

日本人における β 3-アドレナリン受容体遺伝子変異
と脱共役蛋白質-1遺伝子多型性の意義：
肥満,高血圧,脂質代謝異常および耐糖能異常との関連
について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9434

日本人における β_3 -アドレナリン受容体遺伝子変異と 脱共役蛋白質-1遺伝子多型性の意義

—肥満, 高血圧, 脂質代謝異常および耐糖能異常との関連について—

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

谷 口 雅 行

近年, 日本人の生活様式の欧米化から肥満が増加している. このことは, 高血圧, 高脂血症, 糖尿病などのいわゆる生活習慣病の基盤をなしていると同時に, 動脈硬化症の危険因子が集積したマルチプル・リスク・ファクター症候群 (multiple risk factor syndrome) の基本病態として注目されている. 肥満は, エネルギー摂取と消費の不均衡により生じることが, 遺伝的素因が一部関与しているとされている. 最近, ピマ・インディアンや欧米人で, β_3 -アドレナリン受容体 (β_3 -adrenergic receptor) 遺伝子のエクソン1の64番目のトリプトファンをコードするコドンTGGが, アルギニンをコードするCGGに変化するミスセンス変異と肥満, インスリン抵抗性, 高脂血症, 糖尿病の早期発症との関連が, また, 脱共役蛋白質-1 (uncoupling protein-1) 遺伝子の5'-非翻訳領域の制限酵素 *Bcl* I 切断部位における多型性と体重増加が関連すること, さらに両遺伝子変異の相加効果として, 病的肥満での体重増加や肥満者における基礎代謝率の低下が認められると報告されている. そこで, 日本人におけるこれらの遺伝子変異および多型性と肥満, 高血圧, 脂質代謝異常, 耐糖能異常との関連について検討した. 対象は人間ドック受診者222名 [男189名, 平均年齢 (±標準偏差), 50.5 (±7.4) 歳; 女33名, 平均年齢, 52.8 (±5.3) 歳] である. 既報の方法にしたがい, β_3 -アドレナリン受容体遺伝子ミスセンス変異は制限酵素 *Bst* NI を, 脱共役蛋白質-1遺伝子多型は *Bcl* I を用いたPCR-制限酵素切断片長多型法で解析した. 臨床指標として体格指数 (body mass index), ウエスト/ヒップ比, 収縮期および拡張期血圧, 血清総コレステロール, 血清中性脂肪, 血清高比重リポ蛋白コレステロール (high density lipoprotein cholesterol), 血清尿酸, 血清遊離脂肪酸, 血清腫瘍壊死因子アルファ (tumor necrosis factor-alpha) 濃度を測定した. また, 経口ブドウ糖負荷試験によって空腹時血糖および免疫反応性インスリン値を臨床指標とするともに, WHOの診断基準にしたがい耐糖能の分類を行った. その結果, 平均体格指数 (±標準偏差) は23.5 (±2.6) [男, 23.6 (±2.6); 女, 22.5 (±2.1)] であった. WHO診断基準による耐糖能分類では正常型177名, 耐糖能障害型32名, 糖尿病型13名であった. β_3 -アドレナリン受容体遺伝子ミスセンス変異のアレル頻度は0.179, また, 脱共役蛋白質-1遺伝子変異のアレル頻度は0.484であった. いずれも耐糖能の違いで, アレル頻度に差はなかった. 血清腫瘍壊死因子アルファ濃度についても耐糖能の違いで差は認めなかった. 男女にわけて遺伝子型と各臨床指標とを比較したところ, 男性では, β_3 -アドレナリン受容体遺伝子変異型ホモ群で野生型群に比し血清中性脂肪が有意に高値であった. 脱共役蛋白質-1遺伝子では, 変異型群で, 体格指数, 収縮期および拡張期血圧が, 野生型群に比し有意に高値で, 血清高比重リポ蛋白コレステロールが低値であった. β_3 -アドレナリン受容体遺伝子ミスセンス変異, 脱共役蛋白質-1遺伝子多型性の組み合わせによる相加効果は認められなかった. 女性では, β_3 -アドレナリン受容体遺伝子ミスセンス変異型, 脱共役蛋白質-1遺伝子多型性と各臨床指標の間に有意な相関を認めなかった. 高中性脂肪血症, 血清高比重リポ蛋白コレステロール低下, 高血圧, 肥満は, マルチプル・リスク・ファクター症候群の構成因子であるが, 今回の検討により日本人男性において, β_3 -アドレナリン受容体遺伝子ミスセンス変異, ならびに脱共役蛋白質-1遺伝子多型がマルチプル・リスク・ファクター症候群の形成に関連している可能性が示唆された.

Key words β_3 -adrenergic receptor, uncoupling protein-1, DNA polymorphism, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, obesity, multiple risk factor syndrome, diabetes mellitus

β_3 -アドレナリン受容体 (beta 3-adrenergic receptor, β_3 -AR) は褐色脂肪細胞では熱産生の調節を, 白色脂肪細胞では主として内臓脂肪に発現していて, 脂肪分解に関係している¹⁾. そし

て, この遺伝子のエクソン1の64番目のアミノ酸であるトリプトファン (tryptophan, Trp) をコードするコドンTGGがアルギニン (arginine, Arg) をコードするコドンCGGに変化するミスセン

平成11年5月31日受付, 平成11年7月21日受理

Abbreviations: A, adenine; Arg, arginine; β_3 -AR, beta 3-adrenergic receptor; BMI, body mass index; FFA, free fatty acid; G, guanine; HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; MRFs, multiple risk factor syndrome; OGTT, oral

ス変異 (Trp64Arg) が、アメリカ・ピマ・インディアンで糖尿病の早期発症や内臓脂肪の蓄積と関係することが報告²⁾されて以来、フィンランド人における内臓脂肪型肥満、インスリン抵抗性、2型糖尿病の早期発症³⁾、フランス人の病的肥満者における加齢にともなう体重増加⁴⁾との関連が相次いで報告された。日本人においても、閉経前肥満女性における内臓脂肪型肥満や収縮期血圧、空腹時血糖、血清総コレステロールおよび中性脂肪の高値、高比重リポ蛋白コレステロール (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) の低値といった、いわゆるインスリン抵抗性症候群との関連⁵⁾、非糖尿病患者における肥満やインスリン抵抗性との関係⁶⁾、肥満や糖尿病の早期発症との関連⁷⁾が報告されている。一方、脱共役蛋白-1 (uncoupling protein-1, UCP-1) は褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜に特異的に発現する蛋白質で、プロトン・キャリアとして電子伝達系とATP合成系を脱共役することによりエネルギーを熱として産生する働きがあり、いくつかの動物モデルでは褐色脂肪細胞の機能低下がUCP-1の発現量およびエネルギー消費の減少と関係し肥満にいたることが報告されている^{8)~10)}。これまでヒト成人では褐色脂肪細胞がほとんど認められないとされてきたが、最近の報告ではヒト成人の腎周囲の脂肪組織にUCP-1 mRNAの発現が認められヒトにおいても褐色脂肪細胞の存在が考えられている¹¹⁾。そしてUCP-1遺伝子多型性と体脂肪増加の関係が報告され、この遺伝子多型性は5'非翻訳領域のTATAボックスから-3826番目の塩基アデニン (adenine, A) がグアニン (guanine, G) に変化する点変異によることが明らかにされた¹²⁾。さらに、 β_3 -AR促進薬が犬の褐色脂肪細胞¹³⁾ばかりでなくマウスの骨格筋、白色脂肪細胞におけるUCP-1の発現をmRNAおよび蛋白レベルのいずれにおいても促進すること¹⁴⁾が報告されており、 β_3 -ARに対する刺激がUCP-1の発現を介して抗肥満作用を発現する可能性が考えられる。一方、腫瘍壊死因子アルファ (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) は肥満動物モデルでは免疫系の細胞のみならず脂肪細胞からも分泌されており、肥満により脂肪細胞におけるTNF- α がmRNAレベルおよび蛋白レベルのいずれにおいても発現が亢進し^{15)~18)}、インスリン抵抗性に関与すること^{15)17)~19)}、また、肥満糖尿病患者において血清TNF- α 濃度が増加していることが報告されている²⁰⁾。

近年、日本人の生活様式の欧米化から肥満が増加している。このことは、高血圧、高脂血症、糖尿病などのいわゆる生活習慣病の基盤をなすと同時に、動脈硬化症の危険因子の集積した病態であるマルチプル・リスク・ファクター症候群 (multiple risk factor syndrome, MRFS) の上流に位置するものとして注目されている。肥満は、エネルギー摂取と消費の不均衡で生じるが、遺伝的素因が一部関与しているとされている^{21)~24)}。そこで今回、人間ドック受診者を対象に、 β_3 -AR遺伝子ミスセンス変異およびUCP-1遺伝子多型性と肥満、高血圧、脂質代謝異常、耐糖能異常との関連について各臨床指標ならびに血清TNF- α 濃度をもとに検討した。

対象および方法

I. 対象

対象は金沢大学医学部第一内科関連病院で人間ドックを受診

した222例 (男性189例、女性33例) である。平均年齢は50.8 \pm 7.2歳で年齢範囲は30歳~68歳であった。全例早朝空腹時に75g経口ブドウ糖負荷試験 (oral glucose tolerance test, OGTT) を施行し、WHOの診断基準²⁵⁾にしたがい耐糖能の分類を行った。その結果、正常型177例、耐糖能障害型32例、糖尿病型13例であった。また、糖尿病、高脂血症、高尿酸血症、高血圧の治療をすでに受けているものは除外した。

II. 方法

1. 測定項目：体格指数 (body mass index, BMI) [体重 (kg)/身長 (m)²]、ウエスト/ヒップ (waist/hip, W/H) 比、収縮期血圧、拡張期血圧、血清総コレステロール、血清中性脂肪、血清HDL-C、血清尿酸、血清遊離脂肪酸 (free fatty acid, FFA)、75gOGTT、血清TNF- α 濃度、 β_3 -AR遺伝子ミスセンス変異およびUCP-1遺伝子多型性

2. β_3 -AR遺伝子ミスセンス変異およびUCP-1遺伝子多型性の検出

1) DNA抽出

ヘパリン添加採血管で、-20℃にて凍結保存した末梢全血を、37℃の水浴上で急速溶解したあと50 μ l採取し、0.5 mlのTE緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA) に溶解し10,000 rpmで10秒間遠心した。Kawasaki²⁶⁾の方法にしたがって、沈殿した白血球よりDNAを抽出した。すなわち、TE緩衝液を加え、遠心沈殿を2回くり返したあと、沈殿物をK緩衝液 [ゼラチンを含まないPCR緩衝液 (50 mM 塩化カリウム, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM 塩化マグネシウム), 0.45% Tween20 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 100 μ g/ml プロテイナーゼK (Boehringer Mannheim)] に再懸濁し56℃で1.5時間保温後、95℃で10分間加熱し、7.5~10 μ lをPCRに使用した。

2) β_3 -AR 遺伝子ミスセンス変異 (Trp64Arg) の検出

i. PCR

β_3 -AR 遺伝子のエクソン1のコドン64を標的としてPCRを行った。プライマーは、Clementら⁴⁾の方法にしたがって (図1)、上流側を5'-CCAGTGGGCTGCCAGGGG-3'、下流側を5'-GCCAGTGGCGCCCAACGG-3'に設定した。上記のごとく抽出したDNAに1対のプライマー (500 μ g/ml)、PCR反応緩衝液、デオキシヌクレオチド混合液 [dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各500 μ M (Pharmacia, Uppsala, Sweden)], Taq DNAポリメラーゼ (Parkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 2.5単位を加え滅菌蒸留水により全量100 μ lに調整した。加熱による反応液の蒸発を防ぐため反応液に50 μ lのミネラル・オイル (Sigma, St.Louis, USA) を重層した。反応にはDNAミニサイクラー (MJ Research, Watertown, USA) を使用し、熱変性を94℃、30秒間、アニーリングを61℃、30秒間、DNAの伸長を72℃、30秒間とし、これを1サイクルとして35サイクル繰り返した。反応終了後、クロロホルム100 μ lを加え振盪し、上層に増幅後のDNA溶液を得た。得られたDNA溶液を5'-CC/(A, T) GG-3'、3'-GG (T, A)/CC-5'を特異的に認識する制限酵素BstNI (Sigma) で60℃、2時間処理した後、10 μ lをとり2.5%アガロースゲル (FMC, Rockland, USA) で電気泳動し制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) を検討した。

ii. PCR産物および遺伝子変異の確認

2.5% アガロースゲルには制限酵素処理したPCR産物とDNA分子量マーカー9 (和光, 大阪)を平行して流し電気泳動終了後,ゲルをエチジウム・ブロマイドにより染色し,紫外線照射にて

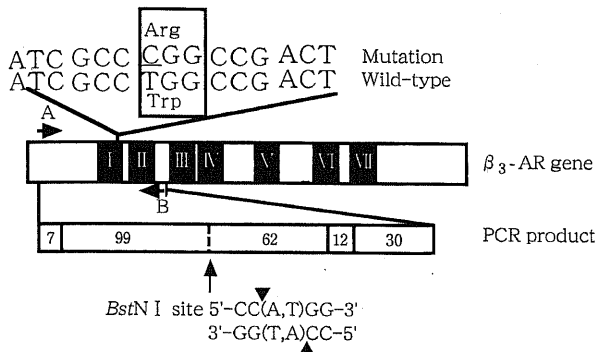


Fig. 1. β_3 -adrenergic receptor (AR) encompassing the mutation in transmembrane domain I. Transmembrane domains are indicated by the numbered black boxes. The positions of the forward and reverse PCR primers are indicated. PCR amplification was carried out with the primers (forward primer, 5'-CCAGTGGGCTGCCAGGGG-3'; reverse primer, 5'-GCCAGTGCGCCAACGG-3'). The polymorphic region is shown above β_3 -AR gene, with the mutated nucleotide underlined and the changed codon surrounded by a box. The final 210 bp PCR product is represented as a box with the fragment sizes after restriction enzyme digestion. The arrow shows where the mutation ablated the *Bst*NI site.

蛍光バンドを確認した。当該変異が存在する場合は制限酵素による消化を受けず161 bpのバンドが得られた。遺伝子変異のない正常例では99 bpと62 bpの2つのバンドが認められ,変異型ヘテロ例では輝度の弱い161, 99, 62 bpの各バンドが認められた(図3, A)。

3) UCP-1: A \rightarrow G (-3826) 遺伝子多型性の検出

i. PCR

5'-非翻訳領域を標的にしてPCRを行った。2)と同様に末梢血ゲノムDNA 50~100 ngを鋳型とし,プライマーはCassard-Doulcierら¹²⁾の方法にしたがい(図2)上流側を5'-CTTGGGTAGTGACAAAGTAT-3',下流側を5'-CCAAAGGGTCAGATTTCTAC-3'に設定した。PCR反応は熱変性を94℃,30秒間,アニーリングを55℃,30秒間,DNAの伸

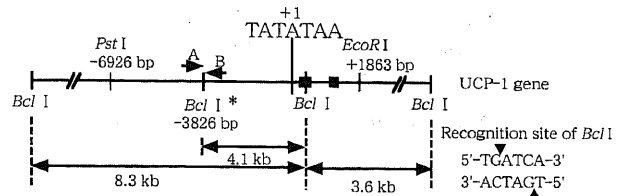
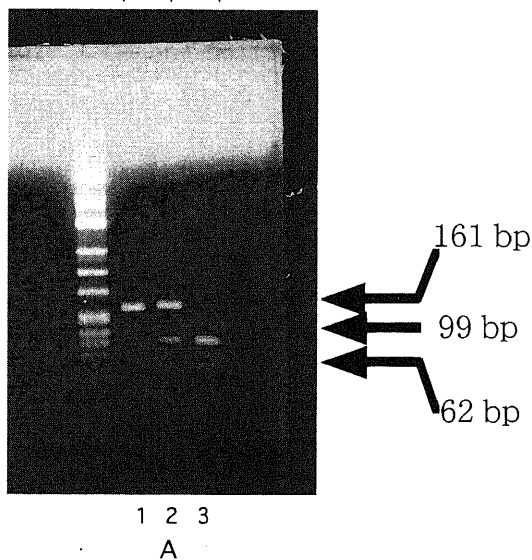


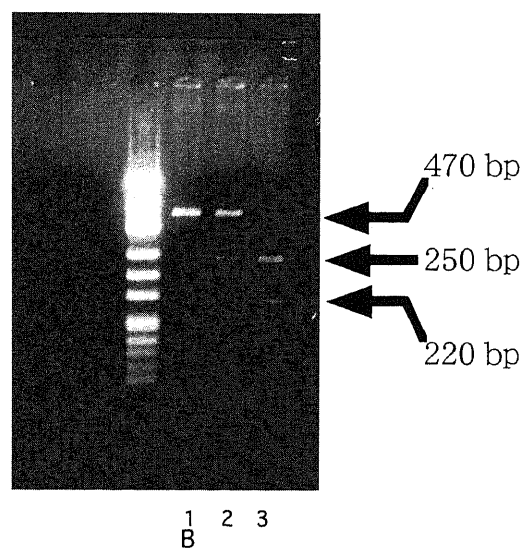
Fig. 2. Restriction map of the 5'-flanking region of the human uncoupling protein (UCP)-1 gene and localization of the polymorphic *Bcl* I restriction site (asterisk). Positions were numbered relatively to the TATA box. PCR primers (forward primer, 5'-CTTGGGTAGTGACAAAGTAT-3'; reverse primer, 5'-CCAAAGGGTCAGATTTCTAC-3') were used to amplify a 470 bp DNA fragment encompassing the polymorphic *Bcl* I site.

Arg/Arg Trp/Arg Trp/Trp



Trp64Arg mutation of β_3 -AR gene

GG AA
AG



A \rightarrow G(-3826) point mutation of UCP-1 gene

Fig. 3. PCR amplification and agarose gel electrophoretic analysis. Panels A and B show the detection of Trp64Arg mutation of the β_3 -adrenergic receptor (AR) gene and A to G(-3826) point mutation of the uncoupling protein (UCP)-1 gene respectively by PCR and restriction fragment length polymorphism. The PCR product was digested with the restriction endonuclease (β_3 -AR gene, *Bst*NI; UCP-1 gene, *Bcl* I) and visualized by staining with ethidium bromide. Lane 1, mutant homozygote; lane 2, heterozygote; lane 3, wild type homozygote.

長を72℃, 60秒間とし, これを1サイクルとして30サイクル繰り返した. 得られたDNA溶液を5'-T/GCAT-3', 3'-ACTAG/T-5'を特異的に認識する制限酵素 *Bcl* I (和光) で50℃, 3時間処理したあと2.5%アガロースゲルで電気泳動しRFLPを検討した.

ii. PCR産物および遺伝子変異の確認

2) ii. と同様に行った. 当該変異が存在する場合は制限酵素による消化を受けず470 bpバンドのみが得られた. 遺伝子変異

のない野生型例では250 bpと220 bpの2つのバンドが認められ, 変異型ヘテロ例では輝度の弱い470, 250, 220 bpの各バンドが認められた(図3, B).

4) 血清TNF- α 濃度の測定

-20℃で保存した血清中のTNF- α 濃度をQuantikineTM高感度ヒトTNF- α イムノアッセイ・キット (R&D Systems, Minneapolis, USA)を用いて測定した. 本測定法の検出限界は0.11 pg/mlであり, 測定内変動係数は13.9%, 測定間変動係数

Table 1. Numbers of Trp64Arg mutation of the β_3 -AR gene and A→G (-3826) polymorphism of the UCP-1 gene

Gender	β_3 -AR gene (%)			UCP-1 gene (%)			Total
	Trp64Arg mutation			A→G (-3826) variant			
	Arg/Arg	Trp/Arg	Trp/Trp	GG	AG	AA	
Male	6 (2.7)	52 (23.4)	131 (59.0)	43 (19.4)	98 (44.1)	48 (21.6)	189
Female	1 (3.0)	10 (30.3)	22 (66.7)	9 (27.2)	15 (45.5)	9 (27.3)	33
All	7 (3.2)	62 (27.9)	153 (68.9)	52 (23.4)	113 (50.9)	57 (25.7)	222

A, adenine; Arg, arginine; β_3 -AR, beta 3-adrenergic receptor; G, guanine; Trp, tryptophan; UCP-1, uncoupling protein-1.

Table 2. Distribution of genotypes defined A→G (-3826) variant of the UCP-1 gene and Trp64Arg mutation of the β_3 -AR gene

UCP-1 gene A→G (-3826) variant	β_3 -AR gene (%)			Total
	Trp64Arg mutation			
	Trp/Trp	Trp/Arg	Arg/Arg	
AA	37 (16.7)	19 (8.6)	0 (0.0)	56 (25.2)
AG	84 (37.8)	27 (12.2)	5 (2.3)	116 (52.3)
GG	32 (14.4)	16 (7.2)	2 (0.9)	50 (22.5)
Total	153 (68.9)	62 (28.0)	7 (3.1)	222 (100)

Table 3. Clinical characteristics according to β_3 -AR genotype

Characteristics	Genotype		
	Homozygote Arg/Arg (n=7)	Heterozygote Trp/Arg (n=62)	Wild-type homozygote Trp/Trp (n=153)
Gender (Male/Female)	(6/1)	(52/10)	(131/22)
Age (years)	48.9±8.2	50.7±7.1	51.3±7.2
Body mass index (kg/m ²)	24.3±1.3	23.2±2.7	23.5±2.5
Waist/hip ratio	0.89±0.06	0.88±0.05	0.88±0.06
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	117±10	114±15	114±14
Diastolic	75±8	74±10	72±10
Serum lipids (mg/dl)			
Total cholesterol	190.0±36.1	210.2±34.7	211.3±38.8
Triglyceride	181.7±72.9*	139.4±58.3	138.4±54.9
HDL-cholesterol	50.9±15.5	53.0±13.4	54.1±14.5
Serum uric acid (mg/dl)	6.3±1.0	5.9±1.4	5.8±1.2
Serum free fatty acid (mEq/l)	0.50±0.22	0.47±0.17	0.48±0.19
Fasting plasma glucose (mg/dl)	96.0±12.9	98.7±14.8	98.9±16.4
Fasting plasma insulin (μ U/ml)	6.14±3.53	5.54±2.07	5.95±2.20
Serum TNF- α (pg/ml)	2.89±0.60	2.71±0.56	2.69±0.59

Data are expressed as \bar{x} ±SD. * P<0.05 versus wild-type homozygote. HDL, high density lipoprotein; TNF- α , Tumor necrosis factor-alpha.

は7.6%であった。

5) 統計

各遺伝子変異群における臨床指標の測定値は平均値±標準偏差で示し、群間の比較はMann-WhitneyのU検定で行なった。アレル頻度は、Hardy-Weinbergの平衡を用いて算出した。また、耐糖能の違いによる遺伝子変異頻度の比較は、標本数が5以下の場合はFisherの直接確率法を、6以上の場合は χ^2 検定を用いた。統計的有意水準は $P < 0.05$ とした。

成 績

1. 変異アレル頻度

β_3 -AR遺伝子およびUCP-1遺伝子型の発現割合を検討したところ β_3 -AR遺伝子の変異型ホモの割合は3.2%で、アレル頻度は0.179、UCP-1遺伝子の変異型ホモの割合は23.4%、アレル頻度は0.484であった(表1)。次に、両遺伝子変異の組み合わせ頻度を検討したところ両遺伝子ともに変異型ホモを示したものは2

Table 4. Clinical characteristics according to UCP-1 genotype

Characteristics	Genotype		
	Homozygote GG (n=52)	Heterozygote AG (n=113)	Wild-type homozygote AA (n=57)
Gender (Male/Female)	(43/9)	(98/15)	(48/9)
Age (years)	50.1±6.9	51.5±7.4	50.2±7.1
Body mass index (kg/m ²)	23.1±2.3	24.1±2.4*	23.1±2.3
Waist/hip ratio	0.88±0.05	0.89±0.06	0.88±0.06
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	116±16	114±14	110±13
Diastolic	74±10	73±10	69±10
Serum lipids (mg/dl)			
Total cholesterol	219.8±41.3	205.8±36.6	210.6±35.1
Triglyceride	145.1±55.8	148.8±54.3	128.3±61.7
HDL-cholesterol	54.8±13.8	51.5±13.4	57.0±15.3
Serum uric acid (mg/dl)	5.8±1.3	6.0±1.2	5.7±1.3
Serum free fatty acid (mEq/l)	0.47±0.20	0.49±0.19	0.46±0.16
Fasting plasma glucose (mg/dl)	98.4±17.5	100.0±16.1	96.5±13.4
Fasting plasma insulin (μ U/ml)	5.6±1.7	6.1±2.5	5.4±1.9
Serum TNF- α (pg/ml)	2.77±0.56	2.67±0.60	2.70±0.57

Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. * $P < 0.05$ versus wild-type homozygote.

Table 5. Clinical characteristics according to UCP-1 genotype

Characteristics	Genotype	
	Variant GG or AG (n=165)	Wild-type homozygote AA (n=57)
Gender (Male/Female)	(141/24)	(48/9)
Age (years)	51.0±7.2	50.2±7.1
Body mass index (kg/m ²)	23.8±2.4*	22.5±2.7
Waist/hip ratio	0.89±0.06	0.87±0.05
Blood pressure (mmHg)		
Systolic	115±14*	110±13
Diastolic	73±10*	70±10
Serum lipids (mg/dl)		
Total cholesterol	210.2±38.6	210.6±35.2
Triglyceride	144.2±54.6	128.3±61.7
HDL-cholesterol	52.5±13.6*	57.0±15.4
Serum uric acid (mg/dl)	5.9±1.2	5.7±1.3
Serum free fatty acid (mEq/l)	0.47±0.20	0.46±0.16
Fasting plasma glucose (mg/dl)	99.5±16.6	96.5±13.4
Fasting plasma insulin (μ U/ml)	5.9±1.2	5.7±1.3
Serum TNF- α (pg/ml)	2.70±0.59	2.70±0.57

Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$. * $P < 0.05$ versus wild-type homozygote.

例で0.9%, β_3 -AR遺伝子が変異型ホモでUCP-1遺伝子が変異型ヘテロを示すものは5例(2.3%), β_3 -AR遺伝子が変異型ヘテロでUCP-1遺伝子が変異型ホモを示すものは16例(7.2%), β_3 -AR遺伝子が変異型ヘテロでUCP-1遺伝子も変異型ヘテロを示すものは27例(12.2%)であった(表2).

2. β_3 -AR遺伝子変異と各臨床指標との関係

β_3 -AR遺伝子変異と各臨床指標との関係を検討したところ、変異型ホモ群で野生型群と比較して血清中性脂肪が有意に高値

であった(表3).

3. UCP-1遺伝子多型性と各臨床指標との関係

UCP-1遺伝子多型性と各臨床指標との関係を検討したところ、変異型ヘテロ群で野生型群と比較してBMIが有意に高値であった(表4). 変異型ホモ群と変異型ヘテロ群を合わせた場合、野生型群と比較してBMI, 収縮期血圧, 拡張期血圧が有意に高値, HDL-Cが低値であった(表5).

4. β_3 -AR遺伝子変異およびUCP-1遺伝子多型性の組み合わせ

Table 6. Clinical characteristics according to the combination with β_3 -AR and UCP-1 genotypes

Characteristics	Combination of genotypes			
	Arg/Arg or Trp/Arg		Trp/Trp	
	GG or AG (n=49)	AA (n=20)	GG or AG (n=116)	AA (n=37)
Gender (Male/Female)	(44/5)	(14/6)	(97/19)	(33/3)
Age (years)	51.1±7.5	50.8±7.0	51.0±7.2	50.0±7.2
Body mass index (kg/m ²)	23.7±2.4*	22.4±2.8	23.8±2.4*	22.6±2.7
Waist/hip ratio	0.88±0.06	0.87±0.05	0.89±0.06	0.87±0.06
Blood pressure (mmHg)				
Systolic	116±15*	112±15	115±14*	109±12
Diastolic	75±9*	71±11	72±11	69±10
Serum lipids (mg/dl)				
Total cholesterol	207.5±32.2	209.9±42.2	211.4±41.1	210.0±31.3
Triglyceride	151.6±55.9	125.6±69.5	141.0±54.0	129.9±57.8
HDL-cholesterol	50.5±12.1	58.3±15.4	55.4±14.2	56.3±15.5
Serum uric acid (mg/dl)	6.1±1.3	5.5±1.6	5.8±1.2	5.8±1.1
Serum free fatty acid (mEq/l)	0.49±0.19	0.45±0.13	0.48±0.20	0.46±0.17
Fasting plasma glucose (mg/dl)	100.1±16.5	94.4±6.5	99.2±16.6	97.6±15.8
Fasting plasma insulin (μ U/ml)	5.88±2.43	5.16±1.57	6.06±2.26	5.62±2.03
Serum TNF- α (pg/ml)	2.76±0.61	2.66±0.42	2.68±0.58	2.73±0.64

Data are expressed as \bar{x} ±SD. * P<0.05 versus Trp/Trp and AA genotype.

Table 7. Clinical characteristics according to the gender

Characteristics	Gender		P
	Male	Female	
Number of subjects	189	33	
Age (years)	50.5±7.4	52.8±5.3	ND
Body mass index (kg/m ²)	23.6±2.6	22.5±2.1	<0.05
Waist/hip ratio	0.89±0.05	0.83±0.88	<0.01
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	115.3±6.0	106.2±15.8	<0.01
Diastolic	73.1±10.0	67.2±10.8	<0.01
Serum lipids (mg/dl)			
Total cholesterol	208.5±37.5	220.7±37.5	ND
Triglyceride	147.4±55.8	101.3±45.6	<0.01
HDL-cholesterol	51.4±12.5	67.1±16.1	<0.01
Serum uric acid (mg/dl)	6.1±1.1	4.5±0.9	<0.01
Serum free fatty acid (mEq/l)	0.48±0.18	0.47±0.21	ND
Fasting plasma glucose (mg/dl)	99.9±16.4	91.8±9.6	<0.01
Fasting plasma insulin (μ U/ml)	5.9±2.2	5.3±2.1	ND
Serum TNF- α (pg/ml)	2.72±0.61	2.62±0.36	ND

Data are expressed as \bar{x} ±SD. ND, not detected.

せと各臨床指標との関係

β_3 -AR 遺伝子および UCP-1 遺伝子に変異型ホモあるいは変異型ヘテロが認められる群ではともに野生型である群と比較して BMI, 収縮期血圧, 拡張期血圧が有意に高値であった。 β_3 -AR 遺伝子に変異型ホモ, あるいは変異型ヘテロを認め, かつ UCP-1 遺伝子が野生型を示す群では, ともに野生型である群と比較していずれの指標にも有意差はなかった。 β_3 -AR 遺伝子は野生型, UCP-1 遺伝子に変異型ホモ, あるいは変異型ヘテロを認める群では, ともに野生型である群と比較して BMI, 収縮期血圧が有意に高値であった。 しかしながら, β_3 -AR 遺伝子ミス

センス変異および UCP-1 遺伝子多型性による相加効果は認められなかった (表 6)。

5. 男性における β_3 -AR 遺伝子変異と各臨床指標との関係

今回の検討では, 女性が 33 名と少なく, BMI, W/H 比, 血圧, 血清中性脂肪, HDL-C, 尿酸, 空腹時血糖において男女差が認められた (表 7) ことから, 男性のみについて各遺伝子変異と臨床指標との関係を検討した。 男性における β_3 -AR 遺伝子変異と各臨床指標との関係を検討したところ, 変異型ホモ群で血清中性脂肪が野生型群と比較して有意に高値であった (表 8)。

6. 男性における UCP-1 遺伝子多型性と各臨床指標との関係

Table 8. Clinical characteristics according to β_3 -AR genotype in men

Characteristics	Genotype		
	Homozygote Arg/Arg (n=6)	Heterozygote Trp/Arg (n=52)	Wild-type homozygote Trp/Trp (n=131)
Age (years)	48.8±9.0	50.7±7.5	50.4±7.4
Body mass index (kg/m ²)	24.4±1.4	23.4±2.8	23.7±2.6
Waist/hip ratio	0.88±0.05	0.88±0.05	0.89±0.05
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	117±10	114±15	114±14
Diastolic	75±8	74±10	72±10
Serum lipids (mg/dl)			
Total cholesterol	188.7±39.4	207.8±36.7	209.7±37.8
Triglyceride	194.3±71.0*	148.4±58.2	144.8±53.4
HDL-cholesterol	45.2±3.8	50.3±11.6	52.1±13.0
Serum uric acid (mg/dl)	6.5±1.0	6.2±1.3	6.0±1.1
Serum free fatty acid (mEq/l)	0.48±0.23	0.48±0.18	0.48±0.18
Fasting plasma glucose (mg/dl)	97.0±13.9	100.4±15.4	98.9±17.0
Fasting plasma insulin (μ U/ml)	6.17±3.87	6.11±2.25	5.95±2.20
Serum TNF- α (pg/ml)	2.96±0.63	2.69±0.59	2.71±0.62

Data are expressed as \bar{x} ±SD. * P<0.05 versus wild-type homozygote.

Table 9. Clinical characteristics according to UCP-1 genotype in men

Characteristics	Genotype		
	Homozygote GG (n=43)	Heterozygote AG (n=98)	Wild-type homozygote AA (n=48)
Age (years)	50.0±7.2	51.1±7.6	49.6±7.3
Body mass index (kg/m ²)	23.4±2.4	24.2±2.4*	22.7±2.8
Waist/hip ratio	0.89±0.05	0.90±0.06	0.87±0.05
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	116±16	117±13*	112±12
Diastolic	74±10	74±9*	70±10
Serum lipids (mg/dl)			
Total cholesterol	217.3±36.0	204.8±38.1	208.1±37.1
Triglyceride	153.1±54.5	149.7±53.4	137.8±61.5
HDL-cholesterol	51.6±11.5	49.6±11.9*	54.6±14.0
Serum uric acid (mg/dl)	6.1±1.2	6.2±1.1	5.9±1.2
Serum free fatty acid (mEq/l)	0.45±0.18	0.49±0.19	0.47±0.16
Fasting plasma glucose (mg/dl)	99.1±18.3	101.3±16.6	97.8±14.1
Fasting plasma insulin (μ U/ml)	5.8±1.8	6.2±2.5	5.5±1.8
Serum TNF- α (pg/ml)	2.82±0.59	2.68±0.63	2.70±0.59

Data are expressed as \bar{x} ±SD. * P<0.05 versus wild-type homozygote.

Table 10. Clinical characteristics according to the combination with β_3 -AR and UCP-1 genotypes in men

Characteristics	Combination of genotypes			
	Arg/Arg or Trp/Arg		Trp/Trp	
	GG or AG (n=44)	AA (n=14)	GG or AG (n=97)	AA (n=34)
Age (years)	50.7±7.7	49.5±7.7	50.8±7.4	49.6±7.3
Body mass index (kg/m ²)	23.7±2.4	22.8±3.1	24.1±2.4*	22.6±2.7
Waist/hip ratio	0.88±0.06	0.87±0.05	0.90±0.05	0.87±0.06
Blood pressure (mmHg)				
Systolic	116±15	114±12	116±14*	111±12
Diastolic	75±9*	72±11	73±10	70±10
Serum lipids (mg/dl)				
Total cholesterol	206.7±33.6	203.1±48.0	209.6±39.7	210.1±32.2
Triglyceride	157.0±56.9	142.5±73.2	147.9±52.1	135.8±57.0
HDL-cholesterol	48.8±11.0*	52.6±11.3	50.9±12.1	55.4±15.0
Serum uric acid (mg/dl)	6.3±1.2	6.1±1.6	6.1±1.1	5.9±1.0
Serum free fatty acid (mEq/l)	0.49±0.19	0.46±0.14	0.48±0.19	0.48±0.17
Fasting plasma glucose (mg/dl)	100.9±17.1	97.3±5.3	100.5±17.2	98.0±16.5
Fasting plasma insulin (μ U/ml)	5.60±2.43	5.57±1.56	6.32±2.32	5.53±1.96
Serum TNF- α (pg/ml)	2.77±0.64	2.58±0.38	2.70±0.61	2.74±0.65

Data are expressed as \bar{x} ±SD. * P<0.05 versus Trp/Trp and AA genotype.

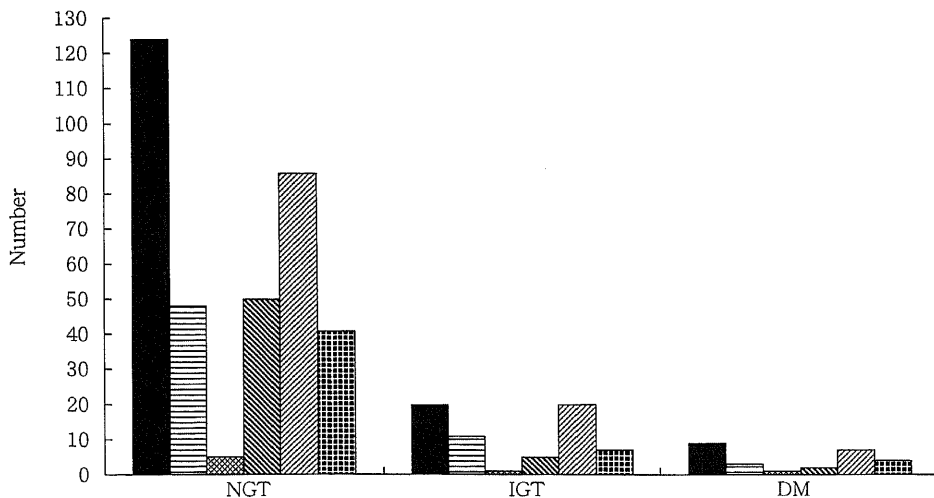


Fig. 4. Distribution of glucose tolerance pattern according to β_3 -adrenergic receptor and uncoupling protein-1 genotypes. NGT, normal glucose tolerance; IGT, impaired glucose tolerance; DM, diabetes mellitus; ■, Trp/Trp; ▨, Trp/Arg; ▩, Arg/Arg; ▪, AA; ▫, AG; ▭, GG.

Table 11. Distribution of glucose tolerance pattern according to β_3 -AR and UCP-1 genotypes or the combination of them

Genotypes	Glucose tolerance pattern			
	NGT	IGT	DM	Total
Trp/Trp	124	20	9	153
Trp/Arg	48	11	3	62
Arg/Arg	5	1	1	7
AA	50	5	2	57
AG	86	20	7	113
GG	41	7	4	52
Trp/Trp and AA	32	3	2	37
(Trp/Arg or Arg/Arg) and AA	18	1	0	19
Trp/Trp and (AG or GG)	94	17	7	118
(Trp/Arg or Arg/Arg) and (AG or GG)	35	11	4	50

NGT, normal glucose tolerance; IGT, impaired glucose tolerance; DM, diabetes mellitus.

同じく男性で、UCP-1 遺伝子多型性と各臨床指標との関係を検討したところ、変異のある群では野生型群と比較して BMI、収縮期血圧、拡張期血圧が有意に高値で、HDL-C が有意に低値であった (表9)。

7. 男性における β_3 -AR 遺伝子変異および UCP-1 遺伝子多型性の組み合わせと各臨床指標との関係

男性において β_3 -AR 遺伝子および UCP-1 遺伝子にともに変異を認める群では、ともに野生型である群と比較して、拡張期血圧が有意に高値で HDL-C が有意に低値であった。 β_3 -AR 遺伝子変異を認めるが UCP-1 遺伝子に変異のない群では、ともに野生型である群と比較して有意差のあるものはなかった。 β_3 -AR 遺伝子に変異を認めないが、UCP-1 遺伝子に変異を認める群では BMI、収縮期血圧が有意に高値であった。しかしながら、 β_3 -

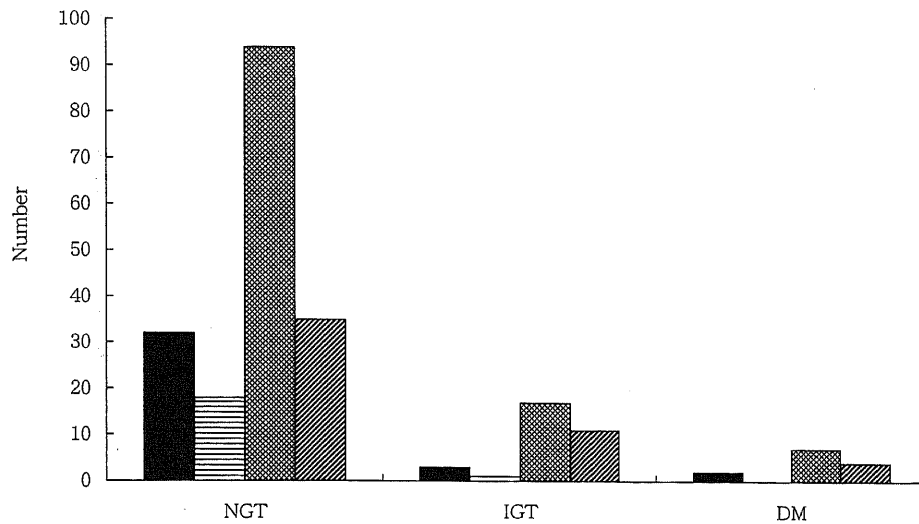


Fig. 5. Distribution of glucose tolerance pattern according to the combination of β_3 -adrenergic receptor and uncoupling protein-1 genotypes. NGT, normal glucose tolerance; IGT, impaired glucose tolerance; DM, diabetes mellitus; ■, Trp/Trp and AA; ▨, (Trp/Arg or Arg/Arg) and AA; ▩, Trp/Trp and (AG or GG); ▤, (Trp/Arg or Arg/Arg) and (AG or GG).

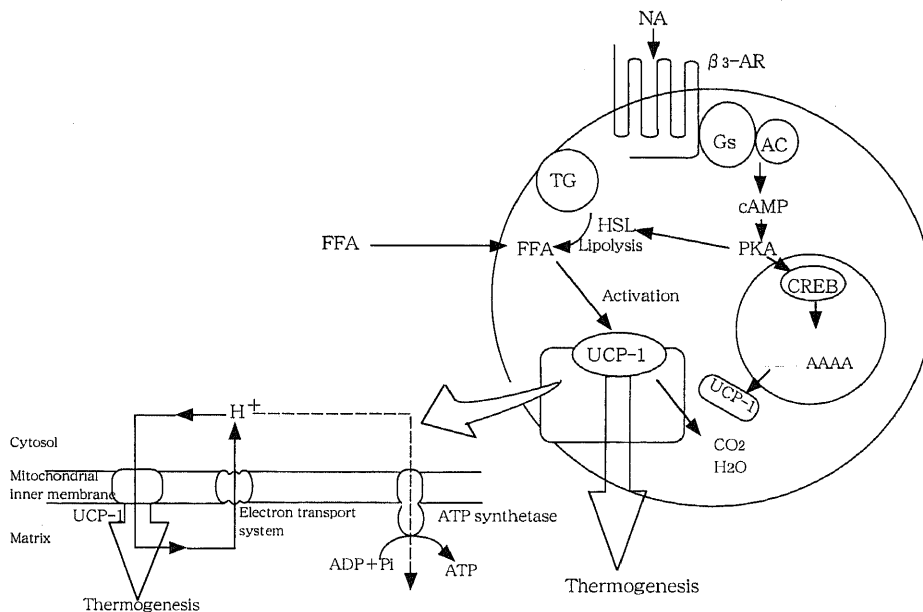


Fig. 6. System of uncoupling protein (UCP)-1 activation by β_3 -adrenergic receptor (AR). Noradrenalin (NA) acts on β_3 -AR and leads via cAMP to lipolysis, i.e. liberation of free fatty acids (FFA). The proton conductance of UCP, normally blocked by ATP, is induced by FFA. NA also leads, probably also mediated by cAMP, to an increase in UCP synthesis. AC, adenylyl cyclase; CREB, cAMP responsive element binding protein; FFA, free fatty acid; Gs, stimulatory G protein; HSL, hormone sensitive lipase; NA, noradrenalin; Pi, inorganic phosphate; PKA, protein kinase A.

AR 遺伝子ミスセンス変異および UCP-1 遺伝子多型性による相加効果は認められなかった (表10).

8. β_3 -AR 遺伝子ミスセンス変異, UCP-1 遺伝子多型性と耐糖能との関係

β_3 -AR 遺伝子変異, UCP-1 遺伝子変異およびその組み合わせにより WHO の診断基準による耐糖能に差が生じるか否かを検討したが両遺伝子変異により耐糖能の分布に有意差を認めなかった (表11, 図4, 5).

考 察

我が国では高齢化社会を迎えて悪性新生物, 虚血性心疾患, 脳血管疾患, 高血圧, 高脂血症, 肥満, 2型糖尿病といった生活習慣が発症, 進展に大きくかかわっていると考えられる疾患群を「生活習慣病」と呼ぶようになった²⁷⁾. 日本人の死因の第1位から第3位までを悪性新生物, 虚血性心疾患, 脳血管疾患が占めており²⁸⁾医療対策上「生活習慣病」をいかに減らしてい

くかが今後の重要課題と考えられている。とりわけ、動脈硬化性疾患である脳血管疾患、虚血性心疾患に関してその背景に、高血圧、高脂血症、肥満、2型糖尿病といった「生活習慣病」が重複して認められることが多い。このように一個人に動脈硬化性疾患の危険因子が集積する状態はMRFSと総称されている。Reaven²⁹⁾はインスリン抵抗性や高インスリン血症がMRFSの根本的原因と考え、Syndrome X〔高インスリン血症、高血圧、脂質代謝異常(高超低比重リポ蛋白血症-高中性脂肪血症、低HDL-C血症)、耐糖能障害〕と命名し、またDeFronzoら³⁰⁾はインスリン抵抗性症候群(高インスリン血症、肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧、動脈硬化性疾患)と呼んでいる。一方、Fujiokaら³¹⁾、松澤³²⁾は、このインスリン抵抗性の上流には肥満、特に内臓脂肪型肥満が存在するとし、これらの症候群を内臓脂肪症候群と呼び肥満を最も重要視している。すなわち、内臓脂肪から分泌されるTNF- α がインスリンのシグナル伝達を阻害し、インスリン抵抗性をきたし、同時にそれを代償するために膵臓からのインスリン分泌が亢進し高インスリン血症を呈する。このことは肝での脂質合成を亢進させ、腎でのナトリウム排泄を低下させることにより高脂血症や高血圧をもたらす。さらに内臓脂肪細胞は代謝活性が高く、脂肪分解により生じたFFAは門脈血中に流入し肝臓に取り込まれる。その結果、中性脂肪合成が亢進し高中性脂肪血症をきたしたり、肝でのインスリン・クリアランスの低下を引き起こし高インスリン血症をも惹起させると考えられている³³⁾。このようなインスリン抵抗性の増大は膵 β 細胞のインスリン分泌能が十分あれば、高インスリン血症による代償によって耐糖能は正常範囲に保たれるが、膵 β 細胞の疲弊により破綻すると糖尿病が発症してくると考えられている。以上の理由から、「生活習慣病」の中でも特に肥満の発症機序を解明しそれを予防することが最も重要な課題と考えられる。

ヒト単純性肥満はいくつかの遺伝因子と生活習慣の環境因子によって規定されている多因子疾患である。現在、肥満形成の遺伝学的検討が多方面で行われている。すなわち、食事摂取とエネルギー消費を調節することで体重の恒常性を保つレプチン^{34)~36)}、白色脂肪細胞における脂肪分解や褐色脂肪細胞における熱産生の機能と関連する β_3 -AR³⁷⁾、イオン勾配の維持作用がエネルギー消費に関係するNa, K-ATPase³⁷⁾、エネルギー均衡に関与するグルココルチコイド受容体³⁸⁾、褐色脂肪細胞のミトコンドリアに存在しATPを介さない熱産生に関与するUCP-1¹¹⁾などの遺伝子であるが、今回、その中で褐色脂肪細胞での熱産生に関与している β_3 -AR遺伝子ならびにUCP-1遺伝子に着目し検討した。

まず、 β_3 -AR遺伝子のミスセンス変異のアレル頻度は0.179で、日本の他施設からの報告頻度とほぼ同程度であった^{5)6)39)~41)}。これはピマ・インディアン(0.31)²⁾より低頻度、欧米人(アメリカ白人、0.08²⁾;フィンランド人、0.11³⁾;フランス人、0.09⁴⁾)より高頻度であった。臨床指標との関連では変異型ホモ群で血清中性脂肪のみが高値であるという結果が得られた。欧米人における β_3 -AR遺伝子変異とW/H比の上昇やインスリン抵抗性との関連が報告されて以後、Hoffstedtら⁴²⁾はヒトにおいて上半身肥満者で β_3 -ARの感受性が低下しており、この機能低下が内臓脂肪蓄積と正相関することを報告した。また、ヒト β_3 -ARが主に内臓脂肪に分布すること⁹⁾から、 β_3 -AR遺伝子変異が β_3 -ARの機能低下をもたらし内臓脂肪蓄積を生じさせている可能

性も考えられる。わが国の他施設からの報告でも、 β_3 -AR遺伝子変異とBMI、高インスリン血症³⁹⁾、内臓脂肪、脂質代謝異常(総コレステロール、高中性脂肪血症、血清HDL-C低下)、収縮期血圧上昇、空腹時血糖上昇⁵⁾との相関が報告されている。したがって、 β_3 -AR遺伝子はいわゆる内臓脂肪症候群あるいはインスリン抵抗性症候群の原因遺伝子のひとつと考えられており⁵⁾、今回の結果もそれらに合致するものであった。

一方、今回の検討では、UCP-1遺伝子変異のアレル頻度は0.484で日本人についての他施設での報告(0.462)⁴³⁾とほぼ同程度であった。欧米人での報告では、フランス人でOppertら¹¹⁾の報告では0.28、Clementら⁴⁴⁾の報告では0.27、デンマーク人で0.253である⁴⁵⁾ことから、日本人における変異頻度は、非常に高いものと考えられた。臨床指標との関連ではUCP-1遺伝子変異のあるものでBMIが有意に高値であった。また、BMIが26.4以上の肥満群でのUCP-1遺伝子変異の割合は変異型ヘテロ、ホモ併せて86.2%で、一方、BMI 19.8未満の痩せ群でのUCP-1遺伝子変異の割合は変異ヘテロ、ホモ併せて55.6%であることから、UCP-1遺伝子変異を有する者に肥満傾向が認められた。また、UCP-1遺伝子変異群では収縮期血圧、拡張期血圧が有意に高値、HDL-Cが有意に低値であったことから、 β_3 -ARのミスセンス変異と中性脂肪との相関とも併せ、これらの遺伝子変異とMRFSとの関連が示唆された。

生命維持に必要な基礎代謝や運動に消費されるエネルギー以外に、寒冷刺激や過食に対応して消費されるエネルギーは、非ふるえ熱産生と呼ばれ、エネルギー消費の自律的調節の主成分をなしている⁴⁶⁾。この調節性熱産生の特異的部位が褐色細胞である。褐色脂肪組織には交感神経が豊富に分布しており、褐色細胞での熱産生の機序は以下のように考えられている。まず、寒冷暴露や過食により交感神経活動は亢進し交感神経終末よりノルアドレナリンが分泌される。次に分泌されたノルアドレナリンは褐色細胞の β_3 -ARに働き、細胞内でアデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼA、ホルモン感受性リパーゼという一連のカスケードを活性化して細胞内の中性脂肪を分解する。遊離した脂肪酸が、ミトコンドリア内膜に存在するUCP-1と結合すると酸化的リン酸化によるATP産生が低下し、脂肪酸の化学エネルギーが熱として放出される(図6)⁴⁷⁾。この β_3 -ARによるUCP-1の活性調節機構が障害されれば、消費エネルギーの低下をきたし肥満を発症することが予想される。実際、UCP-1過剰発現トランスジェニック・マウスは痩せを呈し、逆に、発現低下マウスが肥満することからUCP-1と肥満との関連が証明されている⁴⁸⁾。一方、 β_3 -AR、UCP-1両遺伝子変異の臨床指標に及ぼす相加効果に関しては、欧米人で病的肥満における体重増加⁴⁹⁾や、肥満者における基礎代謝率の低下⁴⁹⁾に関与するとの報告がみられる。そこで今回、日本人における β_3 -ARとUCP-1両遺伝子変異の相加効果の有無を検討したが各臨床指標に与える相加効果は認められなかった。

TNF- α は元来、単球/マクロファージに由来する腫瘍壊死因子として発見されたが⁵⁰⁾⁵¹⁾、近年、脂肪細胞からの産生が確認され¹⁵⁾⁵²⁾、また、肥満に伴いその産生が高まることも報告されており¹⁶⁾²⁰⁾⁵³⁾、インスリン抵抗性因子として注目されている。すなわち、Hotamisligilら¹⁵⁾⁵²⁾によると、遺伝性肥満マウス〔db/db(レプチン受容体異常)、ob/ob(レプチン異常)〕や遺伝性肥満ラット(fa/fa)の脂肪細胞においてTNF- α mRNAの発現は5~10倍増加していた。感染や悪性腫瘍などが背景にあると、

TNF- α のみでなくインターロイキン-1, インターフェロン・ガンマなどの他のサイトカインも増加するが, 肥満動物の脂肪組織では TNF- α 以外の発現増加は認めなかった。さらに, 彼らは, fa/fa ラットに可溶性 IgG-TNF レセプター蛋白質を投与した後, 高インスリン正常血糖クランプ法によりインスリン抵抗性を評価したところ, 筋肉組織におけるブドウ糖利用率が増加し, TNF- α の中和により末梢におけるインスリン抵抗性が改善できることを報告した。また, 彼らはヒトでの検討も加えており, 肥満者では非肥満者に比べて皮下脂肪で 2.5 倍以上の TNF- α mRNA の発現増加を認め, その発現量はインスリン抵抗性の指標となる血漿インスリン濃度と相関し, 体重が減少しインスリン抵抗性が改善するとともに, 皮下脂肪における TNF- α mRNA の発現が減少する¹⁸⁾ことを報告した。さらに, 彼らは血清 TNF- α 濃度についても検討を加えているが, 感度以下のため, TNF- α がエンドクリンに働くとは考えにくいとし, 脂肪細胞から筋肉細胞に対してパラクリンに働くか, あるいは脂肪細胞自身にオートクリンに働いてインスリン抵抗性を生じると推論している¹⁹⁾。しかし, Katuki ら²⁰⁾は高感度イムノアッセイ・キットにより, 肥満 2 型糖尿病患者 (BMI 27.47 \pm 0.33) において血清 TNF- α 濃度が有意に高値であること, 治療後の体重減少およびインスリン抵抗性改善とともに血清 TNF- α 濃度が低下したことを報告しており, TNF- α がエンドクリンに働く可能性も考えられる。TNF- α と β_3 -AR との関連では, 脂肪細胞 3T3-F442A における β_3 -AR の発現が TNF- α により抑制されたとの報告がある⁵⁴⁾。また, TNF- α は脂肪細胞自体に対してアポトーシスを誘導することが報告されている⁵⁵⁾。このことは, 脂肪細胞自体が自己フィードバック制御機構を介して肥満の進行を抑制している可能性を示唆している。以上のことから, β_3 -AR 遺伝子変異ならびに UCP-1 遺伝子多型性と血清 TNF- α 濃度との関係に興味を持たれたため, 今回血清 TNF- α 濃度を測定した。しかしながら, 今回の検討では, β_3 -AR 遺伝子変異や UCP-1 遺伝子多型性と血清 TNF- α 濃度との間には有意な相関はみられなかった。また, データには示さないが血清 TNF- α 濃度と BMI, 血清脂質, 耐糖能との間においても相関は認められなかった。今回の検討母集団の BMI は 23.5 \pm 2.5 であり, 肥満度がそれほど高くなかったことがその原因の一つと考えられた。今後, 肥満者の例数を増やしたり, また, 体脂肪率や腹部コンピューター断層撮影による内臓脂肪/体脂肪比などを測定することでより詳細な検討が可能になると思われる。

ヒト肥満は, 多因子遺伝であり, さまざまな遺伝要因, 環境因子が複雑にからみあって病態を形成すると考えられる。今回の検討では β_3 -AR 遺伝子変異, UCP-1 遺伝子多型性の頻度が欧米人に比べて著しく高かったことから, それら自体の寄与は大きいかもしれないが, 少なくとも日本人男性においては β_3 -AR 遺伝子変異と高中性脂肪血症, UCP-1 遺伝子多型性と BMI の増加, 血圧の上昇, HDL-C の低下との関連が認められた。このことは両遺伝子が, 肥満, そしてそれに伴う MRFS に関連した遺伝子である可能性を示唆している。また, 今後, 日本人女性の例数を増やしてより詳細に検討すべきと思われる。

結 論

人間ドック受診者を対象に, β_3 -AR 遺伝子変異ならびに UCP-1 遺伝子多型性と各臨床指標との関係を検討した結果, 以下の結論を得た。

- 1) β_3 -AR 遺伝子変異アレル頻度は 0.179, UCP-1 遺伝子変異のアレル頻度は 0.484 であった。
 - 2) 男性において β_3 -AR 遺伝子の変異型ホモ群で血清中性脂肪が有意に高値であった。
 - 3) 男性において UCP-1 遺伝子の変異型群で, BMI, 収縮期血圧, 拡張期血圧が有意に高値で, HDL-C が有意に低値であった。
 - 4) β_3 -AR 遺伝子変異ならびに UCP-1 遺伝子多型性により, 血清 TNF- α 濃度および耐糖能に差は認められなかった。
 - 5) 各臨床指標値において, β_3 -AR 遺伝子ミスセンス変異および UCP-1 遺伝子多型性による相加効果は認められなかった。
- 以上の結果より日本人男性においては, β_3 -AR 遺伝子変異ならびに UCP-1 遺伝子多型性が MRFS の形成に関連している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授, ならびにこの研究遂行にあたり直接御指導いただきました永井幸広講師, 早川哲雄博士に深甚なる謝意を表します。また, 研究に御協力いただきました金沢大学第一内科第一研究室の諸先生に深く感謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第 41 回日本糖尿病学会年次学術集会 (1998, 和歌山) において発表した。

文 献

- 1) Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* 245: 1118-1121, 1989
- 2) Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, Sorkin JD, Roth J, Shuldiner AR. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor gene. *N Engl J Med* 333: 343-347, 1995
- 3) Widen E, Lehto M, Kannien T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. Association of a polymorphism in the β_3 -adrenergic receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med* 333: 348-351, 1995
- 4) Clement K, Vaisse C, Manning BSJ, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Sliver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg AD. Genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med* 333: 352-354, 1995
- 5) Sakane N, Yoshida T, Umekawa T, Kondo M, Sakai Y, Takahashi T. β_3 -adrenergic receptor polymorphism: a genetic marker for visceral fat obesity and the insulin resistance syndrome. *Diabetologia* 40: 200-204, 1997
- 6) Kadowaki H, Yasuda K, Iwamoto K, Otabe S, Shimokawa K, Silver K, Walston J, Yoshinaga H, Kosaka K, Yamada N, Saito Y, Hagura R, Akanuma Y, Shuldiner A, Yazaki Y, Kadowaki T. A mutation in the β_3 -adrenergic receptor gene is associated with obesity and hyperinsulinemia in Japanese subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 555-560, 1995
- 7) Fujisawa T, Ikegami H, Yamato E, Takekawa K, Nakagawa Y, Hamada Y, Oga T, Ueda H, Shintani M, Fukuda M, Ogihara T. Association of Trp64Arg mutation of the β_3 -adrenergic receptor

with NIDDM and body weight gain. *Diabetologia* 39: 349-352, 1996

8) Garruti G, Ricquier D. Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes* 16: 383-390, 1992

9) Krief S, Lönnqvist F, Raimbalut S, Baude B, Spronsen AV, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ. Tissue distribution of β_3 adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 91: 344-349, 1993

10) Kortelainen ML, Pelletier G, Ricquier D, Bukowiecki LJ. Immunohistochemical detection of human brown adipose tissue uncoupling protein in an autopsy series. *J Histochem Cytochem* 41: 759-764, 1993

11) Oppert JM, Vohl MC, Chagnon M, Dionne FT, Cassard-Doulcier AM, Ricquier D, Perusse L, Bouchard C. DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes* 18: 526-531, 1994

12) Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Chagnon M, Gelly C, Dionne FT, Oppert JM, Bouchard C, Chagnon Y, Ricquier D. The *Bcl I* polymorphism of the human uncoupling protein (UCP) gene is due to a point mutation in the 5'-flanking region. *Int J Obes* 20: 278-279, 1996

13) Champigny O, Ricquier D, Blondel O, Mayers RM, Briscoe MG, Holloway BR. β_3 -adrenergic receptor stimulation restores message and expression of brown fat mitochondrial uncoupling protein in adult dogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10774-10777, 1991

14) Nagase I, Yosida T, Kumamoto K, Umekawa T, Sakane N, Nikami H, Kawada T, Saito M. Expression of uncoupling protein skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic β_3 -adrenergic agonist. *J Clin Invest* 97: 2898-2904, 1996

15) Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91, 1993

16) Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest* 94: 1543-1549, 1994

17) Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2 the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274: 1377-1397, 1996

18) Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-2415, 1995

19) Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor- α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4854-4858, 1994

20) Katuki A, Sumida Y, Murashima S, Murata K, Takarada Y, Ito K, Fujii M, Tsuchihashi K, Goto H, Nakatani K, Yano Y. Serum levels of tumor necrosis factor- α are increased in obese

patients with noninsulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 859-862, 1998

21) Stunkard AJ, Sørensen TIA, Hanis G, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, Schulsinger F. An adoption study of human obesity. *N Engl J Med* 314: 193-198, 1986

22) Bouchard C, Tremblay A, Després JP, Nadeau A, Lupien PJ, Thériault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G. The response to long term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* 322: 1477-1482, 1990

23) Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 322: 1483-1487, 1990

24) Macdonald A. Body mass indexes of British separated twins. *N Engl J Med* 322: 1530, 1990

25) Alberti KGMM, Zimmet PZ. 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: 539-553, 1998

26) Kawasaki ES. 血液, 細胞などからの試料の調整. PCR実験マニュアル (Michael AI, Gelfand DH, Sninsky JJ, Thomas J, White TJ編), 第1版, 129-134頁, HBJ出版局, 東京, 1991

27) 厚生省公衆衛生審議会. 生活習慣に着目した疾病対策の基本的方向性について (意見具申). 週間保健衛生ニュース (村田幸持編), 第879号, 20-33頁, 社会保険実務研究所, 東京, 1996

28) 厚生省大臣官房統計情報部人口動態統計課. 平成10年最近の人口動態. 第34号, 15頁, (財)厚生統計協会, 東京, 1998

29) Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1605, 1988

30) DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14: 173-194, 1991

31) Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in the human obesity. *Metabolism* 36: 54-59, 1987

32) 松澤佑次. MRFSにおけるインスリン抵抗性と内臓脂肪蓄積の位置づけ. Mebio (猿田享男, 松澤佑次, 北 徹, 春日雅人編) 第15巻別冊: 30-37頁, メディカルビュー社, 東京, 1998

33) Svedberg J, Stömlad G, Wirth A, Smith U, Björntorp P. Fatty acid in the portal vein of the rat regulates hepatic insulin clearance. *J Clin Invest* 88: 2054-2058, 1991

34) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994

35) Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein; Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 543-546, 1995

36) Clement K, Garner C, Hager J, Philippi A, LeDuc C, Carey A, Harris TJR, Jury C, Cardon LR, Basdevant A, Demenais F, Guy-Grand B, North M, Froguel P. Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity. *Diabetes* 45: 687-690, 1996

- 37) Dériaz O, Dionne F, Pérusse L, Tremblay A, Vohl MC, Côté G, Bouchard C. DNA variation in the genes of the Na, K-adenosine triphosphatase and its relation with resting metabolic rate, respiratory quotient and body fat. *J Clin Invest* 93: 838-843, 1994
- 38) Clement K, Philippi A, Jury C, Pividal R, Demenais F, Basdevant A, Guy-Grand B. Candidate gene approach of familial morbid obesity: Linkage analysis of the glucocorticoid receptor gene. *Int J Obes* 20: 507-512, 1996
- 39) 安田和基, 門脇弘子, 岩本圭史, 小田辺修一, 下川耕太郎, 元山 薫, 羽倉稜子, 矢崎義雄, 門脇 孝, 赤沼安夫. 日本人における β_3 アドレナリン受容体のミスセンス変異と肥満/高インスリン血症との相関. *分子糖尿病学* 7: 23-28, 1996
- 40) 岩崎直子, 植田太郎, 勝盛弘三, 佐藤明子, 尾形真規子, 向坂由美子, 斉藤 節, 大河原久子, 金森雅夫, 大森安恵. β_3 AR 遺伝子ミスセンス変異と NIDDM の病態との関連についての検討. *分子糖尿病学* 8: 1-5, 1997
- 41) 近藤しおり, 永淵正法, 赤司朋之, 岩田 勲, 仁保喜之, 安西慶三, 小野順子. 日本人糖尿病患者における β_3 アドレナリン受容体ミスセンス変異と肥満, 高血圧, 内臓脂肪症候群との関係. *糖尿病* 40: 703-708, 1997
- 42) Hoffstedt J, Wahrenberg H, Thörne A, Lönnqvist F. The metabolic syndrome is related to β_3 -adrenoceptor sensitivity in visceral adipose tissue. *Diabetologia* 39: 838-844, 1996
- 43) 吉田俊秀, 小暮彰典, 坂根直樹. 肥満と β_3 アドレナリン受容体・脱共役蛋白質ファミリー. *分子糖尿病学の進歩* (門脇孝, 春日雅人, 清野 進, 渥美義仁編) 第 1 版, 129-135 頁, 金原出版, 東京, 1998
- 44) Clement K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P. Additive effect of A \rightarrow G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the Trp64Arg mutation of the β_3 -adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity. *Int J Obes* 20: 1062-1066, 1996
- 45) Urhammer SA, Fridberg M, Sørensen TIA, Echwald SM, Andersen T, Tybjerg-Hansen A, Clausen JO, Pedersen O. Studies of genetic variability of the uncoupling protein 1 gene in Caucasian subjects with juvenile onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4069-4074, 1997
- 46) Jansky L. Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiol Rev* 75: 237-259, 1995
- 47) 佐々木典康, 浅野 淳, 斉藤昌之. 熱産生と肥満ターゲット分子としての UCP ファミリー. *肥満研究* 3: 60-62, 1997
- 48) 斉藤昌之, 佐々木典康. 褐色脂肪細胞の脱共役蛋白質とアドレナリン作動性 β_3 レセプター. *実験医学* 14: 2222-2227, 1996
- 49) Valve R, Heikkinen S, Laakso M, Uusitupa M. Synergistic effect of polymorphisms in uncoupling protein 1 and β_3 -adrenergic receptor genes on basal metabolic rate in obese Finns. *Diabetologia* 41: 357-361, 1998
- 50) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Flore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72: 3666-3670, 1975
- 51) Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230: 630-632, 1985
- 52) Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor- α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 1271-1278, 1994
- 53) Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in adipose tissue: regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95: 2111-2119, 1995
- 54) Hadri KE, Courtalon A, Gauthereau X, Chambaut-Guérin AM, Pairault J, Feve B. Differential regulation by tumor necrosis factor- α of β_1 , β_2 , and β_3 -adrenoceptor gene expression in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol Chem* 272: 24514-24521, 1997
- 55) Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 46: 1939-1944, 1997

Association of Trp64Arg Mutation of the β_3 -Adrenergic Receptor Gene and Uncoupling Protein-1 Gene Polymorphism with Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Glucose Intolerance in Japanese Masayuki Taniguchi, First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. Juzen Med Soc., **108**, 429 - 442 (1999)

Key words β_3 -adrenergic receptor, uncoupling protein-1, DNA polymorphism, obesity, multiple risk factor syndrome, diabetes mellitus

Abstract

Both the Trp64Arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor (β_3 -AR) gene and the adenine (A) to guanine (G) polymorphism of the uncoupling protein-1 (UCP-1) gene have been associated with weight gain and in combination are reported to have an additive effect in Caucasians. Racial differences have been noted in the β_3 -AR mutation, but little is known about the significance of the UCP-1 gene polymorphism in Japanese. In this study, the association of genetic variations in the β_3 -AR and UCP-1 genes with obesity, hypertension, dyslipidemia, and glucose intolerance in Japanese was investigated. The study population consisted of 222 Japanese adults, 189 men and 33 women, who underwent general health examinations at Kanazawa Municipal Hospital. Their mean age ($\bar{x} \pm SD$) was 50.8 ± 7.2 (men, 50.5 ± 7.4 ; women, 52.8 ± 5.3). As previously described, PCR-restriction length fragment polymorphism analyses with the restriction enzymes *Bst*NI and *Bcl*I were performed to detect the respective mutations of the β_3 -AR and UCP-1 genes. Current body mass index (BMI), waist/hip ratio, systolic and diastolic blood pressure, serum total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, uric acid, free fatty acid, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels were investigated as clinical parameters. We performed a 75g oral glucose tolerance test all subjects and classification of glucose tolerance status was based on the WHO criteria. In this study, 177 subjects were classified as having normal glucose tolerance, 32 as impaired glucose tolerance, and 13 as diabetes mellitus. The mean BMI ($\bar{x} \pm SD$) was 23.5 ± 2.6 (men, 23.6 ± 2.6 ; women, 22.5 ± 2.1). The frequency of the Trp64Arg allele was 0.179, and that of the G allele was 0.484. No relationship was found between the β_3 -AR mutation and UCP-1 polymorphism and glucose tolerance patterns. In men, the serum triglyceride level was significantly higher in Arg64 homozygotes versus Trp64 homozygotes ($P < 0.05$). BMI and systolic and diastolic blood pressure were significantly higher, and HDL-cholesterol was significantly lower in subjects with the G allele versus those without it (AA homozygotes) ($P < 0.05$). The β_3 -AR mutation and UCP-1 polymorphism were not found to have additive effects. In women, there was no significant relationship between the two gene mutations and clinical parameters. In conclusion, the results of this study suggest that the β_3 -AR mutation and the UCP-1 polymorphism may be associated with multiple risk factor syndrome, which is composed of obesity, dyslipidemia, hypertension, and glucose intolerance, in Japanese men.