

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500775

研究課題名(和文)筋疾患予防型トレーニングに遺伝子解析を活用しよう

研究課題名(英文)The ACTN3 gene is a potential biomarker for the risk of non-contact sports injury in female athletes

研究代表者

増見 恭子(小泉恭子)(MASUMI, Kyoko)

武庫川女子大学・薬学部・助手

研究者番号：70379593

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):スポーツ選手にとって靭帯損傷などの故障は人生設計の変更を伴う重大事件であるが、現在までにそれら受傷しやすさを予測するような遺伝子は発見されていない。今回、靭帯損傷などの故障リスクを予測し予防することを目的として、本学運動部99名を対象にスポーツや筋肉に関わる遺伝子型検査およびアンケート調査を実施した。その結果ACTN3遺伝子の577Rは577Xよりも有意に筋疾患歴を持つことが判明した。この結果より、ACTN3遺伝子多型を調べることで自身の受傷リスクが分かる可能性が示唆された。今後この結果をもとに、筋疾患を回避するためのトレーニング方法を検討していく予定である。

研究成果の概要(英文): Sports injuries can become serious impairments for all athletes. Most notably, female athletes are at higher risk than men for sports injury, for example, anterior cruciate ligament (ACL) disorder. However, there is currently no genetic marker to determine if a female athlete harbors a predisposition for muscle trauma. Hence, we performed single nucleotide polymorphism genotyping of the -actinin-3 (ACTN3) in 99 young female athletes who had been injured during a sports activity, and we compared the occurrence of muscle traumas with the genotypes using the chi-square test. For the ACTN3 577R allele, the subjects who had non-contact muscle injury had a marked increase in frequency (p-value = 0.0015; odds ratio = 2.52). The significant increase in non-contact muscle injury related to ACTN3 577R alleles suggests that ACTN3 is likely to be involved in muscle strain and that non-contact muscle injury might occur due to the presence of this allele.

研究分野：分子生物学

キーワード：スポーツ科学 トレーニング科学 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

スポーツ競技による成果・成績には様々な要因が影響を与える。日頃のトレーニングや体調管理はもちろんのこと、それ以外にも多くの生物学的あるいは環境条件等があげられるが、遺伝的背景もその主要な要因の一つであると考えられている。

骨格筋における - アクチニンタンパク質には、 - アクチニン 2 (ACTN2) および α - アクチニン 3 (ACTN3) という二つの種類が存在しているが、このうち ACTN3 タンパク質は、ヒト骨格筋では速筋線維中にしか発現しないという特徴を持っている。また、ACTN2 タンパク質よりも構造が頑健であると言われており、速筋線維を動員するような高い筋出力において様々なメリットをもたらすと考えられている。この ACTN3 遺伝子型には、RR、RX、XX という 3 つのタイプが存在し、X 型の遺伝子配列をもつ人は、ACTN3 タンパク質を作り出すことができないため、ACTN2 タンパク質が肩代わりすることにより、筋線維としての機能は維持されている。近年、海外の研究グループが、ある世界選手権レベルの競技者集団の ACTN3 遺伝子型分布を調べた結果、短距離走などの瞬発力系種目では RR 型および RX 型を持つアスリートの割合が高いことを報告した。また逆に持久性種目の選手では、XX 型の割合が多いことも発見した (*Am. J. Hum. Genet.* 2003, 73:627-631)。この結果は、ACTN3 遺伝子型を調べることが、瞬発力系種目型および持久型という二つの競技種目への適性を判断する材料になるかもしれないことを意味している。自分の競技適性をあらかじめ知ることができれば、その事実を自分の練習項目に取り入れることによって、より効果的なトレーニングを行うことができると考えられる。

研究代表者の所属する武庫川女子大学には健康・スポーツ科学部があり、前年度にバスケットボール部員 49 名を対象として ACTN3 遺伝子検査を実施してきた。バスケットボールは瞬発力も持久力も必要とされる競技であるが、バスケットボール部員の ACTN3 遺伝子の分布は、R アリル頻度に比べ X アリル頻度が多い結果となった。ここで興味深いことに、バスケットボール部員で RR 型と判定された 9 名のうち 5 名は靭帯断裂などで負傷しているという事実を得た。逆に、RX 型、XX 型をもつ選手には負傷者はいなかった。RR 型は速筋線維タイプで筋肉の収縮が速く収縮力は強いが、筋肉が疲労しやすいと言われるため、筋力トレーニングを過度に行うと筋疲労により筋肉を痛めやすくなると考えられる。RR 型がより筋肉を痛めやすいということが示唆されれば、RR 型をもつ選手に対しトレーニング内容の検討を行う必要があると考えた。また一般人でも RR 型と筋肉・靭帯損傷との関連性が考えられ、靭帯損傷などの筋疾患のなりやすさの遺伝子診断としても ACTN3 遺伝子が有用である可

能性が示唆された。

2. 研究の目的

スポーツ選手にとって靭帯損傷などの故障は人生設計の変更を伴う重大事件であるが、現在までにそれら受傷しやすさを予測するような遺伝子は発見されていない。もし受傷リスクが予測できれば、事前にトレーニングの計画を工夫し、より故障の起こりにくい内容で鍛えることが可能となる。今回、靭帯損傷などの故障リスクを予測し予防すること、そして個人の筋特性を知ることにより効果的なトレーニングを行うことを目的として α -actinin 3 (ACTN3) 遺伝子などのスポーツ関連遺伝子検査およびアンケート調査、体力測定を実施することとした。今回、研究代表者の所属機関ならびに大阪大学医学部付属病院 (阪大病院) との共同研究において、コホート研究ならびにケース・コントロール研究を推進することとした。

スポーツ関連遺伝子には主に ACTN3 遺伝子のほか、持久力と関連があるといわれているアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子、省エネルギー特性と関連があるといわれる脱共益たんぱく質 (UCP) 遺伝子などの多型も報告されている。遺伝子検査においては、初年度は ACTN3 遺伝子のみを解析するが、次年度以降はそれらを含めたスポーツ関連遺伝子が、実際にどういった表現型 (運動能力) と関連性があるのかも検討する予定である。

【1. 健康スポーツ科学部学生によるスポーツ体質検査 (コホート研究)】

本校には健康・スポーツ科学部があり、学生自身がアスリートであるとともに、学校・企業・地域社会で活躍できる優れたスポーツ指導者を目指して勉学に励んでいる。その中で特に運動部に所属している学生は、一般の学生に比し運動に対するモチベーションも高く、その技術も優れている。そのため運動部に所属する学生に筋疾患などの既往歴を調査することと、その遺伝子型を比較することが、ACTN3 遺伝子 = 筋疾患の遺伝子マーカーとして有用であることの証明への第一歩と考えた。本学の健康・スポーツ科学部新入生のうち年間約 100 名の学生が運動部に所属し、陸上競技部だけでも現在約 68 名の在籍者が存在するため、研究期間内には当該学生約 300 名程度のデータが得られると考えられる。まずはアンケート調査を行い筋疾患の既往歴を調べ、ACTN3 遺伝子型との比較を行う。また、このとき同時に体力測定を実施し、体力測定結果と ACTN3 遺伝子型との比較も行う。

対照群として、本学薬学部の学生約 200 名も同様に遺伝子検査及びアンケート調査を行い、日ごろ運動を行っていない学生においても靭帯損傷などの筋疾患の起こりやすさについて検討する。調査後の学生の筋疾患追跡調査や、毎年の入学学生のデータを収集し

て統計的に集計することなどを考慮し、約 3 年間の研究期間を計画した。

【2. 靭帯損傷等の筋疾患の危険予測診断 (ケース・コントロール研究)】

さらに *ACTN3* 遺伝子が筋疾患と直接関連性があるかどうかを調査するため、ケース・コントロール研究を実施することとした。

今回大阪大学医学系研究科整形外科学と共同研究を行い、阪大病院に通院する筋疾患患者を対象として *ACTN3* 遺伝子検査を実施する。阪大病院の整形外科にはスポーツ外来が存在し、数多くの靭帯損傷を含む筋疾患患者が来院する。筋疾患患者から唾液(口腔粘膜細胞)もしくは血液を採取し、遺伝子検査を行う。この結果と健常人を比較し、筋疾患と関連性があるかどうか、また特にどの筋疾患と有意に関連しているかの検討を行う。阪大病院では年間 100 例の筋疾患患者の手術を行っているため、入院患者は年間 100 例、通院患者を含めると年間数百例に及ぶ。また筋疾患患者の臨床情報は詳細に管理されており、より臨床的な研究結果が得られるものと期待している。

3. 研究の方法

(1)平成 24 年度

本校には健康・スポーツ科学部があり、学生自身がアスリートであるとともに、学校・企業・地域社会で活躍できる優れたスポーツ指導者を目指して勉学に励んでいる。その中で特に運動部に所属している学生は、スポーツ競技やトレーニングに対するモチベーションも高く、より本研究に協力してくれるものと期待できる。初年度は、在籍している 1 年生～4 年生の運動部員約 200 名を対象に遺伝子検査 (I) 及び、アンケート調査 (II) を実施し、同時に体力測定 (III) も実施する。(I) 遺伝子検査は、インフォームドコンセントに同意した学生に唾液を水溶紙に添加してもらい、その水溶紙を風乾した後使用する。研究代表者グループは、毛根、乾燥ろ紙唾液(口腔粘膜)などの生体サンプルを DNA 抽出することなく直接 PCR に使用して特定の遺伝子を増幅し、制限酵素反応で一塩基変異 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) 部位を断片化して検出する PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) による SNP タイピング法を開発した(特願 2009-018431: 特定遺伝子を検出する方法、および毛根ダイレクト Duplex ASP-PCR 法に関する論文: Hayashida et al. Anal. Sci. 2009)。これにより簡便性と正確性の両方を兼ね備えた実験法を確立することができた。また実際のサンプルを用い、300 サンプルの解析で間違い無し、すなわち 99.7 %以上の正解率を達成することを可能にした(Anal. Sci. 2010 26:503-505)。本手法を用い、PCR-RFLP 法もしくは TaqMan 法により、遺伝子の多型解析を行う予定である。

(II) スポーツ体質検査アンケートの内容は

以下のとおりである。

スポーツの頻度

スポーツの実施年数と内容

スポーツ実施時の負傷の有無

・ 負傷の種類

・ 負傷の状況

スポーツ以外での負傷の有無

・ 負傷の状況

・ 負傷の種類

短距離・長距離走の得手・不得手

筋肉の疲れやすさ

筋肉のつきやすさ

本アンケートにより、靭帯損傷などの筋疾患の既往歴や筋肉のつきやすさ、短距離系と持久系のどちらが得意か等の情報を得る。

(III) 同時に体力測定も実施する。これは筋疾患とは直接関わりは持たないが、*ACTN3* 遺伝子型のタイプが、実際にどこまで遺伝子型と表現型との関連性があるのかを知る一助となる。

4. 研究成果

健康スポーツ科学部生によるスポーツ体質検査として、初年度より運動部員約 100 名を対象に遺伝子検査及び、アンケート調査を実施し、同時に体力測定も実施した。2 年目までに *ACTN3* 遺伝子および他の筋肉関連遺伝子である *ACE*、*UCP1*、*UCP2*、*UCP3* 遺伝子の多型解析を行い、この結果とアンケート結果との相関を検討するために統計解析を行った。その結果、肉離れ及び腱断裂において *ACTN3* の 577R 多型を持っている人で有意に受傷歴 (p 値 = 0.0015; オッズ比 = 2.52) があり、*ACTN3* 577R が受傷しやすさのリスクファクターであると考えられた。最終年度ではこの結果をまとめ、海外雑誌である *Journal of Molecular Biomarker & Diagnosis* へ投稿し掲載された。また遺伝子診療学会にて発表も行った。

最終年度はまた、トレーニングに関する新たなリスクファクターの検索も行った。カルニチンパルミトイル基転移酵素 2 (*CPT2*) 遺伝子の F352C 多型において、変異型は熱中症の重篤化を招くと言われている。現在までに急性脳症等を含む重篤患者にて、この変異率が有意に高いという報告があったが、今回、一般人においても重篤化との関連性について調査した。本学学生 150 名において、*CPT2* 遺伝子多型の調査を行い、同時にアンケート調査も行った。

アンケート内容は以下のとおりである。

インフルエンザの罹患歴

-2 (罹患歴があった場合)

熱が下がりにくかったかどうか

暑さへの弱さ

熱中症への罹患歴

-2 (罹患歴があった場合)

点滴治療(重症化)の有無

日頃熱が下がりにくいかどうか

この結果より、 の「今までに熱中症にか

かったことがあるか否か」の質問に対し、変異型を持っている人で有意に高い結果となり (p 値=0.0225)、変異型の CPT2 遺伝子は熱中症発症時の重症化だけでなく、熱中症の発症を引き起こしやすいのではないかと考えられた。

これらの結果をトレーニングに活かしていくため、今後健康スポーツ科学部と協力してトレーニング方法を考えて行く予定である。

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 5 件)

林田真梨子, 鎌田由佳, 大田智子, 児島沙由梨, 増見恭子, 村田成範, 木下健司

Associations between ALDH2 and ADH1B genotypes and ethanol-induced cutaneous erythema in young Japanese women.

日本衛生学雑誌 掲載確定

大田智子, 林田真梨子, 小泉(岩尾)恭子(増見恭子), 村田成範, 木下健司

High Performance and Straightforward Genotyping of the Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (VKORC1) Polymorphisms.

J Pharm Health Care Sci. 掲載確定

Iwao-Koizumi K*, Ota T, Hayashida M, Yonetani Y, Nakata K, Kinoshita K, Koyanagi Y, and Murata S.

The ACTN3 gene is a potential biomarker for the risk of non-contact sports injury in female athletes.

J Mol Biomark & Diag. 2014 S6 2.

Doi: 10.4172/2155-9929.S6-002

Hayashida M, Ota T, Ishii M, Iwao-Koizumi K*, Murata S, Kinoshita K.

Direct Detection of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) by the TaqMan PCR Assay Using Dried Saliva on Water-soluble Paper and Hair-roots, without DNA Extraction.

Anal Sci. 2014, 30 (3) 427-9.

Doi: 10.2116/analsci.30.427

Ota T, Hayashida M, Ishii M, Iwao-Koizumi K*, Murata S, Kinoshita K.

Long PCR-based genotyping for deleted CYP2D6 gene without DNA extraction.

Drug Metab Pharmacokinet. 2013, 29 (3) 283-285.

Doi: 10.2133/dmpk.DMPK-13-NT-116

*: Iwao-Koizumi K は研究代表者の増見恭子である。

[学会発表](計 5 件)

林田真梨子, 鎌田由佳, 大田智子, 児島沙由梨, 増見恭子, 村田成範, 木下健司

女子大学生におけるエタノールパッチテストの反応性と ALDH2 および ADH1B 遺伝子多型との関連

日本薬学会第 135 年会 神戸サンボホール (兵庫県神戸市) 2015/3/25-28

増見恭子, 大田智子, 林田真梨子, 木下健司, 小柳好生, 村田成範

スポーツ時の故障リスクを遺伝子多型で予測する

日本遺伝子診療学会第 21 回大会 タワーホール船堀 (東京都江戸川区) 2014/11/20-21

大田智子, 石井みのり, 林田真梨子, 増見恭子, 村田成範, 木下健司

薬物代謝酵素 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A5 の遺伝子解析に関する医療薬学的研究

日本薬学会第 134 年会 熊本市総合体育館 (熊本県熊本市) 2014/3/27-30

大田智子, 林田真梨子, 石井みのり, 増見恭子, 村田成範, 木下健司

ファーマコゲノミクス実現に向けた薬剤師の役割

第 46 回日本薬剤師会学術大会 大阪国際会議場 (大阪府大阪市) 2013/9/22-23

大田智子, 林田真梨子, 石井みのり, 増見恭子, 村田成範, 木下健司

ファーマコゲノミクス実現に向けたダイレクト TaqMan-PCR 法による薬物代謝酵素遺伝子の解析

第 23 回日本医療学会年会 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市) 2013/9/21-22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増見 恭子 (MASUMI, Kyoko)

武庫川女子大学・薬学部・助手

研究者番号: 70379593

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

木下 健司 (KINOSHITA, Kenji)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号: 70441219

村田 成範 (MURATA, Shigenori)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号: 80280999

林田 真梨子 (HAYASHIDA, Mariko)
武庫川女子大学・薬学部・助手
研究者番号： 10611387

小柳 好生 (KOYANAGI, Yoshio)
武庫川女子大学・健康スポーツ科学部・准
教授
研究者番号： 20340945

中田 研 (NAKATA, ken)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号： 00283747

米谷 泰一 (YONETANI, Yasukazu)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号： 80642090