

助成番号 0641

タンザニア青年における食塩感受性高血圧関連遺伝子の解析

野口 孝則¹, 池田 克己², 家森 幸男³¹福岡女子大学人間環境学部栄養健康科学科, ²武庫川女子大学薬学部,³武庫川女子大学国際健康開発研究所

概要 食塩を摂取することにより血圧が上昇する食塩感受性高血圧はヒトに普遍的に存在するもので、発症頻度に人種差と加齢の影響が報告されている。すでに我々の実施した、世界 20 カ国 63 地域での循環器疾患一次予防調査により、タンザニア都市部住民における高血圧症罹患率の著しい増加を 1987 年、1998 年の調査で明らかにするとともに、タンザニア在住アフリカ人での食塩感受性高血圧について報告をしたが、その原因遺伝子及び食塩感受性高血圧に関与する環境要因については、いまだ明確にされていない。また、レニンアンギオテンシン系の関与も周知のことであり、本研究では、アミロライド感受性ナトリウムチャンネルの一塩基多型遺伝子変異、レニンアンギオテンシン系遺伝子多型と食塩感受性高血圧への関与とそれをとりまく環境要因についてタンザニア在住アフリカ人青年を対象に調査をすることを目的とした。

首都ダルエスサラーム、テメケ行政区より無作為に選んだ 3 地区の対象者 200 名において、問診票により循環器疾患・家族歴等を調査し、既往歴として心筋梗塞・狭心症・腎障害・糖尿病を有するものは除外した。さらに血圧・血糖が正常で、非蛋白尿・非薬剤服用者の 25～35 歳アフリカ人男性 65 名を介入試験参加者として無作為に選抜した。食塩感受性試験は 3 週間にわたって実施した。第 1 週目に血圧測定・24 時間尿採取および採血をおこない、基礎値とした。第 2 週目にコンソメスープと食塩の錠剤により食塩を負荷 (140 mEq/日) し、第 3 週目に利尿剤ヒドロクロロサイアザイド (25 mg/日) の服用をおこなった。食塩負荷期および利尿剤服用期の 4, 7 日目において血圧測定・24 時間尿採取および採血を実施した。各試験最終日に血中 ACE 濃度、血中および 24 時間尿中の電解質を測定した。食塩負荷および利尿剤のコンプライアンスは 24 時間尿中ナトリウムおよびヒドロクロロサイアザイドの測定により判断した。ACE 遺伝子多型は、第 17 番染色体上イントロン 16 に存在する 287 bp の Alu 配列の挿入 (insertion) / 欠失 (deletion) 多型 (I/D 多型) を PCR 法にて判定し、遺伝型と表現型の解析をおこなった。

食塩感受性試験において、食塩負荷後 7 日目から利尿剤服用後 4 日目の平均血圧 (MBP) の変動が 5% 以上を食塩感受性 (S, n = 10) 群、5% 未満を食塩非感受性 (R, n = 30) 群とした。S 群は R 群に比べて S 群では、R 群に比べて血中 ACE 濃度が有意に食塩負荷前から高値を示していた (食塩負荷前 S; 21.6 ± 2.2 R; 16.3 ± 0.8 p < 0.01、食塩負荷後 S; 22.0 ± 2.5 R; 16.0 ± 0.8 p < 0.01、利尿剤服用 S; 19.4 ± 2.3 R; 16.2 ± 0.8 p = 0.106)。また、ACE 遺伝子多型 (DD/DI/II) ごとに血中 ACE 濃度の評価をおこなった。ACE 遺伝子 DD 型では他型に比し、血中 ACE 濃度が高い傾向が確認された。ACE 遺伝子型と食塩感受性の関係を調べると、DD 型に食塩感受性が多い傾向がみられた。

ACE 遺伝子 DD 型の血中 ACE 濃度が高く、食塩負荷時の血圧変動が大きい食塩感受性群では D アレルを有する頻度が高い傾向がみられた (p = 0.065)。遺伝情報に基づくオーダーメイド医療に向けて、高血圧に関して特異的な遺伝背景をもつアフリカ人を対象とした本研究は、食塩感受性遺伝子の遺伝子と環境因子、遺伝子と遺伝子の相互作用を解明する上でも重要であると考えられる。

1. はじめに

食塩を摂取することにより血圧が上昇する食塩感受性高血圧はヒトに普遍的に存在するもので、発症頻度に人種差と加齢の影響が報告されている。すでに我々の実施

した、世界 20 カ国 63 地域での循環器疾患一次予防調査により、タンザニア都市部住民における高血圧症罹患率の著しい増加を 1987 年、1998 年の調査で明らかにするとともに、タンザニア在住アフリカ人での食塩感受性高血圧

について報告をしたが、その原因遺伝子及び食塩感受性高血圧に關与する環境要因については、いまだ明確にされていない。

また我々の実験的研究では食塩感受性を有する高血圧モデルラットを用いた連鎖解析により、第1染色体上に高血圧の原因遺伝子領域の存在を示唆する結果を得ており、Huang らはこの第1染色体上の高血圧原因遺伝子領域に上皮型ナトリウムチャンネル遺伝子の存在を報告している。上皮型ナトリウムチャンネルは遠位尿細管、大腸、肺などの管腔側に存在しており、上皮細胞でのナトリウム再吸収の中心的役割を果たしており、ヒトの食塩感受性高血圧に關与する候補遺伝子としては興味深い。一方、一塩基多型(SNPs; Single Nucleotide Polymorphisms)はヒトにおける遺伝子の個人差・人種差の研究、病気に対する感受性や薬物への反応を調べる際に有用な多型マーカーであり、SNPsを用いたゲノムワイドスクリーニングが原因遺伝子推定に強力な解析力をもつことが注目されている。本研究グループでは新たにヒトにおけるアミロライド感受性ナトリウムチャンネルのSNPsを検討しており、現在新規に十数種のSNPsを発見している。

また、レニンアンジオテンシン系の關与も周知のことであり、本研究では、アミロライド感受性ナトリウムチャンネルの一塩基多型遺伝子変異、レニンアンジオテンシン系遺伝子多型と食塩感受性高血圧への關与とそれをとりまく環境要因についてタンザニア在住アフリカ人青年を対象に調査をすることを目的とする。

約3,500万人の日本人が140/90 mmHg以上の高血圧であり、高血圧者の比率は年齢とともに上昇し、50代でほぼ半数、70代で7割を占めるとの報告がある。日本人はその食生活様式より食塩摂取量が多く、食塩感受性高血圧の關与も大きく約4割の日本人が食塩感受性高血圧の遺伝素因を持つと報告されている。

また日本人では食塩摂取量が12-3 g/日と日常的に多いため、食塩感受性試験結果がマスクされ食塩感受性の理解が複雑になるのに対し、アフリカ人の食塩摂取量は5 g/日と低く、より正確な結果が得られる可能性が高くその成果に期待ができる。現在、ヒトにおける食塩感受性高血圧におけるアミロライド感受性ナトリウムチャンネルの一塩基多型遺伝子変異を観察した報告はなく、また加齢の影響を除いた条件での本研究はヒトでの食塩感受性高血圧研究に新たな理解と知識を深めるものと考えられる。食塩を摂取することにより血圧が上昇する食塩感受性高血圧

は、発症頻度に人種差が報告されており、アフリカ黒人では、白人と比較して遺伝的要因の關与が高いことが想定される。我々もタンザニア黒人は日本人・ブラジル人と比較して食塩感受性が高いことを報告している¹⁾がその原因遺伝子及び食塩感受性高血圧に關与する環境因子については、いまだ明確にされていない。

高血圧自然発症脳卒中易発症ラット SHRSP では、第10番染色体に高血圧の原因となるQTLが同定されており、その領域にアンジオテンシン変換酵素(ACE)遺伝子座がある²⁾。ACEは、高血圧の候補遺伝子とされるとともに食塩感受性との關与が示唆されている³⁾。

本研究では、タンザニア在住アフリカ人のACE遺伝子多型と食塩摂取の影響を調査した。日本人はその食生活様式より食塩摂取量が多く、約4割が食塩感受性高血圧の遺伝因子を持つと報告されているが食塩摂取量が日常的に多いため、食塩感受性試験結果がマスクされ食塩感受性の評価が複雑になる。それに対してアフリカ人では、食塩摂取量は日本人に比べて少なく、より正確な結果が得られることが期待される。

2. 方法

1) 対象

本調査はタンザニア、ムヒンビリ医科大学生理学教室 J. P. Mtabaji 教授、M. A. Njelekela 講師との共同調査であり、1987年の循環器疾患一次予防調査以来、アフリカ、タンザニアにおける生活習慣病に関する調査を共同で実施している(*East Afr Med J.* 2003; 80(4): 195-9, *J Nutr Sci Vitaminol* 2002; 48(5): 352-8, *East Afr Med J.* 2002; 79(2): 58-64, *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 2002; (29) S23-6, *Acta Trop* 2001; 79(3): 231-9, *J Hypertens* 2001; 19: 529-33)。タンザニア都市部では脳血管疾患による死亡率はタンザニアの宗主国である連合王国の8倍近くの高値を示しており、我々の調査でも脳血管疾患の重要な危険因子である高血圧罹患率の都市部での増加を認めている。現在首都ダルエスサラームの南部地区であるテメケ行政区を中心にフィールドを維持しており、本研究もテメケ行政区青年住民を対象にしている。首都ダルエスサラーム、テメケ行政区より無作為に選んだ3地区の対象者200名において、問診票により循環器疾患・家族歴等を調査し、既往歴として心筋梗塞・狭心症・腎障害・糖尿病を有するものは除外した。さらに血圧・血糖が正常で、非蛋白尿・非薬剤服用者の25~35歳アフリカ人男性65名を介入試

験参加者として無作為に選抜した。

2) 食塩感受性試験

食塩感受性試験は3週間にわたって実施した⁴⁾。第1週目に血圧測定・24時間尿採取および採血をおこない、基礎値とした。第2週目にコンソメスープと食塩の錠剤により食塩を負荷(140 mEq/日)し、第3週目に利尿剤ヒドロクロロサイアザイド(25 mg/日)の服用をおこなった。食塩負荷期および利尿剤服用期の4, 7日目において血圧測定・24時間尿採取および採血を実施した。各試験最終日に血中ACE濃度、血中および24時間尿中の電解質を測定した。食塩負荷および利尿剤のコンプライアンスは24時間尿中ナトリウムおよびヒドロクロロサイアザイドの測定により判断した。

3) ACE 遺伝子多型

ACE 遺伝子多型は、第17番染色体上イントロン16に存在する287 bpのAlu配列の挿入(insertion)/欠失(deletion)多型(I/D多型)をPCR法にて判定し⁵⁾、遺伝型と表現型の解析をおこなった。

4) 統計処理

値はすべて平均±標準誤差で示した。統計処理はStudent's t-test, χ^2 検定, ANOVA 検定を用いた。統計学的有意差は $p < 0.05$ とした。

3. 結果

介入試験参加者の24時間尿採取の完了を尿中クレアチニン値により確認し、食塩および利尿剤のコンプライアンスの判定をおこない、最終的に40名の結果が得られた。その臨床的背景を表1に示す。本研究は肥満度、血圧ともに正常範囲である健康なアフリカ人青年男性を対象とした。24時間尿中排泄ナトリウム含量より求めた食塩摂取量は約6.3gであった。

表1:対象者のプロフィール

基礎値	mean ± SE
n	40
Age	28.2 ± 0.4
BMI (kg/m)	20.9 ± 0.5
SBP (mmHg)	119 ± 2.0
DBP (mmHg)	67.3 ± 1.7
HR (beats/min)	70.5 ± 1.8
MBP (mmHg)	84.5 ± 1.7
Serum Na (mEq/L)	5.8 ± 0.4
Serum K (mEq/L)	4.6 ± 0.1
Serum ACE (IU/L)	17.6 ± 0.9
Urine Na (mEq/day)	107 ± 11
Urine K (mEq/day)	40.8 ± 6.0

平均 ± 標準誤差

表2:S群およびR群におけるプロフィール

基礎値	R群(30)	S群(10)	p-value
Age	28.1 ± 0.4	28.5 ± 1.1	0.685
BMI (kg/m)	20.8 ± 0.6	21.2 ± 1.1	0.707
SBP (mmHg)	118 ± 2.3	120 ± 4.4	0.748
DBP (mmHg)	67.0 ± 1.8	68.2 ± 3.9	0.758
HR (beats/min)	69.1 ± 1.9	74.7 ± 4.5	0.181
MBP (mmHg)	84.2 ± 1.9	85.5 ± 4.0	0.745
Serum Na (mEq/L)	13.5 ± 0.4	13.5 ± 0.7	0.742
Serum K (mEq/L)	4.5 ± 0.1	4.7 ± 0.1	0.577
Serum ACE (IU/L)	16.3 ± 0.8	21.6 ± 2.2*	0.009
Urine Na (mEq/day)	110 ± 14	96.8 ± 6.3	0.388
Urine K (mEq/day)	42.2 ± 7.8	36.7 ± 5.4	0.696

平均 ± 標準誤差、* $p < 0.05$

表3: ACE遺伝型におけるプロフィール

基礎値	DD (15)	DI (16)	II (9)	p-value
Age	28.9±0.8	28.4±0.6	26.7±0.6	0.129
BMI(kg/m)	21.4±0.8	21.1±0.9	19.8±0.6	0.461
SBP(mmHg)	122±2.8	115±3.8	121±3.4	0.284
DBP(mmHg)	66.9±2.2	65.7±3.3	70.8±2.4	0.508
HR(beats/min)	73.8±4.1	67.3±1.5	70.7±3.4	0.301
MBP(mmHg)	85.2±2.3	82.2±3.4	87.7±2.4	0.463
Serum Na (mEq/L)	136±0.5	134±0.5*	135±0.7	0.039
Serum K (mEq/L)	4.6±0.2	4.7±0.1	4.3±0.1	0.242
Serum ACE (IU/L)	19.7±2.0	17.3±1.5	15.4±1.0	0.265
Urine Na (mEq/day)	111±16	105±19	103±25	0.954
Urine K (mEq/day)	37.2±4.8	43.7±14	41.8±8.5	0.892

平均±標準誤差、
*p<0.05 vs DD

食塩感受性試験において、食塩負荷後7日目から利尿剤服用後4日目の平均血圧(MBP)の変動が5%以上を食塩感受性(S, n = 10)群、5%未満を食塩非感受性(R, n = 30)群とした。S群はR群に比べてS群では、R群に比べて血中ACE濃度が有意に食塩負荷前から高値を示していた(図1: 食塩負荷前 S; 21.6 ± 2.2 R; 16.3 ± 0.8 p < 0.01、食塩負荷後 S; 22.0 ± 2.5 R; 16.0 ± 0.8 p < 0.01、利尿剤服用 S; 19.4 ± 2.3 R; 16.2 ± 0.8 p = 0.106)。

また、ACE遺伝子多型(DD/DI/II)ごとに血中ACE濃度の評価をおこなった(図2)。ACE遺伝子DD型では他型に比し、血中ACE濃度が高い傾向が確認された(食塩負荷前 DD: 19.3 ± 1.5 DI; 17.3 ± 1.5 II; 15.4 ± 1.0、食塩負荷後 DD: 19.7 ± 2.0 DI; 16.8 ± 1.4 II; 15.0 ± 1.0、利尿剤服用 DD; 19.9 ± 1.7 DI; 15.3 ± 1.0 II; 15.1 ± 1.2 p = 0.03)。ACE遺伝子型と食塩感受性の関係を調べると、DD型に食塩感受性が多い傾向がみられた。

図1: 食塩負荷の血中ACE濃度への影響

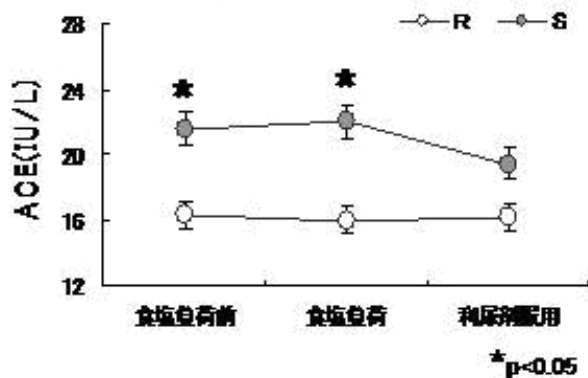
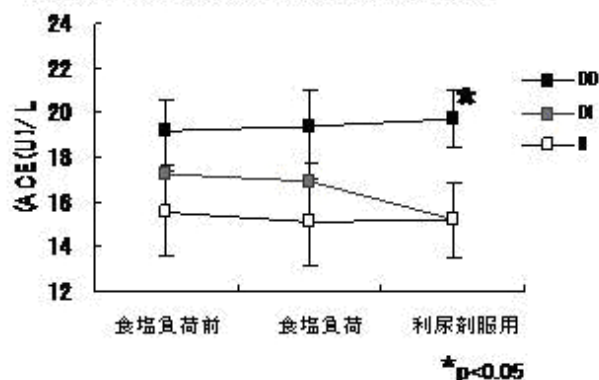


図2: ACE遺伝型の血中ACE濃度への影響



4. 総括

本研究では、食塩感受性の要因と考えられている加齢および食塩過剰摂取の影響を排除した条件下でACE遺伝子多型の食塩摂取への影響を検討した。ACE遺伝子DD型の血中ACE濃度が高く、食塩負荷時の血圧変動が大きい食塩感受性群ではDアレルを有する頻度が高い傾向がみられた(p = 0.065)。高血圧患者を対象にした大規模研究においても同様な結果が報告されているが⁹⁾、本研究のように健常者を対象にした例はない。食塩感受性の遺伝因子を保有していることは、食塩過剰摂取によって高血圧を発症しやすい一方、減塩による降圧効果が大きいことが考えられる。このような遺伝因子の判定は、治療方針を考える上で有用である可能性が示唆される。遺伝情報に基づくオーダーメイド医療に向けて、高血圧に関して特異的な遺伝背景をもつアフリカ人を対象とした本研究は、食塩感受性遺伝子の遺伝子と環境因子、遺伝子と遺伝子の相互作用を解明する上でも重要で

あると考える。今後さらにサンプルを収集し、検討を進める予定である。

keyWords; 食塩感受性, アフリカ人青年男性, ACE 遺伝子多型

1. Mtabaji, J. P, Moriguchi, Y, Nara, Y, et al. Ethnic differences in salt sensitivity: genetic or environmental factors? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1992; Suppl20: 65-7.
2. Hilbert, P, Lindpaintner, K, Beckmann, J. S, et al. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature*. 1991; 353: 521-9.
3. Nara, Y, Nabika, T, Ikeda, K, et al. Blood pressure cosegregates with a microsatellite of angiotensin I converting enzyme (ACE) in F2 generation from a cross between original normotensive Wistar-Kyoto rat (WKY) and stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 181(3): 941-6.
4. Kato, N, Kanda, T, Sagara, M, et al. Proposition of a feasible protocol to evaluate salt sensitivity in a population-based setting. *Hypertens Res*. 2002; 25(6): 801-9.
5. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl*. 1993; Oct;3(2): 120-1.
6. Christopher J. O'Donnell, Klaus Lindpaintner, et al. Evidence for Association and Genetic Linkage of the Angiotensin-Converting Enzyme Locus With Hypertension and Blood Pressure in Men but Not Women in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998; 97: 1766 -1772.

No. 0641

The Analysis of Salt-Sensitive Hypertension Gene in Young Male Tanzanian

Takanori Noguchi¹, Katsumi Ikeda², Yukio Yamori³

¹Fukuoka Women's University, Fukuoka, Japan

²Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Japan;

³International Collaborating Center Research for Cardiovascular Disease, Kyoto, Japan.

Summary

It has been recognized that environmental factors such as dietary habits play an important role in the development of hypertension. Excess salt intake is one of the important environmental risks. Yamori et al. reported ethnic differences in salt sensitivity, and Tanzanian subjects were more salt-sensitive than Brazilian or Japanese subjects. Experiment with animal models indicated that the ACE locus at the chromosome 10 associates with the hypertension, especially salt-sensitive hypertension. ACE polymorphism influences the activity of the renin-angiotensin-aldosterone system. In this study, the relationship between ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism and excessive salt intake was tested in young male Tanzanians.

Two hundred male volunteers aged 25 to 35 were recruited from Temeke in Dar es Salaam. Informed consent for participation was obtained from all subjects. Subjects with cardiovascular diseases, renal diseases, and diabetes mellitus were excluded. Sixty-five healthy male subjects attempted to develop a two-week intervention consisting of saltloading and a diuretic treatment period of one week each. In this method, subjects take 140 mEq of NaCl from a consommé soup and supplement per day and 25 mg of hydrochlorothiazide daily while maintaining their customary diet. At the baseline and the last day of each period, blood sampling and 24-hour urine collection were made. Blood pressure (BP) was measured at the three points (first, fourth, seventh day) of each period. ACE I/D polymorphism was detected by PCR method.

In 40 male Tanzanian subjects, serum ACE concentration of the subjects with more than 5% change in mean BP (MBP) during the transition from the salt-loading to the diuretic treatment period (S, n = 10) was significantly higher than subjects with less than 5% change in MBP (R, n = 30) (before salt-loading R: 21.6 ± 2.2 IU/L, N: 16.3 ± 0.8 IU/L, $p < 0.01$; after salt-loading S: 22.0 ± 2.5 IU/L, N: 16.0 ± 0.8 IU/L, $p < 0.01$; diuretic treatment S: 19.4 ± 2.3 IU/L, N: 16.2 ± 0.8 IU/L, $p = 0.106$). Serum ACE concentration in subjects with DD genotype was high compared with other genotypes (before salt-loading DD: 19.3 ± 1.5 IU/L, DI: 17.3 ± 1.5 IU/L, II: 15.4 ± 1.0 IU/L, $p = 0.265$; after salt-loading DD: 19.7 ± 2.0 IU/L, DI: 16.8 ± 1.4 IU/L, II: 15.0 ± 1.0 IU/L, $p = 0.157$; diuretic treatment DD: 19.9 ± 1.7 IU/L, DI: 15.3 ± 1.0 IU/L, II: 15.1 ± 1.2 IU/L, $p = 0.03$).

The results from this study suggested that an interaction might exist between the renin-angiotensin-aldosterone system and the ACE I/D polymorphism during salt-loading and diuretic treatment in young male Tanzanians.