

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461052

研究課題名(和文) 企業労働男性における心血管疾患発症と遺伝子環境相互作用の解明と予後調査

研究課題名(英文) Evaluation and investigation between the risk of cardiovascular disease and SNP-environment interaction in the company labor men

研究代表者

林 睦晴 (Hayashi, Mutsuharu)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：70426500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の企業労働男性において、健康診断データと、循環器疾患を中心とした生活習慣病との関連が示唆される99個の遺伝子多型(SNPs)のタイピング結果の組み合わせ解析を施行することにより、臨床的に有意となる関連因子の検索を行った。結果、生活習慣病と遺伝子環境相互作用因子に有意に関連した5個のSNPを同定した。遺伝子多型、臨床パラメーター、両者の相互作用について多変量ロジスティック解析を施行した結果、rs7965413と血液中の血小板数で有意な結果を認め、援護論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：We performed a case-control study to explore novel SNP × clinical parameter(CP) interactions as risk markers for MetS based on health check-up data of Japanese male employees. After selection of 99 SNPs that were previously reported to be associated with MetS and components of MetS, we performed logistic regression analyses to assess the association of each SNP with MetS. Of these SNPs, five SNPs were significantly associated with MetS ($P < 0.05$). Then we performed multiple logistic regression analyses, including an SNP term, a CP term, and an SNP × CP interaction term for each CP and SNP that was significantly associated with MetS. We identified a novel SNP × CP interaction between rs7965413 and platelet count that was significantly associated with MetS ($P < 0.01$). We published these results as an English paper.

研究分野：循環器内科

キーワード：遺伝子多型 遺伝子環境相互作用因子 生活習慣病 労働男性

1. 研究開始当初の背景

1. 研究開始当初の背景

現在までの我々を含めた多くの研究成果により、糖尿病(DM)・メタボリック症候群(Mets)など、心血管疾患(CVD)に至る生活習慣病において、特定の遺伝型により環境要因の影響が異なる様々な組み合わせの遺伝子環境相互作用の重要性が報告されてきた。但し、関連疾患は未だ限られた領域であり、高血圧(HT)やCVD発症の最大危険因子であることが報告された慢性腎臓病(CKD)については、発症進展に関わる遺伝子環境相互作用は十分に解明されていない。

また、遺伝子環境相互作用における新たな組み合わせ因子に関しては、短期観察における発症率のみが報告されているものの、その長期予後や重症度に関しては十分な検証がなされていない。

我々はこれまでに医工連携研究として、本研究の基盤となる以下の成果を得た。

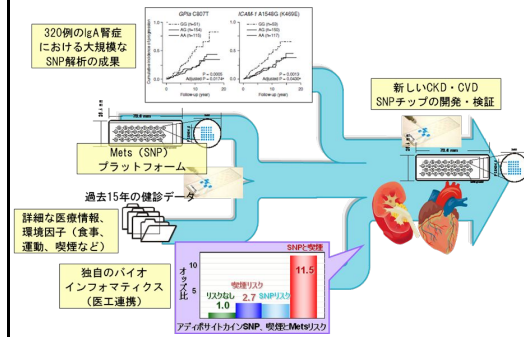
トヨタ自動車、及び従業員の同意・協力を得て、約1,200名のDNA抽出・SNPs解析を行うと同時に、過去数年間の企業健診データ、環境因子(喫煙・食事嗜好・運動習慣など)を含む詳細な医療情報を取得した。

Mets・DMに対するSNPチップを開発し、疾患群と対照群を抽出し、SNP解析を行った。

独自のバイオインフォマティクスソフトを開発し、SNPと血液検査、環境因子などの単独ならびに膨大な組み合わせ解析を自動的に行い、Mets・DM発症に関わるリスク因子やその組み合わせを同定した。

Propensity解析により、観察期間において新規に疾患を発症した群と患者背景をマッチさせた対照群を選別し、詳細なSNPと環境因子との組み合わせ解析を行い、以下の新知見を見出した。

1. **インスリン受容体関連遺伝子(ENPP1)と体脂肪率増加のMets発症率上昇への影響**
2. **活性酸素関連遺伝子(GPX1)と体脂肪率増加のMets発症率上昇への影響**
3. **P-セレクチン関連遺伝子(SELP)とGTP増加のMets発症率上昇への影響**
4. **脂質代謝関連遺伝子(ApoE)と体重増加のMets発症率上昇への影響**
5. **心筋梗塞関連遺伝子(Brap)とHDLコレステロール減少のMets発症率上昇への影響**
6. **LDL受容体関連遺伝子(LRP2)とアルコール摂取のDM発症率上昇、及び尿酸値上昇への影響**
7. **膜結合性チャネル関連遺伝子(SLC34A1)と収縮期血圧上昇(塩分過剰摂取)のDM発症率上昇**
8. **膜結合性チャネル(SLC34A1)関連遺伝子とアルコール摂取・脂肪肝のDM発症率上昇への影響**



2. 研究の目的

□健診データ・環境因子を含む医療情報の取得期間を延長することにより、これまでの解析では発症率が少なく同定出来なかったHT・CKDに関する新たな遺伝子環境相互作用の組み合わせを明らかにする。

□2001年からの医療情報を基に、Mets・DMに関する新たに見出した遺伝子環境相互作用の約10-15年の長期間に渡る予後・重症度調査を施行し、環境因子改善の介入による疾病回避率、及び医療負担軽減の試算を行う。

1. 遺伝情報に基づくオーダーメイド医療への発展：CKD・HTの発症・進展に関わる遺伝子環境相互作用を解明し、遺伝情報に基づき疾病の発祥・重症化を予防する医療への礎を築く

2. 強力な医工連携・産学連携の成果、既存の企業健診資料ならびにDNAを生かして、CKD・HT発症・進展を予測する新たなSNPチップを短期間で開発する、ことである。

3. 新たに確立された遺伝子環境因子相互作用の組み合わせにつき、中長期の予後・重症度調査を施行することにより、改善により疾患発症回避率が高い環境因子の候補が同定され、効率の良い生活指導が可能となる。

この研究は長期間に渡る、詳細な従業員の健診データ、及び喫煙・食事嗜好・運動習慣などを含んだ環境因子の情報を有するトヨタ自動車の協力なくしては実現不可能であり、今まで育んできた産学連携の成果である。本研究は、地域住民を対象とした他の大規模なコホート研究と異なり、若年労働者を対象としており、その成果は我が国における貴重な労働層の健康管理に多大な功績を与えうる。また、医工連携の恩恵として既存の技術を他分野で活用することにより、短期間で成果を出せるのも本研究の特徴である。

本研究で活用する技術とその概要を以下に示す。

- A、医工連携・産学連携により共同開発した、独自のSNP診断技術。
- B、GenFIS：バイオインフォマティクス技術

で膨大な SNP や環境因子の組み合わせ解析を自動化。

C、Propensity 解析：既存資料・試料を有効に活用し、後ろ向きではあるが複数の交絡因子の影響を除いた統計解析が可能。

D、320 例の IgA 腎症の予後に関わる 100 種の SNP 解析結果。

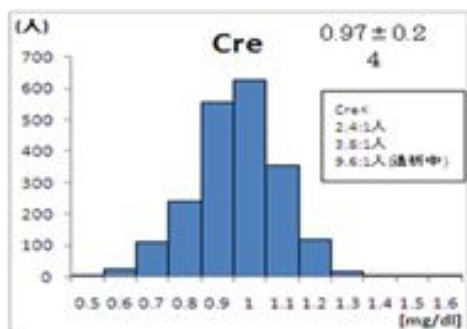
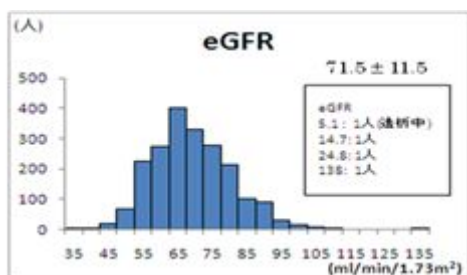
3. 研究の方法

CKD・CVD 疾患関連 SNP の開発：CKD・CVD の発症進展に関わる候補 SNP を探索し、プローブ設計する。プローブの精度を検証し、SNP チップを開発する。すでに解析済みの Mets に関わる SNP、IgA 腎症に関わる SNP がその基礎資料となる。

健診サンプルのデータ解析：4,000 名の 15 年間の企業健診結果・診療情報より CKD 群、CVD 群を抽出する。CKD 群、CVD 群に対し、性別、年齢、既存症や環境因子（生活、食事、喫煙など）をマッチさせた対照群を抽出する。

SNP 解析：DNA を抽出済みの 2,601 名において CKD 群、CVD 群、対照群の各群で新たに開発したチップにより SNP を解析する。

本研究対象における eGFR と Cre の分布を示す。CKD5D を含み、正規分布している。



CKD・CVD 発症・進展リスクの同定：SNP チップ解析より、CKD・CVD 発症進展に関わるリスクを探索。同様に環境因子も探索する。

遺伝子環境相互作用の解析：独自の GenFIS バイオインフォマティクス技術を用いて、SNP、診療情報、環境因子の膨大な組み合わせを自動的に解析する。

Propensity 解析：年齢、性別などの患者

背景をマッチさせた対照群と CKD・CVD 群において後ろ向き解析を行う。可能な限り交絡因子を減らし、遺伝子環境相互作用の有効性を検証する。

本研究に必要な設備は既に名古屋大学医学部ならびに工学部に整備済みである。また 4000 人 15 年間の健診結果や生活習慣などの医療情報を入手し、そのうち同意を得られた 2,601 名の DNA を抽出済みであり、本研究が採択されれば速やかに研究に着手できる環境が整備されている。

研究の代表者と分担者は、名古屋大学で医工連携を通じ良好な共同研究関係が構築されている。本研究は、医学では循環器、腎臓領域にまたがり、工学では SNP チップの開発技術、バイオインフォマティクス技術を要するため、それぞれの専門性を有する共同研究者との協力を要する。各共同研究者との分担は、林睦晴：研究の統括、CKD・CVD 医療情報解析、SNP 解析、今井圓裕：IgA 腎症、Mets の SNP、文献より CKD・CVD に関わる SNP 探索、本多裕之：SNP 開発、バイオインフォマティクス解析、Propensity 解析、安田宜成：CKD・CVD 医療情報解析、SNP 解析、である。

本研究の成果は、共同研究者とも連名で国際一流誌に発表し、国際学会などで報告する。あわせて大学の HP などを通じて広く情報発信を行うことを目指す。

4. 研究成果

メタボリックシンドローム (MetS) と関係しているために多くの遺伝子多型 (SNP) が確認されたが、SNP の臨床的なリスクマーカーに関しては、将来の MetS を予測するゆいなるものは確認されていない。

将来の MetS を予測する能力を向上させるために、組合せの解析 (例えば SNP-SNP インタラクション、SNP-環境インタラクションと SNP 臨床パラメータ (SNP × CP) インタラクション) は有用と考えられる。

日本の男性の従業員の健康検査データに基づく MetS のリスクマーカーとして新しい SNP × CP インタラクションを調査するために、我々は症例対照研究を行った。MetS と MetS の構成要素と関係していることが報告された 99 の SNP を選択し、360 のケースと 1983 人の対照被験者からこれらの SNP を genotyped した。まず初めに、MetS で各々の SNP の影響を評価するために、ロジスティック回帰分析を施行した結果、これらの SNP のうち、5 つの SNP につき有意に Meys との関連を認めた ($P < 0.05$)。有意差を認めた SNP を以下に示す。

LRP2 rs2544390

rs1800592 between UCP1 and TBC1D9

APOA5 rs662799
VWF rs7965413
rs1411766 between MYO16 and IRS2

さらに CP と MetS と関係の強かった一塩基多型ごとに、SNP term、CP term と SNP × CP 相互関連 term を含む多重ロジスティック回帰分析を施行した。結果我々は、MetS と有意に創刊を示す rs7965413 と血小板数の間の新しい SNP × CP 相互作用を確認した [SNP term: odds ratio (OR) = 0.78, P = 0.004; SNP × CP interaction term: OR = 1.33, P = 0.001]。MetS に対する SNP × CP 相互関連のこの相関は、肥満を除いた MetS 構成要素の調整の後の多重ロジスティック回帰分析においても有意であった。これらの結果は、血液中の血小板数が MetS のリスクマーカーとして重要である新たな知見を見出した。

Table. Mets 構成成分別患者背景

Characteristic	Case (n = 360 males)		Control (n = 1983 males)		P value (case vs control)	
	In 2001	In 2009	In 2001	In 2009	In 2001	In 2009
MetS component						
Obesity, n (%)	157 (43.6)	360 (100)	188 (9.5)	239 (12.1)	4.61 × 10 ⁻⁵⁰	<1.00 × 10 ⁻²⁰⁰
Raised blood pressure, n (%)	128 (35.6)	326 (90.6)	236 (11.9)	264 (13.3)	3.12 × 10 ⁻²⁵	3.30 × 10 ⁻¹⁸⁹
Raised FBS, n (%)	33 (9.2)	131 (36.4)	45 (2.3)	58 (2.9)	5.35 × 10 ⁻⁹	7.60 × 10 ⁻⁷¹
Dyslipidemia, n (%)	151 (41.9)	306 (85.0)	192 (9.7)	197 (9.9)	2.17 × 10 ⁻⁴⁵	3.45 × 10 ⁻¹⁸⁸
Number of MetS components	1.3 ± 0.8	3.1 ± 0.3	0.3 ± 0.6	0.4 ± 0.7	4.10 × 10 ⁻¹²⁰	<1.00 × 10 ⁻²⁰⁰
Number of MetS components excluding obesity	0.9 ± 0.7	2.1 ± 0.3	0.2 ± 0.5	0.3 ± 0.5	5.10 × 10 ⁻⁴⁵	<1.00 × 10 ⁻²⁰⁰

Table. 5 SNPs と MetS の有意な関連

SNP	Chr	Position (GRCh37)	Near genes	Minor/major alleles	HWE P value	N		MAF		Logistic regression analysis	
						Case	Control	Case	Control	OR (95% CI)	P value
rs2544390	2	170,204,846	LRP2	C/T	0.231	360	1983	0.450	0.498	0.84 (0.71-0.98)	0.027
rs1800592	4	141,493,961	UCP1, TBC1D9	G/A	0.772	360	1982	0.456	0.502	0.83 (0.70-0.97)	0.022
rs662799	11	116,663,707	APOA5	G/A	0.515	360	1983	0.368	0.327	1.21 (1.03-1.43)	0.023
rs7965413	12	6,234,889	VWF	T/C	0.770	360	1980	0.400	0.452	0.81 (0.69-0.96)	0.012
rs1411766	13	110,252,160	MYO16, IRS2	T/C	0.515	360	1982	0.131	0.102	1.31 (1.03-1.67)	0.030

Table. MetS 患者における SNP rs7965413 と血小板数の有意な相関

Model term	Model 1		Model 2		Model 3	
	OR (95%CI)	P value	OR (95%CI)	P value	OR (95%CI)	P value
SNP	0.78 (0.66-0.92)	0.004 ⁺	0.84 (0.70-1.02)	0.076	0.82 (0.68-0.98)	0.033
CP	1.35 (1.20-1.52)	1.17 × 10 ^{-6†}	1.26 (1.10-1.44)	8.22 × 10 ^{-4†}	1.31 (1.15-1.49)	4.14 × 10 ^{-5†}
Interaction	1.33 (1.12-1.58)	0.001 [†]	1.32 (1.08-1.60)	0.006 ⁺	1.35 (1.12-1.63)	0.002 [†]

Figure. rs7965413 genotype 別の MetS 発症の年齢補正後ハザード比

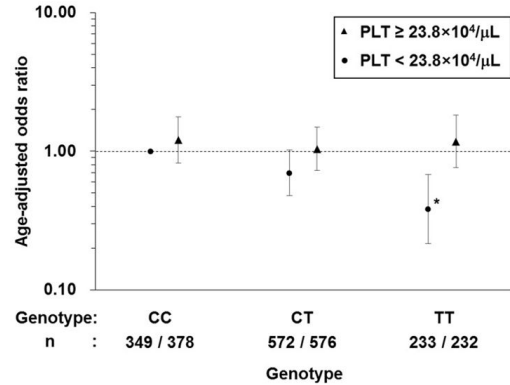


Table. Rs7965413 と血小板数の相関

Group	N	Linear regression analysis		Heterogeneity	
		β ± SE	P value	I ²	P value
Case	360	0.19 ± 0.08	0.013 ⁺	90.2	0.001 ⁺
Control	1980	-0.07 ± 0.03	0.021 ⁺		

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)

1. Hayashi M, Kamada T, Yokoi H, Fujiwara W, Yoshikawa D, Mukaide D, Sugishita Y, Yoshinaga M, Ito T, Ozaki Y, Izawa H. Persistent Excessive Electrocardiogram ST-segment Elevation in a Patient with a Takotsubo Syndrome: What Could be the Cause? Intern Med. 2016;55(3):323. doi: 10.2169 (査読有)
2. Tatami Y, Yasuda Y, Suzuki S, Ishii H, Sawai A, Shibata Y, Ota T, Shibata K, Niwa M, Morimoto R, Hayashi M, Kato S, Maruyama S, Murohara T. Impact of abdominal aortic calcification on long-term cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease. Atherosclerosis. 2015 Dec;243(2):349-55. doi: 10.1016 (査読有)
3. Yoshinaga M, Yoshikawa D, Hayashi M, Izawa H. Clinical Characteristics and

Long-Term Outcomes of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Int Heart J*. 2015;56(4):415-20. doi: 10.1536(査読有)

4. Tagaya M, Hayashi M, Watanabe E, Ishii J, Ozaki Y, Izawa H. Prescription patterns of oral anticoagulants for patients with non-valvular atrial fibrillation: experience at a Japanese single institution. *Heart Vessels*. 2015 May 29. [Epub ahead of print] (査読有)

5. Sawai A, Hayashi M, Matsuo S. Impact of non-invasive cardiovascular screening programs as a predictor of cardiovascular events among asymptomatic chronic kidney disease patients. *Clin Exp Nephrol*. 2015 Sep 24. [Epub ahead of print] (査読有)

6. Shibata Y, Hayashi M, Murohara T. Left ventricular dyssynchrony in patients with moderate coronary stenosis and border line fractional flow reserve. *Nagoya J Med Sci*. 2015 Feb;77(1-2):155-66 (査読有)

7. Kamada T, Hayashi M, Ito T, Ozaki Y, Izawa H. Takotsubo cardiomyopathy with involvement of delayed-onset rhabdomyolysis and acute kidney injury after rosuvastatin treatment. *Intern Med*. 2015;54(1):31-5 doi: 10.2169(査読有)

8. Kumagai S, Amano T, Hayashi M, Yoshikawa D, Murohara T. Impact of cigarette smoking on coronary plaque composition. *Coron Artery Dis*. 2015 Jan;26(1):60-5 doi: 10.1097 (査読有)

9. Nakatochi M, Ushida Y, Hayashi M, Matsuo S, Honda H. Identification of an interaction between VWF re7965413 and platelet count as a novel risk marker for metabolic syndrome: an extensive search of candidate polymorphisms in a case-control study. *PLoS One*. 2015 Feb 3;10(2) doi: 10.1371 (査読有)

10. 河野裕治、粥川知子、青柳陽一郎、才藤栄一、藤原稚也、林睦晴、井澤英夫 心臓リハビリテーションは慢性心不全患者の長期予後を改善するか? *J Jpn Coron Assoc* 2015;21:48-52(査読無)

11.Hayashi M, Izawa H. Recent prophylactic strategies and novel biomarkers for contrast-induced acute kidney injury. *OA Nephrology*. 2014 Jan 18;2(1):1 (査読無)

12.Yoshikawa D, Ishii H, Hayashi M, Niwa T, Izawa H, Murohara T. Plasma indoxyl

sulfate and estimated glomerular filtration rate. *Circ J*. 2014 Aug;78(10):2477-82. (査読有)

13.Wu H, Cheng XW, Hu L, Hao CN, Hayashi M, Murohara T. Renin inhibition reduces atherosclerotic plaque neovessel formation and regresses advanced atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 2014 Dec;237(2):739-47 doi: 10.1016 (査読有)

14.Izumi Y, Hayashi M, Izawa H, Matsuo S, Murohara T. Impact of circulating cathepsin K on the coronary calcification and the clinical outcome in chronic kidney disease patients. *Heart Vessels*. 2014 Aug 24 doi: 10.1007 (査読有)

15.Okumura N, Hayashi M, Ishii H, Murohara T. Novel preprocedural and acute-phase postprocedural predictive factors for contrast-induced kidney injury in CKD patients. *Int J Cardiol*. 2014 Mar 15;172(2):e293-6 doi: 10.1016 (査読有)

16.Sugiura T, Yoshikawa D, Hayashi M, Ando H, Amano T, Murohara T. Relation of omega-3 fatty acid and C-reactive protein to peripheral artery disease in patients with coronary artery disease. *Heart Vessels*. 2014 Jul;29(4):449-55 doi: 10.1007(査読有)

17.Okada K, Ohshima S, Isobe S, Hayashi M, Ishii H, Murohara T. Epicardial fat volume correlates with severity of coronary artery disease in nonobese patients. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2014 May;15(5):384-90 doi: 10.2459(査読有)

18.Ishii J, Takahashi H, Kitagawa F, Kuno A, Okuyama R, S, Matsui S, Hasegawa M, Aoyama T, Kamoi D, Kasuga H, Izawa H, Ozaki Y, Yuzawa Y. Multimarker approach to risk stratification for long-term mortality in patients on chronic hemodialysis. *Circ J*. 2015;79(3):656-63. doi: 10.1253(査読有)

19.Izawa H, Amano T. Plasma microRNA-100 as a biomarker of coronary plaque vulnerability - a new generation of biomarker for developing acute coronary syndrome. *Circ J*. 2015;79(2):303-4. doi: 10.1253 (査読有)

20. Nakatochi M, Ichihara S, Yamamoto K, Ohnaka K, Kato Y, Yokota S, Hirashiki A, Naruse K, Asano H, Izawa H, Matsubara T, Yokota M. Epigenome-wide association

study suggests that SNPs in the promoter region of RETN influence plasma resistin level via effects on DNA methylation at neighbouring sites. Diabetologia. 2015 Dec;58(12):2781-90. doi: 10.1007(査読有)

〔雑誌論文〕(計 20 件)

M.Hayashi

ESC congress(欧州心臓病学)2014(於:Spain, Barcelona)(2014/8/30-9/4)

Impact of Indoxyl sulfate on the progression of endothelial dysfunction and atherosclerosis in chronic kidney disease patients

M.Hayashi

第1回心筋症研究会(於:東京)(2015/7/4)

突発性拡張型心筋症の末梢血マイクロRNAの網羅的解析と定量評価

〔学会発表〕(計 2 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 睦晴(HAYASHI, MUTSUHARU) (藤田保健衛生大学・医学部・准教授)

研究者番号：70426500

(2)研究分担者

安田 宜成(YASUDA, YOSHINARI) (名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授)

研究者番号：60432259

本多 裕之(HONDA, HIROYUKI) (名古屋大学・大学院工学系研究科・教授)

研究者番号：70209328