

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02752

研究課題名(和文)一酸化窒素系を介した精神障害の発症機序を遺伝学的に解析する集団ベース研究

研究課題名(英文)Population based study of mental disorders by nitric oxide system variants.

研究代表者

上野 修一 (Ueno, Shuichi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80232768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)は、統合失調症や認知症との関連も報告されている重要な物質である。NO合成を調節する2つの酵素アラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素2(AGXT2)とジメチルアルギニンジメチルアミノ水酸化酵素(DDAH)が、高齢者の生活習慣病や認知症の発症に関連するかどうかを検討した。AGXT2遺伝子の4つの多型およびDDAH1遺伝子の5多型を用いて、65歳以上の全住民を対象とした集団ベース研究の解析(750名、平均年齢77.0 ± 7.6歳)から、血圧および血糖値とAGXT2遺伝子が有意に相関することを確認した。一方、DDAH1とは関連しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の解析は、チミンの分解産物R-3-アミノイソ酪酸の唯一の代謝酵素AGXT2遺伝子が、一酸化窒素の合成酵素阻害するメチルアルギニン(ADMA等)を介し、高血圧や糖尿病の発症に関わる可能性を集団ベース研究解析から明らかにした。一酸化窒素は、生活習慣病の発症だけでなく、中枢神経機能とも関わる神経伝達物質の一つであることから、脳血管性認知症だけでなく、アルツハイマー病型認知症を含めた他の精神障害とも関連する可能性があり、その最初のステップとなることが証明された。この事実は、日本人での認知症を含めた病態に対する理解を進める上で意味があると思われる、日本人でしか行えない研究で非常に有意義であった。

研究成果の概要(英文)：Alanine:glyoxylate aminotransferase 2 (AGXT2; EC 2.6.1.44) is the only enzyme, which is capable of metabolizing R-form of 3-aminoisobutyrate. AGXT2 has another role of metabolizing asymmetric dimethylarginine (ADMA), which is a unique methyl amino acid that competitively inhibits nitric oxide synthase (NOS) family. AGXT2 activity is known to be regulated by four functional SNPs and the specific haplotype. (Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1; EC 3.5.3.18) also degrade ADMA. In this study, we investigated whether both the AGXT2 gene and the DDAH1 gene are associated with metabolic disease in 750 Japanese subjects recruited by complete enumeration survey method. The loss of AGXT2 function predicted by a SNP, rs16899974, and the haplotype were significantly correlated with the elevated blood pressure ( $p < 0.05$ ) and casual blood sugar ( $p < 0.05$ ), respectively as results of multiple regression. There were no association between the DDAH1 gene and these blood examinations.

研究分野：精神医学

キーワード：一酸化炭素 メチルアルギニン AGXT2遺伝子 高血圧 糖尿病 認知症

## 1. 研究開始当初の背景

近年、加齢とともに罹患率が増加する糖尿病や血管障害と認知症の関連が注目されている。慢性の血管病変を有する糖尿病では、血管性認知症 (Vascular dementia, VaD) の発症が高頻度であることは古くから知られていた。一方、最近になり、久山町研究などの認知症の疫学調査から、糖尿病ではアルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) の発症率も高いことが報告されている。その成因や病態として、脳循環の低下や糖代謝異常が注目されている。一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は、内皮細胞由来血管拡張因子として発見された気体であるが、AD 患者脳のアミロイド β の沈着、脳微小血管内皮障害に NO の低下が関係していることが示され、また、神経伝達物質として作用するため高齢者の精神神経障害の重要な因子である。NO は、NO 合成酵素 (NO synthase, NOS) により合成されるが、生体内で NOS を阻害する唯一の修飾アルギニンである asymmetric dimethyl arginine (ADMA) などのメチルアルギニンは、タンパク質中のメチルアルギニンが分解され作られ、生体内で強力に NOS を阻害する。ADMA は、アラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素 2 (AGXT2) またはジメチルアルギニンジメチルアミノ水酸化酵素 (DDAH) により分解される。Agxt2 を欠損したマウスでは、NO が低値となり、ADMA が増加すること、高血圧や高脂血症を示すことが報告されている。欧米人では AGXT2 活性の欠損は数%に過ぎないが、日本人では約 30% のものが AGXT2 活性を欠いている。我々は、AGXT2 活性を欠損した個体において動脈硬化を示すことを報告し、注目している (J Biol Regul Homeost Agents 28, 605, 2014)。

## 2. 研究の目的

NO 系に影響し、脳で発現する AGXT2 および DDAH1 遺伝子が、日本人 AD や VaD などの認知機能の後天的な低下による疾患に関係する可能性を検討するために、まずは、高齢者を対象とし高血圧や糖尿病などの生活習慣病との関連について遺伝子解析により明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 試料の採取および調整

伊予市中山町の 65 歳以上の住民を対象に、フェイスシートによる健康調査の後、CBC、血糖及び A1c、グリコアルブミン、HDL-Chol など Chol 分画、Cr などの一般血液データを収集した。加えて、Mini Mental State Examination (MMSE)、Geriatric Depression Scale (GDS) などの心理検査を行い、認知症と診断されたものを除いた健常者より遺伝子採血した。その後、血液試料から RNA および DNA を採取し解析まで保存した。この研究は愛媛大学で承認されている (愛媛大学大学院医学系研究科等ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理委員会承認番号 31-K8、愛媛大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会承認番号 1901009 号)。

### 2) AGXT2 および DDAH 遺伝子多型の確認

それぞれの遺伝子相関解析は、ABI 社の Taqman probe を用いた real time PCR 法で行った。AGXT2 遺伝子は 4 機能性多型 (rs37370, rs37369, rs180749, rs16899974)、DDAH1 遺伝子は 5 多型 (プロモーター 4 塩基 ins/del 多型、rs307894, rs669173, rs997251, rs13373844)

を解析した。

### 3) 遺伝子関連解析

1) で行った臨床結果と 2) の遺伝子多型を用い、SPSS 23.0 により遺伝的統計解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) 解析した試料情報

65 歳以上の住民 750 名は、平均年齢 77 歳 (男性 309 名、女性 441 名) であった。これら解析対象者から得られた臨床データも示す (表)。

Parameters	Available number	Values	Parameters	Available number	Values
<b>Demographic data</b>			<b>Biochemical data</b>		
N		750	Albumin (g/dL)	750	4.19 ± 0.34
Age (years)	750	77.0 ± 7.6	Total bilirubin (mg/dL)	750	0.72 ± 0.26
Sex (male:female)	750	309:441	AST (IU/L)	750	25.5 ± 8.51
Height (cm)	746	151.7 ± 9.6	ALT (IU/L)	750	18.9 ± 11.7
Weight (kg)	747	54.6 ± 10.6	LDH (IU/L)	750	220.0 ± 40.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	746	23.6 ± 3.3	γ-GTP (IU/L)	750	29.8 ± 37.3
Education (years)	743		CPK	750	121.1 ± 70.5
1: < 6		1: 33	Total cholesterol (mg/dL)	750	196.7 ± 31.8
2: 7-9		2: 324	LDL cholesterol (mg/dL)	750	110.8 ± 26.7
3: 10-12		3: 323	HDL cholesterol (mg/dL)	750	59.0 ± 26.7
4: ≥13		4: 63	Fasting blood glucose (mg/dL)	24	102.1 ± 42.0
Systolic blood pressure (mmHg)	749	137.8 ± 15.6	Casual blood glucose (mg/dL)	726	117.4 ± 45.6
Diastolic blood pressure (mmHg)	749	76.7 ± 9.9	HbA1c (%)	750	5.85 ± 0.82
Heart rate (per min)	748	70.3 ± 12.0	BUN (mg/dL)	750	17.2 ± 4.93
Hypertension	749	560	Creatinine (mg/dL)	750	0.76 ± 0.26
Diabetes mellitus	743	120	eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	750	66.7 ± 12.0
Liver disease	748	44	Na (mEq/L)	750	140.8 ± 2.32
Kidney disease	750	171	K (mEq/L)	750	5.08 ± 0.67
Depression	748	87	Cl (mEq/L)	750	102.9 ± 2.68
Brain attack (past history of stroke)	748	78			
Head injury	748	37			
Current alcohol drinking	724	235			
Current smoking status	723	32			

ALT alanine aminotransferase, AST aspartate transaminase, BMI body mass index, BUN blood urea nitrogen, CPK creatine phosphokinase, eGFR estimated glomerular filtration rate, γ-GTP γ-glutamyl transpeptidase, HDL high density lipoprotein, LDH lactate dehydrogenase, LDL low-density lipoprotein

### 2) 遺伝子解析結果

AGXT2 遺伝子の 4 機能性多型(rs37370, rs37369, rs180749, rs16899974)および DDAH1 遺伝子の 5 多型 (プロモーター4 塩基 ins/del 多型、rs307894, rs669173, rs997251, rs13373844) の結果を以下に示す (表)。すべてハーディ・ワインベルグ平衡を満たしており、偏ったサンプルではなかった。

SNP (major/minor allele)	Localization	HWE p value	MAF	Genotyping rate (%)
<b>AGXT2</b>				
rs37370 (T/C)	exon 4 (V140I)	0.97	C (0.43)	100
rs37369 (A/G)	exon 3 (S102N)	0.34	G (0.38)	99.87
rs180749 (A/G)	exon 6 (T212I)	0.26	G (0.22)	94.47
rs16899974 (C/A)	exon 14 (V498L)	0.42	A (0.43)	100
<b>DDAH1</b>				
rs3087894 (T/A)	3'-UTR	0.35	A (0.23)	99.87
rs669173 (T/C)	intron 4	0.32	C (0.32)	99.87
rs997251 (T/C)	intron 5	0.23	C (0.24)	99.87
rs13373844 (A/C)	intron 4	0.25	C (0.12)	99.87
-396 4N INS/DEL	promoter		INS (0.16)	99.87

DEL, deletion; INS, insertion

続いて、共分散分析 (ANCOVA) を行い、AGXT2 および DDAH1 遺伝子が他の因子と関係するかどうかについて解析した。そうしたところ、DDAH1 遺伝子は、血圧を含め、いず

れの因子との関係も否定された (表 血圧との関係を示す)。

Association between Systolic Blood Pressure and SNPs in *DDAH1*

SNPs	Association with systolic BP					
	Univariate			Multivariate*		
	$\beta$	S.E.	P value	$\beta$	S.E.	P value
rs997251	0.008	0.920	0.817	0.013	0.919	0.731
rs13373844	0.025	1.224	0.492	0.031	1.206	0.401
-396 4N ins/del	0.002	1.073	0.948	-0.010	1.091	0.790

BP, blood pressure; SNP, single-nucleotide polymorphism; S.E., standard error.

\*Models accounted for sex, age, body mass index, level of education, diabetes mellitus, kidney diseases, depression, brain attack (defined as past history of stroke), head injury, alcohol intake, smoking status, and total serum cholesterol.

Association between Diastolic Blood Pressure and SNPs in *DDAH1*

SNPs	Association with diastolic BP					
	Univariate			Multivariate*		
	$\beta$	S.E.	P value	$\beta$	S.E.	P value
rs997251	-0.018	0.585	0.617	-0.012	0.585	0.738
rs13373844	-0.003	0.779	0.938	0.018	0.768	0.621
-396 4N ins/del	-0.001	0.682	0.971	-0.007	0.694	0.849

BP, blood pressure; SNP, single-nucleotide polymorphism; S.E., standard error.

\*Models accounted for sex, age, body mass index, level of education, diabetes mellitus, kidney diseases, depression, brain attack (defined as past history of stroke), head injury, alcohol intake, smoking status, and total serum cholesterol.

一方、AGXT2 遺伝子では、収縮期血圧 (右表) 拡張期血圧 (左表) と酵素を欠損するハプロタイプ (CAAA) が関係していることが示された ( $p < 0.05$ )。また、AGXT2 遺伝子の一塩基多型 rs16899974 は、AST、ALT、随意血糖値とも関係していた ( $p < 0.05$ )。

Parameters	$\beta$	P value	Parameters	$\beta$	P value
rs37370	-0.081	0.17	rs37370	-0.065	0.26
rs37369	0.036	0.45	rs37369	0.060	0.20
rs180749	0.041	0.36	rs180749	-0.034	0.43
rs16899974	0.047	0.38	rs16899974	0.109	0.040
CAAA haplotype	0.154	0.031	CAAA haplotype	0.155	0.028
Age	0.082	0.075	Age	-0.096	0.034
Sex	-0.174	< 0.001	Sex	-0.127	0.002
BMI	0.088	0.020	BMI	0.114	0.002
Education	0.017	0.69	Education	0.031	0.45
Diabetes mellitus	0.069	0.069	Diabetes mellitus	-0.072	0.054
Kidney disease	-0.019	0.64	Kidney disease	-0.115	0.004
Depression	-0.083	0.026	Depression	-0.075	0.042
Brain attack	-0.023	0.54	Brain attack	0.014	0.71
Head injury	-0.086	0.022	Head injury	-0.061	0.098
Current alcohol drinking	0.042	0.31	Current alcohol drinking	0.039	0.33
Current smoking status	-0.055	0.17	Current smoking status	-0.022	0.58
Total cholesterol	0.119	0.003	Total cholesterol	0.087	0.026

BMI body mass index, brain attack (defined as past history of stroke)

BMI body mass index, brain attack (defined as past history of stroke)

## 結論

65 歳以上の高齢者 750 名を対象とし、NO 系に関係するメチルアルギニンの調整因子 AGXT2 と DDAH1 遺伝子解析した。DDAH1 遺伝子はその関連は否定的で、AGXT2 遺伝子については、血圧や糖尿病などとの関連が確認された。今回解析した AGXT2 遺伝子多型は、酵素活性に関係する機能性多型であることから、AGXT2 遺伝子は高血圧や糖尿病を介して認知症に直接関連する可能性が示された。今後、アルツハイマー病や脳血管性認知症などの解析により、これらの関係を直接示していくことが必要であると思われる。

## 発表文献

Y. Yoshino, H. Kumon, T. Mori, T. Yoshida, A. Tachibana, H. Shimizu, J. Iga, S. Ueno. Effects of AGXT2 variants on blood pressure and blood sugar among 750 older Japanese subjects recruited by the complete enumeration survey method. BMC Genomics 22, 287, 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 129.Y. Yoshino, H. Kumon, T. Mori, T. Yoshida, A Tachibana, H. Shimizu, J. Iga, S. Ueno.	4. 巻 22
2. 論文標題 Effects of AGXT2 variants on blood pressure and blood sugar among 750 older Japanese subjects recruited by the complete enumeration survey method.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-021-07612-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛大学大学院医学系研究科精神神経科学 業績一覧 <a href="https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/neuropsychiatry/study/performance/ist">https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/neuropsychiatry/study/performance/ist</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田原 康玄 (Tabara Yasuharu) (00268749)	京都大学・医学研究科・准教授  (14301)	
研究分担者	三宅 吉博 (Miyake Yoshihiro) (50330246)	愛媛大学・医学系研究科・教授  (16301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊賀 淳一  (Iga Junichi)  (70363140)	愛媛大学・医学系研究科・准教授   (16301)	
研究分担者	大澤 春彦  (Osawa Haruhiko)  (90294800)	愛媛大学・医学系研究科・教授   (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関