

## 第Ⅱ章 $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異と小児肥満

### Ⅱ-1 目的

性と年齢を一致させた非肥満児と肥満児の集団において、

- 1) 各集団における  $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の出現頻度を明らかにし、本変異と肥満との関係を検討する。
- 2) 体格、血圧、血清脂質、耐糖能の各検査項目について、本変異の存在による影響の有無を検討することを、目的とした。

### Ⅱ-2 対象と方法

#### Ⅱ-2-1 肥満群と対照群の作成

本調査は、1995年から1997年までの3年間に、本人と保護者の、文書でのインフォームドコンセントが得られた、9歳から13歳の小児を対象とした。

肥満群は、茨城県つくば市とその周辺に位置する2病院の小児科外来を、肥満を主訴に受診した肥満度20%以上の男児121人、女児104人の計225人である（平均年齢 $11.6 \pm 1.7$ 歳）。対照群として、肥満群各症例の性と年齢に一致させた225人を、同地区に在住し小児生活習慣病予防健診を受診した正常体格児（ $-20\% < \text{肥満度} < 20\%$ ）の中から、無作為に抽出した。

肥満度は、日本人小児の性別・年齢別・身長別標準体重表データが入力された、ポケットコンピュータ用ソフト（健康増進カードVer.3、東京都予防医学協会、日本アルトマーク）を用いて計算した。同時にBMIを算出し、Clinical Guidelines for Overweight in Adolescent Preventive Services<sup>1,2,4)</sup>を参考に、“過体重（overweight）”と本邦の基準である肥満度との比較も行った。

#### Ⅱ-2-2 血圧及び血清脂質の測定

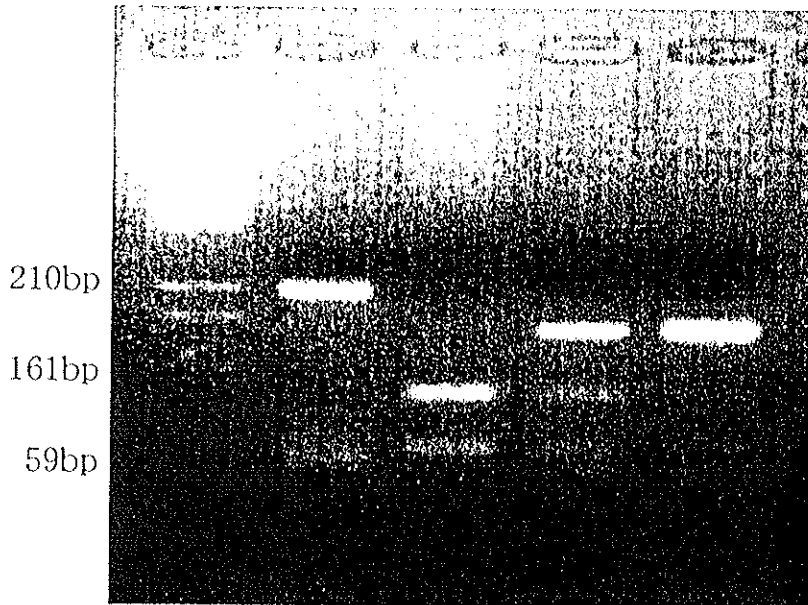
早朝空腹時に、坐位で5分間の安静を保った後、自動血圧計で血圧測定を行った。同時に、肘静脈から採血し、血清を分離し総コレステロール (TC)、HDL-コレステロール (HDL-C)、中性脂肪 (TG) を測定した。肥満児ではさらに血糖と血清インスリンを測定した。TC、TGの測定は酵素法、HDL-Cの測定は沈澱法を用いて行った。血糖は酵素法、血清インスリンはRIA法を用いて測定した。

### II-2-3 PCR-RFLP法による $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の検出

$\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無は、PCR-RFLP法を用いて検出<sup>35)、39)</sup>した。対象者の末梢血から分離した白血球をフェノール処理し、DNAを抽出<sup>125)</sup>した。DNAの変異部分を含む領域の、増幅に用いたプライマーは、上流側が5'-CGC CCA ATA CCG CCA ACA C-3'、下流側が5'-CCA CCA GGA GTC CCA TCA CC-3'である。PCRの反応条件は、熱変性反応94℃30秒、アニーリング反応61℃30秒、伸長反応72℃30秒を35サイクルとした。3% agarose gel上で電気泳動し、210bpの断片が増幅されたことを確認した。増幅した断片を、制限酵素Bst-N Iと60℃で4時間以上反応後、4% Nusieve agarose gel上で電気泳動し、断片の長さで変異の有無を判別した (図4)。

### II-2-4 統計学的解析

すべてのデータは統計パッケージソフトStatView 5.0とSPSS6.1に入力し、解析を行った。それぞれの項目について、はじめに分散の検定を行った。正規分布を示した項目 (身長、体重、TC、HDL-C、血圧、血糖) についてはStudent-t検定を用いて比較したが、そうでない項目 (肥満度、BMI、TG、インスリン) についてはMann-WhitneyのU検定を用いて比較した。 $\beta_3$ -AR遺伝子変異と肥満の出現率との関連の比較には、ロジスティック回帰分析のWald検定を用いた。肥満群における各サブグループ間の比較には、ノンパラメトリック分析のFriedman検定を用いた。



標識	PCR	Trp/Trp	Trp/Arg	Arg/Arg
増幅		┌──────────────────┐		
断片		制限酵素 <i>Bst</i> -N I と反応後、泳動		

図4 PCR-RLFP法による  $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無の判別

## II-3 結果

### II-3-1 $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の遺伝子型及び対立遺伝子頻度

表4に、肥満群と対象群における、 $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度を示した。遺伝子型頻度は、肥満群では、変異のホモ接合体であるArg/Argが4.9%、ヘテロ接合体Arg/Trpが39.1%、野生型のホモ接合体であるTrp/Trpが56.0%、対照群においては、それぞれ、0.9%、23.1%、76.0%であった。この観察値は、Hardy-Weinbergの法則に基づく遺伝子頻度の推定値と、一致していた。Arg64の対立遺伝子頻度は、肥満群は0.244と、対照群の0.124に比較し有意に高かった ( $p < 0.01$ )。肥満群を肥満の程度により、軽度（肥満度20%以上30%未満）、中等度（同30%以上50%未満）、高度（同50%以上）のサブグループに分類し、Arg64の対立遺伝子頻度を比較したが、有意な差は認められなかった。

### II-3-2 $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異と肥満との関連

表5では、 $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異と肥満の、それぞれの出現頻度を、ロジスティック回帰分析のWald検定を用いて検定した。表の左側は、日本人小児の性別・年齢別・身長別標準体重表から算出した肥満度により、肥満なし（肥満度 $< 20\%$ ）と肥満あり（肥満度 $\geq 20\%$ ）の2群に判定した場合の結果である。肥満あり群のArgあり99人、Argなし126人に対し、対照群ではArgあり54人、Argなし171人だった。この結果から、Argありが肥満に関与するオッズ比は、2.49（95%信頼区間1.66~3.73、 $p < 0.0001$ ）であり、対立遺伝子Arg64の存在と肥満との有意な関連が認められた。

また、表の中央と右側には、参考として、BMIを用いた肥満判定基準による、肥満児（yes）と対照児（no）における、変異出現頻度の $\chi^2$ 検定の結果を示した。この基準（Guidelines for overweight in adolescent preventive services<sup>124</sup>）は、性別・年齢別にAt Risk of Overweight（注意して観察すべ

表4 対照群と肥満群における、 $\beta_1$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度

肥満度 (%)	人数 (男児/女児)	Arg/Arg		Arg/Trp		Trp/Trp		対立遺伝子Arg64 の出現頻度 (分散)
		人数(%)	人数(%)	人数(%)	人数(%)	人数(%)	人数(%)	
肥満群 (+20 $\leq$ )	225 (121/104)	11 (4.9)	88 (39.1)	126 (56.0)	0.244 (0.0004) *			
軽度肥満 (+20 $\leq$ and<30)	67 (37/30)	1 (1.5)	29 (43.3)	37 (55.2)	0.231 (0.0013)			
中等度肥満 (+30 $\leq$ and<50)	99 (54/45)	4 (4.0)	40 (40.4)	55 (55.6)	0.242 (0.0009)			
高度肥満 (+50 $\leq$ )	59 (30/29)	6 (10.2)	19 (32.2)	34 (57.6)	0.263 (0.0016)			
対照群 (-20<and<+20)	225 (121/104)	2 (0.9)	52 (23.1)	171 (76.0)	0.124 (0.0002)			

\*; p<0.01、対照群との比較

表5  $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異と肥満との関連

	肥満度を用いた 肥満の判定*		BMIを用いた肥満の判定†			
	肥満なし		At Risk of Overweight		Overweight	
	肥満あり (n=225)	肥満なし (n=225)	Yes (n=207)	No (n=207)	Yes (n=113)	No (n=113)
変異あり群						
Arg/Arg n(%)	99(44.0)	54(24.0)	92(44.4)	49(23.7)	51(45.1)	29(25.7)
Arg/Trp						
変異なし群						
Trp/Trp n(%)	126(56.0)	171(76.0)	115(55.6)	158(76.3)	62(54.9)	84(74.3)
オッズ比	2.49		2.58		2.38	
(95%信頼区間)	(1.66~3.73)		(1.70~3.93)		(1.30~4.18)	
p値	<0.0001		<0.0001		0.0024	

\*; 日本人小児の性別・年齢別・身長別標準体重表 (文献89)、90)

き過体重)とOverweight(明らかな肥満)のBMIを定めている。このうち、肥満度20%以上と判定された肥満群225人のうち、207人(92.0%)がAt Risk of Overweightと(同、中央)、113人(50.2%)がOverweightと(同、右側)判定された。このどちらの基準を用いた判定にも、対立遺伝子Arg64の存在が関連していた(At Risk of OverweightにおけるArgありのオッズ比2.58(1.69~3.93、 $p < 0.0001$ )、OverweightにおけるArgありのオッズ比2.38(1.36~4.18、 $p = 0.002$ ) )。

### II-3-3 $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異と検査値との関連

表6に、肥満群と対照群の体格、血清脂質、血圧の平均値と、肥満群-対照群、変異あり群-変異なし群についての、2群間の比較を示した。肥満群では、血糖、インスリンの平均値についても、変異あり群-変異なし群で比較した。肥満群-対照群の比較では、血圧について、肥満群が対照群に比べて、有意に高かった(収縮期血圧;肥満群 $112.0 \pm 11.9$ vs. $106.3 \pm 11.7$ mmHg、 $p < 0.01$ 、拡張期血圧;肥満群 $62.8 \pm 8.6$ vs. $59.8 \pm 8.1$ mmHg、 $p < 0.001$ )。変異の有無による比較では、対照群においては、どの項目についても有意な関連が認められなかった。一方、肥満群においては、血圧が、変異あり群がなし群に比較して有意に高い値であった(収縮期血圧;肥満群 $112.3 \pm 11.7$ vs. $108.2 \pm 11.8$ mmHg、 $p < 0.01$ 、拡張期血圧;肥満群 $63.2 \pm 8.4$ vs. $60.2 \pm 8.3$ mmHg、 $p < 0.001$ )。

## II-4 考察

### II-4-1 $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の出現頻度

$\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異と肥満との関連は、1995年にWalstonらが北米大陸のPima Indiansの集団について初めて報告した<sup>34)</sup>。その後、成人領域において本変異の頻度がいくつか報告されている<sup>35)-41)</sup>。表7はそれらの報告を

表6 肥満の有無別、 $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の有無別の、体格、血清脂質、血糖とインスリン、血圧の平均値の比較

項目	肥満群			対照群		
	全体 (n=225)	変異あり群 (n=99)	変異なし群 (n=126)	全体 (n=225)	変異あり群 (n=54)	変異なし群 (n=171)
男児/女児	121/104	44/55	77/49	121/104	30/24	91/80
年齢 (歳)	11.6±1.7	11.6±1.7	11.7±1.8	11.7±1.7	11.7±1.7	11.6±1.6
身長 (cm)	148.9±11.0	149.1±10.5	148.7±11.6	147.2±11.5	147.0±10.9	147.2±11.8
体重 (kg)	57.6±14.3	57.8±17.9	57.4±14.4	39.4±10.1	38.9±9.6	39.4±10.3
肥満度 (%)	42.2±17.5	42.7±17.9	42.0±17.2	-0.3±9.3	-1.0±9.1	-0.0±8.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.6±3.7	25.6±3.8	25.6±3.7	17.8±2.2	17.7±2.1	17.8±2.3
TC (mg/dl)	181.1±31.1	181.4±32.9	182.9±30.2	172.5±24.0	174.0±25.1	174.4±25.2
HDL-C (mg/dl)	51.6±10.9	52.2±11.2	51.8±10.8	56.3±10.5	57.6±11.2	56.1±10.4
TG (mg/dl)	95.5±53.5	94.8±45.2	92.1±57.6	74.9±28.4	77.1±31.9	71.8±26.6
空腹時血糖 (mg/dl)	90.0±7.2	92.2±12.6	92.6±14.8	—	—	—
空腹時インスリン (mg/dl)	17.9±12.5	19.5±15.2	16.8±10.4	—	—	—
収縮期血圧 (mmHg)	112.0±11.9* <sup>1</sup>	112.3±11.7	108.2±11.8* <sup>2</sup>	106.3±11.7	108.7±12.2	105.4±11.5
拡張期血圧 (mmHg)	62.8±8.6† <sup>1</sup>	63.2±8.4	60.2±8.3† <sup>2</sup>	59.8±8.1	59.9±8.5	59.8±7.9

平均値 ± SDで表示

\* ; p<0.01、性、年齢、体重で調整後に、\*<sup>1</sup>は対照群と、\*<sup>2</sup>は変異なし群と比較

† ; p<0.001、性、年齢、体重で調整後に、†<sup>1</sup>は対照群と、†<sup>2</sup>は変異なし群と比較変異の有無で比較



もとに、対立遺伝子Arg64の出現頻度を、地域別にまとめたものである。日本人における対立遺伝子Arg64の出現頻度は0.19~0.23と、白人や黒人に比較し高いが、Pima Indiansほどではない。本変異の出現頻度を小児集団で検討した報告は少ないが、遠藤ら<sup>126)</sup>によると、茨城県内1地区で小児生活習慣病予防健診を受診した553（男児291、女児262）人、平均年齢11.9歳の集団における対立遺伝子Arg64の出現頻度は0.22で、日本人成人の報告と同様の値であった。一方、小規模集団での解析であるが、サモア諸島やナウル諸島の住民における対立遺伝子Arg64の出現頻度は、ほとんどゼロに近い<sup>38)</sup>。

このようなヒト集団における地域差について、例えばPima Indiansは約3.8万年前に中央アジアから北米大陸に移住し、長期間飢餓との戦いが続くうちに、脂肪を蓄積する本遺伝子変異が高率に残存したものと推測される（「儉約遺伝子（Thrifty gene）仮説」）<sup>127)</sup>。また、Kurabayashiらの報告では、オーストラリア人女性で本変異と妊娠可能期間の延長との関連が示唆される<sup>40)</sup>など、ある地域におけるヒト集団にとっては、種の保存に有利に作用していたと考えられる。

#### II-4-2 $\beta_3$ -AR遺伝子のTrp64Arg変異と小児肥満

本変異と肥満の関連については、in vitroの実験においてI-6で述べた機序が推測される。ヒト成人領域の研究では、Pima Indiansで初めて本変異を報告したWalstonらが、NIDDMの発症が変異のホモ接合Arg/Argで約5年早く、安静時代謝量がArg/ArgはTrp/Trpに比べて1日あたり82kcal、Arg/Trpは同36kcal減少していたと述べた<sup>34)</sup>。Widénらはフィンランド在住の白人を対象とした研究で、本変異を持つことによりNIDDMの発症が約5年早まること、糖尿病のない成人でもWHRと血清インスリン、拡張期血圧の高値を報告した<sup>35)</sup>。Clémentらは高度肥満のフランス人で、本変異と多大な体重増加との関連を報告した<sup>36)</sup>。日本でも、Kadowakiら、Fujisawaraらが本変異とBMI及び血清インスリンの高値との関連を報告した<sup>39)・43)</sup>。

表7  $\beta_3$ -AR遺伝子Trp64Arg変異の地域別ヒト集団における、  
Arg64対立遺伝子頻度

人種	分析数 (人数)	対立遺伝子 Arg64頻度	対象者集団	報告者と報告年 (文献番号)
Pima Indians	642	0.31	35～87歳男女	Walstonら. 1995 (34)
Japanese	188	0.23	平均54歳女性	Yoshidaら. 1995 (41)
	350	0.20	21～87歳男女	Kadowakiら. 1995 (39)
	295	0.19		Fujisawaら. 1996 (43)
	553	0.22	平均11.9歳男女	遠藤ら (126)
Mexican Americans	62	0.13		Silverら. 1995 (38)
African Americans	49	0.12		Walstonら. 1995(34)
Caucasians				
Finland	335	0.11	成人男女	Widénら. 1995 (35)
France	185	0.10	平均46歳男女	Clémentら. 1995 (36)
Australia	686	0.08	平均70歳男女	Kurabayashiら. 199 (40)
Samoans	55	0.06	25歳～男女	Silverら. 1996 (38)
Nauruans	52	0.00	25歳～男女	Silverら. 1996 (38)

小児領域で本変異と肥満との関連を検討した報告はないが、Walstonらが述べたように本変異が安静時代謝量の減少を引き起こすのであれば、すでに小児期に体脂肪の蓄積は始まっていると考えられる。実際に、Yoshidaら<sup>41)</sup>は肥満女性に3か月間の食事と運動療法を行い、本変異を持つ群では安静時代謝量の減少と減量効果の低下が起こることを報告しており、食事と運動を一定にしても変異の有無により体重変化に差があることが確認された。また、NIDDM患者群と対照群で対立遺伝子Arg64の出現頻度に差がないことは多くの研究者が報告しているが、一方でNIDDMの早期発症との関連は明らかであり、本変異によって早い時期から体脂肪が蓄積し、インスリン抵抗性を招来することが推測される。さらに、血圧との関連については、交感神経刺激を末梢細血管の平滑筋に伝達し、血管拡張に関与する $\beta_3$ -アドレナリン受容体の作動が、本変異の存在により阻害され、血圧が上昇することが考えられる<sup>(28)-(29)</sup>。

本研究第Ⅱ章で行った患者対照研究は、対象者の平均年齢が11.6歳の小児であった。表5に示したように、対立遺伝子Argが肥満に関与するオッズ比は、2.49 (95%信頼区間1.66~3.73、 $p < 0.0001$ ) であり、有意な関連が認められた。参考として用いた、BMIを肥満の判定基準とした検討では、肥満群225人のうち、207人 (92.0%) がAt Risk of Overweightと (同、中央) と判定され、わが国の小児における標準体重の20%以上を肥満とする判定は、BMIを用いた判定基準のうちAt Risk of Overweightとよく合致していると考えられた。しかし、表4に見るように、対照群225人には、対立遺伝子Argをホモで有する者が2人 (0.9%)、ヘテロで有する者が52人 (23.1%) 存在した。以上の結果を合わせると、①いつ頃から本変異と肥満との関連が明らかになるか、より低年齢層で同様の解析を行う、②肥満の発症を修飾する、食事や運動習慣などの環境要因についても検討する、等の、さらなる研究が必要と考えられた。