

厚生科学研究費補助金総合研究報告書  
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、中四国在住の約 3,000 人を対象とし、高血圧候補遺伝子の交絡要因からの検討ならびに、頸動脈硬化に及ぼす各種可溶性動脈硬化関連因子の測定を行った。高血圧に関して GNAS1 と喫煙との相互作用、高血圧、肥満、糖尿病に関して NOS3 と中性脂肪との相互作用、同じく高血圧、肥満、糖尿病に関して ADRB2 と中性脂肪との相互作用に有意な結果が得られた。ゲノムワイドスクニングでは、交絡因子との相互作用の解析を取り入れたことによって、 $p < 10^{-6}$  の約 20 のマーカーを選別することができた。頸動脈硬化に関しては、一般住民を対象として、詳細な検討を行い、頸動脈硬化と血中の接着因子、クラミジア持続感染、HGF との関連性を明らかにした。

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

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、老年病の発症に重要な要因である高血圧および頸動脈硬化について総合的な研究を行った。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）を対象とした。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、末梢白血球由来の高分子量 DNA

の遺伝子解析を行った。また島嶼部の集団において、老年病の発症と密接な関係を有する頸動脈硬化に対する総合的な検討を行う目的で、遺伝要因、クラミジア・ニューモニエ持続感染、可溶性肝細胞増殖因子 (HGF) と頸動脈硬化の関係につき検討した。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。

## B. 研究方法

### (I) 高血圧候補遺伝子の探索

既知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の解析に関して29種類の遺伝子型決定を進め、他集団における相関の再現性を確認する解析や条件を揃えたメタアナリシスによって解析の信頼性を高める。さらに、マイクロサテライトマーカーによるゲノムワイドスクニングを進めることにより未知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の解析を試みた。さらに、他集団における相関の再現性を確認する解析や条件を揃えたメタアナリシスによって解析の信頼性を高める。

### (II) 頸動脈硬化の統合的検討

約300名の住民集団を対象として、頸動脈エコーを用いた頸動脈硬化の評価と、クラミジア・ニューモニエ持続感染との関連、可溶性HGFとの関連、遺伝要因を検討した。頸動脈の遺伝的要因として、レニン・アンジオテンシン系の遺伝子多型と血中の可溶性接着因子との関連につき検討した。クラミジア・ニューモニエの持続感染は、クラミジア・ニューモニエの抗体値をELISAを用いて測定し、IgAおよびIgGが共に陽性を示した者を、陽性群とした。クラミジア・ニューモニエ抗体価と頸動脈硬化、血中可溶性接着因子との関連について検討した。さらに、血中HGFは、ELISAにより測定し、頸動脈リモデリングとの関係について検討した。

## C. 結果

### (I) 高血圧候補遺伝子の探索

サンプルの収集に関して、本研究に関しての研究計画書が愛媛大学の倫理委員会において承認された。また、既知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の解析に関して、GNAS1およびGNB3と起立性の血圧変化との相関、高血圧に関してGNAS1と喫煙との相互作用が示唆されたと共に、高血圧、肥満、糖尿病に関してNOS3と中性脂肪との相互作用、同じく高血圧、肥満、糖尿病に関してADRB2と中性脂肪との相互作用は統計学的に厳しい補正を行った後も非常に有意な結果が得られた。一方、未知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子を同定するために選別した血圧の高い群と低い群、各々150人を対象にしたゲノムワイドスクニングをマイクロサテライトマーカーを用いて行った。2000年度にはスクリーニングにより、 $p < 0.05$ を有意基準として23の陽性候補マーカーを選定したが、2001年度には交絡因子との相互作用の解析を取り入れたことによって、 $p < 10^{-6}$ という非常に厳しい基準を満たす約20のマーカーを選別することができた。

### (II) 頸動脈硬化の統合的検討

レニン・アンジオテンシン系の遺伝子多型と血中の可溶性接着因子(ICAM-1, VCAM-1)の間には、直接的な有意な相関は認められなかった。しかし、頸動脈IMTとICAM-1およびVCAM-1との相関に関して、各遺伝子多型(ACE II vs. ID+DD, AGT M235T TT vs. MM+MT, AT1R A1166C AA vs. AC+CC)間において有意に異なっており、多型毎の可溶性接着因子と頸動脈硬化との関連性に差があることが示された。

クラミジア・ニューモニエの持続感染は、頸動脈硬化とは、緩い相関しか示さなかったが、血中の接着因子、VCAM-1、ICAM-1、および MCP-1 濃度とは有意な正の相関を示した。クラミジアの持続感染は、頸動脈硬化度とは独立した、血中接着因子やケモカインの上昇を伴うことが認められた。

血中 HGF 濃度は、動脈硬化の危険因子とは有意な正の相関を示した。さらに、これらの危険因子とは独立して、頸動脈リモデリング（内膜中膜肥厚および血管拡大）と有意な相関を認めた。

#### D. 考察

##### (I) 高血圧候補遺伝子の探索

これまでに国内外で行われてきた既知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子解析では、交絡因子との相互作用はあまり考慮されておらず、本研究結果ほどの有意な結果も報告されていない。また、未知の動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子に関しても、相互作用を取り入れた相関解析を用いた高血圧のゲノムワイドスクニングは行われておらず、本研究結果ほどの有意な結果も報告されていない。今後の課題としては、SNPs に基づく高血圧関連遺伝子探索を効率良く行うための方法論（ゲノムワイドスクニングを含む）を確立するとともに、より多くのサンプル、表現型や交絡因子の情報収集が必要である。

##### (II) 頸動脈硬化の統合的検討

頸動脈硬化の危険因子には、高血圧や加

齢などの古典的危険因子以外に、近年クラミジアの持続感染や炎症が役割を担っていることが報告されている。本研究では、地域住民における無症候性の頸動脈硬化に対しても、クラミジア抗体値が有意に相関し、さらに接着因子やケモカインの上昇が認められており、これらが病態を連結するメカニズムであると考えられる。頸動脈硬化の関連して、血中の HGF の増加が認められたが、組織中の HGF は、抗動脈硬化作用を有しており、血中 HGF の増加が動脈硬化の進展抑制に働くか否かに関しては、今後の検討課題である。頸動脈硬化の遺伝的要因に関する候補遺伝子的アプローチにおいても、本研究で認められた様な、危険因子との交互作用を含めた検討が必要である。

#### E. 結論

候補遺伝子およびゲノムワイドスクリーニングの両方法論により、動脈硬化・高血圧関連候補遺伝子の解析を危険因子との交絡の視点から、大規模集団を対象に進めた。頸動脈硬化に関しては、一般住民を対象として、詳細な検討を行い、頸動脈硬化と血中の接着因子、クラミジア持続感染、HGF との関連性を明らかにした。これらの知見は、高血圧、動脈硬化という老年病の発症に非常に重要な病態の理解に有用であると思われる。

## 起立性低血圧に関する感受性遺伝子の研究

主任研究者 三木哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座

起立に伴う血圧変化、特に起立性低血圧は、一般的によく認められる異常であるが、転倒や骨折の危険因子であるだけでなく、脳卒中を始めとする心血管系合併症の発症の危険因子であることも明らかにされている老年症候群の一つである。この起立性の血圧変化に関する遺伝的要因を明らかにするために、交感神経系、レニン・アンジオテンシン系の各コンポーネントの遺伝子多型から検討を行った。その結果交感神経系のG蛋白のGNAS1多型およびGNB3多型は、ともに起立性低血圧に有意に関連していることが示された。

### A. 研究目的

起立性の血圧低下は、比較的一般的に認められる異常であるが、大規模疫学調査研究から、起立性低血圧は脳卒中をはじめとする心血管系疾患の発症、総死亡、さらには認知機能障害や無症候性脳梗塞に対して有意な危険因子であることが示されている。一般的には、起立に伴う収縮期血圧20mmHg以上の低下を起立性低血圧と定義し、一般地域住民での罹患率は4～33%であるといわれている。起立性低血圧の成因としては、圧受容器反射機能の低下に伴う交感神経活性化の障害や循環血流量の減少が挙げられている。老年者や高血圧患者などでは、その頻度が増加することが知られているが、遺伝的な背景についてはあまり知られていない。

起立に伴う血圧の調節は、交感神経

系の活動により調節されているが、高血圧を始めとする循環器疾患の遺伝疫学的検討は、交感神経系ではGタンパク質を中心に行われている。βサブユニット遺伝子(GNB3)上のC825T多型が主に検討されており、Tアレルと高血圧や心血管系疾患との関連が指摘されている。αサブユニット遺伝子(GNAS1)上のT131C多型が高血圧と関連することも報告されている。

また、レニン-アンジオテンシン系は、体液量の調節を介して、起立時の血圧変動に関連することが知られている。レニン-アンジオテンシン系では、アンジオテンシン変換酵素(ACE):挿入(I)/欠失(D)多型、アンジオテンシノーゲン(AGT):M235T多型、アンジオテンシンII-1型受容体(AT1R):A1166C多型が、高血圧等循環器系疾患の感受性遺伝

子として報告されている。

これらの成績を踏まえ、本研究では、起立性低血圧の感受性遺伝子として、血圧調節と密接に関連するGタンパク質およびレニン-アンジオテンシン系遺伝子を想定し、その遺伝子多型と起立性低血圧との関連について検討した。

## B. 研究方法

対象は、愛媛県下のコホートのうち、一般住民を対象とするA地域の参加者のうち、本研究に対する同意が得られ、かつ心血管系疾患（高血圧は除く）の既往や現病のない415例を対象とした。全例に対して、書面によるインフォームドコンセントを得て、遺伝子解析を行った。

起立性の血圧変化は、10分以上の臥位下での安静時血圧および心拍数を、5分間隔で2回測定して平均値とした。その後、起立してもらい、起立1分後および3分後に血圧を測定し、収縮期血圧の最大変化をもって起立性血圧変化を評価した。起立による収縮期血圧20mmHg以上の低下を起立性低血圧とした。全ての血圧測定は自動血圧計で行った(HEM-705CP、オムロン社製)。

ゲノムDNAは末梢血より抽出した。ACE:I/D、AGT:M235T、AT1R:A1166C、GNAS1:T393C、GNB3:C825T多型

はPCR-RFLP法で解析した。

## C. 研究結果

解析対象415例について、起立1分後または3分後の最大血圧変化量を基準とすると、起立性低血圧者は38例(9.2%)であった。起立性低血圧者の出現頻度について、性差( $p=0.137$ )、年齢差( $p=0.126$ )は認められなかった。遺伝子多型からの検討では、GNAS1多型CCキャリアにおいて、起立による収縮期血圧低下度が顕著であった(TT vs TC vs CC,  $1.21 \pm 16$ ,  $2.28 \pm 17$ ,  $-3.61 \pm 16$ ,  $p=0.026$ , TT+TC vs CC,  $p=0.008$ )。解析した他の遺伝子多型と起立性血圧変化量とに有意差は認められなかった。収縮期血圧変化量を従属変数とした重回帰分析から、GNAS1多型は、年齢、BMI、安静時収縮期血圧とともに、独立した説明変数であることが示された( $\beta=0.102$ ,  $p=0.034$ )。

起立性低血圧者の頻度は、GNAS1多型CCキャリア( $p=0.011$ )、GNB3多型CTおよびTTキャリア( $p=0.020$ )において有意に高かった。ロジスティック回帰分析の結果、GNAS1多型(オッズ比:2.79(1.35-5.79),  $p=0.006$ )およびGNB3多型(オッズ比:1.78(1.06-3.00),  $p=0.030$ )は、安静時収縮期血圧(オッズ比:1.02(1.01-1.04),  $p=0.009$ )とともに起立性低血圧に対する有意な独立変数であることが示さ

れた。

#### D. 考察

安静時の血圧ではなく、起立による血圧変化、特に起立性低血圧に関連する遺伝子多型が認められた。検討したレニン-アンジオテンシン系遺伝子には有意な関連はなく、交感神経系関連の G 蛋白遺伝子多型が関連することが認められた。

起立性低血圧は、加齢とともにその頻度が増え、しかも、転倒や骨折に直接関連するだけでなく、脳梗塞や心血管イベントのリスクとなることも示されている、老年症候群の一つである。

今回の検討では、加齢によってのみ説明されていた老年症候群にも、遺伝的な要因が関与することが明らかになった。

#### E. 結論

起立性低血圧の遺伝的背景として、Gタンパク質関連遺伝子の影響が推察された。

#### F. 研究発表

##### 1) 原著

1. Kayahara H, Yamagata H, Tanioka H, Miki T, and Hamakawa H: Frequent loss of heterozygosity at 3p25-p26 is associated with invasive oral squamous cell carcinoma. *Journal of Human Genetics*, 2001, 46, 335-341.
2. Tabara Y, Kohara K, Nakura J, and Miki T: Risk factor-gene interaction in carotid atherosclerosis: effect of gene polymorphisms of rennin-angiotensin system. *Journal of Human Genetics*, 2001, 46, 278-284.
3. Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Miki T, Doi T, Tokunaga H, and Konishi I: An association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and the common carotid atherosclerosis. *Journal of Human Genetics*, 2001, 46, 506-510.
4. Matsubara M, Yamagata H, Kamino K, Nomura T, Kohara K, Kondo I, and Miki T: Genetic association between Alzheimer disease and the Alpha-Synuclein gene. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 2001, 12, 106-109.
5. Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Qiu X, Lin X, Okun M, Hohjoh H, Miki T, Hsu S. H, Leffwill: Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *American Journal of Human Genetics*, 2001,

- 68, 686-699.
6. Yamamoto Y, Kohara K, Tabara Y, and Miki T: Association between carotid arterial remodeling and plasma level of circulating hepatocyte growth factor. *Journal of Hypertension*, 2001,19, 1975-1979.
  7. Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, Miki T: Genotype-specific Association between Circulating Soluble Cellular Adhesion Molecules and Carotid Intima-Media Thickness in Healthy Subjects: J-SHIPP study. *Hypertension Research*, 2001, 25, 31-39.
  8. Tabara Y, Kohara K, Miki T: Polymorphisms of genes encoding sympathetic nervous system but not renin-angiotensin system as risk factors for orthostatic hypotension. *Journal of Hypertension*, 2002, in press.
  9. Tabara Y, Kohara K, Ohnishi M, Nakura J, Miki T: Gene for cost? *Journal of American Geriatric Society*, 2002, in press.
  10. Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Miki T: Chlamydia pneumoniae Seropositivity is Associated with Increased Plasma Levels of Soluble Cellular Adhesion

Molecules in Community-Dwelling Subjects: J-SHIPP study. *Stroke*, 2002, in press.

## 2) 学会発表

### Symposium

1. Miki T, Nakura J, and Kohara K: Association analysis of microsatellites in essential hypertension. (The 1st Hakone-yama Symposium) 2001, November 19~20, Tokyo
2. Miki T, Nakura J, and Kohara K: Genetic analysis for hypertension in Japan. (Genomics and Phenomics of Vasculitis and Atherosclerosis) 2001, December 3~5, Urayasu

### 学会発表

3. Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, Ueki S, Yano H, Ohnishi M, Igase M, Nakura J, and Miki T: Genotype specific association between circulating soluble cellular adhesion molecules and carotid intima-media thickness in community dwelling healthy residents in Japan. The 16th Scientific Meeting, American Society of Hypertension, May 15~19, 2001, San Francisco, U.S.A.
4. Tabara Y, Kohara K, Uemura K, Yamamoto Y, Igase M, Fujioka Y,



- Nakura J, and Miki T: Association of endothelial no synthase gene polymorphism with serum ua levels. The 16th Scientific Meeting, American Society of Hypertension, May 15~19, 2001, San Francisco, U.S.A.
5. Tabara Y, Kohara K, Ohnishi M, Ueki S, Yano H, Azechi T, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, and Miki T: Blood pressure variability over year and gene polymorphism of the renin-angiotensin system in community-dwelling elderly subjects. The 16th Scientific Meeting, American Society of Hypertension, May 15~19, 2001, San Francisco, U.S.A.
  6. Tabara Y, Kohara K, Ohnishi M, Ueki S, Yano H, Azechi T, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, and Miki T: Risk factor-gene interaction in carotid atherosclerosis: effect of genes encoding the renin-angiotensin system. The 16th Scientific Meeting, American Society of Hypertension, May 15~19, 2001, San Francisco, U.S.A.
  7. Yamamoto T, Kohara K, Tabara Y, Ohnishi M, Ueki S, Yano H, Igase M, Nakura J, and Miki T: Plasma level of hepatocyte growth factor is associated with carotid intima-media thickness. The 16th Scientific Meeting, American Society of Hypertension, May 15~19, 2001, San Francisco, U.S.A.
  8. Tanaka H, Shimokawa M, Mizusawa H, Arai H, Yamagata H, Miki T, Ishiura S, and Kobayashi T: Expression of DMPK in the autopsied skeletal muscle with severe congenital myotonic dystrophy (cDM). The 3rd International Myotonic Dystrophy Conference, October 9~11, 2001 Kyoto, Japan.
  9. Tanaka H, Shimokawa M, Mizusawa H, Arai H, Yamagata H, Miki T, Ishiura S, and Kobayashi T: Expression of DMPK in the autopsied skeletal muscle with severe congenital myotonic dystrophy (cDM). The 3rd International Myotonic Dystrophy Conference, October 9~11, 2001 Kyoto, Japan.
  10. Yamagata H, and Miki T: High resolution haplotype analysis in the DMWD-DM1-SIX5 region. The 16th Scientific Meeting, American Society of Hypertension, May

15~19, 2001, San Francisco, U.S.A.

11. Miki T, Yamagata H, Matsubara-Tsutsui M, Nakura J, Nomura T, Kohara K, Kamino K, and Kondo I: Genetic association between Aozheimer disease and the polymorphic markers on chromosome 10. 51st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, October 13~16, 2001, San Diego, U.S.A.
12. Nakura J, Yamagata H, Morishima A, Uemura K, Kohara K, and Miki T: High resolution haplotype analysis of the ACE region in essential hypertension. 51st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, October 13~16, 2001, San Diego, U.S.A.

#### 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

## 心筋梗塞と遺伝子多型に関する研究

分担研究者 近藤郁子 愛媛大学医学部老年医学教授

研究要旨 高血中ホモシステイン濃度は広く知られている心筋梗塞の危険因子である。そこで、血中ホモシステイン濃度を調節する4つの代謝酵素 (MTHFR, MS, CBS, MTRR) の遺伝子多型の、心筋梗塞の発症危険因子としての有用性を検討した。その結果、MTHFR 遺伝子多型は心筋梗塞の発症危険因子として有用なマーカーとなることが明らかになったが、他の3つの遺伝子多型は発症危険因子とは判定されなかった。

### A. 研究目的

救急医療の充実に伴い心筋梗塞による死亡数は減少傾向にあるが、患者発症数は増加を示し、その発症危険因子を予知して発症予防を図ることは重要である。遺伝性ホモシステイン尿症は心臓血管脆弱性のために、心疾患で死亡することが多く、血中高ホモシステイン濃度は心疾患の危険因子として良く知られている。又、ホモシステインは遺伝子発現調節に関わるメチオニンの基質となるアミノ酸であり、心臓血管のみならず脳形成にも深く関わる重要なアミノ酸で有る。そこで、血中ホモシステイン-メチオニン濃度を調節する4つの代謝酵素 [methylentetrahydrofolic reductase (MTHFR), methionine synthase reductase (MTRR), methionine synthase (MS), cystathionine beta synthase (CBS)] (Fig.1) の DNA 多型の心筋梗塞の発症危険因子として有用性を検討した。

### B. 研究方法

対象は国立病院の心臓血管外来を受診中

の心筋梗塞と診断された男性患者 (患者群) と心筋梗塞のない男性健常者 (対照群) である。患者群は 235 名で、心筋梗塞発症年齢は 27 歳から 78 歳 (平均 61 歳) で、男性 187 名、女性 48 名である。肥満度は 20 から 33 (平均肥満度 22.8) で、空腹時血糖は 75 から 250mg/dl (平均空腹時血糖 110mg/dl) で、高血糖の患者が多かった。これらの患者群の中から、肥満、糖尿病のない 100 名の男性患者と男性健常者における遺伝子型頻度および対立遺伝子頻度の違いを  $\chi^2$  検定法によって解析した。解析の対象とした遺伝子はホモシステイン-メチオニン濃度を調節する3つの代謝酵素 (MS, MTRR, CBS) で、制限酵素認識サイトのある1塩基置換による遺伝子多型領域を検討した。残るもう1つの遺伝子である MTHFR については 235 名について解析した。

遺伝子型の判定は末梢血より抽出した genomic DNA を4つの遺伝子多型を示す1塩基置換領域を polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて増幅し、制限酵素で切断後にアガロースゲル

に電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色して遺伝子型を判定した。

(倫理面への配慮)

研究参加者は国立病院の病院長の承認のもと、心臓血管外科医師によって、研究対象者に心筋梗塞の発症危険因子を解明する研究であることを説明し、研究参加の同意を得た。実験は研究参加者の個人情報特定出来ないように匿名化された試料として解析が行なわれ、研究成果は個人が特定される事のない集団解析として発表されることから、研究参加者のプライバシーが侵害されることは皆無であることを説明した。

C. 研究成果

患者群および対象者群の MS の D919G 遺伝子多型の遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度を表 1 に示した。日本人の 81 名の対照者群における遺伝子型分布は Hardy-Weinberg の平衡状態にあり、サンプリングによる偏りはなかった。従って、日本人の一般集団における遺伝子頻度は D919 型が 0.83、G919 型が 0.17 であった。100 名の患者群における遺伝子型分布も Hardy-Weinberg の平衡状態にあり、対立遺伝子型頻度は D919 型が 0.78、G919 型が 0.22 であった。従って、両群間の遺伝子型分布には有意差がみられなかった ( $\chi^2 = 1.378$ ,  $p = 0.503$ )。又、対立遺伝子型頻度にも有意差は見られなかった ( $\chi^2 = 1.289$ ,  $p = 0.256$ )。

患者群および対象者群の CBS の C 1080 T 遺伝子多型の遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度を表 2 に示した。日本人の 81 名の対照者群における遺伝子型分布

表 1 MS 遺伝子の D919G 多型の遺伝子型分布と対立遺伝子頻度

遺伝子型	対照者群	患者群
DD 型	56(69%)	62(61%)
DG 型	22(27%)	35(34%)
GG 型	3(4%)	5(5%)
合計	81(100%)	102(100%)
$(\chi^2 = 1.378, p = 0.503)$		

  

対立遺伝子型	対照者群	患者群
D 型	134 (0.83)	159(0.78)
G 型	28 (0.17)	45(0.22)
$(\chi^2 = 1.289, p = 0.256)$		

は、Hardy-Weinberg の平衡にあり、サンプリングによる偏りはなかった。従って、日本人の一般集団における対立遺伝子頻度は C 1080 型が 0.59、T 1080 型が 0.41 であった。100 名の患者群における遺伝子型分布も Hardy-Weinberg の平衡にあり、対立遺伝子頻度は C 1080 型が 0.53、T 1080 型が 0.47 であった。従って、両群間の遺伝子型分布には有意差なく ( $\chi^2 = 1.954$ ,  $p = 0.426$ )、対立遺伝子頻度間にも有意差がみられなかった ( $\chi^2 = 0.994$ ,  $p = 0.426$ )。

患者群および対象者群の MTRR の I22M 遺伝子多型の遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度を表 3 に示した。日本人の 66 名の対照者群における遺伝子型分布は Hardy-Weinberg の平衡にあり、サンプリングによる偏りはなかった。従って、日本人の一般集団における対立遺伝子頻度は I22 型が 0.66、M22 型が 0.34 であった。112 名の患者群における遺伝子型

分布も Hardy-Weinberg の平衡にあり、対立遺伝子頻度は I22 型が 0.74、M2 型が 0.26 であった。両群間の遺伝子型分布には有意差なく ( $\chi^2 = 3.088$ ,  $p < 0.20$ )、対立遺伝子頻度間にも有意差がみられなかった ( $\chi^2 = 2.413$ ,  $p < 0.20$ )。

表2 CBS 遺伝子の C1080T 遺伝子多型の遺伝子型分布と遺伝子頻度

遺伝子型	対照者群	患者群
TT 型	25 (31%)	29 (28%)
CT 型	45 (55%)	51 (50%)
CC 型	11 (14%)	22 (22%)
合計	81 (100%)	102 (100%)

( $\chi^2 = 1.954$ ,  $p = 0.426$ )

対立遺伝子型	対照者群	患者群
T 型	95 (0.59)	109 (0.53)
C 型	67 (0.41)	95 (0.47)

( $\chi^2 = 0.994$ ,  $p = 0.426$ )

表3 MTRR 遺伝子の I22M 遺伝子多型の遺伝子型分布と対立遺伝子頻度

遺伝子型	対照者群	患者群
II 型	31 (47%)	61 (54%)
IM 型	25 (38%)	43 (38%)
MM 型	10 (15%)	8 (7%)
合計	62 (100%)	112 (100%)

( $\chi^2 = 3.088$ ,  $p < 0.20$ )

対立遺伝子型	対照者群	患者群
I 型	87 (0.66)	165 (0.74)
M 型	45 (0.34)	56 (0.26)

( $\chi^2 = 2.413$ ,  $p < 0.20$ )

表4 MTHFR 遺伝子 C677T 遺伝子多型の遺伝子型分布と対立遺伝子頻度

遺伝子型	対照者群	患者群
CC 型	338 (43%)	83 (34%)
TC 型	361 (46%)	123 (52%)
TT 型	79 (10%)	31 (13%)
合計	788 (100%)	235 (100%)

( $\chi^2 = 6.38$ ,  $p < 0.05$ )

対立遺伝子型	対照者群	患者群
C677 型	1037 (0.67)	285 (0.61)
T677 型	519 (0.33)	185 (0.39)

( $\chi^2 = 5.74$ ,  $p < 0.05$ )

患者群および対象者群の MTHFR の C677T 遺伝子多型の遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度を表 4 に示した。日本人の 788 名の健康対照者群における遺伝子型分布は Hardy-Weinberg の平衡にあり、サンプリングによる偏りはなかった。従って、日本人の一般集団における対立遺伝子頻度は C67 型が 0.67、T677 型が 0.33 であった。一方、235 名の患者群における遺伝子型分布も Hardy-Weinberg の平衡状態にあり、対立遺伝子頻度は C677 型が 0.61、T677 型が 0.39 で、両群間の遺伝子型分布には有意差がみられ ( $\chi^2 = 6.38$ ,  $p < 0.05$ )、対立遺伝子頻度間にも有意差がみられた ( $\chi^2 = 5.74$ ,  $p < 0.05$ )。従って、T677 型は C677 型に比較して、1.64 倍心筋梗塞発症者が多かった。

#### D. 考察

血中高ホモシステイン値が心筋梗塞の危険因子となることが広く知られるよう

になり、従来の危険因子として知られる生活習慣や糖尿病、高血圧、肥満、高脂血症などと共に、遺伝要因による心筋梗塞の発症危険因子の探索が精力的に開始され、白人集団ではいくつかの遺伝子の型多型と心筋梗塞発症の相関研究成果が発表されるようになった。しかし、日本人患者群におけるホモシステイン濃度調節に関わる遺伝子群の報告は少なく、その有効性について確立された結果はない。

ホモシステインはメチオニンへの転換によって、遺伝子調節に関わる DNA のメチル化の基質提供に関与するアミノ酸である。ホモシステインの代謝異常はヒトの先天性代謝異常症として新生児代謝異常症のスクリーニングの対象にもなっているホモシステイン尿症があり、常染色体性劣性遺伝を示す。その原因遺伝子として CBS や MTHFR 遺伝子異常が報告されており、患者は若年時より血管脆弱のための心筋梗塞などによる死亡が危険視されている。そこで、ホモシステインの血中濃度調節に関わる酵素の遺伝子群に注目し、日本人集団における遺伝子多型を利用した心筋梗塞の遺伝的危険因子の解明を試みた。

その結果、表 1 から 4 に示した様に、日本人でも白人の心筋梗塞の危険因子として報告された遺伝子多型が存在することを明らかにした。

MS はホモシステインからメチオニンに返還する所で関わる酵素で、ビタミン B12 を補酵素として利用し、メチオニン濃度を直接的に反映する酵素である。白人集団における D919G 遺伝子多型は Hyndman によると環動脈疾患のサバ

イバルに関与すると報告された。しかし、その後の心筋梗塞患者群における遺伝子多型の研究では、患者群と健常者の間で有意差は見られないとの報告もある (Chen et al. 2000)。我々の相関研究でも 919G 型の頻度が患者群で低い傾向にあったが、有意差は同定されなかった。また、G919 型の頻度は日本人と白人で全く同じ 0.17 であった。CBS 遺伝子多型と心筋梗塞の相関研究報告は Kruger らの白人集団での報告では T1080 型が患者集団で有意に高いと報告している。しかし、我々の日本人集団での結果は、C1080 型が患者集団で高い傾向にあるが有意差はみられなかった。

MTRR は MS の代謝と平衡して働くホモシステイン-メチオニン代謝系の酵素である。メチル化の基質と直性供給する酵素であることから、ホモシステイン濃度と様々な疾患の相関研究において遺伝子多型が追求されている。白人集団における心筋梗塞との相関は Brown らによって報告されており、患者 119 名と対照者 61 名の少人数の研究で、有意に MM 型は多いと報告している ( $p=0.03$ )。しかし、我々のほぼ

同数の日本人集団での相関研究では有意差は観察されなかった。しかも、日本人患者群では白人集団で危険因子となる遺伝子型が対照者に比べて少ない傾向が見られた。しかし、日本人集団では白人で心筋梗塞危険因子とされる遺伝子型が白人に比べて有意に少なく、心筋梗塞の発症が日本人では白人に比べて少ないのは、生活習慣の違いと共に、MTRR 遺伝子多型の遺伝子頻度の差に関係している可能

性も示唆された。また、今後さらに多数の患者と対照者群での相関研究では有意差の出る可能性も示唆された。

MTHFR 遺伝子の C677T 多型は心筋梗塞を初めとする心臓血管系の疾患との相関研究が最も活発に行なわれている遺伝要因である。白人集団においても日本人集団でも数多くの報告があり、有差のある報告と無いとする報告がある。C677T 多型は血中ホモシステイン濃度と良く相関し、Valine をコードする T677 型は有意に血中ホモシステイン濃度が高く、Valine 型が発症危険因子とされる。我々の集団でも Valine 型の頻度が高い傾向にあったことから、対象集団を患者 235 名とし、日本人の健常者集団として報告されている 788 名と比較した。その結果、我々の患者集団でも有意に Valine 型の遺伝子頻度が高く、ホモの Valine 型はホモのアラニン型に比して 1.6 倍の発症危険因子となった。さらに、Valine 型のヘテロ接合体とホモ接合体の集団においては Alanine 接合体に比して、2.5 倍の発症危険頻度を示した。我々はホモシステインーメチオニン代謝に関わる遺伝子の遺伝子多型として 4 つの遺伝子の遺伝子多型を検討した。その結果、MTHFR の遺伝子多型は有意に心筋梗塞の発症危険因子となることが示された。

遺伝子型は生涯に渡って変化することのない生活習慣病の発症危険因子として精力的な研究が展開され、様々な遺伝子の報告が相次いでいる。MTHFR の C677T 型は血中ホモシステイン濃度を反映する遺伝子多型として貴重な遺伝子マーカーである。生活習慣などのように個人を意

識と努力によって発症予防を可能にする危険因子は、発症予防に積極的に取り組むべき課題となるが、遺伝子要因は判明しても、予防効果を上げるのに有効性が疑問視されるが、MTHFR の遺伝子型は血中ビタミン B12 を上昇させることによってホモシステイン濃度を低下させることが可能である。従って、MTHFR の遺伝子多型の解析は心筋梗塞の発症危険予知に極めて有効なマーカーとなりうる。各個人の 4 種類の遺伝子多型について複合的な効果な検討を行なうことが出来なかったが、今後は危険因子間の相乗効果や相加効果の検討を行なうことによって、さらに詳細な遺伝子間の危険因子としての役割を明らかにすることが可能である。また、食事習慣と遺伝子多型との相関など今後の解析に待たれる。

#### E. 結論

日本人集団における 4 種類のホモシステインーメチオニン代謝酵素の遺伝子多型の心筋梗塞発症への相関を検討した。その結果、血中ホモシステイン濃度を反映する MTHFR C677T (Alanine-Valine) 多型の Valine 型は有意に心筋梗塞発症危険因子となっていることが明らかとなった。しかし、その他の MTRR, MS, CBS 遺伝子の遺伝子多型のは相関が観察されなかった。日常診療において生活習慣病の予納指導にあたって、遺伝的発症危険因子の保有の有無を基に、有効な生活習慣指導が可能となるために、今後さらにおおくの有用なマーカーの同定が待たれる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Makiko Meguro, Akiko Kashiwagi, Kohzoh Mitsuya, Mitsuyoshi Nakao, Ikuko Kondo, Shinji Saitoh, Mitsuo Oshimura: A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nature genetics*, 28:19-20, 2001.

2. Keiko Obata, Takayuki Fukuda, Riyo Morishita, Shunnosuke Abe, Shuichi Asakawa, Seiji Yamaguchi, Makoto Yoshino, Kenji Ihara, Keiko Murayama, Kazuhiro Shigemoto, Nobuyoshi Shimizu, Ikuko Kondo: Human Biotin-Containing subunit of 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Gene(MCCA):cDNA Sequence, Genomic Organization, Localization to Chromosomal Band 3q27, and Expression. *Genomics*, 72:145-152, 2001

3. Miho Matsubara, Hidehisa Yamagata, Kouzin Kamino, Takuo Nomura, Katsuhiko Kohara, Ikuko Kondo, Tetsuro Miki: Genetic Association between Alzheimer Disease and the Alpha-Synuclein Gene. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 12:106-109, 2001

4. 森 史子, 桑島 克子, 山中 恵子, 近藤 郁子: Fibroblast growth factor receptor 3(FGFR3)遺伝子の P250R 変異を認めた頭蓋縫合早期癒合症の女児例.

脳と発達 33:53-57, 2001

5. 牛田 美幸, 福田 隆之, 西山 逸子, 中野 修身, 遠藤 彰一, 福田 邦明, 太田 明, 近藤 郁子, 古川 正強: 良性家族性新生児痙攣の1家系における KCNQ2 遺伝子変異の検索. *日本小児科学会雑誌* 105 巻 7 号, 780-784, 2001

6. 吉村 脩, 近藤 郁子: 日本人新生児集団における遺伝的成人(生活習慣)病危険因子の頻度の検討(3) -----動脈硬化の予防に向けて--- 聖カタリナ女子短期大学紀要, 34 号: 89-101, 2001

### 2. 学会発表

#### 1. 第72回日本衛生学会

吉村 脩, 山縣英久, 近藤郁子  
心筋梗塞と遺伝子多型に関する研究(第5報)メチオニンシンターゼ、シスタチオニンベーターシンターゼ遺伝子多型



## 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)に焦点をあて、これら受容体の心血管リモデリングにおける病態生理学的意義、インスリン抵抗性を中心に生活習慣病における両受容体の意義、シグナル伝達機構、発現調節機構を中心に解析し、SNP 探索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になっている。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。したが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ともに、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ことが知られている。申請者の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、発生並びにリモデリングにおける病態生理学的な役割が脚光をあびてきている。さらに、AT2 受容体は、従来よりその作用が良く知られている 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 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。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。AT2 受容体欠損マウスを用い、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。我々はさらに、AT2 受容体欠損マウスに圧負荷心肥大モデルを作成し、AT2 受容体欠損マウスでは、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。AT1 受容体ブロッカーが、現在、降圧薬として使用されるようになってきたが、AT1 受容体を特異的にブロックした時に AT2 受容体が刺激されることで、AT1 受容体ブロッカーの心血管リモデリング改善作用が増強される可能性について検討した。AT2 受容体発現調節機構については、不明であるが、我々は Interferon Regulatory Factor (IRF-1) が AT2 受容体の発現に関与するという *in vitro* での結果を得ており、今回、IRF-1 欠損マウスに血管傷害モデルを作成し、IRF-1 の AT2 受容体発現に及ぼす影響、血管リモデリングに与える影響について検討した。

正常妊娠では、レニン・アンジオテンシン系が亢進されているにもかかわらず、アンジオテンシン II による血管の収縮性が低下しており、血圧の上

昇が防がれているが、逆に妊娠中毒症の原因としてアンジオテンシン II による血管収縮性の亢進がひとつとして考えられる。正常妊娠時には、外因性のアンジオテンシン II の昇圧作用に対して不応性である事、AT1 受容体の遺伝子多型と妊娠高血圧の関係、エンドトキシン持続投与による妊娠中毒症モデルラットにアンジオテンシン II 拮抗薬を投与し症状軽快をみたという報告や、妊娠中毒症患者血清には、AT1 受容体に対するアゴニスティックな自己抗体が見られる等、AT1 受容体と妊娠中毒症との関連及び、妊娠羊子宮の血管では AT2 受容体の特異的に発現する事などが示唆されている。そこで、AT1 受容体欠損マウス、AT2 受容体欠損マウスを用い、妊娠時における両受容体の血圧調節に与える影響を検討した。

高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満の合併は良く知られており、インスリン抵抗性、高インスリンがその病態の基礎として注目されている。しかし、高血圧の発症を規定する危険因子とインスリン抵抗性の関連の重要性は報告されているが、この両者を結びつける分子機構、責任遺伝子異常については殆ど不明である。AT1 受容体刺激がインスリン刺激と拮抗し、PI3 Kinase 活性化を抑制、GLUT4 の細胞膜への移行を抑制している可能性が報告さ

れているので、我々は、AT1 受容体欠損マウス、AT2 受容体欠損マウスを用い、両受容体のインスリン抵抗性に与える可能性について検討した。

エストロゲンによる心血管保護作用は、よく知られているが、一方、アンジオテンシン II は、AT1 受容体刺激を介し血管収縮、動脈硬化促進、血管傷害後リモデリング増強等血管障害的に働く。そこで、エストロゲンとアンジオテンシン II がクロストークして血管平滑筋に作用する可能性を検討した。

AT1 受容体、AT2 受容体はシグナルレベルでも拮抗して作用することが知られており、その細胞内サドループの差異が重要であることを報告してきたが、さらに 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ことを考えあわせると、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、ATRAP の AT1 受容体のインターナリゼーション、シグナル伝達機構に及ぼ

す影響、心血管リモデリングにおける意義について、現在、進行中である。

## B. 研究方法

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、圧負荷モデルを作成し、血压に変化を与えない低容量の選択的 AT1 受容体ブロッカーを投与し、AT1 受容体ブロック、AT2 受容体刺激による、心血管リモデリングの影響を検討した。同様の血管傷害モデルを、IRF-1 欠損マウスに作成し、AT2 受容体の発現、新生内膜形成、アポトーシスを検討した。

妊娠時 AT1 受容体、AT2 受容体の胎盤、臍帯、母体腎、大動脈での発現を免疫組織化学的方法にて検討。AT1 受容体及び AT2 受容体欠損マウスでの血压変化、尿中アルブミンを測定した。

無麻酔非拘束 AT1 受容体及び AT2 受容体欠損マウスを用い、2-[<sup>3</sup>H]deoxy glucose 法により、骨格筋、脂肪組織における、インスリンによる糖の取り込み、2 型糖尿病マウスモデル KK-Ay に、選択的 AT1 受容体ブロッカーを投与し、耐糖能の以上が改善する可能性、IRS-1 のチロシンリン酸化、PI3 Kinase 活性、GLUT-4 の細胞膜への移行につ

いて検討した。同時に、骨格筋、脂肪組織における AT1 受容体、AT2 受容体の発現を検討した。

AT1 受容体のみを、特異的に発現している、ラット大動脈由来血管平滑筋細胞を用い、アンジオテンシン II, エストラジオールにて刺激、DNA 合成、c-fos 転写活性 (ルシフェラーゼ発現ベクターに c-fos プロモーター領域を結合したベクターをトランスフェクション)、ERK 活性、MKP-1, SHP-1 などの脱リン酸化酵素発現、活性を測定した。

ATRAP を恒常的に発現している血管平滑筋細胞を作成し、AT1 受容体シグナル伝達に与える影響、血管傷害モデル、圧負荷心肥大モデルにおける、ATRAP の発現変化を RT-PCR、免疫組織化学的方法にて検討した。

(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

血管傷害に伴い AT1 受容体とともに野生型マウスでは AT2 受容体の特異的に上昇しており、AT2 受容体欠損マウスでは野生型マウスに比べ、血管平滑筋における DNA 合成能が増加していること、内膜肥厚が増強されていることが観察された。この血管傷害モデル

では、ケモカイン MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインが産生され、傷害血管への白血球、マクロファージの浸潤が認められるが、これら炎症性変化は、AT2 受容体欠損マウスで亢進しており、AT2 受容体は抗炎症作用を有する事が示された。AT2 受容体遺伝子欠損マウスでは、血管平滑筋でのアポトーシスによる変化も減弱されていた。この血管傷害モデルに AT1 受容体選択的ブロッカーを投与すると血管平滑筋 DNA 合成能、新生内膜肥厚、傷害血管での炎症性変化が抑制されるが、その阻害効果は、AT2 受容体欠損マウスで減弱されており、AT1 受容体ブロッカーの血管リモデリング改善効果として、AT1 受容体ブロックとともに、ブロックされていない AT2 受容体がアンジオテンシン II によって刺激されることが重要であると示唆された。さらに、AT2 受容体欠損マウスに圧負荷心肥大モデルを作成し、AT2 受容体欠損マウスでは、野生型マウスと比べ、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ているが、このモデルでは、AT2 受容体は、冠動脈、血管周囲の線維芽細胞に主として発現されており、心筋細胞には、ほとんど発現されていない。従って、心肥大の程度は野生型マウスと比べ同程度であり、AT1 受容体ブロッカーによる心肥大抑制効果は両マウスで、差異は認め