

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350906

研究課題名(和文)新規エストロゲン受容体GPER遺伝子多型と動脈硬化の関連性

研究課題名(英文)The relationship between G-protein coupled Estrogen Receptor: GPER and arterial stiffening

研究代表者

林 貢一郎 (Hayashi, Koichiro)

國學院大學・人間開発学部・准教授

研究者番号：90433474

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)：日本人男女(18-85歳, 784名)を対象として, 新規エストロゲン受容体である“G-protein Coupled Estrogen Receptor; GPER”遺伝子多型が動脈硬化度および運動による動脈硬化改善効果に及ぼす影響について検討した。rs3808350多型において, GG型を有する者の動脈硬化度は有意に低値であったが, 運動による動脈硬化抑制効果にこの多型は関係しなかった。また, この多型はBMIや血中グルコース濃度と関連していた。以上より, GPER遺伝子多型(rs3808350)は, 有酸素性作業能力の高低に関わらず, 動脈硬化指数や血糖値などの冠危険因子に影響することが示された。

研究成果の概要(英文)：I examined the hypothesis that genotypes of “G-protein Coupled Estrogen Receptor: GPER) might influence arterial stiffening and the ability of regular exercise to decrease arterial stiffness in healthy Japanese men and women (age 18-85, n=784). In rs3808350 polymorphism (in the promoter region, A/G), the carotid arterial stiffness of individuals who have GG type was significantly lower than that of individuals who have AA and AG type. Aerobic capacity did not influence the relationship the polymorphism and arterial stiffness of carotid artery. Also, rs3808350 polymorphism was significantly related with BMI and blood glucose level. These results suggest that polymorphism of GPER (rs3808350) candidate for determining arterial stiffness and the risk factor for coronary artery diseases such as BMI and blood glucose, but these relationships are independent of cardiorespiratory fitness.

研究分野：運動生理学, 応用健康科学

キーワード：GPER 遺伝子多型 動脈硬化 運動

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は加齢に伴い進行するが、この進行度には大きな個人差が存在する。この動脈硬化の加齢的变化の個人差には、身体活動や食生活といった生活習慣の違い(後天的要因)以外に、遺伝的な要因(先天的要因)が関与することが申請者らのグループをはじめ国内外で多くの研究が報告されている。この遺伝的要因については、遺伝子の塩基配列の多様性、すなわち遺伝子多型の違いから検討されている。

女性ホルモンであるエストロゲンは、血管内皮機能の向上(=血管弛緩作用)、血管平滑筋の増殖抑制、血中コレステロール濃度の正常化などを介して、動脈硬化を予防・改善する。このエストロゲンの作用はエストロゲン受容体を介して発揮される。従来、エストロゲン受容体としてエストロゲン受容体 $\alpha$ および $\beta$ があり、両者は動脈組織に豊富に発現していることが知られていたが、近年、細胞膜上に存在するオーファン受容体である GPR30 がエストロゲンの細胞膜受容体として同定され、第3の新しいエストロゲン受容体“G-protein Coupled Estrogen Receptor; GPER”として、その機能解析が急激な勢いで進んでいる。実際に、エストロゲンの持つ急速な血管拡張応答はこの GPER を介して行われていることや、冠動脈における虚血や血管障害の抑制への貢献も明らかとなっている。そのため、この GPER における機能の先天的な個人差は、動脈硬化の個人差と関連することが予測されるが、研究開始当初まで、この GPER 遺伝子多型がエストロゲンの抗動脈硬化作用の個人差に及ぼす影響については全く知られていなかった。さらに、エストロゲンは、身体活動のもつ抗動脈硬化作用に強く関与している血管内皮機能の正常化にも関連していることから、身体活動実施による動脈硬化指数の抑制の個人差にも GPER 遺伝子多型の違いが影響する可能性があるが、この点に関するアプローチも全くなされていなかった。

このように、新規エストロゲン受容体である GPER の循環器系への役割とその抗動脈硬化作用の重要性については、動物実験等で知見が得られつつある状況であった。ただし、ヒトを対象として、この GPER の遺伝子多型と臨床的・生理学的データを結びつけた研究は極めて少なく、動脈硬化リスク、さらには、運動による動脈硬化抑制の個人差との関連性に関する検討は皆無であった。これらの関

連性を解明することが本研究の学術的な特色であると考え、検討を行った。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、新規エストロゲン受容体 GPER の発現に関連する遺伝子多型の違いが、エストロゲンの効果に影響し、動脈硬化指数やその身体活動増加に伴う改善度に違いを生じさせるとの仮説を検証することを目的とした。

本研究課題では、作業仮説を以下のように設定した。

仮説 1) 閉経前および閉経後女性において、GPER 遺伝子多型は動脈硬化指数に明らかな影響を及ぼす。

仮説 2) GPER 遺伝子多型が動脈硬化指数に及ぼす影響には性差がある。

仮説 3) GPER 遺伝子多型の違いにより、身体活動実施による動脈硬化抑制効果は異なる。

これらの仮説が立証されれば、GPER に関連する遺伝子多型の違いから、動脈硬化指数や身体活動の抗動脈硬化作用の個人差の一部が説明でき、生活習慣病予防策・運動処方技術の構築に貢献するものと考えた。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、幅広い年代の日本男女を対象として、GPER 遺伝子多型の判定を行い、各種動脈硬化関連指標との関連性について検討した。また、有酸素性作業能力の高低と動脈硬化指数の違いの関連性から身体活動実施による動脈硬化抑制効果に及ぼす遺伝子多型の影響について検討した。

本研究課題は、(独)国立健康・栄養研究所 健康増進プログラム 運動ガイドラインプロジェクト(プロジェクトリーダー:宮地元彦;連携研究者)における生活習慣病一次予防に必要な身体活動量・体力基準値の策定に関するコホート研究の一部として実施された。なお、本研究は国立健康・栄養研究所の研究倫理委員会の承諾を受け、ヘルシンキ宣言の精神に則り実施された。

### 1) 対象者

対象者は、幅広い年代の日本人男女 784 名であった。特別な疾患(高血圧、脂質異常症、糖尿病を含む)を有していない非喫煙者を分析対象とした。後に記す最高酸素摂取量の各年代における中央値を境に、対象者 High fit 群と Low fit 群に分けた。なお、対象者にはプロジェクトの意義や研究に参加することに危険性等に関する十分な説明を行い、書面

による同意を得た上で各種測定を行った。

## 2) GPER 遺伝子多型

本研究課題では、文献渉猟および遺伝子多型に関するデータベースの情報検索の結果、GPER 遺伝子多型として、rs11544331 ( Exon 3 C→T ), rs 3808350 ( Promoter Region, G→A ), rs3808351 ( Exon 1, C→T ) の 3 つの遺伝子多型が選択され分析された。これらの遺伝子多型との関連を検討した Phenotype は 3 ) に示す以下の項目であった。

## 3) 評価項目

### (1) 動脈硬化に関連する指標

上腕足首間脈波伝播速度 ( brachial-ankle pulse wave velocity; baPWV )

頸動脈 Distensibility coefficient ( DC ), コンプライアンスおよび  $\beta$ -stiffness index

頸動脈内中膜複合体厚 ( Carotid Intima-Media Thickness ; cIMT )

上腕血圧, 足背動脈血圧 ( オシロメトリック法 )

これらの動脈硬化関連指標および血圧については、15 分程度の仰臥位安静の後に仰臥位にて測定した。baPWV および上腕血圧の測定には、formPWV/ABI ( 血圧脈波検査装置 BP-203PREII, オムロンヘルスケア社製 ) を用いた。頸動脈コンプライアンスおよび  $\beta$ -stiffness index の評価には超音波法 ( Vivid i, GE health care ) およびトノメトリー法を併用した。頸動脈内中膜複合体厚は、超音波法にて評価した。

### (2) 血中脂質

中性脂肪, 総コレステロール, HDL コレステロール各濃度を評価した。

### (3) 糖代謝マーカー

血中グルコース濃度, HbA<sub>1c</sub> を評価した。

### (4) 性ホルモン

血清エストラジオール ( E2 ) 濃度を測定した。

### (5) 最高酸素摂取量 ( $\dot{V}O_{2peak}$ )

自転車エルゴメーターを用いた最大運動による最高酸素摂取量をダグラスバッグ法により求め、有酸素性体力の指標とした。

## 4) 統計解析

統計解析では、遺伝子多型 ( 3 群間 ) の比較には、一元配置分散分析を用いた。また、遺伝子多型と有酸素性作業能力の有無の相互作用の検定には、二元配置分散分析を用いた。この際、交絡因子を共変量とすることでその影響は除外した。遺伝子型の頻度の比較

には  $\chi^2$  検定を用いた。なお、有意水準は 5% とした。

## 4. 研究成果

### 1) 【rs11544331 多型と動脈硬化指数および関連因子との関連について】

全被験者における rs11544331 多型の遺伝子頻度は、CC 型 = 94.0% , CT 型 = 5.9% , TT 型 = 0.1% であったため、CC 型と CT+TT 型の 2 群に分けて、指標の比較を行った。

全被験者を対象として分析した結果、身長、体重、BMI 等の体格指標、血中脂質・糖代謝マーカー、血中エストロゲン濃度、上腕血圧および各種動脈硬化に関連する指標のすべてにおいて、この多型の違いによる差は認められなかった。性別により、それぞれで同様の検討を行ったが、いずれにおいてもこの遺伝子多型の影響は明らかではなかった。

有酸素性作業能力との関係については、CT+TT 型の被験者数が少なかったため、この多型においては体力と動脈硬化指数との相互作用について検討することは不可能であると判断した。

### 2) 【rs3808350 多型と動脈硬化指数および関連因子との関連について】

全被験者における rs3808350 多型の遺伝子頻度は、AA 型 = 20.9% , AG 型 = 49.1% , GG 型 = 30.0% であった。男性のみで検討した場合の遺伝子頻度は、AA 型 = 20.8% , AG 型 = 46.8% , GG 型 = 32.5% であった。女性のみで検討した場合の遺伝子頻度は、AA 型 = 21.2% , AG 型 = 49.7% , GG 型 = 29.1% であった。遺伝子頻度に性差は認められなかった。

全被験者を対象に検討したところ、BMI は AA 型で AG 型および GG 型に比較して有意に高値であった。女性のみでの検討でも、BMI は AA 型が他の 2 群と比較して有意に高値であった。男性では違いはなかった。

糖代謝指標および血中脂質レベルに関しては、AA 型のグルコース濃度は他の 2 群と比較して高値であった。女性においては、AA 型のグルコースおよび中性脂肪濃度が他の 2 群よりも有意に高値であった。男性ではそのような違いは認められなかった。HbA<sub>1c</sub>、総コレステロール濃度は、全被験者あるいは男女別に解析しても、いずれもこの遺伝子多型の影響を受けなかった。これらの結果は、特に女性において、rs3808350 多型が肥満・代謝系 ( メタボリックシンドロームに関連する ) 指標に影響することを示唆している。

rs3808350 多型と動脈硬化に関する循環器系指標との関連について、上腕血圧、baPWV はいずれの被験者群（全体、男性のみ、女性のみ）においても関連性は認められなかった。

頸動脈 DC およびコンプライアンスにおいて、GG 型のそれが最も高値であり、AG 型との間に有意な差が認められた。頸動脈  $\beta$ -stiffness index では GG 型のそれが最も低値であり、AG 型および AA 型との間に有意な差が認められた（図 1）。cIMT にこの遺伝子多型は影響していなかった。女性のみでの検討でも同様な傾向があったが、頸動脈 DC においてのみ有意な違いが認められ、コンプライアンスおよび  $\beta$ -stiffness index には有意な差は認められなかった。男性では、いずれにおいても有意な差は認められなかった。

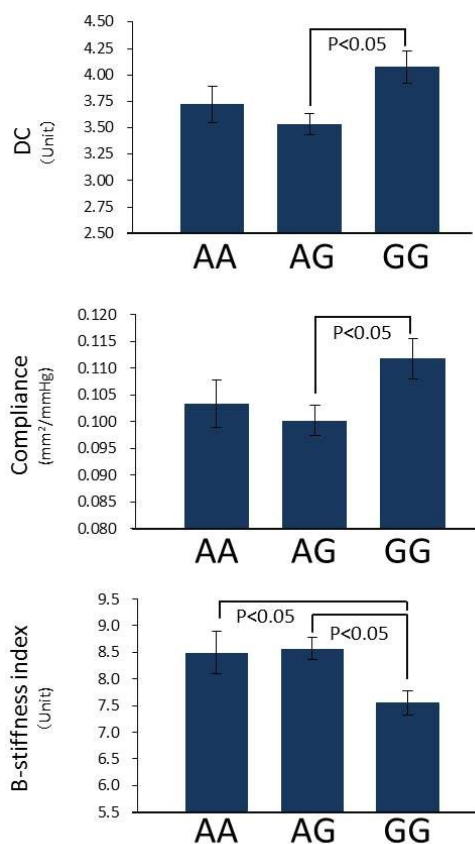


図 1 . rs3808350 多型と頸動脈の動脈硬化指数との関係（全被験者での検討）

GG 型の動脈硬化指数は低かった。データは平均値±標準誤差で示す。

全被験者を対象として、有酸素性体力の高低による動脈硬化指数の違いに及ぼす rs3808350 多型の影響について、二元配置分散分析（遺伝子多型×Fitness）にて検討した。

頸動脈 DC、コンプライアンス、 $\beta$ -stiffness index のいずれの指標においても、遺伝子多型および Fitness レベルによる有意な主効果が認められた（rs3808350 : GG 型で動脈硬化指数が低い、Fitness レベル : High fit 群で動脈硬化指数が低い）ものの、有意な交互作用は認められなかった。女性のみでの解析でも同様の結果が得られた。男性のみでの解析では、これらの指標に及ぼす遺伝子多型および Fitness の単独の影響、さらには、それらの 2 要因の交互作用は認められなかった。

### 3) 【rs3808351 多型と動脈硬化指数および関連因子との関連について】

全被験者における rs3808351 多型の遺伝子頻度は、AA 型 = 2.9%、AG 型 = 28.3%、GG 型 = 68.8% であった。AA 型の頻度が極端に低かったため、AA+AG 型（31.0%）と GG 型（69.0%）にて比較した。

全被験者を対象として分析した結果、身長、体重、BMI 等の体格指標、血中脂質・糖代謝マーカー、血中エストロゲン濃度、上腕血圧および各種動脈硬化に関連する指標のすべてにおいて、この多型の違いによる差は認められなかった。性別により、それぞれで同様の検討を行ったが、いずれにおいてもこの遺伝子多型の影響は明らかではなかった。

有酸素性作業能力の高低と各種動脈硬化指数との関係に及ぼす遺伝子多型の影響について分析したが、有意な相互作用は認められなかった。

### 4) まとめ

本研究課題では、新規エストロゲン受容体 GPER における既知の遺伝子多型（rs11544331, rs3808350, rs3808351）と動脈硬化指数およびその関連因子との関係について検討した。さらに、有酸素性作業能力の高低による動脈硬化指数の違いに、これらの遺伝子多型が影響するか否かを検討した。その結果、rs3808350 多型において、GG 型を有する者の中心動脈における動脈硬化指数は明らかに低いことが明らかとなった。しかし、有酸素性作業能力の高低による動脈硬化指数の違いにはこの遺伝子多型は関係しなかった。さらに、AA 型を有する者では、その他の 2 群と比較して、BMI や血糖値が高値である（女性においては中性脂肪も高値）ことが示された。

その他 2 つの遺伝子多型（rs11544331, rs3808351）は、今回の検討においては、動脈硬化指数やその関連因子、また、運動の動脈硬化抑制効果に影響しないものと考えられ

た。

以上より，新規エストロゲン受容体 GPER 遺伝子多型 (rs3808350) は日本人の動脈硬化指数 (頸動脈の動的な伸展性あるいはスティフネス) に影響するが，運動により動脈硬化抑制効果の個人差には影響しないと結論付けることができた。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 1 件)

Sugawara J, Hayashi, K., Hirofumi Tanaka. Arterial path length estimation on brachial-ankle pulse wave velocity: validity of height-based formulas. J Hypertens. 32(4):881-9, 2014. 査読あり

### [学会発表] (計 10 件)

Hayashi, K., Iemitsu, M., Murakami, H., Sanada, K., Kawano, H., Gando Y., Tanaka, N., Kawakami R., Miyachi, M., CYP19A1 gene polymorphism of aromatase is associated with arterial stiffness in healthy Japanese people. The 64th annual meeting of the American College of Sport Medicine, Denver, USA, May 2017

Hayashi, K., Nakamura, F., Watanabe R., Takamatsu, A., Omori, T., Endothelial function in high school female rhythmic gymnasts: effects of eating disorder and mood states. The 63rd annual meeting of the American College of Sport Medicine, Boston, USA, June 2016

林貢一郎. 月経周期と循環器系機能への影響. 日本臨床スポーツ医学会公開シンポジウム (第 部 月経周期とホルモンの影響) シンポジスト, 東京, 2016 年 1 月

林貢一郎, 家光素行, 村上晴香, 真田樹義, 丸藤祐子, 川上諒子, 宮地元彦. エストロゲン受容体  $\beta$  遺伝子多型は日本人女性の有酸素性作業能力に影響する. 第 70 回日本体力医学会大会, 和歌山市, 2015 年 9 月

Hayashi, K., Nakamura, F., Watanabe R., Takamatsu, A., Omori, T., Endothelial function in high school female rhythmic gymnasts: impact of psychosomatic stress and menstrual status. The 20th Annual Meeting of the European College of Sport Science, Malmo, Sweden, July 2015

Sone, R., Hayashi, K., Shimizu K., Hanaoka Y., Watanabe K. Effects of physical and psychological stress on salivary nitric oxide in young men. The 62nd annual meeting of the American College of Sport Medicine, San Diego, USA, May 2015

Hayashi, K., Iemitsu, M., Murakami, H., Sanada, K., Gando Y., Kawakami R., Miyachi, M., Estrogen receptor-beta gene polymorphism affects cardiorespiratory fitness in Japanese women. The 62nd annual

meeting of the American College of Sport Medicine, San Diego, USA, May 2015

林貢一郎, 家光素行, 村上晴香, 真田樹義, 河野寛, 丸藤祐子, 田中憲子, 川上諒子, 宮地元彦. エストロゲン受容体  $\beta$  遺伝子多型が動脈スティフネスに及ぼす影響に性差はあるか? 第 69 回日本体力医学会大会, 長崎市, 2014 年 9 月

林貢一郎, 家光素行, 村上晴香, 真田樹義, 河野寛, 丸藤祐子, 宮地元彦. 日本人女性におけるエストロゲン受容体  $\beta$  遺伝子多型と頸動脈壁厚との関連. 第 22 回日本運動生理学会大会, 倉敷市, 2014 年 7 月

Hayashi, K., Iemitsu, M., Murakami, H., Sanada K., Kawano H., Gando Y., Tanaka N., Kawakami R., Miyachi, M. Estrogen receptor-beta gene polymorphism affects carotid arterial elasticity and wall mass in Japanese women. The 61st annual meeting of the American College of Sport Medicine, Florida, USA, May 2014

### [図書] (計 2 件)

林貢一郎, 女性アスリートによくみられる身体的トラブルとは? in もっとなっとく使えるスポーツサイエンス, pp50-51, 征矢英昭, 本山貢, 石井好二郎編, 講談社, 東京, 2017 年 4 月

林貢一郎, 中高齢女性の健康づくりに必要な運動とは? in もっとなっとく使えるスポーツサイエンス, pp137-138, 征矢英昭, 本山貢, 石井好二郎編, 講談社, 東京, 2017 年 4 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林貢一郎 (Hayashi Koichiro)  
國學院大學人間開発学部・准教授  
研究者番号: 90433474

### (2) 研究分担者

家光素行 (Iemitsu Motoyuki)  
立命館大学スポーツ健康科学部・教授  
研究者番号: 90375460

### (3) 連携研究者

宮地元彦 (Miyachi Motohiko)  
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所, 国立健康・栄養研究所 健康増進研究部・部長  
研究者番号: 60229870

村上晴香 (Murakami Haruka)  
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所, 国立健康・栄養研究所 健康増進研究部・研究員  
研究者番号: 20344880