

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月24日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770267

研究課題名（和文）：葉酸摂取量から診た食習慣が及ぼすホモシステイン・動脈硬化への生理的多型生の検討

研究課題名（英文）：The association among folate intakes, homocysteine and atherosclerosis.

研究代表者

中里 未央（NAKAZATO MIO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00380973

研究成果の概要（和文）：

ホモシステイン、葉酸、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）C677T 遺伝子多型、動脈硬化の指標を人口規模の違う3つの離島で測定・解析した。葉酸はホモシステインと逆相関したが、ホモシステインおよび葉酸は動脈硬化の指標とは関連しなかった。地域別に解析すると、人口規模が小さいほどホモシステインが有意に低値となったが、血清葉酸と赤血球中葉酸の値は乖離していた。ホモシステインはMTHFR 遺伝子多型や葉酸摂取以外の環境因子からも影響を受ける可能性および血清葉酸よりも赤血球中葉酸の方が葉酸状態を評価するのに適していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

This study was investigated the association among homocysteine, folate, methylene-tetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, and clinical evaluations of atherosclerosis on three remote islands with different populations. Although homocysteine reversely correlated to folate, homocysteine or folate were not correlate to clinical evaluations of atherosclerosis. The homocysteine has lower values in island with less population, and it has divergence among homocysteine, serum folate and erythrocyte folate values. They are suggested that homocysteine were affected by environmental factors excluding MTHFR gene polymorphism or folate intake, and erythrocyte folate was better than serum folate as indicator of folate status.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・応用人類学

キーワード：葉酸、動脈硬化、頸動脈内中膜複合体厚、心臓足首血管指数、ホモシステイン、離島、へき地

1. 研究開始当初の背景

高齢化の進む島嶼地区においては、要介護者発生の予防が重要な課題である。要介護者の介護が必要になった原因としては、脳血管疾患が最も多い。そして、脳血管疾患や認知

症、心臓病の重要な原因として動脈硬化が広く知られている。また、近年独立した動脈硬化危険因子としてホモシステインが注目されており、ホモシステインと脳卒中(Juan P Casas et.al, Lancet. 2005 Jan 15-21;365(9455):224-32.)や

ホモシステインと認知症およびアルツハイマー病(Marisa I Ramons et.al, Am J Clin Nutr. 2005 Dec;82(6):1346-52)、ホモシステインと骨粗鬆症(Sudha Seshadri et.al, N Engl J Med. 2002 Feb 14;346(7):476-83)との関連も報告されている。ホモシステインは、メチオニンがホモシスチンに代謝される時にできるアミノ酸であり、その代謝にはビタミン B6、ビタミン B12、葉酸と、代謝酵素であるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)が関与している。

この MTHFR 遺伝子には C677T 変異による遺伝子多型があり、変異により耐熱性の低下および酵素活性の低下を認め、血中ホモシステイン濃度の上昇から動脈硬化を引き起こす可能性があると考えられている。そして、遺伝子多型間の血中ホモシステイン濃度差は、葉酸欠乏下でより顕著になる可能性が示唆されており、またどの遺伝子多型であっても十分な葉酸を摂取することにより血中ホモシステインが低下するとされている。

我々は以前に、人口規模の小さい小離島、比較的人口の多い大離島、そして本土地区で動脈硬化調査を行った(H18年~19年萌芽研究「動脈硬化と栄養素の関連解明を目指した島嶼地区モデルの開拓」課題番号:18650217)。年齢・性別を調整した血中ホモシステイン濃度は、居住地域の人口規模が小さいほど、優位に高い値となっており、MTHFR 遺伝子多型 CC+CT 群(通常活性型)と TT 群(活性低下型)のどちらでも同様に居住地域により差を認めた。さらに、人口規模が小さいほど、CC+CT 群と TT 群の差が大きかった。一方、MTHFR 遺伝子多型頻度は居住地域では差を認めなかった。これらの結果より、人口規模の小さな島嶼部では、MTHFR 遺伝子多型による影響をより大きくするような環境因子の存在が示唆された。つまり、遺伝的背景の同じ機能的潜在性を持つ集団が、居住人口規模という環境からの異なるストレスにより、血中ホモシステイン濃度の差という生理的多型性がもたらされたと考えられた。この原因の一つは、これまでの報告より食事からの葉酸等の摂取状況に差があるためではないかと推察された。人口規模の小さい小離島では、生鮮食料品の小売店がほとんど無く、食習慣も大きく異なっている可能性が高いと考えられるが、離島の食習慣や栄養学的データは皆無であった。そこで、我々は小離島で栄養調査を実施したが、人口規模が小さいため例数が限られ、高齢者が多く調査票への記入が困難な場合があり、葉酸などの微量の栄養素は少しの差でも大きく値が変わるため、十分なデータを得ることは困難であった。次に血中葉酸を検討したが、血中葉酸は直前の食事に影響され大きく変動することが予想された。そこで、3-4ヶ

月の平均の葉酸摂取を反映するとされる赤血球中葉酸を測定することで、離島住民の食習慣を推測することが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

人口規模の違う離島の住民における、赤血球中葉酸濃度を測定することにより、離島間の食習慣の差が有るかどうかを検討する。同時にホモシステイン、動脈硬化指標等を測定し、MTHFR C677T 遺伝子多型を解析することにより、葉酸やホモシステイン、動脈硬化、遺伝子多型間の関連を解明する。

3. 研究の方法

この調査は、長崎大学のゲノム倫理委員会の承認を得ており(第090528160号)、ヘルシンキ宣言に則っている。市と協力し、住民基本健診の参加者を対象とした。研究協力者より文書による同意を得た後に、生活習慣や既往歴のアンケート調査、血液サンプル等を取得し、動脈硬化の指標を測定した。

取得した血液サンプルからは、血液算定検査、一般的な生化学的検査、血糖・HbA1cを測定し、さらに血漿より高速液体クロマトグラフィーを用いてホモシステイン血中濃度(Hcy)を測定した。葉酸は採取後速やかにACCESS葉酸溶血試薬を加えたEDTA全血サンプル、および遠心分離した血清サンプルを-30°Cに保存した後、検査業者であるSRL Inc.にて測定を行った。また血球成分よりDNAを抽出(QuickGene-810, FUJI FIRM, JAPAN)した後、real-time PCR(LightCycler 1.5®, Roche Diagnostics Japan, Japan)によりMTHFR C677T 遺伝子多型を解析した。

動脈硬化の指標としては、心臓足首血管指数(Cardio-Ankle Vascular Index: CAVI)と頸動脈エコーによる頸動脈内中膜複合体厚(Carotid Intima-media Thickness: CIMT)を測定した。CAVIは脈波伝搬速度を基に、さらに検査時の血圧の影響を受けにくくし再現性を高めたものであり、心臓から足首までの動脈のStiffnessを数値化して表しており、高値であるほど動脈硬化が進んでいると考えられている。今回の調査では、Vasera VSS-10®(Fukuda Denshi, Japan)を用いて臥位にて安静の後に測定し、左右のCAVIの平均値を解析に供した。

CIMTは総頸動脈をエコー(Logiq Book®, GE Mediacal Systems, USA)で10MHzのリニア型プローブを用いて描出し、得られた画像を専用の解析ソフトウェア(Intima Scope®, MEDIA CROSS, Japan)を用いて計測した。解析には左右のCIMTの平均値を用いた。

統計解析には、PASW Statistics18(IBM, USA)を用いた。

4. 研究成果

研究協力者434人(女257人、男175人)について解析した(表1)。

表 1

	女 (n=257)	男 (n=175)	全体
年齢	70.0±9.4	69.9±10.3	69.9±9.8
Hcy*	7.3±3.3	9.1±5.7	8.0±4.6
血清葉酸*	6.7±3.0	5.1±2.3	6.1±2.8
赤血球中葉酸*	230±68	215±56	224±64
CAVI*	8.2±1.2	8.6±1.6	8.3±1.4
CIMT*	0.73±0.13	0.78±0.14	0.75±0.20

平均 ± 標準偏差

単位：年齢(y)、Hcy ($\mu\text{mol/L}$)、血清葉酸 (ng/mL)、赤血球中葉酸 (ng/mL)、CAVI (なし)、CIMT (mm)* 男女差, $p < 0.05$, t 検定

男性と女性を比較すると、年齢に男女差は認めなかったが、ホモシステイン、CAVI、CIMT は有意に男性が高値であり、血清葉酸、赤血球中葉酸においては有意に女性が高値であった。

次に、Hcy、血清葉酸、赤血球中葉酸、CAVI、CIMT と相関する因子を解析した。Hcy は年齢、腹囲、クレアチニン、尿酸値、中性脂肪、HbA1c、CIMT、血清葉酸、赤血球中葉酸と有意な正の相関を認め、HDL-コレステロールと有意な負の相関を認めた。血清葉酸は HDL-コレステロール、赤血球中葉酸と有意な正の相関を認め、クレアチニン、尿酸、Hcy と有意な負の相関を認めた。赤血球中葉酸は HbA1c、血清葉酸と有意な正の相関を認め、Hcy と有意な負の相関を認めた。CAVI は年齢、収縮期血圧、脈圧、クレアチニン、HbA1c、CIMT と有意な正の相関を認めた。CIMT は年齢、腹囲、BMI、収縮期血圧、脈圧、クレアチニン、HbA1c、CAVI、Hcy と有意な正の相関を認めた。Hcy と血清葉酸 ($r = -0.171$, $p < 0.001$)、赤血球中葉酸 ($r = -0.173$, $p < 0.001$) は同程度逆相関しており、また血清葉酸と赤血球中葉酸の間にも強い相関を認めた ($r = 0.652$, $p < 0.001$)。そして、Hcy は CIMT と相関するものの、葉酸とは CIMT および CAVI と相関しなかった。

これまでの Hcy と葉酸が逆相関すること、女性よりも男性の Hcy が高値であることの報告と、今回の調査結果は合致していた。また、血清葉酸および赤血球中葉酸のどちらも女性が高いため、Hcy の男女差はこの葉酸の血中濃度が原因である可能性が示唆された。さらに、この葉酸の男女差は、緑黄色野菜の摂取量などの男女の食習慣の違いがあるためかもしれない。そして、葉酸血中濃度は Hcy と逆相関するものの、動脈硬化の指標に関連しないとするのは、近年の葉酸サプリメントの投与は Hcy を低下させるが、動脈硬化疾患発症の予防に寄与しないとする大規模調査の結果 (Lonn E. et al, N Engl J Med.

354:1567-1577, 2006) を支持するものと考えられた。

また、動脈硬化の指標である CAVI と CIMT はお互いに有意に相関し、また年齢、収縮期血圧、脈圧、クレアチニン、HbA1c といった、これまで報告されている動脈硬化の危険因子と有意に相関していた。しかし、LDL-コレステロールや HDL-コレステロール、中性脂肪といった血清脂質とは相関せず、理由については検討を要すると考えられた。

次に MTHFR C677T 遺伝子多型について解析を行った (表 2)。

表 2

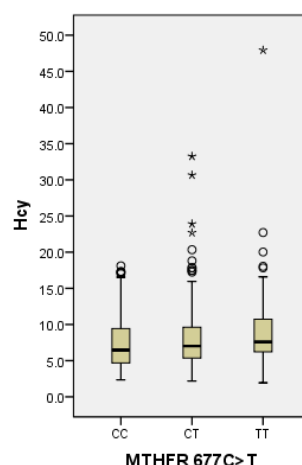
MTHFR	CC (n=184)	CT (n=190)	TT (n=60)
Hcy*	7.5±3.6	8.2±4.6	9.5±6.6
血清葉酸*	6.5±2.7	6.0±3.0	5.1±2.5
赤血球中葉酸*	228±62	225±67	209±58
CAVI	8.3±1.3	8.4±1.3	8.4±1.6
CIMT	0.75±0.14	0.74±0.13	0.75±0.14

平均 ± 標準偏差

* $p < 0.05$, 分散分析

MTHFR C677T 遺伝子多型間においては、Hcy、血清葉酸、赤血球中葉酸に有意差を認めたものの CAVI、CIMT には差を認めなかった。さらに、有意差を認めた Hcy について多重比較を行った所、CC と CT 間、CT と TT 間には有意差を認めないが、CC と TT 間に有意差 ($p = 0.009$, Bonferroni の検定) を認めた。これまでの報告および以前の我々の報告では、CT と TT 間にも有意差を認めているが、今回の調査では有意差を認めなかった。CC に比べて CT や TT 群では、標準偏差が大きくばらつきが大きかった (図 1)。

図 1



実際に箱ひげ図にプロットしてみると、CT 群では、外れ値 (丸印) と極値 (星印) が多く、このために有意差が出なかった可能性があると考えられた。

血清葉酸と赤血球中葉酸の多重比較では、血清葉酸では CC と TT 間に有意さを認めたが、赤血球中葉酸では遺伝子多型間で有意差を認めなかった。これらの結果より、MTHFR 遺伝子多型

は葉酸の血中濃度に影響を与える可能性がある。A. Chango らの報告 (Br J Nutr. 2000 84(6):891-6) によると、MTHFR C677T 遺伝子多型解析において、TT型は有意にHcyが高く、赤血球中葉酸は有意にCC、CT、TTの順に値が低くなっていたが、血清葉酸は同様の傾向を認めたものの有意差は無かった。考察では、MTHFRの熱不安定性が葉酸濃度の低下に関連するとされている。今回の調査でもほぼ同様の結果となったと考えられた。

最後に、地域差を検討した (表3)。

表3-a 全体

	約40,000人の離島	約3,000人の離島	約500人の離島
数	63	279	92
年齢	70.0±10.6	70.0±9.6	70.7±10.1
MTHFR	29/23/11	117/124/38	38/43/11
Hcy*	10.1±3.7	8.1±4.8	6.4±3.7
血清葉酸*	5.5±2.1	6.4±3.0	5.5±2.7
赤血球中葉酸*	240±82	218±58	229±6.8
CAVI	8.4±1.3	8.3±1.4	8.2±1.3
CIMT	0.75±0.12	0.75±1.4	0.74±1.2

*p<0.05

表3-b 女性

	約40,000人の離島	約3,000人の離島	約500人の離島
数	45	153	59
年齢	69.1±10.0	69.4±9.4	72.2±8.9
MTHFR	20/18/7	65/67/21	29/26/4
Hcy*	9.6±3.1	7.2±3.1	5.8±3.1
血清葉酸*	5.5±2.0	7.3±3.3	6.3±2.8
赤血球中葉酸	234±82	225±64	237±68
CAVI	8.3±1.2	8.2±1.1	8.0±1.2
CIMT	0.73±0.11	0.73±0.14	0.73±0.11

*p<0.05

表3-b 男性

	約40,000人の離島	約3,000人の離島	約500人の離島
数	18	126	33
年齢	71.1±12.2	70.2±9.7	68.0±11.6
MTHFR	9/5/4	52/57/17	9/17/7
Hcy*	11.5±4.7	9.2±6.2	7.6±4.4
血清葉酸*	5.7±2.5	5.4±2.4	3.9±1.3
赤血球中葉酸*	255±81	210±49	215±57
CAVI	8.8±1.5	8.6±1.6	8.4±1.5
CIMT	0.81±0.13	0.78±0.14	0.74±0.13

*p<0.05

3つの地域間には、年齢やMTHFR遺伝子多型の頻度に有意差は認めなかった。しかし、Hcyは人口規模が小さいほど有意に低値となった。さらに、血清葉酸と赤血球中葉酸にお

いては、人口規模の大きな離島では血清葉酸が低いにもかかわらず、赤血球中葉酸は戦いと

いう乖離が認められた。以前の我々の調査で (H18年~19年萌芽研究「動脈硬化と栄養素の関連解明を目指した島嶼地区モデルの開拓」課題番号:18650217) においては、人口規模の小さな小離島ほどHcyが有意に高いという、今回の調査とは逆の結果を報告した。以前のデータは、小離島は2月、大離島と本土は6~8月と調査の季節が違ふ事も、地域差を認めた原因の一つと考えられる。しかし、今回の調査は3地域とも4月下旬~6月上旬とほぼ同じ季節に行われているにもかかわらず、前回の調査とは完全に結果が逆転している。

これらからは、Hcyや血清葉酸は、その時のメチオニンや葉酸摂取によって大きな影響を受けており、値の変動が大きいことが予想される。そのため、旬の野菜といった生鮮食品の供給状況などにより、容易に変動すると考えられる。また、全体の相関で見るとHcyと血清葉酸および赤血球中葉酸は逆相関するが、各地域のHcyと血清葉酸および赤血球中葉酸の値は、逆相関とは一致しなかった。このことは、Hcyに影響を与える葉酸摂取量以外の因子が、各地域間に存在していると考えられる。

血清葉酸と赤血球中葉酸に正の相関を認めるにもかかわらず、地域では乖離を認める結果は、血清・血漿葉酸は1日1日の葉酸摂取量に強く影響され、葉酸状態を評価するには赤血球中葉酸が望ましいとする (Molley et al. 1997) 報告を裏付けるものであると考えられた。

今回の調査では、Hcyが血清葉酸および赤血球中葉酸と逆相関するものの、動脈硬化の指標とは相関しないことが明らかとなった。また、MTHFR遺伝子多型はHcyに影響を与えているが、動脈硬化の指標には影響を与えなかった。そして、Hcyは人口規模が小さいほど低いとする、前回の調査とは逆の結果となり、季節性にHcyや葉酸摂取量は変動している可能性が示唆された。葉酸状態の評価には、血清葉酸よりも赤血球中葉酸が優れている可能性が示唆された。

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8件)

- ① Ichinose S, Nakamura M, Maeda M, Ikeda R, Wada M, Nakazato M, Ohba Y, Takamura N, Maeda T, Aoyagi K, Nakashima K., A validated HPLC-fluorescence method with a semi-micro column for routine determination of homocysteine, cysteine and cysteamine, and the relation between the thiol derivatives in normal human plasma., Biomed Chromatogr. 2009

- Sep;23(9):935-9.
- ② Hayashida H, Kawasaki K, Yoshimura A, Kitamura M, Furugen R, Nakazato M, Takamura N, Hara Y, Maeda T, Saito T., Relationship between periodontal status and HbA1c in nondiabetics., J Public Health Dent. 2009 Summer;69(3):204-6.
 - ③ Takamura N, Hayashida N, Hagane K, Kadota K, Yamasaki H, Abiru N, Ozono Y, Kamihiro S, Aoyagi K, Ishibashi K, Nakazato M, Maeda T., Leptin to high-molecular-weight adiponectin ratio is independently correlated with carotid intima-media thickness in men, but not in women., Biomarkers. 2010 Jun;15(4):340-4.
 - ④ Sekitani Y, Hayashida N, Kadota K, Yamasaki H, Abiru N, Nakazato M, Maeda T, Ozono Y, Takamura N. White blood cell count and cardiovascular biomarkers of atherosclerosis. Biomarkers. 2010 Aug;15(5):454-60.
 - ⑤ Nakazato M, Maeda T, Takamura N, Wada M, Yamasaki H, Johnston KE, Tamura T., Relation of body mass index to blood folate and total homocysteine concentrations in Japanese adults., Eur J Nutr. 2011 Oct;50(7):581-5. Epub 2011 Jan 8.
 - ⑥ Nakazato M, Takamura N, Kadota K, Yamasaki H, Mukae H, Kusano Y, Nakashima K, Ozono Y, Aoyagi K, Kohno S, Maeda T., The association between atherosclerosis and plasma homocysteine concentration in the general population residing on remote islands in Japan., ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA, 2011(55):47-54
 - ⑦ Shirakawa T, Ikeda K, Nishimura S, Kuniba H, Nakashima K, Motomura H, Mizuno Y, Zaito M, Nakazato M, Maeda T, Hamasaki Y, Hara T, Moriuchi H. Lack of an association between E-selectin gene polymorphisms and the risk of Kawasaki disease. Pediatr Int. 2012 Mar 13.
 - ⑧ Mio Nakazato, Takahiro Maeda, Kosuke Emura, Mayu Maeda, Tsunenobu Tamura, Blood Folate Concentrations Analyzed by Microbiological Assay and Chemiluminescent Immunoassay Methods., J Nutr Sci Vitaminol, 2012, (58):59-62

[学会発表] (計8件)

- ① 中里未央, 草野洋介, 高村昇, 中島憲一

郎, 青柳潔, 大園恵幸, 前田隆浩, 離島住民における赤血球中葉酸とホモシステインとの関連, 日本生理人類学会第60回大会, 2009年6月6日, 北海道大学学術交流会館

- ② 中里未央, 前田隆浩, 青柳潔, 高村昇, 門田耕一郎, 大園恵幸, 山崎浩則, 本邦における赤血球中葉酸濃度とホモシステイン、動脈硬化との関連, 第1回日本病院総合診療医学会学術総会, 2010年2月5日, IP HOTEL Fukuoka
- ③ M. Nakazato, T. Maeda N. Takamura, K. Kadota, K. Nakashima and T. Tamura., Indices of atherosclerosis in relation to total homocysteine and blood folate levels in Japanese adults., Experimental Biology 2010, 2010 April 26, Anaheim
- ④ 江村康佑, 中里未央, 関田孝晴, 前田隆浩, Kelly Johnston, 田村庸信, 太田幹也, 小足公彦, 葉酸測定における微生物測定法 (microbiological assay) と化学発光酵素免疫測定法 (chemiluminescent enzyme immunoassay) の比較, 第59回日本医学検査学会, 2010年5月23日, 神戸
- ⑤ 中里未央, 関田孝晴, 門田耕一郎, 高村昇, 中島健一郎, 前田隆浩, 吉谷清光, ホモシステインと頸動脈内中膜複合体厚 (CIMT) 及び心臓足首血管指数 (CAVI) との関連, 第1回日本プライマリ・ケア連合学会学術大会, 2010年6月26日, 東京
- ⑥ 江村康介, 中里未央, 関田孝晴, 小足公彦, 前田隆浩, 動脈硬化関連遺伝子の多型解析, 第32回長崎県地域医療研究会, 2010年10月30日, 長崎
- ⑦ 中里未央, 関田孝晴, 江村康介, 門田耕一郎, 和田光弘, 前田隆浩, 太田幹也, 健診受診者3,908名における、内臓中膜複合体厚 (IMT) と心臓足首血管指数 (CAVI) に影響を与える因子の検討, 第2回日本病院総合診療医学会学術総会, 2011年2月4日, 仙台
- ⑧ 中里未央, 関田孝晴, 高村昇, 青柳潔, 草野洋介, 江村康佑, 前田隆浩, 動脈硬化関連遺伝子の多型解析, 日本生理人類学会第64回大会, 2011年6月11日, 九州大学大橋キャンパス 多次元デザイン実験棟

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中里 未央 (NAKAZATO MIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
講師

研究者番号：00380973