

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：82613

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23240089

研究課題名(和文)日本人の身体活動量に関する環境・遺伝要因とその相互作用に関する網羅的研究

研究課題名(英文)The comprehensive study for the interaction between environmental and genetic factors associated with amount of physical activity of Japanese population

研究代表者

宮地 元彦 (Miyachi, Motohiko)

独立行政法人国立健康・栄養研究所・健康増進研究部・部長

研究者番号：60229870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,200,000円

研究成果の概要(和文)：身体活動の個人差は大きい。それには、1)環境、2)遺伝や形質、さらに、3)疲労や感染、の違いが関連すると推測される。本研究では、高強度身体活動の多寡は、染色体4番と染色体8番を中心に複数のSNPsと関連すること、ミトコンドリアDNA多型は筋力や瞬発力と関連すること、自宅近隣の買い物や生活に必要な環境が歩行や身体活動に関連すること、TLR5を介した腸内免疫と腸内細菌叢の相互作用が身体活動の多寡に関連すること、などが示唆された。以上から、身体活動の多寡にはいくつかの内的ならびに外的な要因が関与し、免疫が身体活動に関与する可能性を初めて示唆した。

研究成果の概要(英文)：There is large individual variations in physical activity. This may be associated with differences in the environmental, genetic and trait, and fatigue and infectious factors. Our studies indicated that 1) high-intensity physical activity was associated with a plurality of SNPs in chromosome 4 and 8, 2) mitochondrial DNA polymorphism was associated with the strength and agility, 3) shopping and living environments were associated with walking and physical activity, and 4) the interaction of intestinal immunity and intestinal flora were associated to changes in physical activity. These findings suggest that the variability of physical activity may be affected by some internal and external factors, moreover immunity and infection.

研究分野：運動生理学

キーワード：身体活動 環境 遺伝 免疫 疫学 生理学 生化学

日本人の身体活動量に關与する環境・遺伝要因とその相互作用に關する網羅的研究
總括研究報告書

独) 国立健康・栄養研究所 宮地元彦

1. 研究開始当初の背景

運動・身体活動は量も実施パターンも個人差が極めて大きく、かつ個人内変動も大きい。我々が研究対象とするコホートの場合、1日あたりの中強度以上の活動時間はわずか2分!から5時間14分の間に幅広く分布している。このような身体活動の個人差や変動のメカニズムを明らかにすることは、日本人の身体活動量の低下に歯止めをかけるために必要不可欠である。

身体活動の決定には様々な要因が複雑に關与する。1) 気候、公共交通機関などの「環境要因」と、職業、所得、社会支援などの「社会的要因」に代表される「外的要因」、2) 脳・神経・筋の機能、体力、痛みや傷害、肥満などの「生理的要因」と、DNAの変異や多型などにより生じる「遺伝的要因」に分類される「内的要因」が關与していると考えられる。さらに、これらとは異なる新しい可能性として、3) 感染症や免疫の働きは疲労や痛みを介して身体活動の低下に關連する「疲労・免疫要因」をあげることができる。(図1参照)。

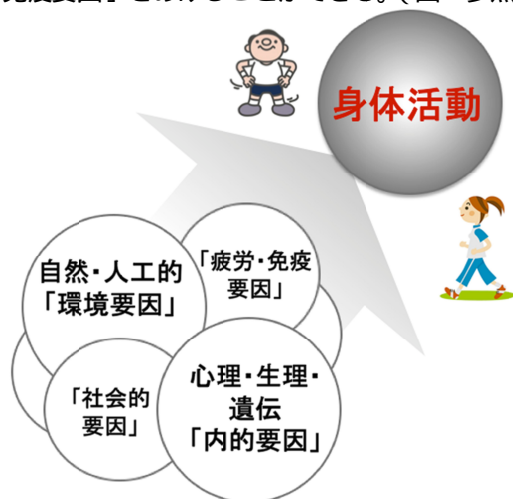


図1. 身体活動の多寡に影響を与えられ
る要因

2. 研究の目的

そこで本研究では、これらの複雑に絡み合う要因を網羅的に押さえつつ、「内的要因」ならびに、「外的要因」と「内的要因」の相互作用により生じる「疲労・免疫要因」について、様々な研究手法を用いて検討することを目的とし、以下の5つの研究を実施した。

日常の身体活動に影響を及ぼす遺伝的影響
~ 網羅的解析 ~ (GWAS 研究: 村上晴香)
身体活動や体力に關わるミトコンドリア遺

伝子多型 (ミトコンドリア研究: 福典之)

郵便番号を使って評価された自宅近隣の環境要因と身体活動の横断的關連 (郵便番号研究: 安永明智)

「内的要因」と「外的要因」との相互作用により生じる「疲労・免疫要因」について (免疫研究: 矢野博己)

遺伝的素因による心血管疾患リスクの増大に体力レベルの違いが及ぼす影響 (効果研究: 家光素行、真田樹義)

3. 研究の方法

3- GWAS 研究

本研究は、日常の身体活動に影響を及ぼす遺伝的要因を明らかにするために Genome Wide Association Study (GWAS) を行った。本研究の対象者は、Nutrition and Exercise Intervention Study (NEXIS) の登録者 869 名から選出された。869 名のうち採択基準を満たした 518 名において SNP チップ (Illumina 社製) を用いた遺伝子解析が行われた。Genotyping 後の Quality Check により 12 名が除外され、最終的に 506 名が本研究の解析対象者とされた。506 名の genotyping データは 1000 genome プロジェクトにおけるアジア人の SNP データを基に imputation が行われ、最終的に 6,034,498 SNP について身体活動との關連が検討された。身体活動については 3 次元加速度計を用いて評価をした。3 メッツ以上の強度における身体活動量 (メッツ・時) (以下、中高強度身体活動量) および歩数の 1 日あたりの平均値を算出した。また、1 日における 1.1~1.5 メッツ未満の Sedentary 時間、1.5~3.0 メッツ未満の低強度身体活動時間、3.0~6.0 メッツ未満の中強度身体活動時間、6.0 メッツ以上の高強度身体活動に費やした時間についても算出した (分/日)。

3- ミトコンドリア研究

本研究の対象者は、NEXIS の登録者 869 名から選出された。そのうち、23~79 歳の男女 480 名 (男性 153 名・女性 327 名) を本研究の対象とした。

日常における身体活動は、に準じ、本研究では 3 メッツ以上の強度の身体活動量、いわゆる中高強度身体活動量と歩数を用いた。最大酸素摂取量はダグラスバッグ法により、筋量は DXA 法により評価した。また、脚伸展パワー・垂直跳びを測定した。

また、被検者の静脈血より総 DNA を抽出し、蛍

光ビーズによる多重解析システム(Luminex® 100TM)を用いて mtDNA に点在する 187 カ所の多型を網羅的に解析した。この方法から得られた多型から対象者を大きくマクロハプログループ N とマクロハプログループ M に大別した。さらに、マクロハプログループ N は、ハプログループ F、B、A、N9a、N9b に分類し、マクロハプログループ M は、ハプログループ M7a、M7b、M*、G2、G1、D5、D4 に分類した。

3- 郵便番号研究

本研究の参加者は、長野県佐久市内在住の 30 ~ 84 歳の男女 1274 名であった。

対象者の身体活動量は、 に準じた。本研究では、歩数については、座位中心なライフスタイルか否か(1日あたり平均 5000 歩以上/未満)、不活動なライフスタイルか活動的なライフスタイルか(1日あたり 7500 歩以上/未満)の 2 つのカットオフ値を設定し、それぞれに関連する要因について分析した。一方、中強度以上の身体活動量に関しては、健康づくりのための身体活動基準 2013 の身体活動推奨基準(厚生労働省)に準じて、65 歳未満に関しては、週あたり 23METs 以上/未満、65 歳以上に関しては週あたり 10METs 以上/未満に基準を設定し、それぞれに関連する要因について検討を行った。

環境要因は、先行研究を参考に設定した佐久市内の 17 種類の施設について、佐久市役所の公式ホームページ及び NTT のタウンページから、それぞれ所在地の住所と郵便番号を抽出した。その後、抽出された 17 種類の施設を同種類別にまとめ、7 種類に再分類した(表 1)。そしてこれらの施設を 7 桁の郵便番号別に分類し、対象者の自宅住所の郵便番号と関連づけた。

分析は、身体活動の 3 つの基準をそれぞれ従属変数、満年齢、性別(1= 男性、0= 女性)、Body Mass Index (BMI)、環境要因(7 種類に分類された施設の合計数)を独立変数とした多重ロジスティック回帰分析を実施した。

3- 免疫研究

実験 1 - 急性運動と TLR5

10 週齢の C3H/HeN 雄マウスを運動群(n=11)と安静群(n=14)に分け、運動群にはトレッドミルを用いた急性運動を負荷した。運動終了後、フラジェリン(FG)を静注し、TLR5 免疫応答性について血漿 TNF- α 濃度で評価した。

実験 2 - TLR5 遺伝子欠損マウス自発運動

4 週齢の C57BL/6 雄性野生型(WT, n=24)マウスおよび同週齢の TLR5 遺伝子欠損(KO5, n=24)マウスを使用し、それぞれ自発運動条件(wheel

running: WR)と安静条件(control: Ctrl)とに分けた。飼育ケージ内に設置した回転輪による自発運動は 20 週間実施した。自発運動量、体重および摂食量は毎週測定し、実験終了後、組織内 mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で測定し、腸内細菌の解析は、次世代シーケンス法を用いた。

実験 3 - 便移植による身体活動量 -

4 週齢の C57BL/6 雄性マウス(n=51)を使用し、実験 2 で採取した各盲腸便[野生型マウス 非運動条件便移植群(WT Ctrl)、野生型マウス 自発運動条件便移植群(WT WR)、TLR5KO マウス 非運動条件便移植群(KO5 Ctrl)、TLR5KO マウス 自発運動条件便移植群(KO5 WR)および疑似移植条件として滅菌 PBS 投与群(PBS)]を移植した。便移植は、まず抗生剤で除菌を実施後、各盲腸便を、週 1 回の頻度で 3 週間、胃内ゾンデを用いて投与した。食餌は、高脂肪食(カロリーベースで 60%脂質)を使用し、8 週間の飼育後、24 時間便を採取した後、回転ゲージを用いて自発運動量の測定を 7 日間行った。そのほか、実験 2 と同様の測定項目について解析を行った。

3- 効果研究

本研究は、NEXIS に登録されている 18 歳から 70 歳までの男女 877 名(男性 241 名、女性 636 名)を対象とした。被験者は、男女の各年代ごとの最高酸素摂取量(VO₂peak)の中央値よりも高値の場合、高体力(High-Fit)群、低値の場合低体力(Low-Fit)群の 2 群に分けた。

12 時間以上の絶食後、早朝より測定を開始した。身長、体重を測定の後、上腕の収縮期血圧(SBP)および拡張期血圧(DBP)は十分な安静時間をとった後に血圧計(オムロン・コーリン社製)にて測定した。続けて、頸動脈 スティフネスは、右頸動脈から超音波診断装置(Sonosite 180-PLUS, Sonosite 社製)とストレインゲージトランスデューサープローブ(APT-301, Millar 社製)を用いて計測し、ccIMT は超音波診断装置(Sonosite 社製)を用いて計測した。VO₂peak の測定は、自転車エルゴメーター(828E: Monark 社製)を使用し、ダグラスバック法により測定した。

遺伝子多型の判定遺伝子多型は、Real-time PCR (Applied Biosystems 7500)を用いて TaqMan probe 法による遺伝子多型の判定を行った。DNA 抽出は、血液中の白血球 DNA から QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN 社製)によって抽出した。

4. 研究の成果

4- GWAS 研究

歩数、中高強度身体活動、Sedentary 時間、低・

中・高強度身体活動時間について、6,034,498 SNPs との関連を検討したところ、高強度身体活動時間において、P 値が $1e-8$ 未満であった SNP が最も多く認められた。一方で、それ以外の身体活動指標については、歩数:1 個、中高強度身体活動:0 個、Sedentary 時間:0 個、低強度身体活動時間:0 個、中強度身体活動時間:0 個と、関連のある SNP は少なかった。高強度身体活動時間に対する Manhattan plots を図 2 に示した。P 値が $1e-8$ 未満を示した SNP 数は 99 個であった。

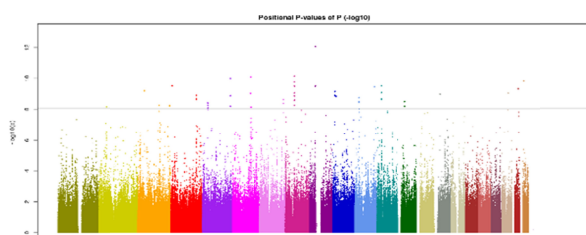


図 2 . 高強度身体活動時間に対する Manhattan Plots

このうち、最も低い P 値を示したものは染色体 9 番上に存在していた。染色体 4 番の染色体位置 155.7Mb ~ 155.8Mb の領域において、p 値が $1e-8$ 未満を示した SNP は 28 SNPs であった。この領域には遺伝子はコードされていなかったが、近隣の遺伝子として、*LRAT*、*RBM46*、*NPY2R* 遺伝子などが存在していた。NPY (neuropeptide Y) は、食欲に関わるホルモンであり、中枢において摂食を調整している。NPY2R は、NPY の 5 つの受容体のうちの 1 つである。この遺伝子上あるいはプロモーター領域に存在している SNP は肥満と関連していることが報告されている (Hunt et al, 2011)。

また染色体 8 番の 56.1Mb ~ 56.2Mb の領域においては、 $1e-8$ 未満である SNP が 23 SNPs が存在していた。この領域は *XKR4* 遺伝子の領域に位置していた。*XKR4* は通常、kell 血液型に関わる複合体の一部であることが知られているが、近年の研究により脳においても発現していることが報告されており、ADHD との関連も報告されている (Lantieri et al, 2010)。この遺伝子における SNPs が高強度身体活動発現にどう関与するかについては今後の研究が必要である。

4- ミトコンドリア研究

身体活動量や歩数にマクロハプログループ N と M の間において有意な差は認められなかった。一方、N を有する群の脚伸展パワーは、M を有する群と比較して有意な高値であった (18.2 ± 6.0 vs. 17.1 ± 5.6 , $p < 0.05$)。また、N を有する群の垂直

跳びは、M を有する群と比較し高値を示す傾向にあった (38.0 ± 10.2 vs. 36.1 ± 9.5 , $p = 0.0577$)。その他の握力、除脂肪体重、四肢の除脂肪体重は両群間に有意の差を認めなかった。また、12 種のハプログループ間の比較においてはいずれのパラメータも有意の差を認めなかった。筋収縮は、神経刺激で筋小胞体からカルシウムが放出され、細胞質のカルシウム濃度が上昇すると起こるので、カルシウムが解糖系を促進し、筋収縮に必要な ATP を供給する。このように、グリコーゲン分解と筋収縮が連動し、これに mtDNA 多型やミトコンドリアハプログループが関与している可能性がある。

4- 郵便番号研究

5000 歩を基準とした 1 日あたりの歩数 (1 = 5000 歩以上、0 = 5000 歩未満) を従属変数、年齢、性別、BMI、環境要因を独立変数として、多重ロジスティック回帰分析を実施した結果、65 歳未満のグループでは、いずれの変数も統計学的に有意な関連を示さなかった。一方、65 歳以上のグループでは、歩数に対して、自宅近隣のスーパー・コンビニエンスストアの数 (1.40; 1.01-1.93) 及び郵便局・銀行の数 (1.39; 1.02-1.88) が統計学的に有意な正の関連を、また年齢 (0.89; 0.82-0.96) 及び公共・民間スポーツ施設の数 (0.66; 0.46-0.94) が有意な負の関連を示した。特に自家用車の使用が困難となる高齢者世代においては、自宅近隣に日常生活を送るために必要な施設が充実していることは、外出の促進や日常身体活動量の増加と関連すると考えられる。

7500 歩を基準とした 1 日あたりの歩数 (1 = 7500 歩以上、0 = 7500 歩未満) を従属変数、とした場合、環境要因は関連がなかった。

65 歳未満は 23METs (1 = 23 METs 以上、0 = 23METs 未満)、65 歳以上は 10METs (1 = 10 METs 以上、0 = 10METs 未満) を基準とした 1 日あたりの中強度以上の身体活動量を従属変数、年齢、性別、BMI、環境要因を独立変数として、多重ロジスティック回帰分析を実施した結果、65 歳未満のグループでは、年齢 (1.02; 1.00-1.04)、性別 (1.39; 1.06-1.82)、スーパー・コンビニエンスストアの数 (1.15; 1.00-1.33) が統計学的に有意な正の関連を、BMI (0.94; 0.90-0.98) が有意な負の関連を示した。一方、65 歳以上のグループでは、年齢 (0.85; 0.78-0.92) のみが統計学的に有意な負の関連を示した。

本研究では身体活動量や歩数の評価に活動量計を用いて客観的に行った。従来の環境研究は全て質問紙によるものであり、本研究のオリジナリティは高い。佐久市内の郵便番号数は 71 であり、一

郵便番号あたりの面積は平均 5.96km²であった。GIS を使って自宅近隣の環境要因を評価した研究と同程度の徒歩で片道 10 分~20 分以内の範囲であり、自宅近隣の歩行や日常生活による身体活動に関する環境要因を適切に評価できる。

4- 免疫研究

強い炎症を誘導する TLR5 発現は、一過性の運動に限らず、運動習慣によっても亢進することを見出した。したがって、TLR5 遺伝子を欠損したマウスでは、運動による TLR5 を介した強い炎症誘導が抑制されると考えられるため、身体活動性が高まるのではないかと仮説し、TLR5 遺伝子欠損マウスを用いた自発運動の変化について検討した。仮説通り、TLR5 遺伝子欠損マウスでは、回転輪を用いて評価した自発運動量が野生型マウスと比較して 14 週目以降から有意に高まることが確認された(図3)。

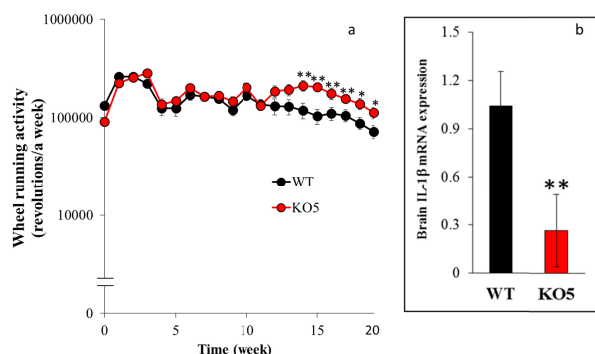


図3 . TLR5 遺伝子欠損マウスを用いた自発運動習慣の変化と脳内 IL-1 発現

便移植の結果、野生型マウスで安静条件を負荷したマウスから採取した便移植によって、移植を受けたマウスの自発運動量が最も低く、逆に TLR5 遺伝子欠損で運動習慣のあったマウスの便を移植されたマウスが最も高い活動性を示した。TLR5 がマウスの自発運動を負に制御する因子の一つであると同時に、それが腸内細菌の変化を介して調整される可能性が示唆された。

4- 効果研究

High-Fit 群において、体重、体脂肪率、中性脂肪、血糖値は Low-Fit 群と比較して有意に低値を示し、HDL コレステロールおよび V02peak は有意に高値を示した。

FABP2 や ADRB3 の遺伝子多型間での比較の結果、すべての項目において有意な差は認められなかった。FABP2 遺伝子の AlaAla 型は、Low-Fit 群において頸動脈 スティフネス、SBP および DBP は

ThrThr 型よりも有意に高値を示したが、High-Fit 群では多型間に差が認められなかった。一方、ADRB3 遺伝子の ArgArg 型の Low-Fit 群において ccIMT は TrpTrp および TrpArg 型よりも有意に高値を示したが、High-Fit 群では多型間に差が認められなかった。以上の結果から体力レベルが低い場合、心血管疾患リスクを増大させるが、体力レベルが高い場合、心血管疾患リスクに対する遺伝的な影響を消失させることが示唆された。

5 つの研究の結果から、身体活動の多寡に関するいくつかの内的ならびに外的な要因を示唆することができた。さらに新しい可能性として、免疫の機能が身体活動に関与する可能性を初めて示唆した。人や動物の身体活動発現のメカニズムを明らかにするために、身体活動に関連する様々な要因を探索する研究を一層推進する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

Murakami H, Iemitsu M, Fuku N, 他 The Q223R polymorphism in the leptin receptor associates with objectively measured light physical activity in free-living Japanese. *Physiol Behav.* 2014;129:199-204.

Uchida, M., Oyanagi, E., Kawanishi, N., 他 Exhaustive exercise increases TNF- α production in response to flagellin via up-regulation of toll-like receptor 5 in large intestine of mice. *Immunol. Lett.* 158 (1-2): 151-158, 2014.

Garatachea N, Fuku N, He ZH, 他 PTK2 rs7460 and rs7843014 polymorphisms and exceptional longevity: a functional replication study. *Rejuvenation Res.* 36(6):9733, 2014.

Garatachea N, Emanuele E, Calero M, 他 ApoE gene and exceptional longevity: Insights from three independent cohorts. *Exp Gerontol.* 53:16-23, 2014.

Mikami E, Fuku N, Murakami H, 他 ACTN3 R577X Genotype is Associated with Sprinting in Elite Japanese Athletes. *Int J Sports Med.* 35(2):172-7, 2014.

Pinósa T, Fuku N, Cámaraa Y 他 The rs1333049 polymorphism on locus 9p21.3 and extreme longevity in Spanish and Japanese cohorts. *Age (Dordr).* 36(2): 933-43, 2013.

Mikami E, Fuku N, Kong QP 他 Comprehensive analysis of common and rare mitochondrial DNA variants in elite Japanese athletes: A case-control study. *J Hum Genet.* 58(12):780-7, 2013.

Wang G, Mikami E, Chiu LL 他 Association

analysis of ACE and ACTN3 in elite Caucasian and East Asian swimmers. Med Sci Sports Exerc. 45(5):892-900, 2013.

Kato T, Fuku N, Noguchi Y 他 Mitochondrial DNA haplogroup associated with hereditary hearing loss in a Japanese population. Acta Otolaryngol. 132(11):1178-82, 2012.

Fuku N, Murakami H, Iemitsu M 他 Mitochondrial macrohaplogroup associated with muscle power in healthy adults. Int J Sports Med. 33(5):410-4, 2012.

Fuku N, Mori S, Murakami H 他 Association of 29C>T Polymorphism in the Transforming Growth Factor- β 1 Gene with Lean Body Mass in Community-Dwelling Japanese Population. Geriatr Gerontol Int. 12(2):292-7, 2012.

Iemitsu M, Fujie S, Murakami H 他. Higher cardiorespiratory fitness attenuates the risk of atherosclerosis associated with ADRB3 Trp64Arg polymorphism. Eur J Appl Physiol 114: 1421-1428, 2014

Fujie S, Iemitsu M, Murakami H 他. Higher cardiorespiratory fitness attenuates arterial stiffening associated with the Ala54Thr polymorphism in FABP2. Physiol Genomics 45: 237-242, 2013.

[学会発表](計3件)

村上晴香. シンポジウム: これ以上の身体活動低下を防ぐための社会環境の整備と改善: 身体活動・運動行動に影響を及ぼす遺伝要因. 第73回日本公衆衛生学会. 2014. 11. 栃木

村上晴香, 福典之, 川上諒子他. 日常身体活動量の個人差とドーパミン受容体(DRD2)遺伝子多型との関連. 第69回日本体力医学会. 2014.9. 長崎

Murakami H, Fuku N, Iemitsu M 他. Effect of DRD2/ANKK1 genotype on exercise behavior and performance in Japanese athlete and control. 61st American College of Sports Medicine. 2014.5. Orlando.

[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

宮地元彦(MIYACHI, Motohiko) 独立行政法人国立健康・栄養研究所・健康増進研究部・部長 研究者番号: 60229870

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

村上晴香(MURAKAMI, Haruka) 独立行政法人国立健康・栄養研究所・健康増進研究部・研究員 研究者番号:20344880

真田樹義(SANADA, Kiyoshi) 立命館大学・スポーツ健康科学部・教授 研究者番号:50421227

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

福典之(FUKU, Noriyuki) 順天堂大学大学院・スポーツ健康科学研究科・准教授 研究者番号:40392526

安永明智(YASUNAGA, Akitomo) 文化学園大学・現代文化学部・准教授 研究者番号:30289649

矢野博己(YANO, Hiromi) 川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授 研究者番号:20248272

(4) 研究協力者

川上諒子(KAWAKAMI, Ryoko)