

助成番号 9921

食塩感受性と関連する遺伝因子の同定と機能解析

助成研究者：荻原 俊男（大阪大学大学院医学系研究科 加齢医学講座）
 共同研究者：檜垣 實男（大阪大学大学院医学系研究科 加齢医学講座）
 森下 竜一（大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療講座）
 勝谷 友宏（大阪大学大学院医学系研究科 加齢医学講座）

食塩感受性は高血圧を規定する重要な要因であり、塩分制限は高血圧加療の柱の一つにもなっているが、塩分制限の効果には個人差が大きいことが知られている。本研究では、食塩感受性と関連する遺伝子多型の同定と、本態性高血圧症、食塩感受性との相関を検討することにより、食塩感受性を規定する具体的な遺伝的資質を明らかにし、高血圧罹患リスクの定量的予測や、発症前からの生活指導、薬剤の選択に生かし、超高齢化社会における循環器死亡の軽減を目的とし、研究を計画、実施した。

研究の対象として、①大阪大学医学部附属病院老人科に通院または入院中の患者、および②1986年に開始された世界初の24時間自由行動下血圧および家庭における自己測定血圧（家庭血圧）に基づくコホート研究である大迫研究（岩手県大迫町）の参加者の中より、遺伝子解析のインフォームドコンセントを得られたものを用いた。表現型としては、血圧値や各種生化学的検査値に加え、阪大研究ではレニン活性やアルドステロン濃度の測定、大迫研究では24時間自由行動下血圧に加え、頭部MRIを用いたラクナ梗塞やPVH (periventricular hyperintensity)の定量的評価を実施した。食塩感受性を有する候補遺伝子多型として、CPY11B2/Lys173Arg 多型、 α -adducin 遺伝子の Gly460Trp 多型、G 蛋白 β 3/C825T 多型をPCR-RFLP法にて同定した。

検討を行った3つの遺伝子多型と高血圧の有無、血圧に関するあらゆる指標との間に有意な相関は認められなかった。唯一、大迫研究において、G 蛋白 β 3/C825T 多型と総コレステロール濃度、血清カリウム値の間に有意な関連が認められた。欧米白人集団で報告されたリスクアレル頻度は日本人において高い傾向が認められたにも関わらず、血圧や電解質、レニン-アンジオテンシン系への影響に特記すべきものは無いと考えられた。G 蛋白 β 3/C825T 多型とコレステロール値、血清 K 値との間に有意な相関が観察された理由に関しては、不明な点が多いが、LDL 受容体が G 蛋白 β 3 サブユニットによって調節されているとする報告や、細胞内 K 濃度の減少、pH の上昇、Na-H exchanger と G 蛋白の関連なども考えられ、今後の *in vitro* での検討が待たれるところである。

現在、世界中でポストゲノムプロジェクトとして SNP (single nucleotide polymorphism) の意義に注目が集まっているが、SNP 解析を押し進めるには、対象者の表現型の把握を充実させることが肝要であると考えられる。

2

助成番号 9921

食塩感受性と関連する遺伝因子の同定と機能解析

助成研究者：荻原 俊男（大阪大学大学院医学系研究科 加齢医学講座）
共同研究者：檜垣 實男（大阪大学大学院医学系研究科 加齢医学講座）
森下 竜一（大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療講座）
勝谷 友宏（大阪大学大学院医学系研究科 加齢医学講座）

① 研究目的

食塩感受性は高血圧を規定する重要な要因であり、塩分制限は高血圧加療の柱の一つにもなっているが、塩分制限の効果には個人差が大きいことが知られている。本研究では、食塩感受性と関連する遺伝子多型の同定と、本態性高血圧症、食塩感受性との相関を検討することにより、食塩感受性を規定する具体的な遺伝的資質を明らかにし、高血圧罹患リスクの定量的予測や、発症前からの生活指導、薬剤の選択に生かし、超高齢化社会における循環器死亡の軽減を目指す。

本態性高血圧症および原発性アルドステロン症は、いずれも原因不明の多因子疾患であり、複数の原因遺伝子と環境因子が発症、進展に関与していると考えられる。単一遺伝子異常に起因する血圧異常症としては、Liddle 症候群が有名であるが、本症候群の原因の一つである Na チャネルβサブユニット遺伝子では N 末側の変異で Liddle 症候群が¹⁾、C 末側の異常では偽性低アルドステロン症が²⁾起きることが報告されており、一つの遺伝子の変異箇所により全く異なる病態を伴う例として注目されている。一方我々も、これまで本態性高血圧症の原因遺伝子の同定を目的として、候補遺伝子アプローチによるケース・コントロールスタディーを実施し、アンジオテンシノーゲン遺伝子の M235T 多型³⁾や C-18T 多型⁴⁾が独立した危険因子となることを示してきた。これらの結果は、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系および腎臓における電解質の出納に関係するイオンチャネルや共輸送体系の遺伝的異常が、食塩感受性や血圧の異常に大きく関与することを示唆するものであり、Lifton により一つの代謝マップにまとめられた仮説が発表されている⁵⁾。

本研究では、欧米において高血圧感受性を高めると報告された遺伝子の多型解析を実施し、食塩感受性や高血圧性臓器合併症との関連、また食塩感受性に伴うと考えられる電解質や脂質代謝異常と遺伝子多型の関連の検討を実施する。

遺伝子多型は生涯変わらぬものであるが、環境の変化に対する反応性は多型による異なるとされ、疾患感受性を高めると考えられる遺伝子型をもつ人でも、生活習慣の改善に努力すれば、かえってリスクを減らすことができることも報告されている。一例を示せば、アンジオテンシノーゲン遺伝子の M235T 多型の TT 型の方は、高血圧感受性が高いことが知られているが、減塩や減量といった生活習慣の改善に努力すると、MT, MM 型の人よりも高血圧予防効果が高いことが示されている。本研究では、上記のような視点に基づ

き、高血圧とこれを取り巻く病態への遺伝子多型の意義を詳細に検討した。

② 研究方法

1. 対象集団

● 阪大研究

大阪大学医学部附属病院老人科に通院または入院中の患者の中で、遺伝子解析のインフォームドコンセントを得られたものケース・コントロールスタディーの対象者とした。原発性アルドステロン症患者は、画像診断、各種負荷試験、副腎シンチグラフィー等により、当科において確定診断の得られた者を対象とした。高血圧患者は、収縮期/拡張期血圧が160/95mmHg 以上または長期間にわたり降圧薬治療を受けている者で、高血圧の家族歴を有する者と定義した。正常血圧群は、現病歴および既往歴に高血圧、心不全、虚血性心疾患、脳卒中、糖尿病をもたない者で、収縮期/拡張期血圧が140/90mmHg 未満の者と定義し、高血圧群と性、年齢のマッチングを行ったものを使用した。

● 大迫研究

大迫研究は、1986年に開始された世界初の24時間自由行動下血圧および家庭における自己測定血圧(家庭血圧)に基づくコホート研究である。岩手県大迫町は、盛岡市の南30kmに位置する兼業農家が中心の典型的な農村型地域である。1998年度の人口は約7800人であり、住民の多くは町内唯一の病院である岩手県立大迫病院を受診している。家庭血圧は、公民館において医師・保健婦による講習会を実施した後に、オムロンHMC401C[®]を対象世帯へ配布し、起床時および就寝時に一定条件下に測定を実施し、1ヶ月間にわたって記録した。一方、24時間自由行動下血圧は、平日に日本コーリンABPM630[®]を用いて測定を行い、午前9-10時に保健婦が対象者宅または勤務先において脱着をおこなった。また一部対象者については、頭部MRI健診も実施し、T2画像によるラクナ梗塞や傍側脳室高輝度病変(PVH: periventricular hyperintensity)の定量評価を実施した。遺伝子解析および大規模疫学研究に関する研究計画書は、東北大学医学部倫理委員会において審査され承認を得ている。

2. 遺伝子解析

● DNA抽出と個人情報管理

対象者の末梢血5-10mlの採血を実施し、白血球分画を密度勾配法により分離、得られたバッフィコートの中の200 μ lを使用し、QIAamp Blood Kit (QIAGEN Inc.)によりDNAを抽出、残りの分画は-80 $^{\circ}$ C保存とした。対象者の検体には、新たなDNA番号をつけ、実験者には番号のみを、解析者には個人情報非連結化を行った後、データの手渡しをおこなった。

● C-344Y/CPY11B2多型の決定

C-344T多型を挟む形でプライマーを以下の形で設定した : sense: 5'-TTT TGC AAT GAA

CTA AAT CTG TGG TAT A-3', anti-sense: CTG GTC TGA GGA TGC TGA GAA AA-3'。OmniGene™ (Hybaid)を使用してPCR増幅後、*Hind*IIIで37°C, 6hrの制限酵素処理を行い、3% MetaPhor (FMC BioProducts)アガロースゲル電気泳動後のエチジウムブロマイド染色により多型を決定した。TT型は128, 75 bp、CT型は128, 75, 71, 57 bp、CC型は75, 71, 57 bpの断片長多型により同定された。

● α -adducin/Gly460Trp 多型の決定

Gly460Trp 多型を挟む形でプライマーを以下の形で設定した：sense: 5'-CGA CGA AGC TTC CAA GGA-3', antisense: 5'-ACA GTA AGG TAG GCA CAG A-3'。OmniGene™ (Hybaid)を使用して、以下の条件でPCRを実施した：94°Cを5分実施後、94°C;60sec, 51°C;60sec, 72°C;60secを35サイクル。*Pf*MI (New England Biolabs)で37°C, 6時間以上の制限酵素処理を行い、3% MetaPhor (FMC BioProducts)アガロースゲルにて多型を決定した。

● G 蛋白 β 3/C825T 多型の決定

C825T 多型を挟む形でプライマーを以下の形で設定した：sense: 5'-GCT TCC TGC CGC TTG TT-3', antisense: 5'-TGC AGT TGA AGT CGT CGT AG-3'。OmniGene™ (Hybaid)を使用して、以下の条件でPCRを実施した：94°Cを5分実施後、94°C;45sec, 56°C;45sec, 72°C;45secを35サイクル。*Bsa*II (New England Biolabs)で37°C, 6時間以上の制限酵素処理を行い、3% MetaPhor (FMC BioProducts)アガロースゲルにて多型を決定した。

3. 統計学的解析

疾患の有無と遺伝子多型の関連は、分割表分析を用いて検討し、 χ^2 検定により有意差を検討した。血中濃度と多型(3群)の関連は、ANOVA(analysis of variance)により検討し、有意差を認められた時のみ2群間の有意差をFisher法により検定した。

③ 研究結果

1. C-344Y/CPY11B2 多型と高血圧、原発性アルドステロン症の関連

最終的に260名のC-344T/CPY11B2遺伝子多型が決定された。正常血圧群、本態性高血圧群、原発性アルドステロン症群のいずれの多型の分布も、Hardy Weibergの法則により算出された期待値の分布に近似し、両者間の間には有意差は認められなかった(表1)。

正常血圧者と本態性高血圧患者群($\chi^2=0.71$, $p=0.70$)、原発性アルドステロン症群($\chi^2=2.07$, $p=0.36$)の間に、C-344T/CPY11B2多型の分布の有意な差は認められなかったが、TT型の頻度は原発性アルドステロン症>本態性高血圧患者>正常血圧者であった。アリル頻度別の有意差検定も実施したが、結果は変わらなかった。

一方C-344T/CPY11B2多型の分布には、正常血圧者においても白人・日本人間で有意差が認められた($\chi^2=29.4$, $p<0.0001$) (表2)。白人において本態性高血圧症の遺伝的リスクとされたTT型⁹⁾の頻度は、日本人高血圧患者で55.3%と白人の30.5%に比し有意に高値であったが、高血圧との関連は日本人では認められなかった($p=0.70$) (表2)。

また低レニン性高血圧の原因と本遺伝子の関連が報告⁷⁾されていることから、低レニン性高血圧患者における PRA(plasma renin activity)と血漿アルドステロン濃度(plasma aldosterone concentration)と C-344T/CPY11B2 多型の関連も検討した。低レニン性高血圧患者を PRA<0.5ng/ml・h と定義し、各種変数と多型の関連を検討したところ、PAC/PRA 比において TT>CT>CC の傾向が認められたが(表3)、有意差は認められなかった(F値=0.97, p=0.39)。

表1 C-344T/CPY11B2 多型の分布と高血圧、原発性アルドステロン症の関係

阪大研究	TT (%)	CT (%)	CC (%)	計
正常血圧	55 (50.0)	45 (40.9)	10 (9.1)	110
(期待値) * ¹	54.6	42.3	8.2	n.s.
本態性高血圧* ²	68 (54.6)	46 (37.4)	9 (7.3)	123
(期待値) * ¹	67.3	47.3	8.3	n.s.
原発性アルドステロン症* ³	17 (63.0)	7 (25.9)	3 (11.1)	27
(期待値) * ¹	15.6	9.9	1.6	n.s.

*1: Hardy Weinberg の法則による検定

*2: vs. 正常血圧。有意差なし, $\chi^2=0.71, p=0.70$

*3: vs. 正常血圧。有意差なし, $\chi^2=2.07, p=0.36$

表2 C-344T/CPY11B2 多型と高血圧 —白人と日本人の比較—

		TT (%)	CT (%)	CC (%)
白人	正常血圧	71 (24.2)	144 (49.1)	78 (26.6)
	高血圧	116 (30.5)	194 (51.1)	70 (18.4)
	χ^2 検定		p=0.0231	
日本人	正常血圧	55 (50.0)	45 (40.9)	10 (9.1)
	高血圧	68 (55.3)	46 (37.4)	9 (7.3)
	χ^2 検定		p=0.70	

表3 低レニン性高血圧患者における PAC/PRA と CYP11B2 遺伝子の関連

	TT	CT	CC
n	22	18	4
PAC/PRA	132.3 ± 33.7	82.2 ± 14.9	78.2 ± 28.7

注 低レニン性高血圧患者: PRA<0.5ng/ml・h

2. α -adducin/Gly460Trp 多型と高血圧の関連

最終的に 364 名の α -adducin/Gly460Trp 遺伝子多型が決定された。正常血圧群、本態性高血圧群の多型の分布は、Hardy Weiberg の法則により算出された期待値の分布に近似し、両者間には有意差は認められなかった。正常血圧者と本態性高血圧患者群の間に、 α -adducin/Gly460Trp 遺伝子多型、アリル頻度に有意な差は認められなかった(表 4)。白人において本態性高血圧症の遺伝的リスクとされた Trp アリル頻度は⁸⁾、日本人高血圧患者で 55.6%と白人の 22.0%に比し有意に高値であったが、高血圧との関連は日本人と白人で異なる結果となった(表 5)。

一方、 α -adducin/Gly460Trp 遺伝子多型と各種臨床検査値(血圧値、レニン活性、アルドステロン濃度ほか)の間には、正常血圧群、本態性高血圧症群のいずれにおいても有意な関連は認められなかった(表 6)。

表 4 日本人における高血圧と α -adducin/Gly460Trp 多型の関連

Gly 460 Trp	高血圧患者		正常血圧者	
	n	%	n	%
遺伝子型				
Gly / Gly	33	19.4%	35	18.0%
Gly / Trp	85	50.0%	96	49.5%
Trp / Trp	52	30.6%	63	32.5%
	$\chi^2=0.043$		ns	

表 5 高血圧患者、正常血圧者における α -adducin/Gly460Trp 多型の国際比較

人種	遺伝子型 (%)			アリル (%)	
	GG	GT	TT	G	T
正常血圧者					
日本人 (n=194)	18.0	49.5	32.5	42.8	57.2
白人 (n=332)	73.2	23.5	3.3	84.9	15.1
	$\chi^2=66.4, p<0.0001$			$\chi^2=38.3, p<0.0001$	
高血圧患者					
日本人 (n=170)	19.4	50.0	30.6	44.4	55.6
白人 (n=477)	60.6	34.8	4.6	78.0	22.0
	$\chi^2=43.5, p<0.0001$			$\chi^2=24.3, p<0.0001$	

表6 α -adducin/Gly460Trp 多型と各種臨床検査値との関連

高血圧患者	Gly / Gly (n=33)	Gly / Trp (n=85)	Trp / Trp (n=52)	p 値
SBP (mmHg)	183±3.7	179±2.3	179±2.2	ns
DBP (mmHg)	102±2.1	106±1.5	106±1.7	ns
BMI (kg / m ²)	24.3±0.7	23.7±0.4	23.9±0.5	ns
PRA (ng / ml / h)	1.37±0.24	1.20±0.19	1.35±0.25	ns
PAC (ng / dl)	15.1±1.4	14.2±0.8	15.4±1.3	ns
TG (mg / dl)	139±14.2	150±9.4	128±11.0	ns
FPG (mg / dl)	98.8±2.1	96.2±1.4	95.3±1.3	ns
正常血圧者	Gly / Gly (n=35)	Gly / Trp (n=96)	Trp / Trp (n=63)	p 値
SBP (mmHg)	117±2.2	118±1.2	121±1.5	ns
DBP (mmHg)	74±1.6	75±0.8	76±1.0	ns
BMI (kg / m ²)	22.3±0.7	21.9±0.3	22.1±0.3	ns
TG (mg / dl)	109±8.1	118±7.5	125±10.0	ns
FPG (mg / dl)	89.9±1.6	92.5±1.0	92.6±1.4	ns

3. G 蛋白 β 3/C825T 多型と高血圧の関連

最終的に阪大研究において 726 名、大迫研究において 346 名の G 蛋白 β 3/C825T 多型遺伝子多型が決定された。両研究において、正常血圧群、本態性高血圧群の多型の分布は、Hardy Weiberg の法則により算出された期待値の分布に近似しており、期待値・観測値間には有意差は認められなかった。

阪大研究は全例家族歴を有する中等症～重症高血圧患者、大迫研究は一般集団における高血圧患者と考えられるが、いずれの研究においても正常血圧者と本態性高血圧患者群の間に、G 蛋白 β 3/C825T 多型頻度に有意な差は認められなかった（表 7）。大迫研究において、各種脂質代謝の指標、頸動脈エコーに基づく IMT 値やプラークスコア、頭部 MRI を用いたラクナスコアと C825T 多型の関連を男女別に検討した結果、男女ともに総コレステロール値と、男性のみ HDL コレステロール値と有意な相関を示した（表 8、9）。さらに、大迫研究において降圧薬非服用者における 24 時間血圧値、昼間および夜間血圧値、血中 Na, K 濃度への C825T 多型の影響を検討したところ、T アリル数に応じて血清 K 値の有意な上昇が認められた（表 10）。

表7 G 蛋白β3/C825T 多型と高血圧の関連

<i>GNB3</i> 遺伝子型	CC	CT	TT
阪大研究			
正常血圧	96 (23%)	204 (48%)	122 (29%)
高血圧	67 (22%)	161 (53%)	76 (25%)
	$\chi^2=1.79, NS$		
大迫研究			
正常血圧	37 (22%)	85 (52%)	43 (26%)
高血圧	43 (24%)	90 (50%)	48 (26%)
	$\chi^2=0.13, NS$		

注：大迫研究における高血圧は、24hr.ABPM において平均血圧 \geq 135/80mmHg（同研究において閾値と考えられている）または降圧薬を慢性服用中と定義。

表8 大迫研究の男性における G 蛋白β3/C825T 多型と各種指標との関連

G 蛋白β3/C825T 多型	CC (n=26)	CT+TT (n=105)	p 値
BMI (kg/m ²)	22.3±0.5	22.9±0.3	ns
Total cholesterol (mmol/l)	4.24±0.16	4.78±0.08	p<0.005
Triglyceride (mmol/l)	1.25±0.19	1.35±0.09	ns
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.23±0.10	1.48±0.05	p<0.05
Lipoprotein (a) (mg/dl)	20.6±4.3	21.3±2.8	ns
Lacunae score	2.18±0.71	1.76±0.32	ns
Patients with lacunae	13/26 (50%)	54/105 (51%)	ns
Maximal intima media thickness (mm)	1.67±0.21	1.81±0.10	ns
Plaque score	2.00±0.55	1.57±0.26	ns
Patients with plaque	15/26 (59%)	57/105 (54%)	ns

BMI: body mass index.

Lacunae score: 全脳におけるラクナ梗塞数.

IMT: 頸動脈における maximal intima-media thickness.

Plaque score: 両頸動脈におけるプラークスコアの合計.

有意差検定は Bonferroni's correction に基づく.

(TT vs CT: p=0.6, TT vs CC: p<0.005, CT vs CC: p<0.005)

表9 大迫研究の女性における G 蛋白β3/C825T 多型と各種指標との関連

G 蛋白β3/C825T 多型	CC (n=52)	CT+TT (n=169)	p 値
BMI (kg/m ²)	23.7±0.4	24.0±0.2	ns
Total cholesterol (mmol/l)	5.17±0.10	5.48±0.05	p<0.05
Triglycelide (mmol/l)	1.40±0.10	1.45±0.05	ns
HDL- cholesterol (mmol/l)	1.36±0.05	1.38±0.03	ns
Lipoprotein(a) (mg/dl)	28.7±4.2	27.8±2.3	ns
Lacunae score	1.00±0.29	1.11±0.16	ns
Patients with laqunae	19/52 (36%)	71/169 (42%)	ns
Maximal intima media thickness (mm)	1.46±0.10	1.41±0.06	ns
Plaque score	0.69±0.27	1.01±0.15	ns
Patients with plaque	17 of 52 (33%)	66 of 169 (39%)	ns

有意差検定は Bonferroni's correction に基づく。

(TT vs CT: p=0.5, TT vs CC: p<0.01, CT vs CC: p< 0.01)

表10 大迫研究の降圧薬非服用者における G 蛋白β3/C825T 多型と電解質、各種血圧指標の関連の検討

G 蛋白β3/C825T 多型	CC (n=43)	CT (n=114)	TT (n=54)	p 値
Na (mmol/l)	142.2±0.3	141.6±0.6	141.4±0.3	ns
K (mmol/l)	4.26±0.10	4.62±0.06	4.84±0.09	p<0.0005
24 時間-SBP	121±2	123±1	122±2	ns
24 時間-DBP	71±1	72±1	71±1	ns
昼間-SBP	127±2	129±1	127±2	ns
昼間-DBP	75±1	76±1	75±1	ns
夜間-SBP	109±2	113±1	112±2	ns
夜間-DBP	62±1	64±1	63±1	ns

有意差検定は Bonferroni's correction に基づく。

(TT vs CT: p=0.6, TT vs CC: p<0.0001, CT vs CC: p< 0.005)

尚、全ての表中の SBP は収縮期血圧、DBP は拡張期血圧を示す。

④ 考察

食塩感受性高血圧と関連の深いとされる低レニン性高血圧症は本態性高血圧症の12.4%を占め、この中の70%が低レニンにも関わらずPACが正常範囲にあり、相対的にアルドステロン産生が亢進した状態にあることが示されている⁹⁾。CYP11B2はsteroid 11- β hydroxylaseやaldosterone synthaseとも呼ばれるアルドステロン合成を司る酵素であり、その遺伝子は8q21にマッピングされている。本遺伝子の異常は、遺伝性低アルドステロン症の一つであるCHO II (corticosterone methyl oxidase type II deficiency)を起こすことで知られる一方、低レニン性高血圧症とCPY11B2/Lys173Arg多型の関連なども報告されてきた。さらに、CPY11B2の3'下流域の近傍に存在するCYP11B1(11 β -hydroxylase)間に起こった不均等組み換えにより、ACTHでコントロールされるアルドステロン産生亢進によるグルココルチコイド奏功性アルドステロン症が惹起される¹⁰⁾ことが知られている。これら一連の結果より、CPY11B2の機能性変異がアルドステロン亢進を伴う高血圧の病態に関連することが推察されたことから本研究を実施した。CPY11B2遺伝子多型としては、最近PACや高血圧との関連が報告されたプロモーター領域のC-344T多型を用いた。本研究で検討された対象者数が少なかったため、有意差は得られなかったが、白人同様に高血圧患者においてTT型が増加する傾向にあり、原発性アルドステロン症におけるTT型の頻度は63.0%に達した。また、低レニン性高血圧症においてもTT型においてPAC/PRA比が高い傾向が認められたが、これも有意なレベルには達しなかった。我々の今回の結果は、フランスのBrandらが報告したTT型が高血圧リスクとして弱く作用するという結果を指示するものとなったが、一方で、Pojoga¹¹⁾や環¹²⁾らが報告するCアレルがアルドステロン合成亢進に働くとする報告に拮抗することにもなった。C-344とT-344のいずれのアレルがCYPB2の転写亢進につながるかについては議論の分かれるところであり、転写因子SF-1の結合部位であることは知られているが、C-344T変異の他により強力な機能性変異が隠されている可能性も否定できない。

一方、欧米特にイタリアのグループを中心に食塩感受性高血圧の最も強い遺伝要因であるとされてきたのが α -adducin遺伝子である。本遺伝子は元来Milan Hypertensive Strain (MHS)と呼ばれる遺伝性高血圧ラットにおいて、最も強力な昇圧遺伝子として報告されてきたものであり¹³⁾、最近になってヒト α -adducin遺伝子近傍へのQTLマッピング、そして白人集団における α -adducin遺伝子のGly460Trp多型と食塩感受性高血圧の関連の報告⁸⁾と、常に話題の中心となってきた。Adducinは細胞骨格蛋白の一つと言われ、アクチンの重合に関与し、Na-K ATPaseとも密接な関連をもつとされ、尿細管におけるNa再吸収を調節しているのではと推定されている。今回の検討では、白人集団において食塩感受性高血圧リスクを高めるとされたTrp460アレルが、日本人では約2.5倍も存在するにも関わらず、高血圧の有無、血圧値、レニン活性、アルドステロン濃度のいずれとも関連を認めず、白人における結果が必ずしも日本人には当てはまらないことを示す良い例となった。

最後に *Nature Genetics* 誌に高血圧遺伝子として報告された G 蛋白 β 3/C825T 多型¹⁹⁾においても、血圧との直接の関連は認められなかった。G 蛋白は高血圧患者のリンパ球で発現亢進が認められ、Na-K ATPase 活性を亢進させることも知られている。T825 アリルはエクソン9の41アミノ酸欠失を惹起し、短縮型のG蛋白 β 3サブユニット(G β 3-s)が産生されることから、本多型はG蛋白を介した食塩感受性高血圧のリスクになる可能性が示唆されていた。しかし、本研究では高血圧の有無、24時間平均血圧、昼間および夜間の平均血圧等、血圧に関するあらゆる指標との間に有意な関連を認めなかった。一方で、コレステロール値、血清K値との間に有意な相関が観察された理由に関しては、不明な点が多い。遺伝子型と相関を検討している表現型が多いため、偶然得られた結果である可能性も否定できないが、LDL受容体がG蛋白 β 3サブユニットによって調節されているとする報告もあり、脂質代謝への本蛋白の関与を示唆するものとして興味深い。また、血圧ではなく血清K値と相関を認めた理由としては、細胞内K濃度の減少、pHの上昇、Na-H exchangerとの関連などが考えられ、in vitroでの検討が待たれるところである。

⑤ 今後の課題

食塩感受性高血圧の代表的な候補遺伝子と考えられる CPY11B2/Lys173Arg 多型、 α -adducin 遺伝子の Gly460Trp 多型、G 蛋白 β 3/C825T 多型のいずれにおいても、血圧あるいは高血圧との関連は認められなかった。本研究において確認されたことは、欧米白人と日本人では感受性遺伝子多型の頻度には大きな差があり、白人で確認された結果を本邦においてそのまま適応することは困難であるということである。遺伝薬理学や、遺伝的資質からみた生活指導を行う上でも、この点は大変重要であり、遺伝子多型の意義は各人種毎に確認する必要があることがあらためて確認される結果となった。

遺伝子解析に対する倫理問題を論議する機運の高まる一方、ポストゲノムプロジェクトを中心とする政府指導型の大規模プロジェクトが強力に押し進められようとしている。遺伝子型を決定するための技術開発には人的・物的支援が豊富になされているのに対し、解析対象とする検体の収集や確実な表現型を集める地道な努力は不足がちである。特に、食塩摂取量やNa排泄量とこれら遺伝子多型の関連、低レニン性高血圧やnon-modulatorと感受性遺伝子の関連など、焦点を絞った形の解析も必要と思われる。また、降圧薬の種類と効果、血圧変動や合併症への効果の遺伝的資質の違いも重要な課題になるものと考えられる。

⑥ 文献

1. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, et al.: Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79: 407-414, 1994.

2. Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rosler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L, Lu Y, Shimkets RA, Nelson Williams C, Rossier BC, Lifton RP: Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet* 12: 248-253, 1996.
3. Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, et al: Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. *J Hum Hypertens* 8: 521-524, 1994.
4. Sato N, Katsuya T, Rakugi H, et al: Association of variants in critical core promoter element of angiotensinogen gene with increased risk of essential hypertension in Japanese. *Hypertension* 30: 321-325, 1997.
5. Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 272: 676-680, 1996.
6. Brand E, Chatelain N, Mulatero P, et al: Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* 32: 198-204, 1998.
7. Fardella CE, Rodriguez H, Montero J, et al: Genetic variation in P450c11AS in Chilean patients with low renin hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4347-4351, 1996.
8. Cusi D, Barlassina C, Azzani T, et al. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 349: 1353-1357, 1997.
9. Komiya I, Yamada T, Aizawa T, et al: Inappropriate elevation of the aldosterone/plasma renin activity ratio in hypertensive patients with increases of 11-deoxycorticosterone and 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone: a subtype of essential hypertension? *Cardiology* 78: 99-110, 1991.
10. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, et al: A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355: 262-265, 1992.
11. Pojoga L, Gautier S, Blanc H, et al: Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am J Hypertens* 11: 856-860, 1998.
1. 環慎二, 岩井直温, 辻田靖之, et al: CPY11B2 遺伝子遺伝子型と高血圧. 第21回日本高血圧学会総会 プログラム・抄録集 平成10年・広島: 113, 1998.
13. Ferrandi M, Tripodi G, Salardi S, et al. Renal Na,K-ATPase in genetic hypertension. *Hypertension* 28: 1018-1025, 1996.
14. Siffert W, Roskopf D, Siffert G, et al. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet* 18:45-48, 1998.

Identification and functional analysis of the susceptible genes for salt sensitivity

Principle investigator: Toshio Ogihara

Co-investigators: Jitsuo Higaki, Ryuichi Morishita*, Tomohiro Katsuya

Department of Geriatric Medicine, *Department of Molecular Therapeutics

Osaka University Graduate School of Medicine

It is well known that the restriction of salt intake helps prevent hypertension in some cases. This leads to the hypothesis that the salt sensitivity, which is not homogenous among individuals according to their genetic backgrounds, plays a key role in the pathogenesis of hypertension. To reduce the cardiovascular mortality, it is effective to use the appropriate therapy that adapts to one's genetic disposition. In the present study, we carried out case-control studies to identify the genes responsible for salt sensitive hypertension.

The participants were recruited from two studies with informed consent for genetic analysis. One is Handai Study which consists of the outpatients of Osaka University Hospital, and another is Ohasama Study, a large cohort study in a rural community of Iwate prefecture. In addition to usual physical findings and biochemical measurements, plasma renin activity and aldosterone concentration were measured in Handai Study, and ambulatory blood pressure monitoring for 24 hour (24hr ABPM), home blood pressure measurement, quantification of asymptomatic cerebral ischemia using MRI and atherosclerotic change in carotid artery were examined in Ohasama Study. The following gene polymorphisms were examined as candidates for salt sensitivity: CYP11B2 (aldosterone synthase)/Lys173Arg, alpha-adducin/Gly460Trp and GNB3 (G protein beta 3 subunit)/C825T.

None of the polymorphisms were associated with the presence of hypertension, with casual and home blood pressure and with mean of 24hr ABPM. Even though several alleles that were reported as genetic risk increasing the prevalence of hypertension in Caucasian population were frequently observed in Japanese, these alleles did not increase the risk for hypertension in this study. On the other hand, total cholesterol and plasma potassium level was significantly associated with GNB3/C825T genotype. Though the causal relationship was unclarified, the truncated protein (G beta 3-s) obtained from GNB3 polymorphism might be involved in the regulation of intracellular potassium or in the expression of LDL receptor.

Our results suggested that gene susceptibility for salt sensitive hypertension of Japanese should be examined using Japanese populations and obtaining certain and various phenotypes is a key for the success of post human genome project.