

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

肥満、糖尿病、胆石症の新しい関連遺伝子、コレシ

ストキニン-A 受容体遺伝子

(H10-長寿-004)

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮坂京子

平成13(2001)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
肥満、糖尿病、胆石症の新しい関連遺伝子	-----1
コレシストキニン-A 受容体遺伝子	
宮坂 京子	
(研究協力者一覧)	
II. 分担研究報告	
1. Cholecystokinin (CCK)-A 受容体遺伝子発現異常の疫学調査-----7	
船越 顕博	
2. ヒトにおける加齢と CCK-A 受容体遺伝子多型に関する研究-----8	
上垣 佐登子	
3. 生活習慣病における Cholecystokinin type-A receptor の遺伝子 -----12	
発現調節	
高田 豊	
4. 肥満、糖尿病、胆石症の新しい関連遺伝子	-----19
コレシストキニン-A 受容体遺伝子	
吉田 由紀	
III 研究成果の刊行に関する一覧表	-----27
IV. 研究成果の刊行物、別冊	-----30

I. 厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（総括）研究報告書

肥満、糖尿病、胆石症の新しい関連遺伝子、コレシストキニン-A 受容体遺伝子

主任研究者 宮坂 京子 東京都老人総合研究所臨床生理部門 研究室長

研究要旨 生活習慣病の発症には、遺伝的背景と生活習慣、環境が深く関与する。我々はコレシストキニン（CCK）-A 受容体遺伝子のプロモーター領域の 2 箇所の塩基置換が肥満の新しい single nucleotide polymorphism (SNP)であることを確認した。因果関係を調べるために転写活性を測定した。また遺伝子のメチル化と遺伝子発現が相関するかどうかをしらべた。環境変化に対応する個体の反応をしらべるとは、疾患発症のメカニズムを調べる上で重要であるが、ヒトで行うことには限界があるので、モデル動物を用い、平行して行った。

研究分担者

船越顕博 国立病院九州がんセンター
消化器部 医長
上垣佐登子 東京都老人医療センター
消化器科 医員

A. 研究目的

社会の高齢化と食糧事情の変化に伴い、糖尿病など生活習慣病の絶対数も増加し、日本人口の約7%が生活習慣病に罹患しているとされている。生活習慣病の発症には、遺伝的背景+環境因子+生活習慣、個人の性格などの複数の要因が関与する。生活習慣病は、慢性疾患として、長期間の医療を必要とし、医療費の増加をもたらす。肥満のなかには、肥満以外に検査所見に殆ど異常をみとめず、とりたてて治療を必要としない「単純肥満」も存在するが、殆どの場合、肥満は生活習慣病の発症を促進したり、増悪させる方向に働いている。肥満を防ぐには、理論的には、摂取カロリーと消費カロリーのバランスを保てばよいわけであるが、肥満の発症にも、遺伝的背景が関与することがあり、肥満の解消は時に困難とな

ることもある。我々は CCK-A 受容体遺伝子多型が肥満の新しい single nucleotide polymorphism (SNP)であることを発見し、分子機構を検討した。

また既知の肥満関連遺伝子として知られているアドレナリン β 3受容体遺伝子多型との関係を比較検討した

B. 研究方法

1. ヒトにおける CCK-A 受容体遺伝子多型の発生頻度の解析

1) プロモーター領域塩基置換(G-T: -128, A-G: -81)の有無を PCR-RFLP 法により検出する方法を作製し、住民検診例について解析した。

2) 肥満関連遺伝子として認知されているアドレナリン β 3遺伝子多型の発生頻度もあわせて検索した。

2. 遺伝子多型と表現型の因果関係についての解析

1) 各多型をもつ DNA 断片を作成し、転写活性を測定した（詳細は、リサーチレジデント高田豊報告書参照）

- 2) 還元法と sequence 法により遺伝子のメチル化の状態と competitive PCR による遺伝子発現を、各多型の胆嚢、および膵臓がんと正常膵組織で比較した (詳細は、リサーチレジデント 吉田由紀報告書参照)
3. CCK-A 受容体遺伝子ノックアウトマウスの表現型を検討した。
 - 1) 通常食により 48, 96 週令まで飼育し、屠殺、胆石の有無を検索した。
 - 2) タンパク、脂肪含有量がわずかに高い繁殖用飼料で 48 週齢まで飼育し、胆石形成の有無を検索した。

C. 研究結果

1. ヒト CCK-A 受容体の遺伝子多型

1) プロモーター領域塩基置換 (G-T: -128, A-G: -81) の有無を PCR-RFLP 法により検出した結果、40-70 歳代で、多型は約 40% にみとめられた。PCR-RFLP 法をセットアップし、末梢血 DNA を用いて CCK-A 受容体遺伝子多型の発生頻度をしらべた。結果は以下の通り。GT/AA, GT/GA, TT/AA, TT/AG は検出されていない。

Genotype	GG/AA(wild)	GG/AG	GG/GG	GT/AG	GT/GG	TT/GG(SNP)
% (972 人)	59.1	14.1	1.1	21.0	2.6	2.1

塩基置換のなかでも、両方の塩基置換が染色体 2 本ともに生じた(TT/GG)は、全体の 2% で、有意に体脂肪、血中レプチン、インスリンが高く、「肥満の新しい single nucleotide polymorphism (SNP)」であることが判明した。この発生比率は、80 歳以上の高齢者においても統計学的には、有意に変化しなかった。性別による影響もうけていなかった。ホモ異常(T/T, G/G)は約 2% にみとめられ、体脂肪増加、血清レプチン、インスリン濃度上昇が認められた。

- 2) 肥満関連遺伝子として認知されているアドレナリンβ 3 遺伝子多型の発生頻度は、従来の報告と同様、約 30% にみとめられ、年齢による分布の相違は全く認められなかった。
2. 遺伝子多型と表現型の因果関係についての解析
 - 1) 多型の存在は、転写活性には影響をあたえなかった。
 - 2) CCK-A 受容体遺伝子の脱メチル化と遺伝子発現は相関した。ホモタイプの胆嚢のメチル化は亢進しており、遺伝子発現が低下していた。
3. CCK-A 受容体遺伝子ノックアウトマウスの表現型を検討した。
 - 1) 常食により 48, 96 週令まで飼育し、屠殺、胆石の有無を検索した。胆石の発生は、ホモで 8 例中 3 匹、ヘテロ、野生型では形成されなかった。
 - 2) ンパク、脂肪含有量がわずかに高い繁殖用飼料で 48 週齢まで飼育すると、胆石形成が有意に増加した。

D. 考察

ヒトに認められた CCK-A 受容体遺伝子多型のうち、ホモ(TT/GG)は、肥満の SNP であることが、明かとなった。また、その他の多型 (GG/AG GG/GG GT/AG GT/GG TT/GG) は、もうひとつの肥満に関係するアドレナリンβ 3 受容体多型と同一個体に存在すると、中年肥満の強い遺伝的要因となりうるということがわかった。今後、これらの多型をスク

リーニングして、リスクファクターをもつ個体を早期に発見し、肥満を生じないように、生活習慣を改善することにより、種々の生活習慣病の発症を阻止できる可能性がある。このことは、今後10-20年にわたって、高齢者が増加することを踏まえると、医療費の削減と高齢者のQOLの向上という点から、非常に有意義となる。

遺伝子多型と表現型の因果関係は、基礎科学的に明らかにすることが難しい。痴呆の関連遺伝子として知られている apoE 多型においてさえ、明確なメカニズムの解明までにはいたっていない。我々は、今回、CCK-A 受容体のプロモーター領域の塩基置換が、転写活性には影響しないが、メチル化および遺伝子発現に影響しているという結果をえつつある。今後さらに症例をかさねる必要がある。

CCK-A 受容体遺伝子ノックアウトマウスでは、総カロリーは同じで、数%タンパクと脂肪が高い飼料により、有意に胆石が形成された。この現象は、戦後の日本人の食生活内容が欧米化することで、飛躍的に肥満、胆石（コレステロール結石）が増加したことと、きわめて類似している。

E. 結論

肥満、糖尿病に代表される生活習慣病は動脈硬化を促進し血管障害の原因となり、寿命を縮めるとともに老人の医療費がかさむことの大きな原因のひとつである。生活習慣病は、遺伝的要素と生活習慣の相乗または相加効果によって発症し増悪することはよく知られている。すでに肥満や成人型糖尿病にかかわっているとされる遺伝子異常がいくつか報告されているが、生活習慣病は、単一遺伝子異常によって生じる遺伝病ではない。今回我々が提起した CCK-A 受容体遺伝子多型という病態も、単一の原因とはなりえない。しかしハイリスク群を検出し、生活習慣の改善などの指導をおこなうことにより、疾患の発生を予防することができれば、本人、家族、社会にとって、非常に有意義である。

F. 研究発表（次頁以降）

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的所有権の取得状況

II 型糖尿病(NIDDM)遺伝子の検出方法

(特許整理番号 SG-7-003)

コレシストキニン A 受容体遺伝子多型による肥満の危険因子の検出法

(出願番号 2000-206806) H. 12.7.7

研究協力者

東京都老人総合研究所臨床生理部門

金井 節子、太田 稔、佐藤 裕子、増田 正雄、鈴木 伸治、佐藤 紀一、三宅 美帆

三菱科学ビーシーエル

山森俊治

G. 研究発表

論文発表

1. Miyasaka K, Masuda M, Kanai S, Ohta M, Suzuki S, Tateishi K, Funakoshi A. Inhibitory effect of somatostatin on CCK release is independent of luminal LCRF content in conscious rats. *Pancreas* in press
2. Kawanami T, Funakoshi A, Suzuki S, Kanai S, Sato Y, Miyasaka K. Oral administration of a synthetic trypsin inhibitor increases pancreatic duct function in CCK-A receptor-deficient rats. *Pancreas*, 20: 394-400, 2000.
3. Suzuki S, Miyasaka K, Jimi A, Funakoshi A. Induction of acute pancreatitis by cerulein in human IL-6 gene transgenic mice. *Pancreas* 21: 86-92, 2000.
4. Suzuki S, Kanai S, Miyasaka K, Jimi A, Funakoshi A. Regulation of pancreatic secretion by vagal nerve during short-term duct occlusion in conscious rats. *Pancreas* 20: 94-101, 2000.
5. Shimokata H, Yamada Y, Nakagawa M, Okubo R, Saido T, Funakoshi A, Miyasaka K, Ohta S, Tsujimoto G, Tanaka M, Ando F, Niino N. Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute of Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA). *J Epidemiology* 10 (suppl) S-46-55, 2000.
6. Funakoshi A, Miyasaka K, Yamamori S, Takata Y, Kataoka K, Takiguchi S, Kono A, Shimokata H. Body fat content is related to cholecystokinin A receptor gene promoter polymorphism. *FEBS Lett* 466: 264-266, 2000.
7. Kanai S, Masuda M, Suzuki S, Ohta M, Yoshida Y, Funakoshi A, Miyasaka K. Inhibitory effect of central calcitonin-gene related peptide (CGRP) on pancreatic secretion in conscious rats. *Jpn J Physiol* 50: 243-248, 2000.
8. Ichikawa M, Kanai S, Ichimaru Y, Funakoshi A, Miyasaka K. Difference in diurnal rhythm of energy expenditure between rats with obesity and glucose intolerance, and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 130: 2562-2567, 2000.
9. Ohta M, Kanai S, Sato Y, Masuda M, Takahashi T, Jimi A, Funakoshi A, Miyasaka K. Mechanism of delayed gastric emptying in naturally occurring CCK-A receptor gene knockout (OLETF) rats. *Jpn J Physiol*, 50: 443-448, 2000
10. Shimazoe T, Ishida J, Maetani M, Yakabe T, Yamaguchi M, Miyasaka K, Kono A, Watanabe S, Funakoshi A. Entrainment function in the suprachiasmatic nucleus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 83: 355-358, 2000.
11. Kurosawa M, Bucinskaite V, Miyasaka K, Funakoshi A, Lundeberg T. Effects of systemic injection of interleukin-1 β on gastric vagal afferent activity in rats lacking type A cholecystokinin receptors. *Neurosci Lett* 293: 9-12, 2000.

12. 鈴木伸治、船越顕博、宮坂京子。膵炎重症化の機序。特集「膵炎重症化の機序と対策」、消化器科 31: 642-649,2000
13. 船越顕博、宮坂京子。CCK-A 受容体遺伝子異常と生活習慣病。日本消化器病学会雑誌 97: 311-318, 2000.
14. 船越顕博、宮坂京子。コレシストキニン(CCK)受容体。臨床消化器内科 15: 427-435, 2000.
15. 船越顕博、篠崎博嗣、宮坂京子。膵外分泌と CCK 受容体。胆と膵 21: 205-212, 2000.
16. 宮坂京子、増田正雄、船越顕博。膵外分泌の体液性調節—膵外分泌抑制ホルモン。胆と膵 21: 193-198, 2000.
17. 宮坂京子、船越顕博。CCK releasing peptide. Key words 2000-2001 肝胆膵 先端医学社 118-119, 2000
18. 船越顕博、宮坂京子。消化管ホルモン。消化器疾患の臨床検査。川崎寛中編。メジカルビュー社。25-35, 2000
19. 鈴木伸治、宮坂京子、船越顕博。膵炎重症化機序の病態と対策、抗 IL-6 受容体抗体の膵炎重症化抑制効果 ミレニアム消化器 2000 in press
20. 宮坂京子、船越顕博。コレシストキニン受容体遺伝子多型と中年肥満、生活習慣病の関わり、および分子機構 Advances in Aging and Health Research 1999 平成12年2月発行,長寿科学振興財団

2. 学会発表

1. Suzuki S, Masuda M, Kanai S, Ohta M, Miyasaka K, Jimi A, Takiguchi S, Takata Y, Funakoshi A. Gallbladder contraction and pancreatic bicarbonate secretion, but not pancreatic amylase secretion, depend on CCK-A receptor: A study in CCK-A receptor deficient mice. 101st Annual Meeting of the American Gastroenterological Association May 21-24, 2000, San Diego, California
2. Hayashi H, Sato Y, Kanai S, Masuda M, Ohta M, Funakoshi A, Nagao K, Imaizumi K, Miyasaka K. Lymphatic lipid transport is not impaired in aging rat intestine. 2000 FASEB Summer Research Conferences April 15-18, 2000 San Diego, California FASEB J 14: A115, 2000
3. Kanai S, Masuda M, Suzuki S, Ohta M, Yoshida Y, Funakoshi A, Miyasaka K. Inhibitory effect of central calcitonin-gene related peptide (CGRP) on pancreatic secretion in conscious rats. Joint Meeting of American Pancreatic Association and International Association of Pancreatology. November 1-5, Chicago, Illinois
4. Masuda M, Kanai S, Funakoshi A, Miyasaka K. Intracerebroventricularly-administered orexin-A stimulates pancreatic exocrine secretion in conscious rats. Joint Meeting of American Pancreatic Association and International Association of Pancreatology. November 1-5, Chicago, Illinois
5. 鈴木伸治、宮坂京子。抗 IL-6 受容体抗体の膵炎重症化抑制効果。第86回日本消化器病学会総会（膵炎重症化機序の病態と対策、シンポジウム） 4.20-22, 2000 新潟

6. 増田正雄、宮坂京子、船越顕博。Luminal cholecystokinin-releasing factor (LCRF)の分泌機構研究。第22回ガットホルモンカンファランス 7/28-29,2000 静岡
7. 金井節子、太田 稔、佐藤裕子、増田正雄、宮坂京子、白見厚郎、船越顕博。コレシストキニン受容体遺伝子以上と肥満の関わり。第23回日本基礎老化学会 6.28-30,2000 愛知県大府市
8. 市川みね子、宮坂京子、海老沢秀道、腰原康子、市丸雄平、宮石理、田中慎、船越顕博。NIDDM モデルラットの長期軽度運動における代謝改善効果。第23回日本基礎老化学会 6.28-30,2000 愛知県大府市
9. 佐藤裕子、林洋、金井節子、増田正雄、太田稔、市川みね子、船越顕博、宮坂京子。肥満ラットにおける脂肪の腸管吸収の年齢変化、および運動と食餌制限の効果。第23回日本基礎老化学会 6.28-30,2000 愛知県大府市
10. 鈴木伸治、増田正雄、宮坂京子、吉田由紀、佐藤紀一、白見厚郎、船越顕博。CCK-A 受容体遺伝子ターゲティングマウスの重炭酸分泌機能 第31回日本膵臓学会大会 10.25-28, 神戸
11. 増田正雄、鈴木伸治、佐藤紀一、吉田由紀、宮坂京子、船越顕博。覚醒ラットの膵外分泌に対するオレキシン A 脳室内投与の影響とその作用機序 第31回日本膵臓学会大会 10.25-28, 神戸
12. 佐藤紀一、鈴木伸治、吉田由紀、増田正雄、船越顕博、宮坂京子。合成 trypsin inhibitor (camostat, ONO-3403)と天然 trypsin inhibitor(SBTI)投与による CCK-A 受容体欠損ラットの膵外分泌の変化 第31回日本膵臓学会大会 10.25-28, 神戸
13. 宮坂京子。膵外分泌の調節機構 静脈経腸栄養学会 教育講演 15: 6, 2000
14. 高田 豊、川波賢子、吉田由紀、瀧口総一、船越顕博 ヒト CholecystokininA 型受容体遺伝子の転写に必要な領域とその DNA 多型 第59回日本癌学会 ミニシンポジウム(増殖因子とレセプター) 2000,10,4-6, 横浜
15. 市川みね子、宮坂京子、船越顕博、神保奈穂、内藤礼子、小林美佳子、市丸雄平。インスリン依存性糖尿病ラットのエネルギー消費比の日周リズムは脂質代謝系に移行する。第7回日本時間生物学会学術大会 11.9-10,2000 東京
16. 船越顕博、澄井俊彦、宮坂京子。CCK-A 受容体遺伝子異常と慢性膵炎発症。厚生省特定疾患対策研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班(班長 小川道雄)平成12年度第1回研究発表会 平成12年, 7月28日、東京
17. 船越顕博、澄井俊彦、宮坂京子。CCK-A 受容体遺伝子異常と慢性膵炎発症。厚生省特定疾患対策研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班(班長 小川道雄)平成12年度第2回研究発表会 平成13年, 1月26日、東京

Cholecystokinin (CCK)-A 受容体遺伝子発現異常の疫学調査

分担研究者 船越顕博 国立病院九州がんセンター、消化器部

研究要旨 これまで CCKAR 遺伝子異常という病態を提示し、生活習慣病発症に対する役割を明らかにすることを計画し、さらに $\beta 3AR$ および $\beta 2AR$ 遺伝子異常との比較、組み合わせ検討も行った。その結果、CCKAR 遺伝子多型は特に肥満、慢性膵炎との関連が示唆され、 $\beta 3AR$ 遺伝子の組み合わせ異常は中年以降肥満の危険因子となる。 $\beta 2AR$ 遺伝子異常は肥満との関係を認めなかった。

A. 研究目的

成人病（肥満、高脂血症、糖尿病）は動脈硬化を増悪させるとともに寿命を縮める要因となる。我々は、肥満、糖尿病発症の遺伝的素因のひとつとして、CCK-A 受容体(CCKAR)遺伝子異常、 $\beta 3$ アドレナリン受容体($\beta 3AR$)遺伝子異常という病態を提示し、生活習慣病発症に対する役割を検討してきた。生活習慣病は多因子遺伝子異常(SNPs)に関わる病態と思われるので、今回は更に $\beta 2$ アドレナリン受容体($\beta 2AR$)異常を検索する。 $\beta 2AR$ Gln27Glu の多型は西欧人において肥満と関係していると報告されている。これらの CCKAR, $\beta 3AR$, $\beta 2AR$ 遺伝子は儉約遺伝子として、糖尿病、肥満との関連が示唆され、SNPs と生活習慣病との関わりについても検討し、将来老化に関連する疾病予防や治療につなげることである。

B. 研究方法

CCKAR プロモーター領域 (G→T: -128, A→G:-81)の有無および $\beta 3AR$ 多型については PCR-RFLP 法で調べた。各症例について肥満度(BMI)、体脂肪量、血清レプチン濃度、胆石症、糖尿病、高脂血症のチェックを行う。さらに、 $\beta 3AR$ 、 $\beta 2AR$ 遺伝子異常との比較も行う。各種疾患からのサンプル採取に関しては国立病院九州がんセンターの倫理委員会に申請したうえで、個々の患者からは検査の内容を詳細に説明し、インフォームドコンセントを得たうえで実施する。長寿研からの 40-70 才代 2251 人の住民検診検体については国立中部病院における倫理委員会で承認を受けた上で実施される。

C. 研究結果

(1) CCKAR 遺伝子多型は約 40%に認め、性差、

年齢差を認めなかった。多型を有すると肥満（体脂肪増加）、血清レプチン、インスリン濃度上昇、肝機能異常、IQ 低下との関連性が示唆された。(2) $\beta 3AR$ 遺伝子多型はホモ(A/A)、ヘテロ(T/A)を約 32%に認め、BMI 上昇との関連を示したが、性差、年齢差を認めなかった。(3) $\beta 2AR$ 遺伝子多型はホモ(E/E)、ヘテロ(Q/E)を約 11%に認めたが、性差、年齢差、肥満との関係を認めなかった。(4) 中年男性において、 $\beta 3AR$ と CCKAR の両方の多型が、18 歳時から現在までの体重変動に影響を与えていることが示唆された。慢性膵炎において CCKAR 遺伝子多型を有意高率に有した。

D. 考察

CCKAR は膵、胆嚢、中枢神経系の一部に存在し、膵増殖、胆嚢収縮、満腹感などの生理作用に重要である。住民検診での検討では血清レプチン濃度、体脂肪量増加との相関を認め、CCKAR 遺伝子多型を有する人は肥満になる可能性を有する。疾患群では慢性膵炎発症との関連を認めた。 $\beta 3AR$ は脂肪組織に発現し、ノルアドレナリンが結合すると、脂肪が分解されて、エネルギーとして使われる。遺伝子多型では、脂肪組織からのエネルギー放出効率が悪くなり、脂肪が蓄積しやすくなり、BMI とよく相関した。しかし、両遺伝子異常は異なる表現型を示し、組み合わせ異常を検討すると生活習慣病予知の可能性を有し大変興味深い。

E. 結論

CCKAR および、 $\beta 3AR$ の多型は今後、肥満の早期発見、予防の一助になると期待される。

ヒトにおける加齢とCCK-A受容体遺伝子多型に関する研究

分担研究者 上垣佐登子 東京都老人医療センター消化器科

研究要旨 高齢者は高血圧、脳梗塞など動脈硬化性疾患や消化器の分野では胆石症やその既往を有するものが多く、これらは近年生活習慣病として生活習慣の改善により病気の一次予防が試みられている。また一方疾患の遺伝的背景も無視できずいくつかの遺伝子異常が検討され将来的に治療や疾患の予防に応用することが考えられている。我々はCCK-A受容体遺伝子異常が生活習慣病発症の遺伝的要因のひとつであると考えているが、高齢者のCCK-A受容体遺伝子多型およびアドレナリンβ3受容体遺伝子多型と胆石症、糖尿病、高血圧症、肥満との関係を検討し生活習慣病発症のメカニズムを検討した。

A. 研究目的

高齢者は高血圧、脳梗塞など動脈硬化性疾患や胆石症の有病率が多く、これらは生活習慣病として長年の生活習慣が疾患の形成に関与していると考えられるが、一方遺伝的素因が発症に関与していることも想定されている。我々はCCK-A受容体遺伝子異常が生活習慣病発症の遺伝的要因のひとつであると考えているが、80歳以上の高齢者を対象としてCCK-A受容体遺伝子多型およびアドレナリンβ3受容体遺伝子多型を測定し胆石症など背景疾患との関係をあきらかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1998年8月から東京都老人医療センター消化器科に入院した80歳以上の高齢者患者105症例（男性37人、女性68人）を対象としてCCK-A受容体遺伝子多型、アドレナリンβ3受容体遺伝子多型を測定し、年齢、性別、高脂血症、糖尿病、高血圧、胆石症の有無、BMI(body mass index)、血清アルブミン値、尿酸値、総コレステロール値、HDL-C、血清インスリン、ヘモグロビンA1c、レプチンなどとの関係を検討した。

C. 研究結果

CCK-A受容体遺伝子型は80歳以上の105症例中、野生型は66例(62.9%)変異型は39例(37.1%)にみられた。CCK遺伝子型type 10(T/T, G/G)は1例(1.0%)のみであった(Table 1)。変異型は90歳以上においても12例中6例(50.0%)と割合はほぼ変わらなかった。また変異型は男性で32.4%、女

性で39.7%を占め性差はなかった。背景疾患では胆石症、高脂血症、糖尿病、高血圧について検討したが有意差はなかった。背景疾患に癌を有する症例は、昨年は9例中5例(55.6%)に多型がみられ、そのうち膵胆道系の癌患者4例中3例(75%)に多型を認めたが、今年多型の頻度は25例中7例で、膵胆道系の癌患者5例中3例に多型がみられた(Table 2)。血清アルブミン値、尿酸値、総コレステロール値、HDL-C、血清インスリン、ヘモグロビンA1c、レプチン値に関して野生型群と変異型群では差は認めなかった。BMI(body mass index)も野生型群と変異型群の間で差は認めなかったが過去の最大体重から求めた最大BMIは変異型群が 25.3 ± 5.0 、野生型群が 24.5 ± 3.9 と変異型群のほうが大きい傾向があった。レプチン値が増加するとBMIが増加する傾向にあり、変異株群、野生株群ともに相関関係が得られた。

アドレナリンβ3受容体遺伝子多型は野生型が68.6%変異型が31.4%に認められた。遺伝子型の分布には性差はなかった(Table 3)。BMIが26以上の症例では8例中4例(50%)と変異型が多く認められた。

D. 考察

今回の検討では高齢者のCCK-A受容体遺伝子変異型の割合は若年者の報告と比較して変化はなかった。若年者ではCCK-A受容体遺伝子変異型と肥満症との関連が報告されているが、高齢者は多疾患を抱えている症例が多く栄養状態を規定する因子が複雑であるため、BMIとの相関を認めなかったと考えられた。個人史からみると過去の最大体重

から求めたBMIの最大値はCCK-A、受容体遺伝子の変異型群のほうが野生型群に比べて大きい傾向にあり、CCK-A受容体遺伝子異常と肥満症との関係が考えられるが、高齢期の合併疾患により体重が減少し高齢期にはBMIに差が生じなくなっているものと考えられた。

また昨年は高齢者に多い悪性腫瘍、特に膵胆道系悪性腫瘍症例でCCK-A受容体遺伝子変異型を多く認められたが、本年の症例をみると変異型は少なかった。膵胆道系の悪性腫瘍症例が少ないことも一因と考えられた。発癌のメカニズムに関与していることが考えられており、今後検討を続けていく予定である。

E. 結論

高齢者のCCK-A受容体遺伝子変異型の割合は若年者と同様であった。栄養状態は合併疾患の影響を受けるため肥満症との関連は明らかでなかった。発癌との関連が考えられるため、今後さらに、悪性腫瘍特に膵胆道系悪性腫瘍の症例の検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

論文発表

生活習慣・遺伝素因からみた肝・胆・膵疾患
大久保賢治, 松本和則 臨床成人病, 第29巻, 第1号, p76-p80, 1999

Table 1. 高齢者（80歳以上）におけるCCK-A受容体遺伝子多型の頻度

	症例数	CCK-A受容体遺伝子型					
		G/G,A/A	G/G,A/G	G/G,G/G	G/T,A/G	G/T,G/G	T/T,G/G
男性	37	25(67.6%)	3(6.1%)		7(18.9%)	2(5.4%)	
女性	68	41(60.3%)	13(19.1%)	1(1.5%)	12(17.6%)		1(1.5%)
年齢	80歳代	82	54(65.9%)	10(12.1%)		16(19.5%)	2(4.0%)
	90歳代	21	11(52.4%)	5(23.8%)	1(4.8%)	3(14.3%)	1(11.1%)
	100歳代	2	1(50%)	1(50%)			
合計	105	66(62.9%)	16(15.2%)	1(1.0%)	19(18.1%)	2(1.9%)	1(1.0%)

Table 2. 悪性腫瘍患者におけるCCK-A受容体遺伝子多型

年齢	性別	癌種	CCK-A受容体遺伝子型
90歳	女性	胃癌術後	G/G, A/A(wild type)
94歳	女性	卵巣癌	T/T, G/G
84歳	女性	子宮頸癌	G/T, A/G
87歳	女性	胃癌術後	G/G, A/A(wild type)
85歳	女性	胆管癌	G/G, A/G
81歳	女性	胃癌	G/G, A/A(wild type)
81歳	女性	胆管癌	G/G, A/G
89歳	女性	胆管癌、胃癌	G/T, A/G
84歳	女性	膵臓癌	G/G, A/A(wild type)
81歳	男性	大腸癌	G/G, A/A(wild type)
82歳	女性	子宮頸癌	G/G, A/A(wild type)
87歳	男性	胃癌	G/T, A/G
86歳	男性	大腸癌	G/G, A/A(wild type)
89歳	女性	大腸癌	G/G, A/A(wild type)
83才	男性	胃癌、前立腺癌	G/G, A/A(wild type)
80歳	女性	大腸癌	G/G, A/A(wild type)
87歳	女性	食道癌、胃癌	G/G, A/A(wild type)
86歳	女性	悪性リンパ腫	G/G, A/A(wild type)
87歳	男性	大腸癌	G/G, A/A(wild type)
91歳	男性	胆管癌	G/G, A/A(wild type)
86歳	女性	膀胱癌	G/G, A/A(wild type)
82歳	男性	肝癌	G/G, A/A(wild type)
80歳	男性	大腸癌	G/G, A/A(wild type)
88歳	女性	肝癌	G/G, A/A(wild type)
86歳	女性	胃癌	G/G, A/G

Table 3. 高齢者（80歳以上）におけるアドレナリンβ3受容体遺伝子多型の頻度

		症例数	アドレナリンβ3受容体遺伝子型		
			A/A	T/A	T/T
男性		37	2(5.4%)	12(32.4%)	23(62.2%)
女性		68	2(2.9%)	17(25.0%)	49(72.1%)
年齢	80歳代	82	3(3.7%)	24(29.3%)	55(67.1%)
	90歳代	21	1(4.8%)	5(23.8%)	15(71.4%)
	100歳代	2	0	0	2(100%)
合計		105	4(3.8%)	29(27.6%)	72(68.6%)

研究実績報告書

リサーチ・レジデント 高田 豊

1.リサーチ・レジデント期間

平成10年10月 1日 ~ 平成13年 3月31日

2.受入機関

国立病院 九州がんセンター
福岡県福岡市南区野多目 3-1-1

3.研究指導者

国立病院 九州がんセンター消化器内科部
役職名 消化器内科医長
船越 顕博

4.研究課題

生活習慣病における Cholecystokinin type-A receptor の遺伝子発現調節

5.研究活動の概要

平成10年10月1日より上記3の研究指導者の下において Aging、生活習慣に関する研究課題に関し、特に胆石症において分子生物学的手法を用いた解析を開始した。

Cholecystokinin type-A receptor (以下 CCKAR)の発現の状態を見るために、切除胆のうを研究サンプルとして CCKAR mRNA の Northern blotting による解析を行った。プロモーター領域のメチル化状態を調べるためには、同一患者の末梢血と切除胆のうについてのメチル化感受性の制限酵素を用いた Southern blotting を比較することで解析した。これらの結果より切除胆のうにおける CCKAR 遺伝子のメチル化状態と発現との相関を調べ、34症例についてまとめることができた。プロモーター領域の中には特に発現に重要な働きをする遺伝子上の領域がある。この領域を探索するために、培養細胞を使った転写のモデル系を確立し、領域の特定を行った。さらに、ヒト CCKAR 遺伝子にはプロモーター領域内に塩基配列に2つのポリモルフィズムが知られており、その転写に与える影響について検討した。

バックグラウンドと目的：胆石症は古くより遺伝的背景も強いとされ、若年での発症は稀で中高年特有の発症機構があると考えられている。胆石症は切除胆のうを研究試料として用いることができるため、ヒトの生活習慣病、老化の遺伝子機構の理解において、その発症が環境および老化とどのように関係し

ているかを解明することに、特に有益な情報を得ることのできるモデルと考えられる。胆石症の診断に CCK に対するレスポンスが試されることがあるが、胆のう切除例では CCK response negative の症例が多いことが知られており、胆のう側の受容体の機能的損失が考えられている。哺乳類では CCK の受容体に 2 種類あることは薬理学的実験により解っており、胆のうの収縮において機能する CCK の受容体は CCKAR であり、CCKAR の機能的損失と胆石症を結びつけることは可能ではないかと考えている。1995 年に最初のヒト CCKAR 遺伝子が部分的に単離され、解析された。2000 年に我々は、CCKAR 遺伝子の全長の単離とその解析を報告した。我々の塩基配列の解析によると、CCKAR 遺伝子の転写開始点近傍のプロモーター領域とエクソン 1 内の塩基配列は、CpG 配列を多く持つことが解った。最近、遺伝子プロモーター領域のメチル化は遺伝子の発現を組織特異的に、また stage-specific に制御するという報告もあり、CCKAR の老化における発現制御とこのメチル化を関連づけることができるのではないかと期待される。本研究では、摘出胆のうの CCKAR の発現状態、遺伝子プロモーター領域のメチル化状態の検索を通して、CCKAR の機能損失と老化との相関の有無をみることを臨床検体からのアプローチで行うことを目的とした。

実験手法

DNA, RNA の調製：実験試料はそれぞれの患者、健常人から informed consent を得たうえで、切除胆のう(主に胆石症患者)、患者末梢血液、健常人末梢血液を集め用いた。胆のうについては、ドライアイス、或いは -80°C 凍結後、genomic DNA を定法であるフェノール抽出法により調製し、また mRNA は AGPC 法を用いて調製した。末梢血液の genomic DNA は、LSM による単核球画分の調製後にフェノール抽出法により得た。

Northern Blotting：各胆のうサンプルについての CCKAR mRNA の発現状態は、NIH の Wank 博士より供与して頂いた ヒト CCKAR cDNA (1.6 kb) を α - ^{32}P -d.CTP によりラベルしてプローブに用い、Northern blotting により検出した。また、内部標準として b-actin mRNA を検出し、各検体間の発現量の補正を行った。CCKAR mRNA の発現は、同一フィルター上にある正常検体の発現量の 10% 以上を発現有りとした。

Methylation Sensitive Southern Blotting：我々の研究では ヒト CCKAR 遺伝子の全塩基配列を決定しており(Fig.1)、さらに転写開始点を決定している。プロモーター領域のメチル化検索は、このデータをもとに 2 つの解析法(プラン A とプラン B)を考案した。両プランとも(Fig.2A, 2B)、半定量的ではあるが末梢血と胆のうの検出パターンを画像処理し、残存する消化されなかった断片量を数値化し比べ、末梢血よりも明らかにメチル化程度の低い検体(10%以上の差を示す)を、methylation negative であるとした。

プラスミド構築：プロモーター活性を測定するための基礎ベクターとして、プロメガ社製のプラスミド pGL3basic(Firefly luciferase; プロモーターを持たないもの)を使用した。pGL3basic ベクターのクローニング部位(上流側 Mlu I site と下流側 Xho I site 間)にヒト CCKAR 遺伝子のプロモーター領域と続く 5'-非翻訳領域の各断片を Fig.3A, 3C に示すようなコンストラクトを得るためにクローニングした。DNA 多型を示すプロモーター領域は、-315 から+122 の領域について、抹消血検体 DNA より PCR により増幅して構築した。

プロモーター活性の測定：各 20mg のプラスミド DNA と 1mg の内部標準用ベクター pRLsv40(Renilla luciferase; プロメガ社製)を 500 万個の対数増殖期の STC-1 cell (マウス十二指腸腫瘍由来)にエレクトロポレーション法により導入した。37°C で 20 時間培養後 cell を集め、cell extract を調製し活性測定に用いた。活性測定はプロメガ社製の測定キットを使用し、マニュアルに従った。活性は各プラスミドを導入した cell extract について Firefly luciferase activity / Renina luciferase activity で求めた数値を pGLbasic の値に対する比で表し、luciferase 比活性とした。

結果 1：胆石症患者におけるヒト CCKAR 遺伝子のメチル化状態と転写制御について

集めた摘出胆のうは、胆石症患者のもの 72 例である。このうち、血液 DNA も解析できる検体は 36 例、mRNA の解析ができるものは 34 例であった。この 34 例について、プラン A、プラン B の何れかの方法で DNA のメチル化の程度を判断した。また、mRNA の解析を行い、各検体について、正常胆のう CCKAR mRNA の発現の 10%以上の発現が見られるものを発現有りとして比較した(表 1)。

34 例中 mRNA の発現の見られたもの 11 例中、胆のうの DNA のメチル化が低度であったもの 10 例(89%)だった。発現の見られなかったもの 23 例(67.6%)中では、DNA のメチル化が低度であるものは 12 例(52%)で、残りの 11 例(48%)はメチル化が高度な状態であった。この結果より、少ない例外は有るものの、DNA の低度なメチル化は CCKAR の発現に大きく貢献しており、逆に高度なメチル化は発現の検出できない検体に多く見られ、高度なメチル化状態による CCKAR の転写活性の抑制があることが示唆された。

32 症例の末梢血と摘出胆のうのメチル化率の差を年齢別に検討したが、各年代で差が 30%症例から 0%の症例が散在しており、解析数は少ないが、疾患群内だけの解析では年齢による経年変化のようなものはみえなかった。

結果 2：ヒト CCKAR 遺伝子プロモーター領域の転写活性

CCKAR 遺伝子上流領域のどの領域が重要な働きをしているかを求めるために、樹立培養細胞 STC-1 cell を使った in vitro の転写測定系を確立した。ルシフェラーゼ cDNA の上流部に CCKAR 遺伝子のプロモーター領域を挿入し、各プロモーター活性を測定した(Fig.3)。5'側プロモーター欠失プラスミドに

よる解析では、転写開始点より -622 から+199 までのプロモーター領域を持つプラスミドは転写活性を STC-1 cell において示した。また、転写活性の最高値は-197 より下流側のプロモーター領域を持つことで得られた。3'側欠失による解析では、+11 を含めてより上流側を持つことが、遺伝子の転写に特に重要であることが解った。このことより、我々のいま見ている Hpa II site のメチル化の位置(-396, -258, -61, +150)は、CCKAR の転写活性に必要な領域の中にあることが解った。

我々の塩基配列の解析によると、CCKAR 遺伝子はプロモーター域内の転写開始点近傍に-128 G to T, -81A to G の DNA 多型をもつことが明らかとなっている。つまり、日本人には異なる塩基配列の CCKAR 遺伝子プロモーター領域が存在する。DNA 多型を示すプロモーター領域塩基配列に転写能力の差があるかどうかを調べるために、GA(wild type), GG, TG 型のプロモーター領域を持つ、転写活性測定用のプラスミドを構築し測定した。測定の結果、それぞれの比活性は pGLbasic に対して 2.64, 2.46, 2.50 であり、wild type である GA 型に対して 90%以上の活性を維持していることが解った。

考察

胆石症での摘出胆のうからは、67.6%(23例/34例)で CCKAR mRNA の発現が抑制されていた。また、今回の検索では、この CCKAR mRNA の発現抑制に遺伝子のプロモーター領域の高度なメチル化が関係するという結果を得た。胆石症においては、Southern 法の結果から CCKAR 遺伝子のプロモーター領域について大きな欠失のようなものはないことがいえため、今回調べたプロモーター領域のメチル化のような後天的な DNA の修飾による遺伝子の発現制御が、胆石症胆のうの CCKAR 遺伝子の発現抑制に関係していると推察された。

また、遺伝子のメチル化が低度な状態での発現の抑制も 48%の検体に見られていることは興味深い結果であった。DNA メチル化以外の、例えば転写因子の機能の欠陥や、プロモーター領域との転写複合体形成能力の差なども、CCKAR 遺伝子の発現制御機構として働いている可能性が考えられる。検体のプロモーター領域の配列が遺伝的に異なるポリモルフィズムについては、日本人の場合では出現頻度の高い3つのタイプの塩基配列で、in vitro での転写活性能力の大きな差は検出できなかった。差がどの程度あれば病的に意味のあるものになるのか、未だに解析されていないことも重要な課題であるが、今後 in vivo での発現系や種を同じくしたヒト培養細胞での解析を行うことも、さらに有益な情報を得るためには必要であると思われる。

また、今回示したプロモーター領域の転写活性の測定により、CCKAR 遺伝子は転写開始点の比較的近傍のプロモーター領域を利用して転写を行うことが示唆された。Fig.3 から転写に促進的に働く領域は-87から-31内にあると思われる。ヒト CCKAR 遺伝子は塩基配列解析の結果から、多くの遺伝子が持つ TATA-box や CAT-box はもたず、GC-box が-62, -48にあるのが特徴である。GC-box は転写因子 Sp1 の結合配列になることも考えられ、メチル化の標的である CpG 配列と共通する部分も多い。我々の現在解析している遺伝子領域は、まさにこの CpG 配列の多いプロモーター領域近傍であるので、今後、

遺伝子メチル化や Sp1 などの転写因子の結合についての解析は多くの結果を導き出すものとする。

胆石症において、我々はどの程度の CCKA 受容体機能の欠損が引き金となるのか解析できてはいない。胆石症のタイプによってその貢献度も異なると思われる。ヒト CCKAR 遺伝子において、メチル化の転写抑制への効果は確認された。しかし、これは年齢のような経時変化に伴うと言うよりも、今回の解析では各年代を通じての発現抑制のメカニズムを表しているように思われる。一部の突発性の癌で、癌抑制遺伝子発現のメチル化による抑制が見られている。私たちの体には遺伝子をメチル化に導くようなシグナルが、性や遺伝のような先天的背景、食生活やストレスのような経時蓄積型の後天的因子により、個体としては中高年齢層内に散在した発症として見られると推察された。

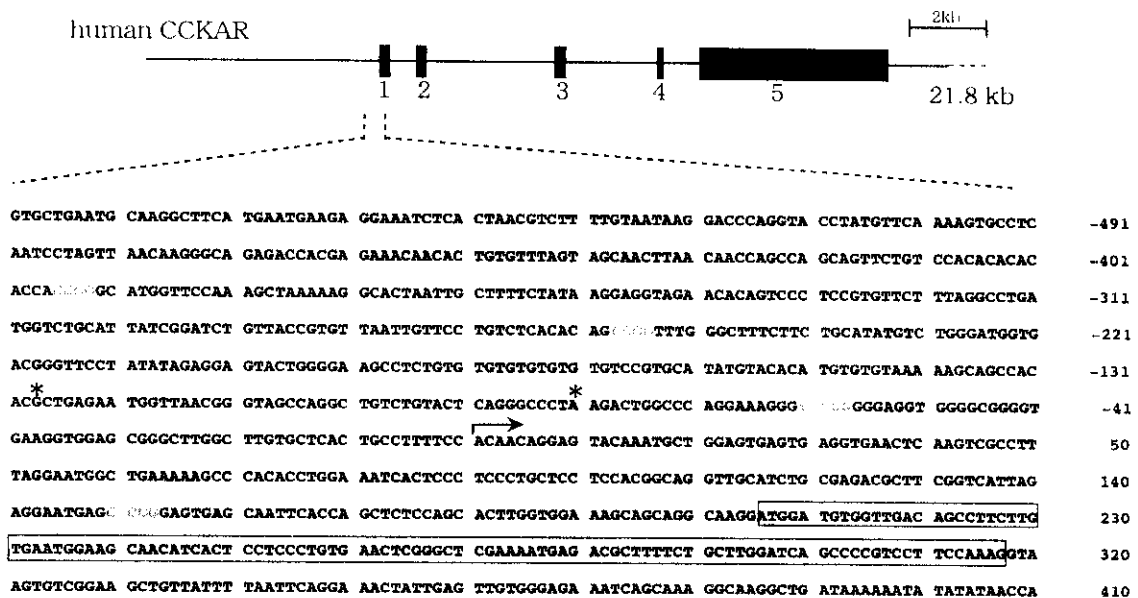


Fig.1 ヒトCCKAR遺伝子プロモーター領域の塩基配列と転写開始点

ヒトCCKAR遺伝子(Accession#D85606)の転写開始点(→)近傍の塩基配列を示した。符号 - 番号は promoter 領域、+ 番号は exon 1 より領域下流を示す。□ は exon 1 内翻訳領域を示した。メチル化感受性制限酵素HpaII site (-396, -258, -61, +150)を□で示した。* はポリモルフィズムの位置 -128, -81を示した。

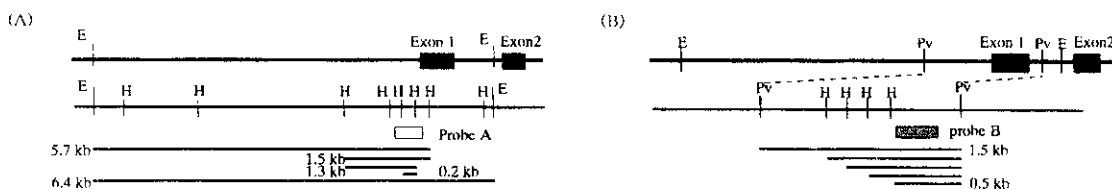


Fig.2 プランA, プランBによるサザン法のストラテジー

プランA : Exon 1を含む6.4 kb EcoRI断片はおよそ5.6 kbの遺伝子上流領域を含む。調製したDNAをメチル化感受性の制限酵素であるHpa IIで第1回目のDNA消化をする。Hpa II siteは、この断片上に8箇所存在する(A)。第2の制限酵素にはメチル化非感受性のEcoRIを用いて解析断片のサイズを小さくし、電気泳動を行い blottingを行った。検出用のプローブとしては、probe Aを α - 32 P-d.CTPによりラベルして用いた。これによりメチル化が高度の検体は6.4 kbのEcoRI断片と同一の移動度として観察され、メチル化が低度のは6.4 kb断片が割合として少なくなり、対照的にサイズの小さい断片が幾つか観察される。

プランB : Exon 1を含む1.5 kb Pvu II断片はおよそ0.9 kbの遺伝子上流領域を含む。プランAよりも、より転写開始点近傍のメチル化に焦点をあてて検出できる(B)。Hpa IIで第1回目のDNA消化をする。Hpa II siteは、この断片上に4箇所存在する。第2の制限酵素にはメチル化非感受性のPvu IIを用いた。検出用のプローブは、probe Bを用いた。メチル化が高度のものは1.5 kbのPvu II断片が主に観察され、メチル化が低度のは1.5 kb断片が割合として少なくなり、サイズの小さい断片が幾つか観察される。

E; EcoRI, H; HpaII, Pv; Pvu IIを示す。

表1. 解析した34症例のCCKAR遺伝子の発現とメチル化
方法に述べた解析法により分類し表した。

CCKaR Express (+)の例		11
メチル化低度例		10
メチル化高度例		1
CCKaR Express (-)の例		23
メチル化低度例		12
メチル化高度例		11
total		34

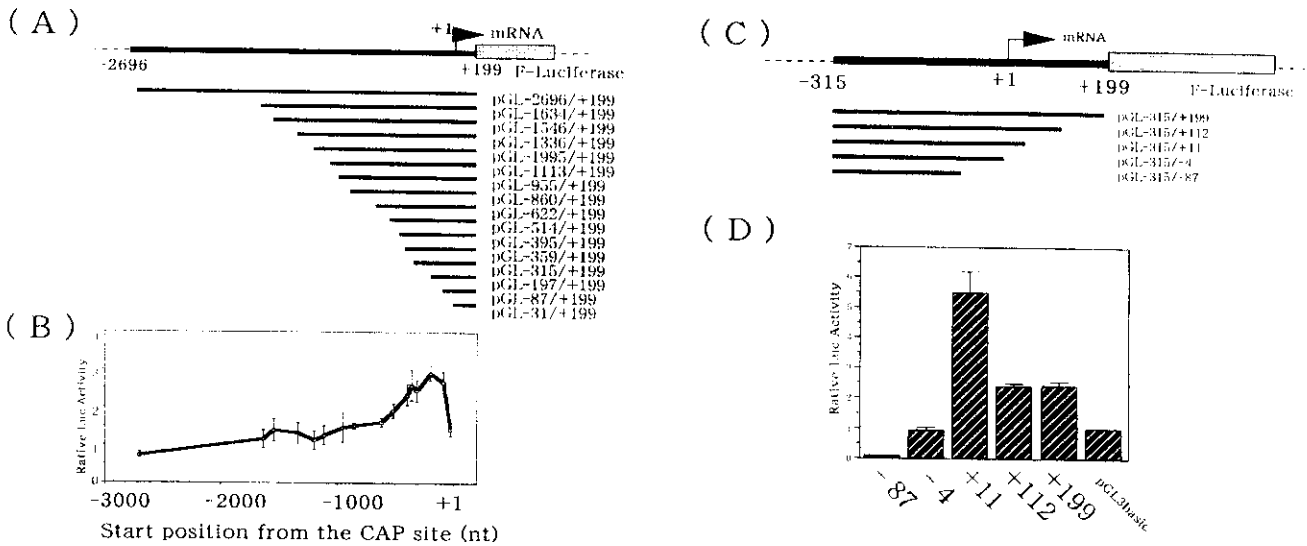


Fig.3 ヒトCCKAR遺伝子のin vitro 転写活性

(A) プロモーター領域の5'-順次欠失plasmidの構築。(B) 5'-順次plasmidにおけるluciferase比活性。(C) プロモーター領域の3'-順次欠失plasmidの構築。(D) 3'-順次plasmidにおけるluciferase比活性。