

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650427

研究課題名(和文)小児肥満におけるグレリンおよびグレリン受容体遺伝子多型と食行動習慣の関連解析

研究課題名(英文)The relationship between eating behavior of pediatric obesity and the SNPs of ghrelin gene and ghrelin receptor gene in Japan

研究代表者

中島 久和(Nakajima, Hisakazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80363985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：小児肥満と摂食行動やエネルギー代謝を調節するホルモンの遺伝子、グレリン遺伝子およびグレリン受容体遺伝子について関連を解析した。小児肥満の出現率とグレリン遺伝子多型の関連を調査した結果、グレリン遺伝子プロモータ領域の多型g.-501C>A(rs26802)のジェノタイプAAは小児肥満の危険因子であることが示唆された(オッズ比14.05[95%信頼区間5.76-34.28, p<0.001])。グレリン受容体遺伝子多型は小児肥満との相関は認められなかった。グレリン遺伝子多型およびその受容体遺伝子多型は小児肥満における血清脂質、インスリン抵抗性、糖尿病合併におよぼす影響は少ないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Ghrelin is an important hormone that regulates appetite and eating behavior, and modulates energy metabolism. We performed SNPs analysis of the ghrelin gene (GHRL) and the ghrelin receptor gene (GHSR) and examined its relationship with the childhood obesity in Japan. We recruited and analysed 165 healthy school-aged subjects and 46 obese children from 2010 to 2014. We selected the five SNPs of GHRL: g.-604A>G(rs27647), g.-501C>A(rs26802), g.247C>A(rs696217), g.265A>T(rs4684677), g.62G>T(rs35683), and the three SNPs of GHSR: g.171C>T(rs495225), g.447C>G(rs2232169), g.477G>A(rs572169). The SNPs were genotyped using Taqman SNP Genotyping Assays. The genotype AA of g.-501C>A was associated with the occurrence of pediatric obesity (OR 14.05: 95%CI 5.76-34.28, p<0.001). We also didn't identify the relationship between childhood obesity and the 3 SNPs of GHSR. Our study suggested that the GHRL g.-501C>A polymorphism was strongly associated with pediatric obesity in Japan.

研究分野：小児肥満

キーワード：小児肥満 グレリン グレリン受容体 遺伝子多型 食行動

1. 研究開始当初の背景

ヒトの肥満に繋がる食行動習慣とゲノムの関連について調査した報告は少なく、空腹感や満腹感の感受性、早食いやだたら食べる食行動の時間的な違い、味の認識の違いなどのヒトの食行動・食認識の多様性は何に由来するのか、生物学的には未解明である。

グレリンは視床下部を介して、摂食(または摂食行動)を増進する消化管ホルモンとして注目されている。動物実験のデータから、グレリンと食行動が関連している可能性を指摘する研究者は少なくない。フランスおよびドイツでの肥満患者・健常人を対象にしたヒトのコホート研究があるが(Gueorguiev, et al: Obesity 2009; 17, 745-754)、グレリン遺伝子やグレリン受容体遺伝子の遺伝子多型(SNPs)によっては、食行動パターンと関連するというデータが公表された。肥満に関する日本人のデータは極めて少ないので、本邦で遺伝子と食行動パターンの関連を解析し、エビデンスを得ることは意義深い。

肥満患者がダイエット後、高グレリン値を示した群では体重の再増加(リバウンド現象)の頻度が高いことから(Crujeiras, et al: J Clin Endocrinol Metab 2010; 95, 5037-5044)、食行動、とくに食衝動が抑えられないこととグレリンの作用(グレリンの活性やグレリン受容体の活性)が関連している可能性がある。

つまり、日本人の小児肥満においてグレリンあるいはグレリン受容体の活性を遺伝子多型解析(SNPs解析)によって予測し、その多型によって小児肥満患者の食行動のパターンを類型化する試みができないかどうか検討することは医学的価値が高いと発想した。

2. 研究の目的

グレリン遺伝子およびグレリン受容体遺伝子の遺伝子多型によって小児肥満のリスクが増加するか否かを検証する。また遺伝子多型のタイプによって食行動パターンに一定の傾向があるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

研究対象者のエントリー: 京都府立医科大学附属病院小児科あるいは連携医療機関の肥満外来に通院する肥満症例 100 名、非肥満の小児 200 名(非肥満小児)を対象に調査を行う予定とした。非肥満小児は、学校検診にて小児肥満症を血液検査を用いてスクリーニングしている小中学校あるいは自治体の教育委員会に協力を依頼する。年齢は 7 歳から 15 歳を対象とした。

肥満に関連する臨床パラメータの計測・測定:

- (1) 身長、体重、腹囲、BMI(体重/身長²)、BMI Z スコア、肥満度を測定・算出した。
- (2) 説明と同意のもと、採血を行い、空腹時血糖・総コレステロール(TCHO)、LDL コレ

ステロール(LDLC)、HDL コレステロール(HDLC)、中性脂肪(TG)・インスリン(ELISA法)を測定した。血液検体から DNA を分離精製し、遺伝子解析に使用した。

(3) 前もって研究対象者に食行動調査に関するアンケート(DEBQ)を配布し、回答を回収した。

遺伝子多型解析(SNPs解析): 血液検体から DNA を抽出し、テンプレート DNA を作成する。テンプレート DNA を試料にして、グレリン遺伝子およびグレリン受容体遺伝子の遺伝子解析(SNPs解析)を行った。それぞれの遺伝子について、プロモータ領域および翻訳領域を、ダイレクトシーケンシング法や Taqman® SNP Genotyping Assays(アプライド・バイオシステムズ:リアルタイムPCR法)を用いて解析を行った。使用した機器は ABI7500 Fast Real Time PCR システム(アプライドバイオシステムズ社)である。解析した SNPs は以下の通りである。

- ・グレリン遺伝子(GHRL)の SNPs
 - g.-604A>G(rs27647):プロモータ領域
 - g.-501C>A(rs26802):プロモータ領域
 - g.247C>A/Leu72Met(rs696217)
 - g.265A>T/Gln90Leu(rs4684677)
 - g.62G>T(rs35683)
- ・グレリン受容体遺伝(GHSR)の SNPs
 - g.171C>T/Gly57Gly(rs495225)
 - g.447C>G/Leu149Leu(rs2232169)
 - g.477G>A/Arg159Arg(rs572169)

研究倫理: 本研究は京都府立医科大学大学院研究倫理委員会によって審議され、承認された。

4. 研究成果

解析対象の選定

インフォームドコンセントを取得後、本研究に参加した対象者は、小児肥満 63 名、正常対照 185 名であった。その内データ不足・染色体異常などの原疾患・経口ステロイド剤の投薬などの理由により解析対象から除外されたものが小児肥満で 17 名、正常対照で 20 名となった。結果、解析対象となったものは小児肥満 46 名、正常対照 165 名であった。

解析対象のプロフィール

解析対象のプロフィールは以下の通りである。値は平均値±標準偏差で表記した。

| | 全体 | 正常対照 | 肥満 | P 値 |
|--------------|------------|------------|------------|-----|
| n | 211 | 165 | 46 | |
| 性別(男/女) | 115/96 | 84/81 | 31/15 | |
| 年齢(歳) | 13.2±1.8 | 13.7±0.9 | 11.3±2.9 | |
| 肥満度(%) | 8.5±24.2 | -2.7±10.6 | 48.8±14.0 | # |
| BMI Z スコア | 0.2±1.3 | -0.4±0.9 | 2.2±0.5 | # |
| TCHO (mg/dL) | 171.1±29.1 | 168.3±27.2 | 181.2±33.6 | |

| | | | | |
|-------------------|------------|-----------|------------|---|
| LDLC(mg/dL) | 93.1±25.8 | 88.4±21.9 | 110.0±31.4 | # |
| HDLC(mg/dL) | 63.9±14.2 | 67.1±12.8 | 52.6±13.1 | # |
| TG (mg/dL) | 104.6±65.8 | 96.5±59.3 | 133.6±79.2 | * |
| 空腹時血糖 (mg/dL) | 88.2±10.7 | 85.9±9.0 | 96.2±12.4 | # |
| インスリン (μIU/mL) | 14.0±24.7 | 8.4±7.4 | 34.1±46.0 | # |
| HOMA-R | 3.4±7.6 | 1.8±2.1 | 9.1±14.6 | # |
| HbA1c (%) | 5.2±0.4 | 5.1±0.2 | 5.6±0.6 | # |

有意差検定は正常対照と肥満を比較した (Mann-Whitney U test)。有意差は、「* p<0.01, #p<0.001」で表記した。

肥満群は正常対照と比較し、肥満度、BMI Zスコア、TCHO、LDLC、空腹時血糖、インスリン、HOMA-R(インスリン抵抗性指標)、HbA1c が有意差をもって高値を示した。肥満群で HDLC は低値を示した。

グレリン遺伝子多型と小児肥満の関連

グレリン遺伝子多型のジェノタイプのプロファイルを示す。なお解析対象者全体のプロファイルを表示する。

g.-604A>G: AA 179 人, AG 32 人, GG 0 人, マイナーアレル頻度 (Minor allele frequency, MAF 0.08.

g.-501C>A: AA 83 人, CA 125 人, CC 3 人, MAF 0.45.

g.247C>A: AA 23 人, CA 64 人, CC 124 人, MAF 0.35.

g.265A>T: AA 205 人, AT 6 人, TT 0 人, MAF 0.01.

g. 62 G>T (オベスタチン翻訳領域): GG 206 人, AG 5 人, AA 0 人, MAF 0.01.

グレリン遺伝子 プロモータ領域の SNP である g.-501C>A (rs26802)のジェノタイプ AA が小児肥満の出現率に対して強い相関をみとめた (オッズ比 14.05 [95%信頼区間 5.76-34.28, p<0.001])。他のグレリン遺伝子多型の g.-604A>G, g.C247A/Leu72Met, g.A265T, g.G62T には小児肥満の出現率との有意な相関はみとめなかった。

g.-501C>A (rs26802)のジェノタイプ AA とジェノタイプ CA+CC の比較を行った。肥満群と正常対照群のなかでの比較には有意差を示す肥満パラメータはなかった。研究対象全体で比較検討をした結果、ジェノタイプ AA で肥満度、BMI-Z スコア、LDLC、空腹時血糖、インスリン、HOMA-R、HbA1c が有意に高値を示した。この結果は肥満ジェノタイプ AA が肥満群の 46 人中 37 人を占めていたことが関与していると考えられた。

ジェノタイプ AA と小児の肥満との強い関連が示唆された。別の言い方をすると、C アレルを持つことが小児の肥満形成に保護的な機能を持つと解釈できる。グレリン遺伝子多型 g.-501C>A は小児肥満の形成に関わる遺伝的素因である可能性が高いと考えられた。しかし、g.-501C>A は小児肥満の表現型 (と

くに肥満関連パラメータ) に影響を与える因子とは考えられなかった。

グレリン受容体遺伝子多型と小児肥満の関連

グレリン受容体遺伝子多型のジェノタイプのプロファイルを示す。なお解析対象者全体のプロファイルを表示した。

g.171C>T: CC 57 人, CT 60 人, TT 94 人, MAF 0.41.

g.447C>G:211: CC 211 人, CG 0 人, GG 0 人, MAF 0.0.

g.477G>A: GG5 4 人, GA 85 人, AA 72 人, MAF 0.38.

g.447C>G はすべての解析対象者がジェノタイプ CC という結果だった。

g. 171C> T、g.477G>A と小児肥満の出現率には統計学的に有意な関連は見られなかった。g. 171C> T、g.477G>A に肥満関連パラメータとの比較を行った。g.171C>T に関する解析対象者すべてにおける検討で、HbA1c と有意差を認めた (P=0.004)。

グレリン受容体遺伝子多型は今回の検討では小児肥満との関連は乏しいと考えられた。g.171C>T は小児肥満から独立した HbA1c (耐糖能異常) の関連因子かもしれない。

その他

DEBQ スコア(食行動調査)によるアンケート調査を研究対象者に配布し、回答を回収した。アンケート回収率は正常対照 100%、小児肥満 36%であった。現在、スコアを集計し、統計解析している。

まとめ

小児肥満と関連するグレリン遺伝子多型を同定した。グレリン遺伝子のプロモータ領域の多型 g.-501C>A のジェノタイプ AA は日本人小児肥満の危険因子である可能性が示唆された。グレリン受容体遺伝子多型については、今回の調査では小児肥満との明らかな関連は示されなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Sugimoto S, Nakajima H, Kodo K, Mori J, Matsuo K, Kosaka K, Aoi W, Yoshimoto K, Ikegaya H, Hosoi H. Miglitol increases energy expenditure by upregulating uncoupling protein1 of brown adipose tissue and reduces obesity in dietary-induced obese mice. Nutrition & Metabolism 11:14, 2014. doi:10.1186/1743-7075-11-14 (査読あり)

Yorifuji T, Hashimoto Y, Kawakita R,

Hosokawa Y, Fujimaru R, Hatake K, Tamagawa N, Nakajima H, Fujii M. Relapsing 6q24-related transient neonatal diabetes mellitus successfully treated with a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor: a case report. *Pediatric Diabetes* 15: 606-610, 2014. doi: 10.1111/pedi.12123 (査読有り)
吉田秀樹、今村俊彦、矢野未央、伊藤育世、坂本謙一、柴田真弓、藤木敦、中島久和、小坂喜太郎、石田宏之、細井創. 小児急性リンパ性白血病におけるL-Asparaginase 関連高血糖発症のリスク因子の検討. *日本小児血液・がん学会雑誌* 51(2): 145-152, 2014. (査読有り)
後藤幸子、今村俊彦、八木加奈恵、新田義宏、浅井大介、吉田秀樹、藤木敦、大曾根真也、中島久和、小坂喜太郎、細井創. L-アスパラギナーゼ関連重症膵炎後に糖尿病を発症した急性リンパ性白血病の1例. *日本小児血液・がん学会雑誌* 51(2):163-167, 2014. (査読有り)

〔学会発表〕(計16件)

伊藤育世、中島久和、幸道和樹、福原正太、茂原慶一、杉本哲、小坂喜太郎、細井創. グレリン遺伝子およびFTO遺伝子のSNPsと小児肥満との関連解析. 第33回日本肥満症治療学会学術集会. 2015年6月26日~27日、千葉市.
伊藤育世、中島久和、杉本哲、幸道和樹、福原正太、茂原慶一、藤原寛、小坂喜太郎. グレリン遺伝子多型と小児肥満の表現型の関連解析. 第35回日本肥満学会. 2014年10月24日~25日、宮崎市.
藤原寛、幸道和樹、伊藤育世、中島久和、小坂喜太郎、井上文夫. 発達障害児の肥満治療の現状と今後の課題. 第35回日本肥満学会. 2014年10月24日~25日、宮崎市.
杉本哲、中島久和、幸道和樹、伊藤育世、森潤、松尾憲典、小坂喜太郎、細井創. ミグリトールは食餌性肥満マウスにおいて褐色脂肪組織のUCP1を活性化しエネルギー消費を亢進させる. 第48回日本小児内分泌学会学術集会 2014年9月25日~27日、浜松市.
Itoh I, Nakajima H, Sugimoto S, Kodo K, Kosaka K, Hosoi H. The association of ghrelin Gene Polymorphism with Obesity in Japanese Children. 53rd European Society of Paediatric Endocrinology (ESPE) meeting. 2014, Sep 18-20; Dublin, Ireland.
Sugimoto S, Nakajima H, Nishikawa T, Kodo K, Itoh I, Kosaka K, Hosoi H. Miglitol upregulates uncoupling protein 1 (UCP1) by enhancing β 3-adrenergic signaling in mature brown adipocytes of rat. 53rd ESPE meeting. 2014, Sep 18-20; Dublin, Ireland.
杉本哲、中島久和、福原正太、茂原慶一、

幸道和樹、伊藤育世、森潤、松尾憲典、小坂喜太郎、細井創. ミグリトールは食餌性肥満モデルのげっ歯類において褐色脂肪組織の β 3-adrenergic signalingを活性化しエネルギー代謝を増加させる. 第32回日本肥満症治療学会学術集会 2014年7月4日~5日、大津市.
幸道和樹、中島久和、伊藤育世、杉本哲、家原知子、小坂喜太郎、細井創、岡島英明、山上卓士. 先天性門脈欠損症の7例. 第117回日本小児科学会学術集会. 2014年4月11日~13日、名古屋市.
杉本哲、中島久和、藤原寛、幸道和樹、伊藤育世、小坂喜太郎、井上文夫. 小児肥満における2型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の遺伝子多型 Thr92Alaの影響. 第34回日本肥満学会. 2013年10月11日~12日、東京.
Sugimoto S, Nakajima H, Matsuo K, Kosaka K, Hosoi H. Miglitol increases energy expenditure by upregulation uncoupling protein 1(UCP1) in brown adipose tissue (BAT) of diet-induced obesity mice. ESPE, 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology. 2013, Sep 19-21; Milan, Italy.
Kosaka K, Sugimoto S, Ito I, Nakajima H, Hosoi H, Yamamoto T. Optimizing growth hormone therapy by dose titration in short children born small for gestational age. ESPE, 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology. 2013, Sep 19-22; Milan, Italy.
Yamamoto T, Katsumi Y, Kajita Y, Nakajima H, Kosaka K. Clinical characteristics of congenital hypothyroidism due to mutations in the thyroid peroxidase gene. ESPE, 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology. 2013, Sep 19-22; Milan, Italy.
Sugimoto S, Nakajima H, Itoh I, Kodo K, Mori J, Matsuo K, Kosaka K, Aoi W, Yoshimoto K, Ikegaya H, Hosoi H. Miglitol increases energy expenditure by up-regulating uncoupling protein1 (UCP1) of brown adipose tissue (BAT) and reduces obesity in high-fat diet induced obese mice. 第18回アディポサイエンス・シンポジウム. 2013年8月24日、豊中市.
杉本哲、中島久和、松尾憲典、小坂喜太郎、細井創. ミグリトールは高脂肪食マウスにおいて褐色脂肪の熱産生を増加する. 第86回日本内分泌学会学術総会. 2013年4月25日~27日、仙台市.
中島久和、杉本哲、松尾憲典、藤原寛、小坂喜太郎、伊藤陽里、井上文夫. 小児肥満における2型脱ヨード酵素の遺伝子多型 Dio2 Thr92Alaの影響. 第26回近畿小児科学会. 2013年3月24日、大阪市.
杉本哲、中島久和、小坂喜太郎. ミグリトールは褐色脂肪のエネルギー消費を増加する. 第33回日本肥満学会. 2012年10月

11日～12日、京都市.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 久和 (NAKAJIMA, Hisakazu)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80363985

(2)研究分担者

なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし

()

研究者番号：

(4)研究協力者

杉本 哲 (SUGIMOTO, Satoru)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・研修

員

幸道 和樹 (KODO, Kazuki)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・大学

院生

伊藤 育世 (ITOH, Ikuyo)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・大学

院生