

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K09058

研究課題名(和文) 遺伝子損傷の防御と修復に関するDNAメチル化に着目した身体活動とがんのコホート研究

研究課題名(英文) A cohort study of physical activity and cancer focusing on DNA methylation related to protection and repair of gene damage

研究代表者

原 めぐみ (Hara, Megumi)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：90336115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子損傷の防御と修復の観点から、がん罹患関連要因をコホート研究で検討した。身体活動は抗酸化酵素MnSODの遺伝子プロモーター領域のメチル化に関連する事、身体活動と尿中の遺伝子損傷マーカーの関連がMnSOD Val16Ala多型で異なる事、さらに本多型は乳がんリスクの上昇に関連し、肥満と相乗的なリスクの上昇を示すことを明らかにした。一方、遺伝子修復酵素であるhOGG1遺伝子での関連は明らかでなかった。本研究成果より、MnSOD Val16Ala多型A/A型保有者は、身体活動などを通じて肥満を抑制することが効果的な乳がん予防につながる可能性を示唆するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、遺伝子損傷防御に関連する遺伝子多型と生活習慣ががん罹患に相乗的な影響を及ぼすことが明らかとなった。体質に応じた効果的な疾病予防のための生活習慣の改善を提案することの意義を示した。

研究成果の概要(英文)：In terms of protection and repair of gene damage, cancer morbidity-related factors were investigated in a cohort study. The following points were clarified. Physical activity was related to methylation of the gene-promoter regions of the antioxidant enzymes MnSOD. The association between physical activity and genetic damage markers in urine differed in MnSOD Val16Ala polymorphisms. This polymorphism was associated with an elevated risk of breast cancer and showed a synergistic elevated risk with obesity. In contrast, the relation in hOGG1 gene which was the gene repairing enzyme was not clear. This study indicated that MnSOD Val16Ala polymorphism A/A type carrier might lead to the effective breast cancer prevention by suppressing the obesity through physical activity.

研究分野：予防医学

キーワード：遺伝子多型 抗酸化 遺伝子修復

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種による遺伝子損傷は加齢とともに増加し、がんをはじめとする生活習慣病を惹起する事が知られている。近年、環境要因による遺伝子のメチル化が遺伝子発現を制御し、疾病の発生に寄与することが解明されてきている。疫学研究では身体活動量の増加が種々のがん(結腸がん、乳がん、子宮内膜がんなど)の発症に予防的に働くことが報告されているが、その生物学的なメカニズムのひとつとして、遺伝子のメチル化に身体活動が関与することが考えられる。

我々は、日本多施設共同コホート (Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study, J-MICC Study) の一環として、佐賀市民約 12,000 人からなる遺伝子解析可能なコホート研究を開始し、2005 年から 2007 年にベースライン調査[1]を、2010 年から 2012 年に 5 年後調査[2]を、2015 年末より 10 年後調査を実施した。

本コホート研究では、身体活動量の評価に加速度計(ライフコーダー)を全員に使用しており、正確性の高い測定結果を元に強度や量別の検討が可能となっている。これまでに、身体活動量の増加が CRP と炎症性サイトカイン (IL-6, IL-15, TNF-) の低下と関連していることを明らかにした[3]他、遺伝子損傷マーカーと負の関連も見出した[4]。特に女性では強度によらず身体活動量の増加によって尿中の遺伝子損傷マーカー (8-OHdG) が低下するのに対し、男性では中強度以上の身体活動量の増加によってのみ低下したことから、遺伝子損傷と修復における身体活動の関与に男女差があることが示唆された。

一方、身体活動と遺伝子のメチル化の関連においては、遺伝子損傷は、遺伝子修復酵素により修復されることから、加齢や身体活動の低下によって、塩基除去修復酵素である hOGG1 の遺伝子のプロモーター領域の CpG island が高メチル化をきたし、hOGG1 遺伝子の発現抑制によって遺伝子修復能の低下をもたらすと仮説を立てたが、むしろ、加齢や身体活動の低下は hOGG1 の遺伝子の低メチル化と関連することを見出し (Hara, et al. The 26th Annual Scientific Meeting of Japan Epidemiological Association にて発表予定) hOGG1 に関しては、遺伝子損傷によってメチル化状態が変化することが示唆された。

したがって、身体活動と遺伝子損傷の関連を総合的に評価するためには、活性酸素種による遺伝子損傷を防御する内因性の抗酸化酵素と遺伝子損傷を修復する酵素の両方に、同時に着目した検討が必要であると考えられる。抗酸化酵素遺伝子の一つである ec-SOD は、ヒトの末梢血に発現し、プロモーター領域の高メチル化により発現が抑制されることが報告されているため[5]、今回、候補遺伝子として検討することにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子損傷の抗酸化防御と修復に関与する遺伝子のメチル化の関与を評価するために、以下の検討を行うことである。

- (1) ベースライン調査のデータに基づく横断研究により、身体活動量と末梢血 DNA メチル化 (ec-SOD や hOGG1 などの候補遺伝子) や遺伝子損傷マーカーである尿中 8-OHdG 濃度の関連を検討する
- (2) ベースライン調査と 5 年後調査に基づく縦断研究により、身体活動量の 5 年間の変化と候補遺伝子のメチル化の変化との関連を検討する。
- (3) コホート研究により、遺伝子損傷と防御に関連する遺伝子多型と身体活動量が 10 年間のがん罹患への影響について評価する。

3. 研究の方法

(1) コホートの追跡とがん罹患の把握

佐賀市民約 12,000 人のコホート研究のベースライン調査、5 年後調査に加え、本研究期間に 10 年後の健康調査を郵送にて実施した。自己申告のがん罹患のあったものについては医療機関でカルテを閲覧し、診断名と診断年月日を確認した。さらに追跡期間中に死亡した例については死亡小票の閲覧により死因を確認し、がんについての記載のある者については医療機関で遡り調査を行い、がん罹患情報(診断、診断年月日)を把握し、10 年間のがん罹患との関連の解析が可能なデータベースを確立した。

(2) 末梢血 DNA メチル化の測定

DNA のメチル化解析の最初のステップとしてベースライン調査と 5 年調査から、それぞれ 576 検体ずつを用いて、バイファルサイト処理(メチル化シトシンは変換されず、非メチル化シトシンのみがウラシルに変換される)を行った。メチル化率が既知のコントロール DNA サンプル(0%, 25%, 50%, 75%, 100%)を用いて ec-SOD 遺伝子プロモーター領域のメチル化レベルを、最適化された方法で測定した結果、コントロール DNA サンプルのメチル化率と実際に測定されたメチル化率の関係は直線的でありかつ非常に高い相関が得られ ($r^2 > 0.99$) た。MassARRAY システムを

用いた測定方法を確立し、10 か所の DNA 領域のメチル化レベルを正確に評価することが可能となった。同様の方法で、OGG1 遺伝子プロモーター部位の 9 か所の DNA 領域の平均メチル化割合も測定した。

(3) ec-SOD の遺伝子多型の測定

2017 年度までの検討において SOD 遺伝子のメチル化と遺伝子多型と同時に検討することで、身体活動と抗酸化の関連について、より多くの知見が得られると考え、SOD の中でも、全身に発現し、かつ、最もよく研究されている MnSOD Val16Ala 多型についてジェノタイピングを行った。

4. 研究成果

(1) 末梢血 DNA メチル化 (ec-SOD や hOGG1 遺伝子などの候補遺伝子) と身体活動の関連

ベースライン調査 2295 検体における、*ec-SOD* 遺伝子プロモーター部位の 10 か所の DNA 領域の平均メチル化割合は、それぞれ、58.9%、48.5%、45.3%、31.2%、40.9%、29.0%、41.3%、47.1%、50.1%、26.9%であった。5 年後調査の 1632 検体の同部位の 10 か所の DNA 領域の平均メチル化割合は、それぞれ、57.8%、47.5%、43.9%、29.6%、39.4%、28.3%、40.3%、45.9%、49.3%、25.6%であった。SOD 遺伝子プロモーター部位の 9 か所すべてにおいて身体活動とメチル化は負の関連がみられ、身体活動によってメチル化が低く保たれ抗酸化遺伝子が発現する可能性が示唆された。

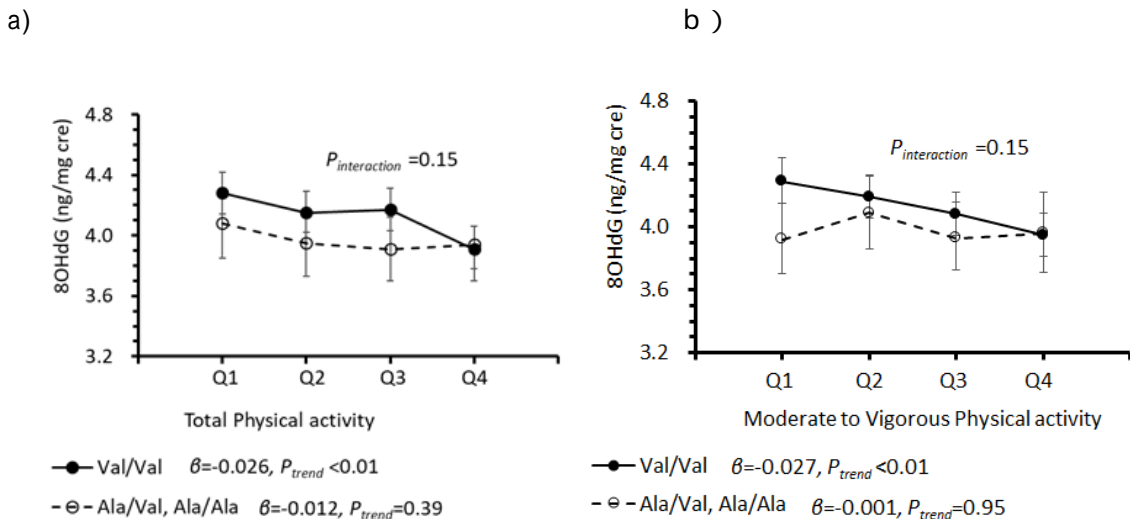
一方、hOGG1 遺伝子プロモーター部位の 9 か所の DNA 領域の平均メチル化割合は、ベースライン調査では、0.7~2.2%、5 年後調査では、0.5%~3.0%と極めて低く保たれており、身体活動との有意な関連は認められなかった。

(2) SOD 遺伝子多型と身体活動による遺伝子損傷防御

MnSOD Val16Ala 多型についてジェノタイピングを行ったところ、CC: n=194 [1.6%]、CT: n=2613 [21.7%]、TT: 9224 [76.7%]であった。今回測定した C アレルの頻度は 12.5%であり、East Asian の C アレル頻度と一致していた。ミトコンドリアでの活性酸素の運搬能力が低い Val/Val 型(低活性型)では、Ala 型保有者に比べて遺伝子損傷マーカーである尿中 8OHdG 濃度が高いが、身体活動と尿中の遺伝子損傷マーカーには統計学的に負の関連が認められた。一方、Ala/Val 型、Ala/Ala 型では認められなかった(図 1)。

Val 型は Ala 型に比べて抗酸化能が低く、一過性の高強度の運動に対しては酵素活性を上昇させにくい、長期間にわたる運動や、習慣的な身体活動によって抗酸化能が Ala 型保有者と同程度まで改善できることが期待される。抗酸化酵素の活性の低い遺伝子型であっても、身体活動を増加することで、抗酸化酵素の活性の高い遺伝子型と同程度の遺伝子損傷抑制が期待できる可能性が示唆された。

図 1 SOD2 遺伝子多型、身体活動 4 分位別の尿中 8-OHdG(ng/mL Cr)



総身体活動(a)および中高強度の身体活動(b)の 4 分位ごとに、性、年齢、喫煙、飲酒、総エネルギー摂取、BMI で補正した尿中 8-OHdG(ng/mL Cr)調整幾何平均

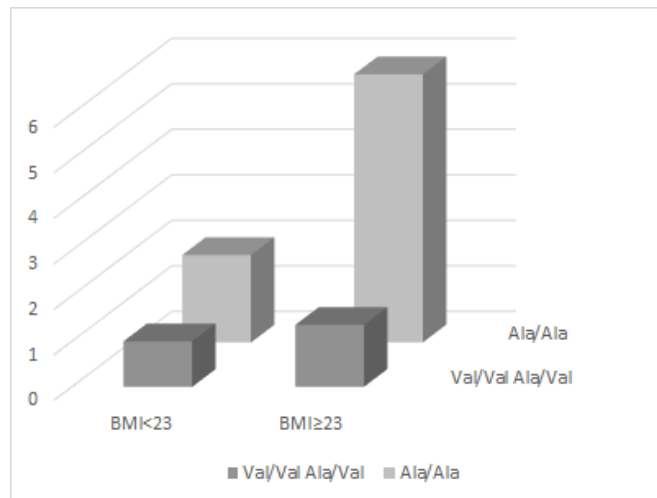
(3) コーホート研究による 10 年間のがん罹患の関連

ベースライン調査時点でがんの既往のない 11,479 人、平均追跡期間 8.65 年 (SD:1.5 年) から、964 人の新規がん罹患を、女性 6616 人、平均追跡期間 8.72 年 (SD:1.4 年) から 129 例の新規乳がんの罹患を登録した。

MnSOD Val16Ala 多型によって、身体活動と尿中の遺伝子損傷マーカーの関連が異なることが明らかとなっており、この多型ががん罹患にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。Val/Val 型（低活性型）は抗酸化能が低いことから、がん罹患リスクが高いことが推測されるが、これまでの疫学研究では結果は一貫していない。そこで、本研究対象集団において MnSOD Val16Ala 多型ごとにがん罹患リスクを評価したところ、全がんの罹患率(1000人年あたり)は、Val/Val 型、Ala/Val 型、Ala/Ala 型において、それぞれ 9.89, 8.94, 11.53、乳がん罹患率(1000人年あたり)は、それぞれ、2.25, 1.85, 6.25 であった。予想に反してミトコンドリアでの活性酸素の運搬能力が高い Ala/Ala 型で乳がん罹患リスクが高いことを示す結果となっていた。

MnSOD Val16Ala 多型に加え、年齢や肥満、エネルギー摂取、加速度計で測定した身体活動や生活習慣とがん罹患の関連について Cox 比例ハザードモデルを用いて解析した。多変量解析の結果 Ala/Ala 型は Ala/Val、Val/Val 型に比べて、乳がんリスクが 3.06 (95%信頼区間: 1.35-6.94) 倍、BMI23 以上は 23 未満に比べて 1.41 (1.00-2.01) 倍高かった。一方、身体活動による乳がんリスクの関連は明らかでなかった。BMI と MnSOD Val16Ala 多型は乳がんリスクにおいて統計学的に有意な交互作用は検出されなかったが、Val/Val 型、Ala/Val 型でかつ BMI23 未満の者の乳がんリスクを 1 とすると、Val/Val 型、Ala/Val 型で BMI23 以上の者、Ala/Ala 型で BMI23 未満の者、Ala/Ala 型で BMI23 以上の者の乳がんリスクは、それぞれ、1.36 (95%信頼区間: 0.95-1.96)、1.92 (95%信頼区間: 0.47-7.85)、5.89 (95%信頼区間: 2.14-16.25) であり、相乗的なリスクの上昇がみられた。このことは、Ala/Ala 型保有者では肥満を抑制することが乳がん予防につながる可能性を示唆するものと考えられた。

図 2 乳がん罹患に対する MnSOD 遺伝子多型と肥満の相乗効果（ハザード比）



< 引用文献 >

1. Hara, M., et al., *Factors influencing participation rate in a baseline survey of a genetic cohort in Japan*. J Epidemiol, 2010. **20**(1): p. 40-5.
2. Hara, M., et al., *Factors associated with non-participation in a face-to-face second survey conducted 5 years after the baseline survey*. J Epidemiol, 2015. **25**(2): p. 117-25.
3. Nishida, Y., et al., *Objectively measured physical activity and inflammatory cytokine levels in middle-aged Japanese people*. Prev Med, 2014. **64**: p. 81-7.
4. Hara, M., et al., *Intensity-specific effect of physical activity on urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in middle-aged Japanese*. Cancer Sci, 2016. **107**(11): p. 1653-1659.
5. Kamiya, T., et al., *Epigenetic regulation of extracellular-superoxide dismutase in human monocytes*. Free Radic Biol Med, 2013. **61**: p. 197-205.

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 Hara M, Tachiya T, Sutodh T, et al	4. 巻 50
2. 論文標題 Genomewide Association Study of Leisure-Time Exercise Behavior in Japanese Adults	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine & Science in Sports & Exercise	6. 最初と最後の頁 2433 ~ 2441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1249/MSS.0000000000001712	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原めぐみ、島ノ江千里、西田裕一郎、田中恵太郎
2. 発表標題 郵送法による10年後のコーホート追跡調査への回答 と関連する要因：J-MICC Study 佐賀地区
3. 学会等名 第29回 日本疫学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原めぐみ、八谷剛史、西田裕一郎、島ノ江千里、清水厚志、田中恵太郎
2. 発表標題 日本人成人の余暇時間の運動に関するGWAS研究：J-MICC Study
3. 学会等名 第28回日本疫学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hara M, Nishida Y, Fuku N, Shimanoe C, Nanri H, Taguchi N, Kawai K, Li YS, Kasai H, Higaki Y, Tanaka K.
2. 発表標題 Mitochondrial haplogroups modify the effect of physical activity on urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in middle-aged Japanese subjects
3. 学会等名 The 21st International Epidemiology Association (IEA) ,World Congress of Epidemiology (WCE2017). (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐賀大学医学部社会医学講座予防医学分野
http://www.prevent.med.saga-u.ac.jp/

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	田中 恵太郎 (Tanaka Keitaro) (50217022)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	西田 裕一郎 (Nishida Yuichiro) (50530185)	佐賀大学・医学部・講師 (17201)	
研究分担者	島ノ江 千里 (Chisato Shimano) (10734064)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

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
---------	---------