

厚生労働科学研究費補助金
健康科学総合研究事業

遺伝子解析に基づく循環器病・糖尿病の
予防医療診療の試み
(H16-健康-011)

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 (愛媛大学医学部衛生学講座)

目 次

I. 総括研究報告

遺伝子解析に基づく循環器病・糖尿病の予防医療診療の試み

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. 予防医療診療実現に向けた代謝異常性疾患感受性遺伝子の探索

愛媛大学医学部老年医学講座・教授 三木哲郎

-----9

2. 予防医療診療実現に向けた高血圧感受性遺伝子の探索

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

-----16

IV. 研究成果の刊行物・別刷

-----17

厚生労働科学研究補助金（健康科学総合研究事業）
総括研究報告書

遺伝子解析に基づく循環器病・糖尿病の予防医療診療の試み

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

テーラーメイド医療の実現に向け、メタボリックシンドロームとGタンパク質β3サブユニット遺伝子（GNB3）C825T多型との関連について検討した。また、遺伝-環境相互作用に着目して、ドーパミンβ水酸化酵素（DBH）遺伝子C-1021T多型と高血圧との関連も検討した。その結果、GNB3遺伝子のTアレルと、肥満、高血圧、高中性脂肪、糖尿病の集積とには有意な相関が認められ、当該遺伝子多型がメタボリックシンドロームのリスクとなる可能性が示された。また、高血圧に対して、DBH遺伝子多型直接の効果は認められなかったものの、空腹時血糖との交互作用が種々の交絡因子を調整した上でも有意な説明変数となることが示された。これらの成績は、今後の予防医療診療実現に向けて、有用な知見になるといえる。

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

ームの遺伝的背景については、まだ多く検討の余地が残されている。特に、各疾患単独ではなく、メタボリックシンドロームとして疾患をマクロ的にとらえた検討は見受けられない。そこで本研究では、メタボリックシンドロームをターゲットとし、疾患感受性候補遺伝子多型との相関を検討した。

A. 研究目的

高血圧や糖尿病に代表される生活習慣病の発症には、複数の環境要因と遺伝的要因とが相互作用をもって関与し、加齢や性なども修飾因子として働く。このような疾病の予防・治療には、食事内容の是正や定期的な運動の励行など、ライフスタイルの改善が主点となる。折しも、政府主導の「21世紀における国民健康づくり運動（健康日本21）」が展開され、徐々に成果をあげつつあることは、環境要因の重要性を裏付けるものといえよう。

その一方で、高血圧や糖尿病、脂質代謝異常、肥満といった基礎疾患は、それ単独よりも重複して存在することが明らかとなってきた。このような基礎疾患の重複は、偶発的な期待値より高頻度で生じていることから、各々が独立したものではなく、成因上互いに密接に関連しているものと考えられている。最近になって、このような病態を「メタボリックシンドローム（代謝異常性疾患）」と定義されるようになってきた。メタボリックシンドロームの成因としては、インスリン抵抗性の亢進と脂肪細胞異常の関与が示唆されている。また臨床的には、冠動脈疾患に代表される動脈硬化症の基礎疾患であることや、高率に2型糖尿病や高血圧に移行する前駆病態であることが、特徴として挙げられる。しかし、メタボリックシンドロ

加えて、メタボリックシンドロームのうち、本邦での有病率が最も高く、かつ脳卒中や心筋梗塞などの循環器系疾患に対して最大の危険因子となる高血圧については、疾患単独での検討も行った。高血圧の成因には、喫煙や飲酒、運動不足などの生活習慣が大きく関与している。同時に、個人の遺伝的背景も血圧には関与しており、すでに幾つかの感受性遺伝子が報告されている。しかし、最近になって、個々の遺伝子の寄与率が比較的小さいことが明らかとなってきた。そのため、変動性の大きい血圧値と、寄与率の小さい遺伝因子との相関を検討するには、より大きなサンプルサイズを必要とするようになってきた。

その一方で、高血圧は多因子疾患であることから、環境因子との交絡効果も無視できない。すなわち、関連する因子のベクトルが揃った状況下において、はじめて疾患発症と遺伝因子との相関が顕在化することを視野に入れた解析が必要がある。しかし、従来の疾患感受性遺伝子解析では、このような交絡効果について十分に加味されてきたとは言い難い。そのため、特に多因子疾患について遺伝的背景に基づいた予防医療診療を実現するには、遺伝因子の直接効果のみならず、環境因子との交絡効果についても十分に把握しておく必要がある。

そこで本研究では、ドーパミンβ水酸化酵素遺伝子 (DBH) を取り上げ、その高血圧感受性について、環境因子との交絡を踏まえて検討した。DBH は、ドーパミンをノルエピネフリンに変換する酵素であり、交感神経活性と関連して血圧上昇に関与すると考えられている。本態性高血圧患者では血中 DBH 濃度が上昇していること、DBH を阻害すると容量依存的に血圧を低下させること、あるいは先天的な DBH 欠損者では顕著な低血圧を呈することなども、DBH 遺伝子の高血圧感受性を示唆する成績といえよう。

DBH の血中濃度を規定する因子として、DBH 遺伝子のプロモーター領域にある C-1021T 多型が知られている。この多型は、血中 DBH 濃度の 35~52% を規定することが示されていることから、血中濃度を介して血圧上昇に関与する有力な感受性遺伝子多型であるといえる。しかし、この多型と血圧との相関を検討した例は見あたらない。そこで本研究では、DBH 遺伝子の C-1021T 多型と血圧との関連について、環境因子との交絡も踏まえて検討した。

このような基礎的知見の集約を経て、生活習慣病の治療や介入効果との関連についても検討していく予定である。

B. 研究方法

対象は、愛媛県下の一般企業従業員から収集した。このうち、本研究に同意の得られた 2245 例を解析対象とした。対象者の臨床情報 (血圧および血液生化学検査値) は、企業検診時のものを利用した。同時に、兵庫県下の一般病院における人間ドック受診者からも協力を得た。このうち、本研究の趣旨に同意の得られた 822 例を解析対象とした。対象者の血圧および血液生化学検査値、生活習慣等については、人間ドック受診時の検査値を利用した。

表 1 対象者の GNB3 遺伝子多型別臨床背景

	TT (n=215)	TC (n=359)	CC (n=232)	p
性別 (男性%)	78.1	83.0	80.6	0.86
年齢 (歳)	54.7±8.7	54.2±8.7	53.7±9.1	0.28
BMI (kg/m ²)	22.9±2.9	23.2±2.8	22.7±3.0	0.13
収縮期血圧 (mmHg)	126.0±18.4	124.8±19.0	122.0±18.8	0.026
拡張期血圧 (mmHg)	78.0±11.7	77.7±12.0	77.1±13.1	0.46
脈圧 (mmHg)	48.0±13.3	47.1±13.0	44.9±10.9	0.0089
中性脂肪 (mg/dl)	131.1±104.6	126.3±96.8	119.0±88.1	0.12
総コレステロール (mg/dl)	201.4±32.1	199.5±33.1	197.2±32.9	0.24
空腹時血糖 (mg/dl)	103.7±18.9	102.3±17.6	101.3±15.0	0.25

対象者の DNA は、末梢血より定法に則って抽出した。抽出した DNA は、DOP-PCR 法により増幅してから分析に供した。GNB3 遺伝子 C825T 多型、および DBH 遺伝子 C-1021T 多型の解析は、TaqMan プローブ法により行った。用いたプライマー/プローブの配列を以下に示す。

GNB3 遺伝子 C825T 多型

Probe1 FAM- ATCACGTCGTGGCC -MGB

Probe2 VIC- CACGTCCGTGGCC -MGB

Primer1 GGCAGACCAGGAGCTGATCT

Primer2 TCGTCGTAGCCAGCGAATAGT

DBH 遺伝子 C-1021T 多型

Probe1 FAM-CTCTCCCACAAGTAGA-MGB

Probe2 VIC-CTCCCGCAAGTAGA-MGB

Primer1 GGATCAAGCAGAATGTCCTGAAG

Primer2 GGCACCTCTCCCTCCTGTGTC

メタボリックシンドロームは、以下の 4 項目について評価した。それぞれの基準も併せて示す。

- 1) 肥満 BMI 25 kg/m² 以上
- 2) 高血圧 SBP 140 mmHg 以上 かつ/または DBP 90 mmHg 以上 かつ/または降圧薬服用
- 3) 高中性脂肪 中性脂肪 150 mg/dl 以上
- 4) 糖尿病 空腹時血糖 126 mg/dl 以上

(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、研究課題名「生活習慣病における個別化医療を目指した研究」「遺伝子多型解析による個別化医療を目指した研究」として承認を得ている。

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・遺伝子解析研究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2 GNB3 遺伝子多型別の代謝性疾患の頻度

	TT (n=215)	TC (n=359)	CC (n=232)	p
肥満	25.6	29.5	23.7	0.21
高血圧	35.3	33.4	30.2	0.28
高中性脂肪	46.0	39.0	34.5	0.060
糖尿病	6.5	5.6	4.3	0.36
代謝性疾患なし	30.7	32.6	40.1	0.026

C. 研究結果

【代謝性疾患感受性遺伝子解析】

表1には、対象者の臨床背景を GNB3 遺伝子多型別に示した。収縮期血圧および脈圧については、遺伝子多型間で有意差が認められた。これは、一般線形分析において、性別と年齢を調整した上でも同様であった (SBP; p=0.050, PP; p=0.0089)。

表2には、遺伝子多型別に代謝異常性疾患の頻度を示した。遺伝子多型に加え、優性モデル/劣性モデルを含めて検討した結果でも、遺伝子多型と各疾患とに有意な関連は認められなかった。しかし、いずれの疾患も有さない対象では、遺伝子多型頻度に有意な偏りがみられ、これは年齢と性別を調整した上でも有意であった。

【高血圧感受性遺伝子解析】

対象者の臨床背景を表3に、遺伝子多型の分布を表4に示した。TT型の頻度が極端に低いため、C優性モデルについて解析を行ったが、有意差は認められなかった。アレル頻度での比較でも有意差は認められなかった(表4)

そこで次に、遺伝子多型と環境因子との交互作用について検討した。その結果(表5)、集団1では、遺伝子多型と血糖値との交互作用が、年齢、性別、BMI、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪を共変量として調整した上でも、高血圧に対して有意な説明変数であった(p=0.031)。CC多型では、血糖値の増加に対して、高血圧頻度の増加がより顕著であった。その他の環境因子(性別、年齢、BMI、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪)と遺伝子多型とは交互作用を認めなかった。集団2では、統計学的には有意でないものの、同様の傾向を示した。2集団をまとめた解析では、共変量を調整した上でも、交互作用項は有意な説明変数であった

同様に血圧値に対するDBH遺伝子多型と血糖値との交互作用について検討した(表6)。その結果、集団1と2を併せた解析において、拡張期血圧に対して、遺伝子多型と血糖値との交互作用は、性別、年齢、BMI、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪を調整した上でも有意な相関を示した(p=0.0060)。収縮期血圧については、同様の傾向を示したものの、有意差を示すには至らなかった。

表3 対象者の臨床背景

	集団1		集団2	
	正常血圧 (n=547)	高血圧 (n=275)	正常血圧 (n=1366)	高血圧 (n=879)
性別(男性%)	78.8	89.1	85.1	90.3
年齢(歳)	52.7±8.6	57.3±8.5	50.6±7.8	53.9±6.3
BMI(kg/m ²)	22.6±2.8	23.8±2.9	22.6±2.8	24.1±3.1
収縮期血圧(mmHg)	112.6±10.7	143.2±17.4	122.8±10.7	148.7±12.9
拡張期血圧(mmHg)	72.0±9.1	89.1±9.9	72.5±7.2	87.3±8.4
総コレステロール(mg/dl)	198.0±30.6	202.4±37.2	195.1±31.6	203.5±31.1
HDLコレステロール(mg/dl)	54.2±14.5	51.9±14.0	60.7±13.4	60.7±13.1
中性脂肪(mg/dl)	116.7±81.7	150.9±127.7	125.3±74.0	155.6±84.6
空腹時血糖(mg/dl)	101.2±17.3	106.0±19.2	102.6±22.2	108.3±30.9

表4 高血圧/正常血圧群での DBH 遺伝子多型頻度

		正常血圧	高血圧	P 値	オッズ比 (95%信頼区間)	
集団 1	CC (%)	378 (69.1)	184 (66.9)	0.52	0.90	0.66-1.23
	CT (%)	153 (28.0)	86 (31.3)			
	TT (%)	16 (2.9)	5 (1.8)			
	C (%)	907 (83.1)	454 (82.5)	0.78	0.96	0.73-1.26
	T (%)	185 (16.9)	96 (17.5)			
	集団 2	CC (%)	935 (68.4)	614 (69.9)	0.69	1.12
CT (%)		398 (29.1)	246 (28.0)			
TT (%)		33 (2.4)	19 (2.2)			
C (%)		2268 (83.0)	1474 (83.8)	0.47	1.06	0.90-1.25
T (%)		464 (17.0)	284 (16.2)			

表5 高血圧に対する空腹時血糖と DBH 遺伝子多型との交互作用

		回帰係数	定数	p 値	オッズ比	95%信頼区間	p 値 (交互作用)
集団 1	CC	3.12	-15.14	5.4×10^{-6}	22.59	5.90-86.55	0.0086
	CT+TT	0.20	-1.53	0.82	1.22	0.22-6.78	
集団 2	CC	1.43	-7.15	0.00064	4.16	1.84-9.44	0.27
	CT+TT	-4.00	17.32	0.41	0.018	1.3×10^{-6} -252.61	
集団 1 + 2	CC	1.95	-9.63	5.8×10^{-8}	7.00	3.47-14.13	0.030
	CT+TT	-0.044	-0.44	0.96	0.96	0.18-5.02	

表6 血圧値に対する DBH 遺伝子多型と空腹時血糖との交互作用

		回帰係数	定数	p 値	p 値 (交互作用)	
SBP	集団 1 (822)	CC (562)	12.1	23.5	0.00016	0.057
		CT+TT (260)	2.9	106.7	0.75	
	集団 2 (2245)	CC (1549)	13.3	65.3	0.00015	0.44
		CT+TT (696)	-1.4	138.5	0.95	
	Total (3067)	CC (2111)	16.7	47.3	0.0016	0.094
		CT+TT (956)	3.7	103.3	0.66	
DBP	集団 1 (822)	CC (562)	11.8	22.1	0.0034	0.045
		CT+TT (260)	-3.1	91.0	0.65	
	集団 2 (2245)	CC (1549)	9.5	31.5	2.8×10^{-5}	0.22
		CT+TT (696)	-5.3	102.6	0.66	
	Total (3067)	CC (2111)	20.3	28.3	0.0030	0.015
		CT+TT (956)	-3.2	91.7	0.60	

D. 考察

本研究結果から、GNB3 C825T 多型が収縮期血圧と脈圧とに相関することが示された。従来、T アレルが血圧に対してリスク因子であるとされてきたが、本研究でも同様の成績が得られた。また、

T アレルはインスリン抵抗性や動脈硬化のリスクであることも報告されており、遺伝子多型と血圧との相関には、動脈硬化を介した機序が内在すると推察された。一方、脈圧も動脈硬化の指標となることが知られている T アレルで脈圧が高値であったことも、動脈硬化の関与を示唆するもの

といえよう。

一方、GNB3 遺伝子多型と各代謝性疾患とには、いずれも有意差は認められなかった。欧米での成績に反し、日本人を対象とした既報では、いずれも有意な成績は得られていない。詳細は不明だが、日本人と白人との遺伝的背景や環境因子の相違が影響しているものと考えられた。しかし、今回検討したいずれの疾患においても、Tアレルキャリアの頻度が高い傾向が見受けられた。よりサンプルサイズを増加し、統計学的パワーを増やせば、遺伝子多型と疾患との関連が明示されるかもしれない。またGタンパク質 (GNB3) を介した生物学的なパスウェイの下流にある遺伝子との相互作用も、今後検討していく必要があるであろう。

一方、DBH 遺伝子 C-1021T 多型については、空腹時血糖との交互作用が高血圧/血圧上昇の有意な説明変数となることが示された。

本研究成果において、遺伝子多型と高血圧者頻度との相関は、空腹時血糖の影響を加味することでより明確化された。このことは、第一に、生活習慣病の遺伝的背景を考える上で、環境因子を的確に加味することが必須であることを示すものである。本成績は、これからの遺伝疫学研究において、重要な示唆を提示するものといえよう。

第二に、本成果は、将来的にテーラーメイド医療に貢献することが期待される。高血圧に対する遺伝子多型と空腹時血糖との交互作用は、血糖値のコントロールや肥満の解消などの効果にも遺伝的差異があることを示唆するものであり、適切な治療方法の選択に大きく寄与するものといえよう。さらに、遺伝子多型ごとの異なった生活指導や予防活動が、従来の画一的なそれより効果的であることは明白であり、この点で本成果は、予防医療の確立・実現にも大きく貢献しうることが期待される。

反面、本研究で提示したような遺伝-環境交互作用は、DBH-空腹時血糖に限らない。高血圧だけをとって、肥満や喫煙、栄養素、運動など多くの環境因子が関与することは明白であり、ヒトゲノムとの多様な組み合わせが推察される。今後は、これら多様な遺伝-環境、あるいは遺伝-遺伝交互作用についてより詳細に検討し、疫学的にそのパワーを立証していくことが必要となる。

予防医療診療の実現には、このような成果の蓄積が必要不可欠である。本研究で示したように、単一の疾患-遺伝子相関解析にとどまらず、環境因子との交絡やリスクの集積などを加味した知見を、今後早急に蓄積していく必要がある。

E. 結論

GNB3 遺伝子 C825T 多型では、Tアレルがリスク因子となり、高血圧および代謝性疾患の集積と相関することが示された。DBH 遺伝子 C-1021T 多型は、血糖のコントロール不良を介し、高血圧/血圧上昇と相関することが明らかとなった。

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, Kusuhashi 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
- 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
- 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

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-SHIP 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, October26-30, 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

予防医療診療実現に向けた代謝異常性疾患感受性遺伝子の探索

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

代謝異常性疾患と G タンパク質 $\beta 3$ サブユニット遺伝子 (GNB3) C825T 多型との関連について検討した。その結果、当該遺伝子多型と肥満、高血圧、高中性脂肪、糖尿病の有無とに有意な相関は認められなかった。しかし、これら疾患を有さない対象では、遺伝子多型頻度に有意な偏りが認められた。これより、GNB3 遺伝子 C825T 多型がメタボリックシンドロームのリスク因子となる可能性が示された。

A. 研究目的

我が国における死因の約 1/3 は脳卒中や心疾患などの循環器系疾患である。近年、これら疾患の背景に、耐糖能異常や高血圧、脂質代謝異常、肥満といった複数の危険因子の重複が存在することが明らかとなってきた。このような危険因子の重複は、偶発的な期待値より高頻度で生じていることから、各々の危険因子は互いに独立したものではなく、成因上互いに密接に関連しているものと考えられている。最近になって、このような病態を「メタボリックシンドローム」と定義されるようになってきた。

メタボリックシンドロームの成因としては、インスリン抵抗性の亢進と脂肪細胞異常の関与が示唆されている。また臨床的には、冠動脈疾患に代表される動脈硬化症の基礎疾患であることや、高率に 2 型糖尿病や高血圧に移行する前駆病態であることが、特徴として挙げられる。

一方、従来の臨床研究や疾患感受性遺伝子研究は、その殆どが高血圧や糖尿病などの 1 疾患をターゲットとしたものであった。しかし、これらが独立した疾患でない以上、よりマクロ的な視点から、メタボリックシンドロームとして疾患をとらえた検討も必要といえよう。

そこで本研究では、メタボリックシンドロームをターゲットとし、疾患感受性候補遺伝子多型との相関を検討した。このような基礎的知見の集約を経て、生活習慣病の治療や介入効果との関連についても検討していく予定である。

候補遺伝子としては、G タンパク質 $\beta 3$ サブユニット遺伝子 (GNB3) を取り上げ、その機能性変異である C825T 多型を解析した。この多型では、一般に T アレルがリスク因子とされており、高血圧や肥満、2 型糖尿病との関連が報告されている、

また、インスリン抵抗性との相関も指摘されていることから、当該遺伝子多型がメタボリックシンドロームの危険因子であることが推察される。

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から収集した。このうち、本研究の趣旨に同意の得られた 806 例を解析対象とした。対象者の血液生化学検査値や生活習慣等については、人間ドック受診時の検査値を利用した。

対象者の DNA は、末梢血より定法に則って抽出した。抽出した DNA は、DOP-PCR 法により増幅してから分析に供した。GNB3 遺伝子 C825T 多型の解析は、TaqMan プローブ法により行った。用いたプライマー/プローブの配列を以下に示す。

Probe1 FAM- ATCACGTCTGTGGCC -MGB
Probe2 VIC- CACGTCCGTGGCC -MGB
Primer1 GGCAGACCAGGAGCTGATCT
Primer2 TCGTCGTAGCCAGCGAATAGT

メタボリックシンドロームは、以下の 4 項目について評価した。それぞれの基準も併せて示す。

- 1) 肥満 BMI 25 kg/m² 以上
- 2) 高血圧 SBP 140 mmHg 以上 かつ/または DBP 90 mmHg 以上 かつ/または降圧薬服用
- 3) 高中性脂肪 中性脂肪 150 mg/dl 以上
- 4) 糖尿病 空腹時血糖 126 mg/dl 以上

(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、研究課題名「生活習慣病における個別化医療を目指した研究」「遺伝子多型解析による個別化医療を目指した研究」として承認を得ている。

対象者には、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

表1には、対象者の臨床背景を GNB3 遺伝子多型別に示した。収縮期血圧および脈圧については、

表1 対象者の GNB3 遺伝子多型別臨床背景

	TT (n=215)	TC (n=359)	CC (n=232)	p
性別 (男性%)	78.1	83.0	80.6	0.86
年齢 (歳)	54.7±8.7	54.2±8.7	53.7±9.1	0.28
BMI (kg/m ²)	22.9±2.9	23.2±2.8	22.7±3.0	0.13
収縮期血圧 (mmHg)	126.0±18.4	124.8±19.0	122.0±18.8	0.026
拡張期血圧 (mmHg)	78.0±11.7	77.7±12.0	77.1±13.1	0.46
脈圧 (mmHg)	48.0±13.3	47.1±13.0	44.9±10.9	0.0089
中性脂肪 (mg/dl)	131.1±104.6	126.3±96.8	119.0±88.1	0.12
総コレステロール (mg/dl)	201.4±32.1	199.5±33.1	197.2±32.9	0.24
空腹時血糖 (mg/dl)	103.7±18.9	102.3±17.6	101.3±15.0	0.25

表2 GNB3 遺伝子多型別の代謝性疾患の頻度

	TT (n=215)	TC (n=359)	CC (n=232)	p
肥満	25.6	29.5	23.7	0.21
高血圧	35.3	33.4	30.2	0.28
高中性脂肪	46.0	39.0	34.5	0.060
糖尿病	6.5	5.6	4.3	0.36
代謝性疾患なし	30.7	32.6	40.1	0.026

D. 考察

本研究結果から、GNB3 C825T 多型が収縮期血圧と脈圧とに相関することが示された。従来、Tアレルが血圧に対してリスク因子であるとされてきたが、本研究でも同様の成績が得られた。また、Tアレルはインスリン抵抗性や動脈硬化のリスクであることも報告されており、遺伝子多型と血圧との相関には、動脈硬化を介した機序が内在すると推察された。一方、脈圧も動脈硬化の指標となることが知られている。Tアレルで脈圧が高値であったことも、動脈硬化の関与を示唆するものといえよう。

一方、GNB3 遺伝子多型と各代謝異常性疾患とは、いずれも有意差は認められなかった。欧米での成績に反し、日本人を対象とした既報では、い

遺伝子多型間で有意差が認められた。これは、一般線形分析において、性別と年齢を調整した上でも同様であった (SBP; p=0.050, PP; p=0.0089)。

表2には、遺伝子多型別に各代謝異常性疾患の頻度を示した。遺伝子多型に加え、優性モデル/劣性モデルを含めて検討した結果でも、遺伝子多型と各疾患とに有意な関連は認められなかった。しかし、いずれの疾患も有さない対象では、遺伝子多型頻度に有意な偏りがみられ、これは年齢と性別を調整した上でも同様であった。

ずれも有意な成績は得られていない。日本人と白人との遺伝的背景や環境因子の相違が影響しているものと考えられた。しかし、今回検討したいずれの疾患においても、Tアレルキャリアの頻度が高い傾向が見受けられた。よりサンプルサイズを増加し、統計学的パワーを増やせば、遺伝子多型と疾患との関連が明示されるかもしれない。またGタンパク質 (GNB3) を介した生物学的なパスウェイの下流にある遺伝子との相互作用も、今後検討していく必要があるであろう。

E. 結論

GNB3 遺伝子 C825T 多型では、Tアレルがリスク因子となり、高血圧および代謝異常性疾患の集積と相関することが示された。

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.

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-SHIP 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（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

予防医療診療実現に向けた高血圧感受性遺伝子の探索

分担研究者 近藤 郁子 愛媛大学医学部環境社会医学講座教授

研究要旨

予防医療診療実現に向け、特に遺伝-環境相互作用に着目して、DBH 遺伝子 C-1021T 多型と高血圧との関連を検討した。その結果、高血圧/血圧上昇に対し、遺伝子多型の直接効果は認められなかった。しかし、空腹時血糖と DBH 遺伝子多型との交互作用は、種々の交絡因子を調整した上でも、高血圧に対して有意な説明変数となった。本研究成果は、疾患感受性遺伝子を検討する上で、環境因子を的確に加味する必要性を示すものであり、テーラーメイド医療実現への大きな布石となることが期待される。

A. 研究目的

高血圧は、脳卒中や心筋梗塞などの循環器系疾患の発症に対して最大の危険因子となる。社会の高齢化が急速に進んでいる我が国において、高齢者の QOL を維持し、また医療経済を健全化する上でも、血圧のコントロールは最も身近な課題であるともいえよう。

高血圧の成因には、喫煙や飲酒、運動不足などの生活習慣が大きく関与している。同時に、個人の遺伝的背景も関与しており、すでに幾つかの感受性遺伝子が報告されている。しかし、最近になって、個々の遺伝子の寄与率が比較的小さいことが明らかとなってきた。そのため、変動性の大きい血圧値と、寄与率の小さい遺伝因子との相関を検討するには、より大きなサンプルサイズを必要とするようになってきた。

その一方で、高血圧は多因子疾患であることから、環境因子との交絡効果も無視できない。すなわち、関連する因子のベクトルが揃った状況下において、はじめて疾患発症と遺伝因子との相関が顕在化することも視野に入れて解析する必要がある。しかし、従来の疾患感受性遺伝子解析では、このような交絡効果が十分に加味されてきたとは言いがたい。そのため、特に多因子疾患について遺伝的背景に基づいた予防医療診療を実現するには、遺伝因子の直接効果のみならず、環境因子との交絡効果についても十分に把握しておく必要がある。

そこで本研究では、ドーパミンβ水酸化酵素遺伝子 (DBH) を取り上げ、その高血圧感受性について、環境因子との交絡を踏まえて検討した。DBH は、ドーパミンをノルエピネフリンに変換する酵

素であり、交感神経活性と関連して血圧上昇に関与すると考えられている。本態性高血圧患者では血中 DBH 濃度が上昇していること、DBH を阻害すると容量依存的に血圧を低下させること、あるいは先天的な DBH 欠損者では顕著な低血圧を呈することなども、DBH 遺伝子の高血圧感受性を示唆する成績といえよう。

DBH の血中濃度を規定する因子として、DBH 遺伝子のプロモーター領域にある C-1021T 多型が知られている。この多型は、血中 DBH 濃度の 35~52% を規定することが示されていることから、血中濃度を介して血圧上昇に関与する有力な感受性遺伝子多型であるといえる。しかし、この多型と血圧との相関を検討した例は見あたらない。そこで本研究では、DBH 遺伝子の C-1021T 多型と血圧との関連について、環境因子との交絡も踏まえて検討した。

B. 研究方法

対象は、愛媛県下の一般企業従業員から収集した。このうち、本研究に同意の得られた 2245 例を解析対象とした。対象者の臨床情報（血圧および血液生化学検査値）は、企業検診時のものを利用した。同時に、兵庫県下の一般病院における人間ドック受診者からも協力を得た。このうち、本研究の趣旨に同意の得られた 822 例を解析対象とした。対象者の血圧および血液生化学検査値、生活習慣等については、人間ドック受診時の検査値を利用した。

対象者の DNA は、末梢血より定法に則って抽出した。抽出した DNA は、DOP-PCR 法により増幅してから分析に供した。DBH 遺伝子 C-1021T 多型の

解析は、TaqMan プローブ法により行った。用いたプライマー/プローブの配列を以下に示す。

Probe1 FAM-CTCTCCCACAAGTAGA-MGB
 Probe2 VIC-CTCCCGCAAGTAGA-MGB
 Primer1 GGATCAAGCAGAATGTCCTGAAG
 Primer2 GGCACCTCTCCCTCCTGTG

対象者は、以下の基準に従って分類し、統計解析に供した。

- 1) 高血圧 SBP 140 mmHg 以上 かつ/または
 DBP 90 mmHg 以上 かつ/または
 降圧薬服用
 2) 正常血圧 SBP 140 mmHg 未満 かつ

DBP 90 mmHg 未満 かつ
 降圧薬非服用

- 3) 耐糖能以上 空腹時血糖 110 mg/dl 以上
 4) 糖尿病 空腹時血糖 126 mg/dl 以上

(倫理面への配慮)

本研究は、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承認を得ている。対象者には、事前に十分な主旨説明を行い、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 対象者の臨床背景

	集団1		集団2	
	正常血圧 (n=547)	高血圧 (n=275)	正常血圧 (n=1366)	高血圧 (n=879)
性別(男性%)	78.8	89.1	85.1	90.3
年齢(歳)	52.7±8.6	57.3±8.5	50.6±7.8	53.9±6.3
BMI (kg/m ²)	22.6±2.8	23.8±2.9	22.6±2.8	24.1±3.1
収縮期血圧(mmHg)	112.6±10.7	143.2±17.4	122.8±10.7	148.7±12.9
拡張期血圧(mmHg)	72.0±9.1	89.1±9.9	72.5±7.2	87.3±8.4
総コレステロール(mg/dl)	198.0±30.6	202.4±37.2	195.1±31.6	203.5±31.1
HDL コレステロール(mg/dl)	54.2±14.5	51.9±14.0	60.7±13.4	60.7±13.1
中性脂肪(mg/dl)	116.7±81.7	150.9±127.7	125.3±74.0	155.6±84.6
空腹時血糖(mg/dl)	101.2±17.3	106.0±19.2	102.6±22.2	108.3±30.9

表2 高血圧/正常血圧群での DBH 遺伝子多型頻度

		正常血圧	高血圧	P 値	オッズ比 (95%信頼区間)	
集団1	CC (%)	378 (69.1)	184 (66.9)	0.52	0.90	0.66-1.23
	CT (%)	153 (28.0)	86 (31.3)			
	TT (%)	16 (2.9)	5 (1.8)			
	C (%)	907 (83.1)	454 (82.5)	0.78	0.96	0.73-1.26
	T (%)	185 (16.9)	96 (17.5)			
	集団2	CC (%)	935 (68.4)	614 (69.9)	0.69	1.12
CT (%)		398 (29.1)	246 (28.0)			
TT (%)		33 (2.4)	19 (2.2)			
C (%)		2268 (83.0)	1474 (83.8)	0.47	1.06	0.90-1.25
T (%)		464 (17.0)	284 (16.2)			

C. 研究結果

対象者の臨床背景を表1に、遺伝子多型の分布を表2に示した。TT型の頻度が極端に低いため、

C優性モデルについて解析を行ったが、有意差は認められなかった。アレル頻度での比較でも有意差は認められなかった(表2)

そこで次に、遺伝子多型と環境因子との交互作用について検討した。その結果（表3）、集団1においては、遺伝子多型と血糖値との交互作用が、年齢、性別、BMI、総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪を共変量として調整した上でも、高血圧に対して有意な説明変数であった（ $p=0.031$ ）。CC多型では、血糖値の増加に対して、高血圧頻度の増加がより顕著であった。そ

他の環境因子（性別、年齢、BMI、総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪）と遺伝子多型とは交互作用を認めなかった。一方、集団2では、統計学的には有意でないものの、同様の傾向を示した。2集団をまとめた解析では、共変量を調整した上でも、交互作用項は有意な説明変数であった。

表3 高血圧に対する空腹時血糖と DBH 遺伝子多型との交互作用

		回帰係数	定数	p 値	オッズ比	95%信頼区間	p 値 (交互作用)
集団 1	CC	3.12	-15.14	5.4×10^{-6}	22.59	5.90-86.55	0.0086
	CT+TT	0.20	-1.53	0.82	1.22	0.22-6.78	
集団 2	CC	1.43	-7.15	0.00064	4.16	1.84-9.44	0.27
	CT+TT	-4.00	17.32	0.41	0.018	1.3×10^{-6} -252.61	
集団 1 + 2	CC	1.95	-9.63	5.8×10^{-8}	7.00	3.47-14.13	0.030
	CT+TT	-0.044	-0.44	0.96	0.96	0.18-5.02	

同様に血圧値に対する DBH 遺伝子多型と血糖値との交互作用について検討した（表4）。その結果、集団1と2を併せた解析において、拡張期血圧に対して遺伝子多型と血糖値との交互作用は有意な相関を示した。これは、性別、年齢、BMI、

総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪を調整した上でも同様の結果であった（ $p=0.0060$ ）。一方、収縮期血圧については、同様の傾向を示したものの、有意差を示すには至らなかった。

表4 血圧値に対する DBH 遺伝子多型と空腹時血糖との交互作用

		回帰係数	定数	p 値	p 値 (交互作用)	
SBP	集団 1 (822)	CC (562)	12.1	23.5	0.00016	0.057
		CT+TT (260)	2.9	106.7	0.75	
	集団 2 (2245)	CC (1549)	13.3	65.3	0.00015	0.44
		CT+TT (696)	-1.4	138.5	0.95	
Total (3067)	CC (2111)	16.7	47.3	0.0016	0.094	
	CT+TT (956)	3.7	103.3	0.66		
DBP	集団 1 (822)	CC (562)	11.8	22.1	0.0034	0.045
		CT+TT (260)	-3.1	91.0	0.65	
	集団 2 (2245)	CC (1549)	9.5	31.5	2.8×10^{-5}	0.22
		CT+TT (696)	-5.3	102.6	0.66	
Total (3067)	CC (2111)	20.3	28.3	0.0030	0.015	
	CT+TT (956)	-3.2	91.7	0.60		

D. 考察

本研究成果から、DBH 遺伝子 C-1021T 多型とが、空腹時血糖との交互作用をもって血圧上昇に関与していることが示された。

本研究成果において、遺伝子多型と高血圧者頻度との相関は、空腹時血糖の影響を加味することでより明確化された。このことは、第一に、生活習慣病の遺伝的背景を考える上で、環境因子を的

確に加味することが必須であることを示すものである。この点において、本成績は、これからの遺伝疫学研究において、重要な示唆を提示するものといえよう。

第二に、本成果は、将来的にテーラーメイド医療に貢献することが期待される。高血圧に対する遺伝子多型と空腹時血糖との交互作用は、血糖値のコントロールや肥満の解消などの効果にも遺伝的差異があることを示唆するものであり、適切

な治療方法の選択に大きく寄与するものといえよう。さらに、遺伝子多型ごとの異なった生活指導や予防活動が、従来の画一的なそれより効果的であることは明白であり、この点で本成果は、予防医療の確立・実現にも大きく貢献しうることが期待される。

反面、本研究で提示したような遺伝-環境交互作用は、DBH-空腹時血糖に限らない。高血圧だけをとり、肥満や喫煙、栄養素、運動など多くの環境因子が関与することは明白であり、ヒトゲノムとの多様な組み合わせが推察される。今後は、これら多様な遺伝-環境、あるいは遺伝-遺伝交互作用についてより詳細に検討し、疫学的にそのパワーを立証していくことが必要となる。

E. 結論

DBH 遺伝子 C-1021T 多型は、血糖のコントロール不良を介し、高血圧/血圧上昇と相関することが明らかとなった。

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
- 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
- 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

研究成果の刊行に関する一覧表

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, 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
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
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
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

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 ²)	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
FFPG (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	49.3±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; FFPG, fasting plasma glucose; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, γ -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.

cohol consumption in the pathogenesis of hypertension (6, 7). Taken together, these results indicate that the T393C polymorphism is likely to interact with β -AR stimulation in the pathogenesis of hypertension. Although this interaction could 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. However, we were unable to assess these two possibilities in the population previously analyzed due to a lack of information on glucose metabolism. In this regard, information on glucose metabolism as well as a well-established biomarker of alcohol consumption, γ -glutamyl transpeptidase (GGT) (β -7), was available in another population. Moreover, association studies are often irreproducible. We therefore examined the possible interaction between the T393C polymorphism and GGT in the association with glucose metabolism as well as with hypertension.

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

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 β -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 β -adrenergic (β -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 γ -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 ($p=0.039$). This interaction was even more significant after adjustment for all confounding factors ($p=0.0028$). 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 β -adrenergic (β -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 α -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 β -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 791-0293, Japan. E-mail: nakura@ehime-u.ac.jp

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

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 and 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 (72). Subjects were considered to have diabetes mellitus if their fasting plasma glucose (FFPG) concentration was ≥ 126 mg/dl.

DNA Analysis

Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the GNAS1 T393C polymorphism (5). The sense oligonucleotide primer was 5'-CTCTTAAGTACACATGGTGCAGAA-3' and the antisense primer was 5'-TAAGGCCACACAAAGTCGGGT-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 FFPG, 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.

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

Genotype	Genotype frequency		p value*	OR*	95% CI*
	Normotensive (n=354)	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.

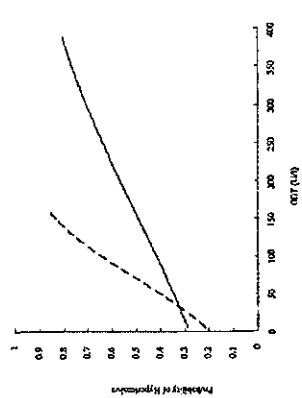


Fig. 1. Genotypic variations in the positive relationship between GGT and the probability of having hypertension. The solid line indicates the TT and TC genotypes; the dotted line indicates the CC genotype. The regression between GGT and the probability of having hypertension in T carriers was represented by the equation, $Y = \exp(0.006X - 0.946)/[1 + \exp(0.006X - 0.946)]$. The equation was $Y = \exp(0.020X - 1.450)/[1 + \exp(0.020X - 1.450)]$ in CC homozygotes. CC homozygotes show a steeper slope than T carriers ($p = 0.033$; after adjustment for all confounding factors, $p = 0.0025$).

Results

Association of GNAS1 T393C Polymorphism with Hypertension

A total of 821 Japanese individuals from the Hyogo region were categorized as hypertensive or normotensive and genotyped for the T393C polymorphism (Table 2). The frequencies in both hypertensive and normotensive subjects were in Hardy-Weinberg equilibrium. Statistical analysis failed to show a significant difference in the frequencies of the alleles ($p = 0.954$) and genotypes ($p = 0.849$ for TT+TC vs. CC) between the hypertensive and normotensive subjects (Table

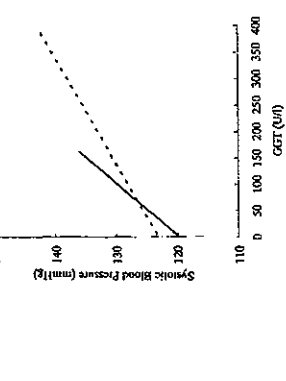


Fig. 2. Genotype-specific regression slopes of blood pressure on GGT. The solid line indicates the TT and TC genotypes; the dotted line indicates the CC genotype. a: The regression between GGT and SBP in T carriers was represented by the equation, $Y = 0.101X + 119.6$. The equation was $Y = 0.049X + 123.0$ 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, $Y = 0.034X + 74.1$. 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, $p = 0.0027$).

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

Phenotype	Genotype (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, γ -glutamyl transpeptidase; FPG, fasting plasma glucose; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

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 β -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 cigarette smoking, alcohol consumption, and GGT in the association with hypertension may each indicate the presence of an interaction between the T393C polymorphism and β -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 β -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-environment 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 β -AR stimulation might have resulted in failure to show a significant association between the T393C polymorphism and hypertension, although the extent of β -AR stimulation is difficult to estimate.

The precise mechanism of the interaction between the T393C polymorphism and β -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 β -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 α -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 α -subunit of Gs proteins. In this context, it is noteworthy that CC individuals 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 β -AR stimulation is the association with hypertension is that, depending on the genotype, β -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 β -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, HbA1c, 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 β -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 β -AR-Gs protein system may be helpful to improve understanding of the relation between the β -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, Wanka Y, et al: Deficient activity of stimulatory nucleotide-binding regulatory protein in lymphocytes from patients with essential hypertension. *Air J Hypertens* 1994; 7: 713-716.
- Feldman RD, Tan CM, Chonayzewski J: G protein alterations in hypertension and aging. *Hypertension* 1995; 26: 725-732.
- Jin H, Hingorani AD, Sharma P, et al: Association of the G β 1 gene with essential hypertension and response to beta-blockade. *Hypertension* 1998; 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 J, 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; 1: 1249-1251.
- Papoz L, Warner JM, Piquignat G, Eschwege E, Claude JK, Schwarz D: Alcohol consumption in a healthy population: relationship to gamma-glutamyl transaminase activity and mean corpuscular volume. *JAMA* 1981; 245: 1748-1751.
- Burke V, Puddey IB, Beilin LJ, Vandongen R, Mensari JR: Changes in markers of alcohol intake in men below 'safe' drinking levels. *Alcohol Alcohol* 1992; 27: 677-683.
- Yersin B, Nicolet JF, Decrey H, Burnier M, van Melte G, Pecoud A: Screening for excessive alcohol drinking: comparative value of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransaminase, and mean corpuscular volume. *Arch Intern Med* 1995; 155: 1907-1911.
- Alberici KG, Zimmer EZ: 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.
- Coyer PE, Haymond MW, Santiago JV, Shah SD: Noradrenergic 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.