

***Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma*の 一遺伝子多型と血液中たん白質濃度との関連について**

曾根保子^{1*}・江川重信²・河原和夫³・近藤和雄⁴・大塚 譲⁴・藤原葉子⁴

¹お茶の水女子大学生活環境教育研究センター ²福岡労働衛生研究所
³東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 ⁴お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科

The Association of *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma* Genetic Variants with Serum Protein Level in Japanese Men

Yasuko SONE^{1*}, Shigenobu EGAWA², Kazuo KAWAHARA³, Kazuo KONDO⁴,
Yuzuru OTSUKA⁴ and Yoko FUJIWARA⁴

¹Institute of Environmental Science for Human Life, Ochanomizu University, Tokyo 112-8610

²Fukuoka Institute of Occupational Health, Fukuoka 815-0081

³Department of Health Policy Science, Graduate School of Tokyo Medical and Dental University,
Tokyo 113-8549

⁴Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University, Tokyo 112-8610

ABSTRACT

Background: The association between serum protein level and genetic variants of *peroxisome proliferator activated receptor-gamma* (*PPAR* γ) genes is unclear. The aim of this study is to elucidate the association with serum protein level and single nucleotide polymorphism (SNP) rs2938392 in the *PPAR* γ gene in middle-aged men. **Methods and Results:** 140 healthy mail subjects were recruited, and their serum lipid profiles were measured. The subjects were genotyped for the SNPs rs2938392 in *PPAR* γ gene. Multiple regression analysis was conducted to detect *PPAR* γ genotypes in relation to total protein and albumin level. Subjects carrying the heterozygous genotype for SNP rs2938392 of *PPAR* γ had a lower albumin level. However, the total protein level was not related to the SNP rs2938392 of *PPAR* γ gene. Those having the heterozygous genotype of *PPAR* γ had a risk of lower albumin level. **Conclusion:** In the Japanese subjects, the *PPAR* γ gene polymorphism was associated with the serum albumin level. Further investigation is necessary to identify the mechanisms directly influencing albumin level. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 138-143, 2013.

Key words : Albumin, Japanese population, *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma*, Single nucleotide polymorphisms, Total protein.

*〒112-8610 東京都文京区大塚二丁目1-1

各種疾患発症リスクの低減には、生活習慣の中でもとりわけ摂取食物が大きな要素の一つとして挙げられる。これまでに、様々な食物が疾患の発症や老化の予防につながるという報告されているが、食物由来の栄養素による疾患予防効果は、集団や民族間において異なる、あるいは、基盤となる科学的根拠に差があるなど、生活習慣病などをはじめとする各種疾患の発症リスクの低減効果や老化抑制効果についての評価にバラツキが大きい。これに対し、栄養素による各種疾患予防効果を正確に評価するには、個人の食生活の調査のみならず、遺伝因子の関与、摂取食物と遺伝因子の相互作用の解明が重要である。

これまでの研究では、日常の摂取食物と遺伝因子の相互作用の解明するため、生活習慣病と密接に関連する脂質代謝系に注目し、日本人男性の脂質代謝酵素の遺伝子多型 (SNP) と血液中の臨床指標との相互関連を検討した。その結果、脂質代謝酵素の遺伝子多型と血漿中の総たん白質との関連性が強く認められた。

そこで、本研究ではリポたん白質代謝に関連する *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma* (*PPAR γ*) 遺伝子に着目し、*PPAR γ* の一遺伝子多型、長期的な食事性脂質の指標となる赤血球膜の脂肪酸組成、血液中のアルブミン濃度やたん白質濃度に関わる臨床指標との相互関連解析を行い、血漿中の総たん白質濃度やアルブミン濃度と関連する因子を明らかとし、生活習慣病の予防・改善に、効果的な栄養摂取を検討することを目的とした。

方 法

1. 倫理的配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言 (2004年東京注釈追加版) に則り、被験者の人権保護に配慮の上、疫学研究に関する倫理指針 (2004年文部科学省 厚生労働省告示1号) に準拠して実施した。また、試験の実施前に、国立大学法人お茶の水女子大学生物医学的研究の倫理特別委員会ならびに国立大学法人お茶の水女子大学生生活環境研究センターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の研究計画に対する審査を受け、その承認を得た上で実施した。対象者には、事前に試験の趣旨および内容の説明を十分に行ったのち、本人の自由意思による同意を文書で得た。

2. 対象

2006年2月に、福岡労働衛生研究所で健康診断を受診した40歳以上から60歳以下の健康な男性150名を募

集し、このうち、腹部周囲長85 cm以上の対象者74名、85 cm未満の対象者66名を含む合計140名を調査対象とした。

3. 採血

対象者に、前日の夜21時以降から食事摂取を控えるよう指導を行ったのち、早朝空腹時に採血を実施した。Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid, disodium salt (EDTA-2Na) を含む真空採血管と解糖阻止剤を含む真空採血管で採血を行い、血清および血漿分離を行ったのち、生化学的検査に用いた。一方、脂肪酸分析および遺伝子多型解析には、EDTA-2Naを含む真空採血管に採血し、ゆっくりと転倒混和後、 -80°C で冷凍保存した血液を用いた。

4. 身体検査項目と生化学的検査項目

身体検査項目として、対象者の年齢、性別、身長、体重、腹部周囲長の測定を行った。BMIは、 $\text{体重}(\text{kg}) \div [\text{身長}(\text{m})]^2$ として算出した。

生化学的検査は、福岡労働衛生研究所にて医師の管理下で行った。検査項目として、中性脂質 (TG) 値 (酵素法)、総コレステロール (TC) 値 (コレステロール脱水素酵素法)、HDL-コレステロール (HDL-C) 値 (直接法)、総たん白質 (Total protein) 値 (Biuret法)、アルブミン (Albumin) 値 (BCG法)、血糖値 (ヘキソキナーゼUV法) を測定した。測定にはclinical biochemistry analyzer BioMajesty BM-2250 (JEOL, Tokyo, Japan) を用いた。また、グリコヘモグロビン (HbA_{1c}) 値は、HPLC法 (automatic glycohemoglobin analyzer HLC-723G8, Tosoh, 東京, 日本) にて測定した。血液中のLDL-コレステロール (LDL-C) 値はFriedewald式より算出した。また、それぞれのコレステロール値およびTG値からLDL-C/HDL-C比、LDL-C/TC比を算出した。

5. 脂肪酸組成分析

対象者の血液を $400 \times g$ で10分間冷却遠心分離後、パフィーコートを除き、氷冷した生理食塩水で洗浄した。 $400 \times g$ で5分間の冷却遠心分離を3回繰り返す。赤血球層から混合物を完全に除去した。赤血球層に40倍容の氷冷した5 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.8, 1 mM EDTA-2Na, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride含有) を加え、10分間氷上で放置後、 $20,000 \times g$ で20分間冷却遠心分離した。沈殿に同量の緩衝液を加え、上清が透明になり、沈殿が白色になるまで同様の操作を繰り返す (遠心分離を少なくとも5回以上)、赤血球膜

成分を抽出した。

その後、赤血球膜からFolch法¹⁾によって脂質抽出を行い、得られた脂質中の脂肪酸に対し、メチルエステル化処理を施した。続いて、メチルエステル化された脂肪酸サンプルを2%炭酸水素カリウム水溶液で脱水し、n-ヘキサンに溶解した。最終的に得られた脂肪酸メチルエステルサンプルをSelect FAMEキャピラリーカラム (CP7419, 50 m×0.25 mm×0.39 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) により分離し、水素炎イオン検出器 (GC-2010, 株式会社 島津製作所, 京都, 日本) で検出した。脂肪酸レベルは、検出された22種類の脂肪酸に対する相対的割合として算出した。

6. 遺伝子多型の同定

DNA抽出試薬 (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を用い、エタノール沈殿法にて対象者の血液からゲノムDNAを抽出した。抽出されたDNAにおけるrs2938392の遺伝型を5'ヌクレアーゼ法にて検出した。検出には、TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) およびABI 7300 system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。

7. 統計解析

身体検査値, 生化学的検査値, 赤血球膜の脂肪酸レベルの値は, 平均値と標準偏差にて表した。腹部周囲長による2群の差は, Mann-whitney *U*検定により検討した。また, 遺伝型による出現頻度の差は χ^2 -testにより検討した。3群の差は, 一元配置分散分析, Bonferroni補正によって評価した。血液中アルブミン濃度, 総たん白質濃度と遺伝型の関連については, 重

回帰分析を行った。信頼区間 (CI) を95%とし, 交絡因子として年齢, BMI, 腹部周囲長などによる調整を行った。統計解析は, SPSS for windows Ver.20.0 (IBM Corporation, New York, NY, USA) を使用し, 両側検定で有意水準を5%とした。

結 果

1. 対象者の背景

本研究に採用された対象者のうち, 血中のTG値 400 mg/100 mL以上の値をもつ対象者 (n=6), 身体計測項目および生化学的検査項目に欠損値を含む対象者 (n=2), 自由意思による参加辞退者 (n=2) を除外し, 最終的に腹部周囲長85 cm以上の対象者74名, 85 cm未満の対象者66名を含む合計140名を調査対象とした。

2. 身体検査結果および生化学的検査結果

身体検査結果および生化学的検査のうち, 血液中のアルブミン濃度や総たん白質濃度についての結果をTable 1に示した。腹部周囲長85 cm未満の対象者と比べ, 腹部周囲長85 cm以上の対象者では, 血液中のアルブミン濃度や総たん白質濃度がやや低かったが, 有意な差は認められなかった。

3. 遺伝子多型の同定

検出されたSNPのアレルの出現頻度を χ^2 -testにより検証した結果, ハーディー・ワインベルグ平衡に則ることが確認された。また, 腹部周囲長85 cm以上の対象者と腹部周囲長85 cm未満の対象者との間で, 遺伝子頻度に有意な偏りは認められなかった。この結果から, 腹部周囲長による遺伝子頻度への影響は認められないことが示唆された (Table 2)。

Table 1. Serum total protein and albumin level of the study subjects

	<85 cm WC (n=74)		≥85 cm WC (n=66)		Total (n=140)	P-value
	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD	mean ± SD		
Total protein (g/100 mL)	7.30 ± 0.51	7.17 ± 0.30	7.24 ± 0.43	0.16		
Albumin (g/100 mL)	4.59 ± 0.25	4.57 ± 0.22	4.58 ± 0.24	0.99		

Clinical data are averages for 140 subjects.

Table 2. Genotype distribution frequencies

PPRA γ A>G rs2938392	<85 cm WC (n=74)			≥85 cm WC (n=66)			P-value
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	
Frequency	23	34	17	23	33	10	0.502
Expected frequency	24.3	35.4	14.3	21.7	31.6	12.7	

Abbreviations: WC, waist circumference. Data shown are average of 140 subjects. Pearson's chi-square test was used to compare genotype frequencies of those with waist circumference <85 cm and those with waist circumference ≥85 cm.

4. 脂肪酸組成分析結果

本研究で解析にもちいた脂肪酸の変動係数を以下に示す。Palmitic acid (C16:0) 0.66%, Palmitoleic acid (C16:1) 0.56%, Stearic acid (C18:0) 0.54%, Oleic acid (C18:1, n-9) 0.46%, cis-11-octadecenoic acid (C18:1, n-7) 0.71%, Linoleic acid (C18:2, n-6) 0.48%, Arachidonic acid (C20:4, n-6) 0.51%, cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (C20:5, n-3) 0.79%となった。

腹部周囲長85 cm以上の対象者と腹部周囲長85 cm未満の対象者との間で、脂肪酸組成に有意な差は認められなかった(未掲載)。この結果から、腹部周囲長による脂肪酸組成への顕著な偏りは認められないことが示唆された。

5. 血液中アルブミン濃度および総たん白質濃度とPPAR γ との関連

PPAR γ の一遺伝子多型rs2938392では、ヘテロ型をもつ対象者で、血液中のアルブミン濃度が有意に低いことが示された(Table 3)。一方、総たん白質濃度に対するPPAR γ 遺伝子多型による顕著な影響は認められなかった。さらに、赤血球膜の脂肪酸組成には一部を除き、PPAR γ の一遺伝子多型rs2938392による顕著な差は認められなかった。

6. 血液中アルブミン濃度および総たん白質濃度と関連する因子の検討

Table 4, 5に血液中アルブミン濃度および総たん白質濃度に対する重回帰分析の結果を示した。重回帰分析の結果より、PPAR γ の一遺伝子多型rs2938392の遺伝型だけでなく、年齢やBMI、血糖値なども血液中アルブミン濃度に影響をもたらすことが明らかとなった。赤血球膜の脂肪酸レベルによる血液中アルブミン濃度への影響は認められなかった。

一方、総たん白質濃度に対する重回帰分析の結果より、PPAR γ の一遺伝子多型rs2938392の遺伝型や赤血球膜の脂肪酸レベルによる総たん白質濃度への影響は認められず、PPAR γ の一遺伝子多型rs2938392の遺伝型は血液中アルブミン濃度に強く影響をもたらしていることが示唆された。

考 察

本研究により、PPAR γ の一遺伝子多型rs2938392は血液中のアルブミン濃度に影響をもたらす可能性が明らかとなった。また、本研究の母集団においては、赤血球膜の脂肪酸組成と血液中アルブミン濃度および総たん白質濃度との直接的な関連は認められなかった。

血液中のアルブミン濃度の変動は、食事摂取、すなわち、環境要因に大きく影響を受けることが予想されるが、特定の遺伝子による遺伝的要因について検討することも重要である。本研究で取り扱った遺伝子のみでは非常に限られたものであるものの、PPAR γ の一遺伝子多型であるrs2938392は、アルブミン濃度に有意に影響をもたらす可能性が示唆された。

一方で、重回帰分析の結果から、遺伝子多型rs2938392によるアルブミン濃度への影響は他の交絡因子と比べて低く、他の交絡因子も有意な影響をもたらしていた。これに対し、C16:1 (n-7) やC18:1 (n-9) といった脂肪酸によるアルブミン濃度への影響は顕著に認められなかったことから、本研究の母集団では、赤血球膜中に含まれる脂肪酸組成比が直接的に血液中のたん白質濃度に影響を与える可能性は低いと考えられた。しかし、BMIのように食事の影響を強く受ける因子によってもアルブミン濃度への影響が及ぶことから、遺伝的要素だけでなく食事摂取などの環境要因が血液中のたん白質濃度に与える影響は大きいことが改めて確認された。

これまでに行われたアジア人を対象とした大規模調査の結果より、血清アルブミン低値かつ総コレステロール高値の場合、死亡リスクが上昇するとの報告もあり、血液中の脂質濃度とたん白質濃度の関連については非常に興味もたれている²⁾。本研究結果においても、アルブミン濃度とコレステロール濃度との負の関連は実際に認められた(結果未掲載)。コレステロールの合成は、脂肪酸不飽和化酵素であるStearoyl CoA desaturase1 (SCD1)の活性亢進により調節されるとの報告もあり^{3,4)}、SCD1によって産生される脂肪酸組成との関連が推測された。しかしながら、本研究では

Table 3. The relationships between PPAR γ A>G rs2938392 and biochemical parameters

	Genotypes			AA vs AG	P-value	
	AA (46)	AG (67)	GG (27)		AA vs GG	AG vs GG
Total protein (g/100 mL)	7.26 ± 0.05	7.21 ± 0.06	7.27 ± 0.07	0.77	1.00	0.77
Albumin (g/100 mL)	4.65 ± 0.03 ^a	4.50 ± 0.03 ^b	4.67 ± 0.04 ^a	0.001>*	0.96	0.005*

Clinical data are average for 140 subjects.

* Indicate significant differences at $P < 0.05$ by one-way ANOVA.

^{ab} Letters indicate significant differences at $P < 0.05$ among groups by Games-Howell test.

Table 4. Multiple regression analysis for albumin concentration

Variable	β	<i>P</i> -value	Adjusted R ²	<i>P</i> -value
<i>PPRA</i> γ A>G rs2938392 GG [§] vs AG+AA	-0.18	0.048*	0.42	<0.001*
Age (per 1 year)	-0.29	0.002*		
BMI (per 1 kg/m ²)	3.63	0.017*		
Abdominal obesity [†] (yes/no)	0.06	0.617		
TG (per 1 mg/100 mL)	0.27	0.503		
HDL-C (per 1 mg/100 mL)	0.29	0.300		
LDL-C (per 1 mg/100 mL)	0.21	0.635		
LDL-C/TC (per 1 point)	-0.31	0.387		
LDL-C/HDL-C (per 1 mg/100 mL)	0.27	0.552		
Fasting plasma glucose (per 1 mg/100 mL)	0.22	0.013*		
Total protein (per 1 g/100 mL)	0.30	0.001*		
TG/HDL-C (per 1 point)	-0.05	0.891		
C16:0 (per 1%)	-0.07	0.562		
C16:1 (per 1%)	0.08	0.676		
C18:0 (per 1%)	0.15	0.268		
C18:1 (n-9) (per 1%)	0.15	0.413		
C18:1 (n-7) (per 1%)	-0.15	0.271		
C18:2 (n-6) (per 1%)	-0.19	0.187		
C20:4 (n-6) (per 1%)	0.17	0.248		
C20:5 (per 1%)	-0.06	0.555		

[§] Indicates reference. [†] Defined as waist circumference ≥ 85 cm.

* Indicate significant differences at $P < 0.05$.

Table 5. Multiple regression analysis for total protein concentration

Variable	β	<i>P</i> -value	Adjusted R ²	<i>P</i> -value
<i>PPRA</i> γ A>G rs2938392 GG [§] vs AG+AA	-0.01	0.947	0.28	0.06
Age (per 1 year)	0.06	0.577		
BMI (per 1 kg/m ²)	-0.97	0.572		
Abdominal obesity [†] (yes/no)	-0.05	0.711		
TG (per 1 mg/100 mL)	0.52	0.242		
HDL-C (per 1 mg/100 mL)	-0.31	0.322		
LDL-C (per 1 mg/100 mL)	-0.39	0.426		
LDL-C/TC (per 1 point)	0.96	0.015*		
LDL-C/HDL-C (per 1 mg/100 mL)	-0.65	0.190		
Fasting plasma glucose (per 1 mg/100 mL)	-0.13	0.176		
Albumin (per 1 g/100 mL)	0.37	0.001*		
TG/HDL-C (per 1 point)	-0.19	0.660		
C16:0 (per 1%)	-0.05	0.715		
C16:1 (per 1%)	-0.19	0.331		
C18:0 (per 1%)	-0.09	0.569		
C18:1 (n-9) (per 1%)	0.00	0.990		
C18:1 (n-7) (per 1%)	-0.01	0.952		
C18:2 (n-6) (per 1%)	0.09	0.559		
C20:4 (n-6) (per 1%)	-0.13	0.434		
C20:5 (per 1%)	0.06	0.566		

[§] Indicates reference. [†] Defined as waist circumference ≥ 85 cm.

* Indicate significant differences at $P < 0.05$.

SCD1と密接に関連する脂肪酸組成との顕著な関連は認められなかったことから、コレステロール代謝を調節する別の因子との検討が必要であるといえる。

本研究で取り扱っている赤血球の脂質のほとんどは、細胞膜に局在するリン脂質であること、赤血球膜の脂質は絶えず代謝や交換反応を行っていることから、赤血球膜中の脂肪酸組成は体内の脂肪酸組成や脂質代謝のより長期的なバロメーターとして機能している可能性がある。その根拠として、これまでも心臓中の長鎖多価不飽和脂肪酸と赤血球膜中の長鎖多価不

飽和脂肪酸とは強く相関すること^{5,6)}、トランス脂肪酸は血漿より赤血球膜の脂肪酸組成との相関が高いことなどが報告されている⁷⁾。これらの理由から、本研究では赤血球膜の脂肪酸組成を採用した。

生活習慣病やその他の疾患発症リスクを軽減につながる知見が得られれば、増加する医療費の削減につながるだけでなく、健康長寿を促し、国民のQOLの維持・向上につながることから、本研究は今後も継続して検討していくべき重要な課題であると考えている。

要 約

【背景】血液中のたん白質濃度はコレステロール濃度や食事摂取などと関連することが知られている。しかし、血液中のたん白質濃度に影響を与えると考えられる遺伝因子の影響や脂質代謝との関連については完全に明らかとなっていない。【方法】そこで、本研究では成人男性140名を対象に生化学的検査を行うとともに、リポたん白質代謝に関連する*Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma (PPAR γ)* 遺伝子の一遺伝子多型を同定した。また、長期的な食事摂取を反映する赤血球膜の脂肪酸組成を分析し、得られた各項目から血清アルブミン濃度および総たん白質濃度に強く影響を及ぼす因子を検討した。【結果および結論】その結果、PPAR γ の一遺伝子多型rs2938392では、ヘテロ型をもつ対象者で、血液中のアルブミン濃度が有意に低いことが示された。また、重回帰分析の結果より、PPAR γ の一遺伝子多型rs2938392の遺伝型だけでなく、年齢やBMI、血糖値なども血清アルブミン濃度に影響をもたらすことが明らかとなった。これらの結果から、血液中アルブミン濃度および総たん白質濃度は、食事摂取および遺伝因子と密接に関連し、コントロールされていることが示唆された。

文 献

- 1) Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497-509.
- 2) Okamura T, Hayakawa T, Kadowaki T, Kita Y, Okayama A, Elliott P and Ueshima H (2004): A combination of serum low albumin and above-average cholesterol level was associated with excess mortality. *J Clin Epidemiol*, **57**, 1188-1195.
- 3) Jeffcoat R, Roberts PA, Ormsher J and James AT (1979): Stearoyl-CoA desaturase: a control enzyme in hepatic lipogenesis. *Eur J Biochem*, **101**, 439-445.
- 4) Paton CM and Ntambi JM (2009): Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **297**, E28-37.
- 5) Harris WS, Sands SA, Windsor SL, Ali HA, Stevens TL, Magalski A, Porter CB and Borkon AM (2004): Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation*, **110**, 1645-1649.
- 6) Metcalf RG, James MJ, Gibson RA, Edwards JR, Stubberfield J, Stuklis R, Roberts-Thomson K, Young GD and Cleland LG (2007): Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*, **85**, 1222-1228.
- 7) Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE, Manson JE, Stampfer MJ, Rexrode KM, Willett WC and Hu FB (2007): A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease. *Circulation*, **115**, 1858-1865.