

# Ca関連遺伝子多型と細胞内Ca動態および 経口Caの降圧効果との関連についての検討

慶應義塾大学医学部内科 猿田享男

## 要約

経口Ca摂取による血圧低下作用は個体差が大きく、必ずしも十分な評価を受けていない。近年、高血圧症の治療に対する個々の反応性の違いを遺伝的多様性（遺伝子多型）に求める研究が盛んに行われるようになってきた。しかしながら、高血圧の成因として最重要であるCa代謝関連遺伝子の検討はほとんど行われていない。本研究はCa関連候補遺伝子の遺伝子多型と細胞内Ca動態との関連について解析することを目的とする。高血圧の遺伝歴の濃厚な若年正常血圧者と高血圧の遺伝歴を有さないコントロールにおいて、細胞内Ca動態の異常がインスリン抵抗性と密接な関連を保ちながら高血圧の発症に寄与していることを示した。さらに、これらの異常にはわずかな体重増加が寄与することが示唆された。次に、若年男性検診対象者147名から同意を得た上でDNAを抽出した。高血圧の遺伝歴の濃厚な高血圧群8名と高血圧の遺伝歴を有さない血圧低値群7名について、Ebstein-Barrウイルスにより不死化リンパ芽球を作成し、細胞Bankを構築した。高血圧群は生体および細胞レベルでインスリン抵抗性を示した。今後、解析対象を広げ、不死化リンパ芽球における細胞内Ca動態について検討する。さらにCa関連候補遺伝子との間で関連研究をする予定である。

【Key Word】 経口Ca摂取、遺伝子多型、Ca関連候補遺伝子、細胞内Ca動態、不死化リンパ芽球

## はじめに

経口Ca摂取による降圧効果は、一部の集団では明らかにされたものの、多くの精力的検討にもかかわらず、いまだ十分な評価を得ていない<sup>1, 2)</sup>。高血圧患者の経口Ca摂取による降圧効果には個体差が多く、その理由として高血圧患者の多様性が指摘されてきた。近年、高血圧患者の個体差は多様な多因子遺伝によると考えられている。しかしながら、高血圧の成因に関与するCa関連遺伝子はいまだ同定されていない<sup>3)</sup>。

本研究は、Ca関連候補遺伝子の遺伝子多型と細胞内Ca動態との関連について解析することを目的とする。さらに、遺伝子多型と細胞内Ca動態の異常が経口Ca摂取による降圧効果を予測することができるかを解析するために適切な対象の抽出を試みた。

## 研究の背景と目的

1997年の米国合同委員会の高血圧治療に関する第6次勧告案において、ようやくCa摂取の有用性が盛り込まれた<sup>4)</sup>。一方、1999年の世界保健機構・国際高血圧学会の高血圧治療のガイドラインでは、食塩制限や体重減少の必要性は力説されているにもかかわらず、Ca摂取の有用性には言及していない<sup>5)</sup>。このように、経口Ca摂取による降圧効果は、一部の集団では明らかにされたものの、必ずしも期待するような評価は定着していない。経口Ca摂取による降圧効果に対する認識の差の背景に、高血圧患者の経口Ca摂取による降圧効果には個体差が多く、その原因として高血圧患者の多様性が指摘されてきた。

近年、本態性高血圧患者は多様な多因子遺伝子病と考えられ、血圧調節に中心的な役割を示すレニン-アンジオテンシン系に関する候補遺伝子を標的とした検討が進められてきた。欧米において、レニン-アンジオテンシン系の最初の基質であるアンジオテンシノーゲン (AGT) について、AGT遺伝子の翻訳開始点から235番目のアミノ酸がメチオニンからスレオニンに変異すると (M235T)、高血圧の罹患率が増加することが報告されてきた<sup>6)</sup>。その機序としてM235Tと連鎖した、翻訳開始点より6塩基上流のコアプロモーター領域にあるグアニン (G) がアデニン (A) に変異すると (G-6A)、AGT遺伝子の転写活性が増加することが示された<sup>7)</sup>。1999年、AGT遺伝子変異と高血圧との関連について、日本と中国における大規模な研究成果がようやく報告された<sup>8, 9)</sup>。予想に反して、いずれの研究においても、高血圧とAGT遺伝子変異との間に有意な関係を認めなかった。Katoらは合計1232名の対象を血圧値から高血圧群・正常血圧群に分け、M235Tとの関連を検討した。両群における遺伝子頻度や遺伝子型による血圧値に有意差を検出できなかった。この結果は、日本人における比較的小規模な従来の研究における高血圧と235Tとの有意な関連に対して疑問を投げかけるものとなった<sup>8)</sup>。Niuらは156家系、488名のTransmission disequilibrium test (TDT) の結果から、高血圧の発症と235Tの遺伝との間に有意な関係を認めなかった。これらの研究は従来欧米で行われていたものと比較しても、研究計画や規模の点において信頼性の高いものと思われる<sup>9)</sup>。したがって、日本人や中国人の一般人口の血圧変動や高血圧の発症に対するAGT遺伝子の関与は、否定はできないがあまり大きな効果をもたらすものとは考えにくい。

現在、汎用されている降圧薬の中で、日本人に対してCa拮抗薬が非常に優れた効果を示すことは市場統計調査からも裏付けされている。乳製品の積極的摂取による経口Caの摂取量の増加は、高血圧患者にとっては天然のCa拮抗薬を内服することにつながるとも考えられる。しかしながら、高血圧の成因に関与するCa関連遺伝子はいまだ同定されていない。このため、どのような高血圧患者にCa摂取の奨励が有効であり、別の患者にはあまり大きな効果が期待できないのか明らかにされておらず、却って経口Ca摂取に対する評価を不十分なものになっている。

そこで、本研究においては、まず、検診対象者から均質で年齢が若く、一定の大きな集団から極端な血圧値を示す遺伝性高血圧者と遺伝性低血圧者を抽出し、細胞および遺伝子Bankの構築を行う。つ

ぎに、ヒトの遺伝性高血圧症に合併する細胞内Ca動態の異常を不死化リンパ芽球において検討する。いくつかのCa関連候補遺伝子の遺伝子多型と細胞内Ca動態との関連について解析し、最終的には、遺伝子多型と細胞内Ca動態の異常が経口Ca摂取による降圧効果を予測することができるかを検討することを目的とする。

## 調査・研究計画および方法

### ① 高血圧素因を有する若年正常血圧者における代謝性因子の検討

私どもは、高血圧の遺伝歴の濃厚な若年正常血圧者と高血圧の遺伝歴を有さないコントロールにおいて、過剰な食塩の摂取により血圧上昇が引き起こされる現象、すなわち、食塩感受性とCa代謝異常が密接に関与することをつきとめた。特に、細胞内Caの基礎値が、食塩感受性と正の相関を有すること、つまり、細胞内Ca動態の異常が食塩感受性を規定する可能性があることを示した<sup>10)</sup>。

さらに、同様の対象において、高血圧・糖尿病・肥満の基礎となる病態として注目されているインスリン抵抗性と、細胞内Ca動態との関係を検討し、細胞内Ca動態の異常がインスリン抵抗性を規定する可能性があることを示した<sup>11)</sup>。

これらの研究によって、遺伝性高血圧症において、細胞内Ca動態の異常が食塩感受性およびインスリン抵抗性の発現に対して重要な役割を演じていることが明らかにされた。今回、これらの正常血圧者において、血圧値およびインスリン抵抗性に対してどの要因が最重要であるかを多変量解析によって検討した。

### ② 極端な血圧値を示す遺伝性高血圧者と遺伝性低血圧者の細胞および遺伝子Bankの構築

大学の検診対象者の中から同意の得られた、高血圧の家族歴の濃厚な若年男性の集団から血圧値の高いものと、心血管疾患の家族歴を有さない血圧値の低いものをコントロールとして選択し、リンパ球をEbstein-Barr (EB) ウィルスにより不死化させる。すなわち、若年性高血圧患者を広くリクルートし、高血圧の遺伝歴の濃厚なものを選択し対象とする。正常血圧コントロールとして、血圧が低値で高血圧および心血管疾患の遺伝歴のない者を選択する。これらからヘパリン採血を行い、リンパ球を分離後、EBウィルスを感染させ、不死化リンパ芽球を作成する。

### ③ 細胞内Ca動態の検討

従来、本態性高血圧症に合併する細胞内Ca動態の検討は主として血小板を用いて行われてきた<sup>12)</sup>。血小板における細胞内Caの変化は凝集をもたらすことと、血管平滑筋における細胞内Caの変化が収縮・弛緩をもたらすことから、血管平滑筋に対する細胞モデルと想定して検討が行われてきた。しかしながら、血小板は血液から容易に採取できる反面、活性化を起こさない条件での分離が非常に難しく、細胞内Ca値の測定の再現性に難点があるのではないかとの疑問が指摘されてきた<sup>13)</sup>。また、血小板は高血圧にさらされることでSheer Stressを受け、2次的に高血圧の状態では細胞内Ca値が増加する可能性があることが指摘されていた。

そこで、高血圧症に合併する細胞内Ca動態の異常は遺伝的であるかどうかを調査する上で、血小板の他に血圧値による2次的な影響を受けることのない細胞において検討する必要がある。私どもは、まず、リンパ球にEBウィルスを感染させて、不死化したBリンパ芽球を用いて、細胞内Ca動態の異常が高血圧患者のリンパ芽球に認められるかどうかを検討することを第1の目的とした。不死化リンパ芽球においては、刺激物質で刺激した状態での細胞内Ca動態を再現性よく検討することが可能となる<sup>14)</sup>。

蛍光色素Fura 2を用いて細胞内Caを基礎値、細胞外Ca非存在下での血小板活性化因子、Thapsigargin、および、イオノマイシンでの刺激時のピーク値、細胞外Ca存在下での血小板活性化因子での刺激時のピーク値について検討する。高血圧患者が正常血圧者に比していくつかの測定値において従来の報告から予測されるように高値となるかどうかを検討する。

#### ④ Ca関連遺伝子の多型解析

不死化リンパ芽球における細胞内Ca値を中間表現型、血圧値を最終表現型として、高血圧の原因遺伝子の候補として考えられるCa関連遺伝子との間で連鎖解析を行う。

Ca関連遺伝子の日本人における多型のいくつかのものは骨粗鬆症における研究ですでに明らかにされている多型を用いて検討する。また、高血圧に深く関与するCa関連遺伝子の多型はDNAチップを用いてSingle Nucleotide Polymorphism(SNP)を新たに見出し検討する。高血圧者の中から不死化リンパ芽球の細胞内Ca値が高値を示す患者を選択し、例えばG蛋白質 $\beta$ 3サブユニット( $G\beta 3$ )の翻訳開始点から825番目の塩基がシトシンからチミジンに変異(C825T)しているものが、高い頻度で検出されるかどうかを連鎖解析において検討する<sup>15)</sup>。さらに細胞内Ca動態に異常を有する対象者において家系調査を行い、罹患家系における連鎖解析を行い、染色体上の責任座位を決定し、統合的な解析検討を行う。

#### ⑤ 経口Ca摂取との関連の検討

Ca関連遺伝子の遺伝子型と細胞内Ca動態に連鎖が認められた高血圧者に食事調査を行い、乳製品の摂取を奨励する食事指導を行い、再度、食事調査を行い、Ca摂取量の変化と血圧値およびその他の動脈硬化にかかわる代謝性因子への影響を検討する。同定されたCa関連高血圧遺伝子の遺伝子型が経口Ca摂取による降圧効果を予測することに役立つことを確かめる。

## 結 果

#### ① 高血圧素因を有する若年正常血圧者における代謝性因子の検討

Body mass index (BMI) および血圧値をできる限りマッチさせた高血圧の家族歴の濃厚な男性若年正常血圧者7名と、高血圧および心疾患合併症の家族歴の希薄な男性若年正常血圧者10名を対象とした。これらを家族歴陽性群および家族歴陰性群とした。2群の間に、年齢、BMI、血圧に有意差を認めなかった (Table 1)。75gブドウ糖負荷試験における血糖値、Immunoreactive Insulin (IRI) 値に

有意差を認めなかった (Table 2)。また、脂質にも有意差を認めなかった。さらに、Interview法による食事カロリー摂取量や身体活動度も同等と考えられた。

Euglycemic hyperinsulinemic clamp法におけるブドウ糖注入率でみたインスリン感受性 (M値) は家族歴陽性群で低下傾向を示した ( $6.90 \pm 0.40$  vs.  $8.75 \pm 0.79$ ,  $P=0.08$ , unpaired t-test) (Table 3)。血小板における細胞内Ca基礎値は家族歴陽性群および家族歴陰性群においてそれぞれ  $116 \pm 3$  および  $101 \pm 2$  nmol/Lと有意差を認めた ( $P < 0.001$ , unpaired t-test) (Table 4)。血小板におけるトロンビン刺激時の細胞内Ca値は家族歴陽性群で増加傾向を示した ( $871 \pm 71$  vs.  $705 \pm 50$  nmol/L,  $P=0.06$ , unpaired t-test)。尿中へのCa排泄の指標となるFractional excretion of calcium (FE<sub>Ca</sub>) は、Euglycemic hyperinsulinemic clamp開始前の状態で、家族歴陽性群で有意に低値を示した ( $0.57 \pm 0.13$  vs.  $0.99 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ , unpaired t-test)。FE<sub>Ca</sub>のFractional excretion of sodium (FE<sub>Na</sub>) に対する比 (FE<sub>Ca</sub>/FE<sub>Na</sub>) はEuglycemic hyperinsulinemic clamp前後の状態、家族歴陽性群で低値を示した ( $P < 0.01$ , ANOVA with repeated measurements) (Fig. 1)。

すべての対象でEuglycemic hyperinsulinemic clamp法により、血糖は正常前値に維持されていたが、

Table 1. Clinical Characteristics of Young, Lean, Normotensive, Male Subjects

Characteristic	FH positive subjects (n=7)	FH negative subjects (n=10)	P value
Age (years)	22 ± 1	22 ± 1	ns
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23.2 ± 0.6	22.5 ± 0.8	ns
Systolic BP (mmHg)	115 ± 4	110 ± 2	ns
Diastolic BP (mmHg)	62 ± 3	60 ± 2	ns
Total cholesterol (mg/dl)	167 ± 11	171 ± 8	ns
Triglycerides (mg/dl)	60 ± 9	69 ± 7	ns
HDL-cholesterol (mg/dl)	53 ± 2	51 ± 2	ns

Values are expressed as means ± SEM. FH, family history of essential hypertension; ns, not significant; HDL, high-density lipoprotein.

Table 2. Oral Glucose Tolerance Test

	FH positive subjects (n=7)	FH negative subjects (n=10)	P value for FH (+) vs. FH (-)
Plasma glucose (mg/dl)			
Fasting	91 ± 3	92 ± 2	
60 min after loading	112 ± 6	110 ± 9	ns
120 min after loading	102 ± 6	96 ± 5	
P value for sequential change		<0.01	
Sigma plasma glucose	299 ± 11	303 ± 14	ns
Serum IRI (μU/ml)			
Fasting	7 ± 1	6 ± 0	
60 min after loading	40 ± 7	32 ± 6	ns
120 min after loading	25 ± 6	22 ± 3	
P value for sequential change		<0.0001	
Sigma IRI	71 ± 13	59 ± 9	ns

Values are expressed as means ± SEM. FH, family history of essential hypertension; ns, not significant; IRI, immunoreactive insulin.

Table 3. Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp Data

	FH (+) subjects (n=7)		FH (-) subjects (n=10)		P value	
	Fasting	Clamping	Fasting	Clamping	FH (+) vs. FH (-)	Fasting vs. Clamping
Plasma Glucose (mg/dl)	82±3	87±4	84±3	88±2	ns	ns
Serum IRI (μU/ml)	6±1	58±5	5±2	52±7	ns	<0.0001
M-value (mg/kg/min)	6.90±0.45		8.75±0.79		=0.08	
Serum sodium (mmol/l)	141±1	141±1	141±1	141±1	ns	ns
Serum potassium (mmol/l)	3.8±0.1	3.6±0.1	4.0±0.1	3.7±0.1	=0.08	<0.05
Serum chloride (mmol/l)	103±1	103±1	103±1	103±1	ns	ns
Serum creatinine (mg/dl)	0.8	0.9	1.0	1.0	<0.05	ns

Values are expressed as means±SEM. FH, family history of essential hypertension; ns, not significant; IRI, immunoreactive insulin. Insulin sensitivity (M-value) was estimated as the mean of the glucose infusion rate during the second hour of the clamp. Blood samples were drawn at fasting and at the end of 2-h euglycemic hyperinsulinemic clamping.

Table 4. Calcium-Related Parameters during Euglycemic Hyperinsulinemic Clamping

	FH (+) subjects (n=7)		FH (-) subjects (n=10)		P value	
	Fasting	Clamping	Fasting	Clamping	FH (+) vs. FH (-)	Fasting vs. Clamping
Serum calcium (mg/dl)	9.1±0.3	9.4±0.2	9.3±0.1	9.0±0.1	ns	ns
Intact PTH (pg/ml)	45±6	31±4	36±4	27±3	ns	<0.05
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (pg/ml)	54±9	47±6	39±4	40±5	ns	ns
Basal [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (nmol/l)	116±3		101±2		<0.001	
Thrombin-stimulated [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (nmol/l)	871±71		705±50		=0.06	
Fractional excretion of calcium	0.6±0.1	1.1±0.2	1.0±0.1	1.3±0.2	ns	<0.05
Ionized calcium (mmol/l)	2.5±0.0		2.5±0.1		ns	
Serum phosphorus (mg/dl)	3.2±0.2		3.3±0.2		ns	
Serum magnesium (mEq/l)	2.0±0.1		2.3±0.2		=0.09	

Values are expressed as means±SEM. Statistical comparisons were performed by ANOVA (with repeated measurements). FH, family history of essential hypertension; ns, not significant; PTH, parathyroid hormone; D<sub>3</sub>, vitamin D<sub>3</sub>; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, intracellular Ca<sup>2+</sup>. Blood samples were drawn at fasting and at the end of 2-h euglycemic hyperinsulinemic clamping.

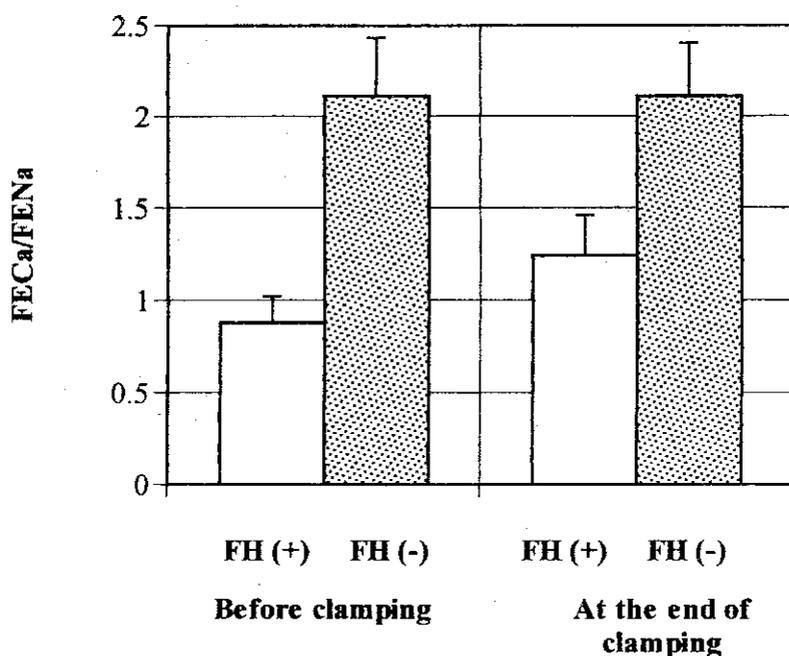
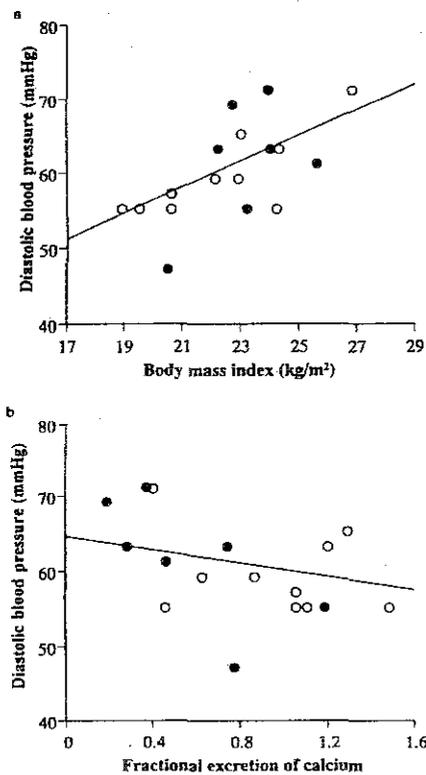


Fig. 1

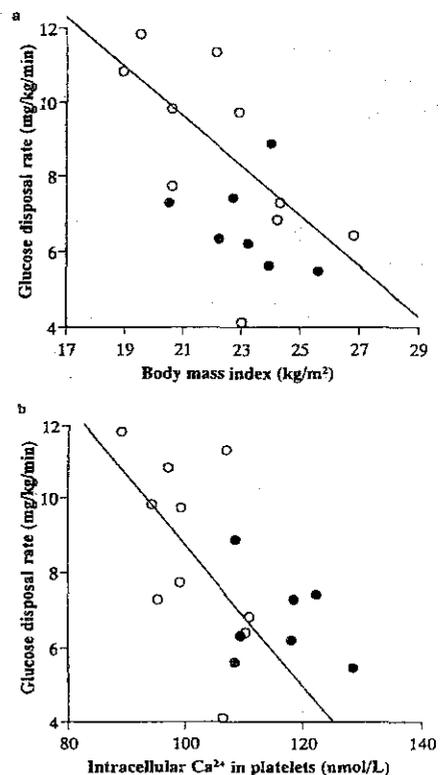
IRIは  $6 \pm 1$  から  $54 \pm 4 \mu\text{U/ml}$ へと顕著に増加した ( $P < 0.0001$ , ANOVA with repeated measurements)。一方、血清K値は高インスリン血症により  $3.9 \pm 0.1$  から  $3.7 \pm 0.1 \text{mmol/L}$ へと有意に減少した ( $P < 0.05$ , ANOVA with repeated measurements)。しかも、血清K値は家族歴陽性群で低下傾向を示した ( $P = 0.08$ , ANOVA with repeated measurements)。血清Na、Ca値は高インスリン血症によっても、2群間においても有意差を認めなかった。すべての対象でEuglycemic hyperinsulinemic clampにより副甲状腺ホルモンインタクト (intact PTH) は  $40 \pm 4$  から  $29 \pm 2 \text{pg/mL}$ へと有意に減少し ( $P < 0.05$ , ANOVA with repeated measurements)、 $\text{FE}_{\text{Ca}}$ は  $0.80 \pm 0.10$  から  $1.23 \pm 0.17$ へと有意に増加した ( $P < 0.05$ , ANOVA with repeated measurements) (Table 4)。

拡張期血圧値はBMIと有意に相関し ( $r = 0.634$ ,  $P < 0.01$ , Fig. 2 a)、 $\text{FE}_{\text{Ca}}$ と有意な負の相関を示した ( $r = -0.484$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 2 b)。また、BMIは細胞内Ca基礎値と有意な相関を示した ( $r = 0.503$ ,  $P < 0.05$ )。しかしながら、拡張期血圧値はインスリン感受性とも血小板の細胞内Ca基礎値とも相関を示さなかった。インスリン感受性はBMI ( $r = -0.598$ ,  $P < 0.01$ , Fig. 3 a)、および、血小板の細胞内Ca



a) Correlation between body mass index and diastolic blood pressure in young, lean, normotensive, male subjects with a (●) positive ( $n=7$ ) and (○) negative ( $n=10$ ) family history of essential hypertension. Correlation coefficient was  $0.634$  ( $p < 0.01$ ). b) Correlation between fractional excretion of calcium and diastolic blood pressure in young, lean, normotensive, male subjects with a (●) positive ( $n=7$ ) and (○) negative ( $n=10$ ) family history of essential hypertension. Correlation coefficient was  $-0.503$  ( $p < 0.05$ ).

Fig. 2



a) Correlation between body mass index and insulin sensitivity ( $M$ -value) in young, lean, normotensive, male subjects with a (●) positive ( $n=7$ ) and (○) negative ( $n=10$ ) family history of essential hypertension. Correlation coefficient is  $-0.612$  ( $p < 0.01$ ). b) Correlation between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in platelets and insulin sensitivity ( $M$ -value) in young, lean, normotensive, male subjects with a (●) positive ( $n=7$ ) and (○) negative ( $n=10$ ) family history of essential hypertension. Correlation is  $-0.598$  ( $p < 0.01$ ).

Fig. 3

基礎値と有意な負の相関を示した ( $r=-0.612$ ,  $P<0.01$ , Fig. 3 b)。

多変量回帰解析において、拡張期血圧値を従属変数として、家族歴の有無、インスリン感受性、ブドウ糖負荷試験におけるシグマIRI、血小板における細胞内Ca基礎値、血清K値、および、Euglycemic hyperinsulinemic clamp前の $FE_{Ca}$ を独立変数としたところ、拡張期血圧値 $=17.1+1.94 \times BMI$  ( $r=0.63$ ,  $F=10.1$ ,  $P=0.006$ )、インスリン感受性を従属変数とし、家族歴の有無、ブドウ糖負荷試験におけるシグマIRI、血小板における細胞内Ca基礎値、血清K値、および、Euglycemic hyperinsulinemic clamp前の $FE_{Ca}$ を独立変数としたところ、インスリン感受性 $=5.45-0.74 \times BMI$  ( $F=16.2$ )  $+4.93 \times$ 血清K値 ( $F=7.2$ ) ( $r=0.77$ ,  $P=0.002$ ) となった。

② 極端な血圧値を示す遺伝性高血圧者と遺伝性低血圧者の細胞および遺伝子Bankの構築

遺伝子解析および細胞機能解析に関するインフォームドコンセントが得られた147名の検診対象者から、家族歴を有する高血圧（または血圧正常高値）群から8名、高血圧および心血管疾患の家族歴が無く、血圧が110mmHg以下の正常低値群から7名を選択し、不死化リンパ芽球系を樹立した (Fig. 4)。

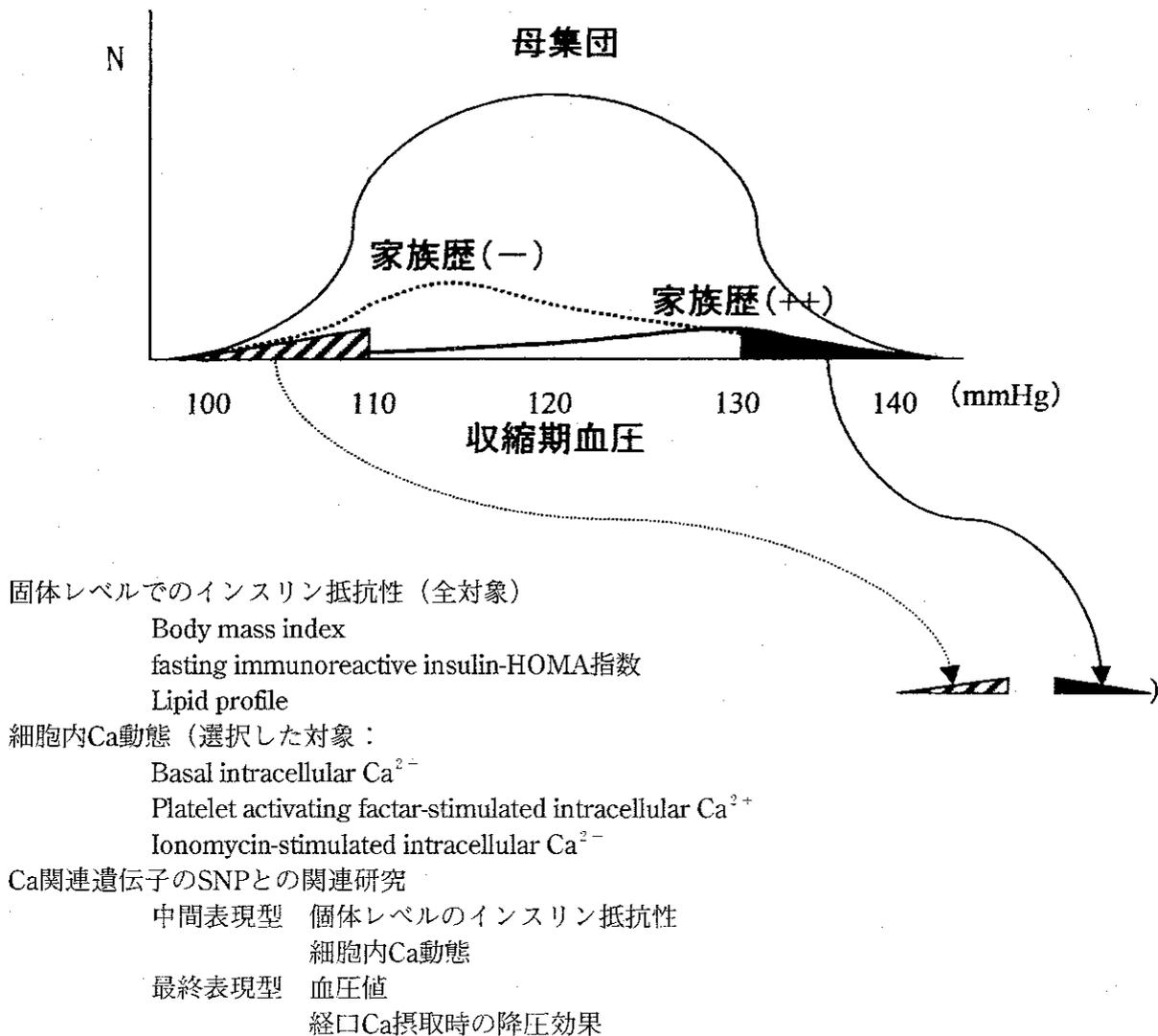


Fig. 4

高血圧群は、血圧低値群および母集団と比較してBody mass indexが有意に高く (Table 5)、また、空腹時血糖値、インスリン値および総コレステロール、中性脂肪、LDLコレステロールのすべてが有意に高値を示した (Table 6、7)。従って、若年性遺伝性高血圧には、肥満を背景とした個体レベルのインスリン抵抗性が合併していることが明らかとなった。

現在、解析対象を約2倍に増やすと同時に、不死化リンパ芽球を用いて細胞レベルでのインスリンによる糖の取りこみ能を測定中である。個体レベルでインスリン抵抗性を示す高血圧群の中に、細胞

Table 5. 若年男性遺伝性高血圧群と低血圧群の臨床データ

	母集団 N=143	高血圧群 N=8	低血圧群 N=7	P
年齢	23.2±1.3	22.8±0.8	23.0±1.3	0.87
収縮期血圧 (mmHg)	123.2±15.8	146.3±8.1	100.4±3.6	<0.0001
拡張期血圧 (mmHg)	71.4±9.3	86.9±8.7	58.3±6.0	<0.0001
脈拍 (/min.)	76.3±14.0	88.8±10.4	67.1±13.0	0.0034
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.8±3.8	25.4±3.6	19.7±1.4	0.0018

Mean±SD

BMI: Body mass index

Table 6. 若年男性遺伝性高血圧群と低血圧群の脂質

	母集団 N=143	高血圧群 N=8	低血圧群 N=7	P
総コレステロール (mg/dL)	173±25	208±24	153±19	0.0003
中性脂肪 (mg/dL)	85±56	148±84	65±28	0.029
HDLコレステロール (mg/dL)	59±11	52±11	65±14	0.057
LDLコレステロール (mg/dL)	97±22	127±15	75±16	<0.0001
遊離脂肪酸 (mEq/L)	0.42±0.19	0.58±0.20	0.44±0.24	0.23

Mean±SD

Table 7. 若年男性遺伝性高血圧群と低血圧群の糖代謝

	母集団 N=143	高血圧群 N=8	低血圧群 N=7	P
IRI ( $\mu$ U/ml)	6.6 $\pm$ 4.7	9.9 $\pm$ 3.2	3.1 $\pm$ 0.7	0.0003
空腹時血糖 (mg/dl)	85.2 $\pm$ 7.5	91.0 $\pm$ 8.2	86.0 $\pm$ 13.0	0.42
HOMA-R Index	1.41 $\pm$ 1.04	2.26 $\pm$ 0.92	0.62 $\pm$ 0.17	0.001

**Mean $\pm$ SD**

IRI: Immunoreactive Insulin

HOMA: Homeostasis model assessment

レベルでのインスリン抵抗性を示すものがあることを示唆する結果を得ている。

今後、上記の②を充実させると共に継続して、方法③④⑤として記した課題に取り組み、解析結果を順次報告する予定である。

**考 案****① 高血圧素因を有する若年正常血圧者における代謝性因子の検討**

一連の研究により、痩せている高血圧素因を有する若年正常血圧者に細胞内Ca動態の異常および糖代謝異常が合併することが示された。しかしながら、若年正常血圧者の血圧に対して、肥満をできる限り排除した集団を対象としても、BMIが最も重要な要因となることが多変量解析によって明らかとなった。すなわち、軽度の体重の増加が遺伝性高血圧の極めて早期の段階で、血圧上昇やインスリン抵抗性に関与することが示唆された。

高インスリン血症のカルシウム代謝への影響を検討したところ、PTHは減少し、FE<sub>Ca</sub>は増加した。このことはDeFronzoらが腎臓の遠位尿細管においてインスリンがCa排泄を増加させると報告したことと一致する所見である<sup>16)</sup>。島本らも高インスリン血症によりPTHは減少し、FE<sub>Ca</sub>は増加することを報告している<sup>17)</sup>。VitaminDについては高インスリン血症による有意な変化は観察されず、高インスリン血症によるカルシウム代謝の変化におけるVitaminDの役割は小さなものと考えられた。高インスリン血症による細胞内Ca値への影響については、報告者により様々であり一致した見解が得られていない。被検者のインスリン感受性や実験条件による影響が異なる結果を生んでいるものと推察された。

細胞内Ca値と血圧値に関する初期の研究では、血小板における細胞内Ca値が血圧値と非常によい相関を示すことから<sup>12)</sup>、細胞内Ca値が一義的に血圧値を規定する要因と考えられた。その後の検討では必ずしも両者に強い相関が見られないことが報告された<sup>18)</sup>。今回の我々の検討では、拡張期血圧値は

血小板における細胞内Ca値とは相関を示さず、むしろ、肥満の影響をできる限り排除した若年正常血圧者においてすら、拡張期血圧値にとって最も重要な要因はBMIであることがわかり、高血圧の成因に関わるカルシウム代謝異常におけるインスリン抵抗性またはわずかな体重増加の役割が再評価された。

## ② 極端な血圧値を示す遺伝性高血圧者と遺伝性低血圧者の細胞および遺伝子Bankの構築

遺伝子解析および細胞機能解析に関するインフォームドコンセントが得られた検診対象者から、家族歴を有する高血圧（または血圧正常高値）群から8名、高血圧および心血管疾患の家族歴が無く、血圧が110mmHg以下の正常低値群から7名を選択し、不死化リンパ芽球系を樹立した。高血圧群は、血圧低値群および母集団と比較してBody mass indexが有意に高く、また、空腹時血糖値、インスリン値および総コレステロール、中性脂肪、LDLコレステロールのすべてが有意に高値を示した。従って、若年性遺伝性高血圧には、肥満を背景とした個体レベルのインスリン抵抗性が合併していることが明らかとなった。

現在、解析対象を増やすと同時に、不死化リンパ芽球を用いて細胞レベルでのインスリンによる糖の取りこみ能および細胞内Ca値を測定中である。個体レベルでインスリン抵抗性を示す高血圧群の中に、細胞レベルでのインスリン抵抗性を示すものがあることを示唆する結果を得ている。懸案の細胞内Ca値については今後の更なる検討が必要であるが、このような集団は、今後の遺伝性高血圧の代謝性因子に関するゲノム解析を進める上で最も有用なサンプルになることと考えられる。

## おわりに

Ca関連候補遺伝子の遺伝子多型と細胞内Ca動態との関連についての解析は、まだ始まったばかりである。今後この分野の研究は薬物の選択、新たなゲノム創薬、牛乳によるCa摂取の奨励などの対象の選択など様々な影響を与える可能性がある。現況においては経口Ca摂取による降圧効果は、一部の集団では明らかにされたものの、必ずしも十分な評価を得ていない。高血圧患者の経口Ca摂取による降圧効果には個体差があり、その理由として高血圧患者の遺伝的多様性が指摘されてきた。私どもの今年度の研究は、サンプルの収集がようやく軌道に乗ったところであるが、カルシウム関連遺伝子の解析を通して経口Ca摂取の有用性を明確にすることが期待され、今後も鋭意解析を進める予定である。

## 参考文献

- 1) McCarron DA, Morris CD, Cole C. Dietary calcium in human hypertension. Science. 1982;217: 267-9.
- 2) Hatton DC, McCarron DA. Dietary calcium and blood pressure in experimental models of hypertension. Hypertension. 1994;23: 513-30.

- 3) Orlov SN, Li JM, Tremblay J, Hamet P. Genes of intracellular calcium metabolism and blood pressure control in primary hypertension. *Semin Nephrol.* 1995; 15: 569-92.
- 4) The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med.* 1997; 157: 2413-46.
- 5) 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens.* 1999; 17: 151-83.
- 6) Jeunemaitre X, Sourbrier F, Kotelevsev YV, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* 1992; 71: 169-80.
- 7) Inoue I, Nakajima T, Williams CS, et al. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest.* 1997; 99: 1786-97.
- 8) Kato N, Sugiyama T, Morita H, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Angiotensinogen gene and essential hypertension in the Japanese: extensive association study and meta-analysis on six reported studies. *J Hypertens.* 1999; 17: 757-63.
- 9) Niu T, Yang J, Wang B, et al. Angiotensinogen gene polymorphisms M235T/T174M: no excess transmission to hypertensive Chinese. *Hypertension.* 1999; 33: 698-702.
- 10) Yamakawa H, Suzuki H, Nakamura M, Ohno Y, Saruta T. Disturbed calcium metabolism in offspring of hypertensive parents. *Hypertension.* 1992; 19: 528-34.
- 11) Ohno Y, Suzuki H, Yamakawa H, Nakamura M, Otsuka K, Saruta T. Impaired insulin sensitivity in young, lean normotensive offspring of essential hypertensives: possible role of disturbed calcium metabolism. *J Hypertens.* 1993; 11: 421-6.
- 12) Erne P, Bolli P, Burgisser E, Buhler FR. Correlation of platelet calcium with blood pressure. Effect of antihypertensive therapy. *N Engl J Med.* 1984; 310: 1084-8.
- 13) Bukoski RD, Lastelic BA, Xue H, Li J, Bian K. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and force generation determined in resistance arteries of normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens.* 1994; 12: 15-21.
- 14) Brzustowicz LM, Gardner JP, Hopp L, et al. Linkage analysis using plateletactivating factor Ca<sup>2+</sup> response in transformed lymphoblasts. *Hypertension.* 1997; 29: 158-64.
- 15) Siffert W, Roszkopf D, Siffert G, et al. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet.* 1998; 18: 45-8.
- 16) DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest.* 1975; 55: 845-55.
- 17) Shimamoto K, Higashiura K, Nakagawa M, et al. Effects of hyperinsulinemia under the euglycemic condition on calcium and phosphate metabolism in non-obese normotensive subjects. *Tohoku J Exp Med.* 1995; 177: 271-8.

- 18) Williams PD, Puddey IB, Martin NG, Berlin LJ. Platelet cytosolic free calcium concentration, total plasma calcium concentration and blood pressure in human twins: a genetic analysis. *Clin Sci Colch.* 1992; 82: 493-504.