

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370090

研究課題名（和文） 関連遺伝子群によるリスク評価と環境因子から追究する動脈硬化の生理的多型性

研究課題名（英文） The physiological polymorphism of atherosclerosis investigated by genetic and environmental factors

研究代表者

前田 隆浩（MAEDA TAKAHIRO）

長崎大学・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）：

特定健診受診者 1,295 人を対象として、動脈硬化に関連することが報告されている遺伝子 MTHFR(rs1801133)、HDAC4(rs3791398)、CARKL(rs465563)、Adiponectin(rs1501299) について多型解析を行い、頸動脈内中膜複合体厚（CIMT）と心臓足首血管指数（CAVI）との関連について検討した。いずれの遺伝子においても CIMT と CAVI との間に有意な関連を認めず、ハイリスクアリの保有数をもとに分類した 5 群における解析でも有意な関連は認めなかった。しかし、保有数が多いほど CAVI 値が上昇する傾向があり、遺伝子多型と動脈硬化との関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Most cases of atherosclerosis result from the interactions of multiple genetic and environmental factors. To investigate the association between gene polymorphisms and clinical parameter of atherosclerosis such as carotid intima-media thickness (CIMT) and cardio-ankle vascular index (CAVI), we conducted cross-sectional study of 1,295 Japanese (502 men and 793 women) who participated in a general health check in western rural community of the Goto Islands from 2000 to 2012. We analyzed polymorphisms of four genes such as MTHFR(rs1801133), HDAC4(rs3791398), CARKL(rs465563), and Adiponectin(rs1501299) which were reported the significant relation with atherosclerosis. The genotype distributions of four genes were as follows, MTHFR (CC: 43.2%, CT: 46.5% and TT: 10.3%), Adiponectin (GG: 53.7%, GT: 38.9%, and TT: 7.4%), HDAC4 (GG: 80.4%, GA: 18.5%, and AA: 1.1%), and CARKL (GG: 12.7%, GA: 44.5%, and AA: 42.8%). No significant association between genotype and CAVI nor CIMT was observed. Next, we categorized into five groups based on the number of risky genotype and analyzed the association according to a group. Although no significant association was observed both in CIMT and CAVI, positive tendency was observed in CAVI. Further investigation with large number of participants is necessary to clarify the association between gene polymorphism and atherosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・応用人類学

キーワード：動脈硬化、遺伝子多型、頸動脈内中膜複合体厚 (CIMT)、心臓足首血管指数 (CAVI)

1. 研究開始当初の背景

診断法や治療法が発達し危険因子の解明が進んできたとはいえ、心血管疾患は先進国における主要な死亡原因であり、そのほとんどでアテローム性動脈硬化が原因であることが判明している。アテローム性動脈硬化の進展や病態には様々な遺伝因子や環境因子が複雑にかかわっているとされているが (Lusis AJ *et al. Ann Rev Genomics Hum Genet* 2004)、近年の分子遺伝学の発達によって、ヒトの動脈硬化と密接にかかわる遺伝子が明らかになってきた。複雑な病態生理を反映して関連している遺伝子がかかわる生理機能は、脂質代謝、血管内皮機能、酸化ストレス、炎症、血管再生、血栓形成、細胞周期調節、血管前駆細胞の調節など多岐にわたり、こうした遺伝子の多型と動脈硬化との関連が注目されている (Roy H *et al. Hum Genet* 2009)。

我々は、長崎県離島と本土の住民を対象とした研究によって、動脈硬化の独立した危険因子であるホモシステインの血中濃度がその代謝にかかわる遺伝子 (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子; MTHFR 遺伝子) の多型と強く関連しており、本土に比べて離島の住民で有意に高いことを証明した。また、動脈硬化に予防的に作用するアディポネクチンの血中濃度が、小規模離島の住民でアディポネクチン遺伝子の多型と有意に関連していた。これらの研究から、離島の住民 (特に小規模離島の住民) では、遺伝要因が表現型に反映されやすい傾向が考えられ、同時に遺伝因子の影響を凌駕するレベルの環境因子の影響が示唆された。

遺伝子多型と動脈硬化との関連について研究した報告は多いが、単独遺伝子では動脈硬化性疾患の危険因子としては弱く、再現性に問題があることが指摘されている。このため、複数の遺伝子多型をもとにスコア化することで動脈硬化性疾患の遺伝的リスクを定量化する試みが始まっている (Trichopoulou A *et al. Arch Intern Med* 2008)。さらにこうした取組と並行して、genome-wide association study 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、動脈硬化と強く関連する遺伝子群が絞り込まれてきた (Lanktree *et al. Stroke* 2009)。

また、臨床症状が発現する前に非侵襲的に動脈硬化のレベルを評価する指標として、頸動脈内中膜複合体厚 (Intima-Media Thickness; IMT) や脈波伝搬速度 (pulse

wave velocity; PWV) が開発され、心血管疾患と密接に関連することが報告されている (Bots ML *et al. Circulation* 1997)。我々は、PWV をさらに発展させた心足首血管指数 (Cardio-Ankle Vascular Index; CAVI) が年齢や CIMT と強く相関し、動脈硬化のスクリーニングツールとして有用であることを報告してきた (Kadota K *et al. Circulation Journal* 72, 2008)

2. 研究の目的

長崎県離島の一般住民を対象として、動脈硬化に関連する複数の遺伝子について多型解析を行い、不利な遺伝子アレルの保有数を基準にして動脈硬化に対する個人の遺伝子リスクをスコア化する。そして、動脈硬化の臨床的評価データ (CIMT、CAVI) との関連を解析することで、遺伝因子が動脈硬化に及ぼす影響の程度を検証する。

一方、離島の都市部からへき地に至る様々な地域で研究を行い、治療歴や生活習慣についての調査と並行して、一般的な血液検査とともにビタミン類やサイトカイン類の血中濃度を測定し、環境因子と遺伝要因 (スコアを含む) との関連についても検証する。

3. 研究の方法

主に五島市が毎年定期的実施している特定健診の受診者で、文書による同意が得られた住民を対象にデータとサンプルの収集を行った。

血液サンプルは血球成分と血清、血漿に分離し、-20°Cに保存して後の分析に備えた。基本データ (年齢、性別、腹囲径、体脂肪率、BMI など) については、その都度データベースに入力保存した。アンケート調査は、特定健診の間診票を活用した。

動脈硬化の臨床的指標として、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、動脈のステイ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。

遺伝子の多型解析では、採取した血液サンプルから DNA を抽出し、蛍光プローブを用いた PCR 法（メルティングカーブの分析）によって、MTHFR (rs1801133)、HDAC4 (rs3791398)、CARKL (rs465563)、Adiponectin (rs1501299) の遺伝子多型の解析を行った。

各遺伝子の多型と CIMT、CAVI の関連について統計学的に解析し、ハイリスクアリの保有数をもとに遺伝的リスクをスコア化し、スコア別解析を行った。

4. 研究成果

収集したサンプルのうち動脈硬化に関連する疾患（糖尿病、腎臓病、心疾患、脳卒中）および喫煙者を除いた 1,295 例（男性 502 例、女性 793 例）について 4 遺伝子の多型解析を行い、それぞれについて性別と年齢を補正して IMT および CAVI との関連を解析した。

遺伝子多型の頻度（％）は、MTHFR(CC/CT/TT): 43.2/46.5/10.3、Adiponectin(GG/GT/TT): 53.7/38.9/7.4、HDAC4(GG/GA/AA): 80.4/18.5/1.1、CARKL(GG/GA/AA): 12.7/44.5/42.8 であった。HDAC4 と CARKL については、初めて本邦の遺伝子多型頻度を明らかにした。各々の遺伝子について、性別と年齢を補正した上で多型と IMT および CAVI との関連をみたが、有意な関連は認めなかった。

Genotype	CC	CT	TT	P
No of case	559	602	134	
Men % (n)	229 (41.0)	227 (37.7)	46 (34.3)	
Age	68.9 ± 10.4	68.2 ± 10.2	67.3 ± 10.5	
mean IMT	0.72	0.72	0.72	0.689
max IMT	0.97	0.95	0.95	0.422
mean CAVI	8.3	8.3	8.6	0.274

Genotype	GG	GA	AA	P
No of case	1041	240	14	
Men % (n)	404 (38.8)	92 (38.3)	6 (42.9)	
Age	68.6 ± 10.4	67.8 ± 10.0	67.6 ± 7.4	
mean IMT	0.73	0.72	0.73	0.388
max IMT	0.96	0.95	0.96	0.687
mean CAVI	8.3	8.4	8.1	0.578

Genotype	GG	GT	TT	P
No of case	695	504	96	
Men % (n)	274 (39.4)	196 (38.9)	32 (33.3)	
Age	69.0 ± 10.0	67.7 ± 10.6	67.8 ± 10.6	
mean IMT	0.72	0.73	0.73	0.734
max IMT	0.96	0.96	0.95	0.777
mean CAVI	8.4	8.3	8.3	0.870

Genotype	GG	GA	AA	P
No of case	165	576	554	
Men % (n)	60 (36.4)	226 (39.2)	216 (39.0)	
Age	68.6 ± 10.0	68.3 ± 10.2	68.5 ± 10.5	
mean IMT	0.74	0.73	0.72	0.391
max IMT	0.98	0.96	0.96	0.503
mean CAVI	8.2	8.4	8.3	0.308

次に、先行研究を参考にして 4 遺伝子の多型のうちハイリスクアリの数を次のように点数化した (MTHFR: CC=0, CT=1, TT=2, Adiponectin: GG=0, GT=1, TT=2, HDAC4: GG=0, GA=1, AA=2, CARKL: GG=0, GA=1, AA=2)。このアリの保有

数をもとに遺伝的リスクのスコア化を試みたところ、0 が 11 例、1 が 166 例、2 が 824 例、3 が 273 例、4 が 21 例であった。性別と年齢を補正した上でスコアと CIMT、CAVI との関連について解析した結果、mean CIMT (p=0.328)、max CIMT (p=0.301)、CAVI (p=0.274) とともに有意な関連は認めなかった。しかしながら、CAVI には有意ではないもののスコアが上がれば CAVI も増加する傾向が認められた。今回解析した 4 つの遺伝子多型と動脈硬化

Score	0	1	2	3	4	P
No of case	11	166	824	273	21	
Men % (n)	4 (36.4)	56 (33.7)	337 (40.9)	94 (34.4)	11 (52.4)	
Age	65.1 ± 10.5	69.1 ± 10.1	68.6 ± 10.5	67.6 ± 9.8	67.7 ± 11.9	P=0.328
mean IMT	0.71	0.74	0.73	0.72	0.73	P=0.301
max IMT	0.9	0.99	0.96	0.95	0.96	

Score	0	1	2	3	4	P
No of case	11	166	824	273	21	
Men % (n)	4 (36.4)	56 (33.7)	337 (40.9)	94 (34.4)	11 (52.4)	
Age	65.1 ± 10.5	69.1 ± 10.1	68.6 ± 10.5	67.6 ± 9.8	67.7 ± 11.9	
mean CAVI	7.72	8.25	8.33	8.44	8.45	P=0.274

の臨床的指標 (CIMT、CAVI) との間には有意な関連は認めなかった。しかしながらハイリスクアリの保有数をもとにスコア化することで、有意ではないもののスコア増加するに伴って CAVI 値が上昇する傾向が認められた。このことは解析する遺伝子の数を増やすことでハイリスク症例を抽出できる可能性を秘めており、動脈硬化性疾患の発症予防を考える上で興味深い。さらに最近の大規模研究によって冠動脈疾患に関連する候補遺伝子が絞り込まれてきていることから (Lusis AJ Trends in Genetics 2012)、疾患と遺伝子を絞った上でサンプル数を増やし、前向きにコホート研究を進めていく必要がある。

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 8 件)

- ① Crews DE, Harada H, Aoyagi K, Maeda T, Alfarano A, Sone Y, Kusano Y: A Pilot Study of Allostatic Load among Elderly Japanese Living on Hizen-Oshima Island. J Physiol Anthropol 31, Epub, 2012, DOI: 10.1186/1880-6805-31-18 【査読有り】
- ② Shirakawa T, Ikeda K, Nishimura S, Kuniba H, Nakashima K, Motomura H, Mizuno Y, Zaitzu M, Nakazato M, Maeda T, Hamasaki Y, Hara T, Moriuchi H: Lack of an association between E-selectin gene polymorphisms and the risk of Kawasaki disease. Pediatr Int 54, 455-460, 2012, DOI:10.1111/j.1442-200X.2012.03608.x

【査読有り】

- ③ Nakazato M, Maeda T, Emura K, Maeda M, and Tamura T: Blood folate concentration analyzed by microbiological assay and chemiluminescent immunoassay methods. *J Nutr Sci Vitaminol* 58, 59-62, 2012, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv/58/1/58_59/_pdf 【査読有り】
- ④ Nakazato M, Takamura N, Kadota K, Yamasaki H, Mukae H, Kusano Y, Nakashima K, Ozono Y, Aoyagi K, Kohno S, and Maeda T: The association between atherosclerosis and plasma homocysteine concentration in the general population residing on remote islands in Japan. *ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA* 55, 47-54, 2011 【査読有り】
- ⑤ Nakazato M, Maeda T, Takamura N, Wada M, Yamasaki H, Johnston KE, and Tamura T: Relation of body mass index to blood folate and total homocysteine concentrations in Japanese adults. *Eur J Nutr* 50, 581-585, 2011, DOI:10.1007/s00394-010-0165-0 【査読有り】
- ⑥ Takamura N, Hayashida N, and Maeda T: Risk of coronary heart disease and mortality for adults with subclinical hypothyroidism. *JAMA* 304(22), 2481-2482, 2010, DOI:10.1001/jama.2010.1786. 【査読有り】
- ⑦ Sekitani Y, Hayashida N, Kadota K, Yamasaki H, Abiru N, Nakazato M, Maeda T, Ozono Y, and Takamura N: White blood cell count and cardiovascular biomarkers of atherosclerosis. *Biomarkers* 15(5), 454-460, 2010, DOI:10.3109/1354450X.2010.486870. 【査読有り】
- ⑧ Takamura N, Hayashida N, Hagane K, Kadota K, Yamasaki H, Abiru N, Ozono Y, Kamihira S, Aoyagi K, Ishibashi K, Nakazato M, and Maeda T: Leptin to high-molecular-weight adiponectin ratio is independently correlated with carotid intima-media thickness in men, but not in women. *Biomarkers* 15(4), 340-344, 2010, DOI:10.3109/13547501003735532. 【査読有り】

〔学会発表〕(計8件)

- ① 岩本亜惟子、曾根良昭、草野洋介、青柳潔、前田隆浩、ダグラスグループ：長崎県の離島に住む高齢者の恒常性維持負荷

度と食生活について、第66回日本生理人類学会、2012年5月12日、長崎大学医学部良順会館

- ② 中里未央、関田孝晴、前田隆浩、江村康介、高村昇、青柳潔、草野洋介：動脈硬化関連遺伝子の多型解析、第64回日本生理人類学会、2011年6月11日、九州大学大橋キャンパス
- ③ 中里未央、関田孝晴、江村康介、門田耕一郎、和田光弘、前田隆浩、太田幹也：健診受診者3,908名における、内臓中膜複合体(IMT)と心臓足首血管指数(CAVI)に影響を与える因子の検討、第2回日本病院総合診療医学会、2011年2月4日、東北大学医学部良陵会館
- ④ 江村康佑、中里未央、関田孝晴、前田隆浩、小足公彦：動脈硬化関連遺伝子の多型解析、第32回長崎県地域医療研究会、2010年10月30日、長崎ブリックホール国際会議場
- ⑤ 江村康佑、中里未央、関田孝晴、前田隆浩、小足公彦：動脈硬化関連遺伝子の多型解析、第6回五島地域医療研究会、2010年9月28日、五島中央病院
- ⑥ 中里未央、関田孝晴、門田耕一郎、高村昇、中島憲一郎、吉谷清光、前田隆浩：ホモシステインと頸動脈内中膜複合体厚(CIMT)及び心臓足首指数(CAVI)との関連、第1回日本プライマリ・ケア連合学会、2010年6月26日、東京国際フォーラム
- ⑦ 江村康佑、中里未央、前田隆浩、太田幹也、Kelley Johnston、田村庸信：Microbiological assay と Chemiluminescent immunoassay による葉酸測定と比較、第59回日本医学検査学会、2010年5月22日～5月23日、神戸国際会議場
- ⑧ Nakazato M, Maeda T, Takamura N, Kadota K, Nakashima K, and Tamura T: Indices of atherosclerosis in relation to total homocysteine and blood folate levels in Japanese adults., *Experimental Biology 2010*, American Society for Nutrition, April 24-26, 2010, Anaheim Convention Center, Anaheim, California, USA

〔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〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 隆浩 (MAEDA TAKAHIRO)
長崎大学・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 憲一郎 (NAKASHIMA KENICHIROU)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30039656

高村 昇 (TAKAMURA NOBORU)
長崎大学・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 YOUSUKE)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・客員研究員
研究者番号：70325637

(3) 連携研究者

なし