

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

「高齢者疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明」に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森本 茂人

平成14 (2002) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

「高齢者疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明」

森本茂人

II. 分担研究報告

1. 高齢者虚血性心疾患の易発症性に関する遺伝的背景の解明

森本茂人

2. 高齢者肺疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明

勝谷友宏

3. 肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者におけるマンナン結合

レクチン遺伝子多型の解析

奥野良信

4. Humaninによる神経細胞死の抑制に関する研究

上野 聡

5. 高齢者骨粗鬆症の易発症性に対する遺伝的負荷の解明

覚道 健一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

高齢者疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明

主任研究者 森本茂人 大阪大学加齢医学助教授

研究要旨：高齢者における疾患の頻発には、加齢に伴う環境因子による障害蓄積とともに、それぞれの個体の遺伝的易発症性が重要である。成年者においては生活習慣病の発症を中心にこれらの遺伝的負荷は解明されつつあるが、高齢者におけるこれら疾患の遺伝的負荷に関する研究は行われていない。本研究においては、高齢者の虚血性心疾患、心不全、脳梗塞、脳内出血、非冬季肺炎、インフルエンザ後肺炎、骨粗鬆症に対する遺伝的負荷につき解明を進めている。

分担研究者

勝谷友宏・大阪大学加齢医学・助手  
奥野良信・大阪府立公衆衛生研究所・課長  
上野 聡・奈良県立医科大学神経内科・教授  
覚道健一・和歌山県立医科大学第二病理学・教授

A. 研究目的

成人期の高血圧、虚血性心疾患、脳血管障害、糖尿病などの生活習慣病に対する疾患感受性遺伝子の検討は多数なされており、欧米においてはこれらの疾患の遺伝子治療の試みも行われてるに至っている。一方、脳・心血管疾患、肺炎を含む高齢者疾患の遺伝的負荷の解明は進んでいない。さらに我が国においては欧米の先進諸外国とことなり、寝たきり状態が極めて高率に発症するが、寝たきりの発生そのものに対する遺伝的負荷の検討は皆無である。本研究においては我が国におけるこれらの高齢者疾患の遺伝的負荷に関し、若年者で報告されている上記既報の遺伝的危険因子の関与を検討するとともに、肺炎に対してはアンジオテンシン変換酵素、キマーゼなど咳嗽反射関連因子遺伝子多型の関与について、また寝たきりについては寝たきりに陥った直接原因疾患につき調査し、それぞれの疾患群に於ける寝たきりの易発症性に対する遺伝的負荷についても検討を行う。本研究により得られる成果は、特定の遺伝子多型検索により各高齢者疾患発症の危険性が高い例に対し発症前の予防措置の方策を提示しえ、また早期の治療体制を整えうることから、長寿先進国で

ある我が国および高齢化が進行する世界各国の老年者の健康・福祉の増進に資する。

B. 研究方法

関連施設老人病院受診例のうち研究計画に同意得た 4000 例を目標とした症例を対象に高齢者疾患の前向きコホート調査を行う。調査対象老年期肺疾患は、①虚血性心疾患、②心不全、③脳梗塞、④脳内出血、⑤非冬季肺炎、⑥インフルエンザ後肺炎、さらには⑦高齢者の寝たきり状態とする。これらの検討は「ヒトゲノム研究に関する共通指針（案）」検討委員会の原案を遵守して行う。

【調査項目】 対象例全例の年齢、性、血圧、入院期間、日常生活動作（移動能力については寝たきり例、端座位可能例、車椅子移動可能例、歩行可能例に分類）、知的機能（Mini-Mental State による）などの他に、各高齢者疾患の既知の危険因子として、脳心血管疾患発症の既往歴、過去・現在の喫煙歴、高血圧（ $>140/90$  mmHg）、糖尿病の有無（血糖値 $>126$  mg/dl）、腎機能障害の有無（血清Cr 値 $>2$  mg/dl）、栄養状態（身長、体重、BMI、血清アルブミン値、血清コレステロール値による）についても同時に調査する。また投薬内容（ステロイド、降圧薬、制酸薬等）の調査も行う。

検索対象遺伝子は、レニン・アンジオテンシン系の遺伝子多型として知られるアンジオテンシン I 変換酵素遺伝子には第 16 intron に約 300 bp の挿入 (I) /欠失 (D) (insertion/ deletion) の多型、アンジオテンシノーゲン遺伝子 M235 T および

T+31C 多型、レニン遺伝子 Mbo I 多型、アンジオテンシン II 1 型受容体遺伝子 A1166C 多型、 $\beta 2$  受容体 遺伝子 Arg16Gly および Gln26Glu 多型、メチレンテトラアルデヒド葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子 C677T、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) 2 遺伝子多型、低比重リポ蛋白受容体遺伝子 C1773T、エンドセリン遺伝子多型、アデュシン 遺伝子 Gly460 Trp 多型、アポ蛋白 E 遺伝子多型、および ヒトキマーゼ遺伝子多型とする。これらの検討は「ヒトゲノムに関する共通指針 (案)」検討委員会の原案を遵守して行い、倫理的に何ら問題となるものではない。

### C. 研究結果

#### 1. 高齢者虚血性心疾患

125 例の高齢者虚血性心疾患例および 500 例の対照例を対象とした case-control 試験において、エンドセリン遺伝子 lys198Arg 遺伝子多型が有意に関与することが明らかとなった。

#### 2. 高齢者肺炎

1011 人の高齢入院患者において、アンジオテンシン変換酵素遺伝子多型の DD 型保有者は、I アリルキャリアに比し 2.9 倍の肺炎リスクを示すことが明らかとなった。

#### 3. 高齢者インフルエンザ感染

高齢者インフルエンザ易罹患性に関するマンナン結合レクチン遺伝子多型の関与につき検討したが、有意差は認められなかった。

#### 4. 骨粗鬆症

高齢者骨粗しょう症における内分泌因子の遺伝的負荷の解明を目的にカルシトニン (CT) 遺伝子、カルシトニン受容体 (CTR) 遺伝子、ビタミン D 受容体 (VDR) 遺伝子の多型と骨密度 (BMD) および血中オステオカルシン (OC) 値との関係について解析を行った。CT の CA repeat 遺伝子多型は血中 OC レベルを決定する一つの因子であり、その機序に CTR および VDR の遺伝子多型が関与していることが示唆された。

#### 5. 神経疾患

培養系において humanin は神経細胞 PC12 の細胞死に関与しており、アルツハイマー型老年期痴呆の

発症機序に関与している可能性がある。

### D. 結論

世界最長寿国であり、また生活習慣、遺伝的背景が欧米とは異なる我が国において、これらの高齢者疾患に対する遺伝的負荷を明らかにすることは、これら疾患に対する遺伝的高負荷群に対しては環境因子の調整、早期からの診断、治療の開始などにより、これら高齢者疾患本研究は我が国高齢者の健康な老後の実現に寄与し、老人の世紀である 21 世紀の我が国および世界各国の福祉と安寧に資する。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 研究発表

#### F. 研究発表

1. Kawai Y, Morimoto S, Sakaguchi K, Yoshino H, Yotsui T, Hirota S, Inohara H, Nakagawa T, Hattori K, Kubo T, Yang J, Fujiwara N and Ogihara T.

Oncogenic osteomalacia secondary to nasal tumor with decreased urinary excretion of cAMP

*Journal of Bone and Mineral Metabolism* 19 : 61-64, 2001

2. Hata S, Fukuo K, Morimoto S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Ogihara T.

Vascular smooth muscle maintains the levels of Bcl-2 in endothelial cells.

*Atherosclerosis* 154: 309-316, 2001

3. Yamanaka Y, Hayashi K, Komurasaki T,

Morimoto S, Ogihara T, Sobue K.  
EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor.

*Biochemical Biophysical Research Communication* 281: 373-377, 2001

4. Mino Y, Morimoto S, Okaishi K, Sakurai S,

Onishi M, Okuro M, Matsuo A, Ogihara T.  
Risk factors for decubitus ulcers in  
bedridden elderly subjects. -Importance of  
turning over in bed and serum albumin level.  
Geriatrics and Gerontology International 1:  
38-44, 2001

5. Ogihara T, Morimoto S, Okaishi K, Hiwada K,  
Matsuoka H, Matsumoto M, Takishita S,  
Shimamoto K, Shimada K, Abe I, Kohara K,  
Ouchi Y.

Questionnaire survey on the Japanese  
Guidelines for Treatment of Hypertension in  
the Elderly -1999 Revised version-  
Hypertension Research 25: 69-75, 2002

6. Morimoto S, Okaishi K, Onishi M, Katsuya T,  
Yang J, Okuro M, Sakurai S, Onishi T, Ogihara  
T.

Angiotensin-I converting enzyme gene  
polymorphism as an indicator of risk of  
pneumonia in the elderly.  
The American Journal of Medicine 112: 89-95,  
2002

7. Onishi M, Morimoto S, Yang J, Okaishi K,  
Katsuya T, Shimizu M, Okuro M, Sakurai S,  
Onishi T and Ogihara  
Association of angiotensin-I converting  
enzyme DD genotype with influenza  
pneumonia in the elderly.  
Geriatrics and Gerontology International  
2002, in press

H. 知的財産権の出現、登録状況  
なし。

厚生科学研究費補助金（厚生労働省長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

高齢者虚血性心疾患の易発症性に関する遺伝的背景の解明

主任研究者 森本茂人 大阪大学加齢医学講座助教授

高齢者虚血性心疾患発症に対するエンドセリン遺伝子 Lys 198 Asn 多型の関与につき検討した。65 歳以上の 125 例の虚血性心疾患例、および性、年齢を一致させた 500 例の対照例を対象とした case-control 試験において、調査項目の中で高血圧の合併およびエンドセリン遺伝子 Lys 198 Asn 多型が、多重ロジスティック回帰分析の結果においても有意の関与因子として認められ、高齢者虚血性心疾患の遺伝的危険因子として作用している可能性がある。

A. 研究目的

高血圧が危険因子として関与する虚血性心疾患は、65 歳以上の老年者においても死因の第二位を占める重要な臓器障害である。一方、若年者における虚血性心疾患の発症には遺伝的背景が存在し、アンジオテンシン変換酵素遺伝子多型の関与などが知られている。しかし、また老年者においては歳月を経て蓄積された生活習慣、慢性疾患の多発、加齢そのものに伴う動脈硬化の進展など、環境因子あるいは他疾患が複雑に関与することから、老年者の虚血性心疾患に対する遺伝的背景は未だ明らかにされていない。研究者は、これら環境因子、他の危険因子、あるいは他合併症なども考慮に入れた高血圧、動脈硬化関連遺伝子の解析を進めた

このうち、エンドセリンは血管内皮より産生される強力な血管収縮性物質であり、種々の血管疾患に対して重要な役割を担っており、高血圧、動脈硬化などの心血管疾患の原因因子の一つとして

知られている。一方、エンドセリン 1 遺伝子のコドン 198 番目の G/T 多型で、リジン/アスパラギン変異 (Lys/Asn 多型) を伴う。エンドセリン 1 遺伝子の、Lys/Asn 多型のうち Asn 型が、肥満高血圧に関与することが、ヨーロッパ人や日本人において報告例されている。しかし虚血性心疾患への関与は現在までに報告されていない。

B. 研究方法

研究者は、老人病院にて、同意を得た、65 歳以上の 125 例の虚血性心疾患例、および性、年齢を一致させた 500 例の対照例を対象とした (男性 100 例、女性 525 例)。これらの例からは、腎不全 ( $Cr \geq 2.0$  mg/dL)、重症感染症、末期患者は除外した。また、虚血性心疾患発症に対する既知の危険因子である高血圧 ( $SBP \geq 140$  mmHg,  $DBP \geq 90$  mmHg、または降圧薬を内服している者)、高コレステロール血症 ( $T-Chol \geq 220$  mg/dL)、糖尿病 ( $FBS \geq 126$  mg/dL、または糖尿病薬内服

例)の合併につき調査するとともに、エンドセリン遺伝子 Lys198Asn 多型、アンジオテンシン I 変換酵素 I/D 多型、アンジオテンシノーゲン M235T 多型、アンジオテンシン II 1 型受容体 A1166C 多型につき検討した。このうちエンドセリン遺伝子は第 6 番染色体に位置し、5.5 kb の長さで、5 個の exon と 4 個の intron を有するが、Lys198Asn 多型につき ABI 7200 による蛍光強度測定を用いた Taq Man PCR 法により解析した。解析したのはエンドセリン 1 遺伝子のコドン 198 番目の G/T 多型で、Taq Man PCR 法の原理は、遺伝子多型ごとに異なる蛍光を発する色素を組み込んだプローブを PCR の反応系に加えることにより、各遺伝子型にアニールするプローブの蛍光色素が放出され、この色素の蛍光を測定することにより、遺伝子型を確定することが可能である。codon198 の G/T 多型に合わせ調整した 2 種類の蛍光色素プローブをこの多型部位を含む 5' 上流域および 3' 下流域に設定した。

### C. 研究結果

検討した臨床危険因子において、対照高齢者高齢者群に比し、高齢虚血性心疾患群において、高血圧の合併は 41%対 51%と有意 ( $p=0.04$ ) に高値を示したが、糖尿病合併 (9%対 11%) および高コレステロール血症合併 (20%対 19%) はいずれも両群間に有意差を認めなかった。一方、対照高齢者高齢者群に比し、高齢虚血性心疾患群において、検討した遺伝子多型では、エンドセリン遺伝子 Lys198Asn 多型が、GG 型、GT 型、TT 型が、53%、43%、4%対 40%、54%、6%と、虚血性心疾患群ではコントロール群に比し、GT+TT 型の割合、すなわちアスパラギン型の遺伝子型が有意に多く認められた ( $\chi^2$  値 6.35、危険率 0.04)。

次に、現在までに虚血性心疾患への関与が知られている、代表的な遺伝子多型、すなわちアンジオテンシンI変換酵素I/D多型、アンジオテンシノーゲンM235T多型、アンジオテンシンII 1型受容体A1166C多型についても検討した。成壮年者ではアンジオテンシノーゲンM235T多型におけるTT型が、アンジオテンシンII 1型受容体A1166C多型ではCCおよびAC型が、また、アンジオテンシン変換酵素I/D多型ではDD型が、それぞれ虚血性心疾患の遺伝的危険因子になっていることが報告されているが、今回我々が検討した高齢者ではいずれの遺伝子多型も虚血性心疾患に対する有意関与は認められなかった。

一方、エンドセリン 1 遺伝子多型の遺伝子型頻度と、年齢、性、高血圧、糖尿病、高コレステロール血症との関連を調査したところ、エンドセリン遺伝子多型は、年齢、性、糖尿病、高コレステロール血症に対してはいずれも有意の関与を示さなかったが、高血圧の合併に対しては、アスパラギン型エンドセリン遺伝子型が有意に多く、危険率 0.03 で有意の関与を認めた。すなわち、アスパラギン型エンドセリン遺伝子型は、成壮年者で認められている肥満高血圧とともに、高齢者高血圧に対しても遺伝的危険因子となると考えられる。

以上の単項目間解析により、虚血性心疾患に対して有意に関与を示した高血圧、およびエンドセリン 1 遺伝子多型、および case-control の規程因子である年齢、性を交絡因子として、多重ロジスティック回帰による、虚血性心疾患に対する独立有意関与因子の解析を行った。エンドセリン 1 遺伝子多型は、高血圧、年齢、性により補正後も虚血性心疾患の独立有意関与因子として認められ、GG 型を 1 としたときの GT+TT 型における虚血性心疾患の合併相対危険率は 1.63 であり、危険率 0.02 で関与が認められた。一方、高血圧もま

た、この高齢者群においては、虚血性心疾患に対する独立有意関与因子として認められ、その相対危険率は1.5倍程度であった。

さらに条件付き多重ロジスティック回帰分析にて、高血圧無し及び有りのそれぞれの群で年齢、性補正後の、エンドセリン1遺伝子多型の虚血性心疾患合併に対する関与を検討したところ、高血圧無しの群では、エンドセリン1遺伝子多型の虚血性心疾患に対する関与は消失するものの、高血圧を有する群においてはエンドセリン1遺伝子多型は虚血性心疾患合併に対する有意関与が認められ、GG型を対照群とするGT+TT型の虚血性心疾患合併の相対危険度は2.4で、危険率1%以下の有意の関与を認めた。このことから、エンドセリン1遺伝子多型は、特に老年者高血圧例で虚血性心疾患合併に大きく関与していると考えられる。

#### D. 考察

以上の結果より、エンドセリン1遺伝子多型は、老年者の高血圧に関与し、さらに高血圧を交絡因子として補正しても虚血性心疾患合併への独立有意関与が認められることから、高血圧への発症機序以外に直接的に虚血性心疾患の合併に関与していると考えられた。

また、老年者高血圧群で特に関与が認められたことより、エンドセリン1遺伝子多型のTアレルが原因となった高血圧を有する例においては虚血性心疾患を高率に合併すると考えられる。本研究で明らかに成った老年者虚血性心疾患の遺伝的背景により、遺伝的高負荷群においては早期より環境因子を整えることにより虚血性心疾患発症予防を目指す手段を提供しうると考えられる。

#### F. 研究発表

1. Kawai Y, Morimoto S, Sakaguchi K,

Yoshino H, Yotsui T, Hirota S, Inohara H, Nakagawa T, Hattori K, Kubo T, Yang J, Fujiwara N and Ogihara T.

Oncogenic osteomalacia secondary to nasal tumor with decreased urinary excretion of cAMP

*Journal of Bone and Mineral Metabolism* 19: 61-64, 2001

2. Hata S, Fukuo K, Morimoto S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Ogihara T.

Vascular smooth muscle maintains the levels of Bcl-2 in endothelial cells.

*Atherosclerosis* 154: 309-316, 2001

3. Yamanaka Y, Hayashi K, Komurasaki T, Morimoto S, Ogihara T, Sobue K.

EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor.

*Biochemical Biophysical Research Communication* 281: 373-377, 2001

4. Mino Y, Morimoto S, Okaishi K, Sakurai S, Onishi M, Okuro M, Matsuo A, Ogihara T.

Risk factors for decubitus ulcers in bedridden elderly subjects. -Importance of turning over in bed and serum albumin level.

*Giatrics and Gerontology International* 1: 38-44, 2001

5. Ogihara T, Morimoto S, Okaishi K, Hiwada K, Matsuoka H, Matsumoto M, Takishita S, Shimamoto K, Shimada K, Abe I, Kohara K, Ouchi Y.

Questionnaire survey on the Japanese



Guidelines for Treatment of Hypertension  
in the Elderly -1999 Revised version-  
Hypertension Research 25: 69-75, 2002

6. Morimoto S, Okaishi K, Onishi M,  
Katsuya T, Yang J, Okuro M, Sakurai S,  
Onishi T, Ogihara T.  
Angiotensin-I converting enzyme gene  
polymorphism as an indicator of risk of  
pneumonia in the elderly.  
The American Journal of Medicine 112:  
89-95, 2002

7. Onishi M, Morimoto S, Yang J, Okaishi K,  
Katsuya T, Shimizu M, Okuro M, Sakurai  
S, Onishi T and Ogihara  
Association of angiotensin-I converting  
enzyme DD genotype with influenza  
pneumonia in the elderly.  
Geriatrics and Gerontology International  
2002, in press

G. 知的財産権の出現、登録状況  
なし。

研究要旨：高齢者の心疾患、上位を占め、早期治療・予防は厚生労働行政の重要な課題となる。本研究では、高齢者の虚血性心疾患、脳卒中、肺炎などの疾患、および高齢者の寝たきり状態に対する遺伝的負荷につき検討した。1011 人の高齢入院患者において、アンジオテンシン変換酵素遺伝子多型の DD 型保有者は、I アリルキャリアに比し 2.9 倍の肺炎リスクを示すことが明らかになった。

#### A. 研究目的

高齢者において、咳嗽反射の減弱は誤嚥を惹起し、呼吸器の易感染性を亢進される。アンジオテンシン変換酵素は、アンジオテンシン II 産生以外にも、サブスタンス P やブラディキニンの代謝に関与し、同変換酵素阻害薬による乾性咳嗽出現に影響する。本研究では、高齢者の肺炎リスクとしてのアンジオテンシン変換酵素(ACE: angiotensin converting enzyme)遺伝子多型の意義を検討した。

#### B. 研究方法

本研究は阪和第二泉北病院の守口篤院長との共同研究である。同病院の入院患者および外来患者の中で、遺伝子解析についての同意の得られた者のみを対象とした。対象者より採血を実施し、白血球分画を分離後、QIAamp DNA Blood Kit(QIAGEN Inc.)を用いて DNA を抽出した。1 年間のフォローアップ期間中に発症した肺炎は、the Centers for Disease Control and Prevention の診断基準に基づき判定した。ACE 遺伝子の第 16 イントロンにある挿入(I)・欠失(D)多型は Rigat らの方法により決定し、I アリル特異的 PCR により確認を行った。統計学的有意差検定は SPSS を用いて行った。

(倫理面への配慮) ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、同意を得た上で行った。

#### C. 研究結果

1011 人の対象者の中で、1 年間の機関に 87 名の肺炎発症を認めた。致死性肺炎のリスクとしては、男性、痴呆、低アルブミン血症が、非致死性肺炎のリスクとしては、痴呆が有意であった。対象者における ACE 遺伝子型の分布は、日本人一般集団に近似していたが、ACE/DD 型保有者では有意に肺炎

リスクが高く、I アリルキャリアとの比較により算出したオッズ比は 2.6 (95% CI=1.5-4.3)に達した。致死性肺炎のリスクはオッズ比=3.8(95% CI: 1.9-7.7)、非致死性肺炎に対するオッズ比=1.8(0.8-3.8)であった。Kaplan-Meier 曲線を用いて肺炎の累積発症率を比較すると、D アリル数に応じた増加が認められ、II 型保有者の肺炎リスクは極めて低いことが示された。多変量解析でも ACE/DD 型は独立した危険因子であることが示され、DD 型保有者の肺炎リスクは 2.9 倍(1.7-4.8)と増加した。

#### D. 考察

ACE/D アリルは血中 ACE 濃度を増加させ、アンジオテンシン II 産生亢進、ブラディキニンやサブスタンス P の低下を招くと考えられる。本研究では、他のレニン-アンジオテンシン系遺伝子多型も検討しているが、肺炎リスクとの関連を認めないことから、本多型の違いが高齢者の咳反射に直接影響している可能性が示唆される。今後、血中および組織の ACE 活性や発現レベルと本多型、肺炎罹患性の関連の検討が必要と考える。

#### E. 結論

ACE/DD 多型は高齢者肺炎易感受性の 1 つのリスクになることが示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Morimoto S, Katsuya T, et al.: Deletion of the angiotensin converting enzyme gene as a risk factor for pneumonia in elderly patients. *Am J Med*, 112: 89-94, 2002.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものなし。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

## 肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者におけるマンナン結合 レクチン遺伝子多型の解析

分担研究者：奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課長

共同研究者：鈴木定彦 大阪府立公衆衛生研究所病理課主任研究員

研究要旨：肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者より得られたDNAよりPCR法によりマンナン結合レクチン遺伝子のエキソン1領域を増幅させた後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、高齢者インフルエンザ患者における肺炎発症とマンナン結合レクチン遺伝子多型の相関性の解析を行った。49例の肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者と以前にわれわれが報告した日本人におけるマンナン結合レクチン遺伝子多型の頻度を比較した結果有意差が見られなかった。

### A. 研究目的

レクチンは、糖鎖を有する物質を凝集する活性を持ち、その結合が単糖やオリゴ糖を添加することにより阻害できる物質を意味している。動物血清レクチンは1980年、Kozutsumi<sup>1</sup>らにより初めて報告された。その後しばらくその生物学的意義は不明であったが、このレクチンの欠損と、易感染性の関連がいくつかのグループから報告されるにいたって、本レクチンの生理的意義の一つが感染に対する基礎免疫である可能性が提唱された。

現在ではこれらの動物血清レクチンは、内部コラーゲン様構造を持つため、コレクチンと呼ばれている。現在コレクチンとしては血清中に存在するマンナン結合レクチン (mannan binding lectin ; MBL)、コングルチニン (conglutinin ; BKg)、CL-43 (collectin 43 ; CL-43) と肺のサーファクタントや羊水中に存在するサーファクタント蛋白A (surfactant protein A ; SP-A) およびサーファクタント蛋白D (surfactant protein D ; SP-D) の5種類が報告されている。十字架様構造を持つBKgやSP-Dではその大きさ

は約100nmとウイルスに匹敵する巨大な分子となっている。一方MBPやSP-Aでは、その形はブーケ様構造で、補体第1因子q (C1q)の構造と非常に類似している。

コレクチンの生理的な機能の一つとして、細菌のみならず酵母やウイルスなど、広範囲の微生物に対する基礎免疫に関与している可能性があるが、本レクチンがどのような機序で宿主の防御に関わっているのか、詳しくは解明されていない。しかし、本レクチンは補体のカスケードと並行して補体の活性化を導くことが最近明かとなり注目を集めている。つまりMBPでは糖認識領域で異物と結合し、これにプロテアーゼ (mannan binding protein associated serine protease ; MASP) が結合し、補体を活性化する経路が明らかにされている。また、本レクチンは、異物と結合してオプソニンとして働き、白血球などによって取り込まれ処理される経路も考えられている。エンドサイトーシスの際の細胞側レセプターについてはいろいろな報告があるが、現在のところ確定されたものはない。オプソニンとともに重要なのは、原始的な凝集活性である。これは、レクチンの多

価の結合手による結合であるが、単に凝集塊を形成するだけでなく、高原の密度を高めたり物理的に排除しやすい大きさに整えたりと合目的な働きをしている。これらの機能が宿主の防御に関わっていることはまちがいないであろう。

われわれはこのコレクチンに興味を持ち、研究を進めてきた。これまでの研究で大腸菌、動物細胞を宿主として、BKg<sup>2, 3</sup>、ヒトSP-D<sup>4</sup>、ヒトMBL<sup>5, 6</sup>の組み替え蛋白質を発現させ、それらの生化学的性状についての解析を行ってきた。また、動物レクチンの一種であるヒトマンナン結合レクチンの抗インフルエンザウイルス活性に関して検討をするために天然型および組み替え型ヒトマンナン結合蛋白質を用いて実験を行った。天然型、組み替え型どちらも0.1 µg/mlの濃度でウイルスを中和する事が確認された。また、細胞への感染の後ヒトマンナン結合蛋白質を加えた場合にはウイルス感染細胞の拡大を抑制する活性があることも確認できた。また、組み替え型ヒトマンナン結合蛋白質を用いる事によりこれらの活性には補体の関与が必要ではないことが判明した<sup>7, 8, 9</sup>。さらに、マンナン結合レクチンの濃度が健常者由来血清においては平均1.04 µg/ml、最低濃度は検出限界の0.03 µg/ml以下、最高濃度は4.7 µg/mlであることを報告した。年代別の濃度分布は20代から50代にかけて減少傾向を示すものの、60代、70代ではむしろ増加傾向がみられることが明かとなった。これは、高齢化に伴って低下する細胞性免疫(T細胞が主な働きをしている)および液性免疫(B細胞が主な働きをしている)等の獲得免疫を相補するためではないかと考えられた<sup>10</sup>。また、日本人におけるマンナン結合レクチン遺伝子の遺伝子多型と血中濃度の相関について解析を行い、この両者の間に強い相関関係があることを示した<sup>11</sup>。

本研究では肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者におけるマンナン結合レクチン遺伝子多型の解析をすることにより、特異免疫の低下した高齢者のインフルエンザ感染におけるマンナン結合レクチンの関与について検討した。

## B. 研究方法

平成11年4月～12年3月の間に、大阪府下の某病院における肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者より採血し、抹消血リンパ球より抽出したDNAを鋳型として表1に示すオリゴヌク

レオチドをプライマーとしてPCRを行い、マンナン結合レクチン遺伝子エキソン1領域を増幅させた。次に増幅産物をアガロースゲル電気泳動にて展開後、ゲルよりエキソン1領域を含むDNA断片を切り出し、塩基配列を決定し、遺伝子変異を検出した。

表1 マンナン結合レクチン遺伝子エキソン1領域の増幅に用いたプライマー

Name	sequence
EX1SF	CAGATTGTAGGACAGAG
EX1SR	CAGTCTCCTCATATCCC

## (倫理面への配慮)

本研究遂行に当たっては、文部科学省、経済産業省、厚生労働省が共同で策定している「ヒトゲノム研究に関する共通指針」の原案を遵守して行なった。また、検体の個人情報、連結不可能匿名化して取り扱った。

## C. 研究結果

表2にわれわれが以前に報告した日本人の健常者479例におけるマンナン結合レクチン遺伝子多型の解析結果と今回行った肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者におけるマンナン結合レクチン遺伝子多型の解析結果を示す。

表2 健常者および肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者におけるマンナン結合レクチン遺伝子の遺伝子多型

population group	genotype		
	A/A	A/B	B/B
Healthy control (n=479)	339 (70.8 %)	108 (22.5 %)	32 (6.7 %)
This work (n=49)	35 (71.4 %)	11 (22.5 %)	3 (6.1 %)

A: wild type, B: variant allele (codon 54)

表2の結果より、肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者におけるマンナン結合レクチン遺伝子のパリアントアレルの出現する頻度は健常者のそれとほぼ同一であることが判明した。

## D. 考察

われわれの以前の研究結果では、培養細胞を用

いた系においてはマンナン結合レクチンがインフルエンザウイルスの感染と広がり抑制できることが明かとなっていた。本研究では、特異免疫が低下し自然免疫の効果が表に現れると考えられる高齢者において、自然免疫の担い手の一つと考えられているマンナン結合レクチンのインフルエンザ患者における意義を明かとするためにマンナン結合レクチンの血中濃度を決定しているマンナン結合レクチン遺伝子エキソン1領域における遺伝子多型を、肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者を対象として解析した。その結果、われわれの予想と反して肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者においても健常者とほぼ同一の遺伝子多型パターンを示していた。このことは高齢者におけるインフルエンザにともなう肺炎の発症の抑制にはマンナン結合レクチンは関与していないことを間接的に示すものであった。今後はコレクチンの一種で肺サーファクタントに存在し、免疫監視を行っていると考えられているサーファクタント蛋白AおよびDの遺伝子多型について解析を行ってゆきたいと考えている。

#### (文献)

- 1) Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., Yamashina, I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum. *Biochem Biophys Res Commun* 1980 31;95(2):658-64
- 2) Eda, S., Suzuki, Y., Kase, T., Kawai, T., Ohtani, K., Sakamoto, T., Kurimura, T., Wakamiya, N. Recombinant bovine conglutinin, lacking the N-terminal and collagenous domains, has less conglutination activity but is able to inhibit haemagglutination by influenza A virus. *Biochem. J.*, 1997 323:393
- 3) Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Ohtani K, Kase T, Sakamoto T, Wakamiya N. Characterization of recombinant bovine conglutinin expressed in a mammalian cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 29;238(3):856-60
- 4) Eda S, Suzuki Y, Kawai T, Ohtani K, Kase T, Fujinaga Y, Sakamoto T, Kurimura T, Wakamiya N. Structure of a truncated human surfactant protein D is less effective in agglutinating bacteria than the native structure and fails to inhibit haemagglutination by influenza A virus. *Biochem J*

1997 15;323 ( Pt 2):393-9

- 5) Eda S, Suzuki Y, Kawai T, Ohtani K, Kase T, Sakamoto T, Wakamiya N. Characterization of truncated human mannan-binding protein (MBP) expressed in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998 62(7):1326-31
- 6) Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Keshi H, Sakai Y, Yamamoto S, Sakamoto T, Wakamiya N. High-level and effective production of human mannan-binding lectin (MBL) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J Immunol Methods* 1999 1;222(1-2):135-44
- 7) Kase, T., Suzuki, Y., Kawai, T., Sakamoto, T., Ohtani, K., Eda, S., Maeda, A., Okuno Y., Kurimura, T., and Wakamiya, N. Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without complement. *Immunology* 1999 97:385-392
- 8) 若宮伸隆、鈴木定彦 レクチンによるウイルス感染制御 臨床免疫 1997 29:508-513
- 9) 若宮伸隆、鈴木定彦 生体防御レクチンとしてのコレクチンファミリー 蛋白質・核酸・酵素 2000 45: 655-663
- 10) 鈴木定彦 コレクチンの生体防御における役割と年齢による推移 エストレーラ 2000, 79; 31-35
- 11) 芥子宏之、大谷克城、坂本隆志、岸雄一郎、荒木宏昌、鈴木定彦、若宮伸隆 日本人におけるMBL遺伝子変異と血中濃度の検討 医学のあゆみ 2000 194: 957-958

#### E. 結論

肺炎を発症した高齢者インフルエンザ患者においても健常者とほぼ同一のマンナン結合レクチン遺伝子の遺伝子多型パターンを示していた。高齢者におけるインフルエンザにともなう肺炎の発症の抑制にはマンナン結合レクチンは関与していないと考えられた。

#### F. 研究発表

##### (1). 論文発表

1. Nakagawa, N., Kubota, R., Nakagawa, T., and Okuno, Y. Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains. *J. Gen. Virol.*

- 82:2169-2172. 2001.
2. Nakagawa, N., Kubota, R., Morikawa, S., Nakagawa, T., Baba, K., and Okuno, Y. Characterization of new epidemic strains of influenza B virus by using neutralizing monoclonal antibodies. *J. Med. Virol.* 65:745-750. 2001.
  3. Suzuki, Y., Yoda, T., Ruhul, A., Sugiura, W. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil. *J. Biol. Chem.* 276:9059-9065. 2001.
  4. Tsuji, S., Uehori, J., Matsumoto, M., Suzuki, Y., Suzuki, Y., Matsuhisa, A., Toyoshima, K., and Seya, T. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacteria cell-wall. *J. Biol. Chem.* 276:23456-23463. 2001.
  5. Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., and Wakamiya, N. The membrane type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276:44222-44228. 2001.
  6. 奥野良信: 高齢者のインフルエンザ予防策 (一週一話). *日本医事新報*, 4040: 85, 2001
  7. 奥野良信: インフルエンザの疫学と変異. *小児感染免疫*, 13(4): 355-358, 2001
  8. 奥野良信: インフルエンザウイルス (分担執筆). *感染症研究のいま* (大阪大学新世紀セミナー) (本田武司、生田和良、堀井俊宏編), p.51-57, 大阪大学出版会. 2001
  9. 鈴木定彦, 田丸亜貴, 鈴木文, 勝川千尋: 結核菌の化学療法剤と薬剤耐性. *臨床と微生物*, 28: 35-41, 2001
  10. 鈴木定彦, 田丸亜貴, 鈴木文, 勝川千尋: 結核菌の薬剤耐性. *感染症*, 31: 75-83, 2001
  11. 鈴木定彦, 若宮伸隆: 感染防御とコレクチンファミリー. *Annual Review 免疫* 2002: 217-225, 2001
- (2) 学会発表
1. 弓指孝博, 木村朝昭, 奥野良信: 高齢者におけるインフルエンザワクチン接種後の HI および中和抗体の経時的推移について. 第 42 回日本臨床ウイルス学会、名古屋 (2001、6)
  2. 岡本成史, 川端重忠, 中川一路, 奥野良信, 浜田茂幸: インフルエンザウイルス及び A 群レンサ球菌により引き起こされる劇症型感染症の発症とそのメカニズム. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
  3. 廣野ゆかり, 鈴木和宏, 赤堀 泰, 黒澤良和, 久保田律子, 鈴木定彦, 奥野良信: インフルエンザウイルスに対するヒト型モノクロナール抗体の作製. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
  4. 齋藤紀幸, 安岐昌子, 一口 毅, 天辻康夫, 馬場宏一, 森川佐依子, 加瀬哲男, 奥野良信: インフルエンザ A/B 検出迅速診断キットの開発. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
  5. 加瀬哲男, 森川佐依子, 奥野良信, 馬場宏一: 2000/2001年シーズンを通しての 1 小児科におけるインフルエンザの観察. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
  6. 中川直子, 奴久妻聡一, 呉 笑山, 中川俊正, 奥野良信, 林皓三郎: B 型インフルエンザウイルス Yamagata タイプの抗原性変異の解析. 第 49 回日本ウイルス学会総会、大阪市 (2001、11)
  7. 奥野良信: インフルエンザの疫学とウイルス変異. 第 33 回日本小児感染症学会、山口県宇部市 (2001、11)
  8. 池田 優, 森口直彦, 磯川貞之, 吉岡加寿夫, 片岡 知, 加瀬哲男, 奥野良信: インフルエンザワクチン接種にもかかわらずインフルエンザ脳症をきたした一例. 第 33 回日本小児感染症学会、山口県宇部市 (2001、11)
  9. 因田祥子, 森島恒雄, 富樫武弘, 水口 雅, 横田俊平, 田代真人, 岡部信彦, 奥野良信, 宮崎千明: インフルエンザ脳炎・脳症全国調査-検査所見を中心に- (インフルエンザ脳炎・脳症研究班. 第 33 回日本小児感染症学会、山口県宇部市 (2001、11)
  10. H Keshi, T Kawai, Y Suzuki, K Ohtani, A Fukuoh, T Sakamoto, N Wakamiya. Molecular cloning and characterization of a novel collectin CL-K1. 第 16 回 国際複合糖質学会、デンハーグ (オランダ) (2001)
  11. K Ohtani, Y Suzuki, S Eda, T Kawai, A Fukuoh,

H Keshi, T Sakamoto, N Wakamiya. Molecular cloning and characterization of a novel collectin CL-P1. 第 16 回 国際複合糖質学会、2001. デンハーグ (オランダ) (2001)

12. 大谷克城、鈴木定彦、坂本隆志、芥子宏行、福應 温、若宮伸隆 コレクチンの分子進化について 第 24 回 日本分子生物学会、横浜市 (2001)
13. 芥子宏行、大谷克城、鈴木定彦、坂本隆志、福應 温、若宮伸隆 新規コレクチン CL-K1 のクローニングと機能解析 日本分子生物学会、横浜市 (2001)
14. 大谷克城、鈴木定彦、坂本隆志、芥子宏行、福應 温、若宮伸隆 新規膜型コレクチン CL-P1 のクローニングと機能解析 第 29 回 日本免疫学会、大阪市 (2001)

厚生科学研究費補助金（厚生労働省長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

Humanin による神経細胞死の抑制に関する研究

分担研究者 上野 聡 奈良県立医科大学神経内科 教授

研究要旨 HN および HNG は無血清培養した PC12h 細胞の細胞死、DNA 断片化および caspase-3 活性の上昇を抑制した。HN および HNG は、アポトーシス実行カスケードの進行を阻止することにより、多種の細胞および細胞損傷に対して細胞死抑制作用を発揮する可能性がある。

E. 研究目的

Humanin (HN) は、アミロイドβ蛋白の培養液内添加や異常 presenilin 2 遺伝子の過剰発現など、アルツハイマー病に関連した細胞死を抑制するペプチドとして報告された。本研究は、HN が今までの報告とは異なる細胞種や細胞損傷に対しても細胞死抑制作用を示すか否かを検討することを目的とする。

F. 研究方法

HN 添加あるいは非添加の無血清培養液中、ラット pheochromcytoma(PC12h) 細胞を培養し、生存 PC12h 細胞数を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay で評価した。培養 PC12h 細胞の caspase-3 活性を測定し、genomic DNA を抽出し DNA 断片化を検討した。

G. 研究結果

無血清培養した PC12h 細胞では、血清培養した場合に比べ8時間後 caspase-3 活性は約3倍に上昇し、48時間後には約80%の PC12h 細胞は死滅し、DNA 断片化がみられた。無血清培養液に HN を添加すると、HN 非添加の場合に比べ用量依存性に生存 PC12h 細胞数は有為に増加し、PC12h 細胞の caspase-3 活性は抑制され、DNA 断片化は認められなかった。HN ペプチド14番目のアミノ酸残基セリンをグリシンに置換したペプチド (HNG) はより低濃度で、HN と同等の PC12h 細胞死抑制効果を示した。



#### D. 考察

HN および HNG は、無血清培養した PC12h 細胞にみられるアポトーシス実行カスケードの進行を阻止し、アポトーシスによる細胞死を抑制すると考えられる。HN および HNG は、無血清培養とアルツハイマー病関連細胞損傷にみられる細胞死を同様に抑制することから、2 種類の細胞損傷による細胞死誘発機序には共通した部分が存在する可能性がある。

#### E. 結論

HN および HNG は、アルツハイマー病関連以外の細胞損傷による細胞死を抑制する作用がある。HN および HNG は、従来の報告以上に多様な細胞や細胞損傷に対して、細胞死抑制作用を発揮する可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shingo Kariya, Nobuyuki Takahashi, Naoki Ooba, Makoto Kawahara, Hitoshi Nakayama, Satoshi Ueno: Humanin inhibits cell death of serum-deprived PC12h cells. Neuroreport (in press)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)

分担研究報告書

高齢者疾患の易発症性に対する遺伝的負荷の解明

分担研究者 覚道 健一 和歌山県立医科大学 第二病理学教室教授

研究要旨

高齢者において骨粗しょう症は深刻な問題である。我々は、高齢者骨粗しょう症における内分泌因子の遺伝的負荷の解明を目的にカルシトニン (CT) 遺伝子、カルシトニン受容体 (CTR) 遺伝子、ビタミン D 受容体 (VDR) 遺伝子の多型と骨密度 (BMD) および血中オステオカルシン(OC)値との関係について解析を行った。その結果、3 種の遺伝子多型と BMD との間に相関性は見られなかった。OC に関しては、CT、CT/CTR (CT 遺伝子型と CTR 遺伝子型との組み合わせ)、CT/CTR/VDR の遺伝子型において各グループで有意な差が認められた。以上の結果より、CT の CA repeat 遺伝子多型は血中 OC レベルを決定する一つの因子であり、その機序に CTR および VDR の遺伝子多型が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

高齢者において骨粗しょう症は深刻な問題である。従来より、ビタミン D 受容体 (VDR) 遺伝子の多型と骨密度 (BMD) および血中オステオカルシン(OC)値との間に相関のあることが報告されているが、対象集団によって必ずしも一致した見解が得られていないのが現状である。そこで我々は、VDR 多型以外に骨密度 (BMD) や血中オステオカルシン(OC)値に影響する遺伝子多型を明らかにすることを目的に骨代謝と関係の深いカルシトニン (CT) 遺伝子、カルシトニン受容体 (CTR) 遺伝子、ビタミン D 受容体 (VDR) 遺伝子の多型と骨密度 (BMD) および血中オステオカルシン(OC)値との関係について解析を行った。CT 遺伝子の多型として、Miyao らの報告による cystein-adenine (CA) dinucleotide repeat の数を、CTR には、我々が報告した

cystein (C)と thymine (T)の 1 塩基多型を、また VDR には BsmI による多型 (B と b) を指標とした。

B. 研究方法

材料は、大阪在住の健常日本人高齢者女性 66 名 (68.65 ± 13.13 歳) の末梢血を用いた。

I.末梢血 DNA の抽出

Sepa Gene kit (三光純薬化学〔株〕)を用い、プロトコールに従い行った。

II.CT 遺伝子の CA repeat 数の決定

6FAM でラベルした forward primer 5'-GGAGACAAACAGGGATGACA-3' (Applied Biosystems Co., Tokyo, Japan) および unlabeled reverse primer (5'-CA GAAAVATGGTGTGCCAGC-3') を用いて、I.で抽出した DNA をテンプレート

にして 30 cycles (each 30s at 94°C, 60s at 58°C, and 60s at 72°C) で PCR を行った。一部をフォルムアミドおよび matrix size standard marker GS450 TAMRA (Applied Biosystems Co.), と混和し、95°C 処理後氷冷した。ABI DNA sequencer (ABI PRISM310, Applied Biosystems Co.) を用い、PCR 産物を 6% urea gel (GS STR POP4: Applied Biosystems Co.) at 60 °C にて分離した。autosequencer Model 373A (Applied Biosystems Co.) を用いて 17 (CA) repeats の直接シーケンスを行い、これを指標として他の repeats 数の決定を行った。

### III. CTR 遺伝子多型の決定

PCR- restriction enzyme 法により行った。  
forward primer 5'-  
TCAACATTGTCCGG GTGCTTG -3'  
(Applied Biosystems Co., Tokyo, Japan)  
および reverse primer 5'-  
CTCAGTGATCACGATACTGTG -3'  
を用いて、I. で抽出した DNA をテンプレートにして 30 cycles (each 30s at 94°C, 30s at 58°C, and 30s at 72°C) で PCR を行った。得られた PCR 産物を AluI 酵素処理を行い、切断された場合 T、切断されなかった場合 C と判定した。

### IV. VDR 遺伝子多型の決定

PCR- restriction enzyme 法により行った。  
forward primer 5'-  
CAACCAAGACTCAA  
GTACCGCGTCAGTGA -3' および  
reverse primer 5'-  
AACCAGCGGAAGAGGTCA AGGG -3'  
を用いて、I. で抽出した DNA をテンプレ

ートにして 35 cycles (30s at 94°C, 60s at 58°C, and 30s at 72°C) で PCR を行った。得られた PCR 産物を BsmI 酵素処理を行い、切断された場合 b、切断されなかった場合 B と判定した。

### V. BMD および OC の測定

BMD は dual energy X-ray absorptiometry 法 (Lunar DPX: Lunar Radiation Co.) により、第 4 腰椎を測定した。OC は BGM IRMA kit (Mitsubishi petrochemical Co. Ltd.) を用い immunoradiometric assay 法により、測定した。

### VI. 統計処理

各遺伝子多型と BMD および OC の値との相関性は、ANOVA (StatView4.5, ABACUS Concepts) 解析により行った。P 値が、0.05 以下の場合を有意差有りとなした。

### C. 研究結果

3 種の遺伝子多型と BMD および OC 値との関係

3 種の遺伝子多型と BMD に相関性は見られなかった。OC に関しては、CT 遺伝子座における CA repeats 数が 10 と 17 (10/17) の heterozygote のグループが他の CA repeats 数を持つグループと比較して有意に低かった ( $p=0.0035$ )。10/17 または 17/17 の遺伝子型が日本人ではほとんどで、10/17 の遺伝子型のグループと 17/17 のグループでの比較においても 10/17 の遺伝子型のグループは有意に OC 値が低かった ( $p=0.044$ )。CTR および VDR の遺伝子多型と Oc 値との間に相関性は見られなかった。

3種の遺伝子多型の組み合わせと BMD および OC 値との関係

CT、CT/CTR (CT 遺伝子型と CTR 遺伝子型との組み合わせ)、CT/CTR/VDR の遺伝子型において各グループで OC 値において有意な差が認められた。CT の CA repeats 数と CTR の遺伝子型の組み合わせにおいて 10C/17C のグループは他のグループと比べて有意に OC 値が低かった ( $p=0.014$ )。CT の CA repeats 数と VDR の遺伝子型の組み合わせにおいて 10b/17b のグループは他のグループと比べて有意に OC 値が低かった ( $p=0.01$ )。さらに、CT の CA repeats 数と CTR および VDR の遺伝子型の組み合わせにおいて 10Cb/17Cb のグループは他のグループと比べて有意に OC 値が低かった ( $p=0.028$ )。3種の遺伝子多型の組み合わせと BMD 値において有意な差は認められなかった。

#### D. 考察

本研究より、CT の CA repeats 数は OC レベルと密接な関連のあることが明らかとなり、このことは、CT の CA repeats 数が血中 OC レベルを決定する遺伝的ファクターであることを示唆する。OC は、ビタミン K の作用のもとで、骨芽細胞により合成され、骨の非コラーゲン性蛋白の 25% を占めるカルシウム結合蛋白である。骨代謝回転 (特に骨形成) と密接な関係があり、血中濃度を測定することにより、骨の代謝異常あるいは治療効果を知るうえで有用である。OC の合成は、vitamin D と VDR の複合体が OC 遺伝子のプロモーターに存在する vitamin D-responsive element に結合することで始まることが報告されている。血中の OC 濃度は遺伝的要因による影響を

強く受けていることが言われており、特に VDR 遺伝子多型と OC 値との相関性が健康白人の集団で報告されている。この報告では、BB グループが bb グループと比較して OC が有意に高いことを示している。我々の結果では、この 2 グループに統計学的有意な差は認めないものの同様の傾向が見られた。

CT が腎近位尿細管において 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> から 1 $\alpha$ , 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> に変換する 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase mRNA 発現を誘導することが報告されている。我々の結果より、3種の遺伝子多型の組み合わせと OC 値との間に有意な相関性があったことから、CT、CTR および VDR の遺伝子型が相互に影響し合い、血中 OC レベルを調節していることが推測された。特に CT と CTR の遺伝子型が、VDR 遺伝子型依存的に vitamin D または VDR の活性に影響し、VDR と vitamin D の複合体が OC 遺伝子のプロモーター領域に結合し OC レベルの多様性を引き起こしていることが予測された。

CT の CA repeats 数が血中 OC レベルと密接な関係のあることを示した研究は、本研究が最初であり、今後は CT の CA repeats 領域が OC レベルに及ぼすメカニズムの解析が必要であると考えている。

#### E. 結論

日本人高齢者において、CT の CA repeat 遺伝子多型は血中 OC レベルを決定する一つの因子であり、その機序に CTR および VDR の遺伝子多型が関与していることが示唆された。