

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

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、中四国在住の約 1,000 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、血圧などの検診データと、さらに白血球由来 DNA の遺伝子解析を行った。方法は、遺伝因子と環境因子との相互作用の検討、SNP (Single Nucleotide Polymorphism)の効率のよいタイピング法の開発、候補遺伝子の機能を解析するための転写調節領域の同定などである。

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

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、個人情報漏出しを防止するために、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、遺伝学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、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）を含む約 1,000 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、血圧などの検診データと、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。上記の集団の

B. 研究方法

研究方法は、対象となる集団を収集し、動脈硬化などの表現型について遺伝因子と環境因子との相互作用を検討する。SNP (Single Nucleotide

Polymorphism)の効率のよいタイピング法を見い出す。候補遺伝子の機能を解析するためにマウスモデルなどを作成することである。

老年病の遺伝子解析の例として、成人病の発症機構に対する遺伝因子と環境因子との相互作用を明らかにするために動脈硬化について、高血圧・動脈硬化に関わる候補として報告されているアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子の第 16 イントロンにおける挿入/欠失 (I/D) 多型と年齢の相互作用を解析した。さらに、肥満、高脂血症、高血圧、糖尿病と ACE 遺伝子多型との関連についても解析した。

また、脳神経細胞障害物質として働く thiolactone は体内の過剰なホモシステインによって産生され、paraoxonase: PON によって解毒されることより、高ホモシステイン血症を来す 5,10-methylen tetrahydrofolate reductase (MTHFR) と paraoxonase 遺伝子 (PON1) の遺伝子多型について、特発性パーキンソン病患者と健康対照者を比較した。

SNPs のタイピングについては、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、マイクロチップ型電気泳動装置の開発を目指した。

遺伝子機能解析の例として、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 受容体サブタイプタイプ 1 受容体 (AT1 受容体)、タイプ 2 受容体 (AT2 受容体) の発現を調節している転写調節領域の同定、AT1 受容体、AT2 受容体に結合する新規シグナル伝達物質の機能解析を目指した。

C. 研究結果

一般に、加齢に伴って IMT は増加するが、ACE 遺伝子多型の解析結果から、D キャリア (ID または DD) において、その肥厚速度が有意に高値であることが示された。また肥満、高脂血症、高血圧、糖尿病と ACE 遺伝子多型との関連について、疾患ごとの検討では ACE 遺伝子多型ごとに有意差は認められなかったが、4 疾患いずれか 1 つ以上を罹患している場合を従属とすると、D キャリア (ID または DD) において、その頻度が有意に増加していた。

また、パーキンソン病 (PD) では、MTHFR の稀な遺伝子型である Val 型の遺伝子頻度頻度が有意に高く、変異型のホモ接合体は正常型のホモ接合体に比べて約 2 倍の頻度であった。逆に PON1 の稀な遺伝子型頻度は PD 患者で有意に低かった。

さらに、種々のヒト遺伝子におけ

る SNP 検出のために、SSCP (single strand conformation polymorphism)解析をマイクロチップ上で実現するためのマイクロチップの設計と試作ならびに、遺伝子解析とその条件検討を進め、1-2 分程度で SSCP に基づく SNP 検出を実現した。

また、胎児血管平滑筋細胞において、AT2 受容体の-336--382 の部位に特異的に結合する転写調節因子結合 DNA 配列が存在する可能性が示唆された。AT2 受容体の細胞内サードループに特定的に結合する可能性が示唆される 70kDa の蛋白を得た。

D. 考察

ACE 多型において年齢を第 3 変数として投入した場合、IMT と遺伝子多型との間に有意な関連が認められたことは、環境因子を投入する必要性を示すものと考えられる。また成人病と ACE 遺伝子多型とについて、疾患ごとの検討では有意な関連を認めなかったが、いずれか 1 つ以上の疾患を有しているというモデルを想定した場合、D アレルが危険因子であることが示されたことは、ACE 遺伝子多型がそれぞれの疾患発症に対し、単独では十分な因子負荷を持ち得ないことを示唆している。換言すれば、「成人病」という表現型をいかに捉えるか、適切な観測変数の必要性を

示すものと考えられる。

MTHFR 型の Val 型のホモ接合体で、PON1 の Gln 型のホモ接合体が最も PD の発症の高いことが明らかとなったが、MTHFR と PON1 の遺伝子型多型は心筋梗塞の発症危険因子でもある。そこで、高齢者集団における MTHFR 遺伝子や PON1 遺伝子型を検討して、これらの遺伝子型頻度の加齢による影響をさらに検討する必要性、さらに PD 患者での MTHFR と PON1 遺伝子の遺伝子多型と患者の血漿ホモシステイン濃度と PON の酵素活性との関係と解析し、遺伝子型変異と PD 発症との相関を直接検討する必要性が示唆された。

マイクロチップ上での SSCP では、今後ポリマーの充填方法を改善することにより、高粘性のポリマー溶液も使用可能となり、さらに高い Separation Selectivity 値が得られるだろう。また温度コントローラーを用い、より低温でマイクロチップ電気泳動による SSCP を行うことで、分離度のさらなる改善が期待できる。さらにマイクロチップ電気泳動を用いた超高速 PCR 増幅技術も開発されつつあり、CE-SSCP、マイクロチップ電気泳動による SSCP に、これらの高速 PCR 法を結びつけることで、より高速な SSCP 解析が可能となることが期待される。

IRF が AT2 受容体の発現に重要であることが示唆され、IRF 以外の転写調節因子も血管平滑筋細胞の AT2 受容体発現に関与している可能性も示唆された。また AT2 受容体細胞内サードループに特異的に結合する 70kDa のシグナル伝達蛋白を得たので、cDNA をクローニングする必要があると考えられる。AT1 受容体の C-末端とは結合するが、AT2 受容体の C-末端とは結合しない ATRAP が AT1 受容体に特徴的で AT2 受容体では認められないインターナリゼーション、デセンシタイゼーションに関与している事も示唆された。

E. 結論

ACE 遺伝子多型の解析結果から、D キャリア (ID または DD) において、IMT の肥厚速度が有意に高値であることが示された。また肥満、高脂血症、高血圧、糖尿病と ACE 遺伝子多型との関連について、4 疾患いずれか 1 つ以上を罹患している場合を従属とすると、D キャリア (ID または DD) において、その頻度が有意に増加していた。これらの結果から表現型として適切な変数を見だし、適切な環境因子を把握・測定し、遺伝-環境相互作用を踏まえて解析することの重要性が示唆された。

孤発例の特発性 PD 患者集団におけ

る MTHFR の Ala677Val と PON1 の Gln 192Arg の遺伝子多型を、健常対照者集団と比較した結果、MTHFR の Val 型と PON1 の Gln 型が PD の発症危険因子となることが示唆された。日本人ではこれらの遺伝子型をホモ接合体の頻度は約 6% である。今後、これらの人々には若い時から高ホモシステイン値を生じないように、生活習慣の確立、特に MTHFR の機能促進をはかるために葉酸の摂取を心がけるような食事習慣の確立を啓発し、特にホモシステイン値の高い人々には、葉酸の予防的内服も考慮される。

SSCP に基づくマイクロチャンネル電気泳動を用いて、SNP 検出に要する時間を劇的に短縮することができた。これらの成果は、SNP 検出による老年病・生活習慣病の候補遺伝子多型解析に大いに威力を発揮するものと考えられる。ただし、現時点でのマイクロチャンネル電気泳動による SNP 解析の精度は、従来法より若干低くなっており、今後は、SNP 解析の精度向上とさらなる高速化を目指した研究を進めることが極めて重要である。また今後は、複数のマイクロチャンネルアレイを作成し、よりスループットの高い SNP 解析システムの構築を進めることが重要である。

血管の発生、分化、血管病変にお

ける AT2 受容体の特異的発現が血管リモデリングに重要であり、IRF をはじめ、特異的な転写調節因子が重要である事が示唆された。AT1 受容体、AT2 受容体のシグナル伝達を規定する新規シグナル伝達物質が得られたので、今後はその機能の解析を行う。

今後、老年病の遺伝子解析法、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開発していく予定である。

老年病感受性遺伝子の解析

三木哲郎 愛媛大学医学部老年医学教授

一般に、加齢に伴って IMT は増加するが、ACE 遺伝子多型の解析結果から、D キャリア (ID または DD) において、その肥厚速度が有意に高値であることが示された。また肥満、高脂血症、高血圧、糖尿病と ACE 遺伝子多型との関連について、疾患ごとの検討では ACE 遺伝子多型ごとに有意差は認められなかったが、4 疾患いずれか 1 つ以上を罹患している場合を従属とすると、D キャリア (ID または DD) において、その頻度が有意に増加していた。

A. 研究目的

成人病の発症には、加齢、性別に加えて、環境因子と遺伝因子とが交絡して関与している。このうち環境因子としては、肥満、喫煙、飲酒、運動不足、偏向した食生活、ストレスなどが挙げられる。一方、遺伝因子に関しては、現在、多くの候補遺伝子について成人病発症との関わりが検討されているが、確立した指標を得るには至っていない。その理由としては、主に成人病発症が多くの環境因子によって左右されており、かつ交絡した遺伝因子との相互作用を解明するのが困難なためである。しかしながら社会の高齢化は急速に進行しており、その健全性を保つためには、成人病発症に関わる交絡因子の解明は急務の課題である。特に「健康余命」が注目される中、一次予防のための保健学的介入が必要と

されているため、その重要性はより一層強調されなければならない。そこで本研究では、成人病の発症機構に対する遺伝因子と環境因子との相互作用を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

研究者らが設定している国内の二つのコホート（一般地域住民）を対象に、成人病発症に関わる各種背景因子・臨床検査成績と、一塩基遺伝子置換（SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms）との相互作用を解明するため、コホート A においては動脈硬化と遺伝子多型について、コホート B においては肥満、高脂血症、高血圧、糖尿病発症と遺伝子多型との関連について検討した。

【対象】コホート A からは、50 歳以上のもの全員（平成 10 年 7 月 1 日

現在 698 名) を抽出し、このうち文書によって本調査研究に同意が得られ、かついずれの測定項目にも欠損を有さない 205 例を解析対象とした。対象者の内訳は、男性 69 人 (71±9 歳)、女性 136 人 (70±9 歳) であった。コホート B からは成人男性 300 名 (29~59 歳) を解析対象とした。本対象者はいずれの測定項目にも欠損値を有さず、かつ本調査研究に対する文書による同意が得られている。なお両コホートにおいて、降圧薬等を服薬していた対象者は事前に解析から除外した。

【遺伝子解析】DNA は対象者血液より抽出した (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)。解析する遺伝子多型として、高血圧・動脈硬化に関わる候補として報告されているアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子の第 16 イントロンにおける挿入/欠失 (I/D) 多型を選定した。解析はセンスプライマー: 5'-GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT-3'、およびアンチセンスプライマー: 5'-GGA TGG CTC TCC CCG CCT TGT TCT C-3' を用いたポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長法 (PCR-RFLP 法) にて行った。

【内膜中膜複合体厚の測定】コホート A における内膜中膜複合体厚 (IMT) の測定は右頸動脈にて行っ

た (Aloka SSD-900)。7.5Mhz のプローブを使用し、内頸動脈と外頸動脈の分岐部から約 1 cm 中枢側遠位側にて測定した。測定は前射位、側射位、後射位から行い、各値の平均をもって指標とした。なお周囲の壁厚より 50% 以上の肥厚が認められる部位は測定より除外した。

【臨床検査】コホート B における臨床検査は、一晚絶食後に行った。中性脂肪、総コレステロールは定法に則って測定し、それぞれ 220 mg/dl、150 mg/dl 以上を高脂血症と判断した。糖尿病は 75 g のブドウ糖負荷試験の成績から判断した。血圧は安静臥床にて測定し、収縮期血圧 140 mmHg あるいは拡張期血圧 90 mmHg 以上を高血圧とした。肥満は BMI を指標とし、26 kg/m² 以上とした。

【統計解析】各遺伝子多型の頻度およびハーティ・ワインベルグ平衡の検定は χ^2 二乗分析にて行った。多型間の表現型の差違は分散分析 (ANOVA) にて比較した。各種危険因子と遺伝子多型の交互作用は共分散分析 (ANCOVA) または一般線形分析 (GLM) にて検討した。統計解析には JMP ver.4 (SAS Institute, Cary, USA) 及び SPSS ver.10 (SPSS Inc, Chicago, USA) を用いた。

C. 研究結果

【IMT と遺伝子多型】コホート A における解析対象者の背景を表 1 に示した。表記はしていないが、人口的要因、血圧および血漿成分のいずれにおいても、ACE 遺伝子多型間で有意な差は認められなかった。

ACE 遺伝子多型と IMT との関連を表 2 に示した。IMT は II<ID<DD の順に増加する傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。

ACE 多型とともに環境要因として年齢を加味した場合について図 1 に示した。一般に、加齢に伴って IMT は増加するが、危険因子とされている D キャリア (ID または DD) において、その肥厚速度が有意に高値であることが示された ($F[1,196]=4.97, p=0.027$)。

【成人病発症と遺伝子多型】コホート B における解析対象者の背景を表 3 に示した。DD キャリアにおいて、収縮期および拡張期血圧が有意に高値を示したが、その他について有意差は認められなかった。

他方、肥満、高脂血症、高血圧、糖尿病と ACE 遺伝子多型との関連について表 4 に示した。疾患ごとの検討では ACE 遺伝子多型ごとに有意差は認められなかったが、4 疾患いずれか 1 つ以上を罹患している場合を従属とすると、D キャリア (ID または DD) において、その頻度が有意に

増加していた。

D. 考察

遺伝子多型と各種臨床検査成績または成人病発症との関連は ACE に留まらず、肯定的な成績と否定的なものとの混在している。これは IMT との関連においても同様であり、初報以来、特に一般住民を対象とした検討では否定的な見解が多い。他方、糖尿病患者や高血圧者等を対象とした場合では、両者に有意な関連を認めており、換言すれば遺伝子多型単独では十分な影響力を示し得ないことを暗示している。本報告においても、ACE 多型において年齢を第 3 変数として投入した場合、IMT と遺伝子多型との間に有意な関連が認められたことは、環境因子を投入する必要性を示すものである。一般に動脈硬化は複数の環境要因が影響することが知られている。また動脈硬化に限らず、成人病発症には多くの環境因子が関与している。今後これら疾患のメカニズムを解明するにあたっては、環境要因の投入が必要と考えられる。

一方、成人病と ACE 遺伝子多型については、疾患ごとの検討では D キャリアの頻度が高値であるものの、有意な関連を認めなかった。しかし、いずれか 1 つ以上の疾患を有してい

るというモデルを想定した場合、D アレルが危険因子であることが示された。このことは、ACE 遺伝子多型がそれぞれの疾患発症に対し、単独では十分な因子負荷を持ち得ないことを示唆している。換言すれば、「成人病」という表現型をいかに捉えるか、適切な観測変数の必要性を示すものである。

今後、成人病発症の機構を解明するにあたり、1) 表現型として適切な変数を見だし、2) 適切な環境因子を把握・測定し、3) 遺伝-環境相互作用を踏まえて解析することが重要であると考えられる。

E. 結論

一般に、加齢に伴って IMT は増加するが、ACE 遺伝子多型の解析結果から、D キャリア (ID または DD) において、その肥厚速度が有意に高値であることが示された。また肥満、高脂血症、高血圧、糖尿病と ACE 遺伝子多型との関連について、疾患ごとの検討では ACE 遺伝子多型ごとに有意差は認められなかったが、4 疾患いずれか 1 つ以上を罹患している場合を従属とすると、D キャリア (ID または DD) において、その頻度が有意に増加していた。これらの結果から表現型として適切な変数を見だし、適切な環境因子を把握・測定し、

遺伝-環境相互作用を踏まえて解析することの重要性が示唆された。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Ohishi M, Rakugi H, Miki T, Katsuya T, Okamura A, Kamide K, Nakata Y, Takami S, Ikegami H, Yanagitani Y, Tabuchi Y, Kumahara Y, Higaki J, and Ogihara T. Deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene is associated with postprandial hyperglycaemia in individuals undergoing general check-up. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27: 483-487, 2000
2. Uemura K, Kohara K, Nakura J, and Miki T. Deletion polymorphism of ACE gene is associated with higher blood pressure after hospitalization in normotensive subjects. *Hypertension Research* 23:201-205, 2000
3. Uemura K, Nakura J, Kohara K, and Miki T. Association of ACE I/D polymorphism with cardiovascular risk factors. *Human Genetics* 107: 239-242, 2000
4. Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, and Miki T. Orthostatic

hypertension: another orthostatic disorder to be aware of. Journal of American Geriatric Society 48: 1538-1539, 2000

2) 学会発表

1. Etoh H, Kohara K, Tabara Y, Igase M, Yamamoto Y, Ueki S, Yano H, Ohnishi M, Uemura K, Nakura J, and Miki T. Post prandial hypotension evaluated by 24-hour blood pressure monitoring. The 15th scientific meeting, American Society of Hypertension, 2000
 2. Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, Ueki S, Yano H, Ohnishi M, Igase M, Uemura K, Nakura J, and Miki T. Orthostatic hypertension is associated with carotid atherosclerosis: Sekizen study, Japan. The 15th scientific meeting, American Society of Hypertension, 2000
 3. Tabara Y, Kohara K, Yamamoto Y, Ueki S, Yano H, Ohnishi M, Igase M, Uemura K, Nakura J, and Miki T. Genetic predisposition of orthostatic dysregulation of blood pressure in the elderly in Sekizen, Japan. The 15th scientific meeting, American Society of Hypertension, 2000
 4. Tabara Y, Kohara K, Yamamoto Y, Ueki S, Yano H, Ohnishi M, Igase M, Uemura K, Nakura J, and Miki T. Carotid atherosclerosis and gene polymorphisms of renin angiotensin system in elderly subject in Sekizen, Japan. The 15th scientific meeting, American Society of Hypertension, 2000
 5. Zhang J, Kohara K, Yamamoto Y, Nakura J, Uemura K, Tabara Y, Katagi R, and Miki T. Symptomatic cerebral infarction and ACE I/D polymorphism in Japanese patients: comparison with asymptomatic cerebral infarction. The 15th scientific meeting, American Society of Hypertension, 2000
 6. Kohara K, Jiang YN, Igase M, Miki T, and Hiwada K. Mechanical forces and carotid atherosclerosis in patients with risk factor atherosclerosis. 54 th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, 2000
- 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

表 1 対象者の背景

年齢 (歳)	70±9
性別 (男/女)	66/139
BMI (kg/m ²)	22.8±3.0
収縮期血圧 (mmHg)	135±22
拡張期血圧 (mmHg)	74±10
総コレステロール (mg/dl)	183±43
LDLコレステロール (mg/dl)	49±15
HDLコレステロール (mg/dl)	108±33
血糖 (mg/dl)	104±34

平均値±標準偏差

表 2 ACE 遺伝子多型と IMT

		n	IMT (X10E-1 mm)
ACE	II	83	7.9±1.2
	ID	95	8.0±1.4
	DD	27	8.1±1.4

平均値±標準偏差

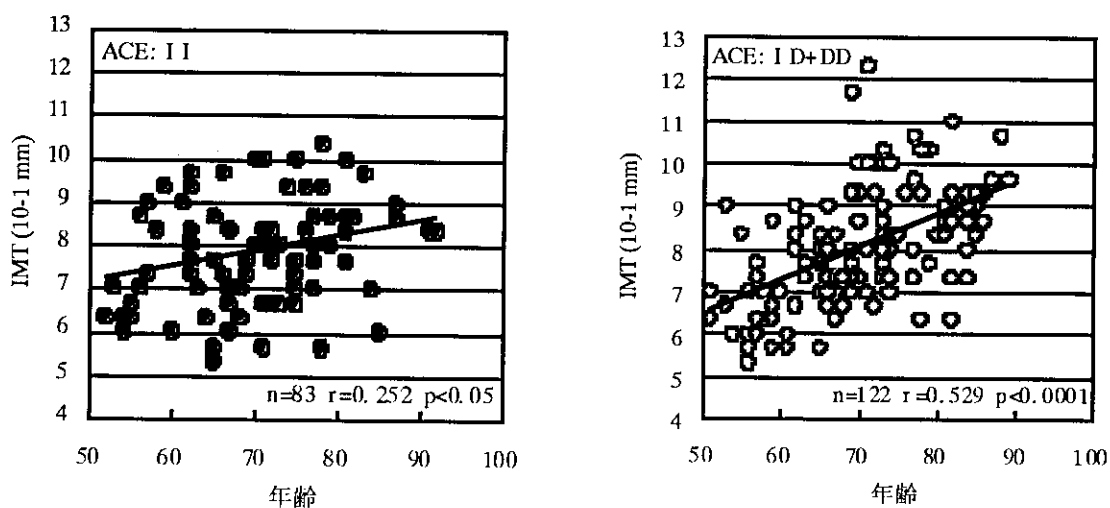


図 1 ACE 多型別の加齢に対する IMT 肥厚

表 3 ACE 遺伝子多型別解析対象者の背景

	II (n=132)	ID (n=125)	DD (n=43)	p
年齢 (歳)	51±5	51±5	52±5	NS
BMI (kg/m ²)	22.8±2.3	23.4±2.7	23.1±3.1	NS
収縮期血圧 (mmHg)	119±15	121±15	126±17	0.007
拡張期血圧 (mmHg)	76±12	79±11	81±12	0.026
総コレステロール (mg/dl)	193±27	196±30	186±24	NS
LDLコレステロール (mg/dl)	127±31	129±33	116±29	NS
HDLコレステロール (mg/dl)	43±15	41±14	43±13	NS
中性脂肪 (mg/dl)	116±72	132±68	135±65	NS
血糖 (mg/dl)	103±19	101±15	106±27	NS

平均値±標準偏差

表 4 成人病と ACE 遺伝子多型との関連

	II (n=132)	ID (n=125)	DD (n=43)	p
肥満	11 (8.3)	16 (12.8)	6 (14.0)	NS
高脂血症	39 (29.5)	50 (40.0)	19 (44.2)	NS
高血圧	25 (18.9)	29 (23.2)	12 (28.0)	NS
糖尿病	13 (9.8)	11 (8.8)	6 (14.0)	NS
上記疾患一つ以上	62 (47.0)	76 (60.8)	30 (69.8)	NS

人数 (%)

パーキンソン病発症素因としての高ホモシステイン血症の遺伝子の検討

近藤 郁子 (愛媛大学医学部教授)

脳神経細胞障害物質である thiolactone は体内のホモシステインによって産生され、paraoxonase (PON) によって解毒される。従って、特発性パーキンソン病 (PD) では持続的な軽度の高ホモシステイン血症によって thiolactone 産生が高まり、さらに PON の機能低下によって神経毒を長く保有する可能性がある。そこで、高ホモシステイン血症を来す 5,10-methylen tetrahydrofolate reductase (MTHFR) と PON 遺伝子 (PON1) の遺伝子多型について、PD 患者と対照者の遺伝子頻度を比較した結果、PD 患者では MTHFR の minor allele 頻度が有意に高く、PON1 の minor allele 頻度は有意に低かった。これらの結果、パーキンソン病の発症はチオラクトン産生に関わる遺伝性素因が関与することが示唆された。

A. 研究目的

高齢者に発症頻度の高い老人性痴呆とパーキンソン病 (PD) は、加齢と共に神経細胞が生体内外因子によって障害され、特に海馬の神経細胞の消失により老人性痴呆を、特に黒質神経細胞の消失により PD の発症にいたることが示唆される多因子遺伝性疾患である。日本人の長寿化と共に、健康でいきいきした長寿生活を維持、促進するために、高齢者に発症頻度の高い老人性痴呆や PD の発症予防は極めて重要な研究課題である。最近、ゲノム情報の蓄積によって生活習慣と遺伝要因の関係が取りざたされる多因子遺伝性疾患の遺伝性要因の解明が重点的に行われようとしている。そこで、我々はホモシステインが数多くの遺伝子の発現調節に関わる DNA 部位のメチル化に際して、メチル基の提供に関わり、メチオニン-ホモシステイン代謝過程のカギになるアミノ酸であることに注目し、高ホモシステイン血症を来す遺伝的危険因子が PD の発症危険因子となりうるのではないかと考えた。高ホモシステイン血症の原因遺伝子として、Cystathionine-synthase (CBS)、

methionine synthase (MS)、5,10-methylen tetrahydrofolate reductase (MTHFR)、methionine synthase reductase (MTRR) などの遺伝子変異が同定されている。また、これらの遺伝子には遺伝子型多型を示す遺伝子変異が存在し、遺伝子型と血中ホモシステイン濃度との間に有意な相関が報告されている。中でも MTHFR の遺伝子型多型は虚血性心疾患の危険因子として広く検討されているので、PD 患者における MTHFR の遺伝子多型の頻度を検討した。さらに、高ホモシステイン状態の持続はホモシステインから神経毒である thiolactone への変換が生じ、thiolactone は血漿 paraoxonase (PON) によって無毒化される。そこで、PON 酵素活性の遺伝的多型である PON1 遺伝子多型頻度を PD の発症に関与することが示される。1997 年に我々は検討した PON1 遺伝子多型に加えて、新しい多型の遺伝子型を加えて PD 患者における遺伝子頻度を検討した。

B. 研究方法

1) 研究対象者

四国の地方都市在住の年齢 40 歳から 85 歳の特発性パーキンソン病患者 182 名を研究対象者とした。家族歴には特記すべき疾患はなく、全て孤発性の PD 病患者である。ドパミンに良く反応し、病態はヤールの 2 から 4 である。健常対照群は運動障害や生活習慣病を持たない健康な男女 380 名とした。実験材料採集にあたっては、研究目的と研究方法について説明を行い、研究結果を公表するにあたっては個人情報十分に保護されることを説明し、了解の得られた研究参加者より採血した。

2) 遺伝子解析

採血された末梢血より、DNA を抽出し、遺伝子解析の材料とした。遺伝子変異の同定は既知の報告に基づき、polymerase chain reaction(PCR)法を用いて変異部分を増幅し、制限酵素で切断の後、電気泳動し遺伝子型を判定した。MTHFR の遺伝子型は 677 番目のアミノ酸の Ala 型と Val 型を判定した。PON1 遺伝子多型は 192 番目のアミノ酸の Ala 型と Val 型を判定した。さらに 55 番目のアミノ酸である Leu 型と Met 型の遺伝子頻度も解析した。

C. 研究結果

1) MTHFR の遺伝子型

360 人の健康対照者集団における MTHFR 遺伝子の 677 番目のアミノ酸置換である Val 型の遺伝子頻度は 0.36 であった。一方、PD 患者集団での Val 型の頻度は 0.41 と高く、Ala/Ala 型が 62 名、Ala/Val 型が 91 名、Val/Val 型が 29 名であった。遺伝子型分布は遺伝子頻度に基づいて算出された予測分布と全く一致して偏りはみられなかったが、変異型である Val 型が一般集団より高く、統計的有意差がみられた ($P < 0.0076$)。すなわち、Val 型のホモ接合体の PD 患者は Ala 型のホモ接合体の 2 倍の発症危険率を示した ($P <$

0.0096)。

2) PON1 の遺伝子多型

1. Gln192Arg 型の遺伝子頻度 162 名のパーキンソン病患者における Arg 型の頻度は 0.272 であった。Gln/ Gln 型の患者は 84 名、Gln/Arg 型は 68 名、Arg/Arg 型は 11 名で、遺伝子頻度に基づいて予測される遺伝子型分布を示した。一方、252 名の健常対照者集団での Arg 型の遺伝子頻度は 0.38 で、PD 患者に比べて有意に高値を示した ($P < 0.025$)。この結果、PON1 の稀な遺伝子型である Arg 型は PD の発症の予防に働くことが示唆された。

2. Leu55 Met 型の遺伝子頻度 PD 患者での Leu 型の遺伝子頻度は 0.913 で、稀な遺伝子型である Met 型の頻度は 0.087 であった。一般健常者集団においても PD 患者と同様に Met 型の遺伝子頻度は 0.10 と低く、2 群間では有意差はみられなかった。

D. 考察

従来、遺伝子型多型を示す遺伝子群における遺伝子型多型の分布は、日本人と白人集団では異なることがしばしば観察された。先天性高ホモシステイン血症の患者頻度も民族によって異なるが、日本人では極めて低く、新生児スクリーニングで発見される患者頻度は 90 万人に 1 人である。しかし、健康対照者集団における軽度の高ホモシステイン値を伴う MTHFR の遺伝子の Val 型遺伝子の頻度は、日本人にと白人の間で有意はみられず、0.36 前後であった。この値は従来日本人集団での結果と同じであった。このことは、Ala677Val 型の遺伝子多型は、人間の従来生活習慣においては生命の脅威となることなく、長く保存され、伝搬されて来たことが示唆される。しかし、PD 患者では Val 型の頻度が有意に高く、軽度ではあるが持続的なホモシステインの高値は thiolactone 産生を促進し、加齢と

ともに、神経細胞維持に影響することが示唆された。今後の日本人においては、生活習慣の変化、特に食事内容の変化により、高血糖、肥満、高脂血症などの動脈硬化因子の高まりが予想される。これらの因子は脳血管の健康への危険因子である。これらの外的、環境的因子がPDの内的因子をもつ個人に加重されることによって、今後のPD患者の増加が心配される。

一方、PON1の遺伝子型多型では通常型のGln型の遺伝子頻度がPD患者で高く、稀な遺伝子型のArg型はPDに予防的に機能している可能性が示唆された。この結果、遺伝子頻度の高いMTHFRとPON1の遺伝子型はPD発症に相補的に働くことが示唆された。我々の結果ではMTHFR型のVal型のホモ接合体で、PON1のGln型のホモ接合体が最もPDの発症の高いことが明らかとなり、約6%の日本人はPDの危険因子の2つともにホモ接合体になる。MTHFRとPON1の遺伝子型多型は心筋梗塞の発症危険因子でもある。そこで、今後、高齢者集団におけるMTHFR遺伝子やPON1遺伝子型を検討して、これらの遺伝子型頻度の加齢による影響をさらに検討する必要があるが、今後さらにPD患者でのMTHFRとPON1遺伝子の遺伝子多型と患者の血漿ホモシステイン濃度とPONの酵素活性との関係と解析し、遺伝子型変異とPD発症との相関を直接検討することによって、今回の結果の有用性が明らかになるであろう。

E. 結論

孤発例の特発性PD患者集団におけるMTHFRのAla677ValとPON1のGln192Argの遺伝子多型を、健常対照者集団と比較した。その結果、MTHFRのVal型とPON1のGln型がPDの発症危険因子となることが示唆された。日本人ではこれらの遺伝子型をホモ接合体の頻度は約6%である。従

って、約20人に1人は遺伝的にPDを発症しやすい危険因子を持つことになる。今後、これらの人には若い時から高ホモシステイン値を生じないような生活習慣の確立、特にMTHFRの機能促進をはかるために葉酸の摂取を心がけるような食事習慣の確立を啓発し、特にホモシステイン値の高い人には、葉酸の予防的内服も考慮される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Obata K, Matsuishi T, Yamashita Y, Fukusa T, Kuwajima K, Horiuchi I, Nagamitsu S, Iwanaga R, Kimura A, Omori I, Endo S, Mori K. and Kondo I. Mutation analysis of methyl-CpG binding protein 2 (MECP2) in patients with Rett syndrome. *J Med Genet* 38: 608-610, 2000
- 2)Shigenomoto K, Kubo S, Maruyama N, Yamada S, Obata K, Kikuchi K, and Kondo I. Identification and characterization of 5' extension of mammalian agrin exons and the promoter sequences. *Biochem Biophys Acta* 1494: 170-174, 2000

2. 学会発表

- 1)吉村脩、山縣英久、近藤郁子 心筋梗塞の遺伝的多型に関する研究(3報)第70回日本衛生学会(平成12年3月)
- 2)近藤郁子、山縣英久、吉村脩 CYP2A6の遺伝子多型とパーキンソン病の相関 第70回日本衛生学会(平成12年3月)
- 3)近藤郁子 Mutations and parent origin of MeCP2 gene in Rett syndrome 第10回国際Rett症候群会議(平成12年7月、軽井沢)
- 4)近藤郁子 Rett症候群とMeCP2遺伝子 第7回日本遺伝子診療学会(平成12年7月)

候補遺伝子機能の解析

分担研究者 堀内正嗣 愛媛大学医学部医化学第一講座

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受容体サブタイプ1受容体(AT1受容体)、タイプ2受容体(AT2受容体)に焦点を当て、これら受容体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AT1受容体、AT2受容体の発現、機能変化に与える影響を検討する。このため、AT1受容体、AT2受容体遺伝子の発現を調節している転写調節因子の同定、更に病態生理的意義の解明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。同時にAT1受容体、AT2受容体に結合する新規シグナル伝達物質の機能解析、SNPを探す研究を三木教授の研究グループとの共同にて行う。

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事は病態解明の鍵となると共に心血管老化への対応にも必須の課題である。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事が知られている。堀内等が新しくクローンした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事が最近、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AT1受容体、増殖因子と拮抗して働く事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 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事を示唆している。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 の生理作用を検討したところ、AT2 受容体遺伝子欠損マウスでは血管分化の遅延、血管障害時での血管平滑筋細胞増殖亢進、新生内膜の過剰増殖を認めた。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事を観察した。現在、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

用を検討しつつある。これら遺伝子の生理機能を検討すると共に同時に AT1 受容体、AT2 受容体遺伝子の SNP を探す目的の研究も同時に進める。

ところで、AT1 受容体、AT2 受容体のシグナル伝達特異性を決定するのにどの部位が大切であるかは今後の興味であるばかりでなく、新しい創薬研究にとっても重要である。AT2 受容体の構造に注目すると、AT2 受容体は他の 7 回膜貫通型受容体に比べドパミン D3, セロトニン SSTR1 受容体、Frizzle 蛋白等と共通した特徴的な細胞内サードループを有する受容体であり、これら受容体は、未知の G 蛋白またはシグナル伝達物質と結合し、チロシン脱リン酸化酵素を活性化する事により、抗増殖作用、アポトーシス誘導作用を示すことが報告されており、新しいタイプの受容体ファミリーを構成する可能性が考えられ興味深い。この可能性を検討するため、AT1 受容体、AT2 受容体及びセロトニン SSTR1 のサードループに相当する合成ペプチドを血管平滑筋細胞に導入したところ、Ang II の刺激は必要とせず AT2 受容体及びセロトニン SSTR1 のサードループは ERK 活性化を阻止する事により、細胞増殖を抑制した。また、AT2 受容体の細胞内サードループが、K チャネルの開口に重要であるとの報告

もなされている。以上の結果より、これら受容体のシグナル伝達の特異性を決定するのに細胞内サードループが重要である事が推測される。そこで、AT2受容体の細胞内サードループに特異的に結合する新規シグナル伝達物質をクローニングし解析する事を目的とする。

更にAT1受容体のC-末端がインターナリゼーションに関与している事、AT2受容体ではインターナリゼーションが認められない事を考え併せると、C-末端の差異もこれら両受容体の機能の違いに関与している可能性が示唆される。そこで我々は、Yeast Two Hybrid Systemにより、AT1受容体のC-末端とは結合するが、AT2受容体のC-末端とは結合しない ATRAP(AT1 Receptor Associated Protein)と命名した新規シグナル伝達物質をクローニングし、現在、その機能解析を行っている。

B. 研究方法

Interferon Regulatory Factor (IRF) が AT2 受容体の発現に関与するという *in vitro* での結果及び、*in vivo* での実験結果を得ているので、野生型、AT2 受容体遺伝子欠損マウス、IRF 遺伝子欠損マウス胎生期、生後の各時期の大動脈、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。更に血管傷害モデルを用い、IRF 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。

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事は 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。現在 IRF を候補転写調節因子として同定しているが、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事により 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事により検討していく予定である。

AT1 受容体、AT2 受容体のシグナルレベルでのクロストークを解明す

るため、AT1 受容体、AT2 受容体が内因性に発現しているラット胎児より調整した血管平滑筋細胞に dominant-negative SHP-1, 対照として dominant-negative SHP-2 を遺伝子導入し、SHP-1 活性、ERK 活性、Akt 活性、アポトーシスの指標として、caspase-3 活性を測定した。我々は AT1 受容体、AT2 受容体のシグナル特異性を決定するのに細胞内サードループに焦点を絞り、AT2 受容体特異的シグナルに必須の細胞内サードループ内のアミノ酸を特定、AT2 受容体に結合する新規シグナル伝達物質を、酵母細胞を用いた two-hybrid system によりクローニングを行いつつあるが、同時に AT2 受容体細胞内サードループアフィニティカラムなどを用いた精製を試みている。更に AT1 受容体の C-末端のみに特異的に結合する ATRAP をクローニングしたので、AT1 受容体のみを発現しているラット成体より調整した血管平滑筋細胞に遺伝子導入し、その機能を解析した。現在、ATRAP の血管リモデリングにおける意義を検討しつつある。

(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

IRF-1 遺伝子欠損マウスでは、血管傷害による AT2 受容体発現が野生型に比べ低下しており、新生内膜肥厚が増加していた。また、胎児期 20 日、生後 10 週のラット大動脈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したところ、-336--382 の部位に胎児血管平滑筋細胞において、特異的に結合する転写調節因子結合 DNA 配列が存在する可能性が示唆された。

ラット胎児より調整した血管平滑筋細胞において、AT1 受容体の刺激にて SHP-1 活性は影響を受けず、ERK 活性、Akt 活性の上昇、caspase-3 活性の低下が観察された。AT2 受容体刺激により SHP-1 活性上昇、ERK 活性、Akt 活性の低下、caspase-3 活性の上昇が認められた。これらの AT2 受容体刺激による変化は、dominant-negative SHP-1 の導入により、減弱され、dominant-negative SHP-2 導入にては変化を受けなかった。

AT2 受容体細胞内サードループアフィニティカラムなどを用いた精製を試み、現在、37kDa, 70kDa の 2 種類の異なった蛋白を得たので、アミ