

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670306

研究課題名（和文）メンデル無作為群間比較アプローチを用いた生活習慣病の原因因子の探索

研究課題名（英文）A Mendelian randomization approach for the identification of causal association in lifestyle disease

研究代表者

畝 博（Une, Hiroshi）

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40122676

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、まず、生活習慣などの曝露要因に影響する遺伝子多型を検討し、様々な曝露と生活習慣病との因果関係を明らかにするため、メンデル無作為群間比較研究を実施した。解析した遺伝子多型の中から、アルデヒド脱水素酵素ALDH2のrs671遺伝子多型は飲酒習慣と強い相関が認められた。そこで、rs671遺伝子多型を操作変数としたメンデル無作為群間比較を実施した。その結果、アルコール摂取量と血清脂質（LDLコレステロール）および血圧に有意な関連が認められた。しかしながら、中性脂肪と糖尿病の指標となるヘモグロビンA1cとは有意な関連は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：We evaluated genetic polymorphisms affecting exposure, such as lifestyle factors and carried out a Mendelian randomization study to elucidate the causal associations. Aldehyde dehydrogenase 2 SNP rs671 was strongly related to alcohol consumption. Therefore Mendelian randomization study that used rs671 SNP as an instrumental variable was conducted. As a result, there are significant association between LDL cholesterol or blood pressure and alcohol consumption. However, we did not find the association between alcohol consumption and triglyceride or haemoglobin A1c which is an index of diabetes mellitus.

研究分野：衛生学

キーワード：遺伝疫学 遺伝子多型 生活習慣病 疫学

1. 研究開始当初の背景

ヒト遺伝学研究と健康との関連を明らかにするために行われたヒトゲノムプロジェクトの成果は、人種集団、個人間の違いを探る足場となった。さらに遺伝子の多様性を理解するために、国際 Hap Map プロジェクトがスタートし、遺伝子類似性および相違性のパターンが調べられてきた。現在、Common disease, common variant の仮説に基づき、Genome wide association study (GWAS)により疾患の原因となる遺伝子多型がわずか数年間で数千も報告されており、これまでに多くの遺伝子研究が行われ、遺伝子と疾患との関連に明らかとなってきた。このように疾患の原因となる一塩基多型 (SNP) が報告されているが、それと同時に多くの SNP が疾患感受性に対してそれほど大きな影響をもたらしていない可能性も指摘されている。その一因として肥満などの生活習慣病は、喫煙、飲酒および運動習慣といった生活習慣をはじめ、様々な要因が複雑に絡み合って発症すると考えられており、従来の疫学研究のみでは疾患の発症メカニズムおよび環境要因との因果関係を明らかにすることは困難であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、平成 23 年以降に DNA サンプルの提供を受けた福岡県下の A 企業の男性労働者を対象に、研究開始当初にはまだ報告数が少なかったメンデル無作為群間比較という統計学的手法を用い、これまでに明らかとなっていなかった生活習慣病と環境要因との因果関係を推論する。本研究では、これまでに飲酒習慣または飲酒量の良い指標と考えられているアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) の遺伝子多型の一つである rs671 を用い、これまでに飲酒との関連が報告されている血圧および血清脂質、ヘモグロビン A1c (HbA1c) との関連について検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 対象者

福岡県下の A 企業の男性労働者で、2011 年、2012 年の定期健康診断受診した 1438 名のうち、ALDH2 遺伝子多型の測定に同意が得られた 1433 名 (参加率: 99.7%) とした。

(2) 測定データ

喫煙習慣、飲酒習慣、運動習慣などの生活習慣に関するデータは、自記式質問票より得た。HbA1c、収縮期血圧、拡張期血圧、HDL コレステロール (HDL-C)、LDL コレステロール (LDL-C) などの生化学データは、健康診断のデータより得た。また、健康診断時に採血された血液の余剰の提供を受け、血液サンプルとし、遺伝子多型の測定に用いた。

HbA1c 値 6.5%または、糖尿病治療薬を服用している者を糖尿病と定義した。低 HDL-C 血症は、HDL-C 値が 40mg/dL とした。高血圧

は、拡張期血圧 140mmHg または収縮期血圧 90mmHg または、高血圧治療薬を服用している者とした。

(3) 飲酒習慣

飲酒習慣は、自記式質問表の項目の飲酒習慣および 1 日の飲酒量 (合) より、() ほとんど飲まない、() 毎日または時々飲酒で 1 合未満の者、() 毎日または時々飲酒で、1~2 合未満の者、() 毎日または時々飲酒で 2~3 合未満、() 毎日または時々飲酒で 3 合以上の 5 群に分類した。

(4) 遺伝子多型の測定

提供を受けた血液サンプルは、Qiagen の DNA 抽出キット (QIAamp DNA Blood Kit) を用い、DNA サンプルを抽出した。抽出した DNA サンプルは、QP 法を用い、ALDH2 遺伝子多型 (rs671) を測定した。

(5) 統計解析

すべての統計解析は、R for Windows ver.3.2.2 を用いた。ALDH2 遺伝子多型 rs671 遺伝子型別の比較では、連続変数は、1 元配置分散分析、離散変数は、 χ^2 検定を用いた。ALDH2 (rs671) 遺伝子多型の A アレルの数に基づき、ALDH2 (rs671) 遺伝子多型を Additive モデルと仮定した。ALDH2 (rs671) 遺伝子多型と飲酒習慣および血液データとの関連は、正規分布に基づく線形モデルを用いた。メンデル無作為群間比較には、ALDH2 (rs671) 遺伝子多型を操作変数とし、2 段階最小二乗法を用いた。統計学的有意差は $P < 0.05$ とした。

(6) 倫理

本研究は、福岡大学医の倫理審査委員会および国立医薬品食品衛生研究所倫理審査委員会の承認を得て、実施した。

4. 研究成果

まず解析対象者 1433 名のうち、G/G アレル保有者は 814 名 (56.9%)、G/A アレル保有者は 530 名 (37.0%)、A/A アレル保有者は 87 名 (6.1%) であった。ハーディ・ワインバーグ平衡は認められた ($P=1.0$)。

対象者の ALDH2 (rs671) 遺伝子型別の基本属性を表 1 に示した。拡張期血圧 ($P < 0.05$)、HDL-C 値 ($P < 0.01$)、LDL-C/HDL-C 比 (LHR) ($P < 0.05$)、飲酒習慣 ($P < 0.001$)、糖尿病 ($P < 0.05$)、高血圧の有病率 ($P < 0.01$) に有意な差が認められた。

次に我々は、ALDH2 (rs671) 遺伝子多型と飲酒習慣に相関があるかどうかを確認した (表 2)。ALDH2 (rs671) 遺伝子多型は、飲酒習慣と有意な負の相関が認められた。また、その F 値は、43.34 であった。よって、ALDH2 (rs671) 遺伝子多型は、飲酒習慣の強力な操作変数となることが認められた。

さらに我々は、ALDH2 (rs671) 遺伝子多型と BMI、血圧 (収縮期血圧、拡張期血圧) お

よび生化学検査値との相関を検討し、ALDH2（rs671）遺伝子多型を操作変数としたメンデル無作為群間比較が可能となるアウトカムを検討した（表3）。

表 1. ALDH2（rs671）遺伝子型別の対象者の基本属性

	G/G		G/A		A/A		P
人数、（%）	814	(56.9)	530	(37.0)	87	(6.1)	
年齢、平均（SD）	43.1	(11.2)	43.1	(10.9)	43.9	(11.9)	0.81
BMI、平均（SD）	24.1	(3.6)	23.9	(3.7)	23.4	(3.1)	0.18
収縮期血圧、平均（SD）	128.3	(17.3)	126.5	(15.6)	125.0	(15.9)	0.07
拡張期血圧、平均（SD）	78.8	(12.1)	77.3	(11.5)	75.9	(10.8)	P<0.05
HDL-C、平均（SD）	59.0	(14.5)	57.4	(13.1)	54.5	(10.8)	P<0.01
LDL-C、平均（SD）	118.5	(31.2)	121.1	(31.6)	122.3	(29.2)	0.22
中性脂肪、平均（SD）	150.0	(112.8)	137.9	(103.2)	127.0	(76.9)	0.17
LHR、平均（SD）	2.1	(0.8)	2.2	(0.8)	2.3	(0.7)	P<0.05
HbA1c、平均（SD）	5.1	(0.8)	5.1	(0.6)	5.0	(0.6)	0.23
飲酒習慣、人数(%)							P<0.001
ほとんど飲まない	46	(7.9)	99	(25.6)	65	(92.9)	
1 合未満	109	(18.8)	119	(30.7)	2	(2.9)	
1～2 合未満	174	(30.0)	74	(19.1)	1	(1.4)	
2～3 合未満	202	(34.8)	78	(20.2)	2	(2.9)	
3 合以上	49	(8.4)	17	(4.4)	0	(0.0)	
喫煙習慣、人数(%)							0.29
吸わない	211	(25.9)	148	(27.9)	32	(36.8)	
やめた	179	(22.0)	114	(21.5)	15	(17.2)	
吸う	424	(52.1)	268	(50.6)	40	(46.0)	
糖尿病、人数(%)	43	(5.4)	16	(3.0)	1	(1.1)	P<0.05
低 HDL 血症、人数(%)	53	(6.5)	28	(5.3)	6	(6.9)	0.62
高血圧、人数(%)	285	(35.2)	151	(28.6)	19	(21.8)	P<0.01

表 2. 飲酒習慣と ALDH2（rs671）遺伝子多型との相関

	β	標準誤差	P
飲酒習慣	-0.85	0.06	P<0.001

F 値=43.34

BMI (BMI がアウトカムの場合を除く)、年齢、運動習慣、飲酒習慣、喫煙習慣で補正すると、BMI、拡張期血圧、HDL-C には有意な負の相関が認められた。収縮期血圧、LDL-C、中性脂

肪、HbA1c では有意な相関は認められなかった。

そこで、表 3 で ALDH2（rs671）遺伝子多型と直接相関関係が認められなかった収縮期血圧、LDL-C、中性脂肪および HbA1c をアウトカムとし、2 段階最小二乗法を用い、飲酒習慣との因果関係について検討を行った。その結果、収縮期血圧および LDL-C に有意な関連が認められた。しかしながら、中性脂肪と HbA1c には有意な関連は認められなかった。

表 3. ALDH2（rs671）遺伝子多型と BMI、血圧および生化学検査値との相関

	Crude		Adjusted*	
	β	P	β	P
BMI	-0.29	0.07	-0.40	0.04
収縮期血圧	-1.68	0.02	-1.22	0.17
拡張期血圧	-1.50	0.00	-1.69	0.01
HDL-C	-1.93	0.00	-2.34	0.00
LDL-C	2.30	0.09	1.07	0.53
LHR	0.10	0.00	0.08	0.06
中性脂肪	-11.82	0.01	-3.88	0.51
HbA1c	-0.05	0.09	-0.07	0.12

* 年齢、BMI、飲酒習慣、喫煙習慣、運動習慣で補正した。

表 4. ALDH2（rs671）遺伝子多型を操作変数とした最小二乗法による飲酒習慣と収縮期血圧、血清脂質および HbA1c との関連

	β	95%CI		P
収縮期血圧	3.22	1.42	5.02	0.00
LDL-C	-3.70	-7.12	-0.29	0.03
中性脂肪	10.04	-1.72	21.79	0.09
HbA1c	0.03	-0.05	0.12	0.45

考察

メンデル無作為群間比較は、メンデルの独立の法則である遺伝要因が非遺伝要因（環境要因や交絡因子）とは独立して、配偶子形成から受精時にかけて親から子へランダムに分配されることに基づいており、遺伝子多型を操作変数として用いる統計解析の手法の一つである。近年、多くの遺伝子を用いた横断研究において用いられている。これまでの古典的な観察研究では、アウトカムに影響を与える可能性のあるすべての交絡因子を考慮することは不可能であり、因果の逆転の可能性や選択バイアス等の問題点が存在する。このような古典的な観察研究の問題点を解

決する方法の一つとして無作為化比較試験と同様の解析が可能であると考えられているメンデル無作為群間比較が用いられている。近年では疾患と環境要因の因果関係の同定に多くの成果を上げつつある(1)。

本研究では、日本人を含む東アジア人において飲酒量との関連が報告されている ALDH2 遺伝子多型の一つである rs671 遺伝子多型を操作変数として用いた。ALDH2 (rs671) 遺伝子多型と飲酒習慣には強い相関が認められ、F 値も 10 以上の強力な操作変数であることが認められた。

そこで、ALDH2 (rs671) の A アレルの数に基づき additive モデルとした遺伝子多型と有意な相関が認められなかった収縮期血圧、LDL-C、中性脂肪および HbA1c に対し、操作変数法として最もよく知られている 2 段階最小二乗法を用いた。収縮期血圧および LDL-C では有意な関連が認められたが、中性脂肪、HbA1c には有意な関連が認められなかった。本研究結果より、飲酒習慣は血圧および LDL-C を含め、血清脂質と関連があることが示唆された。健康診断は空腹時に実施されていないため、食事の影響を受けやすい中性脂肪では有意な関連が認められなかった可能性が考えられる。また、ALDH2 (rs671) 遺伝子多型の遺伝子型別にみると、糖尿病の有病率に有意な違いが認められたが、飲酒量と HbA1c に有意な関連は認められなかった。

飲酒と疾患との関連についてはフラミンガムスタディを始め、多くの疫学研究で研究がなされている。血圧、HDL-C、HbA1c との関連について多くの研究成果が報告されている。特に適度の飲酒により HDL-C 濃度が増加することが知られており、飲酒量が増加するにつれ、相対的に LDL-C 濃度が減少する可能性が考えられる。Vu KN らによる欧米人の飲酒量と相関のあるアルコール脱水酵素 ADH の遺伝子多型を操作変数としたメンデル無作為群間比較を用いた研究では、適度の飲酒は LDL-C、中性脂肪、総コレステロール値を低下させることを示唆しており(2)、本研究はほぼ一致した結果が得られた。

本研究にはいくつかの限界が存在する。メンデル無作為群間比較は、因果関係について言及することを可能としているが、曝露とアウトカムの明らかな経時的な関連は、前向き研究のみで検討することが可能である。本研究では、操作変数法として最もよく知られている 2 段階最小二乗法を用いたが、いくつかの問題点が指摘されている。それは、操作変数となりうる変数は、「説明変数と相関がある」かつ「誤差との相関がゼロである」必要があるが、現実的にこのような変数を見つけることは容易ではない。近年では、より効率的な推定方法として、一般化積率法や経験尤度法などの手法が提案されているため、他の推定方法によって検討する必要がある。さらに、操作変数として用いた遺伝子多型とアウトカムに影響を与える第 3 の因子が存在する

可能性が考えられる。今後これら限界を考慮した、より大規模なサンプルで検討する必要がある。

本研究は、遺伝子多型を操作変数とすることで横断研究においても曝露とアウトカムの因果関係について言及することが可能と考えられるメンデル無作為群間比較を実施し、ALDH2 (rs671) 遺伝子多型を操作変数とし、飲酒習慣と血圧、血清脂質および HbA1c との関連を検討した。BMI および HbA1c には有意な関連は認められなかったが、血圧および血清脂質は飲酒習慣と関連がある可能性が示唆された。

参考文献

1. Smith GD, Ebrahim S. "Mendelian randomization": can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol.* 2003 Feb; 32(1): 1-22.
2. Vu KN, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Nambi V, Volcik KA, Boerwinkle E, et al. Causal Role of Alcohol Consumption in an Improved Lipid Profile: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *PLoS One.* 2016 Jan;11(2):e0148765.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

今任拓也、上村精一郎、畝博、ALDH2 および ADH1B 遺伝子多型と血清脂質プロファイルとの関連に関する縦断研究、第 36 回日本肥満学会、2015 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場(愛知・名古屋)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

畝 博(UNE, Hiroshi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号: 4 0 1 2 2 6 7 6

(2)研究分担者

今任 拓也(IMATOH, Takuya)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・主任研究官

研究者番号: 2 0 3 6 8 9 8 9