

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370104
 研究課題名（和文） 遺伝因子と環境因子からアプローチする動脈硬化の生理的多型性の解明

研究課題名（英文）
 The elucidation of the physiological polymorphism related to arteriosclerosis by the approach method from genetic and acquired factor

研究代表者
 前田 隆浩（MAEDA TAKAHIRO）
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：40284674

研究成果の概要（和文）：環境因子が違うことが予想される、人口規模が 1,000 人未満の小離島と、約 40,000 人の大離島で動脈硬化に関連する調査を行った。小離島 205 人と大離島 2,520 人において年齢と性別を調節して検討したところ、ホモシステインと頸動脈内膜中膜厚は大離島で高く、血中葉酸は小離島で高かった。葉酸代謝に関連する遺伝子多型頻度に地域差はなかったため、環境による生理的多型性の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We conducted the investigation study related to arteriosclerosis in small remote islands with a population of less than 1,000 and large island with a population of about 40,000 in Goto islands, where the environmental factor was considered to be different. Comparing 205 inhabitants in small islands with 2,520 inhabitants in large island after adjustment for age and sex, plasma homocysteine concentration and carotid intima-media thickness was significantly higher in large island, and plasma folic acid concentration was significantly higher in small island. Because there was not a difference by areas regarding the genetic factor related to the metabolism of folic acid, it was suggested that the physiological polymorphism with acquired factor existed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生理人類学

キーワード：生理的多型性

1. 研究開始当初の背景

多くの観察研究と分子遺伝学の発達によって、動脈硬化の危険因子や密接にかかわる

遺伝子が明らかになってきた。動脈硬化の複雑な病態生理を反映して関連因子（遺伝子）は多岐にわたるが、近年ではメチオニンの中

間代謝産物であるホモシステインや脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン等が注目されている。

ホモシステインは酸化ストレス、血管内皮細胞の障害、血栓形成に関与していることが示され (Welch GN et al. *N Engl J Med* 338, 1998)、高ホモシステイン血症が動脈硬化の独立した危険因子であることが明らかにされた (Vasan RS et al. *JAMA* 289, 2003)。また、アディポネクチンは動脈硬化の進展を予防する作用があることが証明されているが、動脈硬化との関連が指摘されているメタボリック症候群でアディポネクチンが低下しており、このことがメタボリック症候群で動脈硬化性疾患の発症頻度が高い原因の一つとされている。

ホモシステインやアディポネクチンの血中濃度には、それぞれ遺伝子多型が関与しているとされるが、その遺伝因子と同等かそれ以上に生活習慣などの環境因子が影響していることが報告されている。

さらに、近年の genome-wide association assay などの大規模研究によって膨大な遺伝子の解析が進められ、動脈硬化と関連する多数の遺伝子が報告されはじめた。

2. 研究の目的

動脈硬化の進展は、食習慣や運動習慣、嗜好品といった環境因子によって、遺伝因子と同等かそれ以上に影響を受けるとされる。そこで、大小様々な島からなる長崎県五島市の特性を生かし、生活環境が大きく違うと考えられる2つの地区 (人口規模1,000人未満の小離島と、人口規模が40,000人以上の大離島)において、遺伝要因と、環境要因の両面から動脈硬化へアプローチすることでその生理的多型性を解明していく。また、日本人ではほとんど報告されていない動脈硬化に関連した遺伝子多型の頻度も合わせて調査する。

3. 研究の方法

長崎県五島市の住民基本健診と連動し、同意書の得られた健診受診者を対象に調査を行った。

基本健診の採血と同時に、真空採血管によりEDTA採血とプレーン採血を行った。採血後直ちに、EDTA採血の全血と1%アスコルビン酸を添加し、さらに遠心後の血漿成分に1%アスコルビン酸を添加して-30℃にて凍結保存し、葉酸測定に備えた。その後、血球成分と、血漿、血清に分離し、-30℃に凍結保存してその後の分析に備えた。年齢、性別、身長、体重、腹囲、体脂肪率、体重などの基本的臨床データは、そのつどデータベースに入力し管理した。

臨床的な動脈硬化の評価として、CIMT

(Carotid Intima-Media Thickness) と CAVI (Cardio-Ankle Vascular Index) の測定を行った。CIMTは、臥位にて LOGIQ Book (GE 横河メディカルシステムズ) と 10Mhz プローブを用いて、B-モードで左右頸動脈の縦断像を撮影し、後に IMT 測定ソフトウェア Intima Scope (株式会社ソフトメディカル) を用いて、プラークでない部分の CIMT 計測し、左右の平均値を算出して解析に用いた。CAVIは、動脈のスティフネスを測定する脈波伝播速度をさらに発展させたものであり、仰臥位の安静状態で測定した。

アンケート調査は、基本健診の間診内容を活用した。

一般血液検査は採血時に実施し、ホモシステインは、ある程度サンプルが集まった後に、高速液体クロマトグラフィーにて測定を行った。葉酸は Alabama University at Birmingham, Department of Nutrition Sciences に測定を依頼した。

遺伝子多型の解析は、ホモシステインに関連する MTHFR 遺伝子多型 677C>T、アディポネクチン血中濃度に影響を与えるアディポネクチン遺伝子 276G>T 多型、そして、近年 CIMT と関連することが報告されたヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC4) 遺伝子多型(rs3791398)について解析した。解析方法は、血球成分より DNA を抽出し、それぞれの遺伝子の single nucleotide polymorphism (SNP) 部分を増幅するようなプライマーと、SNP 部分を挟む特異的な蛍光プローブを作成し、LightCycler (Roche) により PCR を行った後、メルティングカーブを分析することによって遺伝子多型を解析した。

得られたデータは、すべてデータベースで管理し、IBM SPSS Statistics 18 (エス・ピー・エス・エス株式会社) にて統計解析を行った。

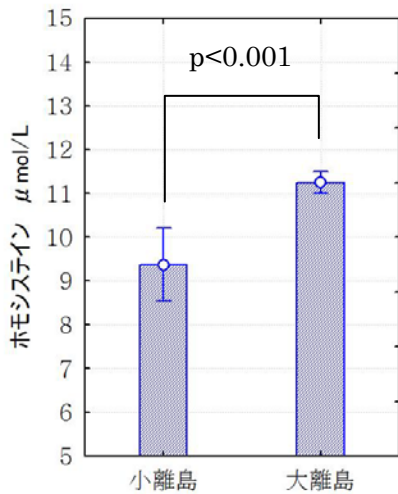
4. 研究成果

2007年度1,394人、2008年度696人、2009年度635人、3年間の合計2,725人 (男945人、女1,780人、平均年齢66.7±10.9歳)の参加を得た。そのうち、基本的臨床検査や一般生化学検査、CIMT、CAVIはほぼ全員に施行された。ホモシステインは1,282人、葉酸は591人で測定し、MTHFR 遺伝子 677C>T は 2,023 人、アディポネクチン遺伝子 276G>T は 1,741 人、HDAC4 遺伝子 G>A は 1,318 人について解析した。

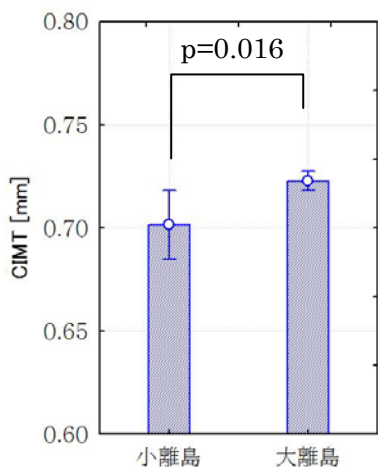
小離島の研究参加者 205 人、(男 77 人、女 128 人)と大離島 2,520 人 (男 868 人、女 1,652 人)を比較すると、年齢は小離島が有意に高く (小離島 72.5±9.9 歳、大離島 66.2±10.8 歳)、男性の比率も小離島が有意に高かった (小離島 38%、大離島 34%)。遺伝子多型のマイナーアレル頻度は、MTHFR 遺伝子 677T 0.34、

アディポネクチン遺伝子 276T 0.27、HDAC4 遺伝子 A 0.10 であった。このうち、本邦の一般住民を対象とした HDAC4 遺伝子多型の解析については報告がなく、本研究が最初の報告と思われる。MTHFR 遺伝子 677C>T とアディポネクチン 276G>T には、小離島と大離島で遺伝子多型頻度に有意差を認めなかったが、HDAC4 遺伝子 G>A では、小離島 0.07、大離島 0.11 と大離島に有意に多かった (p=0.017)。HDAC4 遺伝子多型のみ地域差を認めた理由については不明であるが、ややマイナーアレル頻度が低い SNP であることから、例数を増やして検討することが重要であると考えられた。

次に、年齢と性別で調整して、小離島と大離島を比較した。



ホモシステインは、小離島 9.4 (95%信頼区間 8.5-10.2) μmol/L、大離島 11.2 (11.0-11.5) μmol/L で、大離島で有意に高値であった。以前の調査の結果、小離島のホモシステインがもっとも高く、大離島、本土と続いて有意に低くなることを報告したが、今回の調査では逆の結果となった。この理由の一つとして、調査を行った時期による生活環境の変化が挙げられる。血中ホモシステイン濃度は葉酸の摂取によって低下することが知られている。小離島における前回の調査は1月下旬で、今回の調査は5月に行われたことから、調査時期の違いによって食生活に変化が生じ、今回の調査時期には葉酸の摂取量が比較的增加していた可能性が考えられ

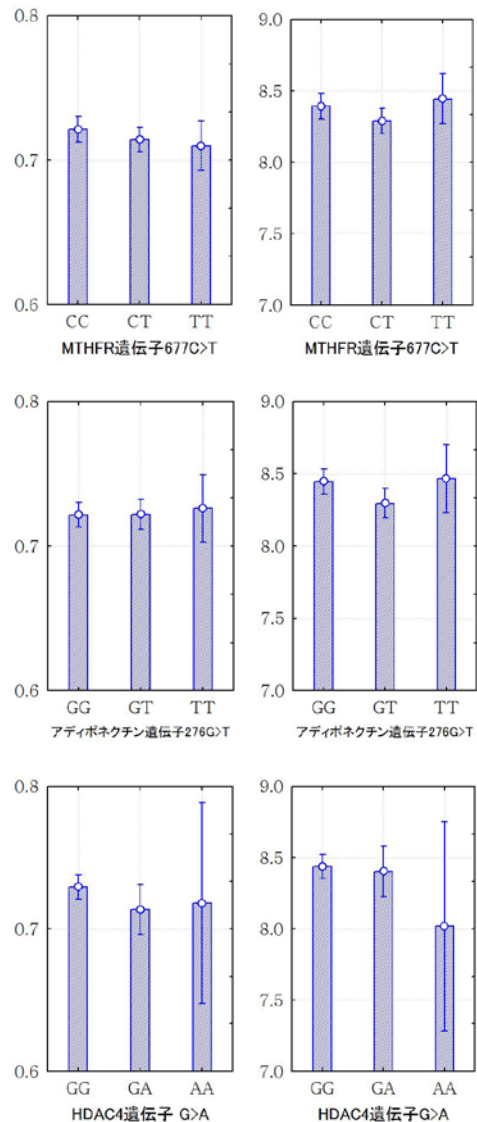


る。血漿中葉酸は小離島 8.6 (7.9-9.3) ng/ml、大離島 6.8 (6.3-7.2) ng/ml と小離島の血漿中葉酸濃度が有意に高かった。今後は、季節による変動を考慮した研究計画を立て、通年にわたって評価していく必要があると考えられた。

年齢と性別を調整した CIMT は、小離島 0.70 (0.69-0.72) mm、大離島 0.72 (0.72-0.73) と有意に大離島が高値であった (p=0.009)。一方 CAVI は、小離島 8.5 (8.3-8.6)、大離島 8.3 (8.3-8.4) であり、地域差を認めなかった (p=0.151)。CIMT は総頸動脈の壁の厚さを視覚的にとらえた指標であり、CAVI は大動脈から上腕動脈や下腿動脈の動脈壁の弾性を数値的にとらえた指標であることから、臨床的な動脈硬化の指標とはいえ違う面からの評価である。CIMT と動脈硬化性疾患との強力な関連が知られていることから、CIMT に地域差が認められた理由については、追跡調査と解析を進めていく必要がある。

動脈硬化のリスクファクターの地域差としては、前述のホモシステインの他に、収縮期血圧、拡張期血圧、Low density lipoprotein (LDL) コレステロールが小離島で有意に高値であり、腹囲、中性脂肪、クレアチニン、尿酸が大離島で有意に高値であった。

多変量解析により CIMT に影響を与える因



子を検索したところ、年齢、性別、脈圧、HbA1C、High density lipoprotein (LDL) コレステロールであった。CAVI に影響を与える因子としては年齢、性別、BMI、収縮期血圧、LDL コレステロール、HbA1C、尿酸、喫煙習慣であり、ホモシステインは CIMT および CAVI の両者に影響を与えなかった。

分散分析による、遺伝子多型間の解析では、MTHFR 遺伝子多型とホモシステイン血中濃度との間には有意な関連を認めたものの、CIMT および CAVI には有意差を認めなかった。また、アディポネクチン 276G>T と HDAC4 遺伝子多型 G>A の両者においても、CIMT および CAVI には有意差を認めなかった。MTHFR、アディポネクチン、HDAC4 の 3 者の遺伝子多型を組み合わせた解析を行ったが、CIMT および CAVI で遺伝子多型の組み合わせ間において有意差を認めなかった。この 3 つの遺伝子多型は動脈硬化に与える影響が非常に少ない可能性も考えられるが、HDAC4 遺伝子多型のアレル頻度に偏りがあることから、サンプルサイズを増やして解析する必要があるものと思われる。

これまでの研究によって、小離島の住民では遺伝要因が表現型に反映されやすい傾向が認められたが、一方で遺伝因子の影響を凌駕する環境因子の影響が示唆された。また、遺伝子背景はほぼ同じにもかかわらず、年齢や性別を調整しても CIMT に地域差が認められるという生理的多型性を認めた。しかしながら、今回解析した 3 つの遺伝子多型では、臨床的な動脈硬化の指標と多型間に有意な関連を認めなかった。

今後は、近年の genome-wide association assay 等によって絞り込まれてきた動脈硬化に関連した遺伝子を加え、解析数を増やして遺伝因子と環境因子の両面から動脈硬化の生理的多型性を解析していく必要がある。

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 9 件)

- ① Minematsu K, Kaneko Y, Nakazato M, Maeda T, Christopher NJ, Yoda T, Goto K, Takamura N, Mizota T: Percentage body fat assessed by bioelectrical impedance analysis as a new health index for rural areas in the Asia-Pacific region. *Acta Med Nagasaki* 54, 39-43, 2009 【査読有り】
- ② Ichinose S, Nakamura M, Maeda M, Ikeda R, Wada M, Nakazato M, Ohba Y, Takamura N, Maeda T, Aoyagi K, Nakashima K: A validated HPLC-fluorescence method

with a semi-micro column for routine determination of homocysteine, cysteine and cysteamine, and the relation between the thiol derivatives in normal human plasma. *Biomed Chromatogr* 23, 935-939, 2009 【査読有り】

- ③ Hayashida H, Kawasaki K, Yoshimura A, Kitamura M, Furugen R, Nakazato M, Takamura N, Hara Y, Maeda T, Saito T: Relationship between periodontal status and HbA1c in non-diabetics. *J Publ Health Dent* 69, 204-206, 2009 【査読有り】
- ④ Takamura N, Akilzhanova A, Hayashida N, Kadota K, Yamasaki H, Usa T, Nakazato M, Maeda T, Ozono Y, Aoyagi K: Thyroid function is associated with carotid intima-media thickness in euthyroid subjects. *Atherosclerosis* 204, e77-e81, 2009 【査読有り】
- ⑤ Kadota K, Takamura N, Aoyagi K, Yamasaki H, Usa T, Nakazato M, Maeda T, Wada M, Nakashima K, Abe K, Takeshima F, Ozono Y: Availability of cardio-ankle vascular index (CAVI) as a screening tool for atherosclerosis. *Circ J* 72, 304-308, 2008 【査読有り】
- ⑥ Ishibashi K, Takamura N, Aoyagi K, Yamasaki H, Abiru N, Nakazato M, Kamihira S, Maeda T: Multimers and adiponectin gene 276G>T polymorphism in the Japanese population residing in rural areas. *Clin Chem Lab Med* 45, 1457-1463, 2007 【査読有り】
- ⑦ Takamura N, Abe Y, Nakazato M, Maeda T, Wada M, Nakashima K, Kusano Y, Aoyagi K. Determinants of plasma homocysteine levels and carotid intima-media thickness in Japanese. *Asia Pac J Clin Nutr* 16, 698-703, 2007 【査読有り】
- ⑧ Mori S, Sugahara K, Uemura A, Yamada Y, Uzihara K, Hayashida H, Ideguchi T, Ishibashi K, Nakazato M, Maeda T, Takamura N, Kamihira S: The possibility of a valuable resource of circulating DNA for single nucleotide polymorphisms genotyping: the application of a rapid and a simple polymerase chain reaction with melting curve analysis for methyltetrahydrofolate reductase

polymorphisms. *Laboratory Hematology* 13, 1-5, 2007 【査読有り】

- ⑨ Yagura C, Takamura N, Kadota K, Nagazumi T, Morishita Y, Nakazato M, Maeda T, Kusano Y, Abe Y, Aoyagi K: Evaluation of cardiovascular risk factors and related clinical markers in healthy young Japanese adults. *Clin Chem Lab Med* 45, 220-225, 2007 【査読有り】

〔学会発表〕(計 17 件)

- ① 一山公佑、池田理恵、和田光弘、前田隆造、中島憲一郎：ルテニウム錯体化学発光を用いる新規葉酸定量法の開発に関する基礎的検討、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山
- ② 前田麻由、中島真裕美、池田理恵、和田光弘、中里未央、前田隆造、高村昇、青柳潔、中島憲一郎：健常人血漿チオール化合物の定量とその解析、第 49 回日本臨床化学学会、2009 年 9 月 18 日、長崎
- ③ 中里未央、草野洋介、高村昇、中島健一郎、青柳潔、大園義之、前田隆造：離島住民における赤血球中葉酸とホモシステインとの関連、第 60 回日本生理人類学会、2009 年 6 月 6 日、北海道
- ④ 山下裕、古巢朗、西野友哉、小畑陽子、中里未央、高村昇、前田隆造、大園恵幸、河野茂：五島地区の健診者における血清シスタチン C と動脈硬化の関連、第 52 回日本腎臓病学会、2009 年 6 月 4 日、横浜
- ⑤ 山下裕、古巢朗、西野友哉、小畑陽子、中里未央、宮崎正信、高村昇、前田隆造、大園恵幸、河野茂：五島地区健診受診者における尿中シスタチン C と腎虚血マーカー (FEMg) との関連の検討、第 52 回日本腎臓病学会、2009 年 6 月 3 日、横浜
- ⑥ Obata Y, Furusu A, Yamashita H, Nishino T, Nakazato M, Miyazaki M, Takamura N, Maeda T, Ozono Y, Kohno S: Urinary cystatin C as a biomarker for detecting early renal dysfunction in the general populations. World Congress of Nephrology 2009, 22nd-26th May 2009, Milan, Italy
- ⑦ Yamashita H, Furusu A, Nishino T, Obata Y, Nakazato M, Miyazaki M, Harada T, Takamura N, Maeda T, Ozono Y, Kohno S: Cystatin C and the risk of atherosclerosis among asymptomatic adults. World Congress of Nephrology 2009, 22nd-26th May 2009, Milan, Italy

- ⑧ 中里未央、坂本大地、高村昇、門田耕一郎、中島憲一郎、青柳潔、大園恵幸、山崎浩則、前田隆造、田村庸信、Kelley Johnston、中尾郁子、吉谷清光：本邦における赤血球中葉酸濃度と血清ホモシステイン、動脈硬化との関連、第 17 回日本総合診療医学会、2009 年 3 月 1 日、福岡
- ⑨ 中里未央、坂本大地、高村昇、門田耕一郎、大園恵幸、青柳潔、前田隆造、中尾郁子、吉谷清光：一般住民における潜在性甲状腺機能異常症の頻度と TSH 正常者における ft3・TSH と動脈硬化との関連、第 17 回日本総合診療医学会、2009 年 3 月 1 日、福岡
- ⑩ Nakazato M, Shimokawa I, Takamura N, Aoyagi K, Nakashima K, Ozono Y, Maeda T: The association between plasma homocysteine concentration and atherosclerosis in the Japanese population residing in remote islands. The Japan-Korea Joint Seminar (AACL 2008; Asian Aging Core for Longevity 2008), Huis Ten Bosch in Nagasaki, Japan, Sep. 4-6, 2008
- ⑪ Kusano Y, Nakazato M, Ishibashi K, Takamura N, Nakashima K, Yamasaki H, Oozono Y, Kuwahara K, Nakamura H, Aoyagi K, Maeda T: Physiological polymorphism of arteriosclerosis on a remote Japanese island. 9th International Congress of Physiological Anthropology, Delft, The Netherlands, Aug. 22-26, 2008
- ⑫ 前田麻由、中村真裕美、和田光弘、中里未央、前田隆造、高村昇、青柳潔、中島憲一郎：蛍光誘導体化試薬 SBD-F を用いた血漿中チオール化合物の HPLC-FL 定量とそのバリデーション評価、第 48 回臨床化学学会、2008 年 8 月 29 日、静岡
- ⑬ 草野洋介、石橋純美、高村昇、青柳潔、山崎浩則、中里未央、前田隆造：離島住民におけるアディポネクチン血中濃度と遺伝子多型、第 58 回日本生理人類学会、2008 年 6 月 7 日、大阪
- ⑭ 中里未央、石橋純美、山崎浩則、高村昇、瀬尾幸、青柳潔、大園恵幸、前田隆造：小離島と大離島における、Adiponectin 276G>T 遺伝子多型と Adiponectin 分画、第 16 回日本総合診療医学会、2008 年 3 月 8 日、名古屋
- ⑮ 渡辺美和、中里未央、原和子、前田隆造、川井光子：長崎県小離島における栄養調

査一健康調査との関連から一、第 54 回
日本栄養改善学会、2007 年 9 月 20 日、
長崎

- ⑩ 草野洋介、中里未央、高村昇、中島憲一郎、青柳潔、大園恵幸、前田隆浩：MTHFR 遺伝子多型による血中ホモシステイン濃度の変化が動脈硬化の生理的多型に及ぼす影響一島嶼と本土の比較一、第 56 回日本生理人類学会、2007 年 7 月 17 日、秋田
- ⑪ Nakazato M, Kadota K, Takamura N, Sekitani M, Yamasaki H, Mukae H, Nakashima K, Aoyagi K, Maeda T: An association between plasma homocysteine concentration and methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism on a remote island. 6th Conference on Homocysteine Metabolism, World Congress on Hyperhomocysteinemia, Saarbruecken, Germany, June 8, 2007

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 隆浩 (MAEDA TAKAHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40284674

(2) 研究分担者

中島 健一郎 (NAKASHIMA KENICHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30039656

青柳 潔 (AOYAGI KIYOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80295071

高村 昇 (TAKAMURA NOBORU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30295068

山崎 浩則 (YAMASAKI HIRONORI)

長崎大学・保健・医療推進センター・准教授
研究者番号：40346953

草野 洋介 (KUSANO YOSUKE)

長崎ウエスレヤン大学・現代社会学部・教授
研究者番号：70325637

(3) 連携研究者

なし