

厚生労働科学研究費補助金  
長寿科学総合研究事業

老化及び老年病関連遺伝子同定を目指した  
遺伝疫学研究  
(H15-長寿-005)

平成16年度 総括研究報告書  
平成17 (2005) 年3月

主任研究者

三木哲郎 (愛媛大学医学部老年医学講座)

分担研究者

近藤郁子 (愛媛大学医学部環境遺伝学講座)

I. 総括研究報告

老化及び老年病関連遺伝子同定を目指した遺伝疫学研究

愛媛大学医学部老年医学講座・教授 三木哲郎

-----3

II. 分担研究報告

1. 生活習慣病関連遺伝子同定を目指した遺伝疫学研究

愛媛大学医学部老年医学講座・教授 三木哲郎

-----7

2. 高次脳機能（痴呆・アルツハイマー病・知的障害）関連遺伝子同定を目指した遺伝疫学研究

愛媛大学医学部衛生学講座・教授 近藤郁子

----12

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----13

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----14

厚生労働科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

老化及び老年病関連遺伝子同定を目指した遺伝疫学研究

主任研究者 三木哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座教授

研究要旨

本研究では、老化及び老年病関連遺伝子の同定を目的とした遺伝疫学研究を行った。その結果、GNAS1 遺伝子 rs7172 多型が、飲酒量のマーカーである GGT (gamma-glutamyl transpeptidase) との交互作用をもって血圧上昇/高血圧発症と相関していることが示された。この成績は、別に収集した職域集団サンプルを用いた検討でも確認されている。異なる 2 集団において同様の成績が得られたことより、高血圧発症に対する rs7172 多型の有意性が確認されといえる。また、晩発性アルツハイマー病の遺伝的背景について検討した成績では、POU2F1 遺伝子および FGF1 遺伝子が LOAD のリスクファクターとなることが示唆された。これらの成績は、疾患の予防、あるいは効果的な治療の実現といった観点からテーラーメイド医療の実現へとつながるものであり、もって健康長寿の実現に資する成果であるといえる。

三木哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座・教授  
近藤郁子 愛媛大学医学部衛生学講座・教授

A. 研究目的

本研究では、生活習慣病および老年病に係る遺伝要因を探索し、ひいては老化の予防・遅延を達成することで、長寿科学の発展と健康余命の確保に貢献することを目的とする。

生活習慣病の発症には、複数の遺伝因子と環境因子とが交絡して関与している。このうちライフスタイルなどの環境因子と生活習慣病、あるいは脳卒中や心疾患などとの関連については多くのエビデンスが蓄積されてきた。しかし、その反面で遺伝因子との関連については、未だ多く検討の余地が残されている。今後、遺伝因子に関する多くの知見が集約され、環境因子との交絡を踏まえて疾患発症との関連を明確化することが、健康余命を確保する上で重要であろう。

その一方で、ADL や QOL を低下させ、ひいては要介護状態を招く晩発性アルツハイマー病 (LOAD; Late Onset Alzheimer's Disease) も、高齢者の健康余命を確保する上で克服すべき疾患である。LOAD の遺伝的リスクファクターとしては、アポリポタンパク質 E の多型が知られている。しかし、LOAD も多因子疾患であることから、さら

なる遺伝/環境因子の解明と、それに続く予防医学の実現、治療方法の確立が期待されている。

そこで本研究では、生活習慣病のうち最も有病率の高い高血圧と、LOAD とに着目し、感受性遺伝子解析を行った。

このような疾患感受性遺伝子解析は、欧米を中心として展開されてきた。しかし、疾患の原因遺伝子やある遺伝子の対立遺伝子頻度が、人種間で異なることはしばしば観察されており、この点から、日本人独自のデータの蓄積は必須である。

B. 研究方法

高血圧感受性遺伝子の探索では、疾患の発症に対し、複数の遺伝因子と複数の環境因子とが交絡して関与することを考慮し、一般地域集団を対象とした長期縦断遺伝疫学研究を進める。一方、高次脳機能障害に関する検討では、剖検脳組織による遺伝子発現解析と、晩発性アルツハイマー病と診断された 380 例、および同数の健常高齢者からなるケース/コントロール研究とを中心に展開する。具体的な方法等は以下の通りである。

【高血圧感受性遺伝子解析】

対象は、兵庫県下の一般病院における人間ドック受診者とした。このうち、本研究の趣旨に同意の得られた 821 例を解析対象とした。血圧、アルコ

ール摂取量、および血液生化学検査値等の臨床情報は、人間ドック受信時のものを利用した。遺伝子多型の解析は、昨年度の報告で有意性の認められたGタンパク質 $\alpha$ サブユニット遺伝子 (GNAS1; 20q13.2 -q13.3) のT393C多型 (rs7172) について行った。

#### 【LOAD 関連遺伝子解析】

マイクロアレイによる遺伝子発現解析と遺伝子多型 (SNP) による相関解析とを組み合わせた検討を行った。同時に候補遺伝子アプローチとして、老人斑周囲の活性型アストロサイトで発現が亢進している繊維芽細胞成長因子 (Fibroblast Growth Factor : FGF1) 遺伝子に着目し、当該遺伝子多型と LOAD との関連についても検討した。

遺伝子発現解析は、LOAD 初期 (Braak stage III) と病理診断された剖検脳の海馬及び頭頂皮質組織より RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて行った。遺伝子多型は TaqMan プローブ法で解析し、LOAD 患者群 376 例と年齢を一致させた健常群 376 例を対象としたケース/コントロールで頻度を比較した。FGF1 遺伝子多型は、別に収集した LOAD 100 例と健常対照群 106 例のゲノム DNA を用いて解析した。解析は、プロモーター領域にある -1385A/G 多型について、PCR-RFLP 法により行った。同時に APOE 遺伝子多型も解析した。

#### 【倫理面への配慮】

本研究計画は、愛媛大学医学部倫理審査委員会にて承認済みである (「長寿者となるための環境要因と遺伝要因の研究」「生活習慣病と動脈硬化性疾患の発症要因の探索」「老人性痴呆の発症要因の探索」平成 14 年 9 月 12 日付)。

対象者 (あるいはその親族) には、事前に十分な主旨説明の上、書面にて同意を得た。個人情報、所定の手続きに則って匿名化し管理している。これらはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守したものであり、本研究における倫理面への配慮は十分であると判断した。

### C. 研究結果

#### 【高血圧感受性遺伝子解析】

正常血圧/高血圧群で GNAS1 遺伝子 T393C 多型の頻度に有意差は認められなかった。しかし、我々は以前に、別の集団において T393C 多型が飲酒量との交互作用をもって血圧上昇に関与していることを報告した。そこで高血圧に対する GGT ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase) と T393C 多型との交互作用について検討したところ、統計学的に有意な相関を得た ( $p=0.033$ )。この相関は、

他の交絡因子を調整した上でも維持された ( $p=0.0025$ )。同様に収縮期血圧または拡張期血圧を従属変数とした場合でも、GGT と T393C 多型の交互作用は、共変量を調整した上で有意な相関を示した ( $p=0.0027$ ,  $p=0.011$ )。

#### 【LOAD 関連遺伝子解析】

遺伝子発現解析の結果、LOAD 初期脳の海馬で有意に発現が亢進又は低下していた遺伝子を複数個得た。このうち、発現量の変化が大きい順に 33 遺伝子を選択し、各遺伝子あたり 1 つの SNP を選出して相関解析を行った。 $\chi^2$  乗検定の結果、解析した 33 NP のうち遺伝子多型頻度で 9 SNP が、対立遺伝子頻度で 5 SNP が統計学的有意差を示した ( $p<0.05$ )。このうち POU2F1 (POU domain, class 2, transcription factor 1) 遺伝子で最も強い相関が見られた ( $p<0.0007$ )。一方、FGF1 遺伝子 -1385A/G 多型については、LOAD 群では G アレル (GG 遺伝子型) の頻度が有意に高値であった ( $p<0.02$ )。LOAD に対する GG 遺伝子多型のオッズ比は 2.02 であり、APOE4 のオッズ比 5.19 には及ばないものの統計学的有意差を示した。

### D. 考察

高血圧感受性遺伝子解析では、GNAS1 遺伝子 T393C 多型と血圧との関連について検討した。この遺伝子多型は、アルコール摂取量との交互作用を示すことが事前の検討から推察されたため、特に血中の GGT との交互作用を踏まえて、血圧との関連を検討した。

その結果、収縮期血圧、拡張期血圧ともに、GNAS1 遺伝子多型が GGT との交互作用をもって有意に相関することが示された。また、この相関は、従属変数を高血圧/正常血圧と定義した場合でも同等であった。我々は、以前、別の集団で同様の成績を得ていることから、GNAS1 遺伝子とアルコール摂取との関連が、血圧または高血圧発症に対し有意なリスクファクターとなることが確認されたといえる。多因子疾患の感受性遺伝子解析は、個々の遺伝子多型の寄与率が比較的弱いことから、別のサンプルで再現性が確認されることが、相関関係を立証する有用な根拠となる。その点、本成績が由来の異なる大規模 2 集団で検証されたことは、非常に興味深い。また、GNAS1 遺伝子多型と高血圧との関連は、アルコール摂取の影響を加味することでより明確化された。このことは、生活習慣病のような多因子疾患の遺伝的背景を考える上で、遺伝-環境交互作用を的確に加味することの必要性を示すものである。この点で、本成績は、これからの遺伝疫学研究において、重要な方法論を提示するものといえよう。

一方、LOAD 関連遺伝子解析は、病理学的な裏付

けを有するサンプルを用いて行った。その点で信頼性の高い成果が得られたといえる。反面、サンプル数は比較的小規模であったため、今後、さらなるサンプルの収集を行い、より統計学的パワーを増した検討を行う予定である。

#### E. 結論

GNAS1 遺伝子 T393C 多型はアルコール摂取と関連して血圧上昇、あるいは高血圧発症に関与していることが再現性をもって確認された。また、POU2F1 遺伝子が LOAD のリスクファクターとなることも見いだした。これらの成果は、個別医療・予防の実現に大きく寄与するものであり、ひいては健康長寿の実現にも貢献することが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Yamamoto M, Abe M, Ji JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of a GNAS1 Gene Variant with Hypertension And Diabetes Mellitus. *Hypertension Res.* 2004;27:919-924
- Tachibana-Iimori R, Tabara Y, Kusuhara H, Kohara K, Kawamoto R, Nakura J, Tokunaga K, Kondo I, Sugiyama Y, Miki T. Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLC01B1) on lipid-lowering response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004;19:375-80.
- Zhang JH, Kohara K, Yamamoto Y, Nakura J, Tabara Y, Fujisawa M, Katagi R, Miki T. Genetic predisposition to neurological symptoms in lacunar infarction. *Cerebrovasc Dis.* 2004;17:273-9.
- Akatsu H, Yamagata H, Chen Y, Miki T, Kamino K, Takeda M, Campbell W, Kondo I, Kosaka K, Yamamoto T and Okada H. TAFI polymorphisms at amino acids 147 and 325 are not risk factors for cerebral infarction. *Br J Haematology* 2004;127:440-447 15521922
- Fukuda T, Yamashita Y, Nagamitsu S,

Miyamoto K, Jin J, Ohmori I, Ohtsuka Y, Kuwajima K, Endo S, Iwai T, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Matsuishi T, Kondo I. Methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) variations in Japanese patients with Rett syndrome: pathological mutations and polymorphisms. *Brain Dev.* 2005;27:211-7.

- Yamagata H, Chen Y, Akatsu H, Kamino K, Ito J, Yokoyama S, Yamamoto T, Kosaka K, Miki T, Kondo I. Promoter polymorphism in fibroblast growth factor 1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun,* 2004;32:320-323
  - Kondo I, Shimizu A, Asakawa S, Miyamoto K, Yamagata H, Tabara Y, Shimizu N. COH1 analysis and linkage study in two Japanese families with Cohen syndrome. *Clin Genet* 2005 Mar;67(3):270-2.
  - Akatsu H, Kamino K, Yamagata H, Isojima D, Kondo I, Yamamoto T, Kida T, Takeda M, Miki T, Kosaka K. Increased incidence of dementia with Lewy bodies in patients carrying the e4-allele of apolipoprotein E Psychogeriatrics 2004;4:24-32
  - Taguch K, Yamagata H, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer'd disease. *Ann Neurol* 2005;57:585-588.
- ##### 2. 学会発表
- The American Society of Hypertension 19th Annual Scientific Meeting New York, USA, May18-22, 2004
- Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and pulse pressure in a large Japanese general population. Kohara K, Fujisawa M, Ando F, Tabara Y, Niino N, Yamada Y, Miki T, Shimokata H
  - Genetic risk factor for the susceptibility for chronic Chlamydia Pneumoniae infection: J-SHIPP study. Kohara K, Tabara Y, Abe M, Tachibara R, Nakura J, Miki T

第 27 回日本高血圧学会総会 平成 16 年 10 月 7 日～9 日 宇都宮

- Catalase 遺伝子 (CAT) のプロモータ領域 C-844T 遺伝子多型と日本人高血圧との関連

性. 安部道子・名倉潤・金京姫・呉志紅・山本美由紀・田原康玄・茂木正樹・小原克彦・三木哲郎

Human Genome Meeting 2004. Berlin, Germany 4th - 7th April 2004

- Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) polymorphism in patients with Rett syndrome. Kondo I, Yamashita Y, Miyamoto K, Yamagata H, Tabara Y, Matsuishi T

第 46 回日本老年医学会学術集会・総会 平成 16 年 6 月 16～18 日 千葉

- アルツハイマー病の病因遺伝子探索のための候補遺伝子アプローチ 田口敬子、山縣英久、紙野晃人、田原康玄、赤津裕康、名倉潤、小原克彦、近藤郁子、三木哲郎

第 11 回日本遺伝子診療学会大会 平成 16 年 9 月 17 日～18 日 東京

- Cohen 症候群原因遺伝子 COH1 の日本人患者における変異解析 清水厚志・宮本憲一・浅川修一・山崎悟・石川サビヌ和子・山縣英久・田原康玄・近藤郁子・清水信義

日本人類遺伝学会第 49 回大会 平成 16 年 10 月 12 日～15 日 東京

- Weaver 症候群は Sotos 症候群とは異なる疾患である 近藤郁子
- アルツハイマー病の原因遺伝子の単離同定を目的とした研究 山縣英久

The 54th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics Toronto, Canada, October 26-30, 2004

- PANK2 mutations in a Japanese girl with motor and emotional problems. Kondo I, Nakadoi Y, Jyofuku N, Iwai T, Miyamoto K, Yamagata H, Tabara Y, Endo S

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 生活習慣病関連遺伝子同定を目指した遺伝疫学研究

分担研究者 三木 哲郎 愛媛大学医学部老年医学講座教授

## 研究要旨

高血圧感受性遺伝子を同定する目的で、G タンパク質  $\alpha$  サブユニット遺伝子 (GNAS1) に着目して検討を行った。人間ドック受診者 821 例を対象とした検討から、GNAS1 遺伝子 rs7172 多型が、飲酒量のマーカーである GGT (gamma-glutamyl transpeptidase) との交互作用をもって血圧上昇/高血圧発症と関連していることが示された。以前、我々は、別に収集した職域集団サンプルでの検討から、rs7172 多型が飲酒量との交互作用をもって高血圧と関連することを報告した。異なる 2 集団において同様の成績が確認されたことより、高血圧発症に対する rs7172 多型の有意性が確認されといえる。

## A. 研究目的

生活習慣病の発症には、複数の遺伝因子と環境因子とが交絡して関与している。よって生活習慣病を予防するためには、肥満や食生活、喫煙、飲酒などのライフスタイルを、個々人の遺伝的背景に沿って是正することが最も効果的である。ライフスタイルと生活習慣病、あるいは脳卒中や心疾患などの心血管系イベントとの関連については多くのエビデンスが蓄積されてきた。しかし、その反面で遺伝因子との関連については、未だ多く検討の余地が残されている。

生活習慣病の感受性遺伝子解析を、高血圧を例にして概観すると、レニン-アンジオテンシン系や血管内皮、水分貯留、交感神経活性等に関与する候補遺伝子を中心とした解析が多くなされてきた。しかし、いずれにおいても、遺伝因子の影響について一貫した成績は得られていない。その原因として、高血圧などのコモンディージーズが以下の特徴を有することが挙げられる。

複合遺伝性疾患である

複数の遺伝因子と複数の環境因子とが交絡して疾患の発症に関与する

高い遺伝的異質性

同一疾患でも発症メカニズムや関与する遺伝因子は複数。

低い浸透率

疾患関連遺伝子を保因していても発症しないケースが存在。

高い表現型模写

疾患関連遺伝子を保因していなくても発症するケースが存在。

個々の因子の関与が小さい

発症へのベクトルが揃うと発症リスクが大きくなる

以上より、生活習慣病等の多因子疾患について、その遺伝的背景を探索するには、環境因子と遺伝因子との交互作用を十分に加味したアプローチが必須であるといえる。しかし、従来の研究成果では、単純な相関解析がほとんどであり、遺伝-環境交互作用はあまり検討されていなかった。

以前、我々は、高血圧感受性遺伝子を探索する過程で、G タンパク質  $\alpha$  サブユニット遺伝子 (GNAS1) T393C 多型と喫煙や飲酒との交互作用が高血圧の発症に関与していることを示した。この多型はアミノ酸変異を伴わないが、血圧や  $\beta$  遮断薬に感受性を持つことが既に報告されている。これより、GNAS1 遺伝子 T393C 多型は、 $\beta$  アドレナリン受容体 ( $\beta$  AR) 刺激後のシグナル伝達経路において、血圧上昇と関連していることが推察された。

そこで本研究では、当該遺伝子多型と高血圧との関連について再現性の検証を行った。本邦で最も有病率の高い高血圧をターゲットとし、その遺伝的背景の一端を明らかにすることで、長寿科学の発展および健康寿命の確保に資することを目的とした。

## B. 研究方法

対象は、兵庫県下の一般病院における人間ドック受診者とした。このうち、本研究の趣旨に同意の得られた 821 例を解析対象とした。血圧、アルコール摂取量、および血液生化学検査値等の臨床情報は、人間ドック受信時のものを利用した。

対象者のゲノム DNA は末梢血から定法に則って抽出した。G タンパク質  $\alpha$  サブユニット遺伝子 (GNAS1; 20q13.2-q13.3) の T393C 多型 (rs7172) は、RFLP 法で解析した。解析に用いたプライマー/プローブの塩基配列を以下に示す。PCR で増幅される産物は 345 bp であり、制限酵素 FokI により C アレルなら 263 bp と 82 bp に切断される。切断片長は、5 % のアガロースゲルを用いた電気泳動法により分析した。

### GNAS1; rs7172

5' -CTC CTA ACT GAC ATG GTG CAA-3'

5' -TAA GGC CAC ACA AGT CGG GGT-3'

高血圧/正常血圧群間での血圧および血液生化学検査値の比較は分散分析にて行った。また、遺伝子多型の頻度は  $\chi^2$  乗検定で分析した。高血圧

の有無 (名義変数) と遺伝子多型との相関は、ロジスティック回帰分析にて、血圧値 (連続変数) との関連は一般線形分析にて行った。このとき、高血圧は収縮期血圧 140 mmHg 以上、かつ/または拡張期血圧 90 mmHg 以上、あるいは降圧薬服用者と定義した。

### (倫理面への配慮)

愛媛大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会において、「長寿者となるための環境要因と遺伝要因の研究」「生活習慣病と動脈硬化性疾患の発症要因の探索」「老人性痴呆の発症要因の探索」という 3 研究課題名で承認を得ている (平成 14 年 9 月 12 日付)。

対象者には、事前に十分な主旨説明の上、書面にて同意書を得た。個人情報、所定の手続きに則って匿名化し管理している。これらはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守したものであり、本研究における倫理面への配慮は十分であると判断した。

表 1 解析対象者の臨床的背景

	正常血圧者 (554 人)	高血圧者 (267 人)	p 値
性別 (男性%)	78.3	89.0	< 0.001
年齢 (歳)	52.8 ± 8.6	57.4 ± 8.4	< 0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.6 ± 2.9	23.9 ± 2.9	< 0.001
収縮期血圧 (mmHg)	115.1 ± 11.6	143.9 ± 16.6	< 0.001
拡張期血圧 (mmHg)	72.2 ± 8.9	88.9 ± 9.9	< 0.001
総コレステロール (mg/dl)	197.7 ± 31.2	202.9 ± 37.1	NS
HDL コレステロール (mg/dl)	54.2 ± 14.6	52.1 ± 14.1	NS
中性脂肪 (mg/dl)	116.3 ± 80.9	151.6 ± 129.2	< 0.001
血糖 (mg/dl)	101.2 ± 17.0	105.7 ± 18.5	< 0.001
AST (U/l)	23.3 ± 26.0	25.1 ± 14.3	NS
ALT (U/l)	20.9 ± 32.8	21.4 ± 14.9	NS
GGT (U/l)	31.3 ± 34.8	43.3 ± 45.4	NS

BMI ; body mass index、AST ; aspartate aminotransferase、ALT ; alanine aminotransferase、GGT ; gamma-glutamyl transpeptidase.



表 2 GNAS1 遺伝子 rs7172 多型ごとの高血圧者頻度

	正常血圧	高血圧	p 値	オッズ比 (95%信頼区間)
TT (%)	187 (33.8)	87 (32.6)		
TC (%)	254 (45.8)	126 (47.2)		
CC (%)	113 (20.4)	54 (20.2)	0.954	1.01 (0.70-1.45)
T (%)	628 (56.7)	300 (56.2)		
C (%)	480 (43.3)	234 (43.8)	0.849	0.98 (0.79-1.21)

表 3 GNAS1 遺伝子 rs7172 多型ごとの GGT と血圧との関連

	多型 (人数)	共変量	p 値 (回帰)	p 値 (交互作用)
SBP (mmHg)	TT+TC (654)	0.05	0.037	
	CC (167)	0.10	0.006	0.198
DBP (mmHg)	TT+TC (654)	0.03	0.003	
	CC (167)	0.09	0.003	0.049

### C. 研究結果

対象者の臨床背景および T393C 多型の頻度を、正常血圧/高血圧群ごとに示した (表 1・2)。高血圧者および正常血圧者ともに、遺伝子多型の頻度は Hardy-Weinberg 平衡に則っていた。しかし、正常血圧者と高血圧者とで遺伝子多型の頻度に差はなかった。

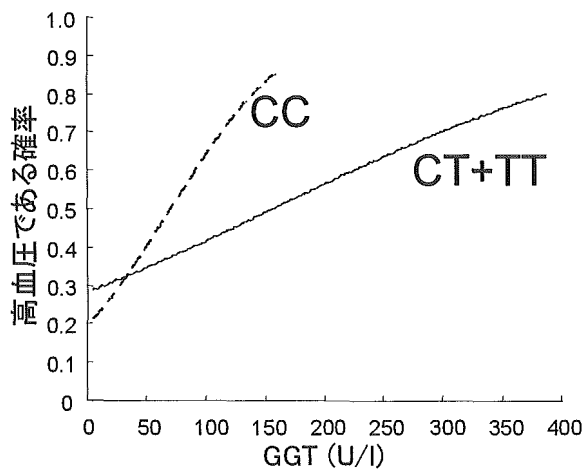


図 1 高血圧に対する GGT と GNAS1 T393C 多型との交互作用

そこで次に、高血圧に対する GGT と T393C 多型との交互作用について検討した (図 1)。その結果、両者の交互作用は統計学的な有意差を示し

( $p = 0.033$ )、これは他の交絡因子を調整した上でも維持された ( $p = 0.0025$ )。さらに、GGT を 4 分位として検討した場合でも、GGT と T393C 多型の交互作用は有意であった ( $p = 0.0013$ )。

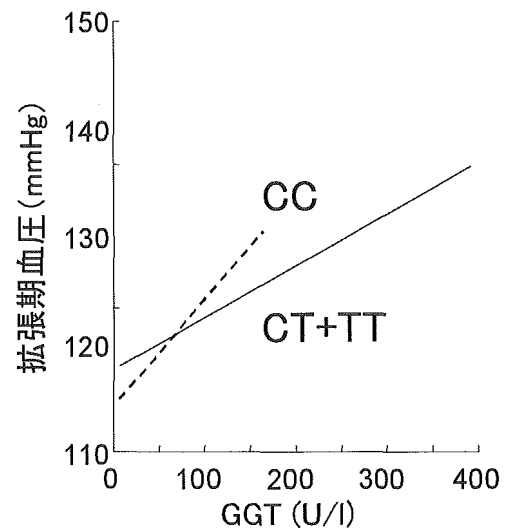


図 2 収縮期血圧に対する GGT と GNAS1 T393C 多型との交互作用

図 2、図 3 には、同様に収縮期血圧または拡張期血圧を従属変数とした場合の、解析結果を示した。一般線形分析を用いた解析から、緩やかながら拡張期血圧とには有意な相関を認め ( $p = 0.049$ )、この相関は共変量を調整しても有意であった ( $p = 0.0027$ )。

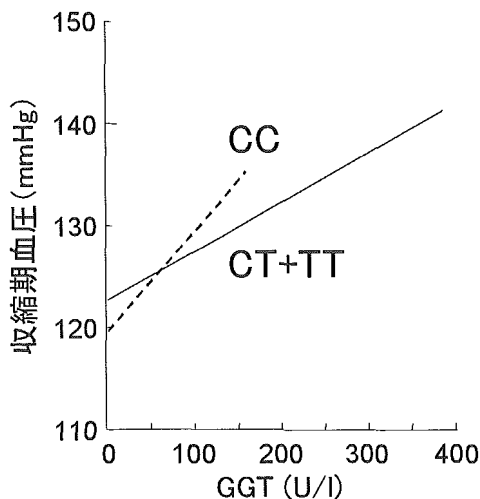


図3 拡張期血圧に対するGGTとGNAS1 T393C多型との交互作用

収縮期血圧との関連は、単相関では有意差を認めなかったものの ( $p=0.198$ )、共変量を調整することで有意差を示した ( $p=0.011$ )。さらに、GGTの4分位による検討でも収縮期血圧 ( $p=0.0011$ )、拡張期血圧 ( $p=0.0041$ ) とともに有意な相関を示した。

#### D. 考察

本研究では高血圧感受性遺伝子を同定する目的で、既報から相関が示唆されているGNAS1遺伝子T393C多型と血圧との関連をみた。この遺伝子多型は、アルコール摂取量の影響を受けることが事前の検討から推察されたため、特に血中のGGTとの交互作用を踏まえて、血圧との関連を検討した。

その結果、収縮期血圧、拡張期血圧ともに、GNAS1遺伝子多型がGGTとの交互作用をもって有意に相関することが示された。また、この相関は、従属変数を高血圧/正常血圧と定義した場合でも同等であった。我々は、以前、別の集団で同様の成績を得ていることから、GNAS1遺伝子とアルコール摂取との関連が、血圧または高血圧発症に対し有意なリスクファクターになるといえる。

従来の高血圧感受性遺伝子解析研究では、多くの場合、ポジティブ/ネガティブの成績が混在しており、一定の成果は得られていない。その原因として、個々の遺伝子多型の寄与率が比較的弱いたことが挙げられる。このような場合、別のサンプルで再現性が確認されることが、相関関係を立証する有用な根拠となる。その点、本成績が由来の異なる大規模2集団で検証されたことは、GNAS1遺伝子多型と血圧との相関関係を立証する成果

といえる。

一方、本研究において、GNAS1遺伝子多型と高血圧との関連は、アルコール摂取の影響を加味することでより明確化された。このことは、生活習慣病のような多因子疾患の遺伝的背景を考える上で、遺伝-環境交互作用を的確に加味することの必要性を示すものである。この点で、本成績は、これからの遺伝疫学研究において、重要な方法論を提示するものといえよう。

加えて本成果は、テーラーメイド医療の実現にも貢献しうる。血圧とアルコール摂取との関連は、従来からの多くの成績で立証されている。その上でGNAS1遺伝子多型の影響が明確化されたことは、例えば生活指導などの予防医学において、画一的でない効果的な指導を実現しうる。また、アルコール制限などのライフスタイル改善において、最大限の効果を得る上でも、有用な知見をもたらすことが期待される。

#### E. 結論

GNAS1遺伝子T393C多型はアルコール摂取と関連して血圧上昇、あるいは高血圧発症に関与していることが再現性をもって確認された。本成果はテーラーメイド医療/予防の実現に大きく貢献するものと期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Yamamoto M, Abe M, Ji JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of a GNAS1 Gene Variant with Hypertension And Diabetes Mellitus. *Hypertension Res.* 2004;27:919-924
- Tachibana-Iimori R, Tabara Y, Kusuhara H, Kohara K, Kawamoto R, Nakura J, Tokunaga K, Kondo I, Sugiyama Y, Miki T. Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) on lipid-lowering response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004;19:375-80.
- Zhang JH, Kohara K, Yamamoto Y, Nakura J, Tabara Y, Fujisawa M, Katagi R, Miki T.

Genetic predisposition to neurological symptoms in lacunar infarction. Cerebrovasc Dis. 2004;17:273-9.

## 2. 学会発表

The American Society of Hypertension 19th Annual Scientific Meeting New York, USA, May18-22, 2004

- Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and pulse pressure in a large Japanese general population. Kohara K, Fujisawa M, Ando F, Tabara Y, Niino N, Yamada Y, Miki T, Shimokata H
- Genetic risk factor for the susceptibility for chronic Chlamydia Pneumoniae infection: J-SHIPP study. Kohara K, Tabara Y, Abe M, Tachibara R, Nakura J, Miki T

第27回日本高血圧学会総会 平成16年10月7日～9日 宇都宮

- Catalase 遺伝子 (CAT) のプロモータ領域 C-844T 遺伝子多型と日本人高血圧との関連性. 安部道子・名倉潤・金京姫・呉志紅・山本美由紀・田原康玄・茂木正樹・小原克彦・三木哲郎

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

高次脳機能（痴呆・アルツハイマー病・知的障害）関連遺伝子同定を目指した遺伝疫学研究

分担研究者 近藤 郁子 愛媛大学医学部衛生学講座教授

研究要旨

晩発性アルツハイマー病の遺伝的背景を、遺伝子発現解析、および遺伝子多型(SNP)による相関解析とから検討した。その結果、POU2F1 遺伝子が LOAD のリスクファクターとなることが示唆された。また、FGF1 遺伝子 -1385A/G 多型と LOAD とに有意な相関を認めた ( $p < 0.02$ )。

A. 研究目的

晩発性アルツハイマー病 (LOAD; Late Onset Alzheimer's Disease) は、記憶障害で始まる持続的な知能低下や記憶障害を来す。LOAD は、ADL や QOL を低下させ、ひいては要介護状態を招くため、高齢社会を目前に、その予防/治療方法の確立が急務の課題となっている。また、65 歳以上の高齢者では、有病率は 4% 程度と見積もられており、個人の健康余命を確保する上でも重要な位置づけにある。

LOAD の遺伝的背景については、従来、第 19 染色体上のアポリポ蛋白 E (APOE) 遺伝子の関与が指摘されている。APOE 遺伝子上の 3 つの多型 (E2, E3, E4) のうち、E4 型が LOAD のリスクファクターとして知られている。しかし、必ずしも E4 型と LOAD とが直接的な関係にあるとは言い難い。APOE 遺伝子以外には、プレセニン-1、やセロトニントランスポーター遺伝子等の関与が検討されているが、いずれも疾患発症と明確な相関は得られていない。

その一方で、近年遺伝子工学の進歩に伴い、大量のサンプルを効率良く処理することが可能となっている。同時に様々な疾患感受性遺伝子の解析法も開発されてきたが、これらの手法を包括的に利用した報告はなされていない。そこで本研究では LOAD 感受性遺伝子の検索・同定を目的として、マイクロアレイによる遺伝子発現解析と遺伝子多型(SNP)による相関解析とを組み合わせた検討を行った。同時に候補遺伝子アプローチとして、老人斑周囲の活性型アストロサイトで発現が亢進している繊維芽細胞成長因子 (Fibroblast Growth Factor : FGF1) 遺伝子に着目し、当該遺伝子多型と LOAD との関連についても検討した。

B. 研究方法

遺伝子発現解析は、LOAD 初期 (Braak stage III) と病理診断された剖検脳の実馬及び頭頂皮質組織より RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて行った。遺伝子多型の解析は TaqMan プローブ法で行い、LOAD 患者群 376 例と年齢を一致させた健常群 376 例を対象としたケース/コントロール間で頻度を比較した。FGF1 遺伝子多型は、別に収集した LOAD 100 例と健常対照群 106 例のゲノム DNA を用いて解析した。解析は、プロモーター領域にある -1385A/G 多型について、PCR-RFLP 法により行った (図 1)。同時に APOE 遺伝子多型も解析した。

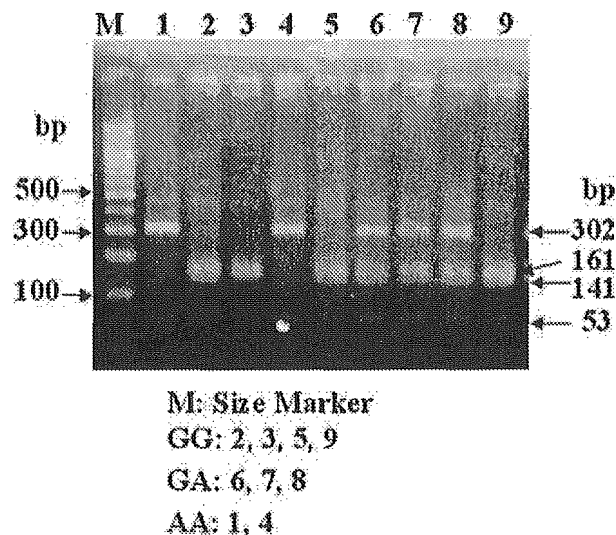


図 1 FGF1 遺伝子-1385A/G 多型の解析結果

(倫理面への配慮)

研究課題「老人性痴呆の発症要因の探索」として、愛媛大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会より承認を得ている。同意は、患者死亡後に遺族より書面にて得た。

### C. 研究結果

遺伝子発現解析の結果、LOAD 初期脳の海馬で有意に発現が亢進又は低下していた遺伝子を複数個得た。このうち、発現量の変化が大きい順に 33 遺伝子を選択し、各遺伝子あたり 1 つの SNP を選出して相関解析を行った。

$\chi^2$  二乗検定の結果、解析した 33 NP のうち遺伝子多型頻度で 9 SNP が、対立遺伝子頻度で 5 SNP が統計学的有意差を示した ( $p < 0.05$ )。このうち

POU2F1 (POU domain, class 2, transcription factor 1) 遺伝子で最も強い相関が見られた ( $p < 0.0007$ )。

一方、FGF1 遺伝子 -1385A/G 多型については、LOAD 群では G アレル (GG 遺伝子型) の頻度が有意に高値であった ( $p < 0.02$ )。LOAD に対する GG 遺伝子多型のオッズ比は 2.02 であり、APOE4 のオッズ比 5.19 には及ばないものの統計学的有意差を示した。

表 1 FGF1 遺伝子 -1385A/G 多型の頻度

	Genotype (frequency)			Allele (frequency)		
	AA	GA	GG	AA + GA	G	A
LOAD 群	6 (0.06)	38 (0.38)	56 (0.56)	44 (0.44)	150 (0.75)	50 (0.25)
健常対照群	14 (0.13)	51 (0.48)	41 (0.39)	65 (0.61)	133 (0.63)	79 (0.37)
			*	**		***

\*  $p < 0.03$  \*\*  $p < 0.02$  \*\*\*  $p < 0.01$ .

表 2 LOAD に対する APOE 遺伝子 E4 型と FGF1 遺伝子 GG 型の相対危険度

		LOAD	健常対照群	オッズ比 (95%信頼区間)
APOE	FGF1			
	non-GG	44	65	Reference
	GG	56	41	2.02 (1.16- 3.52)
E4-		52	90	Reference
E4+		48	16	5.19 (2.68- 10.1)
E4-	non-GG	17	58	Reference
E4-	GG	35	32	3.73 (1.81- 7.69)
E4+	non-GG	18	11	5.58 (2.21- 14.1)
E4+	GG	30	5	20.5 (6.88- 60.9)

### D. 考察

遺伝子発現解析により見出された疾患候補遺伝子は従来強制発現系を用いた機能解析が行われてきた。しかしながら強制発現系を用いた方法では候補遺伝子が実際にヒトの疾患に関連しているかどうかは不明であった。そこで、これらの候補遺伝子が実際にヒトの疾患に関連しているかどうかを遺伝子多型による関連解析にて検

討した。その結果高頻度で有意差が検出され、両者を組み合わせるのは疾患感受性遺伝子の検索・同定に有用な方法であると考えられた。

また、候補遺伝子アプローチでは、FGF1 遺伝子プロモーター領域の -1385A/G 多型と LOAD とに有意な相関を認めた。本研究で用いた LOAD サンプルは、病理学的所見からの裏付けを有するものであり、信頼性の高い成果といえる。今後、さらな

るサンプルの収集を行い、より統計学的パワーを増した検討を行う予定である。

#### E. 結論

LOAD 関連遺伝子を、遺伝子発現解析、および遺伝子多型 (SNP) による相関解析とを組み合わせを行った。その結果、POU2F1 遺伝子が LOAD のリスクファクターとなることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Akatsu H, Yamagata H, Chen Y, Miki T, Kamino K, Takeda M, Campbell W, Kondo I, Kosaka K, Yamamoto T and Okada H. TAFI polymorphisms at amino acids 147 and 325 are not risk factors for cerebral infarction. *Br J Haematology* 2004;127:440-447 15521922
- Fukuda T, Yamashita Y, Nagamitsu S, Miyamoto K, Jin J, Ohmori I, Ohtsuka Y, Kuwajima K, Endo S, Iwai T, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Matsuishi T, Kondo I. Methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) variations in Japanese patients with Rett syndrome: pathological mutations and polymorphisms. *Brain Dev.* 2005;27:211-7.
- Yamagata H, Chen Y, Akatsu H, Kamino K, Ito J, Yokoyama S, Yamamoto T, Kosaka K, Miki T, Kondo I. Promoter polymorphism in fibroblast growth factor 1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004;32:320-323
- Kondo I, Shimizu A, Asakawa S, Miyamoto K, Yamagata H, Tabara Y, Shimizu N. COH1 analysis and linkage study in two Japanese families with Cohen syndrome. *Clin Genet* 2005 Mar;67(3):270-2.
- Akatsu H, Kamino K, Yamagata H, Isojima D, Kondo I, Yamamoto T, Kida T, Takeda M, Miki T, Kosaka K. Increased incidence of dementia with Lewy bodies in patients carrying the e4-allele of apolipoprotein

*E Psychogeriatrics* 2004;4:24-32

- Taguch K, Yamagata H, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2005;57:585-588.

##### 2. 学会発表

Human Genome Meeting 2004. Berlin, Germany 4th - 7th April 2004

- Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) polymorphism in patients with Rett syndrome. Kondo I, Yamashita Y, Miyamoto K, Yamagata H, Tabara Y, Matsuishi T

第 46 回日本老年医学会学術集会・総会 平成 16 年 6 月 16~18 日 千葉

- アルツハイマー病の病因遺伝子探索のための候補遺伝子アプローチ 田口敬子、山縣英久、紙野晃人、田原康玄、赤津裕康、名倉 潤、小原克彦、近藤郁子、三木哲郎

第 11 回日本遺伝子診療学会大会 平成 16 年 9 月 17 日~18 日 東京

- Cohen 症候群原因遺伝子 COH1 の日本人患者における変異解析 清水厚志・宮本憲一・浅川修一・山崎悟・石川サビヌ和子・山縣英久・田原康玄・近藤郁子・清水信義

日本人類遺伝学会第 49 回大会 平成 16 年 10 月 12 日~15 日 東京

- Weaver 症候群は Sotos 症候群とは異なる疾患である 近藤郁子

- アルツハイマー病の原因遺伝子の単離同定を目的とした研究 山縣英久

The 54th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics Toronto, Canada, October 26-30, 2004

- PANK2 mutations in a Japanese girl with motor and emotional problems. Kondo I, Nakadoi Y, Jyofuku N, Iwai T, Miyamoto K, Yamagata H, Tabara Y, Endo S

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	出版年	巻号	ページ
Yamamoto M, Abe M, Ji JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J	Association of a GNAS1 Gene Variant with Hypertension And Diabetes Mellitus.	Hypertension Res.	2004	27	919-924
Tachibana-Iimori R, Tabara Y, Kusuvara H, Kohara K, Kawamoto R, Nakura J, Tokunaga K, Kondo I, Sugiyama Y, Miki T.	Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) on lipid-lowering response to HMG-CoA reductase inhibitors.	Drug Metab Pharmacokinet.	2004	19	375-80
Zhang JH, Kohara K, Yamamoto Y, Nakura J, Tabara Y, Fujisawa M, Katagi R, Miki T.	Genetic predisposition to neurological symptoms in lacunar infarction.	Cerebrovasc Dis.	2004	17	273-9
Akatsu H, Yamagata H, Chen Y, Miki T, Kamino K, Takeda M, Campbell W, Kondo I, Kosaka K, Yamamoto T and Okada H	TAFI polymorphisms at amino acids 147 and 325 are not risk factors for cerebral infarction.	Br J Haematology.	2004	127	440-447
Fukuda T, Yamashita Y, Nagamitsu S, Miyamoto K, Jin J, Ohmori I, Ohtsuka Y, Kuwajima K, Endo S, Iwai T, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Matsuishi T, Kondo I.	Methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) variations in Japanese patients with Rett syndrome: pathological mutations and polymorphisms.	Brain Dev.	2005	27	211-7
. Yamagata H, Chen Y, Akatsu H, Kamino K, Ito J, Yokoyama S, Yamamoto T, Kosaka K, Miki T, Kondo I	Promoter polymorphism in fibroblast growth factor 1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease	Biochem Biophys Res Commun,	2004	32	320-3
Kondo I, Shimizu A, Asakawa S, Miyamoto K, Yamagata H, Tabara Y, Shimizu N.	COHI analysis and linkage study in two Japanese families with Cohen syndrome.	Clin Genet	2005	67	270-2
Taguch K, Yamagata H, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T	Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer'd disease	Ann Neurol	2005	57	585-588
Akatsu H, Kamino K, Yamagata H, Isojima D, Kondo I, Yamamoto T, Kida T, Takeda M, Miki T, Kosaka K.	Increased incidence of dementia with Lewy bodies in patients carrying the e4-allele of apolipoprotein E	Psychogeriatrics	2004	4	24-32

## 研究成果の刊行物・別刷



## Original Article

## Association of a GNAS1 Gene Variant with Hypertension and Diabetes Mellitus

Miyuki YAMAMOTO, Michiko ABE, Jing Ji JIN, Zhihong WU, Yasuharu TABARA, Masaki MOGI, Katsuhiko KOHARA, Tetsuro MIKI, and Jun NAKURA

Previous studies have shown that the T allele of the GNAS1 T393C polymorphism is associated with poor responsiveness to  $\beta$ -blockade and that the T393C polymorphism interacts with cigarette smoking and alcohol consumption in the pathogenesis of hypertension. Thus, the T393C polymorphism is likely to interact with  $\beta$ -adrenoceptor ( $\beta$ -AR) stimulation in the pathogenesis of hypertension. Although this interaction might be caused by a direct effect of Gs proteins on the cardiovascular system, it could also result from an indirect effect of Gs proteins mediated by glucose metabolism. Moreover, association studies are often irreproducible. We therefore examined the possible interaction between the T393C polymorphism and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT), which is an established biomarker of alcohol consumption, in the association with glucose metabolism as well as with hypertension in a Japanese population. Genotyping for GNAS1 was performed by using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method in all 821 samples. The present study showed a significant interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with hypertension ( $p=0.033$ ). This interaction was even more significant after adjustment for all confounding factors ( $p=0.0025$ ). In contrast, analysis of the possible interaction of the T393C polymorphism with GGT in the association with diabetes mellitus or fasting plasma glucose failed to show a significant result. These results did not support the hypothesis that the interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with hypertension could be caused by an indirect effect of Gs proteins mediated by glucose metabolism. (*Hypertens Res* 2004; 27: 919–924)

**Key Words:** G proteins, glucose, hypertension, polymorphism, sympathetic nervous system

## Introduction

Hypertension is considered to be a complex trait to which genetic, environmental, and demographic factors contribute interactively (1). The  $\beta$ -adrenoceptor ( $\beta$ -AR)-stimulatory guanine nucleotide-binding protein (Gs) system has been shown to play important roles in the cardiovascular system. Recently, based on several lines of biological evidence suggesting an association of the  $\alpha$ -subunit of Gs proteins with

hypertension (2–4), an initial study examined the association between a common silent polymorphism (T393C) in GNAS1 and hypertension (5). This study showed that the T393C polymorphism was significantly associated with hypertension and with poor responsiveness to  $\beta$ -blockade. Subsequently, we also studied the association in a large Japanese population, resulting in replication of the association between the T393C polymorphism and hypertension (6). Additionally, in the same population, we showed that the T393C polymorphism interacted with cigarette smoking and with al-

From the Department of Geriatric Medicine, School of Medicine, Ehime University, Ehime, Japan.

This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas C, "Medical Genome Science," from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and a Grant-in-Aid for Research on the Human Genome, Tissue Engineering, and Food Biotechnology from the Ministry of Health, Labour, and Welfare.

Address for Reprints: Jun Nakura, M.D., Department of Geriatric Medicine, School of Medicine, Ehime University, Shigenobu-cho, Onsen-gun, Ehime 791-0295, Japan. E-mail: nakura@ehime-u.ac.jp

Received May 11, 2004. Accepted in revised form August 18, 2004.

Table 1. Characteristics of Participants According to Hypertension Status

Variable	Normotensive (n=554)	Hypertensive (n=267)	P value
Sex (male %)	78.3	89.0	<0.001
Age (years)	52.8±8.6	57.4±8.4	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.6±2.9	23.9±2.9	<0.001
SBP (mmHg)	115.1±11.6	143.9±16.6	<0.001
DBP (mmHg)	72.2±8.9	88.9±9.9	<0.001
T-Chol (mg/dl)	197.7±31.2	202.9±37.1	NS
HDL-Chol (mg/dl)	54.2±14.6	52.1±14.1	NS
TG (mg/dl)	116.3±80.9	151.6±129.2	<0.001
FFP (mg/dl)	101.2±17.0	105.7±18.5	<0.001
AST (U/l)	23.3±26.0	25.1±14.3	NS
ALT (U/l)	20.9±22.8	21.4±14.9	NS
GGT (U/l)	31.3±34.8	43.3±45.4	NS

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; T-Chol, plasma total cholesterol; HDL-Chol, plasma high density lipoprotein cholesterol; TG, plasma triglyceride; FFP, fasting plasma glucose; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. Data are mean±SD. Blood pressure readings prior to the start of antihypertensive medication were not available for 113 hypertensive subjects whose values were measured under treatment.

records were used in the analyses. All subjects provided informed consent to participate, and the ethics committee of Ehime University approved the study.

## Diagnostic Categories

Each subject was assigned to one of the blood pressure diagnostic categories defined by the following criteria. Hypertensive subjects had a previous diagnosis of hypertension or they were being treated with antihypertensive medication, or their systolic/diastolic blood pressure (SBP/DBP) was  $\geq 140/90$  mmHg. Normotensive subjects had never been treated with medication for hypertension, and their SBP/DBP was  $< 140/90$  mmHg. Diabetic subjects were diagnosed according to the WHO98 definition of type 2 diabetes (7). Subjects were considered to have diabetes mellitus if their fasting plasma glucose (FPG) concentration was  $\geq 126$  mg/dl.

## DNA Analysis

Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the GNAS1 T393C polymorphism (5). The sense oligonucleotide primer was 5'-CTCCTAACTGACATGGTCCAA-3' and the antisense primer was 5'-TAAGGCCACACAAGTCCGGGT-3'. The amplified PCR products were digested with 3 U of the restriction enzyme, FokI. A thymine at nucleotide position 393 was shown by a fragment of 345 bp, whereas a cytosine at nucleotide position 393 was shown by two fragments of 263 bp and 82 bp. The person who assessed the genotype was blinded to the clinical data of the subjects from whom the samples originated.

## Statistical Methods

Analysis of variance was used to assess differences in the means and variances of continuous variables. Logistic regression models were used to assess whether the GNAS1 T393C polymorphism made a statistically significant contribution to prediction of hypertension or diabetes mellitus, with consideration of the interactions between the T393C polymorphism and GGT. Sex, age, body mass index, plasma total cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol, and triglyceride levels were considered to be confounding factors (Table 1). Because the distributions of plasma triglyceride and GGT values were skewed, their logarithmically transformed values were used in the analyses. General linear regression models were used to assess whether the T393C polymorphism made a statistically significant contribution to prediction of blood pressure or of FPG, with consideration of interactions between the polymorphism and GGT. P values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed with SPSS statistical software.

## Methods

## Subjects

According to the criteria described below, 267 hypertensive subjects and 554 normotensive subjects were selected from a population in the Hyogo region of Japan (Table 1). All subjects were Japanese. They had participated in a medical check-up, and the values of variables in their personal health

Table 2. GNAS1 Genotype and Allele Frequencies in Hypertensive and Normotensive Subjects

Genotype	Genotype frequency		p value*	OR*	95% CI*
	Normotensive (n = 554)	Hypertensive (n = 267)			
GNAS1 genotypes					
TT (%)	187 (33.8)	87 (32.6)			
TC (%)	254 (45.8)	126 (47.2)			
CC (%)	113 (20.4)	54 (20.2)	0.954*	1.01*	0.70-1.45*
GNAS1 alleles					
T (%)	628 (56.7)	300 (56.2)			
C (%)	480 (43.3)	234 (43.8)	0.849	0.98	0.79-1.21

\* p value, OR and 95% CI are for TT+TC vs. CC. OR, odds ratio; CI, confidence interval.

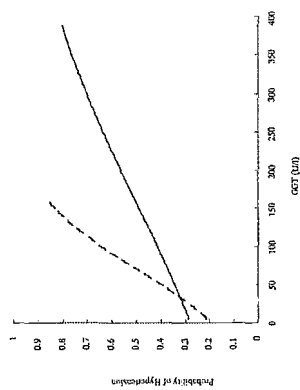


Fig. 1. Genotypic variations in the positive relationship between GGT and the probability of having hypertension. The solid line indicates the TT and TC genotypes; the dotted line indicates the CC genotype. The regression between GGT and the probability of having hypertension in T carriers was represented by the equation,  $Y = \exp(0.006X - 0.946)/1 + \exp(0.020X - 1.450)$  in CC homozygotes. CC homozygotes show a steeper slope than T carriers ( $p = 0.033$ ; after adjustment for all confounding factors,  $p = 0.0023$ ).

2). Moreover, there was no significant difference in GGT and FPG between the genotypes (TT+TC vs. CC) (data not shown).

**Interaction of GNAS1 T393C Polymorphism with GGT in Association with Hypertension and Diabetes Mellitus**

We next analyzed the possible interaction of the GNAS1 T393C polymorphism with GGT in the association with hypertension in a logistic regression model. This analysis showed a significant interaction ( $p = 0.033$ ) (Fig. 1). This interaction was even more significant after adjustment for all confounding factors ( $p = 0.0023$ ). Because, all nine of the subjects with a GGT level above 150 U/l of GGT had the T allele(s), and despite the fact that the T393C polymorphism was not associated with GGT ( $p = 0.686$ ), we also examined this interaction using GGT stratified by quartiles (13, 22, and 42 U/l). The results showed that the p value for the interaction was 0.034. The p value was 0.0013 after adjustment for all confounding factors. In contrast, analysis of the possible interaction of the T393C polymorphism with GGT in the association with diabetes mellitus failed to show a significant relation ( $p = 0.492$ ).

We further analyzed the interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with blood pressure in general linear regression models (Table 3 and Fig. 2). This analysis showed a marginally significant interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with DBP ( $p = 0.049$ ). This interaction was more significant after adjustment for all confounding factors ( $p = 0.0027$ ). The analysis also showed a non-significant trend supporting the presence of an interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with SBP ( $p = 0.198$ ). However, this interaction was significant after adjustment for all confounding factors ( $p = 0.011$ ). Analyses of these interactions using GGT stratified by quartiles showed that the p values for these interactions were 0.039 and 0.183 for DBP and SBP, respectively. The p values were 0.0011 for DBP and 0.0041 for SBP after adjustment for all confounding factors. In contrast, analysis of the possible interaction of the

Table 3. General Linear Model for Regression of GGT in Association with Blood Pressure and FPG, According to Genotype

Phenotype	Genotypes (n)	Coefficient	Constant	p value for regression	Determination coefficient	p value for interaction
SBP (mmHg)	TT+TC (654)	0.05	123.0	0.037	0.027	
	CC (167)	0.10	119.6	0.006	0.077	0.198
DBP (mmHg)	TT+TC (654)	0.03	76.5	0.003	0.034	
	CC (167)	0.09	74.1	0.003	0.122	0.049
FPG (mg/dl)	TT+TC (654)	5.59	85.0	<0.001	0.065	
	CC (167)	5.58	84.0	<0.001	0.071	0.998

GGT,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; FPG, fasting plasma glucose; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

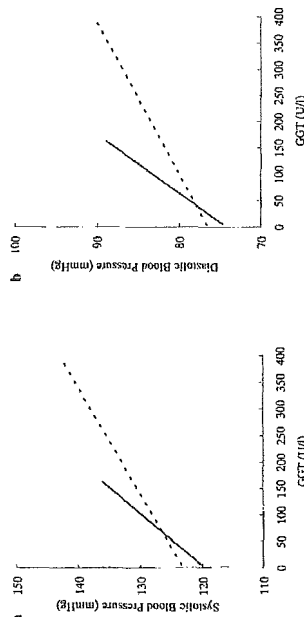


Fig. 2. Genotype-specific regression slopes of blood pressure on GGT. The solid line indicates the TT and TC genotypes; the dotted line indicates the CC genotype. a: The regression between GGT and SBP in T carriers was represented by the equation,  $Y = 0.101X + 119.6$ . The equation was  $Y = 0.049X + 123.0$  in CC homozygotes. CC homozygotes showed a steeper slope than T carriers ( $p = 0.198$ ; after adjustment for all confounding factors,  $p = 0.011$ ). b: The regression between GGT and DBP in T carriers was represented by the equation,  $Y = 0.090X + 74.1$ . The equation was  $Y = 0.034X + 76.5$  in CC homozygotes. CC homozygotes showed a steeper slope than T carriers ( $p = 0.049$ ; after adjustment for all confounding factors,  $p = 0.0027$ ).

T393C polymorphism with GGT in the association with FPG failed to show a significant result ( $p = 0.998$ ) (Table 3).

**Discussion**

The present study showed a significant interaction of the GNAS1 T393C polymorphism with GGT in the association with hypertension in a Japanese population. In subjects with lower GGT, the CC genotype appeared to have a protective effect against the development of hypertension, whereas the TT and TC genotypes appeared to have a risk-increasing effect (Figs. 1 and 2). However, CC homozygotes were more sensitive to an increment of GGT than T carriers in the association with hypertension. Consequently, in subjects with higher GGT, the TT and TC genotypes appeared to have a protective effect against the development of hypertension, whereas the CC genotype appeared to have a risk-increasing effect. These relations and directions were very similar to

those in the interaction of the T393C polymorphism with cigarette smoking and alcohol consumption in the association with hypertension (6, 7). Given that both cigarette smoking and alcohol consumption could affect blood pressure through the  $\beta$ -AR-Gs protein system (13-16), and because GGT is a well-established biomarker of alcohol consumption (8-11), the significant interactions of the T393C polymorphism with GGT, the significant interactions of the T393C polymorphism with cigarette smoking, alcohol consumption, and GGT in the association with hypertension may each indicate the presence of an interaction between the T393C polymorphism and  $\beta$ -AR stimulation in the pathogenesis of hypertension from different angles. Indeed, the T393C polymorphism has been shown to be associated with blood pressure response to  $\beta$ -blockers in a Caucasian population (5). However, more accurate assessment will require additional information on drinking history.

The present study failed to show a significant association between the T393C polymorphism and hypertension. How-

ever, given the above interactions, this failure may not be surprising, because an association between a polymorphism and hypertension could be masked in the presence of gene-environmental interactions even when analyzed in subjects with matched confounding factors (6). In this context, the significant association shown in the population previously analyzed was largely dependent on the fact that hypertensive subjects had a significantly higher frequency of the TT and TC genotypes than normotensive subjects both in non-heavy smokers and in non-drinkers or light drinkers. In the present population, a possibly lower  $\beta$ -AR stimulation might have resulted in failure to show a significant association between the T393C polymorphism and hypertension, although the extent of  $\beta$ -AR stimulation is difficult to estimate.

The precise mechanism of the interaction between the T393C polymorphism and  $\beta$ -AR stimulation in the pathogenesis of hypertension is elusive and remains to be investigated. Previous studies have shown that the T allele of the T393C polymorphism is associated with poor responsiveness to  $\beta$ -blockade (5) and that the T393C polymorphism interacts with cigarette smoking and alcohol consumption in the pathogenesis of hypertension (6, 7). Based on this evidence, we previously speculated that the TT and TC genotypes or genotypes in linkage disequilibrium with them might produce a constant amount of  $\alpha$ -subunit of Gs proteins independent of activation of the sympathetic nervous system (6). In contrast, the CC genotype or genotype in linkage disequilibrium with it might produce a controlled amount of  $\alpha$ -subunit of Gs proteins. In this context, it is noteworthy that CC homozygotes tended to be more strongly affected by an increment of GGT than T carriers in the association with hypertension (Figs. 1 and 2). Thus, the above explanation appears also to be applicable to the interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with hypertension.

Another point of view in regard to the interaction between the T393C polymorphism and  $\beta$ -AR stimulation in the association with hypertension is that, depending on the genotype,  $\beta$ -AR stimulation could influence glucose metabolism, which in turn could influence blood pressure (6). In order to assess this possibility, we examined the possible interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with diabetes mellitus, and failed to show a significant interaction. Analysis of the possible interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with FPG also failed to show a significant interaction. These results appeared to contribute evidence against the hypothesis that the interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with hypertension could be caused by an indirect effect of Gs proteins mediated by glucose metabolism. Further extending this, the interaction between the T393C polymorphism and  $\beta$ -AR stimulation in the association with hypertension might not result from an indirect effect of Gs proteins mediated by glucose metabolism. However, because data on insulin levels, HbA<sub>1c</sub>, and oral glucose tolerance test

were not available in the present population, a further study including such data should be performed.

Taking advantage of the fact that GGT is a good biomarker of alcohol consumption, the present study provided an additional piece of evidence supporting the presence of an interaction between the GNAS1 T393C polymorphism and  $\beta$ -AR stimulation in the pathogenesis of hypertension. Moreover, by analyzing the possible interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with diabetes mellitus and with FPG, the present study provided evidence against the possibility that the interaction may be caused by an indirect effect of Gs proteins mediated by glucose metabolism. However, the present study did not assess gene-gene interaction, which is a candidate factor for modifying the evaluation of an association. In this context, interaction analyses of the GNAS1 gene with other genes involved in the  $\beta$ -AR-Gs protein system may be helpful to improve understanding of the relation between the  $\beta$ -AR-Gs protein system and hypertension. Furthermore, in order to establish an association, it is also important that associated alleles affect the gene product in a physiologically meaningful way. In this context, thus far, there is no evidence showing that the T393C polymorphism affects the gene product in a physiologically meaningful way. Therefore, it is necessary to investigate the possible biological change of the gene product by the T393C polymorphism or another variant in linkage disequilibrium with it.

## References

- Kato N: Genetic analysis in human hypertension. *Hypertens Res* 2002; 25: 319-327.
- Feldman RD, Lawton WJ, McArdle WL: Low sodium diet corrects the defect in lymphocyte beta-adrenergic responsiveness in hypertensive subjects. *J Clin Invest* 1987; 79: 290-294.
- Yoshikawa H, Fukuda K, Wataka Y, et al: Deficient activity of stimulatory nucleotide-binding regulatory protein in lymphocytes from patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1994; 7: 713-716.
- Feldman RD, Tan CM, Chonazyczewski J: G protein alterations in hypertension and aging. *Hypertension* 1995; 26: 725-732.
- Jia H, Hingorani AD, Sharma P, et al: Association of the  $\beta$ 2-adrenergic gene with essential hypertension and response to beta-blockade. *Hypertension* 1999; 34: 8-14.
- Abe M, Nakura J, Yamamoto M, et al: Association of GNAS1 gene variant with hypertension depending on smoking status. *Hypertension* 2002; 40: 8-14.
- Chen Y, Nakura J, Jin JJ, et al: Association of GNAS1 gene variant with hypertension dependent on alcohol drinking status. *Hypertens Res* 2003; 26: 439-444.
- Chick J, Kreiman N, Plant M: Mean cell volume and gamma-glutamyl-transpeptidase as markers of drinking in working men. *Lancet* 1981; i: 1249-1251.
- Papouk L, Wainet JM, Paquinot G, Eschwege E, Claude JR, Schwartz D: Alcohol consumption in a healthy population: relationship to gamma-glutamyl transferase activity and mean corpuscular volume. *JAMA* 1981; 245: 1748-1751.
- Burke V, Puddey IB, Beilin LJ, Vandongen R, Masarei JR: Changes in markers of alcohol intake in men below 'safe' drinking levels. *Alcohol Alcohol* 1992; 27: 677-683.
- Yersin B, Nicolet JF, Deroy H, Burnier M, van Melle G, Pecoud A: Screening for excessive alcohol drinking: comparative value of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean corpuscular volume. *Arch Intern Med* 1995; 155: 1907-1911.
- Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus: provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15: 539-553.
- Cryer PE, Haymond MW, Santiago JV, Shah SD: Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic mediation of smoking-associated hemodynamic and metabolic events. *N Engl J Med* 1976; 295: 573-577.
- Eisenhofer G, Lambie DG, Johnson RH: Effects of ethanol on plasma catecholamines and norepinephrine clearance. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 34: 143-147.
- Ireland MA, Vandongen R, Davidson L, Beilin LJ, Rouse IL: Acute effects of moderate alcohol consumption on blood pressure and plasma catecholamines. *Clin Sci* 1984; 66: 643-648.
- Puddey IB, Beilin LJ, Vandongen R, Rouse IL, Rogers P: Evidence for a direct effect of alcohol consumption on blood pressure in normotensive men: a randomized controlled trial. *Hypertension* 1985; 7: 707-713.

## Regular Article

## Effect of Genetic Polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) on Lipid-Lowering Response to HMG-CoA Reductase Inhibitors

Rieko TACHIBANA-IMORI<sup>1)</sup>, Yasuharu TABARA<sup>2)</sup>, Hiroyuki KUSUHARA<sup>3)</sup>,  
Katsuhiko KOHARA<sup>1)</sup>, Ryuichi KAWAMOTO<sup>4)</sup>, Jun NAKURA<sup>1)</sup>, Katsushi TOKUNAGA<sup>5)</sup>,  
Ikuko KONDO<sup>2)</sup>, Yuichi SUGIYAMA<sup>3)</sup> and Tetsuro MIKI<sup>1,\*)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Geriatric Medicine, Ehime University School of Medicine, Tohon-shi, Ehime, Japan

<sup>2)</sup>Department of Medical Genetics, Ehime University School of Medicine, Tohon-shi, Ehime, Japan

<sup>3)</sup>Department of Molecular Pharmacokinetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,

The University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>4)</sup>Department of Internal Medicine, Noyura Municipal Hospital, Ehime, Japan.

<sup>5)</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Full text of this paper is available at <http://www.jssx.org>

**Summary:** The effect of genetic polymorphism of human organic anion transporting polypeptide C (OATP-C) on the lipid-lowering response to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors was assessed.

A retrospective study was conducted on 66 patients who underwent treatment of hyperlipidemia with HMG-CoA reductase inhibitors in a municipal hospital in a community-based cohort of Ehime prefecture in the southern part of Japan. Plasma lipid concentrations before and after administration were analyzed in patients in relation to the 521T/C (Val174→Ala) polymorphism in the OATP-C gene (TT: n = 44 (66.7%), TC: n = 20 (30.3%), CC: n = 0 (0.0%), undetermined: n = 2 (3.0%). Total cholesterol level was significantly lowered after treatment with HMG-CoA reductase inhibitors in all patients ( $p < 0.001$ ); moreover, subjects with the 521C allele showed an attenuated total-cholesterol-lowering effect compared with those homozygous for the 521T allele ( $-22.3 \pm 8.7\%$  vs.  $-16.5 \pm 10.5\%$ ,  $p < 0.05$ ).

These data suggest that the 521T/C polymorphism of the OATP-C gene modulates the lipid-lowering efficacy of HMG-CoA reductase inhibitors.

**Key words:** HMG-CoA reductase inhibitor; genetic polymorphism; transporter; OATP-C; cholesterol; individualized medicine

## Introduction

The treatment of common diseases as typified by hyperlipidemia and hypertension gives first priority to lifestyle regimens such as smoking cessation, dietary therapy, kinestherapy, and maintenance of optimal body weight. However, pharmacotherapy is combined with these measures in patients showing low effectiveness or compliance. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins) are now the most widely prescribed drugs worldwide and are established as the first-line treatment for hyperlipidemia. Inhibition of HMG-CoA reductase, which catalyzes the rate-limiting step of cholesterol biosynthesis,

causes a decrease in intracellular cholesterol levels, resulting in upregulation of low density lipoprotein (LDL) receptors, increasing clearance of LDL-cholesterol, and leading to a further lipid-lowering effect. The statins decrease blood levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, very low density lipoprotein (VLDL)-cholesterol and triglyceride. High-density lipoprotein (HDL) level is increased to a moderate degree.<sup>1)</sup> The clinical significance of statins has been established as the class of drug that most effectively lowers LDL-cholesterol at present. Recent primary and secondary prevention trials have evidenced that statins also reduce the risk of coronary heart disease (CHD).<sup>2-12)</sup>

Pravastatin, one of the statins, is widely used in the treatment of hyperlipidemia. After oral administration, it is absorbed from the gastrointestinal tract, and then taken up from the circulation by the liver through organic anion transporting polypeptide C (OATP-C).<sup>13,14)</sup> OATP-C, encoded by the gene SLCO1B1 and also referred to as liver-specific transporter 1 (LST-1) or OATP2, is a liver-specific multispecific organic anion transporter that plays a major role in the hepatic uptake of a variety of endogenous and foreign chemicals.<sup>15-17)</sup> In addition to pravastatin, it also plays a major role in the hepatic uptake of pitavastatin,<sup>18)</sup> and an inhibition study suggested that lovastatin, simvastatin and atorvastatin are potential substrates of OATP-C.<sup>18)</sup> Recently, a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in the human OATP-C gene by different groups, and some nonsynonymous SNPs have been found to alter its transport activities.<sup>19-21)</sup> The distribution of OATP-C haplotypes varies among ethnic groups. The 521C polymorphism is strongly associated with the A388G variant in Japanese subjects,<sup>22)</sup> while in European Americans, the A388C521 (OATP-C\*5) allele occurs at a considerable frequency of 14–15%.<sup>20,23)</sup> An

*in vivo* pharmacokinetic study in healthy Japanese subjects showed reduced total and nonrenal clearance of pravastatin in subjects with the G388C521(OATP-C\*15) allele as compared with individuals homozygous for the G388T521 (OATP-C\*1b) allele.<sup>23)</sup> The reduced hepatic uptake due to this gene polymorphism may be associated with a lower hepatic concentration, resulting in attenuation of the lipid-lowering effect of statins, since the liver is the target organ of statins. In this retrospective study performed in Japanese patients with hyperlipidemia in whom a statin was prescribed, the effect of genetic polymorphism of OATP-C (521C) on the lipid-lowering response to statins was assessed.

## Methods

**Subjects:** This retrospective cohort study included 3071 subjects in a rural district of Ehime prefecture in the southern part of Japan. Of these subjects, 101 were prescribed HMG-CoA reductase inhibitors between July 1, 2003 and August 28, 2003.

Follow-up survey was based on the medical records of the municipal hospital. The date of first administration of an HMG-CoA reductase inhibitor was confirmed, and the data of total cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride before and after the first administration were transcribed. LDL-cholesterol concentration was calculated using Friedewald's formula. Subjects who showed low or no drug compliance in their medical record were excluded from the analysis. Sixty six subjects were finally available for analysis.

All subjects gave informed consent, and the study was approved by the ethics committee of Ehime University.

**DNA analysis:** Genomic DNA was extracted from blood lymphocytes using an extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). DNA was amplified by degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR). DOP-PCR amplification was performed as previously described.<sup>24)</sup> with slight modifications as follows. The PCR reactions contained 4  $\mu$ M DOP-PCR primer (5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3'), 400  $\mu$ M dNTPs, 2  $\times$  GC buffer I, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2.5 U Taq polymerase (Takara LA Taq, TAKARA BIO Inc.) in a final volume of 50  $\mu$ L. The reaction mixture was subjected to an initial denaturation step of 5 min at 95°C, then 10 cycles of 94°C for 30 sec, 30°C for 2 min, and 68°C for 7 min (a ramping step of 0.08°C/sec to 68°C); and then 25 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 1 min, and 68°C for 7 min. Amplification was carried out in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc.). Then the DOP-PCR-preamplified DNA samples were subjected to ExoSAP-IT (Amersham Biosciences Inc.) according to the manufacturer's protocol to remove unincorporated primers and dNTPs and used to determine the gene polymorphism. The TaqMan chemical method was used to detect the OATP-C 521C (Val174Ala) polymorphism. The forward primer was 5'-AGG TTG TTT AAA GGA ATC TGG GTC ATA C-3', the reverse primer was 5'-CTC CCC TAT TCC ACG AAG CAA TTT-3', the T allele-specific probe was 5'-FAM-CCC ATG AAC AACA TAT AT-MGB-3', and the C allele-specific probe was 5'-VIC-CCATGAACGCATATAT-MGB-3'.

**Statistical analysis:** All values are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical comparisons among genotypes were performed by ANOVA. Chi-squared tests were used to compare the prevalence among genotypes and to verify Hardy-Weinberg equilibrium. The effect of statin treatment on lipid values was analyzed by *t* test for dependent samples. Analysis of variance for repeated measurements was used to determine the significance of differences in serum lipid concentrations. Probability values less than 0.05 were considered to be significant. Statistical analysis was performed with SPSS statistical software (SPSS Inc.).

## Results

Baseline characteristics of the subjects are shown in Table 1. Out of the 66 subjects, 22 were treated with pravastatin, 11 with atorvastatin and 33 with simvastatin. The allele frequencies of the OATP-C 521C polymorphism were 0.85 and 0.15, respectively, and agreed with the results of previous reports in Japanese.<sup>21,25)</sup> Genotype frequencies were: TT, 66.7%; TC, 30.3%; CC, 0%; undetermined, 3.0%.

Lipid concentrations in patients treated with statins are shown in Table 2. The mean serum concentrations of total cholesterol, LDL-cholesterol, and triglyceride

Received: July 28, 2004. Accepted: October 14, 2004

\*To whom correspondence should be addressed: Tetsuro Miki, M.D., Ph.D., Department of Geriatric Medicine, Ehime University, School of Medicine, 454 Shitsukawa, Tohon-shi, Ehime 791-0295, Japan. Tel. + 81-89-960-5552, E-mail: [tmiki@m.ehime-u.ac.jp](mailto:tmiki@m.ehime-u.ac.jp)