

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15年度～17年度 総合研究報告書  
平成18（2006）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）

田原康玄（愛媛大学医学部統合医科学講座）

## 目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表

----17

III. 研究成果の刊行物・別刷

----18

## 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、循環器病・糖尿病を中心に、予防医療診療に向けた疾患感受性遺伝子解析を行うと共に、レトロスペクティブに候補遺伝子の薬剤応答性についても検討した。HMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン）の血中脂質低下作用に対する肝有機アニオントランスポーターOATP-C遺伝子多型の影響を検討したところ、OATP-C遺伝子V174A多型と脂質低下量とに有意な相関が認められ、アラニン型では脂質低下作用が減弱していた。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ところ、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。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を検討したところ、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。コレステリルエステル転送蛋白（CETP）遺伝子のInt14GA、D442G多型と血中HDLコレステロールならびに動脈硬化性疾患マーカーとの関連を検討したところ、両多型はいずれもHDLコレステロール量と有意に相関したが、各種動脈硬化性疾患マーカーとの関連は認められなかった。抗結核薬イソニアジド等のarylamineやhydrazine系薬剤の代謝に影響するHepatic arylamine N-acetyltransferase（NAT）遺伝子多型について、日本人における頻度を検討したところ、代謝速度が遅く副作用の危険性が高い変異型のホモ接合体が、日本人一般地域住民において11.6%認められた。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。

## 分担研究者

近藤郁子 愛媛大学医学部衛生学講座・教授

田原康玄 愛媛大学医学部統合医科学講座・講師

## 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。

他方、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。

このような生活習慣病あるいはメタボリックシンドロームの発症要因のうち、4～6割を占めると考えられている遺伝要因については、近年、その探索・基盤整備において目覚ましい進歩を遂げた。しかし、これら疾患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。候補遺伝子としては、Gタンパク質β3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。

上記の検討に加えて、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である。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。

このように、メタボリックシンドロームや個々の関連疾患について、その成因の遺伝的背景を検討することは、将来の個別化医療に対して重要な知見を与えるが、同時に治療効果や薬剤応答性に関する検討も必要である。生活習慣病の治療は、食習慣や運動習慣などのライフスタイルの改善が第一義である。しかし、効果が不十分な場合や、コンプライアンスが悪い場合などは、薬剤による治療を併用する。高脂血症の薬物治療は、HMG-CoA還元酵素阻害(スタチン)が主流であり、*Penicillium citrinum*から抽出されたプラバスタチン(メバロチン)を皮切りに、現在では第3世代にあたるアトルバスタチン(リピトール)やピタバスタチン(リバロ)も用いられている。

なかでもプラバスタチンは、高脂血症治療薬として、最も高頻度で使用されているスタチン系薬剤である。プラバスタチンは腸管より吸収され、肝臓への取り込みには、肝有機アニオントランスポーターOATP-C(organic anion transporting polypeptide C)を介する。近年OATP-C遺伝子に、いくつかの一塩基対多型(SNP; Single Nucleotide Polymorphism)が報告された。機能との関連をin vitroでみた成績では、T217C(OATPC\*2)、T521C(OATP-C\*5)、T1058C(OATP-C\*6)、G1463C(OATP-C\*9)、A1964G(OATP-C\*10)多型とに相関が認められている。さらに、プラバスタチン投与後の血中濃度をヒトで評価した成績では、同様にT521C多型で有意差を認めた。反面、T521C(OATP-C\*5)多型が機能とは無関係であるとの報告もあり、明確な結論は得られていない。

そこで本研究では、スタチン系薬剤の血中コレステロール量に対する影響とOATP-C遺伝子V174A(T521C)多型(rs4149056)との関連を、一般地域住民を対象に検討した。テーラーメイド医療の実現において、薬剤感受性/応答性は主要なテーマである。個人ごとに効果的かつ副作用の少ない薬剤を選択可能にすることは、治療効果の観点から、あるいは医療経済学的にも急務の課題である。

同様の観点から、本研究では、arylamineやhydrazine系薬剤の代謝において重要な酵素であるHepatic arylamine N-acetyltransferase(NAT)の遺伝子多型についても検討した。NATには2つのアイソフォーム(NAT1/NAT2)があり、このうちNAT2にはアセチル化の速度に影響しうる多型が存在する(表1)。野生型(4型)に比して変異型ではアセチル化の速度が遅く、変異型の種類は日本人では3種類(5型、6型、7型)、日本人以外の人種では14種類が報告されている。また、変異型の頻度にも人種特異性があり、白人では約50%程度、日本人では10%程度が変異型とされている。

表1 ヒト NAT2 遺伝子多型の種類

| NAT2 allele | Nucleotide change(s)                                       | Amino acid change(s)                               |
|-------------|--|--|
| NAT2*4      | None   | None   |
| NAT2*5A     | T <sup>311</sup> C, C <sup>481</sup> T                     | Ile <sup>114</sup> → Thr                           |
| NAT2*5B     | T <sup>311</sup> C, C <sup>481</sup> T, A <sup>803</sup> G | Ile <sup>114</sup> → Thr, Lys <sup>268</sup> → Arg |
| NAT2*5C     | T <sup>311</sup> C, A <sup>803</sup> G                     | Ile <sup>114</sup> → Thr, Lys <sup>268</sup> → Arg |
| NAT2*6A     | C <sup>282</sup> T, G <sup>581</sup> A                     | Arg <sup>137</sup> → Gln                           |
| NAT2*6B     | G <sup>581</sup> A   | Arg <sup>137</sup> → Gln                           |
| NAT2*7A     | G <sup>857</sup> A   | Gly <sup>286</sup> → Arg                           |
| NAT2*7B     | C <sup>282</sup> T, G <sup>557</sup> A                     | Gly <sup>286</sup> → Arg                           |
| NAT2*12A    | A <sup>803</sup> G   | Lys <sup>268</sup> → Arg                           |
| NAT2*12B    | C <sup>282</sup> T, A <sup>803</sup> G                     | Lys <sup>268</sup> → Arg                           |
| NAT2*13     | C <sup>282</sup> T   | None   |
| NAT2*14A    | G <sup>181</sup> A   | Arg <sup>61</sup> → Gln                            |
| NAT2*14B    | G <sup>181</sup> A, C <sup>282</sup> T                     | Arg <sup>61</sup> → Gln                            |
| NAT2*17     | A <sup>434</sup> C   | Glu <sup>145</sup> → Pro                           |
| NAT2*18     | A <sup>845</sup> C   | Lys <sup>282</sup> → Thr                           |

Doll MA, Anal biochem, 2005 より引用。

この NAT2 遺伝子は、抗結核薬であるイソニアジドの代謝にも関与している。イソニアジドは、1950 年代後半より広く使用されてきたが、一部の対象において重篤な副作用が認められている。NAT2 の多型が副作用の責任多型であることが知られているが、日本人大規模集団を対象に、その頻度を検討した例は見あたらない。

そこで本研究では、イソニアジドによる個別化医療の実現に資することを目的に、大規模な一般地域住民を対象に NAT2 遺伝子多型の頻度を明らかにし、

生活習慣病やメタボリックシンドロームは、その発症要因や頻度から多因子疾患であることは間違いない。しかし、家族性高 HDL 血症のように、単一遺伝子の多型(変異)が関与している場合もある。なかでも、コレステリルエステル転送蛋白(CETP)遺伝子の Int14GA、D442G 多型は、血中の高 HDL 血症の原因遺伝子のひとつとして良く知られている。CETP は、血管壁などの末梢組織から肝へコレステロールを逆転送して、処理・排泄に働くタンパク質である。具体的には、HDL 内の余剰コレステリルエステルが CETP を介して apoB 含有リポ蛋白(LDL, VLDL)に転送され、LDL レセプターを介して肝細胞に取りこまれる。日系アメリカ人を対象とした検討では、Int14GA、D442G いずれかの変異型が 5~6%の頻度で認められ、有意に高い HDL コレステロール濃度を示すことが報告されている。また変異型保有者では、HDL コレステロール量が高いにもかかわらず、冠動脈疾患の有病率が高いことも報告されている。

そこで本研究では、この CETP 遺伝子多型と血中 HDL コレステロール量ならびに各種動脈硬化性疾患マーカーとの関連を、一般地域住民を対象に検討し、当該遺伝子多型のリスク評価を行った。

これら一連の検討を通じ、国民的疾患である高

血圧や糖尿病、あるいはその集積であるメタボリックシンドロームの発症や治療・予防の遺伝的背景を総合的に明らかにし、未来型医療の実現および医療経済の適正化に先鞭を付けることを目的とした。

## B. 研究方法

GNB3 遺伝子多型ならびに DBH 遺伝子多型に関する検討は、愛媛県下の A 一般企業従業員を対象として行った。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。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- ATCACGTCTGTGGCC -MGB  
 Probe2 VIC- CACGTCCGTGGCC -MGB  
 Primer1 GGCAGACCAGGAGCTGATCT  
 Primer2 TCGTCGTAGCCAGCGAATAGT

### DBH 遺伝子 C-1021T 多型

Probe1 FAM-CTCTCCCACAAGTAGA-MGB  
 Probe2 VIC-CTCCCACAAGTAGA-MGB  
 Primer1 GGATCAAGCAGAATGTCCTGAAG  
 Primer2 GGCACCTCTCCCTCCTGTC

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/m<sup>2</sup> 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

HMG-CoA 還元酵素阻害薬の応答性に関する検討では、愛媛県下でコホート設定している B 町を対象地区とした。同町の住民健診、あるいは町立病院を通じて、本研究に同意の得られた 3071 例を調査対象とした。このうち、平成 15 年 7 月 1 日から 8 月 28 日まで、同町立病院でスタチン系

高脂血症薬が処方された 101 例について追跡調査した。追跡調査は町立病院の診療録に基づいた。スタチン系薬剤の服薬時期を特定し、その前後での総コレステロール、HDL-コレステロール、および中性脂肪の検査値を転記した。追跡対象 101 例のうち、投薬前後での検査値が得られた 66 例を解析対象とした。

対象者の高分子量 DNA は末梢血由来白血球より抽出した。全ての DNA は、その一部を DOP-PCR 法で 200 倍に増幅し、多型解析に供した。OATP-C 遺伝子 V174A (T521C) 多型 (rs4149056) 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。

#### OATPC 遺伝子 T521C 多型

Probe1 FAM- CCCATGAACACATATAT-MGB  
 Probe2 VIC- CCATGAACGCATATAT -MGB  
 Primer1 AGGTTGTTTAAAGGAATCTGGGTCATAC  
 Primer2 CTCCTTATTCCACGAAGCATATT

CETP 遺伝子多型ならびに NAT2 遺伝子多型に関する検討は、同様に B 町住民を対象に行った。血中 HDL コレステロール量ならびに一般検査項目は、住民健診の成績を利用した。加えて、高感度 CRP やアディポネクチンなどの動脈硬化性マーカーを、末梢血を用いて独自に測定した。対象の一部においては、脈波伝搬速度 (PWV) や頸動脈内中膜複合体厚 (IMT) の測定を行い、CETP 遺伝子多型との関連を検討した。

CETP 遺伝子の Int14GA、D442G 多型は、同様に TaqMan プローブ法で解析した。用いたプライマー/プローブの配列を以下に示す。なお、D442G 多型はアプライドバイオシステムズ社の Assay-on-demand にて既製のプライマー/プローブセットを購入して解析に供した (C\_790072\_1)。

#### CETP 遺伝子 Int14GA 多型

Probe1 FAM- CATGTCTCGTAAGTGTG-MGB  
 Probe2 VIC- TCATGTCTCATAAGTGTG -MGB  
 Primer1 CTGTGGGCATCCCTGAGG  
 Primer2 CCTCGGCACCCAGTTTCC

解析した NAT2 遺伝子多型を表 2 に示した。これらの多型の解析は、TaqMan プローブ法で行った。rs1801280 多型の解析に用いたプライマー/プローブの配列を以下に示す。

#### NAT2 遺伝子 rs1801280 多型

Probe1 FAM- CGTCAGTGGTCACC -MGB  
 Probe2 VIC- CCGTCAATGGTCACC -MGB  
 Primer1 ACTGGCATGGTTCACCTTCTC  
 Primer2 CCCAGCATCGACAATGTAATTCCT

表 2 解析した NAT2 遺伝子多型

| Rs 番号     | 置換    |           | 遺伝子型 |
|-----------|-------|-----------|------|
|           | 塩基    | アミノ酸      |      |
| rs1799930 | 590GA | Arg197Gln | *6   |
| rs1799931 | 857GA | Gly286Arg | *7   |
| rs1041983 | 282CT | -         | *13  |
| rs1801280 | 341TC | Ile114Thr | *5   |

上記以外の rs1799930, rs1799931, rs1041983 多型については、アプライドバイオシステムズ社の Assay-on-demand にて既製のプライマー/プローブセットを購入して解析に供した (C\_1204091\_10, C\_572770\_10, C\_8684085\_10)。

遺伝子多型の解析においては、事前に高速かつ安価にタイピング可能なシステムを構築した。本システムは、TaqMan プローブ法によるもので、通常の作業では、1 日あたり 12,000 タイピングが可能である。1 タイピングに必要な DNA 量は約 1 ng、単価は約 40 円と、現在の技術レベルを鑑みると、極めて高い水準にあるといえる。なお、本システムに用いた機器は以下の通りである。

- 試料ハンドリング  
 ベックマン・コールター社製  
 Biomeck FX (96 連チップ) × 1 台  
 Biomeck 2000 (8 連チップ) × 1 台
- PCR  
 アプライド・バイオシステムズ社製  
 GeneAmp9700 (384 well 2 枚) × 10 台  
 GeneAmp9700 (96 well 1 枚) × 6 台
- 検出  
 アプライド・バイオシステムズ社製  
 ABI Prism 7900HT × 1 台

#### (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、研究課題名「生活習慣病と動脈硬化性疾患の発症要因の探索」、「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

#### 【代謝性疾患感受性遺伝子解析】

表3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3 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 <sup>2</sup> ) | 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4 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 |

#### 【高血圧感受性遺伝子解析】

対象者の臨床背景を表5に、遺伝子多型の分布を表6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6)

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7)、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

表4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。

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8)。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5 対象者の臨床背景

|                         | 集団1             |                | 集団2              |                |
|-------------------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|
|                         | 正常血圧<br>(n=547) | 高血圧<br>(n=275) | 正常血圧<br>(n=1366) | 高血圧<br>(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 <sup>2</sup> ) | 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6 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7 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 | 5.4x10 <sup>-6</sup> | 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 | 1.3x10 <sup>-6</sup> -252.61 |           |
| 集団1+2 | CC    | 1.95   | -9.63  | 5.8x10 <sup>-8</sup> | 7.00  | 3.47-14.13                   | 0.030     |
|       | CT+TT | -0.044 | -0.44  | 0.96                 | 0.96  | 0.18-5.02                    |           |



表 8 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              |            |
|     |              | CT+TT (260) | 2.9  | 106.7 | 0.75                 | 0.057      |
|     | 集団 2 (2245)  | CC (1549)   | 13.3 | 65.3  | 0.00015              |            |
|     |              | CT+TT (696) | -1.4 | 138.5 | 0.95                 | 0.44       |
|     | Total (3067) | CC (2111)   | 16.7 | 47.3  | 0.0016               |            |
|     |              | CT+TT (956) | 3.7  | 103.3 | 0.66                 | 0.094      |
| DBP | 集団 1 (822)   | CC (562)    | 11.8 | 22.1  | 0.0034               |            |
|     |              | CT+TT (260) | -3.1 | 91.0  | 0.65                 | 0.045      |
|     | 集団 2 (2245)  | CC (1549)   | 9.5  | 31.5  | 2.8X10 <sup>-5</sup> |            |
|     |              | CT+TT (696) | -5.3 | 102.6 | 0.66                 | 0.22       |
|     | Total (3067) | CC (2111)   | 20.3 | 28.3  | 0.0030               |            |
|     |              | CT+TT (956) | -3.2 | 91.7  | 0.60                 | 0.015      |

【薬剤応答性遺伝子解析】

HMG-CoA 還元酵素阻害薬の応答性に関する検討において、対象者の平均年齢は 70.4±8.4 歳 (男性 17 人/女性 49 人)、平均 BMI は 23.7±2.6 kg/m<sup>2</sup> であった。服用していたスタチン系薬剤の内訳は、プラバスタチン 22 例、アトルバスタチン 11 例、シンバスタチン 33 例であった。解析した OATP-C 遺伝子 V174A 多型の頻度は、遺伝子型が決定できなかった 2 例を除き、VV 型 44 例 (66.7%)、VA 型 20 例 (30.3%)、AA 型 0 例であった。

スタチン服薬前後で総コレステロール、LDL コレステロール、および中性脂肪は有意に低下していた。しかし、HDL コレステロールは、服薬前後での変化は認められなかった。スタチン系薬剤による脂質低下作用について、薬剤間での相違を検討した。その結果、いずれも薬剤間で有意な差は認められなかった。しかし、スタチン系薬剤の脂質低下作用は OATP-C 遺伝子多型で有意に異なっており、A アレルでは V アレルに比し、効果が減弱していた。

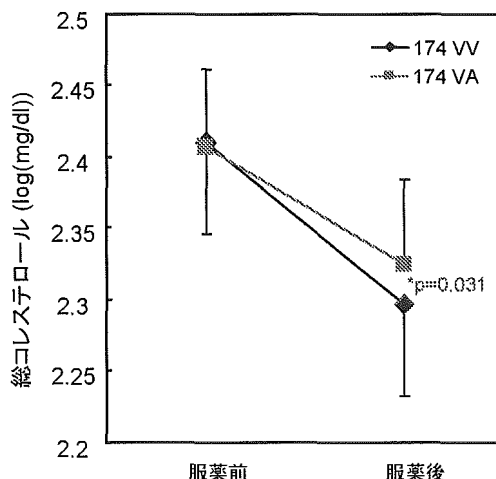


図 1 スタチン系薬剤による脂質低下作用と OATP-C 遺伝子多型

NAT2 遺伝子上で、解析した 4 つの遺伝子多型の頻度を表 9 に示した。このうちいずれの多型にも変異型をもたない野生型は 43.6%、ヘテロ接合体 (4\*5, 4\*6A, 4\*6B, 4\*7B) は 44.7%、変異型のホモ接合体は 11.6% であった (表 10)。この頻度は、性別や年齢階層に依らず一定であった。

表 9 NAT2 遺伝子多型の頻度

|           | 野生型            | ヘテロ            | 変異型           |
|-----------|----------------|----------------|---------------|
| rs1799930 | 1884<br>(62.2) | 1002<br>(33.1) | 142<br>(4.7)  |
| rs1799931 | 2386<br>(78.4) | 613<br>(20.1)  | 45<br>(1.5)   |
| rs1041983 | 1381<br>(45.4) | 1341<br>(44.1) | 322<br>(10.6) |
| rs1801280 | 2945<br>(97.6) | 71<br>(2.4)    | 2<br>(0.1)    |

表 10 NAT2 遺伝子多型の頻度

| 遺伝子型 | 人数    | 頻度          |
|------|-------|-------------|
| 野生型  | 4*4   | 1292 (43.6) |
| ヘテロ  | 4*5   | 47 (1.6)    |
|      | 4*6A  | 828 (27.9)  |
|      | 4*6B  | 1 (0.0)     |
|      | 4*7B  | 452 (15.2)  |
| 変異型  | 5*5   | 2 (0.1)     |
|      | 5*6A  | 10 (0.3)    |
|      | 5*7B  | 12 (0.4)    |
|      | 6A*6A | 142 (4.8)   |
|      | 6A*7B | 135 (4.6)   |
|      | 7A*7B | 1 (0.0)     |
|      | 7B*7B | 43 (1.5)    |

【CETP 遺伝子多型解析】

CETP 遺伝子 Int14GA 多型、ならびに D442G 多型の頻度を表 11 に示した。日系アメリカ人を対象とした検討では、Int14GA 多型では GA 型が 0.49%、D442G 多型では DG 型が 4.9%、GG 型が 0.17%と報告されており、本研究の成果と同程度であった。

表 11 CETP 遺伝子多型の頻度

| Int14GA 多型 |        |         |
|------------|--------|---------|
| GA         | 22 人   | (0.8%)  |
| GG         | 2851 人 | (99.2%) |
| D442G 多型   |        |         |
| DD         | 2718 人 | (94.6%) |
| DG         | 152 人  | (5.3%)  |
| GG         | 3 人    | (0.1%)  |

各遺伝子多型と血中 HDL コレステロール濃度との関連を図 2、図 3 に示した。いずれにおいても変異型で有意に高い HDL コレステロール値を示した (Int14GA 多型;  $p=2.4 \times 10^{-18}$ 、D442G 多型;  $p=6.5 \times 10^{-7}$ )。Int14GA 多型と D442G 多型の組み合わせと HDL コレステロール量との関係を図 4 に示した。両多型の組み合わせは、相加的に HDL コレステロール量と相関していた ( $p=2.7 \times 10^{-24}$ )。

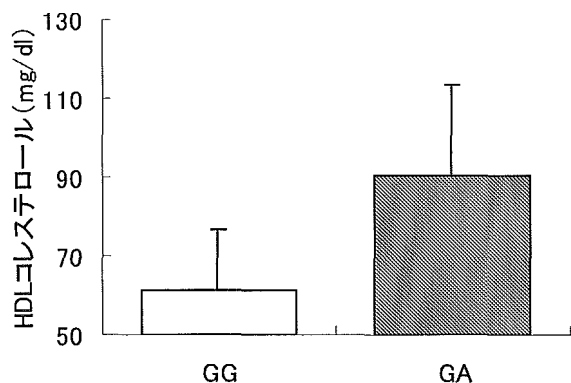


図 2 Int14GA 多型と HDL コレステロール量

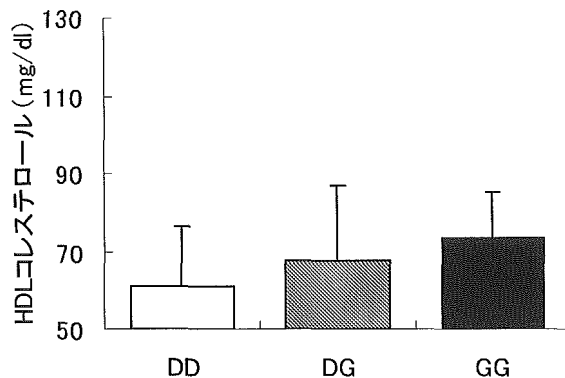


図 3 D442G 多型と HDL コレステロール量

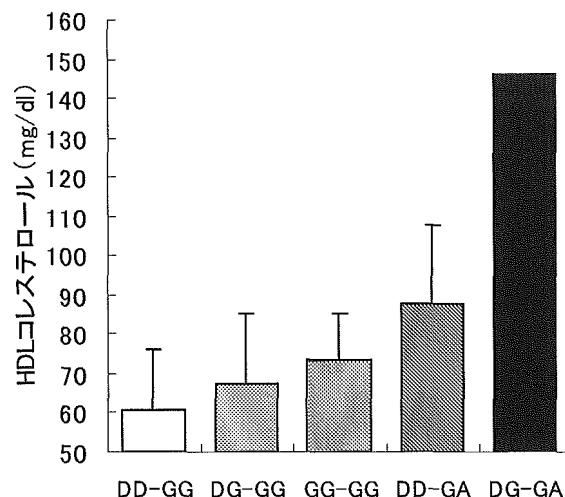


図 4 Int14GA 多型と D442G 多型の組み合わせと HDL コレステロール量

CETP 遺伝子の Int14GA 多型と D442G 多型いずれかにおいて変異型を持つ例と、いずれも野生型である例とで各種動脈硬化性疾患マーカーとを比較した (表 12)。その結果、いずれにおいても有意差は認められず、遺伝子変異による高 HDL 血症が動脈硬化性疾患のリスクあるいは予防因子とはならない可能性が示された。

表 12 CETP 遺伝子多型と動脈硬化性疾患マーカーとの関連

|                    | 野生型         | 変異型         | p     |
|--------------------|-------------|-------------|-------|
| HOMA 指数            | 1.7 ± 1.7   | 1.8 ± 1.5   | 0.682 |
| アディポネクチン (mg/dl)   | 6.0 ± 4.3   | 6.3 ± 5.0   | 0.578 |
| 高感度 CRP (ug/dl)    | 0.10 ± 0.17 | 0.12 ± 0.20 | 0.202 |
| 上腕一足首脈波伝搬速度 (cm/秒) | 1743 ± 428  | 1762 ± 405  | 0.821 |
| 頸動脈内膜中膜複合体厚 (mm)   | 0.82 ± 0.12 | 0.80 ± 0.10 | 0.405 |

## D. 考察

### 【代謝性疾患感受性遺伝子解析】

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。

### 【高血圧感受性遺伝子解析】

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。本研究結果において、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も、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

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ろう。

### 【薬剤応答性遺伝子解析】

スタチン系薬剤による脂質低下作用について、OATP-C 遺伝子多型との関連を、一般地域住民を対象に検討したところ、プラバスタチン・アトルバスタチンにおいて、Aアレルで脂質低下量が減少していた。一方、3種のHMG-CoA還元酵素阻害剤(プラバスタチン、アトルバスタチン、シンバスタチン)で脂質低下作用に有意差は認められなかった。プラバスタチン・アトルバスタチンは、OATP-Cを介して肝へ取り込まれることが報告されている。また、シンバスタチンは、構造上OATP-Cの基質になり得ないと考えられるが、代謝物の関与については現段階では否定できない。各薬剤の詳細な体内動態に関しては今後さらなる解明が必要とされるが、以上の理由からOATP-C遺伝子多型が総コレステロール低下作用に有意に影響したものと推察された。しかし、従来の報告通り、OATP-C遺伝子多型はAアレルの頻度が低かった。そのため本調査結果では、AA型が解析対象に含まれなかった。今後は対象者数を増加させ、より大規模に検討する必要があると思われた。

NAT2 遺伝子多型は、イソニアジドなどの薬物代謝に強く影響することが知られている。特に変異型のホモ接合体ではアセチル化活性が著しく低く、薬物代謝が遅いため、副作用の発現が危惧される。このような遺伝子型が、日本人の約10人に1人の割合で認められたことは、今後のarylamineやhydrazine系薬剤投与において、事前の遺伝子検査の必要性を示すものである。変異型のヘテロ接合体については、日本人において約40%程度存在することが示された。既報によれば、ヘテロ型の代謝速度は野生型の50%程度である。変異型のホモ接合体とあわせると、日本人の半数はNAT2遺伝子多型に変異型をもつことになり、このことから、将来的には、薬物投与前の遺伝子検査が必要となるであろう。本研究では、NAT2遺伝子上の4つの多型についてのみ検討した。しかしNAT2遺伝子には、さらにいくつかの亜型が存在している。今後、これら亜型について、頻度や酵素活性への影響を検討することが必要であろう。

### 【CETP 遺伝子多型解析】

CETP 遺伝子多型と血中HDLコレステロール量とに有意な相関が認められ、Int14GA多型とD442G多型はいずれも高HDL血症の原因遺伝子であることが確認された。高HDL血症のリスク性については、未だ結論が得られていない。日系アメリカ人を対象とした検討では、CETP遺伝子の変異による高HDL血症は、心血管系イベントのリスクとなる可能性が報告されている。反面、本研究では、血

中の動脈硬化性疾患マーカー、あるいは頸動脈肥厚などの中間形質と CETP 遺伝子多型とに相関は認められなかった。日系アメリカ人と本調査対象とでは、生活習慣が大きく異なることは既知である。また CETP 遺伝子多型頻度も、人種によって大きく異なることが予想される。今後の個別化医療の実現に向けて、さらに多くの対象において、より大規模かつ長期縦断的検討がなされることにより、当該遺伝子多型と心血管系イベントとの関連を明らかにしていく必要があるといえよう。

## 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。
- プラバスタチン・アトルバスタチンの脂質低下作用は OATP-C 遺伝子 V174A 多型の影響を受けることが示された。
- CETP 遺伝子多型は高 HDL 血症の原因遺伝子となることが確認されたが、動脈硬化性疾患マーカーとの関連は認められなかった。
- arylamine や hydrazine 系薬剤の代謝に関わる NAT2 遺伝子において、代謝能の低い変異型が、日本人において性別や年齢階層を問わず 11% 程度認められることが明らかとなった。

一連の研究成果は、個別化医療・予防医療の実現に向けて貴重な知見を提供するものと期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Yamamoto M, Abe M, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of GNB3 gene with pulse pressure and clustering of risk factors for cardiovascular disease in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Apr 9;316(3):744-8.
- Tabara Y, Kohara K, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, Kondo I, Miki T. Polymorphism of the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) gene is associated with the plasma level of MCP-1 but not with carotid intima-media thickness. *Hypertens Res.* 2003 Sep;26(9):677-83.
- Jin JJ, Nakura J, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Chen Y, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Bo X, Kohara K, Miki T. Association of angiotensin II type 2 receptor gene variant with hypertension. *Hypertens Res.* 2003 Jul;26(7):547-52.
- Wu Z, Nakura J, Abe M, Jin JJ, Yamamoto M, Chen Y, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Bo X, Kohara K, Miki T. Genome-wide linkage disequilibrium mapping of hypertension in Japan. *Hypertens Res.* 2003 Jul;26(7):533-40.
- Chen Y, Nakura J, Jin JJ, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Bo X, Kohara K, Miki T. Association of the GNAS1 gene variant with hypertension is dependent on alcohol consumption. *Hypertens Res.* 2003 Jun;26(6):439-44.
- Jin JJ, Nakura J, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Kohara K, Miki T. Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension.* 2003 Jan;41(1):163-7.
- 冠動脈疾患の危険因子としての MTHFR 遺伝子多型と糖尿帽の相関 山縣英久、吉村脩、黒河内隆、近藤郁 愛媛医学, 2003;22:115-123
- 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 (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
- Taguchi 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.
- Tamaki S, Nakamura Y, Tabara Y, Okamura T, Kita Y, Kadowaki T, Tsujita Y, Horie M, Miki T, Ueshima H. Combined analysis of polymorphisms in angiotensinogen and adducin genes and their effects on hypertension in a Japanese sample: The Shigaraki Study. *Hypertens Res*. 2005;28:645-50.
- Abe M, Wu Z, Yamamoto M, Jin JJ, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with hypertension through interaction with fasting plasma glucose in Japanese. *Hypertens Res*. 2005;28:215-21.
- Osawa H, Onuma H, Ochi M, Murakami A, Yamauchi J, Takasuka T, Tanabe F, Shimizu I, Kato K, Nishida W, Yamada K, Tabara Y, Yasukawa M, Fujii Y, Ohashi J, Miki T, Makino H. Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335:596-602.
- Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M, Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. A novel alternative splice variant of nicastrin and its

implication in Alzheimer disease. *Life Sci*. 2005 in press

- Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T. Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease. *J Neurol Sci*. 2005;238:53-7.

## 2. 学会発表

XVth Scientific Meeting of the Inter-American Society of Hypertension, San Antonio TX U.S.A., 2003. 4. 27-30

- Home blood pressure is better predictor of carotid atherosclerosis than office blood pressure. Tachibana R, Tanara Y, Kohara K, Nakura J, Kondo I, Miki T
- Deletion allele of angiotensin-converting enzyme as gene for medical cost in the elderly. Tabara Y, Kohara K, Tachibana R, Kawamoto R, Igase M, Nakura J, Kondo I, Miki T
- Urinary microalbumin is an independent predictor of pulse wave velocity in the community-dwelling subjects: J-SHIP study. Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Tachibana R, Nakura J, Miki T
- Angiotensin-converting enzyme gene deletion allele disappear brachial-carotid pulse pressure amplification. Tabara Y, Kohara K, Yamamoto Y, Kawamoto R, Tachibana R, Nakura J, Kondo I, Miki T
- Chlamydia pneumoniae seropositivity is associated with higher oxidative stress: J-SHIP study. Kohara K, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, Miki T

第 67 回日本循環器学会・学術集会 平成 15 年 3 月 28 日～30 日 福岡

- Angiotensin-Converting Enzyme Gene Deletion Allele Disappear Brachial-Carotid Pulse Pressure Amplification 田原康玄, 小原克彦, 山本善邦, 川本龍一, 橋理恵子, 名倉 潤, 近藤郁子, 三木哲郎

第 24 回 日本老年医学会学術集会 平成 15 年 6 月 18 日～20 日 名古屋

- 頸動脈内膜中膜複合体厚の予測因子としての家庭血圧の有用性 橋理恵子・田原康玄・小原克彦・名倉 潤・三木哲郎

- クラミジア・ニューモニエ抗体価と酸化ストレス：J-SHIPP 研究 小原克彦・田原康玄・山本善邦・伊賀瀬道也・橘理恵子・名倉 潤・三木哲郎
- 加齢に伴う高血圧発症に及ぼす GNAS1 T393C 遺伝子多型の影響 安部道子・名倉 潤・田原康玄・山本善邦・伊賀瀬道也・小原克彦・三木哲郎
- プレセニン1 遺伝子変異とアポ E4 変異の合併は進行性皮膚下グリオーシスの表現型をとる 山縣英久・田原康玄・近藤郁子・名倉 潤・小原克彦・三木哲郎・満田憲昭・田辺敬貴
- 総頸動脈硬化症における収縮期血圧と angiotensin-converting enzyme 遺伝子多型の相互作用 川本龍一・小原克彦・田原康玄・三木哲郎

第 10 回日本遺伝子診療学会大会 平成 15 年 7 月 24 日～25 日 大阪

- SCNN1A (Amiloride-sensitive Epithelial Sodium Channel  $\alpha$  Subunit) 遺伝子の A2139G 遺伝子多型と本態性高血圧の関連性 安部道子・名倉 潤・呉 志紅・金 京姫・陳ユウセン・山本美由紀・伊賀瀬道也・田原康玄・小原克彦・三木哲郎
- PON1 遺伝子多型と尿中 8 イソプロスタニン濃度の関連 橘理恵子・田原康玄・小原克彦・名倉 潤・近藤郁子・三木哲郎
- 頸動脈肥厚に対する MCP-1 遺伝子多型および血中 MCP-1 濃度の影響 田原康玄・小原克彦・橘理恵子・伊賀瀬道也・名倉 潤・近藤郁子・三木哲郎

第 26 回日本高血圧学会総会 平成 15 年 10 月 30 日～1 日 宮崎

- 尿中 8-イソプロスタニン濃度に及ぼす Paraoxonase 遺伝子多型の影響 橘理恵子・小原克彦・田原康玄・名倉 潤・近藤郁子・三木哲郎
- 本態性高血圧と ADBR3(beta 3 adrenergic receptor) 遺伝子 Trp64Arg 多型との関連性 呉 志紅・名倉 潤・金 京姫・安部道子・山本美由紀・陳ユウ森・山本邦善・田原康玄・伊賀瀬道也・小原克彦・三木哲郎
- アルコール摂取量、アルデヒド脱水素酵素遺伝子多型と本態性高血圧：The J-SHIPP Study

田原康玄・小原克彦・橘理恵子・川本龍一・名倉 潤・近藤郁子・三木哲郎

- マイクロアルブミン尿と動脈壁硬化：PWV からの検討 小原克彦・田原康玄・伊賀瀬道也・名倉 潤・三木哲郎
- 日本人高血圧における Adipocyte-derived leucine aminopeptidase 遺伝子 (ALAP) Lys528Arg 遺伝子多型と BMI および Endothelin-1 遺伝子 (EDN1) Lys198Asn 遺伝子多型との相互作用 安部道子・名倉 潤・呉 志紅・金 京姫・陳ユウ森・山本美由紀・田原康玄・伊賀瀬道也・小原克彦・三木哲郎
- 低身長と脈圧・血圧圧波形：The J-SHIPP Study 田原康玄・小原克彦・橘理恵子・川本龍一・近藤郁子・三木哲郎

第 73 回日本衛生学会 平成 15 年 3 月 26 日～29 日 大分

- MTHFR 遺伝子多型と先天異常-1 Rett 症候群 近藤郁子

日本人類遺伝学会第 48 回大会 平成 15 年 10 月 21～24 日 長崎

- MECP2 以外の Rett 症候群原因遺伝子の検索 宮本憲一，山下裕史郎，永光信一郎，松石豊次郎，桑島克子，家島厚，山口文佳，田原康玄，山縣英久，近藤郁子

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 4 9 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

The American Society of Hypertension 20th Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, May 14-18, 2005

- Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Nakura J, and Miki T. Genetic risk factors for arterial stiffness.
- Kohara K, Fujisawa M, Ando F, Tabara Y, Niino N, Miki T, Shimokata H Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms and Silent Cerebral Infarcts in a Large Japanese General Population.
- Tabara Y, Kohara K, and Miki T on behalf of the study group of Millennium Genome Project for hypertension. Hunting for hypertension genes: The National Millennium Project in Japan,
- Kohara K, Tabara Y, and Miki T. Systemic multiple candidate genes approach for identification of susceptible genes for hypertension in a Japanese

population; on behalf of the study group of Millennium Genome Project for hypertension

The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting, Salt Lake City, USA, October 25-29

- Kondo I, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Yamaguchi F, Kuwajima K. NSD1 polymorphic DNA markers for microdeletion screening in patients with sotos syndrome.
- Miki T, Tabara Y, Nakura J, Kohara K. Genom-wide scan for hypertension: The National Millennium Project in Japan.

第 47 回日本老年医学会学術集会 平成 17 年 6 月 15 日～17 日 東京

- Matric metalloproteinase 遺伝子多型と無症候性脳梗塞: NLS-LSA スタディ 永井勅久・小原克彦・藤沢道子・安藤富士子・田原康玄・三木哲郎・下方浩史
- 高血圧感受性遺伝子の解析: ミレニアム・ゲノム・プロジェクト 三木哲郎・小原克彦・名倉 潤・田原康玄・ミレニアムゲノムプロジェクト高血圧部会
- 血管壁硬化を中間形質とした脈圧に関連する遺伝要因探索: J-SHIPP 研究 小原克彦・田原康玄・永井勅久・伊賀瀬道也・名倉 潤・三木哲郎
- 加齢に伴う腎機能低下に関連する遺伝要因の探索: J-SHIPP 研究 小原克彦・田原康玄・永井勅久・伊賀瀬道也・名倉 潤・三木哲郎
- 虚血性脳卒中と MTHFR 遺伝子多型との関連について 川本龍一・小原克彦・富田仁美・田原康玄・三木哲郎

第 12 回遺伝子診療学会大会 平成 17 年 8 月 松本

- 高血圧感受性遺伝子解析におけるデータマイニングの有用性 三木哲郎, 田原康玄, 名倉潤, 小原克彦

第 28 回日本高血圧学会総会 平成 17 年 9 月 旭川

- Angiotensinogen M235T 多型および  $\alpha$  adducin G640W 多型と高血圧の関連～日本人住民での検討 中村保幸・田原康玄・三木哲郎・環 慎二・山本貴子・喜多義邦・岡村智教・上島弘嗣
- 2 万個のマイクロサテライトマーカーを用い、本態性高血圧の疾患感受性 (成因) 遺伝子同定を目指したゲノムワイド相関解析 谷津圭介・平和伸仁・小川桃子・志和忠志・相馬正義・羽田 明・中尾一和・上島弘嗣・荻原俊男・友池仁暢・田原康玄・三木哲郎・木村彰方・岡 晃・水木信久・

猪子俊英・梅村 敏

- マルチプル候補遺伝子アプローチによる高血圧感受性遺伝子、感受性経路の探索～ミレニアム・ゲノム・プロジェクト 小原克彦・田原康玄・名倉潤・三木哲郎
- Follicle stimulating hormone (FSH)受容体遺伝子 5' 非翻訳領域の一塩基多型は転写活性に影響し本態性高血圧症と関連する (ミレニアムゲノムプロジェクト) 中山智祥・黒井信宏・佐野守彦・田原康玄・勝谷友宏・萩原俊男・蒔田芳男・羽田明・山田美智子・高橋規郎・平和伸仁・梅村 敏・三木哲郎・相馬正義
- RGS2 遺伝子多型と 12 年間の家庭血圧変化の関連:大迫研究 勝谷友宏・田原康玄・大久保孝義・菊谷昌浩・目時弘仁・戸恒和人・小原克彦・楽木宏美・三木哲郎・今井 潤・萩原俊男
- 高血圧候補遺伝子と脂肪蓄積および血圧の関連性 小川桃子・平和伸仁・遠藤晃彦・谷津圭介・田村功一・木原 実・戸谷義幸・安田 元・田原康玄・三木哲郎・徳永勝士・梅村 敏

59th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on Kidney in Cardiovascular Disease. September 21.24, 2005. Washington, DC

- Tabara Y, Kohara K, Nakura J, Miki T, The study Group of Millennium Genome Project for Hypertension. Whole-genome Candidate Gene Association Study for the Development of Hypertension; The National Millennium Genome Project in Japan
- Kohara K, Tabara Y, Nagai T, Igase M, Nakura J, Miki T. Candidate Gene Approach for Age-related Increase in Pulsere Pressure with an Employment of Arterial Stiffness as an Intermediate Phenotype: J-shipp Study
- Tabara Y, Kohara K, Kawamoto R, Osawa H, Nakura J, Makino H, Miki T. Association Between Adiponectin and C-reactive Protein in Community-based Large Scale Population

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, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J.   | Association of GNB3 gene with pulse pressure and clustering of risk factors for cardiovascular disease in Japanese.   | Biochem Biophys Res Commun. | 2004 | 316(9) | 744-8   |
| Tabara Y, Kohara K<br>Yamamoto Y, Igase M<br>Nakura J, Kondo I, Miki T.  | Polymorphism of the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) gene is associated with the plasma level of MCP-1 but not with carotid intima-media thickness. | Hypertens Res.              | 2003 | 26(9)  | 677-83  |
| Jin JJ, Nakura J, Wu Z<br>Yamamoto M, Abe M, Chen Y<br>Tabara Y, Yamamoto Y<br>Igase M, Bo X, Kohara K<br>Miki T.              | Association of angiotensin II type 2 receptor gene variant with hypertension.   | Hypertens Res.              | 2003 | 26(7)  | 547-52  |
| Wu Z, Nakura J, Abe M,<br>Jin JJ, Yamamoto M,<br>Chen Y, Tabara Y,<br>Yamamoto Y, Igase M, Bo X,<br>Kohara K, Miki T.          | Genome-wide linkage disequilibrium mapping of hypertension in Japan.  | Hypertens Res.              | 2003 | 26(7)  | 533-40  |
| Chen Y, Nakura J, Jin JJ,<br>Wu Z, Yamamoto M, Abe M,<br>Tabara Y, Yamamoto Y,<br>Igase M, Bo X, Kohara K,<br>Miki T.          | Association of the GNAS1 gene variant with hypertension is dependent on alcohol consumption.  | Hypertens Res.              | 2003 | 26(6)  | 439-44  |
| Jin JJ, Nakura J, Wu Z,<br>Yamamoto M, Abe M,<br>Tabara Y, Yamamoto Y,<br>Igase M, Kohara K, Miki T.                           | Association of endothelin-1 gene variant with hypertension.   | Hypertension                | 2003 | 41(1)  | 163-7   |
| 山縣英久、吉村脩、黒河内隆、<br>近藤郁子   | 冠動脈疾患の危険因子としての MTHFR 遺伝子多型と糖尿病の相関   | 愛媛医学                        | 2003 | 22     | 115-23  |
| Yamamoto M, Abe M, Ji JJ, Wu Z,<br>Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T,<br>Nakura J   | Association of a GNAS1 Gene Variant with Hypertension And Diabetes Mellitus.  | Hypertension Res.           | 2004 | 27     | 919-924 |
| Tachibana-Iimori R, Tabara Y,<br>Kusuhara H, Kohara K,<br>Kawamoto R, Nakura J,<br>Tokunaga K, Kondo I,<br>Sugiyama Y, Miki T. | Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) on lipid-lowering response to HMG-CoA reductase inhibitors.  | Drug Metab Pharmacokin.     | 2004 | 19     | 375-80  |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名                        | 出版年  | 巻号  | ページ     |
|--|--|-----------------------------|------|-----|---------|
| 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   |
| Taguchi 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 |
| 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   |
| Tamaki S, Nakamura Y, Tabara Y, Okamura T, Kita Y, Kadowaki T, Tsujita Y, Horie M, Miki T, Ueshima H.  | Combined analysis of polymorphisms in angiotensinogen and adducin genes and their effects on hypertension in a Japanese sample: The Shigaraki Study. | Hypertens Res.              | 2005 | 28  | 645-50  |
| Abe M, Wu Z, Yamamoto M, Jin JJ, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J.   | Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with hypertension through interaction with fasting plasma glucose in Japanese.                 | Hypertens Res.              | 2005 | 28  | 215-21  |
| Osawa H, Onuma H, Ochi M, Murakami A, Yamauchi J, Takasuka T, Tanabe F, Shimizu I, Kato K, Nishida W, Yamada K, Tabara Y, Yasukawa M, Fujii Y, Ohashi J, Miki T, Makino H. | Resistin SNP-420 determines its monocyte mRNA and serum levels inducing type 2 diabetes.   | Biochem Biophys Res Commun. | 2005 | 335 | 596-602 |
| Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M, Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T.                             | A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease.  | Life Sci.                   | 2005 |     |         |
| Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T.  | Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease.  | J Neurol Sci.               | 2005 | 238 | 53-7    |

## 研究成果の刊行物・別刷

## Association of GNB3 gene with pulse pressure and clustering of risk factors for cardiovascular disease in Japanese

Miyuki Yamamoto, Michiko Abe, Jing Ji Jin, Zhihong Wu, Yasuharu Tabara, Masaki Mogi, Katsuhiko Kohara, Tetsuro Miki, and Jun Nakura\*

Department of Geriatric Medicine, School of Medicine, Ehime University, Shigenobu-cho, Onsen-gun, Ehime 791-8505, Japan

Received 14 January 2004

### Abstract

Heterotrimeric guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) mediate many pathways including the  $\beta$ -adrenergic signaling pathway. The CR25T polymorphism in the gene coding for the  $\beta 3$  subunit of G proteins (GNB3) has been shown to be associated with several phenotypes such as hypertension, obesity, and diabetes mellitus comprising the metabolic syndrome. The GNB3 CR25T polymorphism may therefore be associated with many atherosclerosis-related phenotypes. On these grounds, we studied the CR25T polymorphism in relation to atherosclerosis-related phenotypes in a large Japanese population. Analyses in general linear models showed that T carriers had a significantly wider pulse pressure ( $P = 0.0089$ ) as well as a significantly higher systolic blood pressure ( $P = 0.026$ ). In contrast, analyses in logistic regression models showed that the CR25T polymorphism was not significantly associated with each of the four major classical risk factors for cardiovascular and cerebrovascular disease (obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, and diabetes mellitus). However, a significantly higher percentage of subjects had none of the four disorders in CC homozygotes than in T carriers ( $P = 0.026$ ). Thus, the CR25T polymorphism was significantly associated with clustering of these four risk factors. Although the effect of the gene on each phenotype appears to be weak, considering the combined impact of the effects of the CR25T polymorphism on risk factors, the GNB3 gene may be an important gene for human health.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** G protein; Hypertension; Atherosclerotic; Multiple risk factor clustering syndrome

Heterotrimeric guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) couple seven transmembrane receptors to adenylate cyclase, and mediate many pathways including the  $\beta$ -adrenergic signaling pathway. Each G protein is composed of three distinct subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ). Based on amino acid similarities of the  $\alpha$ -subunits, G proteins are classified into four major classes (Gs, Gi/o, Gq/11, and G12/13) [1–3]. G proteins dissociate into the  $\alpha$ -subunits and the  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits, which separately activate intracellular effector molecules. Recently, the  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits have been recognized as signal transduction molecules, and are now known to directly regulate as many different protein targets as the  $\alpha$ -subunits [4].

More recently, a CR25T polymorphism in the gene coding for the  $\beta 3$  subunit of G proteins (GNB3) was

identified [5]. The R25T allele has been shown to be associated with hypertension [5–8] and obesity [9–11] in several populations, although the conclusions have been inconsistent. In the initial study, the R25T allele has been assumed to exert a dominant effect based on an observation that, stimulated by platelet-activating factor, levels of G protein activation of the TC genotype were similar to those of the TT genotype, but not to those of the CC genotype [5]. The R25T allele has also been shown to be associated with insulin resistance [12] and type 2 diabetes mellitus [13]. Thus, the R25T allele appears to be related to the metabolic syndrome, which is a complex condition composed of several disorders including hypertriglyceridemia, obesity, hypertension, and diabetes mellitus. The metabolic syndrome is a strong risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disease. Indeed, as expected, the R25T allele has been shown to be associated with myocardial infarction [14] and clinical stroke [15]. However, association studies are

not sufficient to establish a causal relationship between the R25T allele and the metabolic syndrome.

Although associations of the CR25T polymorphism with classical risk factors for cardiovascular and cerebrovascular disease have been reported, the underlying mechanism remains to be explained. In this context, the T allele of the CR25T polymorphism combines preferentially with the  $\alpha$ -subunit of Gi proteins, and expression of the T allele is accompanied by enhanced sensitivity of Gi proteins to receptor activation [5,29]. Gi proteins are known to play an important role in adipogenesis. Increased expression of Gi  $\alpha 2$  in mouse embryo stem cells promoted their terminal differentiation to adipocytes [30]. Expression of constitutively active Gi  $\alpha 2$  in mouse embryonic fibroblasts stimulated adipogenesis [31]. Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulated lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentration [32]. Indeed, the GNB3 R25T allele was associated with impairment of the  $\beta$ -adrenergic control of lipolysis [33]. Thus, the association of the CR25T polymorphism with obesity may be plausible. This association could result in association of the CR25T polymorphism with hypertriglyceridemia, diabetes mellitus, and hypertension through insulin resistance. Indeed, adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  induced obesity-linked insulin resistance [34].

In addition, because Gi proteins are coupled with many pathways, other mechanisms may also underlie the associations of the CR25T polymorphism with hypertriglyceridemia, diabetes mellitus, and hypertension. Indeed, enhanced expression of Gi proteins has been shown to be associated with hypertension [35–38], and inactivation of enhanced expression of Gi protein attenuated the development of hypertension [39]. With respect to hypertriglyceridemia, several nonselective  $\beta$ -blockers often cause hypertriglyceridemia [40,41]. In contrast, with respect to diabetes mellitus, biological evidence suggests that Gi proteins are associated with enhanced insulin action [42–44]. The apparently discrepant tendency of more frequent T carriers in diabetic subjects could have been by chance. However, the GNB3 R25T allele has been shown to be associated with insulin resistance [12] and with type 2 diabetes mellitus

[13] in other association studies. Therefore, the apparent discrepancy between biological evidence and the results of association studies could imply that accumulated fat in T carriers might have stronger effects on insulin action than enhanced expression of Gi proteins in T carriers. Alternatively, gene-gene interactions might underlie the discrepancy. In this context, the GNB3 R25T allele has been shown to interact with the insulin receptor substrate 1-922A>9 variant in the association with type 2 diabetes mellitus [13]. Whatever the case, the combined effects of a higher percentage of T carriers in several major risk factors for atherosclerosis than CC homozygotes could explain the significantly wider PP in T carriers than in CC homozygotes in our population.

Although the effect of the gene on each phenotype may be weak, considering the combined impact of the effects of the gene, extensive investigation of the GNB3 gene in relation to various phenotypes may be required. In the present study, interaction analyses showed that the CR25T polymorphism did not interact with any confounding factors shown in Table 1 (data not shown). However, the present study did not assess gene-gene interaction, which is a candidate factor modifying the evaluation of an association. In this context, interaction analyses of the GNB3 gene with other genes involved in G protein-mediated pathways may be helpful to improve the understanding of the relation between G protein-mediated pathways and cardiovascular disease.

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. Obesity was defined as body mass index  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> (Japan Society for the Study of Obesity). Hypertriglyceridemia was defined as triglyceride  $\geq 150$  mg/dl [16]. Diabetic subjects were diagnosed according to the WHO's definition of type 2 diabetes mellitus [17]. Subjects were considered to have diabetes mellitus if fasting plasma glucose concentration was  $\geq 126$  mg/dl.

**Statistical methods.** Statistical analysis was performed with SPSS statistical software. Comparisons of categorical variables were performed using the  $\chi^2$  test. Analysis of variance was used to assess differences in means and variances of continuous variables. Logarithmically transformed plasma triglyceride values were used in the analysis. Logistic regression models were used to assess whether the GNB3 CR25T polymorphism made statistically significant contribution to prediction of obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, diabetes mellitus, and the number of disorders, with consideration of the effects of sex and age. General linear regression models were used to assess whether the CR25T polymorphism made a statistically significant contribution to prediction of body mass index, blood pressure, triglyceride, total cholesterol, and fasting plasma glucose, with consideration of the effects of sex and age. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

### Results

Table 1 presents the actual values of the parameters associated with risk for cardiovascular and cerebrovascular disease as a function of the three genotypes. The relative frequencies of the TT, TC, and CC genotypes were 27%, 45%, and 29%, respectively. The allele frequencies were 49% and 51% for the T and C alleles, respectively. These results were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium, tested by the  $\chi^2$  test. Analysis of variance showed that the CR25T polymorphism was significantly associated with SBP ( $P = 0.026$ ) and PP ( $P = 0.0089$ ), assuming a dominant effect of the T allele. General linear regression analysis showed that the association was significant even after adjustment for sex and age ( $P = 0.050$  for SBP and  $P = 0.018$  for PP).

Table 1  
Clinical characteristics of subjects according to GNB3 genotype

| Variable                             | Genotype | TT (n = 215) | TC (n = 359) | CC (n = 333) | <i>P</i> value |
|--------------------------------------|----------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| Sex (male %)                         |          | 78.1         | 83.0         | 80.6         | 0.86           |
| Age (years)                          |          | 54.7 (8.7)   | 53.7 (8.7)   | 53.7 (9.1)   | 0.28           |
| Body mass index (kg/m <sup>2</sup> ) |          | 22.9 (2.9)   | 22.7 (3.0)   | 22.7 (3.0)   | 0.13           |
| Systolic blood pressure (mmHg)       |          | 126.0 (18.4) | 124.8 (19.0) | 122.0 (18.8) | 0.026          |
| Diastolic blood pressure (mmHg)      |          | 78.0 (11.7)  | 77.1 (12.0)  | 77.1 (13.1)  | 0.46           |
| Pulse pressure (mmHg)                |          | 48.0 (13.3)  | 47.7 (13.0)  | 44.9 (10.9)  | 0.0089         |
| Triglyceride (mg/dl)                 |          | 131.1 (96.3) | 135.1 (96.3) | 135.1 (96.3) | 0.12           |
| Total cholesterol (mg/dl)            |          | 201.4 (32.9) | 199.5 (33.1) | 197.2 (32.9) | 0.24           |
| Fasting plasma glucose (mg/dl)       |          | 103.7 (18.9) | 103.3 (19.0) | 101.3 (15.0) | 0.25           |

Data are means (SD). *P* values are for TT–TC vs. CC.

Table 2  
Prevalence of disorders according to GNB3 genotype<sup>a</sup>

| Disorder (%)              | Genotype | TT (n = 215) | TC (n = 359) | CC (n = 333) | <i>P</i> value |
|---------------------------|----------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| Obesity                   |          | 25.6         | 29.5         | 23.7         | 0.21           |
| Hypertension              |          | 35.3         | 33.4         | 30.2         | 0.28           |
| Hypertriglyceridemia      |          | 46.0         | 39.0         | 34.5         | 0.060          |
| Diabetes mellitus         |          | 6.5          | 5.6          | 4.3          | 0.36           |
| Subjects with no disorder |          | 30.7         | 32.6         | 40.1         | 0.026          |

<sup>a</sup> *P* values are for TT–TC vs. CC.

Disorders are obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, and diabetes mellitus.

\* Corresponding author. Fax: +81-89-926-5822.  
E-mail address: nakura@ehime-u.ac.jp (J. Nakura).

Table 2 shows the prevalence of four major disorders (obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, and diabetes mellitus) correlated with the risk for cardiovascular and cerebrovascular disease according to the GNB3 genotype. Assuming a dominant effect of the T allele, logistic regression analyses showed that the CR25T polymorphism was not significantly associated with any of the four disorders. However, a significantly higher percentage of subjects had none of the four disorders in CC homozygotes than in T carriers ( $P = 0.026$ ) in a logistic regression model. Logistic regression analysis showed that the association was significant even after adjustment for sex and age ( $P = 0.044$ ).

### Discussion

The present study showed that the GNB3 CR25T polymorphism was significantly associated with PP. T carriers had higher PP than CC homozygotes. This result is consistent with another result of this study that a T carrier state was significantly associated with SBP, whereas it was not significantly associated with DBP. Because the R25T allele has been shown to be associated with classical risk factors for atherosclerosis including hypertension, obesity, and diabetes mellitus [5–11,13], T carriers may tend to develop atherosclerosis. Atherosclerosis may lead to increased aortic stiffness, resulting in a wide PP as well as elevated SBP [27]. Conversely, a wide PP may be attributable to atherosclerosis. Indeed, elevated PP is interestingly being recognized as an independent risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disease [22].

In the present study, we failed to show a significant association of the CR25T polymorphism with each classical risk factor for cardiovascular and cerebrovascular disease. Consistent with this failure in our Japanese population, other studies have also failed to show a significant association of the CR25T polymorphism with hypertension in Japanese populations [23,24]. The reason for this failure in Japanese is not clear. A possible reason may be the difference of environmental and genetic background between Japanese and other races. In this context, the CR25T polymorphism has been shown to interact with the angiotensin I-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) polymorphism in the association with myocardial infarction [14]. Thus, the lower frequency of DD homozygotes in Japanese than in other races could explain the failure. In addition, because, as expected, in each disorder, T carriers were consistently more frequent than CC homozygotes (Table 2), the failure could be partly attributable to lack of statistical power, suggesting that the effect of the CR25T polymorphism on each classical risk factor may be weak. Consistent with this, a significantly higher percentage of subjects had none of the four disorders in

CC homozygotes than in T carriers. This result is in line with the concept that the clinically manifest phenotype of each subject with genetic factors for the metabolic syndrome may depend on phenotype-specific genetic factors in each subject [25]. Similar analysis of the ACE I/D polymorphism has also shown a significant association of the I/D polymorphism with clustering of risk factors, despite a lack of association of the I/D polymorphism with each risk factor [26]. Indeed, more recently, the ACE gene has been increasingly recognized as a gene that is associated with many disorders [27,28]. Likewise, the GNB3 gene might have a similar impact on human health, because G proteins mediate many pathways and the GNB3 CR25T polymorphism has been shown to be functional [5,29].

Although associations of the CR25T polymorphism with classical risk factors for cardiovascular and cerebrovascular disease have been reported, the underlying mechanism remains to be explained. In this context, the T allele of the CR25T polymorphism combines preferentially with the  $\alpha$ -subunit of Gi proteins, and expression of the T allele is accompanied by enhanced sensitivity of Gi proteins to receptor activation [5,29]. Gi proteins are known to play an important role in adipogenesis. Increased expression of Gi  $\alpha 2$  in mouse embryo stem cells promoted their terminal differentiation to adipocytes [30]. Expression of constitutively active Gi  $\alpha 2$  in mouse embryonic fibroblasts stimulated adipogenesis [31]. Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulated lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentration [32]. Indeed, the GNB3 R25T allele was associated with impairment of the  $\beta$ -adrenergic control of lipolysis [33]. Thus, the association of the CR25T polymorphism with obesity may be plausible. This association could result in association of the CR25T polymorphism with hypertriglyceridemia, diabetes mellitus, and hypertension through insulin resistance. Indeed, adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  induced obesity-linked insulin resistance [34].

In addition, because Gi proteins are coupled with many pathways, other mechanisms may also underlie the associations of the CR25T polymorphism with hypertriglyceridemia, diabetes mellitus, and hypertension. Indeed, enhanced expression of Gi proteins has been shown to be associated with hypertension [35–38], and inactivation of enhanced expression of Gi protein attenuated the development of hypertension [39]. With respect to hypertriglyceridemia, several nonselective  $\beta$ -blockers often cause hypertriglyceridemia [40,41]. In contrast, with respect to diabetes mellitus, biological evidence suggests that Gi proteins are associated with enhanced insulin action [42–44]. The apparently discrepant tendency of more frequent T carriers in diabetic subjects could have been by chance. However, the GNB3 R25T allele has been shown to be associated with insulin resistance [12] and with type 2 diabetes mellitus

[13] in other association studies. Therefore, the apparent discrepancy between biological evidence and the results of association studies could imply that accumulated fat in T carriers might have stronger effects on insulin action than enhanced expression of Gi proteins in T carriers. Alternatively, gene-gene interactions might underlie the discrepancy. In this context, the GNB3 R25T allele has been shown to interact with the insulin receptor substrate 1-922A>9 variant in the association with type 2 diabetes mellitus [13]. Whatever the case, the combined effects of a higher percentage of T carriers in several major risk factors for atherosclerosis than CC homozygotes could explain the significantly wider PP in T carriers than in CC homozygotes in our population.

Although the effect of the gene on each phenotype may be weak, considering the combined impact of the effects of the gene, extensive investigation of the GNB3 gene in relation to various phenotypes may be required. In the present study, interaction analyses showed that the CR25T polymorphism did not interact with any confounding factors shown in Table 1 (data not shown). However, the present study did not assess gene-gene interaction, which is a candidate factor modifying the evaluation of an association. In this context, interaction analyses of the GNB3 gene with other genes involved in G protein-mediated pathways may be helpful to improve the understanding of the relation between G protein-mediated pathways and cardiovascular disease.

### Acknowledgments

This work 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, "Yusei Engineering," and Food Biotechnology from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

### References

- B.R. Cooklin, H.R. Bourne, Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors, *Cell* 73 (1993) 631–641.
- E.J. Neer, Heterotrimeric G protein organizers of transmembrane signals, *Cell* 80 (1995) 249–257.
- S. Rens-Domiano, H.E. Hamm, Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins, *FASEB J.* 9 (1995) 1059–1069.
- D.E. Clapham, E.J. Neer, G protein beta gamma subunits, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37 (1997) 167–203.
- W. Siffert, D. Roskoff, G. Siffert, S. Busch, A. Moritz, R. Ebold, A.M. Sharma, E. Hitz, H.E. Wichmann, K.H. Jakobs, B. Horvath, Association of a human G protein beta3 subunit variant with hypertension, *Nat. Genet.* 18 (1998) 45–48.
- H. Schneider, H.W. Hesse, A. Doring, G.A. Riegger, W. Siffert, Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels, *Hypertension* 32 (1998) 510–513.
- A.V. Benfante, C.L. Jayaraman, D.R. Nyholt, L.R. Griffiths, B.J. Moris, G-protein beta3 subunit gene (GNB3) variant in association of essential hypertension, *Hypertension* 32 (1998) 1094–1097.
- J. Heige, H. Hohelbecker, A. Dvöler, A.M. Sharma, G-protein beta3 subunit CR25T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension, *Hypertension* 33 (1999) 1049–1051.
- W. Siffert, P. Forster, R.H. Eckel, D.A. Meyer, B. Brückmann, C. Naber, R. Crooks, P.H. Do, J.T. Eppken, J. Frisley, K.J. Moutery, F. Froehner, M. Müller, D. Stöckel, A.M. Sharma, K. J. Moutery, H. Grosse-Wilde, B. Buerbaum, T. Ehrlich, H.R. Ahmad, B. Horvath, G.E. De Zeeb, A. Tillikainen, J. Ge, Y. Wang, D. Roskoff, Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit R25T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals, *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (1999) 1921–1930.
- R.A. Hegele, C. Anderson, T.K. Young, P.W. Connelly, G-protein beta3 subunit gene splice variant and body fat distribution in Nunavut Inuit, *Obesity Res.* 9 (1999) 972–977.
- A. Gasterengh, C. Naber, N. Müller, R. Ebold, W. Siffert, G protein beta3 subunit R25T genotype and post-pregnancy weight retention, *Lancet* 355 (2000) 1340–1341.
- E. Poch, V. Ghier, D. Gonzalez-Nunez, E. Cobi, J. Oriola, A. de la Sierra, Association of G protein beta3 subunit T allele with insulin resistance in essential hypertension, *Clin. Exp. Hypertens.* 24 (2002) 345–353.
- D. Roskoff, L. Frey, S. Eckhardt, S. Schmidt, E. Ritz, S. Hoffmann, M. Jakobs, N. Müller, J. Heide, W. Siffert, K.H. Jocke, Interaction of the G protein beta3 subunit R25T allele and the H51 A>G72 variant in type 2 diabetes, *Eur. J. Med. Res.* 5 (2000) 484–490.
- C.K. Naber, J. Huang, U. Waldhard, R. Ebold, W. Siffert, Interaction of the ACE D allele and the GNB3 R25T allele in myocardial infarction, *Hypertension* 36 (2000) 966–969.
- A.C. Morrison, J.A. Doris, A.R. Folsom, J.K. Heiss, E. Boerwinkle, G-protein beta3 subunit R25T polymorphism and risk of cardiovascular and clinical stroke: atherosclerosis risk in communities study, *Stroke* 33 (2002) 4822–4829.
- Y. Hata, H. Mubuchi, Y. Saito, H. Makura, G. Egusa, H. Ito, T. Yamamoto, M. Tsuchida, S. Tada, S. Okawa, N. Yamada, S. Yamashita, N. Sakuma, J. Sasaki, Report of the Japan Atherosclerosis Society (JAS) guideline for diagnosis and treatment of hyperlipidemia in Japanese adults: Working committee on JAS guideline for diagnosis and treatment of hyperlipidemia, *J. Atheroscler. Thromb.* 9 (2003) 1–23.
- K.G. Albert, P.Z. Zimmet, 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.* 15 (1998) 539–553.
- J.W. Holloway, B. Deagle, S. Furner, L.J. Hinks, L.M. Day, W.M. Howell, Comparison of three methods for single nucleotide polymorphism typing for DNA bank studies: sequence-specific oligonucleotide probe hybridization, TaqMan liquid phase hybridization, and microplate array digestion, *J. Genet. Mol. Evol.* 48 (1999) 340–347.
- K. Ishikawa, S. Baba, T. Kusuya, N. Iwai, T. Arai, M. Fukuda, S. Takachi, Y. Fu, T. Muzumaji, J. Ogata, J. Higaki, T. Oghura, T-31C polymorphism of angiotensinogen gene and essential hypertension, *Hypertension* 37 (2000) 283–285.
- L. Nordfors, M. Janzon, G. Sundberg, C. Lavebratt, S. Seung, M. Schalling, P. Amer, Large-scale genotyping of single nucleotide polymorphisms by pyrosequencing: trade mark and validation against the 5' nuclease (TaqMan) assay, *Hum. Mutat.* 19 (2002) 395–401.
- J.B. de Kok, E.T. Weigerick, B.A. Grienders, D.W. Swinkels, Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel