

生活習慣病に関連する因子群の 遺伝子多型に関する検討

森木 隆典* 柴田 洋孝* 広瀬 寛* 横山 裕一*
村田 満** 渡辺 清明** 齊藤 郁夫*

代表的な生活習慣病（成人病）である動脈硬化症ならびに骨粗鬆症の危険因子を明らかにするためには、個人のライフスタイル、食事栄養状態、ならびに健康診断における理学的、生化学的データを解析することが重要であるが、近年これらの情報と合わせて遺伝的素因が注目されている。もちろん、生活習慣病の発症が遺伝的素因のみで決まる訳ではなく、生活習慣の関与がより大きいと考えられるが、遺伝的素因・体質の評価は今後の予防医学にとって不可欠なものになると予想される。また、遺伝的素因に関しては、人種差がかなり大きいことが明らかになっており、そのデータに関しては欧米のものをそのまま受け入れて使用することは適切ではなく、独自のデータ収集が必要であると考えられる¹⁾。

本稿では、慶應義塾大学保健管理センターと慶應義塾大学病院中央臨床検査部の共同研究として、生活習慣病である動脈硬化症に焦点を当て、予想される危険因子群に関し遺伝子多型解析を試みた結果を概説する。具体的には、血管関連因子、血圧調節因子、脂質代謝関連因子、血液凝固線溶因子、血小板因子などの各因子群より代表的な因子を選んで遺伝子多型を検討し、疾患との関連を正常群と疾患群で比較した結果である。

対象と方法

1. 対象

K 大学教職員を対象として、健康診断時にインフォームドコンセントを取得した上でサンプルを取得した。また、脳血管障害（CVD）、閉塞性動脈硬化症（ASO）、閉塞性血栓性血管炎（TAO）、糖尿病（DM）、冠動脈疾患（CAD）を有する患者より、インフォームドコンセントを取得した上でサンプルを取得した。

2. 方法

同意の得られた教職員ならびに患者の末梢白血球より DNA を抽出し、各因子の遺伝子に対応するプライマーにより目的 DNA 領域の遺伝子増幅（PCR: polymerase chain reaction）を行い、遺伝子多型を識別する制限酵素による制限酵素分解断片長多型（RFLP: restriction fragment length polymorphism）により、各因子の遺伝子多型を解析した。このようにして得られた遺伝子多型の結果と理学的所見、各種臨床検査成績との関連を統計解析した。

成績および考察

1. 血管関連因子

1) パラオキシネース（PONA: Paraoxonase）

PONA は、HDL に結合した血漿蛋白で、LDL の酸化を抑制することにより抗動脈硬化

* 慶應義塾大学保健管理センター

** 慶應義塾大学病院中央臨床検査部

作用を有している。遺伝子多型 192 Gln/Arg は、その血中濃度と関連しており、冠動脈疾患等の発症率と関連するという報告がある。今回、この多型の2型糖尿病患者 (NIDDM), CVD, ASO における頻度を検索し、特に NIDDM において動脈硬化進展度を、腹部 CT スキャンによる大動脈狭窄率・石灰化率より評価し解析を行った。

a) 正常群と NIDDM, CVD, ASO 患者群における 192 Gln/Arg 多型の頻度

タイプ別出現頻度は、正常群に比べて NIDDM で Arg/Arg タイプが若干多い傾向があるが、有意差は認められなかった (表1A)。

b) NIDDM 患者における 192 Gln/Arg 多型と腹部大動脈狭窄率・石灰化率との関連

狭窄率においては、遺伝子型別における差は認められなかったが、石灰化率では Arg/Arg > Gln/Arg > Gln/Gln の関係が認められた (表1B)。

2. 血圧調節因子

1) アンギオテンシン変換酵素 (ACE: Angiotensin Converting Enzyme)

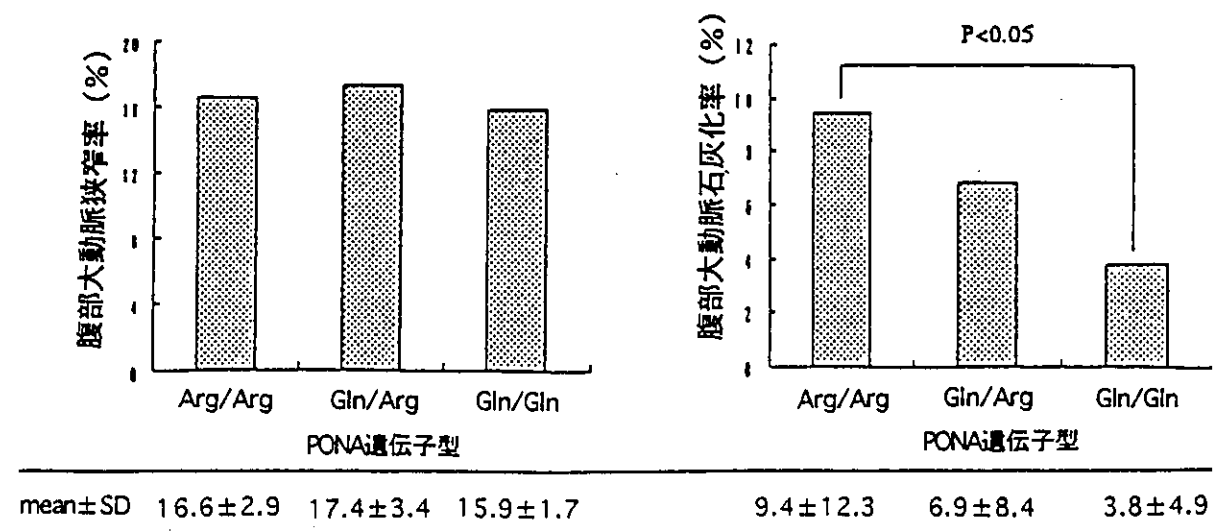
ACE 遺伝子のイントロン16における多型である 287 bp の挿入 (I), もしくは欠失 (D) は、ACE の血中濃度と関連することが報告されている²⁾。今回、この遺伝子型の正常群、CVD, ASO, TAO, DM, CAD 各患者群との頻度を解析し、さらに正常群における遺伝子

表1A パラオキシネースタイピング結果

	n	遺伝子タイプ (%)			P
		Gln/Gln	Gln/Arg	Arg/Arg	
NIDDM	195	19(9.7)	89(45.6)	87(44.6)	0.40
CVD	200	23(11.5)	101(50.5)	76(38.0)	0.53
ASOその他	79	14(17.7)	46(58.2)	19(24.5)	0.02
コントロール	333	45(13.5)	152(45.6)	136(40.8)	
文献例 (日本人)	115	17(14.8)	61(53.0)	37(32.2)	

NIDDM : 2型糖尿病, CVD : 脳血管障害, ASO : 閉塞性動脈硬化症

表1B NIDDM 患者群における腹部大動脈狭窄率・石灰化率と PONA 遺伝子多型



型と ACE 活性値・高血圧との関係, 各患者群において細分化した場合の遺伝子型との関係を解析した。

a) 正常群と患者群における I/D 多型の頻度

正常群に関しては, II 型 42%, ID 型 44%, DD 型 14%であった。患者群では, CVD および CAD において DD 型の頻度が若干高かった。ASO, TAO, DM 群では, 正常群と同様の頻度であった (表 2A)。

b) 正常群における ACE 活性値と I/D 多型

正常群を, 男女・男性のみ・女性のみにおいて検討した。男性において, DD 型が II 型や ID 型に比較し有意に高値を示した。女性では, II 型との比較で DD 型が有意に高値を示した。

c) 正常群における血圧と I/D 多型

降圧薬投与中のサンプルは除外し検討した。収縮期血圧において, 男性においては DD 型が II 型, ID 型と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。女性では, 有意差が認められなかった (表 2B)。また, 拡張期血圧においては, 男性において DD 型が若干高値を示したが有

意ではなかった。

3. 脂質代謝関連因子

1) 血漿コレステリルエステル転送蛋白 (CETP: Cholesteryl Ester Transfer Protein)

CETP は, HDL からのコレステロールエステルや, VLDL から LDL における TG の交換や転送反応を特異的に促進し, HDL 代謝に深く関与する蛋白である。HDL の抗動脈硬化作用との関連から CETP は注目されている。ここでは, CETP の多型の一つである TaqIB 遺伝子型 (B1/B2) について, 正常群, DM および ASO の患者群で比較検討した。

a) 正常群と患者群における TaqIB 多型の頻度

タイプ別出現頻度は, 正常群と比べて DM および ASO で有意差は認められなかった (表 3A)。

b) 正常群における多型と生化学データおよび CETP 濃度

表 3B に示すように, CETP 遺伝子多型と主な生化学データに有意な差は認められなかつ

表 2 A アンジオテンシン変換酵素タイピング結果

Control

		ACE genotype			Allele frequency	
		II	ID	DD	I	D
健診検体	(n=141)	62 (44%)	67 (48%)	12 (9%)	0.68	0.32
60~65才	(n= 70)	19 (27%)	39 (56%)	12 (17%)	0.55	0.45
信濃町	(n=248)	103 (42%)	105 (42%)	40 (16%)	0.63	0.37
三田 (51~60才男)	(n=109)	53 (49%)	41 (38%)	15 (14%)	0.67	0.33
合計	(n=568)	237 (42%)	252 (44%)	79 (14%)	0.64	0.36

疾患群

		ACE genotype			Allele frequency	
		II	ID	DD	I	D
CVD検体	(n=200)	89 (45%)	77 (39%)	34 (17%)	0.64	0.36
ASO・TAO検体	(n= 99)	38 (38%)	48 (48%)	13 (13%)	0.63	0.37
DM検体	(n=299)	119 (40%)	136 (45%)	44 (15%)	0.63	0.37
CAD検体	(n=100)	42 (42%)	39 (39%)	19 (19%)	0.62	0.39

表 2 B 血圧正常群における収縮期血圧と ACE 遺伝子多型

男女						男性						女性					
	全体	II	ID	DD	II+ID		全体	II	ID	DD	II+ID		全体	II	ID	DD	II+ID
N	321	140	131	50	271	N	174	84	65	25	149	N	147	56	66	25	122
MEAN	120.9	121.4	118.9	124.5	120.2	MEAN	123.0	121.5	121.9	131.0	121.7	MEAN	118.4	121.3	116.1	118.0	118.5
S.D.	16.4	15.4	15.2	21.0	15.3	S.D.	16.9	17.4	14.4	19.5	16.1	S.D.	15.5	12.2	15.5	20.8	14.2
M+SD	137.3	136.8	134.1	145.5	135.5	M+SD	139.9	138.9	136.3	150.5	137.8	M+SD	133.9	133.5	131.6	138.8	132.7
M-SD	104.5	106.0	103.7	103.5	104.9	M-SD	106.1	104.1	107.5	111.5	105.6	M-SD	102.9	109.1	100.6	97.2	104.3

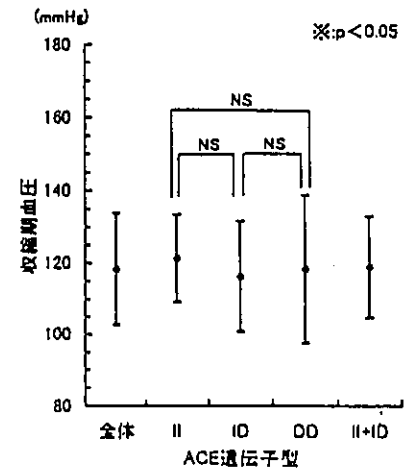
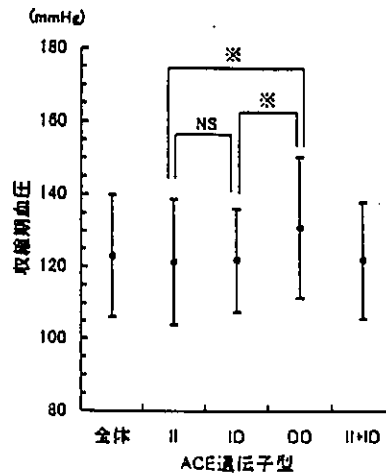
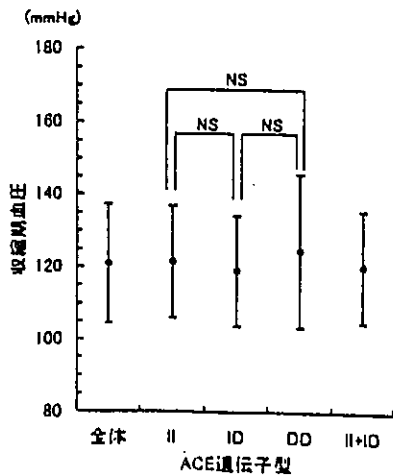


表 3 A 血漿コレステリルエステル転送蛋白タイピング結果

	n	遺伝子タイプ (%)		
		B1/B1	B1/B2	B2/B2
DM	195	78(40.0)	85(43.6)	32(16.4)
ASO その他	79	24(30.4)	40(50.6)	15(19.0)
コントロール	333	104(31.2)	180(54.1)	49(14.7)
文献例 (欧米人)	724	258(35.6)	346(47.8)	120(16.6)

DM : 糖尿病、ASO : 閉塞性動脈硬化症

表 3 B 正常群における生化学データと CETP 遺伝子多型

		B1/B1 (n = 71)	B1/B2 (n = 118)	B2/B2 (n = 30)	p value
Total cholesterol	(mg/dl)	208.7 ± 32.9	209.5 ± 30.9	208.6 ± 28.6	0.98
HDL cholesterol	(mg/dl)	58.6 ± 15.7	59.3 ± 14.8	64.8 ± 14.9	0.15
LDL cholesterol	(mg/dl)	131.5 ± 32.5	133.5 ± 27.7	128.5 ± 27.9	0.69
Triglycerides	(mg/dl)	105.4 ± 48.9	56.4 ± 19.9	56.4 ± 19.9	0.06
CETP concentration	(μg/ml)	2.67 ± 0.66	2.63 ± 0.65	2.20 ± 0.57	<0.01

たが, CETP 濃度との関係は B1/B1 > B1/B2 > B2/B2 であった。また, HDL-C 濃度との関連を報告したものがあるが, 今回の検討では関連は認められなかった。

4. 血液凝固線溶因子, 血小板因子

1) 血液凝固 XII 因子 (FXII)

FXII は, 血液凝固における接触相に働く因子の一つであり, 異物である陰性荷電体に接すると活性化し, セリンプロテアーゼとして以降の内因性凝固反応を進めることになる。さらには線溶系の活性化, キニン生成にも関与し, その増加は血栓症の発症と関連している可能性が示唆されている。FXII 遺伝子のエクソン 1 には 46C/T 多型が存在し, 抗原量・活性と関連しているという報告があるが, 疾患との関連は明らかにされていない。今回, 虚血性 CVD における 46C/T 遺伝子型の出現頻度と病型, 関連因子について検討した^{3), 4)}。

a) 正常群と患者群における 46C/T 多型の頻度

日本人正常群の多型頻度は, 報告されているコーカシアン正常群とは異なり, 人種差が認められた。CVD 患者群において, 特にアテローム血栓性脳梗塞で C/C 型の頻度が高く, 正常群との間に有意差が認められた (表 4A)。

b) 患者群における FXII 活性と 46C/T 多型の関連

CVD 患者群において, FXII 活性は 46C/T 多型に強く依存していた (表 4B)。

2) 線溶系因子 (PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1)

PAI-1 は, 線溶系の重要な抑制因子であり, 血中 PAI-1 レベルの上昇とインスリン抵抗性, 肥満, 動脈硬化などの関連が報告されており, さらに血栓症との関連が注目されている。

PAI-1 4G/5G 遺伝子多型はプロモーター領域

表 4A 血液凝固 XII 因子タイピング結果

	n	T/T (%)	T/C (%)	T/C (%)
正常群	333	145(43.5)	157(47.2)	31(9.4)
全 CVD 患者	194	80(41.2)	90(46.4)	24(12.4)*
・アテローム血栓性脳梗塞	49	25(51.0)	15(30.6)	9(18.4)**
・TIA	23	7(30.4)	14(60.9)	2(8.7)
・ラクナ梗塞	122	48(39.3)	61(50.0)	13(10.7)
コーカシアン正常群 (Kohler et al.)	185	14(7.6)	84(45.4)	87(47.0)

*P=0.530 (対正常群), **P=0.039 (対正常群)

CVD : 脳血管障害, TIA : 一過性脳虚血発作

表 4B CVD 患者群における FXII 活性と FXII 遺伝子多型

	T/T	T/C	C/C	P
Age (m±SD)	58.0 ± 7.7	58.9 ± 7.2	56.9 ± 8.7	0.47
Sex (male/female)	64/16	68/22	17/7	0.60
Body mass index (kg/m ²)	23.5 ± 2.7	24.0 ± 2.5	23.5 ± 2.6	0.63
Smkking (%)	40/71(56.3%)	44/80(55.0%)	9/23(39.1%)	0.33
Hypertension (%)	38/79(48.1%)	56/88(63.6%)	17/24(70.1%)	0.051
Hypercholesterolemia (%)	21/76(27.6%)	31/83(37.3%)	8/23(34.8%)	0.42
Diabetes mellitus (%)	22/79(27.8%)	23/88(26.1%)	7/24(29.2%)	0.94
APTT (sec)	28.9 ± 3.5	27.8 ± 3.2	26.5 ± 2.5	0.0508
FXII activity (%)	64.4 ± 14.3	104.4 ± 20.8	138.2 ± 26.5	<0.0001

に存在する多型であり、その転写活性と関連しているとされている。4G/4G型は、他の遺伝子型に比べて PAI-1 の抗原量・活性が高くなると報告されている。そこで、4G/5G 多型の正常群と NIDDM, ASO, TAO などの疾患群での頻度を検討した。さらに、NIDDM 患者群で、この多型が動脈硬化危険因子との関連で血漿 PAI-1 レベルに影響を与える可能性を検討した。

a) 正常群と患者群における 4G/5G 多型の頻度
表 5A に示すように、PAI-1 4G/5G 遺伝子

多型は、正常群と比較していずれの疾患群でも 4G/4G 型がリスクファクターであるという結果は得られなかった。

b) NIDDM 患者群における 4G/5G 多型と動脈硬化危険因子の血漿 PAI-1 レベルに及ぼす影響

表 5B に示すように、4G/4G 型 NIDDM 患者は、喫煙や高血圧を有すると血漿 PAI-1 レベルが上昇しやすい傾向が予想された。

3) 血小板因子 (GPIb: Glycoprotein Ib)

血小板膜蛋白 GPIb は、障害された動脈血管壁への血小板の粘着に重要な役割を果たして

表 5A PAI-1 タイピング結果

	n	PAI-1 Genotype			allele frequency		P value
		4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G	5G	
CVD	228	93(40.3%)	111(48.7%)	24(10.5%)	0.65	0.35	0.9178
A	49	20(40.8%)	24(49.0%)	5(10.2%)	0.65	0.35	0.9704
L	122	56(45.9%)	55(45.1%)	11(9.0%)	0.68	0.32	0.8117
T	23	5(21.7%)	15(65.2%)	3(13.1%)	0.54	0.46	0.1461
NIDDM	290	108(37.2%)	145(50.0%)	37(12.8%)	0.62	0.38	0.3537
ASO/TAO	98	29(29.6%)	54(55.1%)	15(15.3%)	0.57	0.43	0.0575
AAA	36	14(38.9%)	16(44.4%)	6(16.7%)	0.61	0.39	0.5038
ASO	42	11(26.2%)	26(61.9%)	5(11.9%)	0.57	0.43	0.1255
TAO	9	1(11.1%)	6(66.7%)	2(22.2%)	0.44	0.56	0.1380
Control	284	121(42.6%)	134(47.2%)	29(10.2%)	0.66	0.34	

CVD: 脳血管障害, A: アテローム血栓性脳梗塞, L: ラクナ梗塞, T: TIA (一過性脳虚血発作), NIDDM: 2 型糖尿病, AAA: 腹部大動脈瘤, ASO: 閉塞性動脈硬化症, TAO: 閉塞性血栓性血管炎

表 5B NIDDM 患者群における動脈硬化危険因子、PAI-1 血漿濃度と PAI-1 遺伝子多型

		4G/4G		4G/5G+5G/5G	
		PAI-1ag	P value	PAI-1ag	P value
SEX	Male	12.8 ± 10.3	0.0667	9.2 ± 7.8	0.7207
	Female	9.0 ± 4.7		9.6 ± 6.5	
Hyperlipidemia	P	13.9 ± 9.7	0.0648	10.9 ± 6.7	0.2039
	N	9.4 ± 6.7		8.8 ± 7.7	
Hypertension	P	14.2 ± 10.2	0.0285	10.2 ± 8.4	0.3204
	N	9.6 ± 7.2		8.9 ± 6.3	
Smoking	P	17.4 ± 10.9	0.0003	10.1 ± 7.2	0.6966
	N	9.1 ± 6.6		9.4 ± 7.5	

*PAI-1ag (ng/ml); MEAN±SD

P: 患者群, N: 正常群, ag: 抗原量

おり、動脈硬化に伴う血栓症への関連が予想されている。GPIb は、145 番目のアミノ酸置換を伴う多型である 145 Thr/Met (T/M) を有しており、蛋白機能への影響から血小板の粘着能の違いが生じる可能性があり、血栓性疾患との関連に興味をもたれている。そこで、正常群と虚血性 CVD 疾患群との T/M 多型の頻度に関し検討した。

CVD 患者における TM+MM タイプの出現頻度は 26.5%と正常群の 14.2%に比べて有意に高く (表 6 A)、さらにCVD 患者群を一過性脳虚血発作 (TIA)、ラクナ梗塞、アテローム硬化性梗塞の病型別に分けて検討した結果、TIA とラクナ梗塞では TM+MM タイプに有意差を認めたが、アテローム硬化性梗塞には有意な関連を認めなかった (表 6 B)⁵⁾。

動脈硬化症の予想される危険因子群である血管関連因子、血圧調節因子、脂質代謝関連因子、血液凝固線溶因子、血小板因子について、それぞれ代表的な危険因子を選び、遺伝子多型頻度を正常群と動脈硬化性疾患群で比較し、さらに遺伝子多型と理学的所見、生化学的所見の関連性について検討した。

検討した因子の中で、正常群と疾患群の間で頻度の差異に明らかな有意差が認められたのは、血液凝固第 XⅡ 因子 (FXⅡ) の 46 C/T 多型、血小板膜蛋白 GPIb の 145 Thr/Met 多型であった。FXⅡ の 46 C/T 多型は、FXⅡ の抗原量・活性と強く関連していることが報告されており、また GPIb の遺伝子多型は、アミノ酸の置換をもたらし蛋白機能に影響を及ぼす可能性があり、両者とも蛋白レベルでの変化が直接的に疾患の発症頻度に影響する因子であることが予想

表 6 A GPIb タイピング結果

	all subjects			males			females		
	TT (%)	TM+MM (%)	P	TT (%)	TM+MM (%)	P	TT (%)	TM+MM (%)	P
control (n=317)	272 (85.8)	45 (14.2)		189 (84.0)	36 (16.0)		83 (90.2)	9 (9.8)	
CVD (n=200)	147 (73.5)	53 (26.5)	0.0005	116 (73.9)	41 (26.1)	0.0153	31 (72.1)	12 (27.9)	0.0068

CVD : 脳血管障害

表 6 B CVD 患者群における病型と GPIb 遺伝子多型

	TT	TM+MM	p
	n(%)	n(%)	
control	272(85.2)	43+2(14.2)	
subtypes of CVD			
TIA	14(58.3)	10+0(41.7)	0.0004
lacunar stroke	92(73.6)	32+1(26.4)	0.0024
atherothrombotic stroke	41(80.4)	9+1(19.6)	0.3143
cerebral lesions			
multiple	46(73.0)	16+1(27.0)	0.0121
single	87(77.0)	25+1(23.0)	0.0303

TIA : 一過性脳虚血発作

された。

血管関連因子 PONA の 192Gln/Arg 多型、血圧調節因子 ACE の I/D 多型については、疾患群全体としてはその多型頻度に正常群との有意差を認めないが、前者では NIDDM 患者の腹部大動脈石灰化率、後者では血圧の性差など疾患群を細分化して比較すると有意差を認めた。これらの因子は、単独で疾患の発症頻度に影響を及ぼすほどではないが、他の因子と関連して疾患の病態や易発症性に関連している可能性があると思われた。

脂質代謝関連因子 CETP、線溶系因子 PAI-1 については、両者ともそれぞれの多型と血漿中抗原量・活性との関連は明らかであったが、疾患群との関連は認めなかった。これらの因子は、動脈硬化性因子としては十分にその関連が予想されるものであるが、疾患の発症因子としては、他の因子の影響がより強く関与するグループに属するものと考えられた。

以上のごとく、代表的な動脈硬化性因子の遺伝子多型と生活習慣病の発症頻度について検討したが、遺伝子多型の関与の程度は因子によって差異が認められた。今後、さらに動脈硬化性危険因子群を検討し、各疾患群の発症頻度への影響も検討し、その関与が強いと思われるものを選択していくことが必要である。それらの危険因子群の遺伝子多型を組み合わせ、疾患発症に対する影響を多変量的に解析することにより、各個人別の生活習慣病発症危険率が求められる可能性があり、個人の特徴に合わせた予防を効果的に実践できることが期待される。

総 括

1. 動脈硬化症の代表的な危険因子群の遺伝子多型と疾患発症頻度の関連について検討した。危険因子群として、血管関連因子パラオキソネース (PONA)、血圧調節因子アンギオテ

ンシン変換酵素 (ACE)、脂質代謝関連因子血漿コレステリルエステル転送蛋白 (CETP)、血液凝固線溶因子・血小板因子である凝固 X II 因子 (FX II)、PAI-1、血小板膜蛋白 GPIb を選択し、その遺伝子多型を解析した。

2. PONA の 192Gln/Arg 多型は、NIDDM 患者の腹部大動脈石灰化率において Arg を有するものが有意に多く認められた。
3. 血圧調節因子 ACE の I/D 多型は、男性血圧正常群において、DD 型が ID 型、II 型より収縮期血圧が有意に高値を示した。
4. CETP の B1/B2 多型は、B1 を有するものの CETP 濃度が高いことが示されたが、疾患群の頻度では有意差を認めなかった。
5. FX II の 46C/T 多型は、虚血性脳血管障害 (CVD) において C/C 型頻度が多く、特にアテローム血栓性脳梗塞で強く差異が認められた。
6. PAI-1 の 4G/5G 多型では、4G/4G 型 NIDDM 患者で喫煙、高血圧を有する群で血漿 PAI-1 濃度が高くなる傾向が認められたが、疾患別頻度では有意差を認めなかった。
7. GPIb の 145Thr/Met (T/M) 多型は、CVD において M 型 (TM もしくは MM) を有する頻度が多く、一過性脳虚血発作 (TIA) とラクナ梗塞に有意差を認めたが、アテローム硬化性では有意差を認めなかった。
8. 今後、さらに多くの危険因子群の選択を行い、多因子の遺伝子多型解析による疾患発症率を検討する必要がある。

文 献

- 1) Murata M: Genetic polymorphisms and thrombotic disorders in the Japanese population. Fibrinolysis & Proteolysis 14: 155-164, 2000
- 2) Matsubara Y, et al: Angiotensin converting

enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with plasma antigen levels of plasminogen activator inhibitor-1 in healthy Japanese population. Blood Coagul Fibrinolysis 11: 115-120, 2000

- 3) Oguchi S, et al: Genotype distribution of the 46C/T polymorphism of coagulation factor X II in the Japanese population: absence of its association with ischemic cerebrovascular disease. Thromb Haemost 83: 178-179, 2000

- 4) Ishii K, et al: Activated factor X II levels are dependent on factor X II 46C/T genotypes and factor X II zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. Blood Coagul Fibrinolysis 11: 277-284, 2000

- 5) Sonoda A, et al: Association between platelet glycoprotein Ib α genotype and ischemic cerebrovascular disease. Stroke 31: 493-497, 2000