1. 老化促進因子の発症機序の解明—ことに肥満, 成人型糖尿病の発症と行動異常とコレシストキニン (CCK)-A-レセプター遺伝子異常の関連

宮坂 京子¹⁾ 船越 顕博²⁾

〈要 約〉 肥満と糖尿病を自然発症するラットが, 遺伝子異常により CCK-A-受容体を発現しないことを発見した. 交配実験で, CCK-A 受容体欠損単独では20%, ODB-1遺伝子単独では18%, CCK-A 受容体欠損と ODB-1遺伝子の存在両方で35%に耐糖能異常が発生した. 以上の結果から CCK-A 受容体遺伝子異常は生活習慣病(老化促進因子)の原因遺伝子の一つであるという仮説を立てた. 研究計画は以下の3つからなる.

1) モデルラットの肥満, 糖尿病発症のメカニズムの解明. 2) CCK-A 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成と病態. 3) ヒトにおける CCK-A 受容体遺伝子発現異常の存在の確認. 結果: 1) 代謝実験から肥満の原因は過食であり, その原因のひとつとして, 情動異常(不安亢進)が関与している. 2) CCK-A 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成は完了し, 現在 F-2生育中. 3) ヒト胆石症胆嚢内 CCK-A 受容体遺伝子発現は有意に低下したが, genomic DNA Southern blotting では正常人, 胆石症, 糖尿病の間で制限酵素切断フラグメントに差がなかった. 胆石症100例中3例に CCK-A 受容体 short form mRNA が, 14例中9例にプロモーター領域の塩基置換がみられた. 結論: CCK-A 受容体遺伝子異常は老化促進因子となる可能性を提示した.

Key words: CCK-A 受容体, 生活習慣病, 肥満, 糖尿病, 胆石

(日老医誌 1999; 36: 90—94)

緒 言

動脈硬化, 血管壁の粥状硬化性病変の進展と増悪は, 脳血管障害の発生を増加する. 肥満, 高脂血症, 糖尿病などの存在は動脈硬化の発生母体となり, 寿命を縮める要因ともなる. 糖尿病はじめ, 生活習慣病といわれるものは, 本人の素質と環境因子との両方の兼ね合いがあって発症することが多く, 時として, 治療に抵抗性を示すこともある一方で, 単一の原因遺伝子というものは, まだ同定されていない. 我々は, 最近, 肥満, 高脂血症, 高血糖→糖尿病を自然発症するラットが, 遺伝子異常によりコレシストキニン (CCK)-A 受容体を全く発現しないことを発見した. CCK は消化管ホルモンとして, また神経伝達物質として生体内に広く分布し, 多彩な生物活性をもつ. 十二指腸に存在する CCK は強力な胆嚢収縮, 膵内外分泌刺激ホルモンとして働き, 膵臓に対し栄養効果を持つ. 一方, CCK には CCK-A, -B 受容体があ

り, CCK-A 受容体は膵, 胆嚢, 中枢神経系の一部に存在し, 7回膜貫通, G 蛋白共役型の一連の受容体と類似の構造を有している¹⁾. ラット胎児膵では CCK-A 受容体遺伝子の発現は認められないが, CCK-B 受容体は発現している. しかし, 離乳後は逆に CCK-A 受容体が発現し, CCK-B 受容体は消失してくる²⁾. 我々は糖尿病 (NIDDM) 実験動物モデルとして開発された OLETF ラット³⁾が CCK-A 受容体遺伝子発現欠損動物であることを発見した^{2,4)}. また, このラットは CCK-B 受容体の発現は膵と膵臓では正常であった^{2,5)}. 更に詳細に CCK-A 受容体遺伝子構造の解析を行なった結果, プロモーター領域よりエクソン2までの約6.8kb に渡って欠失変異を起こしていることを見いだした⁶⁾. この変異は, 14番常染色体上にある本遺伝子にホモ接合 (-/-) で起こっていた. CCK-A 受容体欠損ラットと正常ラットとを交配して F1 をえ, さらにヘテロ同士をかけあわせると, メンデルの法則にしたがって, 正常, ヘテロ, CCK-A 受容体欠損の3群が, 1:2:1の割合で生まれてくる. この F2 について遺伝子型と耐糖能異常の有無とをつきあわせてみると, CCK-A 受容体欠損では, 正常あるいはヘテロに比較し, 3,4倍の高率で糖尿病になっていることを発見した. 以上の結果から, CCK-A 受容体欠損という病態は, 糖尿病の直接の原因ではないけれども

Mechanism of aging: Obesity, non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) and abnormal behavior, and CCK-A receptor gene abnormality

Kyoko Miyasaka: 東京都老人総合研究所臨床生理部門
Akihiro Funakoshi: 国立病院九州がんセンター消化器部

(CCK-A 受容体欠損動物全部が糖尿病になるわけではないので), 過食, 肥満, 糖尿病発症を促進しているのではないか, という仮説をたてた. 先天的 CCK-A 受容体欠落は CCK-B 受容体ノックアウトマウス⁷⁾と同様致死的ではなく, ヒトにおいても同様の遺伝子異常が存在することが考えられる.

以上の事実から, 以下の3つからなる研究計画をたてた. 1) 動物実験による肥満, 高脂血症, 高血糖→糖尿病発症のメカニズムの解明. 2) CCK-A 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成とその病態の検討. 3) ヒトにおける CCK-A 受容体遺伝子発現異常の存在の確認.

方 法

1. 動物モデルによる肥満, 高脂血症, 高血糖→糖尿病発症のメカニズムの解明.

1) 肥満の原因がどこにあるか, エネルギーバランスを測定する.

2) 過食の原因として, 中枢神経系の異常, 行動, 情動異常の有無をしらべる.

3) 消化器系機能, 小腸, 胃分泌, 胃排出速度を測定する.

4) CCK-A 受容体遺伝子欠損と X 染色体の肥満遺伝子 (ODB-1) との相互関係を交配実験からつきあわせる.

5) 腸管内腔からリンパ管への脂質の移送効率を直接測定してしらべる.

2. CCK-A 受容体の直接の関与を確認するためマウス CCK-A 受容体クローニングをおこなった⁸⁾. これをもとに CCK-A 受容体ノックアウトマウスを作成し, 病態を比較する.

3. ヒトにおける CCK-A 受容体遺伝子発現の異常

ヒト胆嚢は, CCK-A 受容体を豊富に有しており, 腹腔鏡下胆嚢摘出が簡便におこなわれるようになっているので, 基礎検討材料として第一選択とする.

1) 胆石症患者胆嚢と正常胆嚢における CCK-A 受容体遺伝子発現を比較する.

2) CCK-A 受容体蛋白の抗体を作り組織染色に用いる.

3) 肥満, 糖尿病症例における CCK-A 受容体遺伝子異常の有無の検討を genomic DNA southern blotting でしらべる.

4) プロモーター領域についてはクローニングによる sequence 法で塩基配列を調べた.

成 績

1. 動物モデルによる肥満, 高脂血症, 高血糖→糖尿病

図1 CCK-A 受容体欠損ラットと対照ラットの long term potentiation (LTP). CCK-A 受容体欠損ラットで低下している (n=4 for each group).

図2 Plus maze test の結果. CCK-A 受容体欠損ラットでは, free arm に滞在する時間が短い.

発症のメカニズムの解明.

1) エネルギーバランス

モデル動物にみられた肥満は, エネルギー摂取が消費をうまわっており, 過食が主原因であることがはっきりした⁹⁾¹⁰⁾.

2) 過食の原因を中枢神経系から探索すると, 八方放射状迷路での餌の取得成績が著明に悪く, 記憶のパロメーターである long term potentiation (LTP) の発生が低下していた (図1).

肥満ラットは, 9 週齢ではエネルギー消費が正常に日内変動するが, 24 週齢になると, 変動が消失して平坦になり, 光に対する視索上核の fos expression の発現が障害されていた⁹⁾¹⁰⁾.

Plus Maze による検討では, anxiety が亢進していた (図2).

しかし過食をおこすことでしられる NPY mRNA は正常であり、組織学および神経細胞培養でも異常を認めなかった。

3) 消化器系機能

胃酸分泌は亢進し、胃壁細胞の肥大増殖が認められた¹¹⁾。これは CCK-A 受容体欠損による CCK-B 受容体の過発現と考えられた。

胃排出速度は想像と異なり遅延していたが、少量のレセルピンの投与で正常化した。胃排出速度に関係すると思われる消化管ホルモンはすべて正常であり、胃における自律神経のバランス異常が原因のひとつと考えられた。

小腸膜酵素は肥満ラットで増加していた¹²⁾。

4) 交配実験により、CCK-A 受容体遺伝子異常と ODB-1 遺伝子異常の糖尿病発症に対する相互関係を seg-

regation で検討したところ、CCK-A 受容体欠損単独で約20%、ODB-1遺伝子の存在単独が約18%の頻度でそれぞれ耐糖能異常を生じさせた。CCK-A 受容体欠損と ODB-1 遺伝子の存在両方で、耐糖能異常は35% (有意) 発症した¹³⁾。

5) 脂肪の腸管からリンパ管への移送は正常ラットでは年齢変化しないが、肥満ラットでは18週以降で亢進していた (図3)。

2. CCK-A 受容体欠損マウスの作成

マウス CCK-A 受容体をクローニングした (図4) 1997 年秋にキメラマウスが誕生、現在 F2 の育成を行っている。

3. ヒトにおける CCK-A 受容体遺伝子異常の有無

1) 胆石症胆嚢内 CCK-A 受容体遺伝子発現は有意の低下を認めた ($33 \pm 5.2\%$)。

2) Genomic DNA を用いる Southern blotting では正常人、胆石症、糖尿病の間で制限酵素切断フラグメントに差を認めず、大きな遺伝子構造上の差異はないものと思われた。

3) 胆石症100例中3例に CCK-A 受容体 short form mRNA がみられ、alternative splicing 異常が示唆された。

4) CCK-A 受容体遺伝子のプロモーター領域の塩基配列解析を行い、ヒト・ゲノム・ライブラリ由来の DNA の塩基配列と比較した。胆石症患者14例中9例において2カ所の塩基置換を観察した。

図3 CCK-A 受容体欠損ラット脂肪の腸管からリンパ流への移送。18,19週齢で有意の亢進がみられる (SE bar は省略した)。

考 察

本年度研究ではまず、CCK-A 受容体遺伝子異常は他の遺伝子異常との複合異常により、糖尿病発症促進因子になりうることを明らかに出来た。肥満ラットの過食の

CCKAR遺伝子の構造比較

図4 ラット、ヒト、マウス CCK-A 受容体遺伝子

原因のひとつとして emotional factor が考えられるが、CCK-A 受容体の関わりの方の深さの程度については、今後 CCK-A, B 受容体ノックアウトマウスでの病態生理を比較検討することによって、明らかになる部分も多いと思う。

胆石症において量的に約 7 割減の有意の CCK-A 受容体遺伝子発現低下を認め、CCK-A 受容体機能低下による胆嚢収縮不良が胆石形成の一因である可能性が考えられた。しかし、白血球 DNA での、Genomic DNA を用いる Southern blotting では、正常人、胆石症、糖尿病患者の間で、制限酵素切断フラグメントに差を認めず、3 群間で大きな遺伝子構造上の差異はないものと思われた。しかし、3 例の症例で alternative splicing によると思われる、short form mRNA の発現をみたことは、本症例における遺伝子発現異常の存在を強く示唆する結果である。

ヒト胆石症における CCK-A 受容体遺伝子プロモーター領域の point mutation の存在と遺伝子発現、蛋白質量の発現との間に相関関係があるかどうか、point mutation の存在が直接の病因となっているのかどうか、が今後の一つの課題である。現在 CCK-A 受容体抗体を作成し得たので、Western blot による胆嚢内 CCK-A 受容体蛋白質量の測定を行い、point mutation、遺伝子発現量との比較検討を行いつつある。

胆嚢は組織の入手が比較的簡単であり、CCK-A 受容体が豊富であることから、遺伝子発現調節という方面からアプローチするのに適した材料であったが、臨床診断に結び付けていくためには、末梢血（白血球 DNA）での解析を行える方向にもっていきたい。胆石症のほか肥満、糖尿病患者の末梢血で、point mutation の存在を検索する予定である。

我々の報告をもとに、1996、7 年にアメリカからそれぞれ胆石、肥満糖尿病患者における、CCK-A 受容体の alternative splicing, missense variant の症例が数例ずつ報告された¹⁴⁾¹⁵⁾。これらが単に sporadic な変化にすぎないのか、病因と有意に結びついているのかは、大規模な疫学的調査を行わねばならない。今後更に、CCK-A 受容体遺伝子異常と生活習慣病発症促進との因果関係を詳細につめるため、正常対象者（40～70 歳台それぞれ男女各 25 名、計 200 名）、約 100 例糖尿病患者の血液採取より得られた末梢血 DNA を用い、プロモーター領域を含む、各エクソン部位の PCR（SSCP 法）によるヒトにおける構造異常を検索する予定である。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、東京都老人総合研究所

臨床生理部門研究室員、細胞認識部門：小林 悟研究員、栄養学部門：市川みね子研究助手、中枢神経部門：野本茂樹研究員、神経生物部門：新海 正研究員、横浜赤十字病院：林 洋博士、国立病院九州がんセンター臨床研究部：瀧口総一研究員、河野 彬主任研究員諸氏に研究協力を仰ぎました。深謝いたします。

文 献

- 1) Wank SA: Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol* 1995; 269: G628—G646.
- 2) Funakoshi A, Miyasaka K, Shinozaki H, Masao M, Kawanami T, Takata Y, et al.: An animal model of congenital defect of gene expression of cholecystokinin (CCK)-A receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 210: 787—796.
- 3) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T: Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. *Diabetes* 1992; 41: 1422—1428.
- 4) Funakoshi A, Miyasaka K, Jimi A, Kawanami T, Takata Y, Kono A: Little or no expression of the cholecystokinin-A receptor gene in the pancreas of diabetic rats (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty-OLETF rats). *Biochem Biophys Res Comm* 1994; 199: 482—488.
- 5) Miyasaka K, Kanai S, Ohta M, Kawanami T, Kono A, Funakoshi A: Lack of satiety effect of cholecystokinin (CCK) in a new rat model not expressing the CCK-A receptor gene. *Neurosci Lett* 1994; 180: 143—146.
- 6) Takiguchi S, Takata Y, Funakoshi A, Miyasaka K, Kataoka K, Fujimura Y, et al.: Disrupted cholecystokinin type-A receptor (CCK-AR) gene in OLETF rats. *Gene* 1997; 197: 169—175.
- 7) Nagata A, Ito M, Iwata N, Kuno J, Takano H, Minowa O, et al.: G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 11825—11830.
- 8) Takata Y, Takiguchi S, Kataoka K, Funakoshi A, Miyasaka K, Kono A: Mouse cholecystokinin type-A receptor gene: Alternative splice acceptor site in exon 2. *Gene* 1997; 187: 267—271.
- 9) Ichikawa M, Miyasaka K, Fujita Y, Shimazoe T, Funakoshi A: Disappearance of diurnal rhythm of energy expenditure in genetically diabetic obese rats. *Jpn J Physiol* 1998; 48: 211—214.
- 10) Yamanouchi S, Shimazoe T, Nagata S, Moriya T, Maetani M, Watanabe S, et al.: Decreased level of light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of diabetic rats. *Neurosci Lett* 1997; 227: 103—106.
- 11) Miyasaka K, Kanai S, Ohta M, Jimi A, Kono A, Funakoshi A: Overexpression of cholecystokinin (CCK)-B/gas-

- trin receptor gene in the stomach of naturally occurring CCK-A receptor gene knockout rats. *Digestion* 1998; 59: 26—32.
- 12) 船越顕博, 自見厚郎, 佐藤裕子, 太田 稔, 増田正雄, 金井節子ほか: インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) 発症モデル OLETF ラットに対する α -glucosidase inhibitor (voglibose) 長期投与の膵及び小腸酵素活性に及ぼす効果. *臨牀と研究* 1997; 74: 2940—2944.
- 13) Takiguchi S, Takata Y, Takahashi N, Kataoka K, Hirashima T, Kawano K, et al.: A disrupted cholecystokinin A receptor gene acted synergistically with ODB-1 gene to diabetic in obese rats. *Am J Physiol* 1998; 274: E 265—270.
- 14) Miller L, Holicky JE, Ulrich CD, Wieben ED: Abnormal processing of the human cholecystokinin receptor gene in association with gallstones and obesity. *Gastroenterology* 1995; 109: 1375—1380.
- 15) Inoue H, Iannotti CA, Welling CM, Veile R, Dons-Keller H, Permutt MA: Human cholecystokinin type A receptor gene: cytogenetic localization, physical mapping, and identification of two missense variants in patients with obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Genomics* 1997; 42: 331—335.
-