

研究実績報告書

1. リサーチ・レジデント氏名 吉田 由紀

2. リサーチ・レジデント期間

平成 11 年 4 月 1 日～平成 13 年 3 月 31 日

3. 受け入れ機関 名称 : 財団法人東京都老人総合研究所
所在地 : 東京都板橋区栄町 35-2

4. 研究指導者 所属 : 生理老化学研究系臨床生理部門
職名 : 研究室長
氏名 : 宮坂 京子

5. 研究課題

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

6. 研究活動の概要

平成 11 年 4 月 1 日より上記の研究指導者の下において、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 受容体遺伝子に関する研究課題に関し、特にヒトコレシストキニン-A 受容体遺伝子プロモーター領域の多型と肥満・糖尿病に関する研究を開始した。

〔目的〕増加の傾向を示す肥満(および肥満症)は、生活習慣病、特に高血圧、高脂血症、糖尿病(インスリン非依存型:NIDDM)を発症する危険率を高める、共通の基盤となっている。さらに、これらの生活習慣病は合併症を引き起こし、脳・心臓血管障害等の重篤な疾病と強く結び付いている。健康な長寿社会を築くためには、生活習慣病の発症を解明し、治療に役立てると共に、早期からの予防が必要とされる。脳-腸ホルモンであるコレシストキニン(cholecystokinin; CCK)は、摂食行動特に摂食抑制との関与が知られている。その受容体(CCK-AR)遺伝子を欠損するラット(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty;OLETF)では、後天的に肥満を呈し高脂血症、高血糖から糖尿病を自然発症する。ヒトでは、1例の肥満・胆石症で本遺伝子の alternative splicing による機能しない産物を

発現する症例が報告されたが、欠損等による遺伝子構造上の違いは認められなかった。また、肥満の患者で2例の missense variant が確認されたが、我々の解析では肥満・糖尿病患者でこれら変異は見つからなかった。これまでの報告から、本遺伝子構造内の相違や変異が肥満・糖尿病・胆石症に中心的な役割を担う可能性は低いと考えられる。最近、本研究グループはヒト CCK-AR 遺伝子のプロモーター領域内の2カ所の変異から生じた多型を確認した(nt.-128:G→T, nt.-81:A→G)。このうち、転写開始点から-128塩基对上流の変異部位では塩基の置換に伴い、メチル化の離脱による発現調節を受ける可能性が推察され(CG→CI)、本遺伝子発現の調節と疾病との関与が推測される。

生活習慣病の温床である肥満は、環境因子に加え個体の遺伝的素因により発症すると考えられており、多因子遺伝であることが知られている。脂肪分解と熱産生作用に関わる β_3 アドレナリン受容体(β_3 -adrenargic receptor; β_3 -AR)遺伝子のコドン64のトリプトファンがアルギニンに変換するミスセンス変異(Trp64Arg)は、病的肥満者の間で変異型が正常型に比べ、肥満度、長期間の体重増加と相関することが報告されており、肥満・糖尿病発症に強い関連が考えられている。このミスセンス変異の頻度は、日本人の3人に1人と高く見られ、他の関連遺伝子に比べ日本人の肥満に特徴的な遺伝素因と考えられている。しかしながら、 β_3 -AR 遺伝子変異単独では肥満発生を説明できず、環境因子に加え他の遺伝因子の相加的効果が示唆されている。そこで、肥満発生の解明には肥満関連の複数遺伝子の組み合わせによる解析が期待される。これらのことから、健常人と糖尿病患者で両遺伝子の多型解析を行い、CCK-AR 遺伝子のプロモーター領域内多型と β_3 -AR 遺伝子ミスセンス変異とが肥満・糖尿病発症の遺伝的素因となるかについて、検討した。また、長寿との関係について超高齢者のCCK-AR 遺伝子の遺伝型を調べ、同遺伝子多型が老化促進因子としての可能性を保持するかについて解析を行った。

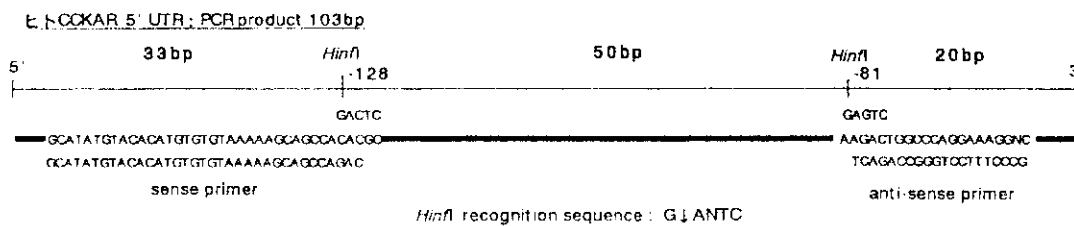
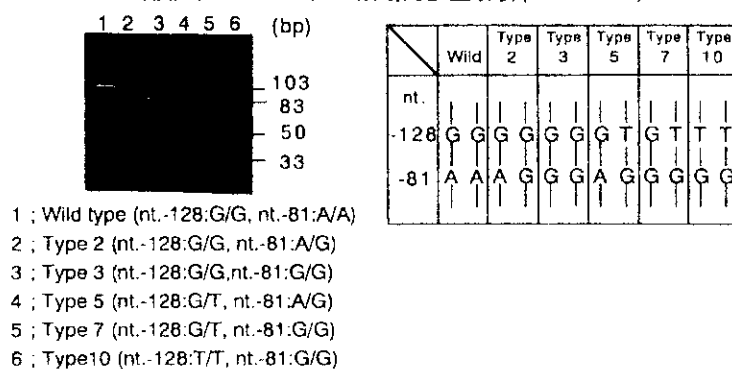
【解析材料】ヒト末梢血単核細胞(PBMC)由来 genomic DNA

糖尿病患者(n=333)、住民検診(40~70歳台, n=2251; 40-70歳台 2251人のNational Institute for Longevity Sciences Longitudinal Study of Aging(NILS-LSA)住民検診、長寿医療研究センター疫学研究部、下方浩史部長研究委託事業:9公-03)、高齢者(80~103歳, n=110)について末梢血単核細胞(PBMC)から genomic DNA を抽出し、CCK-AR 遺伝子および β_3 -AR 遺伝子の genotyping 解析を行った。これらの解析は、インフォームドコンセントを得て、行われた。

[方法] 1. ヒト CCK-AR 遺伝子多型解析(PCR-RFLP 法)

ヒト CCK-AR 遺伝子プロモーター領域内の 2ヶ所の変異(nt-128 ; G→T、nt-81 ; A→G)を含んで増幅する primer を用い、genomic DNA の PCR を行った。PCR 産物(103bp)は、これらの変異が存在する場合に制限酵素 *Hinf* I で消化され、83bp, 50bp, 33bp の断片が検出される。これらの消化断片の組み合わせが、2ヶ所の変異による CCK-AR 遺伝子の genotype を反映する。*Hinf* I 消化後、polyacrylamide gel で電気泳動し、出現バンドのパターンにより野生型(Wild)、変異型(Type2~10)を確認した。

ヒトCCK-AR遺伝子プロモーター領域内多型解析(PCR-RFLP)



2. ヒト β_3 -アドレナリン受容体(β_3 -AR)遺伝子多型解析

ヒト β_3 -アドレナリン受容体(β_3 -AR)遺伝子多型(Trp64Arg)は、CLÉMENT らにより報告された方法を用い、変異部を増幅した PCR 産物を制限酵素 *Mva* I で変異箇所の切断を行い、切断バンドの泳動パターンを解析した(N.Engl.J.Med. 1995;333:352-4.)。

3. 競合 PCR 法を用いたヒト CCK-AR mRNA 定量法の確立

微量組織からヒト CCK-AR 遺伝子の発現量を測定する目的で、競合 PCR 法による解析系の確立を試みた。

【結果】 1. ヒト CCK-AR 遺伝子プロモーター領域内多型の肥満への関与

住民検診(n=2251)の解析で、CCK-AR 遺伝子プロモーター領域内多型は、野生型(nt.-128:G/G, nt.-81:A/A)と、変異型アリルではヘテロ接合体 Type2 (nt.-128:G/G, nt.-81:A/G)、Type3 (nt.-128:G/G, nt.-81:G/G)、Type5 (nt.-128:G/T, nt.-81:A/G)、Type7 (nt.-128:G/T, nt.-81:G/G)とホモ接合体 Type10 (nt.-128:T/T, nt.-81:G/G)を有する 5 種類の遺伝型が確認された。理論上想定された、Type4 (nt.-128:G/T, nt.-81:A/A)、Type6 (nt.-128:G/T, nt.-81:G/A)、Type8 (nt.-128:T/T, nt.-81:A/A)、Type9 (nt.-128:T/T, nt.-81:A/G)は出現しなかった。確認された野生型(Wild;GG/AA)の出現率が、58.51%であったのに対し、各遺伝型はそれぞれ Type2(GG/AG) 13.64%、Type3(GG/GG) 1.16%、Type5(GT/AG) 21.81%、Type7(TT/GG) 2.71%、Type10(TT/GG) 2.18%であった。この結果から、CCK-AR 遺伝子プロモーター領域内 2ヶ所の塩基置換は、約 40%の頻度で出現することが明らかになった。さらに、遺伝子多型と体格指数 body mass index(BMI, kg/m²)および血清レプチン濃度(ng/ml)、血清インスリン濃度(μU/ml)の関係をみた(n=1296)。BMI は、肥満度を評価する指標であり、レプチン濃度は、体脂肪量と相関を示すことが知られている。また、血清インスリン濃度の上昇は、インスリン耐性と関係し糖尿病で問題とされている。野生型と CCK-AR 遺伝子多型のヘテロ接合体(Type2, 3, 5, 7,n=1271)の BMI、血清レプチン濃度、血清インスリン濃度に対し、ホモ接合体(Type10, n=25, 全体の 1.9%)はこれら総てが有意に高い値を示した。これにより、CCK-AR 遺伝子プロモーター領域内ホモ多型はその野生型とヘテロ多型に比べ、BMI、血清レプチンおよびインスリン濃度の上昇に関係することが示唆された。

ヒトCCK-AR遺伝子プロモーター領域内多型の出現率(n=2251)

Genotype	GG/AA	GG/AG	GG/GG	GT/AG	GT/GG	TT/GG	Total
Subjects(n)	1317	307	26	491	61	49	2251
Percent(%)	58.51	13.64	1.16	21.81	2.71	2.18	100

ヒトCCK-AR遺伝子プロモーター領域内の多型とBMIおよび血清中レプチン、インスリン濃度(n=1296)

	Wild(GG/AA), heterozygote type n=1271	Homozygote (TT/GG) type n=25	P value
Body mass index (kg/m ²)	22.8 (0.09)	23.9 (0.78)	0.076
Serum leptin (ng/ml)	5.7 (0.14)	8.8 (2.18)	0.003
Serum insulin (μU/ml)	7.9 (0.13)	9.8 (1.32)	0.038

Mean (S.E.M.). Statistical differences in phenotypic parameters between the two genotypic groups were analyzed by Student's t-test. Statistical significance was assumed with a P value < 0.05.

2. 高齢者における CCK-AR 遺伝子プロモーター領域内多型の出現頻度

長寿を全うしている高齢者(80~103 歳、n=110)について、CCK-AR 遺伝子多型出現率を解析した。結果、野生型(Wild;GG/AA)の出現率が、61.82%であり、住民検診の出現率(58.51%)より高い傾向を示した。また、変異型では Type2(GG/AG) 14.55%、Type3(GG/GG) 0.91%、Type5(GT/AG) 20.00%、Type7(TT/GG) 1.82%、Type10(TT/GG) 0.91%であった。それぞれ住民検診の結果に対し、顕著な相違は見られなかった。ホモ変異型においては、高齢者で低い出現率を示す傾向が見られた。この結果から、高齢者において CCK-AR 遺伝子野生型およびヘテロ変異型は、ホモ変異型に比べ生存に有利である可能性が考えられた。

高齢者(n=110)におけるCCK-AR遺伝子プロモーター領域内多型の出現率

Genotype	GG/AA	GG/AG	GG/GG	GT/AG	GT/GG	TT/GG	Total
Subjects(n)	68	16	1	22	2	1	110
Percent(%)	61.82	14.55	0.91	20.00	1.82	0.91	100

3. ヒト CCK-AR 遺伝子多型と β₃-AR 遺伝子多型

次に、日本人の肥満と強い関連が示されている β₃ アドレナリン受容体(β₃-AR)遺伝子多型と CCK-AR 遺伝子多型との組み合わせで、住民検診(n=838)、糖尿病患者(n=333)の間でこれら両多型の出現頻度の相違について検討した。住民検診と糖尿病患者の両遺伝子野生型(Wild/Wild)は、住民検診 37.59%、糖尿病 41.14%となり同様な出現頻度であったが、糖尿病患者でやや高い傾向を示した。また、CCK-AR/β₃-AR 変異型の組み合わせにおいても、(hetero/hetero)、(homo/hetero)の出現頻度は両群間で大きな相違は見られなかった。(homo/homo)の組み合わせは、糖尿病では検出されず、住民検診で 1 例が検出されたのみであった(0.12%)。(CCK-AR hetero/β₃-AR homo)の組み合わせにおい

では、住民検診 0.48%に対し、糖尿病患者が 1.50%を示した。(CCK-AR homo/ β_3 -AR hetero)の組み合わせが、住民検診 0.72%、糖尿病 0.60%であることから、CCK-AR 遺伝子ヘテロ変異型と β_3 -AR 遺伝子ホモ変異型の組み合わせが糖尿病に關与する可能性が示唆された。

住民検診(n=838)におけるCCK-AR/ β_3 -AR遺伝子多型の出現率

CCK-AR/ β_3 -AR genotype	Wild/Wild	hetero/hetero	homo/hetero	hetero/homo	homo/homo
Subjects (n)	315	96	6	4	1
Percent (%)	37.59	11.46	0.72	0.48	0.12

糖尿病患者(n=333)におけるCCK-AR/ β_3 -AR遺伝子多型の出現率

CCK-AR/ β_3 -AR genotype	Wild/Wild	hetero/hetero	homo/hetero	hetero/homo	homo/homo
Subjects (n)	138	33	2	5	0
Percent (%)	41.14	9.91	0.60	1.50	0

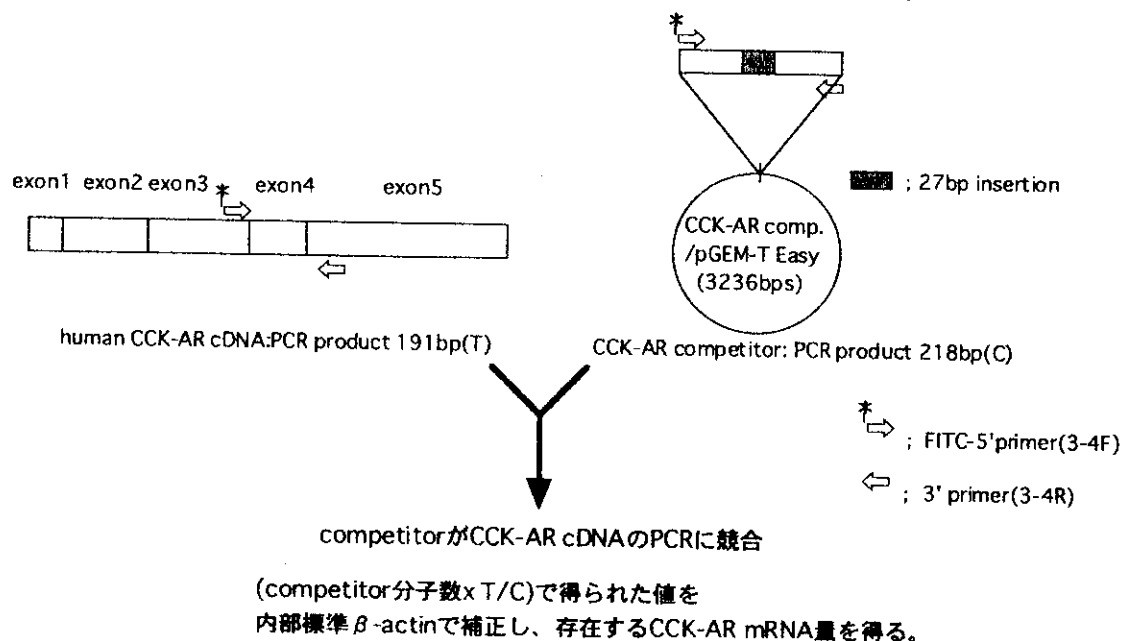
3. ヒト CCK-AR 遺伝子発現測定系の確立(Competitive PCR)

ヒト CCK-AR 遺伝子の競合 PCR は、特異プライマーに対し競合するよう設計された DNA(competitor)の共存下で、標的(CCK-AR)遺伝子 mRNA から逆転写反応で得た cDNA の PCR を行い、既知分子数の competitor に対する標的遺伝子産物の増幅率から、存在する遺伝子発現量を算出する。

Competitor は、ヒト CCK-AR 遺伝子の exon3 と 5 に設定した特異 primer(3-4F, 3-4R)で増幅して得られた PCR product(191bp)に、Stop codon Linker(Linker BamHI stop codon 28bp)を挿入し、作製した。塩基配列の確認(挿入 DNA の 1 塩基欠失)および特異 primer を用いた PCR から、CCK-AR competitor の PCR product は 218bp であることを認めた。次に、ヒト total RNA から逆転写反応により得た cDNA を既知分子数の CCK-AR competitor と共に PCR を行った。測定系の感度を高めるために、蛍光物質(FITC: Fluorescein Isothiocyanate)で標識した PCR primer を用いた。得られた蛍光標識された PCR 産物を尿素変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、標的物(T)と競合物(C)を分離後、蛍光イメージアナライザー(FM-BIO, TaKaRa)で取り込み、解析した。内部標準測定

のため、 β -actin 遺伝子の競合 PCR により得られた値を用いて CCK-AR 遺伝子競合 PCR の補正を行い、CCK-AR 遺伝子発現量を決定した。

Competitive PCR method (human CCK-AR mRNA)



この方法の確立により、微量組織からヒト CCK-AR 遺伝子プロモーター領域内多型の遺伝子発現について簡便に定量することが可能になった。

なおこれらの研究は、国立病院九州がんセンター消化器部、長寿医療研究センター疫学研究部、(株)三菱化学ビーシーエル研究第二部遺伝子解析部および東京都老人医療センター消化器内科との共同で行われた。

[研究業績]

鈴木 伸治、増田 正雄、宮坂 京子、吉田 由紀、自見 厚郎、篠崎 博嗣、船越 顕博(1999) CCK-A 受容体遺伝子ターゲティングマウスの胆汁、膵外分泌機能. 第30回日本膵臓学会大会(第7回日本消化器関連学会週間), 広島.

T. Kawanami, S. Suzuki, Y. Yoshida, S. Kanai, Y. Takata, T. Shimazoe, S. Watanabe, A. Funakoshi and K. Miyasaka. Different effects of trypsin inhibitors on intestinal gene expression of secretin and on pancreatic bicarbonate secretion in CCK-A-receptor-deficient rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 81: 339-345, 1999.

高田 豊、川浪 賢子、吉田 由紀、滝口 総一、船越 顕博(2000) ヒト Cholecystokinin A 型受容体遺伝子の転写に必須な領域とその DNA 多型. 第 59 回日本癌学会総会, 横浜.

鈴木 伸治、増田 正雄、宮坂 京子、吉田 由紀、佐藤 紀一、自見 厚郎、船越 顕博(2000) CCK-A 受容体遺伝子ターゲティングマウスの重炭酸イオン分泌機能. 第 31 回日本膵臓学会大会 (第 8 回日本消化器関連学会週間), 神戸.

増田 正雄、鈴木 伸治、佐藤 紀一、吉田 由紀、船越 顕博、宮坂 京子 (2000) 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 (第 8 回日本消化器関連学会週間), 神戸.

佐藤 紀一、鈴木 伸治、吉田 由紀、増田 正雄、宮坂 京子、船越 顕博 (2000) 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 (第 8 回日本消化器関連学会週間), 神戸.

S. Kanai, M. Masuda, S. Suzuki, M. Ohta, Y. Yoshida, A. Funakoshi, and K. Miyasaka(2000) Inhibitory effect of central calcitonin-gene related peptide(CGRP) on pancreatic secretion in conscious rats. Combined meeting of the International Association of Pancreatology and the American Pancreatic Association. Chicago, Illinois, November1-5, 2000.

S. Kanai, M. Masuda, S. Suzuki, M. Ohta, Y. Yoshida, A. Funakoshi and K. Miyasaka: Inhibitory effect of central calcitonin-gene related peptide (CGRP) on pancreatic secretion in conscious rats. *Jpn. J. Physiol.*, 50: 243-248, 2000.

III. 研究成果の刊行に関する1覧表			
雑誌名、巻、ページ、年、タイトル	年	著者	出版者
日本消化器病学会雑誌 97: 311-318, 2000.CCK-A受容体遺伝子異常と生活習慣病	2000	船越顕博、宮坂京子	
臨床消化器内科 15: 427-435, 2000. コレシストキニン(CCK)受容体	2000	船越顕博、宮坂京子	
胆と膵21: 205-212, 2000. 膵外分泌とCCK受容体	2000	船越顕博、篠崎博嗣、宮坂京子	
胆と膵 21: 193-198, 2000 膵外分泌の体液性調節—膵外分泌抑制ホルモン。	2000	宮坂京子、増田正雄、船越顕博	
消化器科 31: 642-649 特集「膵炎重症化の機序と対策」、膵炎重症化の機序	2000	鈴木伸治、宮坂京子、船越顕博	
Geriatric Medicine (老年医学)39: 70-75, 2001. 21世紀の高齢者疾患はどう変わるか—病型、診断法、治療法など、8) 肝。胆。膵疾患。	2000	木谷健一、宮坂京子	
Advances in Aging and Health Research 1999 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	2000	宮坂京子、船越顕博	長寿科学振興財団
ミレニアム消化器2000 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	in press	鈴木伸治、宮坂京子、船越顕博	
Pancreas, 20: 394-400, 2000. Oral administration of a synthetic trypsin inhibitor increases pancreatic duct function in CCK-A receptor-deficient rats.	2000	Kawanami T, Funakoshi A, Suzuki S, Kanai S, Sato Y, Miyasaka K	
Pancreas 20: 94-101, 2000. Regulation of pancreatic secretion by vagal nerve during short-term duct occlusion in conscious rats.	2000	Suzuki S, Kanai S, Miyasaka K, Jimi A, Funakoshi A	

Pancreas 21: 86-92, 2000. Induction of acute pancreatitis by cerulein in human IL-6 gene transgenic mice.	2000	Suzuki S, Miyasaka K, Jimi A, Funakoshi A	
J Epidemiology 10 (suppl) S-46-55, 2000. Distribution of geriatric disease-related genotypes in the National Institute of Longevity Sciences, Longitudinal Study of Anging (NILS-LSA).	2000	Shimokata H, Yamada Y, Nakagawa M, Okubo R, Saïdo T, Funakoshi A, Miyasaka K, Ohta S, Tsujiimoto G, Tanaka M, Ando F, Niino N.	
FEBS Lett 466: 264-266, 2000. Body fat content is related to cholecystokinin A receptor gene promotor polymorphism.	2000	Funakoshi A, Miyasaka K, Yamamori S, Takata Y, Kataoka K, Takiguchi S, Kono A, Shimokata H.	
Jpn J Physiol 50: 243-248, 2000. Inhibitory effect of central calcitonin-gene related peptide (CGRP) on pancreatic secretion in conscious rats.	2000	Kanai S, Masuda M, Suzuki S, Ohta M, Yoshida Y, Funakoshi A, Miyasaka K.	
J Nutr130: 2562-2567, 2000. Difference in diurnal rhythm of energy expenditure between rats with obesity and glucose intolerance, and streptozotocin-induced diabetic rats.	2000	Ichikawa M, Kanai S, Ichimaru Y, Funakoshi A, Miyasaka K.	
Jpn J Physiol, 50: 443-448,2000. Mechanism of delayed gastric emptying in naturally occurring CCK-A receptor gene knockout (OLETF) rats.	2000	M, Kanai S, Sato Y, Masuda M, Takahashi T, Jimi A, Funakoshi A, Miyasaka K.	

Jpn. J. Pharmacol. 83: 355-358, 2000. Entrainment function in the suprachiasmatic nucleus of streptozotocin-induced diabetic rats.	2000	Shimazoe T, Ishida J, Maetani M, Yakabe T, Yamaguchi M, Miyasaka K, Kono A,	
Neurosci Lett 293: 9-12, 2000. Effects of systemic injection of interleukin-1b on gastric vagal afferent activity in rats lacking type A cholecystokinin receptors.	2000	Kurosawa M, Bucinskaite V, Miyasaka K, Funakoshi A, Lundeberg T.	
Pancreas Inhibitory effect of somatostatin on CCK release is independent of luminal LCRF content in conscious rats.	in press	Miyasaka K, Masuda M, Kanai S, Ohta M, Suzuki S, Tateishi K, Funakoshi A.	

20000165

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。