

遺伝的素因による生活習慣病リスクの増大に 習慣的運動が及ぼす影響

立命館大学 家光素行
(共同研究者) 国立健康・栄養研究所 宮地元彦
同 村上晴香
立命館大学 真田樹義
同 田畑 泉

Cardiorespiratory Fitness Affects Genetic Predisposition-caused Increase in Arterial Stiffness

by

Motoyuki Iemitsu, Kiyoshi Sanada, Izumi Tabata,
Ritsumeikan University
Motohiko Miyachi, Haruka Murakami
National Institute of Health and Nutrition

ABSTRACT

The present study provides a cross-sectional investigation of 763 Japanese men and women (18 – 70 years old) to clarify the effects of cardiorespiratory fitness on the relationship between arterial stiffness and 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and ghrelin (GHRL) C214A gene polymorphism. Arterial stiffness was assessed by carotid β -stiffness with ultrasonography and tonometry. The study subjects were divided into High-Fit and Low-Fit groups based on the median value of peak oxygen uptake in each gender and decade. The plasma homocysteine level was higher in the TT genotype of MTHFR C677T polymorphism compared with CC and CT genotype individuals. There was no effect of MTHFR C677T polymorphism

on carotid β -stiffness, but was significant interaction effect fitness and MTHFR C677T polymorphism on carotid β -stiffness ($P = 0.0017$). In the Low-Fit subjects, carotid β -stiffness was significantly higher in TT genotype individuals than that in CC and CT genotypes. However, there were no such differences in High-Fit subjects. In addition, total cholesterol, LDL cholesterol and triglyceride level was lower in the AA genotype of GHRL C214A polymorphism compared with CC and CA genotype individuals. There was no effect of GHRL C214A polymorphism on carotid β -stiffness in either fitness level. These results suggest that the higher cardiorespiratory fitness may attenuate the central artery stiffening associated with MTHFR C677T polymorphism.

要 旨

本研究は、動脈硬化リスクに対するホモシステインの代謝酵素、5,10-methylene tetrahydrofolate reductase 遺伝子 (MTHFR:677C \rightarrow T) やグレリン遺伝子 (GHRL:214C \rightarrow A) の多様性に体力レベルの違いが影響するかを横断的に検討した。男女763名を対象にMTHFR およびGHRL 遺伝子多型を Taqman 法にて判定し、動脈硬化の指標として頸動脈 β スティフネスを測定した。体力レベルは最大酸素摂取量を測定し、各年代・性別ごとの平均値を基準に High-Fit と Low-Fit に分けた。MTHFR 遺伝子の TT 型は、High-Fit, Low-Fit 群ともに有意に高い血中ホモシステイン濃度を示した。Low-Fit 群において MTHFR 遺伝子の TT 型の頸動脈 β スティフネスは CC および CT 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、GHRL 遺伝子の AA 型の総コレステロールおよび LDL コレステロール、中性脂肪は CC および CA 型よりも有意に低値を示した。GHRL 遺伝子多型および体力レベルにより頸動脈 β スティフネスの差は認められなかった。これらの結果から、MTHFR 遺伝子多型 677C \rightarrow T による動脈硬化リスクの多様性に体力レベルの違いが影響する可能性が示唆された。

緒 言

近年、高齢化社会が進む中、国内では生活習慣病が急増しており、その中でも虚血性心疾患、脳血管疾患などの動脈硬化を起因とする全死亡原因の30%近くを占めている。その背景には、運動・食習慣の乱れによる生活習慣病の増大が大きな要因となっている。習慣的な運動は、身体的な体力を向上させるだけでなく、血管拡張・収縮物質を変動させ、動脈血管内皮機能の充進・改善、平滑筋トーンや増殖の抑制が生じることにより、動脈硬化性疾患リスクを軽減させる効果がある^{1,2)}。しかしながら、運動習慣の改善による効果には個人差が認められる。現在までに運動による動脈硬化への効果の個人差に影響する遺伝子多型として、エンドセリン-1受容体³⁾、心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide: ANP)⁴⁾、エストロゲン受容体⁵⁾、内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase: eNOS)⁶⁾ の遺伝子の多様性が検討されており、身体活動量と動脈硬化指標や血圧の関係に影響することが報告されている。

ホモシステインは、血中濃度が高値の場合、動脈の内皮機能の低下や酸化ストレスの増大を引き起こし、動脈硬化などの心血管系疾患リスクを増大させる⁷⁻⁹⁾。通常、ホモシステイ

ンは、5,10-methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 酵素によって葉酸およびビタミン B₁₂ とともにメチオニンに代謝されるが¹⁰⁾、MTHFR 遺伝子の 677C → T (Ala → Val) に置換される多型は、酵素活性が低下し、血中ホモシステイン濃度が増大することが報告されている^{11, 12)}。また、グレリンは、成長ホルモン分泌促進作用や強力な摂食亢進作用がある^{13, 14)} ことで知られているが、近年、血管拡張作用がある一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 合成を促進させ、血圧や血管トーンスの調節に影響することが報告された^{15, 16)}。グレリン遺伝子 (GHRL) 214C → A (72Leu → Met) に置換される多型は、グレリン作用を低下させ、摂食障害や肥満などの体組成に影響することが報告されている^{17, 18)}。このように、MTHFR やグレリンは動脈硬化性疾患リスクに対して影響するが、MTHFR やグレリンの遺伝的素因により動脈硬化性疾患リスクを増大させるか否か、さらにこれらの遺伝子多型が動脈硬化性疾患リスクに対する運動効果に及ぼす影響については明らかでない。

そこで本研究は、MTHFR や GHRL 遺伝子多型が習慣的な運動や体力の増大による動脈硬化性疾患リスクの軽減効果に影響を及ぼすか否かを検討することを目的とした。

1. 研究方法

1.1 被験者

本研究は、国立健康・栄養研究所で実施している大規模な疫学的調査フィールド：Nutrition and Exercise Intervention Study (NEXIS) に登録されている 18 歳から 70 歳までの男女 763 名 (男性 239 名、女性 524 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 ($\dot{V}O_{2peak}$) 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。18-30 歳男性は平均 47.1 ml/min/kg、女性は平均

36.7 ml/min/kg、31-40 歳男性は平均 37.1 ml/min/kg、女性は平均 35.6 ml/min/kg、41-50 歳男性は平均 34.7 ml/min/kg、女性は平均 31.9 ml/min/kg、51-60 歳男性は平均 31.8 ml/min/kg、女性は平均 29.3 ml/min/kg、61-70 歳男性は平均 31.0 ml/min/kg、女性は平均 27.2 ml/min/kg であった。すべての被験者は慢性疾患を有さない、非喫煙者であり、被験者の中には座職者および活動的な被験者が含まれているが、スポーツ競技者は含まれていない。本研究は、独立行政法人国立健康・栄養研究所の倫理審査委員会の承諾を受け、被験者には研究の目的および測定方法の説明をした後に実験参加の承諾を得て、測定を実施した。

1.2 形態計測および安静時血圧計測

被験者は、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。体脂肪率は、二重エネルギー X 線吸収測定法 (DXA 法: Hologic QDR-4500A scanner; Hologic 社製) による全身の体脂肪量の測定と体重から算出した。

1.3 血液パラメーターの測定

座位安静状態にて肘正中静脈から採血し、採取した血液から、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、血糖、ホモシステイン、葉酸濃度を測定した。

1.4 $\dot{V}O_{2peak}$ の測定

$\dot{V}O_{2peak}$ の測定は、自転車エルゴメーター (828E: Monark 社製) を使用した。男性被験者は 90W (60-120W) から、女性被験者は 60W (30-90W) から開始し、1 分毎に 15W ずつ強度を増やす多段階漸増負荷法で行い、自転車エルゴメーターの回転数は 60 回転/分とし、疲労困憊に至るまで

とした。運動中、各負荷ステージの心拍数と主観的運動強度 (RPE: rating of perceived exertion) をモニターした。呼気ガスはダグラスバックにより 30 秒毎採取し、呼気ガスの酸素と二酸化炭素の濃度分析は質量分析器 (ARCO-1000A: アルコシステム社製) により行い、ガス量およびガス温は乾式ガスメーター (DC-5C: 品川製作所社製) により測定した。 $\dot{V}O_{2peak}$ の評価基準は、1) $\dot{V}O_2$ のレベリングオフが確認されること、2) 年齢から推定される最高心拍数 (220 - 年齢 \pm 5 拍/分) にほぼ到達していること、3) 換気交換比が 1.1 以上であること、4) RPE が 18 以上であることとし、この 4 つの指標のうち 3 つ以上を満たすことを条件とした。

1.5 頸動脈 β スティフネスの測定

すべての被験者は、動脈硬化の指標として、頸動脈 β スティフネスの測定を行った。頸動脈コンプライアンスやスティフネスは、頸動脈の超音波画像と頸動脈の血圧によって評価することが可能である¹⁹⁾。頸動脈の直径は、超音波診断装置 (Sonosite 180-PLUS, Sonosite 社製) を用いて測定された。右頸動脈にプローブをあて、頸動脈の分岐から中枢へ 1-2cm の位置の総頸動脈の縦断画像を描写した。安定した 10 心周期にあたる連続画像を直接パーソナルコンピューター (iBook G3, Apple 社製) に取り込み、後に画像解析ソフト (NIH image1.63) を用いて解析した。取り込まれた画像をスクロールし、1 心周期における最大直径および最小直径 (それぞれ心臓の収縮期および拡張期にあたる) を算出し、同様に算出された 5 拍分の平均値を求め、頸動脈最大収縮期直径および最小拡張期直径とした。また、頸動脈最大収縮期直径と最小拡張期直径との差分を頸動脈直径の較差とし算出した。

圧波形はペンタイプの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
デサントスポーツ科学 Vol. 32

製) を用いて右頸動脈から得られた (平圧脈圧法)¹⁹⁾。総頸動脈にプローブを押し当てることによって得られる波形は、A/D 変換器 (PowerLab, AD Instruments) を介してパーソナルコンピューターに 1000Hz の時間分解能でサンプリングされ、上腕の平均および拡張期血圧によって補正された¹⁹⁾。頸動脈最大収縮期直径、最小拡張期直径と頸動脈径較差、頸動脈収縮期血圧 (Carotid Systolic Blood Pressure: CSBP) と頸動脈脈圧 (Carotid Pulse Pressure: CPP) および拡張期血圧 (DBP) から、以下の式によって頸動脈 β スティフネスを算出した。

頸動脈 β スティフネス (index) = \ln (CSBP/DBP) / (頸動脈径較差 / 頸動脈拡張期径)¹⁹⁾

頸動脈径、頸動脈脈圧および頸動脈 β スティフネスの変動係数は、それぞれ、 2 ± 1 、 7 ± 3 および $5 \pm 2\%$ であった。

1.6 遺伝子多型の判定

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^{3,4)}。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^{3,4)}。MTHFR 677C \rightarrow T, GHRL 214C \rightarrow A の遺伝子多型を判定するための TaqMan probe および MTHFR, GHRL を増幅するための primer は、Primer Express v.1.5 software (Applied Biosystems 社製) により設計した。MTHFR 677C \rightarrow T の DNA 塩基配列は、NCBI に登録されている「rs1801133」を、さらに、GHRL 214C \rightarrow A の DNA 塩基配列は、NCBI に登録されている「rs696217」を用いて、以下の primer および TaqMan probe を合成した：

MTHFR forward: 5'-GCACTTGAAGGAGAAGGTGTCT-3'

MTHFR reverse: 5'-CCTCAAAGAAAAGCTGCGTGATG-3'

MTHFR/G probe: 5'-ATGAAATCGGCTCCCGC-3'

MTHFR/A probe: 5'-ATGAAATCGACTCCCCGC-3'
 GHRL forward: 5'-ACAGAAGCATAAACTGCAGAGGTA-3'
 GHRL reverse: 5'-GGAAGATGGAGGTCAAGCAGAAG-3'
 GHRL /G probe: 5'-CGGACTTCCAGTTCAT-3'
 GHRL/T probe: 5'-CGGACTTCCATTTTCAT-3'

Real-time PCR による DNA 増幅は、95℃ 10 分間を 1 サイクル、92℃ 15 秒間と 60℃ 60 秒間を 40 サイクルにより行った。DNA 増幅後の遺伝子多型の判定は、SDS v.1.7a software package (Applied Biosystems 社製) を用いて ABI-7500 with end-point analysis mode により自動的に解析した^{3,4)}。

1.7 統計解析

本研究結果は、すべて平均値 ± 標準誤差で表した。MTHFR 677C → T および GHRL 214C → A のアレル頻度と Hardy-Weinberg 平衡 (遺伝子型の分布頻度が世代を重ねて平衡に達しているという法則) は、 χ^2 検定を用いて確認した。High-Fit 群および Low-Fit 群の 2 群間の比較は、対応のない t 検定を用いた。また、多型間および High-Fit 群および Low-Fit 群間の多型の比較は、年齢を共変量とした一元配置分散分析を用いた。危険率は 5% 未満を有意水準とした。

2. 研究結果

2.1 High-Fit 群および Low-Fit 群間の比較

High-Fit 群および Low-Fit 群の間において、年齢、身長、SBP、DBP、頸動脈 β スティフネス、総コレステロール値、血糖値、ホモシステイン濃度、葉酸濃度には有意な差が認められなかった。体重、体脂肪率、LDL コレステロール値、中性脂肪は、Low-Fit 群よりも High-Fit 群にて有意に低値を示した (表 1)。また、HDL コレステロール値および $\dot{V}O_{2peak}$ は、Low-Fit 群よりも High-Fit 群にて有意に高値を示した (表 1)。

表 1 Characteristics of subjects in the High cardiorespiratory fitness and Low cardiorespiratory fitness groups

	High-Fit	Low-Fit
No. of subjects	385	378
Age, years	39 ± 1	38 ± 1
Body weight, g	58 ± 1 *	60 ± 1
Height, cm	163 ± 1	163 ± 1
%fat, %	21.2 ± 0.3 *	26.4 ± 0.4
SBP, mmHg	112 ± 1	112 ± 1
DBP, mmHg	65 ± 1	66 ± 1
β -stiffness, A.U.	8.4 ± 0.2	8.8 ± 0.3
Total cholesterol, mg/dl	191 ± 2	190 ± 2
HDL cholesterol, mg/dl	69 ± 1 *	63 ± 1
LDL cholesterol, mg/dl	112.1 ± 1.7 *	118.7 ± 1.7
Triglycerides, mg/dl	67 ± 1 *	72 ± 2
Glucose, mg/dl	89 ± 1	90 ± 1
Homocysteine, mmol/L	7.7 ± 0.2	7.6 ± 0.2
Folic acid, ng/ml	9.8 ± 0.3	9.3 ± 0.2
$\dot{V}O_{2peak}$, ml/kg/min	40.9 ± 0.5 *	31.1 ± 0.4

High-Fit: High cardiorespiratory fitness, Low-Fit Low cardiorespiratory fitness, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, β -stiffness: carotid β -stiffness, HDL: high density lipoprotein, $\dot{V}O_{2peak}$: peak oxygen uptake. Values are means and SE, * P<0.05 vs. Low-Fit

2.2 MTHFR および GHRL 遺伝子多型の遺伝子型とアレル頻度

本研究の対象者における MTHFR 677C → T および GHRL 214C → A の遺伝子型とアレル頻度の全体および男女別を表 2 に示す。MTHFR および GHRL の遺伝子多型はともに Hardy-Weinberg 平衡であることが確認された。さらに、MTHFR

表 2 Gene polymorphism of MTHFR (C677T) and GHRL (C214A) distribution and allele frequency in the study subjects

Parameters	Total	Male	Female
Genotypes, % (n)			
MTHFR			
CC	35 (268)	41 (97)	33 (171)
CT	50 (384)	44 (106)	53 (278)
TT	15 (111)	15 (36)	14 (75)
GHRL			
CC	63 (477)	63 (140)	62 (337)
CA	33 (254)	33 (73)	33 (181)
AA	4 (32)	4 (8)	5 (24)
Allele frequency			
MTHFR (T allele)	0.53	0.49	0.56
GHRL (A allele)	0.25	0.24	0.25

MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase, GHRL: ghrelin The genotype frequencies did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium. No difference was found between genders.

および GHRL の遺伝子多型の遺伝子型およびアレル頻度は男女間に差がなく、同程度の頻度であった。

2.3 MTHFR 677C → T 遺伝子多型間の比較

MTHFR 677C → T 遺伝子多型間において、年齢、体重、身長、体脂肪率、SBP、DBP、頸動脈 β スティフネス、総コレステロール値、HDL コレステロール値、LDL コレステロール値、中性脂肪、血糖値、葉酸濃度、 $\dot{V}O_{2peak}$ には有意な差が認められなかった。しかしながら、血中ホモシステイン濃度は、CC 型および CT 型よりも TT 型で有意に高値を示した (表 3)。

表3 Genotypes of MTHFR C677T and subject characteristics

	MTHFR C677T		
	CC	CT	TT
Age, years	40±1	39±1	41±2
Body weight, g	59±1	58±1	59±1
Height, cm	164±1	162±1	162±1
%fat, %	23.3±0.5	24.1±0.4	24.3±0.7
SBP, mmHg	113±1	112±1	114±1
DBP, mmHg	66±1	66±1	67±1
β -stiffness, A.U.	8.5±0.3	8.2±0.2	9.2±0.6
Total cholesterol, mg/dl	191±2	191±2	196±4
HDL cholesterol, mg/dl	66±1	66±1	65±1
LDL cholesterol, mg/dl	110.8±1.9	110.8±1.5	117.3±3.2
Triglycerides, mg/dl	71±2	69±1	70±2
Glucose, mg/dl	90±1	89±1	90±1
Homocysteine, mmol/L	7.4±0.1	7.4±0.1	9.7±0.5 [†]
Folic acid, ng/ml	9.8±0.2	9.5±0.3	8.7±0.4
$\dot{V}O_{2peak}$, ml/kg/min	36.4±0.7	35.9±0.6	35.7±0.9

MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, β -stiffness: carotid β -stiffness, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, $\dot{V}O_{2peak}$: peak oxygen uptake. Values are means and SE, * P<0.05 vs. CC, † P<0.05 vs. CT

2.4 GHRL 214C → A 遺伝子多型間の比較

GHRL 214C → A 遺伝子多型間において、年齢、体重、身長、体脂肪率、SBP、DBP、頸動脈 β スティフネス、HDL コレステロール値、血糖値、 $\dot{V}O_{2peak}$ には有意な差が認められなかった。しかしながら、血中総コレステロール値および LDL

表4 Genotypes of GHRL C214A and subject characteristics

	GHRL C214A		
	CC	CA	AA
Age, years	42±1	42±1	40±3
Body weight, g	60±1	60±1	59±3
Height, cm	163±1	162±1	161±2
%fat, %	24.4±0.3	25.1±0.5	24.9±1.3
SBP, mmHg	116±1	116±1	115±3
DBP, mmHg	68±1	68±1	68±2
β -stiffness, A.U.	7.9±0.2	7.8±0.3	7.8±0.8
Total cholesterol, mg/dl	198±2	197±2	177±7 [†]
HDL cholesterol, mg/dl	66±1	64±1	64±2
LDL cholesterol, mg/dl	116.9±1.4	118.6±1.9	102.6±5.0 [†]
Triglycerides, mg/dl	81±2	85±3	63±6 [†]
Glucose, mg/dl	91±1	92±1	90±2
$\dot{V}O_{2peak}$, ml/kg/min	33.8±0.4	34.0±0.6	34.1±1.5

GHRL: ghrelin, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, β -stiffness: carotid β -stiffness, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, $\dot{V}O_{2peak}$: peak oxygen uptake) Values are means and SE, * P<0.05 vs. CC, † P<0.05 vs. CA

コレステロール値、中性脂肪は、CC 型および CA 型よりも AA 型で有意に低値を示した (表 4)。

2.5 High-Fit 群および Low-Fit 群における MTHFR 677C → T 遺伝子多型間の比較

High-Fit 群 および Low-Fit 群 に分けて、MTHFR 677C → T 遺伝子多型間の比較をした結果、年齢、体重、身長、体脂肪率、SBP、DBP、総コレステロール値、HDL コレステロール値、中性脂肪、血糖値、葉酸濃度は多型間において有意な差が認められなかった。しかしながら、血中ホモシステイン濃度は、High-Fit 群および Low-Fit 群ともに、CC 型および CT 型よりも TT 型で有意に高値を示した (表 5)。また、頸動脈 β スティフネスは、体力レベルと遺伝子多型による有意な交互作用 (年齢で補正) が認められ (P<0.0017)、Low-Fit 群において CC 型および CT 型よりも TT 型で有意に高値を示したが、High-Fit 群においては多型間に有意な差は認められなかった (表 5)。

表5 Characteristics of subjects in each cardiorespiratory fitness and genotypes of MTHFR C677T group

	Low-Fit			High-Fit		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Age, years	39±1	38±1	37±2	38±1	38±1	41±2
Body weight, g	60±1	60±1	61±2	59±1	58±1*	57±1*
Height, cm	164±1	162±1	164±1	164±1	163±1	162±1
%fat, %	25.3±0.7	26.9±0.5	27.1±1.1	20.7±0.6*	21.0±0.5*	22.7±0.8*
SBP, mmHg	111±1	112±1	115±3	113±1	112±1	111±2
DBP, mmHg	66±1	66±1	69±1	66±1	65±1	66±1
β -stiffness, A.U.	8.1±0.3	8.9±0.4	10.2±0.8†	8.4±0.4	8.3±0.3	8.7±0.6
Total cholesterol, mg/dl	190±3	189±3	193±6	189±3	191±3	195±5
HDL cholesterol, mg/dl	65±1	63±1	65±1	67±1	70±1*	70±2*
LDL cholesterol, mg/dl	110.4±2.7	112.8±2.2	117.0±5.2	108.7±2.9	106.8±2.5	112.8±4.4
Triglycerides, mg/dl	75±3	70±2	75±4	68±3	67±2	64±4*
Glucose, mg/dl	89±1	90±1	90±1	90±1	89±1	89±1
Homocysteine, mmol/L	7.2±0.2	7.2±0.1	9.8±0.7†	7.5±0.2	7.5±0.2	9.1±0.7†
Folic acid, ng/ml	9.8±0.4	9.2±0.3	8.4±0.8	9.9±0.4	9.9±0.4	9.0±0.6
$\dot{V}O_{2peak}$, ml/kg/min	31.1±0.8	30.6±0.5	32.9±1.4	41.4±0.9*	41.2±0.8*	38.1±1.1*†

MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, β -stiffness: carotid β -stiffness, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, $\dot{V}O_{2peak}$: peak oxygen uptake. Values are means and SE, * P<0.05 vs. each genotype in Low-Fit, † P<0.05 vs. CC and CT in High-Fit

表6 Characteristics of subjects in each cardiorespiratory fitness and genotypes of GHRL C214A group

	Low-Fit			High-Fit		
	CC	CA	AA	CC	CA	AA
Age, years	42±1	42±2	46±4	42±1	41±2	36±4
Body weight, g	60±1	61±1	61±3	59±1*	58±1*	58±3
Height, cm	162±1	161±1	160±2	163±1	162±1	161±2
%fat, %	26.2±0.4	27.1±0.7	26.9±2.0	21.5±0.4*	22.2±0.6*	22.6±1.4
SBP, mmHg	116±1	117±2	115±3	116±1	115±1	115±4
DBP, mmHg	69±1	69±1	68±3	68±1	68±1	69±3
β -stiffness, A.U.	7.8±0.3	7.9±0.4	9.2±1.2	7.9±0.3	7.7±0.3	6.6±0.9
Total cholesterol, mg/dl	200±2	199±3	181±11	196±3	195±4	174±10†
HDL cholesterol, mg/dl	62±1	63±1	62±3	70±1*	66±2	65±3
LDL cholesterol, mg/dl	119.8±2.2	118.0±2.7	106.0±9.0	112.3±2.2*	113.8±2.8	97.9±7.4†
Triglycerides, mg/dl	88±4	92±5	64±7	74±2*	78±4*	63±9
Glucose, mg/dl	91±1	92±1	94±3	90±1	91±1	87±3
$\dot{V}O_{2peak}$, ml/kg/min	28.8±0.5	29.4±0.7	28.8±1.6	38.7±0.5*	38.7±0.8*	38.3±1.8*

GHRL: ghrelin, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, β -stiffness: carotid β -stiffness, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, $\dot{V}O_{2peak}$: peak oxygen uptake. Values are means and SE, * P<0.05 vs. each genotype in Low-Fit, † P<0.05 vs. CC and CA in High-Fit

2.6 High-Fit群およびLow-Fit群における

GHRL 214C → A 遺伝子多型間の比較

High-Fit群およびLow-Fit群に分けて、GHRL 214C → A 遺伝子多型間の比較をした結果、年齢、体重、身長、体脂肪率、SBP、DBP、頸動脈 β スティフネス、HDL コレステロール値、中性脂肪、血糖値、 $\dot{V}O_{2peak}$ は多型間において有意な差が認められなかった。しかしながら、血中総コレステ

ロール値およびLDL コレステロール値は、High-Fit群においてCC型およびCA型よりもAA型で有意に低値を示したが、Low-Fit群においては多型間に有意な差は認められなかった(表6)。

3. 考察

MTHFR 677C → T の TT型は、CC型およびCT型よりも血中ホモシステイン濃度が高値を示

し、High-Fit 群および Low-Fit 群の体力レベルに分けた検討においても TT 型の血中ホモシステイン濃度が高値を示した。ホモシステインは、MTHFR 酵素によって葉酸およびビタミン B₁₂ とともにメチオニンに代謝・分解されるが¹⁰⁾、MTHFR 遺伝子の 677C が T に置換された場合、酵素活性が低下し、血中ホモシステイン濃度が増大することが報告されている^{11, 12)}。血中ホモシステイン濃度と $\dot{V}O_{2peak}$ との間には 30-59 歳の男性および女性においては関係がないという報告²⁰⁾ や、女性（平均年齢 33.5 歳）では負の相関関係が認められたが、男性（平均年齢 33.1 歳）では認められなかったという報告がある²¹⁾。このように一定した見解が得られていないが、体力レベルは MTHFR 遺伝子多型による血中ホモシステイン濃度の関係に影響しないのかもしれない。MTHFR 677C → T の TT 型は、High-Fit 群および Low-Fit 群の両方で血中ホモシステイン濃度が高値を示しているにもかかわらず、頸動脈 β スティフネスは、Low-Fit 群の MTHFR 677C → T の TT 型において CC 型および CT 型よりも高値を示したが、High-Fit 群においては多型間に有意な差は認められなかった。ホモシステインは、血中濃度が高値の場合、内皮依存性血管拡張の減弱や、血管拡張作用のある NO の作用の低下が生じることにより、動脈の内皮機能の低下や酸化ストレスの増大を引き起こし、動脈硬化などの心血管系疾患リスクを増大させる^{7, 9, 22, 23)}。しかしながら、TT 型の High-Fit 群においては頸動脈 β スティフネスが他の遺伝タイプである CC 型および CT 型と有意な差はなかった。習慣的な運動は、血管拡張物質の NO の増大や血管収縮物質のエンドセリン-1 の低下を介した内皮機能の改善を引き起こすことが知られている²⁴⁾。動物実験にて Hayward et al.²⁵⁾ は、血中が高ホモシステイン状態でも運動トレーニングにより内皮依存性血管拡張能は改善し、その機序に動脈の内皮型

NO 合成酵素のタンパク発現や活性の増大が寄与している可能性を示した。したがって、High-Fit 群においては MTHFR 677C → T の多型間の差がなかった機序として、TT 型による血中ホモシステイン濃度の高い状態は習慣的な運動の実施により改善することはできないが、動脈内皮細胞由来の血管拡張物質の増大や血管収縮物質の低下などの他の運動効果による内皮機能の改善が関与している可能性が考えられる。このように、MTHFR 677C → T の TT 型を保有している場合、遺伝子多型によって生じる動脈硬化を促進させる影響を消失させるために、高い体力レベルを得るような習慣的な運動を実施する必要があると考えられる。

一方、GHRL 214C → A 遺伝子多型間の比較や High-Fit 群および Low-Fit 群の体力レベルに分けた多型間の比較において頸動脈 β スティフネスには影響しなかった。近年、グレリンは、PI3 キナーゼを介して Akt や eNOS のリン酸化を増大させ、内皮細胞からの NO 産生を促進させることが報告された¹⁶⁾。さらに、メタボリックシンドローム患者は血管内皮機能が低下するとともに血中グレリン濃度が低値を示しているが、その患者にグレリンを投与した結果、NO 産生増大による血管拡張能の改善が認められた¹⁵⁾。このように、グレリンは、血圧や血管トーンスの調節に関与するが、GHRL 214C → A 遺伝子多型による動脈硬化への影響はないかもしれない。しかしながら、GHRL 214C → A 遺伝子多型間の比較において、AA 型は、CC 型および CA 型よりも血中の総コレステロールおよび LDL コレステロール、中性脂肪が有意に低値を示した。グレリンは、成長ホルモン分泌促進作用や強力な摂食亢進作用があることが知られている^{13, 14)}。グレリン遺伝子やグレリン受容体遺伝子の欠損マウスでは、正常マウスよりも食欲が低下し、体重が減少することが報告されている²⁶⁾。さらに、

GHRL 214C → A 遺伝子多型は、グレリン作用を低下させ、摂食障害や肥満などの体組成に影響することが報告されている^{17,18)}。これらの先行研究から、AA型の総コレステロールおよびLDLコレステロール、中性脂肪が低い要因の1つとして、GHRL 214C → A 遺伝子多型のAA型は食事摂取量が関与している可能性が考えられる。しかしながら、本研究において、多型間の体重および体脂肪は差が認められなかったため、食事摂取量は影響していないかもしれない。

本研究結果から、MTHFR 677C → T 遺伝子多型による動脈硬化リスクの多様性は、体力レベルの違いにより影響が異なる可能性が示唆された。近年、運動効果の個人差に影響する遺伝子多型が報告されている。Iemitsu et al.⁴⁾は、身体活動量における動脈硬化度への運動効果を血管拡張作用を有するANPの遺伝子多型(32Val>Met [664G>A])に分けて検討したところ、GGタイプでは身体活動量が多ければ運動効果が得ることができるが、GAもしくはAAタイプでは運動効果が得られ難いという1つの塩基の違いが運動効果に影響する可能性が示されている。ANP以外にも、エンドセリン-1 (198Lys>Asn)、エンドセリン-1受容体(ETA [958A>G]およびETB [831A>G])、eNOS (298Glu>Asp)、アンギオテンシン変換酵素(287bp Insertion/Deletion)、アンギオテンシン受容体(1166A>C)、エストロゲン受容体(-401T>C)など動脈硬化性疾患リスクに対する運動効果の個人差に関わる遺伝子多型の影響が報告されている³⁻⁶⁾。これらの研究成果は、今後の遺伝的要因を考慮した動脈硬化に対するテーラーメイド運動処方に応用できるかもしれない。本研究では、MTHFRやGHRL遺伝子多型を検討したが、運動トレーニングによる動脈硬化改善効果に関連する遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に解析した結果、複数の関連候補遺伝子が報告されている²⁷⁾。ゆえに、動脈

硬化に対する運動効果に関連する遺伝子多型は多数存在する可能性があり、今後、網羅的な遺伝子多型の解析が必要であると考えられる。

4. 結 論

本研究では、健常な日本人のMTHFR遺伝子多型677C → TおよびGHRL 214C → A遺伝子多型と体力レベル、動脈硬化リスクの関連性について検討した。本研究結果から、MTHFR遺伝子のTT型を保有する者は、体力レベルが低い場合、動脈硬化を増大させるが、体力レベルが高い場合、動脈硬化に対する遺伝的な影響を消失させることが示唆された。また、GHRL遺伝子のAA型を保有する者は、総コレステロールおよびLDLコレステロール、中性脂肪が低値を示したが、GHRL遺伝子多型および体力レベルによる動脈硬化への影響は認められなかった。以上の結果から、MTHFR遺伝子多型677C → Tによる動脈硬化リスクの多様性に体力レベルの違いが影響する可能性が示唆された。

謝 辞

この研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました(財)石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究実施にあたり多大なご協力を頂いた早稲田大学：河野寛先生、ノーステキサス大学：山元健太先生、国立健康・栄養研究所：丸藤祐子先生、東京都健康長寿医療センター研究所：福典之先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Cooper K.H., Pollock M.L., Martin R.P., White S.R., Linnerud A.C., Jackson A. Physical fitness levels vs selected coronary risk factors. A cross-sectional study. *J.A.M.A.*, 236: 166-169(1976)
- 2) Ferreira I., Twisk J.W., Stehouwer C.D., van Mechelen W., Kemper H.C., Longitudinal changes

- in $\dot{V}O_2\text{max}$: associations with carotid IMT and arterial stiffness. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 35: 1670-1678(2003)
- 3) Iemitsu M., Maeda S., Otsuki T., Sugawara J., Tanabe T., Jesmin S., Kuno S., Ajisaka R., Miyauchi T., Matsuda M., Polymorphism in endothelin-related genes limits exercise-induced decreases in arterial stiffness in older subjects. *Hypertension*, 47: 928-936 (2006)
 - 4) Iemitsu M., Maeda S., Otsuki T., Sugawara J., Kuno S., Ajisaka R., Matsuda M., Arterial stiffness, physical activity, and atrial natriuretic Peptide gene polymorphism in older subjects. *Hypertens. Res.*, 31: 767-774(2008)
 - 5) Hayashi K., Maeda S., Iemitsu M., Otsuki T., Sugawara J., Tanabe T., Miyauchi T., Kuno S., Ajisaka R., Matsuda M., Estrogen receptor-genotype affects exercise-related reduction of arterial stiffness. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 40: 252-257 (2008)
 - 6) Kimura T., Yokoyama T., Matsumura Y., Yoshiike N., Date C., Muramatsu M., Tanaka H., NOS3 genotype-dependent correlation between blood pressure and physical activity. *Hypertension*, 41: 355-360(2003)
 - 7) Chambers J.C., Obeid O.A., Kooner J.S., Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 2922-2927(1999)
 - 8) Clarke R., Daly L., Robinson K., Naughten E., Cahalane S., Fowler B., Graham I., Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N. Engl. J. Med.*, 324: 1149-1155(1991)
 - 9) Upchurch G.R. Jr, Welch G.N., Loscalzo J., Homocysteine, EDRF, and endothelial function. *J. Nutr.*, 126: 1290S-1294S(1996)
 - 10) Castro R., Rivera I., Blom H.J., Jakobs C., Tavares de Almeida I., Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinemia and vascular disease: an overview. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 29: 3-20(2006)
 - 11) Bailey L.B., Gregory J.F. 3rd., Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J. Nutr.*, 129: 919-922(1999)
 - 12) Trabetti E., Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. *J. Appl. Genet.*, 49: 267-282(2008)
 - 13) Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656-660(1999)
 - 14) Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K., Matsukura S., A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409: 194-198(2001)
 - 15) Tesauro M., Schinzari F., Iantorno M., Rizza S., Melina D., Lauro D., Cardillo C., Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Circulation*, 112: 2986-2992 (2005)
 - 16) Iantorno M., Chen H., Kim J.A., Tesauro M., Lauro D., Cardillo C., Quon M.J., Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 292: E756-E764(2007)
 - 17) Monteleone P., Tortorella A., Castaldo E., Di Filippo C., Maj M., The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is significantly associated with binge eating disorder. *Psychiatr. Genet.*, 17: 13-16(2007)
 - 18) Kuzuya M., Ando F., Iguchi A., Shimokata H., Preproghrelin Leu72Met variant contributes to overweight in middle-aged men of a Japanese large cohort. *Int. J. Obes.*, 30: 1609-1614(2006)
 - 19) Miyachi M., Kawano H., Sugawara J., Takahashi K., Hayashi K., Yamazaki K., Tabata I., Tanaka H., Unfavorable effects of resistance training on central arterial compliance: a randomized intervention study. *Circulation*, 110: 2858-2863(2004)
 - 20) de Bree A., Mennen L.I., Zureik M., Ducros V., Guillard J.C., Nicolas J.P., Emery-Fillon N., Blacher J., Hercberg S., Galan P., Homocysteine is not associated with arterial thickness and stiffness in healthy middle-aged French volunteers. *Int. J. Cardiol.*, 113: 332-340(2006)
 - 21) Kuo H.K., Yen C.J., Bean J.F., Levels of homocysteine are inversely associated with cardiovascular fitness in women, but not in men: data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *J. Intern. Med.* 258: 328-335(2005)
 - 22) Stamler J.S., Osborne J.A., Jaraki O., Rabbani L.E., Mullins M., Singel D., Loscalzo J., Adverse

- vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J. Clin. Invest.*, **91**: 308-318 (1993)
- 23) Tawakol A., Omland T., Gerhard M., Wu J.T., Creager M.A., Hyperhomocyst(e) inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation*, **95**: 1119-1121 (1997)
- 24) Maeda S., Miyauchi T., Kakiyama T., Sugawara J., Iemitsu M., Irukayama-Tomobe Y., Murakami H., Kumagai Y., Kuno S., Matsuda M., Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. *Life Sci.*, **69**: 1005-1016(2001)
- 25) Hayward R., Ruangthai R., Karnilaw P., Chicco A., Strange R., McCarty H., Westerlind K.C., Attenuation of homocysteine-induced endothelial dysfunction by exercise training. *Pathophysiology*, **9**: 207-214(2003)
- 26) Abizaid A., Liu Z.W., Andrews Z.B., Shanabrough M., Borok E., Elsworth J.D., Roth R.H., Sleeman M.W., Picciotto M.R., Tschöp M.H., Gao X.B., Horvath T.L., Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.*, **116**: 3229-3239(2006)
- 27) Maeda S., Iemitsu M., Miyauchi T., Kuno S., Matsuda M., Tanaka H., Aortic stiffness and aerobic exercise: mechanistic insight from microarray analyses. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **37**: 1710-1716 (2005)