

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460759

研究課題名(和文)生活習慣病予防のための身体活動の遺伝子多型・メチル化への影響に関する疫学研究

研究課題名(英文)Epidemiological study on the genetic polymorphisms and methylation effects of physical activity for lifestyle disease prevention

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷マーカーである尿中8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の濃度は、女性では総身体活動量と負の相関が、男性では中高強度の身体活動量と負の相関がみられた。一方、遺伝子損傷修復酵素である8-oxoguanine DNA glycosylase 1(hOGG1)のプロモーター領域のDNAのメチル化は、身体活動量とは正の相関がみられた。身体活動量が高いと内因性の抗酸化能が亢進しDNA損傷が低下すること、逆に、身体活動量が低いとDNA損傷が増加するため、hOGG1を発現するためにDNAのプロモーター領域は低メチル化状態となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genetic damage due to reactive oxygen species increases with age and contributes to the onset of cancer. In this study, we examined the relationship between physical activity and DNA damage, and DNA damage repair gene methylation. The concentration of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), a DNA damage marker, was negatively correlated with the total body activity level in females and negatively correlated with mid- to high-intensity physical activity levels in males. On the other hand, DNA methylation in the promoter region of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1), a gene damage repair enzyme, was positively correlated with the amount of physical activity. Higher amount of physical activity increases endogenous antioxidant capacity and DNA damage decreases. Conversely, DNA damage increases when the amount of physical activity is low, so the promoter region of DNA is low in order to express hOGG1 Suggesting the possibility of methylation.

研究分野：疫学

キーワード：遺伝子損傷 身体活動 メチル化

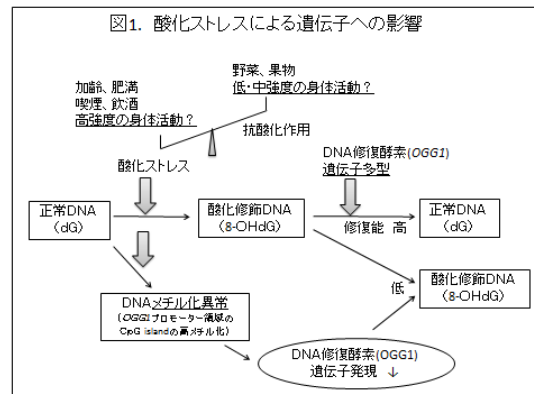
## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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や免疫機能の低下を惹起する事が知られている<sup>1,2</sup>。酸化ストレスによる遺伝子損傷マーカーである尿中 8-OH-dG 濃度は、肥満や喫煙、飲酒により上昇し、野菜や果物の摂取で低下すると報告されているが、身体活動についての検討は十分でない<sup>3</sup>。これまで、少人数の介入研究では、高強度の運動では遺伝子損傷マーカーが増加したとする報告があるが、低・中強度の運動では、むしろ低下したとする報告がほとんどで、低・中強度の運動により、内因性の抗酸化酵素が活性化されるためと考えられている。一方、観察研究においては、運動や身体活動と酸化ストレスマーカーは負の関連があるとする報告があるが、中強度の定期的な運動や余暇時間の身体活動とは関連がないとする報告もあり、一貫していない。その原因の一つとして、標準化された方法で身体活動量が把握されていないことがあげられ、これまで妥当性、再現性のある調査票や客観的測定に基づいて運動や身体活動を評価した研究はほとんどない<sup>4</sup>。

(2) 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、尿中 8-OH-dG 濃度と身体活動量の関連は塩基除去修復酵素である OGG1 遺伝子の発現による影響を受けると考えられるが、知見は十分でない。OGG1 遺伝子のプロモーター領域の CpG island の高メチル化は、OGG1 遺伝子の発現を抑制し遺伝子修復能の低下をもたらす尿中 8-OH-dG 濃度の上昇と関連すると推測されるが、身体活動による影響は明らかでない<sup>5</sup>。

い<sup>5</sup>。

以上のことから、身体活動による遺伝子損傷への影響を総合的に評価するためには、客観的な身体活動量の測定に基づいて、遺伝子修復酵素のメチル化異常の影響を同時に考慮した検討が必要である。



## 2. 研究の目的

(1) 強度別身体活動と酸化ストレスマーカーである尿中 8-OH-dG 濃度の関連を検討する。

(2) 強度別身体活動と OGG1 遺伝子のプロモーター領域の CpG island の高メチル化の関連を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 2010年11月から2012年11月にかけて実施された日本多施設共同コーホート研究(佐賀地区)の5年後調査へ研究に参加した8,454人について、10日間ライフコーダーにて計測した身体活動量データの処理を行い、解析可能な状態のデータに整理した。5年後調査時に提出した尿検体を用いて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法にて尿中 8-OHdG 濃度を測定した。加速度計法による身体活動測定が不十分な者

(249人)尿中8-OH-dG濃度が測定できなかった者(49人)および既往歴のある者(がん(703人)狭心症(241人)心筋梗塞(103人)脳卒中(230人)糖尿病(692人)肝疾患(118人)腎疾患(19人))を除外した6,422人(男性2370人、女性4052人)を解析対象とした。共分散分析により、年齢、BMI、喫煙、飲酒、エネルギー摂取量、閉経の有無(女性のみ)を補正し、全身身体活動量および、中・高強度以上(3メッツ以上)の身体活動量4分位ごとの尿中8-OHdGの補正平均値を残差法にて推定し、重回帰分析により傾向性の検定を行った。

(2)ベースライン調査、および、5年後調査より、それぞれ2295検体についてメチル化解析を行った。末梢血DNA250ngについてバイサルファイト処理を行った後、*hOGG1*遺伝子の転写開始部位に近いプロモーター領域の遺伝子をPCRで増幅し、パイロシーケンス法を用いて塩基を測定し、9か所のCpGサイトのメチル化の割合(%)を求めた。平均メチル化割合の最も多かったSite5のメチル化状態を中心に、加齢、がんの既往、尿中の8-OHdG、生活習慣との関連を下記の通り検討した。また、ベースラインと5年後調査の検体を用いて、それぞれ横断的に年代ごとのメチル化割合の比較、および、ベースラインの年代別の経年変化について比較した。ベースラインの検体を用いてがんの既往のある者(32人)とない者(544人)について9か所のCpGサイトのメチル化割合(%)を比較した。

統計解析にはSAS statistical software package (Ver. 9.3 for Windows; SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用し、2群間の比較にはWilcoxonの順位和検定を、3群以上の群間の比較にはKruskal-Wallis検定をおこなった。 $P < 0.05$ を有意水準とした。

#### 4. 研究成果

(1)尿中8-OHdG濃度は、女性では身体活動の総量との間に有意な負の関連がみられたが、強度との関連はみられなかった。一方男性では、身体活動の総量との関連は明らかでなかったが、中・高強度の身体活動量との間に有意な負の関連が認められた。さらに、総身体活動量で補正しても有意な関連が認められた。以上より、中・高強度以上の身体活動によるDNA損傷予防効果には性差がある可能性があり、男女別に指針を策定する必要性が示唆された。

(2)OGG1遺伝子のプロモーター領域の9か所のCpGの平均メチル化割合は1.1%~5.4%であった。9つのCpG部位のうち、最もメチル化割合の高かった5番目の部位の平均メチル化割合について示すと、年齢階級(40歳代、50歳代、60歳代)別の横断的検討では、ベースライン時点ではそれぞれ4.9%、5.0%、5.4%、5年後調査時点ではそれぞれ4.5%、4.6%、4.6%と、両時点共に年齢階級による有意な差は認めなかった。一方、経年変化をみると、いずれ年齢階級も、5年後のメチル化割合が有意に低かった。また、このメチル化割合が経年で低下する関連は5年間にがん罹患した人では認めなかった。

さらに、ベースライン時点の情報を用いて、この部位のメチル化割合と身体活動レベルとの関連を検討したところ、身体活動

レベルが低いほどメチル化割合は低く、5年間にがん罹患した人を除いた検討でも同様の結果であった。

以上より、遺伝子修復酵素のプロモーター部位のメチル化割合は低く保たれているが、さらに加齢や低い身体活動レベルと低メチル化状態が関連することから、遺伝子損傷の修復を必要とする状態では脱メチル化が進む可能性が示唆された。一方、がん罹患患者では、このような傾向が見られないことから、遺伝子修復酵素のプロモーター領域の脱メチル化が起こりにくいと、がん罹患リスクが高まる可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004; 567: 1-61.
2. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
3. Tamae K, Kawai K, Yamasaki S, Kawanami K, Ikeda M, Takahashi K, et al. Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci* 2009; 100: 715-721.
4. Friedenreich CM, Neilson HK, Lynch BM. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur J Cancer* 2010;

46: 2593-2604.

5. Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA, Sparrow D, Vokonas PS, Tarantini L, et al. Aging and epigenetics: Longitudinal changes in gene-specific DNA methylation. *Epigenetics* 2012; 7: 63-70.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Hara M, Nishida Y, Shimano C, Otsuka Y, Nanri H, Horita M, Yasukata J, Miyoshi N, Yamada Y, Higaki Y, Tanaka K. Intensity specific effect of physical activity on urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in middle-aged Japanese. *Cancer Sci*. 2016. 107: 1653-1659.

Hara M, Shimano C, Otsuka Y, Nishida Y, Nanri H, Horita M, Yasukata J, Miyoshi N, Yamada Y, Higaki Y, Tanaka K. Factor associated with non-participation in face-to-face survey conducted 5 years after baseline survey. 2015. *J. Epidemiol.* 25 ( 2 ): 117-125.

〔学会発表〕(計4件)

原めぐみ、西田裕一郎、島ノ江千里、堀田美加子、田中恵太郎. 加齢とhOGG1 遺伝子プロモーター領域のメチル化の関連. 第26回日本疫学会学術総会. 2016, 1, 21-23. *J Epidemiol.* 26: Suppl. 1, 87

Hara M, Nishida Y, Shimano C, Otsuka Y, Nanri H, Higaki Y, Horita M, Kawai K, Li YS, Kasai J, Kasai H,

Tanaka K. Association between objectively measured physical activity and serum adiponectin in the middle-aged population. 第25回日本疫学会学術総会. 2015, 1, 21-23. J. Epidemiol. 25. Suppl. 1: 103.

原めぐみ, 西田裕一郎, 南里妃名子, 大塚康子, 島ノ江千里, 檜垣靖樹, 堀田美加子, 河井一明, 李 云善, 葛西順, 葛西宏, 田中恵太郎. 強度別身体活動量と尿中 8OHdG 濃度の関連. 第83回 日本衛生学会総会. 2013, 3, 24-26. 日衛誌, 68, 第83回学術総会演題集, S169

原めぐみ, 南里妃名子, 西田裕一郎, 中村和代, 今泉猛, 坂本龍彦, 堀田美加子, 檜垣靖樹, 田口尚人, 新地浩一, 田中恵太郎. hOGG1 遺伝子の Ser326Cys 多型と空腹時血糖との関連. 第23回日本疫学会学術総会. 2013, 1, 24-26. J. Epidemiol. (Suppl.) 23, 1, 91

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.prevent.med.saga-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

原めぐみ(HARA, Megumi)

佐賀大学・医学部医学科・准教授

研究者番号:90336115

(2)研究分担者

田中恵太郎(TANAKA, Keitaro)

佐賀大学・医学部医学科・教授

研究者番号:50217022

西田裕一郎(NISHIDA, Yuichiro)

佐賀大学・医学部医学科・講師

研究者番号:50530185