年病・生活習慣病の候補遺伝子多型の解析を目指しており、この目的に適した新しい方法を創出するものである。

B. 研究方法

まず、キャピラリー電気泳動を用いた SSCP による SNPs 解析技術の確立を目指す。SSCP は、最も簡便で確実な SNPs 解析法であるが、ゲル電気泳動を用いているために、速度が遅く、多数の遺伝子多型を解析するには向いていない。ここでは、キャピラリー電気泳動を用いることにより高速化と自動化を達成する。また、キャピラリーアレイ電気泳動を用いた DNA シークエンシングによる SNPs 解析の方法を確立することを目指す。キャピラリーアレイ電気泳動におけるシークエンシングの速度と精度を向上させ、SNPs 解析の高速化・高精度化を目指す。さらに、半導体集積化技術を応用し

て、マイクロチップ上にマイクロチャンネルを多数作製し、このマイクロチャンネルを用いた SSCP および DNA シークエンシングによる SNPs 解析を行う。マイクロチップを用いることにより、従来の方法の数百倍の高速化を達成することが可能であり、多数の遺伝子多型解析の新規標準方法の創出を目指すものである。

C. 研究結果

キャピラリー電気泳動を用いて、SSCP を行う際に最も重要な一塩基多型検出のためのポリマー溶液を種々検討し、数種のポリマーが一塩基多型を検出する際の感度が高いことを見出した。さらに、SSCP 多型解析のための条件を最適化することにより、約 10 分間で SNPs の検出が可能であることを明らかにした。

キャピラリーアレイ電気泳動による DNA シークエンシングの精度を高めるためにシークエンシング条件の検討を行った。その結果、電場のグラジエントが効果的であることを明らかにした。この条件によって、高い精度で SNPs を決定できることを明らか

かにした。

半導体集積化技術である、光リソグラフィ—化学エッチングおよびシンクロトロン放射光によるドライエッチングにより、ガラスおよびプラスチックチップ上にマイクロチャンネルを作製した。マイクロチャンネルの大きさは、巾が10~50 μm 程度、深さが2~100 μm 程度のものを作製した。

このマイクロチャンネル中でのDNAの電気泳動挙動を詳細に調べるためのイメージングシステムをレーザー共焦点顕微鏡と超高感度カメラを組み合わせで開発した。このイメージングシステムを用いて、DNA解析に必要なマイクロチャンネルの長さを検討したところ、あるDNAサンプルにおいては、わずか3 mmの長さがあればDNA解析にとって十分であり、その場合にはわずか数秒で解析が終了することを明らかにした。さらに、SSCPによるSNPs解析を行うための条件を検討し、予備的ながら、2分以内にSNPs解析が可能であることが示唆された。

これらの研究成果は、国内外の学会において高く評価され、この研究課題を実施した1年間(1999年4月~2000年3月)に国際学会等での招待講演が14回、国内の学会等での招待講演が25回を数えた。また、これらの研究成果は、社会的にも注目を集めこの1年間に新聞紙上において4度(読売新聞、日本経済新聞、日本工業新聞、徳島新聞)報道された。

D. 考察

キャピラリー電気泳動およびキャピラリーアレイ電気泳動を用いたSNPs解析は、ほぼ確立しつつあるが、今後、これらの技術

については、さらに精度を向上させることが、重要である。そのためには、さらなる解析条件の精査を行うことが必要である。

マイクロチップによるDNAの解析は、まだ予備的な結果のみしか得ていないが、従来法に比べて百倍以上の高速化を達成している。しかし、マイクロチップについては、まだ、検討しなければならない条件が多数あり、SNPs解析の条件確立のための研究をさらに進める必要がある。さらに、条件検討等の基礎研究以外に、装置の実用化のための開発を進める必要がある。

E. 結論

老年病・生活習慣病の候補遺伝子多型解析のための新しいシステムの開発は、順調に進行しており、来年度中には、キャピラリー電気泳動およびキャピラリーアレイ電気泳動を用いた方法の確立を目指す。また、マイクロチップを用いたDNA解析技術開発は、予備的なデータでは、大幅な高速化が達成できることが明らかになった。さらに、今後は、マイクロチップを用いた遺伝子多型解析の超高速化を目指して、解析条件の最適化とマイクロチップ設計の最適化に関する研究を進める必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 喜羽百合子、馬場嘉信: キャピラリー電気泳動法によるトリプレットリピートDNAの泳動挙動及び高次構造の解析, 分析化学, 1999, 48(2), 193-203.
- 2) C. Sumita, M. Tsubako, and Y. Baba: Simultaneous Analysis of PCR Products by Capillary Electrophoresis with a Laser-Induced Fluorescence Detector Using