

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22116010

研究課題名（和文）脂質メディエーター関連遺伝子のSNPと疾患

研究課題名（英文）Genes/SNPs of lipid mediators and diseases

研究代表者

清原 裕（Yutaka, Kiyohara）

九州大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：80161602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 89,700,000円

研究成果の概要（和文）：福岡県久山町の一般住民を対象に、脂質メディエーターおよびその関連遺伝子と生活習慣病の関連を検討した。脂質メディエーター関連遺伝子と生活習慣病の関連を分析すると、PLA2G3遺伝子多型はHDLコレステロールレベルと、PA-PLA1遺伝子多型はbody mass indexとそれぞれ有意な正の関連を示した。また、久山町の追跡調査の成績を用いて脂質メディエーターと生活習慣病の関連を検討したところ、血清エイコサペンタエン酸/アラキドン酸の血中濃度比の低下は虚血性心疾患発症、悪性腫瘍死亡の、血清1,25-ジヒドロキシビタミンDレベルの低下は慢性腎臓病発症のそれぞれ有意な危険因子であった。

研究成果の概要（英文）：We examined the associations of lipid mediators or their genetic polymorphisms with common diseases in inhabitants of Hisayama Town, Fukuoka. The association study of genetic polymorphisms and common diseases revealed that a polymorphism in PLA2G3 gene was associated with serum HDL cholesterol concentration, and a polymorphism in PA-PLA1 was correlated with body mass index. The cohort study in Hisayama demonstrated that a lower ratio of serum eicosapentaenoic acid to arachidonic acid was a risk factor for the development of coronary heart disease and death from malignant tumors, and that a decreased level of serum 1,25-dihydroxy-vitamin D was associated with an increased risk of chronic kidney disease.

研究分野：生活習慣病の疫学

キーワード：脂質メディエーター 遺伝子多型 エイコサペンタエン酸 アラキドン酸 ビタミンD 心血管病 悪性腫瘍 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

脂質は生体においてエネルギー源や細胞膜の主要構成成分として重要な役割を担っているが、近年脂質が受容体を介して生理活性作用を示し局所ホルモン様の作用を有することが明らかとなり、このような機能を持つ脂質は“脂質メディエーター”と称されている。プロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子、内因性カンナビノイド、リゾホスファチジン酸、スフィンゴシン1リン酸などがその例である。ステロイドホルモンや脂溶性ビタミン、あるいは脂肪酸自体も広義には脂質メディエーターの一種と考えられる。これらの脂質メディエーターは、免疫、生体防御、血圧調節、痛みや発熱、消化管活動、細胞増殖、分裂と分化制御など幅広い生理機能を担っており、このバランスの破綻によって様々な疾患が引き起こされると推定されている。しかし、ヒトにおける血清中の脂質メディエーターやその関連遺伝子群と個々の疾患との関連性についてはほとんど明らかになっていない。

そこで本研究では、日本人の標準的なサンプル集団である福岡県久山町の一般住民の検体を用いて各種脂質メディエーターとその関連遺伝子多型を測定し、生活習慣病を中心とした疾患との関連を検討する。

2. 研究の目的

(1) 脂質メディエーター関連遺伝子多型と生活習慣病の関係

久山町の断面調査の成績を用いて、脂質メディエーター関連遺伝子多型と生活習慣病との関連を明らかにする。

(2) 脂肪酸血中濃度と心血管病発症・死亡の関係

久山町の追跡調査の成績を用いて、代表的な必須脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)とアラキドン酸(AA)の濃度比が心血管病の発症や死亡におよぼす影響を検討する。

(3) ビタミン D 血中濃度と慢性腎臓病発症の関係

久山町の追跡調査の成績を用いて、脂溶性ビタミンの一つである 1,25-ジヒドロキシビタミン D の血中濃度が慢性腎臓病の発症や進行におよぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 脂質メディエーター関連遺伝子多型と生活習慣病の関係

久山町では 2002 年に循環器健診を受診した 3,328 名(受診率 78%)の住民のうち、3,196 名より遺伝子解析研究に対する同意を得ている。本研究では、この 3,196 名から得られ

たゲノム DNA を用いて、脂質メディエーターの関連遺伝子上にある遺伝子多型(一塩基多型[SNPs]または挿入欠失多型)の遺伝子型を決定した。解析の対象となった遺伝子群は、BLT1、BLT2、PAFR、S1P1、Spns2、Spns3、Spns1、DP、GPR44、FP、EP2、EP4、EP1、EP3、IP、SMS1、SMS2、SMS1、ANGPTL2、15-LOX、PLA2G2D、PLA2G3、PNPLA7、PNPLA5、PLA2G2E、PNPLA1、PNPLA8、P2Y10、GPR174、PS-PLA1、PA-PLA1beta、NPP2、PA-PLA1、LPA4、Sphk2、PLD1、PLD2 で、これらの遺伝子上にある計 118 個の多型について検討した。

評価項目は高血圧、収縮期血圧、拡張期血圧、糖尿病、空腹時血糖値、総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、肥満、body mass index (BMI)、メタボリックシンドローム、推算糸球体濾過率(eGFR)とし、それぞれ個々の多型との関連について、共分散分析またはロジスティック回帰分析を用いて統計解析を行った。

(2) 脂肪酸血中濃度と心血管病発症・死亡の関係

2002 年の循環器健診を受診した 40 歳以上の住民のうち、心血管病(脳卒中、虚血性心疾患)の既往歴がない 3,103 名を対象とした。健診時に対象者から採取し凍結保存しておいた血清サンプルを用いて EPA、AA を含む脂肪酸の濃度を測定し、その濃度比(EPA/AA 比)を算出した。

血中 EPA/AA 比と心血管病発症の関係

上記の 3,103 名からなる集団をコホートとして 2007 年までの 5 年間追跡した成績を用いて、血清 EPA/AA 比が追跡期間中の心血管病発症に及ぼす影響を検討した。血清 EPA/AA 比は 4 分位により Q1 群(<0.29)、Q2 群(0.29~0.41)、Q3 群(0.41~0.59)、Q4 群(>0.59)の 4 群に分類した。各群における心血管病罹患率は人年法を用いて算出した。また、心血管病発症のハザード比の算出には Cox 比例ハザードモデルを用い、性、年齢および代表的な心血管病危険因子の影響を多変量調整した。さらに、血管の慢性炎症の有無が EPA/AA 比と心血管病発症との関連を修飾しているか否かを明らかにするために、集団を高感度 C 反応性蛋白(hsCRP)高値群(1.0 mg/L 以上)と低値群(1.0 mg/L 未満)に分けた層別解析を行った。

血中 EPA/AA 比と総死亡および死因別死亡の関係

上記の集団を 2012 年までの 10 年間追跡した成績を用いて、EPA/AA 比と総死亡および死因別死亡との関連を検討した。死因を悪性腫瘍、循環器疾患、その他の疾患の 3 種に分類し、と同様の方法で血清 EPA/AA 比が総死亡および死因別死亡におよぼす影響を多変量調整後のハザード比を用いて評価した。

(3) ビタミン D 血中濃度と慢性腎臓病発症の関係

2002 年の循環器健診を受診した 40 歳以上の住民のうち、健診時に慢性腎臓病 (eGFR 60 mL/分/1.73m² 未満) を有する者、2007 年の循環器健診を受診しなかった者を除外した 2,417 名を対象とした。凍結保存血清サンプルを用いて 1,25-ジヒドロキシビタミン D の血中濃度を測定した。血清 1,25-ジヒドロキシビタミン D レベルは 4 分位で 79.3, 66.8 ~ 79.2, 56.5 ~ 66.7, < 56.5 (pg/mL) の 4 群に分類した。2007 年の健診で eGFR が 60 mL/分/1.73m² 未満に低下したものを慢性腎臓病発症と定義した。1,25-ジヒドロキシビタミン D の血中レベルと慢性腎臓病発症との関連はロジスティック回帰によるオッズ比を用いて評価した。また、2007 年と 2002 年の eGFR の差を追跡期間 (5 年) で割った値を eGFR 変化率と定義し、ビタミン D レベルとの関連は共分散分析を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 脂質メディエーター関連遺伝子多型と生活習慣病の関係

検討した 118 個の遺伝子多型のうち、マイナーアレル頻度が 1% 以上であった多型は 21 個であり、これらの多型と生活習慣病 (またはその指標) との関連を検討した。

その結果、phospholipase A2, group III (PLA2G3) 遺伝子の SNP rs2074735 と HDL コレステロール値との間に有意な関連を認め、メジャーアレルの CC 型と比べてマイナーアレルの GG 型では HDL コレステロール平均値 (性・年齢調整後) が有意に高かった (CC 型: 61.9 mg/dL, CG 型: 62.6 mg/dL, GG 型: 65.2 mg/dL, 傾向性 P = 0.001) (図 1)。

また、phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 homolog (PA-PLA1) 遺伝子の挿入欠失多型 rs55671452 は BMI との間に有意な関連を認め、メジャーアレルの NN 型と比べてマイナーアレルの DD 群で BMI 平均値 (性・年齢調整後) が有意に高かった (NN 型: 23.1 kg/m², DN 型: 23.7 kg/m², DD 型: 23.4 kg/m², 傾向性 P = 0.002) (図 1)。その他の 19 個の多型と前述の評価項目との間には有意な関係を認めなかった。

これらの脂質メディエーターおよび遺伝子多型が脂質異常症、肥満などの生活習慣病に及ぼす影響のメカニズムは明らかではない。今後、本研究の成果を生化学、分子生物学などの基礎研究にフィードバックすることにより、これらの脂質メディエーターの生活習慣病における役割が解明されることが期待される。

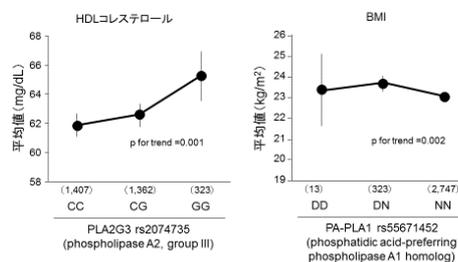


図1. 脂質メディエーター関連遺伝子多型と生活習慣病との関連

(2) 脂肪酸血中濃度と心血管病発症・死亡の関係

血中 EPA/AA 比と心血管病発症の関係

3,103 名の対象者を 5 年間追跡したところ、127 例が心血管病 (虚血性心疾患 49 例、脳卒中 83 例) を発症した。

まず、血清 EPA/AA 比のレベル別に性・年齢調整後の心血管病罹患率 (対 1,000 人年) を算出すると、Q1 群から Q4 群の順に 12.3, 7.2, 8.3, 8.6 で、EPA/AA 比と罹患率の間に明らかな関連は認めなかった。次に、血管の慢性炎症の指標である血清 hsCRP レベル別に検討した。その結果、hsCRP 高値群 (1.0 mg/L 以上) における EPA/AA 比のレベル別の心血管病罹患率 (性・年齢調整) はそれぞれ 23.3, 14.5, 12.1, 6.4 で、EPA/AA 比の低下にともない心血管病罹患率が有意に上昇した (傾向性 P = 0.006)。一方、hsCRP 低値群 (1.0 mg/L 未満) における心血管病罹患率 (性・年齢調整) は 8.2, 4.8, 7.4, 9.1 の順で、EPA/AA 比との間に明らかな関連はなかった。

さらに、EPA/AA 比の低下が心血管病の発症に及ぼす影響について、性、年齢、高血圧、糖尿病、総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、脂質異常症治療薬服用、BMI、喫煙、飲酒、運動習慣の影響を調整した多変量解析を用いて検討した (図 2)。その結果、EPA/AA 比の 0.20 低下ごとの心血管病発症のハザード比 (95% 信頼区間) は hsCRP 高値群では 1.52 (1.12 ~ 2.04)、低値群では 0.95 (0.82 ~ 1.10) であり、hsCRP 高値群でのみ EPA/AA 比の低下が他の危険因子と独立して心血管病発症のリスク上昇と関連することが明らかとなった。心血管病を病型別にみると、hsCRP 高値群では EPA/AA 比の低下は虚血性心疾患の発症リスクを有意に上昇させたが、hsCRP 低値群ではこのような関連は認めなかった。脳梗塞発症についても同様の傾向があったが統計学的には有意ではなかった。

EPA は ω -3 多価不飽和脂肪酸のひとつであり、抗炎症作用、抗凝固作用、血管拡張作用などを有することが知られている。一方、AA は ω -6 多価不飽和脂肪酸のひとつで血管の炎症メディエーターとして作用し、血管内皮障害、血小板凝集などをもたらす。EPA と AA

は動脈硬化に対して拮抗的に作用するため、その血中濃度比は心血管病発症のリスク予測に有用と考えられる。

本研究により、血清 EPA/AA 比の低下が hsCRP 高値群における心血管病、とくに虚血性心疾患の発症予測に有用なバイオマーカーとなりうる事が示された。EPA は動脈硬化性疾患や脂質異常症の治療薬として臨床で使用されている。今後、EPA 製剤を用いた臨床研究や基礎研究がさらに発展することにより、これらの脂肪酸の循環器領域における役割が明らかになることが期待される。

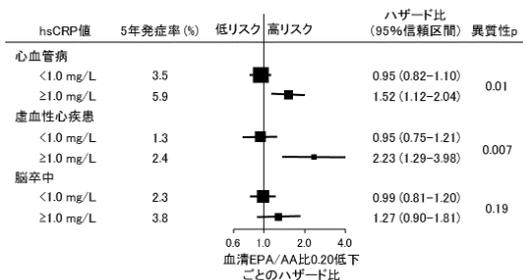


図2. 血清EPA/AA比0.20低下ごとの心血管病発症リスク

血中 EPA/AA 比と総死亡および死因別死亡の関係

対象者を 10 年間追跡したところ 421 例が死亡した。その死因別の内訳は、悪性腫瘍 121 例、循環器疾患 118 例、その他 182 例であった。

EPA/AA 比が最も高い Q4 群を基準とした場合、性・年齢調整後の総死亡のハザード比は Q3 群 0.97、Q2 群 1.08、Q1 群 1.60 で、EPA/AA 比の低下に伴い総死亡のリスクが有意に上昇した (傾向性 $P < 0.001$)。さらに、性、年齢、高血圧、糖尿病、HDL コレステロール、非 HDL コレステロール、脂質異常症治療薬、BMI、hsCRP、eGFR、喫煙、飲酒、運動習慣の影響を調整しても同様の関連を認めたと (多変量調整ハザード比: Q3 群 0.98、Q2 群 1.02、Q1 群 1.46、傾向性 $P = 0.01$)。さらに死因別にみると、EPA/AA 比の低下は悪性腫瘍による死亡の有意な危険因子であった (多変量調整ハザード比: Q3 群 1.34、Q2 群 1.34、Q1 群 1.93、傾向性 $P = 0.02$)。一方、EPA/AA 比と循環器疾患およびその他の疾患を原因とする死亡との間には明らかな関連は認めなかった。

EPA/AA 比の低下が死亡、とくに悪性腫瘍死亡と関連するメカニズムについては不明である。本研究ではイベント数が限られており悪性腫瘍を臓器別・組織型別に分けた検討を行うことは出来なかった。今後、より大規模な疫学研究でこの問題を検証するとともに、これらの脂肪酸が悪性腫瘍の発症・進展に及ぼす影響のメカニズムを基礎研究で解明する必要がある。

(3) ビタミン D 血中濃度と慢性腎臓病発症

の関係

2417 名の対象者を 5 年間追跡した時点で 378 例が慢性腎臓病を発症した。

血中 1,25-ジヒドロキシビタミン D レベルを 4 群に分けて慢性腎臓病の発症リスクを検討した。その結果、最も高い群 (79.3 pg/mL) を基準とした性・年齢調整オッズ比は、 $66.8 \sim 79.2 \text{ pg/mL}$ の群で 1.20、 $56.5 \sim 66.7 \text{ pg/mL}$ の群で 1.68、 $< 56.5 \text{ pg/mL}$ の群で 1.87 と、1,25-ジヒドロキシビタミン D レベルの低下に伴い慢性腎臓病の発症リスクは有意に上昇した (傾向性 $P < 0.001$)。この関連は、性、年齢、収縮期血圧、降圧薬服用、ヘモグロビン A1c、総コレステロール、HDL コレステロール、蛋白尿、BMI、喫煙、飲酒、運動習慣を用いて多変量調整を行っても有意であった (オッズ比は順に 1.27、1.74、1.90、傾向性 $P < 0.001$)。

また、血中 1,25-ジヒドロキシビタミン D のレベル別に eGFR の 1 年あたりの変化率を多変量調整して算出した (図 3)。その結果、1,25-ジヒドロキシビタミン D レベルの低下にともない eGFR の低下の程度が有意に大きくなっていった。つまり、血中 1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度が低いほど、腎機能がより急速に低下しやすいことが明らかとなった。

ビタミン D は生体ではカルシウムやリンの代謝に関わっているほか、血管の炎症や平滑筋細胞の増殖をコントロールしていることが明らかとなっている。その結果、ビタミン D の欠乏が全身の動脈硬化とともに腎臓における細動脈硬化、糸球体硬化、間質の線維化などをもたらし、eGFR の低下、さらには慢性腎臓病の発症に関与していると考えられる。ビタミン D の血中濃度が慢性腎臓病の発症予測のバイオマーカーとなる可能性があるが、経口によるビタミン D の補充治療が慢性腎臓病の発症を予防するか否かはいまだ明らかではない。今後、この問題を臨床試験により検証する必要があると考えられる。

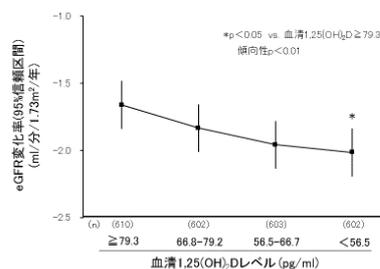


図3. 血清1,25-ジヒドロキシビタミンDレベルとeGFR変化率の関連

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140件)

Izumaru K, Ninomiya T, (他), Kiyohara Y (10 名中 10 番目). Serum 1,25-dihydroxyvitamin D and the development of kidney dysfunction in a Japanese community: the Hisayama Study. *Circ J*, 査読有, 2014; 78:732-737
DOI:10.1253/circj.CJ-13-0422

Ninomiya T, Nagata M, Hata J, (他), Kiyohara Y (12 名中 12 番目). Association between ratio of serum eicosapentaenoic acid to arachidonic acid and risk of cardiovascular disease: the Hisayama Study. *Atherosclerosis*, 査読有, 2013; 231:261-267
DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.023

Usui T, Ninomiya T, Nagata M, Takahashi O, Doi Y, Hata J, (他), Kiyohara Y (10 名中 10 番目). Angiotensin-like protein 2 is associated with chronic kidney disease in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Circ J*, 査読有, 2013; 77:2311-2317
DOI:10.1253/circj.CJ-12-1548

Hata J, Ninomiya T, (他), Kiyohara Y (14 名中 14 番目). Secular trends in cardiovascular disease and its risk factors in Japanese: half-century data from the Hisayama Study (1961-2009). *Circulation*, 査読有, 2013; 128:1198-1205
DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002424

Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Takahashi O, Mukai N, Hata J, (他), Kiyohara Y (10 名中 10 番目). Angiotensin-like protein 2 and risk of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Diabetes Care*, 査読有, 2013; 36:98-100
DOI:10.2337/dc12-0166

Miyazaki M, Doi Y, Ikeda, F, Ninomiya T, Hata J, (他), Kiyohara Y (10 名中 10 番目). Dietary vitamin A intake and incidence of gastric cancer in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Gastric Cancer*, 査読有, 2012; 15:162-169
DOI:10.1007/s10120-011-0092-7

Ohara T, Ninomiya T, Hirakawa Y, Ashikawa K, Monji A, Kiyohara Y, Kanba S, Kubo M. Association study of susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population. *Psychiatr Genet*, 査読有, 2012; 22:290-293
DOI:10.1097/YPG.0b013e3283586215

Doi Y, Ninomiya T, Hata J, (他), Kiyohara Y (9 名中 9 番目). N-terminal pro-brain natriuretic peptide and risk of cardiovascular events in a Japanese community: the Hisayama Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 査読有, 2011; 31: 2997-3003
DOI:10.1161/ATVBAHA.111.223669

Ohara T, Ninomiya T, Kubo M, Hirakawa Y, Doi Y, Hata J, (他), Kiyohara Y (9 名中 9 番目). Apolipoprotein genotype for prediction of Alzheimer's disease in older Japanese: the Hisayama Study. *J Am Geriatr Soc*, 査読有, 2011; 59:1074-1079
DOI:10.1111/j.1532-5415.2011.03405.x

Kawamura R, Doi Y, Osawa H, Ninomiya T, Hata J, (他), Kiyohara Y (10 名中 10 番目). Circulating resistin is increased with decreasing renal function in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Nephrol Dial Transplant*, 査読有, 2010; 25:3236-3240
DOI:10.1093/ndt/gfq155

〔学会発表〕(計 6 7 件)

Nagata M, Ninomiya T, Hata J, Kiyohara Y. Association between the ratio of serum EPA to AA and cause-specific mortality in a general Japanese population: the Hisayama Study. 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators. February 10, 2015, Tokyo, Japan.

清原 裕. 糖尿病と癌 - 久山町研究から. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013 年 5 月 17 日, 熊本市.

清原 裕. 肥満症と動脈硬化. 第 33 回日本肥満学会, 2012 年 10 月 11 日, 京都市.

清原 裕. 糖尿病と認知症: 久山町研究. 第 2 回認知症予防学会学術集会, 2012 年 9 月 9 日, 北九州市.

清原 裕. 高血圧とメタボリックシンドロームの疫学. 第 34 回日本高血圧学会総会, 2011 年 10 月 21 日, 宇都宮市.

〔図書〕(計 1 8 件)

清原 裕. 脳とこころのプライマリケア 2: 知能の衰え, 章. 総論, 認知症の疫学. 池田 学 (編). シナジー, 2013, pp12-24

清原 裕. カラー版 内科学. 3 章: 疾患の疫学, 3: コホート研究: 久山町研究. 門脇 孝, 永井良三 (編). 西村書店, 2012, pp100-104

清原 裕. 脳卒中症候学, 総論: 脳卒中症候学を理解するために, 9. 脳血管障害の臨床疫学. 田川皓一 (編). 西村書店, 2010, pp93-97

〔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

九州大学大学院医学研究院環境医学分野の
ホームページ
<http://www.envmed.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清原 裕 (KIYOHARA, Yutaka)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：80161602

(2) 研究分担者

久保 充明 (KUBO, Michiaki)
理化学研究所・総合生命医科学研究センター・副センター長
研究者番号：30442958

二宮 利治 (NINOMIYA, Toshiharu)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30571765

秦 淳 (HATA, Jun)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：00448432

(3) 連携研究者

該当なし