

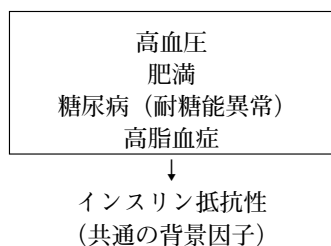
若年性遺伝性高血圧におけるインスリン抵抗性関連遺伝子の追究

●猿田 享男1) ◆林 松彦1) ◆大野 洋一2) ◆森居 俊行1) ◆江口 高1)

1)慶應義塾大学医学部内科 2)さいたま市立病院内科

〈研究の目的と進め方〉

本態性高血圧患者は正常者と比べ、高率に糖代謝異常、脂質代謝異常、肥満を合併することが知られている。近年、高血圧・糖尿病—耐糖能異常・高脂血症・肥満など、動脈硬化の危険因子が重積することにより虚血性心疾患の発症率が急激に増加することが多くの大規模臨床試験から明らかになっている。これらの危険因子に共通して存在する病態としてインスリン抵抗性が注目されている。インスリン抵抗性とは、筋肉や脂肪細胞などインスリンの標的臓器において細胞内への糖取り込み能が低下している状態とされ、日本人の遺伝性高血圧の成因にとってインスリン抵抗性をはじめとした代謝性要因は極めて重要であり、しかも心血管系合併症発症に対しては、血圧値と共に決定的な役割を担っている。



従来のインスリン抵抗性は、個体レベル、もしくは骨格筋や脂肪細胞などインスリンの標的臓器における組織レベルでの現象、あるいは高血圧発症後の2次的後天的結果とする説が提唱されてきたが、近年インスリン抵抗性には遺伝素因を認めることが明らかにされるようになった。

これまでに我々の研究室では、食塩感受性や高血圧に合併するインスリン抵抗性に、細胞内Ca動態の異常が遺伝的に関与することを明らかにしてきており、この結果を踏まえて本研究においては、高血圧に合併するインスリン抵抗性は遺伝的であることを個体レベル（臨床データを用いた検討）、細胞レベル（リンパ芽球を用いた検討）、遺伝子レベル（SNPsを活用した関連解析）において明らかにすることを目的としている。

我々が対象とする若年の遺伝性血圧高値の男性は、壮年、老年者の高血圧と異なり、環境要因を主とした後天的要因の影響をできる限り排除した最適な対象集団と言える。しかも相当数を解析した上で、更なる層別化解析をすることも可能となる。複雑な多因子遺伝性疾患においては、遺伝的背景の差や環境要因の影響により、各遺伝子の効果が相乗的に増幅されたり、減弱・消失したりすることが知られており、遺伝的背景や臨床的特徴を考慮した検体収集、機能解析、遺伝子解析は、今まで暗礁に乗り上げていた高血圧にかかわる代謝性遺伝要因の解明を加速度的に進展させる有力な方法を提供することとなるであろう。

若年で高血圧・心血管系合併症の家族歴を有さない血圧低値群をコントロールとし、若年で高血圧の家族歴を有する血圧高値群を対象として選別する。採取した血液

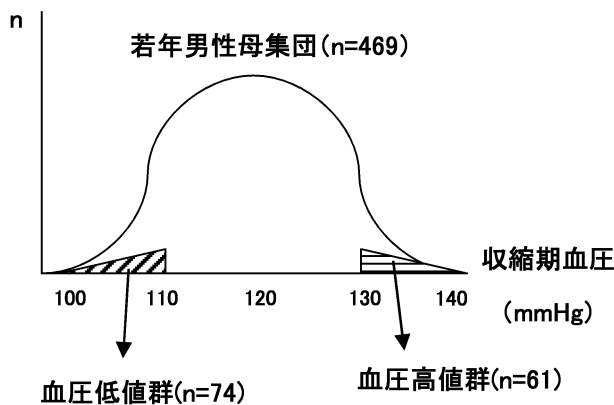
から、不死化したBリンパ芽球を作成し、細胞レベルでの糖の取り込み能に差があるかを検討することにより、高血圧に合併するインスリン抵抗性は遺伝的であることを明らかとする。

本態性高血圧は多元性で、しかも、多因子性の量的形質を示す遺伝性疾患とされてきた。今回、高血圧患者よりリンパ球を分離し、Epstein-Barr virus(EBV)により、形質転換したリンパ芽球とし、様々な機能解析を行えるようにする点も、これまでの報告と大きく異なっている。リンパ芽球の利点を挙げると、1) 血液を用いるため脂肪細胞や筋肉細胞と異なり、被検者から容易に検体を採取することができる、2) リンパ球を不死化することにより、細胞機能が高血糖や高インスリン血症といった二次的な要素に左右される事なく、細胞外液の濃度を自由に設定して細胞機能を測定することができる。このため、糖取り込み能の低下が存在するとすれば、それが二次的要因から惹起されるのではなく、遺伝子異常によって生じていると言える、3) リンパ芽球をストックすることが可能であり、ストックした細胞をサルベージすることにより、安定した状態でサンプル量の制約もなく、繰り返し細胞機能を測定することができる。また、後日リンパ芽球よりDNA、RNAを自由に採取できる。

近年、多くのデータベースよりSNPsデータを入手することが可能になっているが、多くのSNPsデータは欧米人を対象として発見されたものであり、日本人と欧米人では頻度が異なる可能性がある。また、日本人において心血管系疾患の候補遺伝子については必ずしも十分に網羅されていなかった。そこで国立国際医療センターでは、主要なインスリン抵抗性関連遺伝子について日本人DNAを用いてダーレクトシークエンスによるSNPs探索を行い、データベース化している。

(<http://www.jmdbase.jp/index.asp>)

生活習慣病の遺伝的成因に関して、頻度の高いSNPがその発症や合併症に関与しているのではないかという“common disease - common variant(CD-CV)仮説”に基づいて、我々は国際医療センターとの共同研究として、インスリン抵抗性関連遺伝子について日本人で頻度の高いSNPと臨床データとの解析により、個体レベルでのインスリン抵抗性とインスリン抵抗性関連遺伝子との関連解析を行い、遺伝子レベルでのインスリン抵抗性の解明を目的として研究を進める。



個体レベルでのインスリン抵抗性 (全対象)

- ① 血圧値、心血管系疾患の家族歴の有無による若年性遺伝性血圧高値群、血圧低値群の群分け
- ② BMI、糖代謝、脂質代謝関連の指標を解析

細胞レベルでのインスリン抵抗性 (血圧高値群、血圧低値群の一部)

糖輸送担体を介した、インスリン刺激の有無による細胞内への糖取り込み能の差を検討

遺伝子レベルでのインスリン抵抗性

インスリン抵抗性関連遺伝子25個、136SNPsについてTaqmanPCR法を用いた関連解析

図1

検体収集、群分け方法と、階層別の研究アプローチ

〈研究開始時の研究計画〉

(若年男性の検体収集と個体レベルでのインスリン抵抗性の検討)

慶應義塾大学で健康診断を受診する20歳～30歳の若年男性母集団を対象とする。血圧値に対するエストロゲンの影響を考慮し、今回の研究では女性は対象としなかった。母集団の血圧値、脈拍、BMI、空腹時血糖、血漿インスリン濃度 (IRI)、血清総コレステロール、中性脂肪、LDLコレステロール、HDLコレステロール、遊離脂肪酸、尿酸などを測定し、母集団の中で本態性高血圧の家族歴を有する収縮期血圧が130mmHg以上の (若年性遺伝性) 血圧高値群、コントロール群として高血圧・心血管系疾患の家族歴を有さず、収縮期血圧110mmHg以下の血圧低値群を選択する。後日両群について臨床データを比較し、個体レベルでのインスリン抵抗性を検討する。(図1)

(リンパ芽球細胞ラインの樹立)

血圧高値群、血圧低値群について、7mlの血液よりRPMI1640、Ficoll-Conray液を用いてリンパ球を分離する。

分離したリンパ球にEpstein-Barr Virus (EBV) を感染させ、CyclosporinA添加のRPMI1640で培養することによりBリンパ球を不死化し、リンパ芽球細胞ラインを樹立して、リンパ芽球をストックする。なお、どちらの群にも属さない中間群についてはリンパ芽球細胞ラインを樹立せず、DNAのみを抽出する。

(細胞レベルでのインスリン抵抗性)

少数検体で、各種インスリン濃度 (インスリン 0nM, 1nM, 3nM, 10nM) の培地によって血圧高値群と血圧低値群の間で、リンパ芽球の増殖能をcell-countにより比較検討する。また、少数検体で、各種インスリン濃度において3Hでラベルした2-deoxyglucoseと、糖輸送担体の阻害薬であるCytochalasin Bを用いて糖輸送担体を介したリンパ芽球への糖取り込み能に差が見られるか否かを検討して、インスリン刺激の至適濃度を決定する。次にリンパ芽球における糖輸送担体を介したインスリン非刺激下の糖取り込み能、糖輸送担体を介したインスリン刺激による糖取り込み能を、3Hでラベルした2-deoxyglucose、糖輸送担体の阻害薬であるCytochalasin Bを用いて測定する。

(糖代謝、インスリン抵抗性遺伝子の遺伝子解析)

糖代謝、インスリン抵抗性に関連する25遺伝子について、国立国際医療センター研究所と共同研究を行い、スクリーニングとしてのSNPs解析を行う。国際医療センターでは上記遺伝子における全てのExon、プロモーター領域を対象として、健常日本人48名のダイレクトシーケンシングによるSNPs discoveryを行ってきた。この結果発見されたSNPsについて、連鎖不平衡、アレル頻度などを勘案して、136SNPs (平均5.4SNPs/1遺伝子) を選出した。次に、血圧高値群、血圧低値群のリンパ芽球よりDNAを抽出して、TaqManPCR法によるSNPs typingを行い、1次スクリーニングとして有意なSNPsを選出する。これらの有意なSNPsについて母集団全体で2次解析を行い、各種臨床データとインスリン抵抗性関連遺伝子との関連について検討する。

(G Protein beta3 subunit遺伝子C825T多型とリンパ芽球における細胞内Ca異常との関連)

多因子疾患と考えられている本態性高血圧の原因の一つとして、細胞内Ca異常が想定されていることから、若年男性の一部において、G Protein beta3 subunit遺伝子 (GNB3)C825T多型とリンパ芽球における細胞内Ca異常との関連について検討する。細胞内Ca濃度は、血圧高値群 (n=19)、血圧低値群 (n=18) のリンパ芽球を用いて、蛍光分光光度計によりFura-2/AMを負荷し、基礎値とPlatelet-Activating Factor (PAF) (100nM) による刺激値を測定する。また、リンパ芽球よりDNAを精製して制限酵素BsaJ1によるPCR-RFLP法を用いてGNB3C825T多型について解析する。

〈研究期間の成果〉

本研究に同意した母集団は469名に達した。そのうち、血圧高値群 (n=61)、血圧低値群 (n=74) について、リンパ芽球細胞ラインを樹立した。また母集団全例に対して臨床データを収集し、DNAを抽出した。

(個体レベルでのインスリン抵抗性)

両群の臨床データを比較した結果、脈拍、BMI、IRI、

HOMA-R、総コレステロール、中性脂肪、LDL-コレステロール、遊離脂肪酸、尿酸について、血圧高値群は血圧低値群に比して有意に高値であった。また、HDLコレステロールについて血圧高値群は血圧低値群に比して有意に低値であった。従って、血圧高値群は個体レベルのインスリン抵抗性を示した。(表1)

	血圧高値群 (n=61)	血圧低値群 (n=74)	P
年齢	22.9±1.7	22.4±1.4	NS
収縮期血圧	140±10	105±5	<0.0001
拡張期血圧	78±7	61±6	<0.0001
脈拍	82±15	69±10	<0.0001
BMI	22.9±3.7	20.4±2.0	<0.0001
IRI	8.32±3.58	5.49±4.78	0.0002
空腹時血糖	86±8	84±8	NS
HOMA-R index	1.77±0.78	1.17±1.17	0.0008
総コレステロール	182±29	170±25	0.0127
中性脂肪	89±50	70±49	0.0275
LDLコレステロール	108±26	94±22	0.0007
HDLコレステロール	59±12	65±14	0.0099
遊離脂肪酸	0.554±0.208	0.420±0.188	0.0001
尿酸	6.1±0.9	5.7±1.0	0.0096

表1
母集団より血圧値、家族歴の有無により選択した血圧高値群、血圧低値群にでの臨床データの比較

〔個体レベルのインスリン抵抗性〕

収集した両群のうち、一部の検体(血圧高値群(n=10)、血圧低値群(n=10))についてリンパ芽球を用いた細胞機能研究を行った。

両群の臨床データを比較した結果、脈拍、BMI、IRI、空腹時血糖、HOMA-R、総コレステロール、LDL-コレステロールについて、血圧高値群は血圧低値群に比して有意に高値であった。従って、細胞機能解析に用いた血圧高値群でも個体レベルのインスリン抵抗性を示すことを確認した。(表2)

	血圧高値群 (n=10)	血圧低値群 (n=10)	P
年齢	23±2	24±1	NS
収縮期血圧	142±11	103±5	<0.0001
拡張期血圧	85±7	61±8	<0.0001
脈拍	86±9	71±12	0.007
BMI	23.3±4.1	19.9±1.1	0.020
IRI	8.5±3.5	3.8±2.0	0.003
空腹時血糖	88±8	81±6	0.045
HOMA-R	1.9±0.9	0.8±0.4	0.042
総コレステロール	191±37	160±17	0.028
中性脂肪	115±65	71±28	0.064
LDLコレステロール	115±32	85±17	0.016
HDLコレステロール	54±9	64±13	0.068
遊離脂肪酸	0.54±0.23	0.41±0.22	NS
尿酸	6.0±1.2	5.9±1.0	NS

表2
リンパ芽球における細胞レベルの研究における、両群間の臨床データの比較

予備解析として、血圧高値群(n=5)血圧低値群(n=5)を用いて、糖輸送担体を介したリンパ芽球の糖取り込み能を検討した。その結果、両群共にインスリン刺激によって有意に増加したが、1nMのインスリン刺激で取り込み能はプラトーに達した。(図2)

このため、リンパ芽球へのインスリン刺激は1nMの濃度で行うこととして、リンパ芽球を増やして検討した。

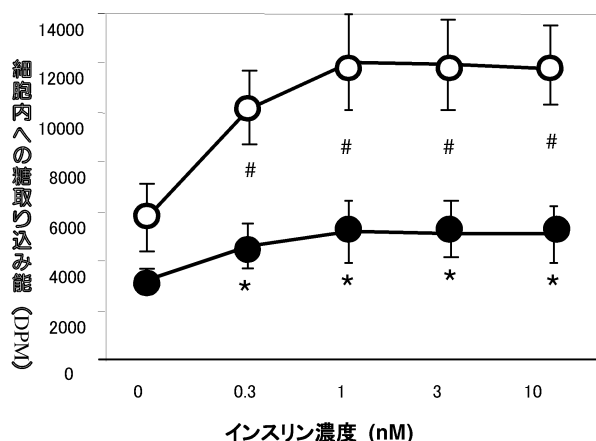


図2
各種インスリン濃度における糖輸送単体を介したインスリン刺激による糖取り込み能の比較。

● 血圧高値群 (n=5); ○ 血圧低値群 (n=5).

*P < 0.001 and #P < 0.0001 (それぞれインスリン濃度 0nM と比較)

Values are means ± SD.

リンパ芽球における、糖輸送担体を介した糖取り込み能は、血圧高値群は血圧低値群に比して有意に低値であり、インスリン刺激により両群共に糖取り込み能は有意に増加したが、両群とインスリン刺激の相互作用を検討した結果、血圧低値群のみがインスリン刺激による糖輸送担体を介した糖取り込み能を有意に増加させた。従って、血圧高値群は細胞レベルにおいてもインスリン抵抗性を示した。(図3)

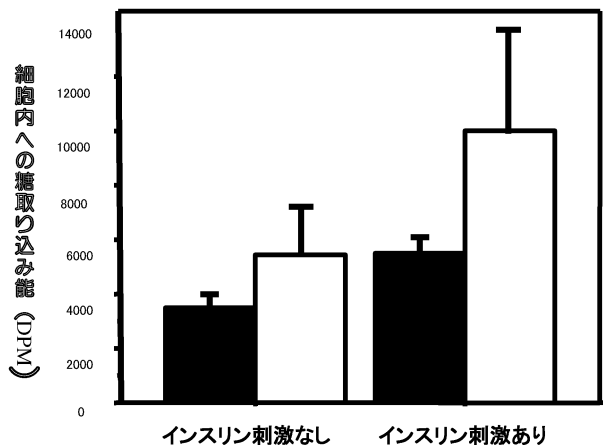


図3
糖輸送担体を介した糖取り込み能
■ 血圧高値群 (n=10) □ 血圧低値群 (n=10)

なお、両群間でリンパ芽球の細胞増殖能を比較した結果、細胞増殖能に有意な差を認めなかった。(図4)

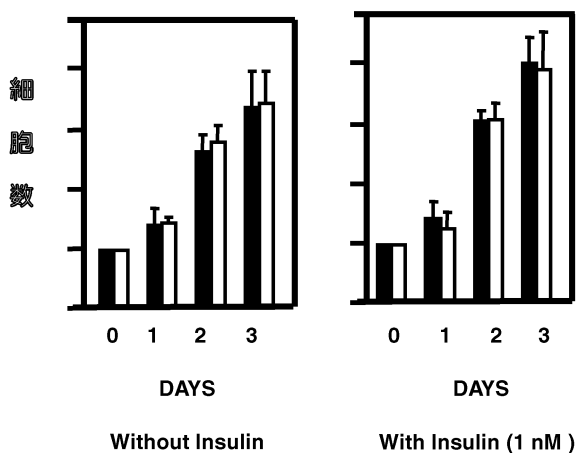


図4
インスリン刺激による細胞増殖能の比較
■ 血圧高値群 (n=10) □ 血圧低値群 (n=10)

上記の結果から、環境要因、加齢などの後天的な影響が血圧値に与える影響の少ない若年男性という母集団において、個体レベル、細胞レベルでのインスリン抵抗性を検証し、血圧高値群に個体レベル、細胞レベルでのインスリン抵抗性を認めることを確認した。

(糖代謝、インスリン抵抗性遺伝子の遺伝子解析)

血圧高値群、血圧低値群の一次スクリーニングを行い、有意なSNPsを相当数選出した。これらについては、母集団全体で2次解析を行い、臨床データと遺伝子型との関連

解析を行った。この結果、これまでにいくつかの動物実験でインスリン抵抗性との関連が指摘されており、脂質代謝に関連する遺伝子に存在する1SNPについて、総コレステロール、LDLコレステロールなどの脂質代謝との間に有意な関連を認めた。(表3)

	AA+AG genotype (n=389)	GG genotype (n=80)	P
年齢	22.7±1.6	22.5±1.4	NS
収縮期血圧 (mmHg)	121±14	124±15	NS
拡張期血圧 (mmHg)	70±8	71±8	NS
脈拍 (bpm)	74±13	78±13	0.012
BMI (kg/m ²)	21.2±2.4	21.7±2.8	0.094
IRI (μU/ml)	6.51±4.11	7.31±4.32	NS
空腹時血糖 (mg/dl)	85±9	85±7	NS
HOMA-R index	1.38±0.92	1.56±0.97	NS
総コレステロール (mg/dl)	176±27	183±42	0.037
中性脂肪 (mg/dl)	75±43	80±52	NS
LDLコレステロール (mg/dl)	101±25	108±39	0.038
HDLコレステロール (mg/dl)	62±13	61±12	NS
遊離脂肪酸 (mEq/l)	0.48±0.22	0.49±0.21	NS
尿酸 (mg/dl)	5.8±0.9	6.0±1.0	0.042

表3
脂質代謝関連遺伝子の1SNP genotype別臨床データの比較

また、インスリン代謝関連遺伝子についてハプロタイプを構築し、血圧高値群と血圧低値群で比較検討した結果、以下のように両群間でハプロタイプ頻度に有意な差を認めた。(表4)

ハプロタイプ	血圧高値群 (n=47)	血圧低値群 (n=48)
CCGTAGGTCC	0.394	0.270
CCGTAGGTCT	0.112	0.151
CCGTAGGTTC	0.071	0.082
TCGTAGGTCT	0.070	0.062
CCGCCTATCT	0.070	0.022
TCGTAGGTCC	0.057	0.094
CCACCTACCC	0.047	0.000
TCGCCTATCC	0.028	0.016
CTGCCTACCC	0.023	0.000
TCGCCGGCCC	0.023	0.000
計	0.897	0.697

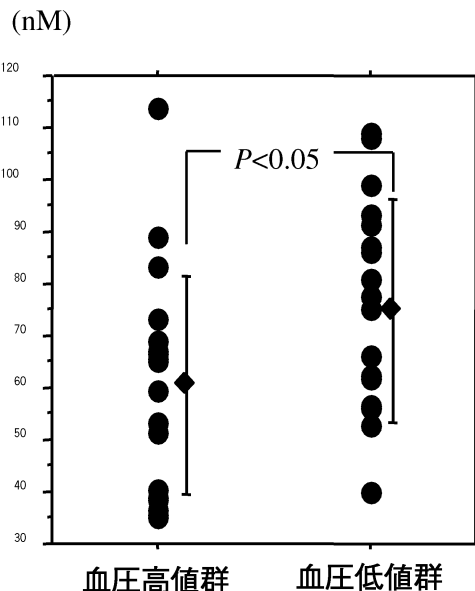


図5
細胞外Ca非存在下でのPAF刺激値

P < 0.05

P values were calculated by standard χ^2 analysis.

表4

インスリン代謝関連遺伝子のハプロタイプ頻度と解析結果

血圧高値群におけるハプロタイプ頻度上位10組を列挙

(G Protein beta3 subunit遺伝子(GNB3)C825T多型とリンパ芽球における細胞内Ca異常との関連)

血圧高値群において、従来の報告とは異なり、PAF刺激時の細胞内Caは有意に低値を示し、細胞内Caの低反応が中間表現型になるという事を明らかにした。また、GNB3 C825T多型は、細胞外からのCaの流入量の分散に影響を与える可能性を示した。

血圧高値群と血圧低値群では、細胞内Ca濃度は、基礎値には有意差を認めなかった。細胞外Ca存在下でPAF刺激値に有意差を認めなかったが、細胞外Ca非存在下でPAF刺激値は血圧高値群で有意に低かった(図5)。GNB3 C825T多型のアレル頻度は血圧高値群でCC 3例(16%)、CT 12例(63%)、TT 4例(21%)であり、血圧低値群はCC 7例(37%)、CT 9例(47%)、TT 3例(16%)であり、Tアレルと高血圧との関連を支持する傾向はあるものの有意ではなかった(図6)。細胞外からのCaの流入量はGNB3 C825T遺伝子型がCT型の時に分散が増大する傾向を認めた。従来の報告との相違は、主として血圧高値群の中でTT型を示したものが細胞内Ca値が低値を示したことに起因しており、今後、その理由の解明が必要と考えられた。

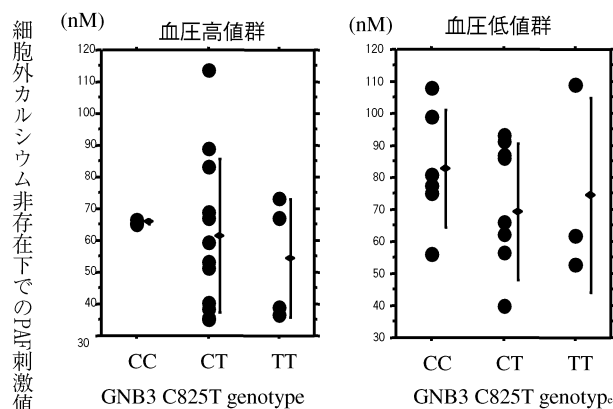


図6

GNB3 C825T genotypeと細胞外Ca非存在下のPAF刺激値の関係

<国内外での成果の位置づけ>

本研究は、若年性遺伝性血圧高値群というユニークなサンプルを用いた研究である。遺伝的要因が濃厚であり、将来心血管合併症を発症する危険性の高いHigh risk groupにおいて、インスリン抵抗性関連遺伝子の関与が判明した。この研究の成果は、今後インスリン抵抗性・高血圧を背景とした動脈硬化の予防に関わる新たな診断方法および治療法の開発に影響を及ぼすものとする。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

三省合同で告示されているヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき本研究を進めており、倫理上のトラブルは生じていない。

ただし、一人当たりには多くの説明時間を要すること、個人情報保護の風潮の高まりなどで、検体収集の増加が

鈍化してきた。同意取得に際しては、医師、治験コーディネーターの経験を積んだ薬剤師等を増員して対応したが、当大学の特殊健康診断受診者を対象としていたため、複数年度にまたがって受診する対象も多く、研究年度が経過するに従って検体の収集効率が低下した。

また細胞機能解析として、糖代謝関連遺伝子の発現解析を行い、遺伝子解析の結果との関連について検討する予定であったが、日程の関係で更なる追究は困難であった。

〈今後の課題〉

脂質代謝関連遺伝子についての解析結果、インスリン代謝関連遺伝子のハプロタイプ解析結果については、現在投稿準備中である。

また、細胞機能解析用にリンパ芽球のストックを作成しており、インスリン抵抗性関連遺伝子について網羅的な発現解析を行いたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1

Morii T, Ohno Y, Hirose H, Kawabe H, Ogata T, Hirao K, Eguchi T, Maruyama T, Kanno Y, Hayashi M, Saito I, Saruta T.

Cellular insulin resistance in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblasts from young insulin-resistant Japanese men. *Metabolism*. 54(3), 370-375 (2005).

2

Ohno Y, Suzuki H, Yamakawa H, Nakamura M, Kato Y, Saruta T.

Correlation of sodium-related factors with insulin sensitivity in young, lean, male offspring of hypertensive and normotensive subjects. *J Hum Hypertens*. 15(6). 393-399(2001).

3

Ohno Y, Suzuki H, Yamakawa H, Nakamura M, Saruta T.

Insulin sensitivity and calcium homeostasis in young, lean, normotensive male subjects. *Hypertens Res*. 23(5), 433-440 (2000).

4

Ohno Y, Suzuki H, Tanase H, Otsuka K, Sasaki T, Suzawa T, Morii T, Ando Y, Maruyama T, Saruta T.

Quantitative trait loci mapping for intracellular calcium in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 18(5 Pt 1), 666-671 (2005).