

発および予防的介入法の開発に寄与することを目的とした。すなわち、①大腿骨頸部骨密度の変化率に影響を及ぼす形態学的項目の抽出、② ①で抽出された形態学的項目との交互作用が大腿骨頸部骨密度に影響を与える遺伝子多型の抽出（網羅的検索）、③遺伝子多型と形態学的項目との相互作用を考慮した骨密度の将来予測である。

B. 研究方法

1. 対象

研究の対象は、「国立長寿医療センター老化に関する長期縦断疫学研究（NILS-LSA）」の第1次調査に参加した閉経女性826名であった。その中から、骨粗鬆症の治療を受けておらず、第1次調査から6年後の第4次調査のうち、少なくとも1回は連続して調査を受け、2年間の変化量の計測が可能であった507名（平均年齢 62.5 ± 8.2 歳）について、延べ1384回の骨密度年間変化率のデータを用いて解析した。男性についても同様に第1次調査に参加した1139名のうちの883名（ 58.6 ± 10.6 歳）を分析対象とし、延べ2288回の骨密度年間変化率のデータを用いて解析した。

調査参加者は愛知県大府市および知多郡東浦町の住民から年齢、性別に層化し無作為に抽出されて選ばれている。全ての参加者から、事前の説明会において文章による同意を得た。

2. 骨密度および年間骨密度変化量

二重X線吸収装置（DXA, Hologic社, QDR4500）を用いて測定した右大腿骨頸部骨密度（以下、BMDと記載する）を用い、連続した2回の調査の骨密度差を2回の調査間の日数で除し、そこから年間骨密度変化量（ $\text{cm}^2/$

年）を算出した。

3. 形態学的項目

本研究では形態学的項目として、次の13項目を使用した：身長、体重、BMI、腹囲（中間）、腹囲（へそ）、臀囲、ウエストヒップ比、体脂肪率（DXA）、体脂肪率（BODPOD）、体脂肪量、除脂肪量、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積、腹囲（CT）。

4. 遺伝子検査

第1次調査時にEDTA採血血漿から分離凍結保存されたDNAを用い、蛍光法によるアレル特異DNAプライマー測定システム（東洋紡）を用いてタイピングを行った。本研究の解析時までにNILS-LSAでタイピングが終了した老化・老年病関連候補遺伝子多型196種の中で解析に必要な多型の分布が得られた177種の遺伝多型について解析をおこなった。

5. 統計処理

① 大腿骨頸部骨密度の年間変化率（ Δ BMD）に影響を及ぼす形態学的項目を抽出するために、MIXED EFFECT MODELを用いた主効果の分析に加え、従来の骨密度と形態学的項目の関連性に関する報告等を加味して検討した。

② ①で抽出された形態学的項目との交互作用が Δ BMDに影響を与える遺伝子多型の抽出するために、形態学項目ごとにMIXED EFFECT MODELを用いて遺伝子多型の網羅的分析をおこない、漸減法により最終的な遺伝子多型を探索した。

③遺伝子多型と形態学的項目との相互作用を考慮した骨密度の将来予測をおこなう予測式を作成した。

解析にはSAS 9.1.3を用い、 $p < 0.05$ を統計的有意とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究における倫理指針」ならびに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、国立長寿医療センターにおける倫理委員会での研究実施の承認を受けた上で実施し、対象者全員からインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1. Δ BMD に影響を及ぼす形態学的項目としては、本データの主効果の検討に加え、従来の骨密度と形態学的項目の関連性に関する報告等を加味した結果、BMI・体重・除脂肪量を採用することにした。

2. BMI との交互作用が Δ BMD に影響を与える遺伝子多型の網羅的解析および漸減法による絞込み（表 1 を参照、以下には漸減法による絞込みの結果を記載した）

(ア) 閉経女性の場合

【優性】LEPR、APOB、ESR22、ADRB12、ENPP1

【劣性】LPA

(イ) 男性の場合

【優性】ACE、AGN、PAI、APO1、PPARD

【劣性】DLST1、OSCAR、FAAH1、CNTF

3. 体重との交互作用が Δ BMD に影響を与える遺伝子多型の網羅的解析および漸減法による絞込み（表 2 を参照、以下には漸減法による絞込みの結果を記載した）

(ア) 閉経女性の場合

【優性】ACE、ESR22、ENPP1

【劣性】LPA

(イ) 男性の場合

【優性】GS、AGN、ADD1、CD14

【劣性】MTP1、VDBP、OSCAR

4. 除脂肪量との交互作用が Δ BMD に影響を与える遺伝子多型の網羅的解析および漸減法による絞込み（表 3 を参照、以下には漸減法による絞込みの結果を記載した）

(ア) 閉経女性の場合

【優性】TGF2、FYN、ESR22、ENPP1

【劣性】NOS3、AGTR5、PRKCH

(イ) 男性の場合

【優性】GS、ADD1、CD14

【劣性】MTP1、VDBP、OSCAR

5. 大腿骨頸部骨密度の将来予測

(ア) 条件を閉経女性・BMI 22 として、遺伝子 ESR22 (estrogen receptor 2(-1213T/C)) の多型による年齢と骨密度変化量の関係を作図した (図 1)。

(イ) 条件を閉経女性・BMI (18、20、22、25 の 3 パターン) として、遺伝子多型の最悪の組み合わせによる年齢と骨密度変化量の関係を作図した (図 2)。

D. 考察

形態学的項目が大腿骨頸部骨密度に強い影響を与えることは、理論的に考えてみてもリーズナブルなことであり、これまでの疫学的研究もそれを裏付けるものが多く報告されている。すなわち、体重 (BMI) そのものが適度な物理的負荷となり、骨形成を促進している可能性が強い。また、体重という負荷を直接伝えるのは筋肉 (骨の付

着部位である靭帯)であるため、筋肉量(筋力)の大小も骨密度に少なからず影響を与えると考えることは否定できないであろう。本研究では、統計的計算の結果に加えて、このような理由から、大腿骨頸部骨密度の年間変化率(Δ BMD)に影響を及ぼす形態学的項目としてBMI・体重・除脂肪量を採用することにした。

BMI・体重・除脂肪量といった形態学的項目との交互作用が Δ BMDに影響を与える遺伝子多型の網羅的解析および漸減法の結果、3つの形態学的項目ごとに数種類のSNPsが抽出されたが特に閉経女性ですべてに共通して抽出されたのはESR22(estrogen receptor 2(-1213T/C))であったことから、本研究では、ESR22について骨密度の将来予測式を作成すると同時に、作図をおこなった(図1)。本推定式ならびに図1によると、BMIは22と仮定し、野生型を有する場合、80歳の骨密度は50歳の時点から約190 mg/cm²低下し、ヘテロ・ホモ型では約250 mg/cm²の低下になることがわかる。ESR22のヘテロ・ホモ型を有する場合には、より一層の骨粗鬆症対策が必要であることがわかる。

次に遺伝子多型の最悪の組み合わせによる今後30年間の骨密度の推定式をBMI 18、20、22、25の場合について作成し、図示した(図2)。この結果によると、BMIが22であっても骨密度の減少量は大きく、80歳までに骨粗鬆症に陥る危険性は極めてたかくなることがわかる。一方、BMI 25であれば、骨密度の減少量は30年間で100 mg/cm²以内に抑えることが可能となり、骨粗鬆症の危険性はかなり低下する。このような観点からも高齢期の低体重は生活機能に悪影

響を与える可能性が示唆されると同時に、高齢者に特化した適正体重(従来のBMI 22)の見直しの必要性が感じられる。

E. 結論

形態学的項目と大腿骨頸部骨密度の変化量との関係に影響を与える遺伝子多型が存在することが明らかになった。

最悪の遺伝子多型の組み合わせであっても、BMI 25を維持することで、骨密度の減少をある程度予防できるかもしれない。

閉経女性においては体重や除脂肪量が骨密度に与える影響力は強く、骨粗鬆症予防の観点からは高齢期における体重維持および筋力維持の重要性も示唆された。すなわち、①適切な食事(指導)による適正体重の維持の重要性、及び②運動(有酸素運動と筋トレ)習慣化による除脂肪量の維持(増加)の重要性である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Numao S, Hayashi Y, Katayama Y, Matsuo T, Tomita T, Kazunori K, Nakata Y, Okura T, Tanaka K. Plasma fat concentration increases in visceral fat obese men during high-intensity endurance exercise. *Obesity Research & Clinical Practice*. 1: 273-279, 2007.
2. Okura T, Nakata Y, Ohkawara K, Numao S, Katayama Y, Matsuo T, Tanaka K. Effect of

- aerobic exercise on metabolic syndrome improvement in response to weight reduction. *Obesity* 15:2478-2484, 2007.
3. 松尾知明, 室武由香子, 齋藤義浩, 大藏倫博, 中田由夫, 田中喜代次. 減量介入前の体格, 食事摂取量, 身体活動量が体重減少量に及ぼす影響. *肥満研究*.13: 154-163, 2007.
 4. Okura T, Nakata Y, Ohkawara K, Numao S, Katayama Y, Ono Y, Matsuo T. Tanaka K. Effects of weight reduction on concentration of plasma total homocysteine in obese Japanese men. *Obesity Research and Clinical Practice* 1:213-221, 2007.
 5. Matsuo T, Okura T, Nakata Y, Yabushita N, Numao S, Sasai H, Tanaka K. The influence of physical activity-induced energy expenditure on the variance in body weight change among individuals during a diet intervention. *Obesity Research & Clinical Practice*. 1: 109-117, 2007.
 6. 柳久子, 奥野純子, 戸村成男, 大藏倫博, 田中喜代次. 軽度要介護者の血中ビタミンDレベルの分布状況とビタミンD・カルシウム製剤補充による介護予防効果—生活機能・身体機能と血中ビタミンDレベルとの関連より— *Osteoporosis Japan* 15:677-681, 2007.
 7. Kitamura I, Ando F, Koda M, Okura T, Shimokata H. Effects of the interaction between lean tissue mass and estrogen receptor gene polymorphism on bone mineral density in middle-aged and elderly Japanese. *Bone* 40:1623-1629, 2007.
- 2.学会発表
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
1. 深作貴子, 奥野純子, 柳久子, 戸村成男, 藪下典子, 大藏倫博, 田中喜代次. 介護予防教室における在宅虚弱高齢者への栄養指導による介護予防効果. 第66回日本公衆衛生学会, 愛媛, 2007年10月
 2. 奥野純子, 深作貴子, 戸村成男, 柳久子, 藪下典子, 大藏倫博, 田中喜代次. 開始時のビタミンD濃度とビタミンD補充が虚弱高齢者の介護予防に及ぼす効果. 第66回日本公衆衛生学会, 愛媛, 2007年10月
 3. 中田由夫, 大河原一憲, 片山靖富, 松尾知明, 沼尾成晴, 大藏倫博, 田中喜代次. 食事制限に運動実践を加えることによる効果は肥満度によって異なる: The SMART Study. 臨床運動療法研究会, 大阪, 2007.7.
 4. 大藏倫博, 中田由夫, 大河原一憲, 沼尾成晴, 片山靖富, 松尾知明, 田中喜代次. 食事療法を併用した有酸素性運動の実践がメタボリックシンドロームの改善に与える影響: The SMART Study. 第28回日本肥満学会, 東京, 2007.10.
 5. 藤本幸弘, 大石洋子, 阿部純子, 高柳由紀子, 織田映子, 大藏倫博. エステティック施術と生活習慣改善指導が成人男性の体組成および腹部脂肪に与える効果. 第28回日本肥満学会, 東京, 2007.10.
 6. 中田由夫, 片山靖富, 松尾知明, 大河原一憲, 沼尾成晴, 大藏倫博, 田中喜代次. 肥満者におけるメタボリックシンドローム罹患率と減量に伴う改善率の男女差: The SMART Study. 第28回日本肥満学会, 東京, 2007.10.

7. 笹井浩行、中田由夫、沼尾成晴、大藏倫博、田中喜代次. CT 画像を用いた内臓脂肪面積の算出における撮影間および検者間誤差の検討. 第 28 回日本肥満学会, 東京, 2007.10.
8. 金美芝, 藪下典子, 松尾知明, 大藏倫博, 田中喜代次. 地域在住高齢者における身体パフォーマンス評価指標を用いた身体的虚弱状態スクリーニング法の有効性. 第 62 回日本体力医学会, 秋田, 2007 年 9 月.
9. 中田由夫, 河原一憲, 片山靖富, 松尾知明, 沼尾成晴, 大藏倫博, 田中喜代次. 食事制限に運動実践を加えることによってもたらされる効果: The SMART Study. 第 62 回日本体力医学会, 秋田, 2007 年 9 月.
10. 松尾知明, 中田由夫, 大藏倫博, 田中喜代次. リバウンドをもたらない減量介入プログラムの開発: Sodegaura Weight Management Study. 第 62 回日本体力医学会, 秋田, 2007 年 9 月.
11. Sasai H, Katayama Y, Numao S, Nakata Y, Okura T, Tanaka K. Effects of exercise training on metabolic syndrome and its component factor in middle-aged Japanese men. The 54th Annual Meeting of American College of Sports Medicine, New Orleans, June 2007.
12. Matsuo T, Nakata Y, Okura T, Hotta K, Tanaka K. Is peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) genotype a useful predictor for body-weight reduction?. The 54th annual meeting of American College of Sports Medicine, New Orleans, 2007.5.30-6.2.
13. Shigematsu R, Okura T, Nakagaichi M, Tanaka K, Sakai T, Kitazumi S, Rantanen T. Square Stepping Exercise And Fall Risk Factors In Older Adults: A Single-blind Randomized Controlled Trial. The 54th annual meeting of American College of Sports Medicine, New Orleans, 2007.5.30-6.2.
14. Yabushita N, Shigematsu R, Nakagaichi M, Matsuo T, Okura T, Shimura Y, Tanaka K. Primary factors for exercise habituation and physical activity barriers among community-dwelling older adults. The 54th annual meeting of American College of Sports Medicine, New Orleans, 2007.5.30-6.2.
15. J. Okuno, S. Tomura, H. Yanagi, N. Yabushita, T. Okura, K. Tanaka. Relationship between Serum 25-hydroxyvitamin D3 Concentration and Walking Ability, Leg Strength, or Balance in Community-Dwelling Japanese Frail Elderlies. The 29th American Society for Bone and Mineral Research. Honolulu, HI, USA, 2007.9.16~19.
16. 深作貴子, 奥野純子, 柳久子, 戸村成男, 藪下典子, 大藏倫博, 田中喜代次. 在宅虚弱高齢者における食品摂取状況の多様性と生活の質・食習慣との関連. 日本プライマリケア学会, 宮崎, 2007 年 5 月.
17. 中田由夫, 大藏倫博, 田中喜代次, 堀田紀久子. 肥満関連遺伝子が減量効果に及ぼす影響~運動実践の有無を考慮して~: The SMART Study. 第 17 回日本疫学会, 広島, 2007.1.26-27.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

研究協力者

北村伊都子 (国立長寿医療センター研究所
疫学研究)

表 1 BMIとの交互作用が骨密度減少率に影響を与える遺伝子多型の網羅的解析結果

		閉経女性		男性			
		優性	劣性	優性	劣性		
SNP	p値	SNP	p値	SNP	p値		
LEPR	0.0242	CCK	0.0039b	DLST2	0.0201	DLST1	0.0027
BDNF1	0.0352	DAT	0.0404b	ACE	0.0326	ESR2	0.0406
APOB	0.0227	FGB	0.0191b	AGN	0.0134	S1BR	0.0158b
ESR22	0.0105	CETP	0.0200b	PAI	0.0117	VDBP	0.0258
ADRB12	0.0149	VEGF4	0.028b	APOA1	0.0120	OSCAR	0.0442
LPA	0.0213a	LPL	0.0368b	IGF2R2	0.0352	COL1A2	0.0195
ENPP1	0.0036	CNR2	0.0229	VLDLR	0.0179	FAAH1	0.0283
		ROCK2	0.0355	G1A3	0.0273	CNTF	0.0320
		LPA	0.0138	PPARD	0.0186		
		SHBG	0.0289b				

a: p値の関係で劣性として漸減法の解析に供した

b: 50名未満のため漸減法の解析に含めなかった

表2 体重との交互作用が骨密度減少率に影響を与える遺伝子多型の網羅的解析結果

SNP	閉経女性		男性		
	優性 p値	劣性 p値	優性 p値	劣性 p値	
ACE	0.0176	CCK	0.0041b	DLST1	0.0114
TGF1	0.0391	NOS3	0.0485b	AGN	0.0160
TGF2	0.0152	CETP	0.0200b	ADD1	0.0117
CASR	0.0402	GOL	0.0188	PAI	0.0217
PPARG3	0.0346	VEGF4	0.0021b	CD14	0.0207
ESR22	0.0014	LPL	0.0045b	IGF2R2	0.0447
ENPP1	0.0042	HTR1B	0.0452	Ghrelin	0.0448
		LPA	0.0078		
		NCOA3	0.0222		
		SHBG	0.0435b		

b: 50名未満のため漸減法の解析に含めなかった

表3 除脂肪療との交互作用が骨密度減少率に影響を与える遺伝子多型の網羅的解析結果

SNP	閉経女性		男性				
	優性 p値	劣性 p値	優性 p値	劣性 p値			
TGF2	0.0280	CCK	0.0251	PAFAH	0.0259	DLST1	0.0111
ADH	0.0282	NOS	0.0137	GS	0.0120	CCK2	0.0482
AF7153	0.0489	CETP	0.0200b	APOE1	0.0163	PRC	0.0321
PPARG3	0.0150	AGTR5	0.0297	ADD1	0.0039	MMP1	0.0494
TPH	0.0224	COL	0.0120	MMP9	0.0411	OPG2	0.0454
FYN	0.0370	VEGF4	0.0036b	SHIP2	0.0179	MTP1	0.0107
RGS2	0.0311	MTP1	0.0101b	CD14	0.0346	LMNA	0.0232
ESR22	0.0062	LPL	0.0053b			VDBP	0.0035
RGS22	0.0319	RAGE1	<0.0001b			OSCAR	0.0116
ENPP1	0.0144	LPA	0.0.301				
		NCOA3	0.0285				
		PRKCH	0.0497				
		SHBG	0.0466b				

b: 50名未満のため漸減法の解析に含めなかった

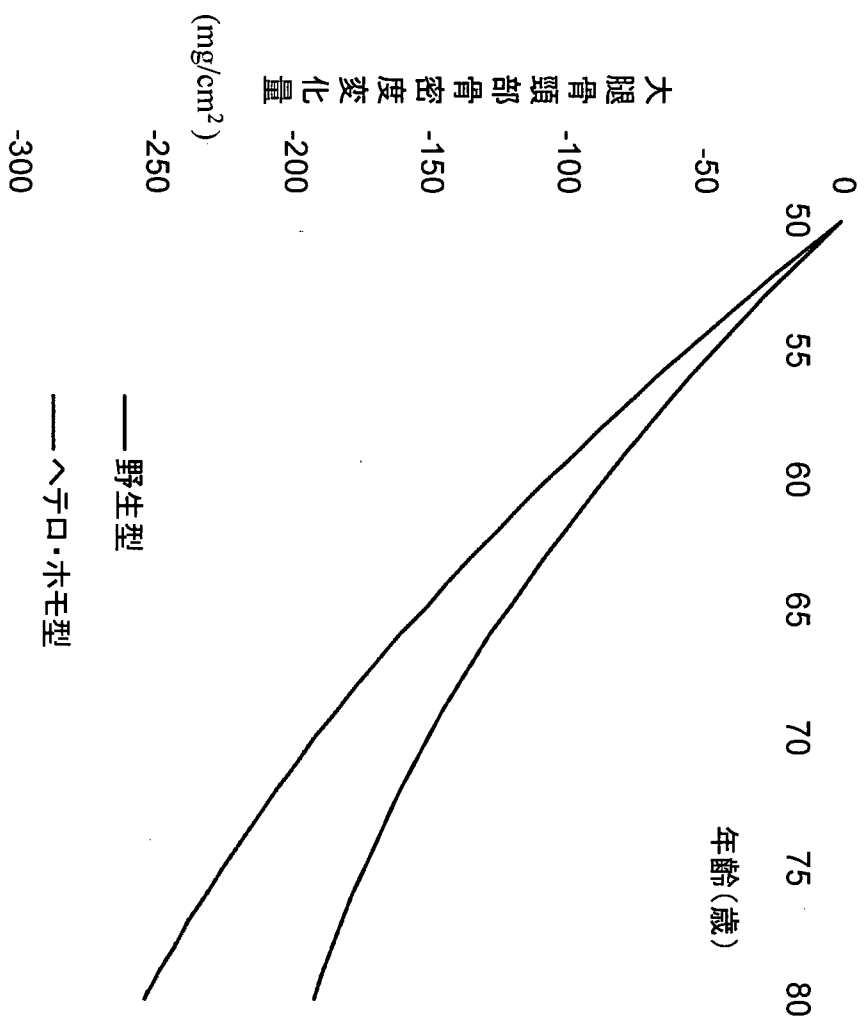


図1 Estrogen receptor 2(-1213T/C) 遺伝子多型が大腿骨頸部骨密度の50歳から80歳の加齢変化予測値に与える影響(閉経女性, BMI 22を維持, 閉経年齢50歳と仮定)

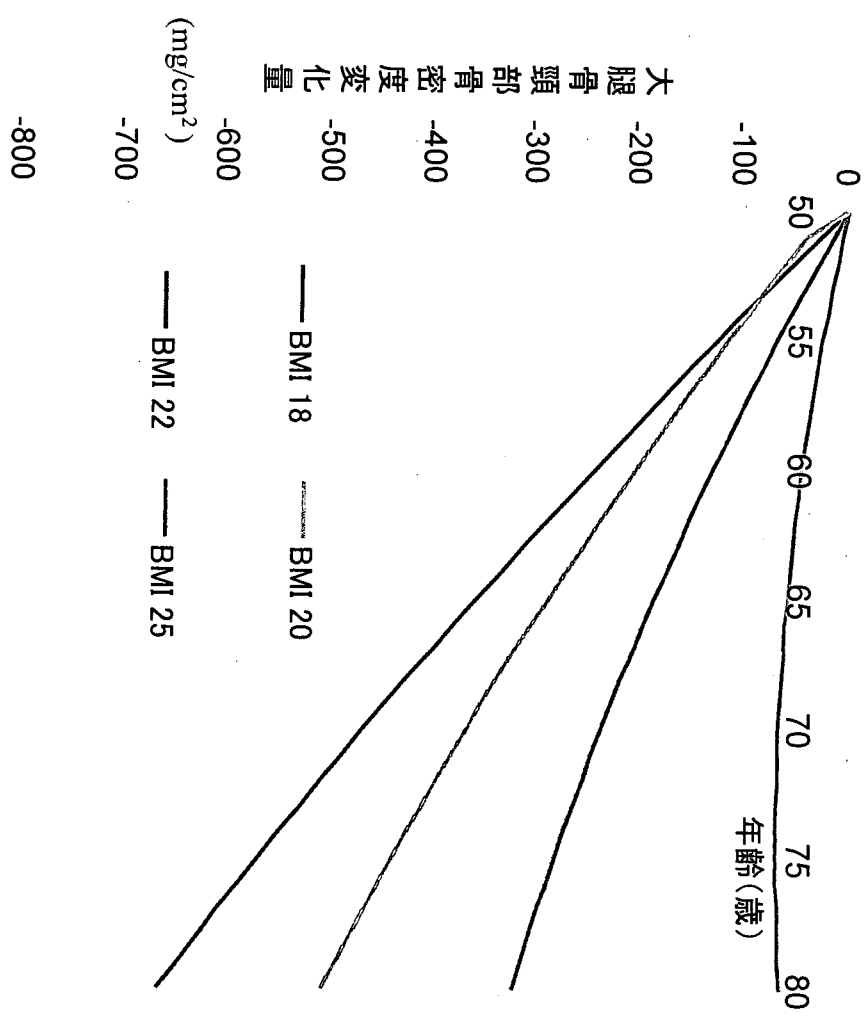


図2 遺伝子多型の最悪の組み合わせによる今後30年間の骨密度変化予想値(閉経女性, 閉経年齢を50歳であるとした場合)

※BMI 18, 20, 22, 25の比較

分担研究報告書

骨密度加齢変化に関連する食習慣要因の縦断的検討
—主効果および遺伝子多型との交互作用—

研究協力者 今井 具子

国立長寿医療センター疫学研究部栄養疫学研究室長

研究協力者 大塚 礼

国立長寿医療センター疫学研究部外来研究員

研究要旨 「老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)」の第1次調査に参加した男性及び閉経女性の中で、第1次調査から6年後の第4次調査までの間に、連続した2回の調査に少なくとも1度は参加した者を対象とし、①右大腿骨頸部骨密度の2年間の変化量と関連する栄養関連要因(食生活因子)の抽出、②この因子と交互作用を示す遺伝子多型の抽出、③これらから特定の遺伝子多型を有する特定年齢の個人の将来の骨密度変化量を予測する式を作成することを目的とした。分析方法は班の統一方針に従った。

大腿骨頸部骨密度変化量に対し有意な関連を示す栄養素が認められなかったため、昨年度と同様、骨密度との関連がほぼ確立しているカルシウムを栄養関連要因として選び、検討を行った。

遺伝子多型の主効果を考慮し、カルシウム摂取量と交互作用を示す遺伝子多型の絞り込みをしたところ、女性では、ABCA、LPL、COL1A2、COX2、の遺伝子多型において、男性では、VEGF1、VEGF4、IGF2R2、GPX1、の遺伝子多型においてカルシウムと交互作用を示す多型が認められた。ついで、それぞれの遺伝子多型について、カルシウム摂取量別の50歳以降30年間の大腿骨頸部骨密度変化量を推定したところ、男女ともに数種の遺伝子多型において、カルシウムの多摂取が、中年期以降の骨密度変化量(減少)を低下させる方向に働いている可能生が示唆された。

A. 研究目的

骨密度や骨代謝における介入可能な環境要因の一つとして栄養・食生活因子が注目されている。

これまでに、栄養素摂取量と骨密度との関連に及ぼす遺伝子多型の影響を明らかにすることを目的として、NILS-LSAの第1次～第3次調査データを用いて横断的検討および縦断的検討を行ってきた。昨年度は大腿骨頸部骨密度と各栄養素との関連について MIXED EFFECT MODEL を用い縦断的な解析を行ったところ、有意に大腿骨頸部骨密度と関連している栄養素は認められなかった。そのため骨密度との関連がほぼ確立しているカルシウムとビタミンD、さらに葉酸について、栄養素と遺伝子多型の組み合わせの検討を実施した。結果、カルシウムと HTR1B 遺伝子多型、ビタミンDと ICAM1 遺伝子多型・RS 遺伝子多型・BMP2 遺伝子多型・SRD 遺伝子多型・CAL 遺伝子多型・PONA 遺伝子多型において、交互作用が認められた。

本年度は、特に骨密度の変化量について①骨密度の変化量に影響を与える栄養関連要因(食生活因子)の抽出と②この後天的要因と交互作用を示す遺伝子多型の抽出を行い、③これらから特定の遺伝子多型を有する特定年齢の個人の将来の骨密度変化量を予測する式を作成することを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

本研究は、国立長寿医療センター研究所疫学研究部が1997年から行っている「国立長寿医療センター研究所・老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)」の第1次～第4次調査データを用いて実施した。

NILS-LSAの参加者は、愛知県大府市および知多郡東浦町の、初回調査時40歳から79歳ま

での住民から性・年齢層化無作為抽出で選ばれた者で、文書による合意の得られた者である。

NILS-LSA第1次調査(1997年11月～2000年4月)参加者2,267人の中で遺伝子多型解析用の血液採取が可能であったのは2,259人であった(99.6%)。このうち、第1次調査から第2次調査(2000年4月～2002年5月)、第3次調査(2002年5月～2004年6月)、第4次調査(2004年6月～2006年7月)までの間に少なくとも一度は連続する2回の調査に参加した者から、骨粗鬆症の既往のある者、骨密度に影響を与える薬剤を服用している者を除いた男性883人(59.6歳±10.6歳)と閉経女性507人(62.5±8.2歳)を本研究の解析対象とした。連続する2回の調査結果から計算される、右大腿骨頸部骨密度変化量(mg/年)を目的変数とする解析の、延べ人数は男性2,288人(1人あたり2.59データ)、閉経女性1,384人(1人あたり2.73データ)である。閉経の確認は自記式調査票を用いて月経の有無と閉経年齢について確認した。

2. 栄養素摂取量および食品群摂取量

栄養素摂取量および食品群摂取量は写真法を併用した3日間食事秤量記録法により求めた1日の平均摂取量とした。栄養摂取量の算出には五訂増補日本食品標準成分表(平成18年度公表)を用いた。

本年度は食品群18種類と、栄養素16種(昨年度の解析に使用した15種にたんぱく質を加えた16種)について検討した。栄養素16種の内訳は、エネルギー、たんぱく質、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、βカロテン当量、ビタミンD、トコフェロール当量、ビタミンK、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、葉酸、ビタミンCである。

3. 大腿骨頸部骨密度変化量

二重 X 線吸収装置 (DXA, Hologic 社, QDR4500) を用いて測定した右大腿骨頸部骨密度を用い、連続した2回の調査の骨密度差を2回の調査間の日数で除し、そこから年間骨密度変化量 (cm²/年) を算出した。

4. 遺伝子多型

第1次調査時に EDTA 採血血漿から分離凍結保存された DNA を用い、蛍光法によるアレル特異 DNA プライマー測定システム (東洋紡) を用いてタイピングを行った。本研究の解析時までには NILS-LSA でタイピングが終了した老化・老年病関連候補遺伝子多型 196 種の中で解析に必要な多型の分布が得られた 177 種の遺伝多型について解析をおこなった。

5. 解析方法

(1) 大腿骨頸部骨密度変化量に関わる食習慣因子の抽出:

統計学的方法は研究班で統一された方法に従って実施した。具体的には、先に述べた栄養素16種 (エネルギー、たんぱく質、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、βカロテン当量、ビタミンD、トコフェロール当量、ビタミンK、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、葉酸、ビタミンC) と食品群18種について、右大腿骨頸部骨密度変化量との関連を性別に、男性では年齢、女性では年齢及び閉経年齢を調整して Mixed Effect Model を用いて縦断的に検討した。

(2) 大腿骨頸部骨密度変化量と食習慣因子 (栄養素) との関連に影響を及ぼす遺伝子多型の網羅的解析:

大腿骨頸部骨密度変化量と関連する栄養素 (本年度はカルシウムを採用) について、男性では年齢、閉経女性では年齢と閉経年齢を調整して、大腿骨頸部骨密度との関係に影響を及ぼす遺伝子多型を Mixed Effect Model を用いて縦

断的データで検討した。

(3) 食習慣因子、遺伝子多型およびそれらの交互作用で表される、50歳以降30年間の大腿骨頸部骨密度変化予測式の作成:

大腿骨頸部骨密度変化量と関連する栄養素 (カルシウム) との関連に影響を及ぼす遺伝子多型について、Mixed Effect Model の多項式から、50歳以降30年間の大腿骨頸部骨密度変化予測式を作成した。さらに、栄養素 (カルシウム) 摂取量の群別 (400mg/日、600mg/日、800mg/日) に BMI22kg/m² を維持した場合 (女性では閉経年齢を50歳とした場合) の50歳以降30年間の大腿骨頸部骨密度変化予測式を作成した。

カルシウム摂取量の群分け (400mg/日、600mg/日、800mg/日) は、本研究対象者のカルシウム摂取量が平均約600mg、標準偏差が約200mgであったため、その値を参考に平均値±標準偏差である400mg、600mg、800mgを採用した。

解析には SAS 8.2、9.1.3 を用い、 $p < 0.05$ を統計的有意とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究における倫理指針」ならびに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、国立長寿医療センターにおける倫理委員会での研究実施の承認を受けた上で実施し、対象者全員からインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1. 大腿骨頸部骨密度変化量に関わる食習慣因子の抽出

男女ともに、食習慣因子の主効果が有意 ($p < 0.05$) であった要因は、食品群では魚介類、卵類、油脂類等、多種類の群において認められた。しかし、栄養素では男女ともに、有意に大腿骨頸部骨密度と関連している因子は認められな

かった。

そこで、昨年度までの解析と、骨密度との関連がほぼ確立しているカルシウムを食習慣因子として採用し、以下の検討を行うこととした。

2. 大腿骨頸部骨密度変化量とカルシウム摂取量との関連に影響を及ぼす遺伝子多型の網羅的解析

177 種類の遺伝子多型について検討したところ、女性の優性モデルでは ABCA、LPL、COL1A2、RGS2、RGS22、COX2、の遺伝子多型において交互作用が有意であった(いずれの遺伝子多型についても、優性モデルおよび劣性モデルの各該当者は 50 名以上)。男性の優性モデルでは、VEGF1、VEGF4、IGF2R2、GPX1、APOAV、DBH、の遺伝子多型において交互作用が有意であった(いずれの遺伝子多型についても、優性モデルおよび劣性モデルの各該当者は 50 名以上)。男女ともに劣性モデルでは、有意な関連が認められなかった。

ついで、主たる関連要因(カルシウム)と交互作用を示す遺伝子多型の絞り込みをしたところ、多型の主効果を考慮しない場合、男女ともにカルシウムと交互作用を示す多型は認められなかった。

さらに多型の主効果を考慮し同様の解析を行ったところ、女性では、ABCA、LPL、COL1A2、COX2、の遺伝子多型において、男性では、VEGF1、VEGF4、IGF2R2、GPX1、の遺伝子多型においてカルシウムと交互作用を示す多型が認められた。

3. カルシウム摂取量の群別(400mg/日、600mg/日、800mg/日)に BMI22kg/m²を維持した場合の 50 歳以降 30 年間の大腿骨頸部骨密度変化予測式の作成

図1に 50 歳男性における GPX1 遺伝子多型による今後 30 年間の骨密度変化予想図を示した。尚、カルシウム摂取量は 400mg/日、600mg/日、800mg/日の 3 群に分け、BMI22kg/m²を維持した場合の予測式から図式化した。TT 型ではカルシウム摂取量の多寡により骨密度変化量に有意な差は認められなかったが、TC/CC 型ではカルシウム摂取量が少ない群ほど、骨密度低下量は大きかった(p=0.02)。たとえば TC/CC 型の遺伝子多型をもつ 50 歳男性が、カルシウム摂取量 800mg を今後 30 年間維持した場合、骨密度低下量は推定 103 mg/cm²であるのに対し、カルシウム摂取量 600mg の者では 152 mg/cm²の低下、カルシウム摂取量 400mg の者では 189 mg/cm²の低下が見込まれた。

図 2 に閉経女性における ABCA 遺伝子多型による今後 30 年間の骨密度変化予想図を示した。尚、カルシウム摂取量は 400mg/日、600mg/日、800mg/日の 3 群に分け、閉経年齢は 50 歳、BMI22kg/m²を維持した場合の予測式から図式化した。TC/CC 型ではカルシウム摂取量の多寡により骨密度変化量に有意な差は認められなかったが、TT 型ではカルシウム摂取量が少ない群ほど、骨密度低下量は大きかった(p=0.01)。たとえば TT 型の遺伝子多型をもつ 50 歳閉経女性が、カルシウム摂取量 800mg を今後 30 年間維持した場合、骨密度低下量は推定 189 mg/cm²であるのに対し、カルシウム摂取量 600mg の者では 231 mg/cm²の低下、カルシウム摂取量 400mg の者では 273 mg/cm²の低下が見込まれた。

D. 考察

一昨年度実施した横断的検討では、栄養素と骨密度の関連は主に腰椎骨密度において観察されたが、昨年度は研究班統一の方針として、大腿骨頸部骨密度における遺伝子多型の作用

を検討することとした。昨年度の栄養素と大腿骨頸部骨密度との縦断的検討においても、大腿骨頸部骨密度と有意な関連を示す栄養素は認められなかったが、今年度、大腿骨頸部骨密度変化量に対する栄養素の関連を検討した解析においても有意な関連を示す栄養素は認められなかった。

このため昨年度と同様、骨密度との関連がほぼ確立しているカルシウムを食習慣因子として採用し、遺伝子多型別の大腿骨頸部骨密度変化量に対する栄養素摂取量(カルシウム)の影響を検討した。

遺伝子多型の主効果を考慮し、カルシウム摂取量と交互作用を示す遺伝子多型の絞り込みをしたところ、女性では、ABCA、LPL、COL1A2、COX2、の遺伝子多型において、男性では、VEGF1、VEGF4、IGF2R2、GPX1、の遺伝子多型においてカルシウムと交互作用を示す多型が認められた。それぞれの遺伝子多型について、カルシウム摂取量別の50歳以降30年間の大腿骨頸部骨密度変化量を推定したところ、女性のCOX2 遺伝子多型ではカルシウム摂取量が高い群ほど、TC/CC 型では骨密度が有意に減少するという想定外の結果が算出されたが、その他の遺伝子多型については、カルシウム摂取量が高い群ほど、骨密度の減少量が低く、カルシウム摂取量を高く維持することが、将来の骨粗鬆症予防に有効であることが示唆された。

E. 結論

栄養素摂取量と骨密度変化量との関連におよぼす遺伝子多型の影響を明らかにすることを目的として、地域在住の中高年男性男性 883 人と閉経女性 507 人の、6年間の縦断調査の結果から、中高年男性、閉経女性の骨密度低下に関連する食生活因子とその背景要因と交互作用を示す遺伝子多型について検討した。男女とも

に数種の遺伝子多型において、カルシウム摂取量の多摂取が、中年期以降の骨密度減少量を抑制させる方向に働いている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

今井具子、安藤富士子:アンチエイジングのための食事. クリニカルプラクティス, 26(7);536-540, 2007

安藤富士子、今井具子、下方浩史:食事・栄養と中高年男性の健康 一栄養疫学の立場から一. 更年期から熟年期までの男性医学—中高年の Men's Health を支えるために—熊本悦明、堀江重郎編集. ライフサイエンス社、東京 (in press)

2. 学会発表

今井具子、大塚礼、中村美詠子、安藤富士子、下方浩史:写真撮影併用が3日間食事調査に有用であるか. 第61回日本栄養・食糧学会. 京都, 2007年5月20日.

Imai T, Otuka R, Nakamura M, Ando F, Shimokata H: Advantages of taking photographs in the 3-day dietary record, The 10th European Nutrition Conference. Paris, 12 July, 2007.

大塚礼、今井具子、北村伊都子、安藤富士子、下方浩史:家族構成からみた中高年期の栄養摂取状況ならびに肥満度. 第28回日本肥満学会, 東京 2007年10月19日.

今井具子、大塚礼、安藤富士子、下方浩史:食事バランスガイドの目安量(SV)情報を含む料理データベースの作成とデータベースを介した栄

養素等推定量と3DRによる推定量の比較.第 18
回日本疫学会学術総会.東京、2008 年 1 月 26
日.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

図1 男性における GPX1 遺伝子多型による 50 歳以降 30 年間の骨密度変化予想図
 (カルシウム摂取量 400mg/日、600g/日、800mg/日の 3 群で検討、BMI は 22kg/m² を維持した場合)

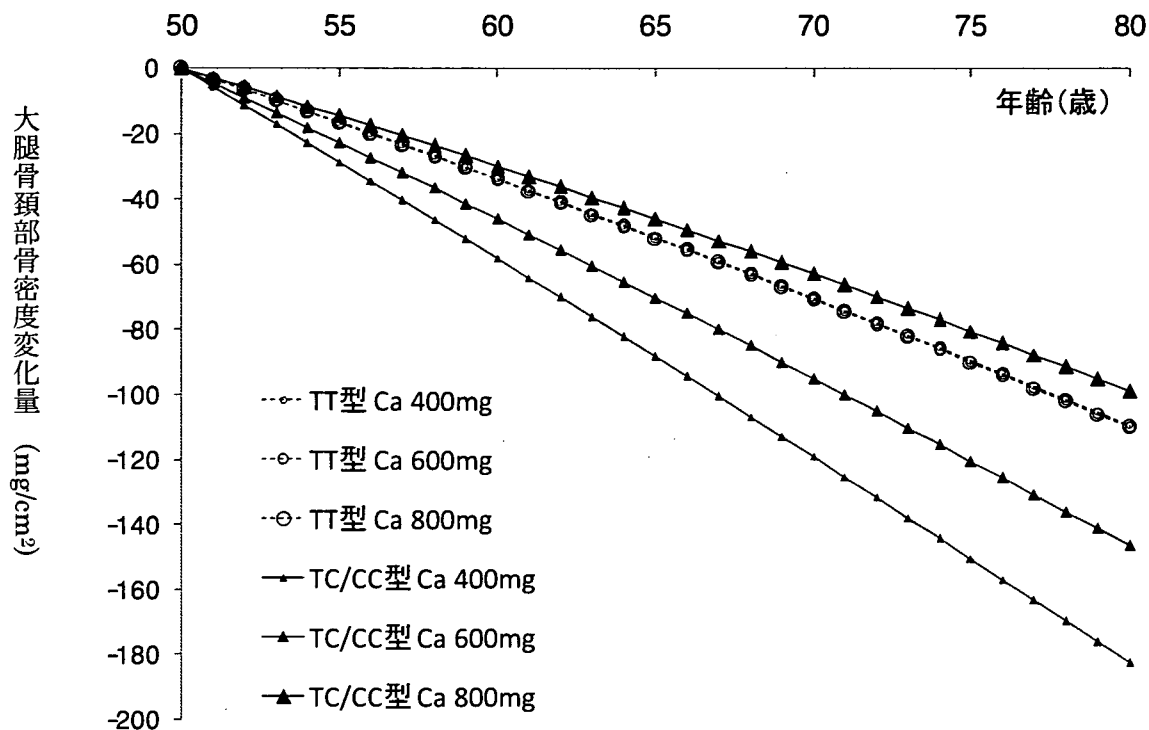
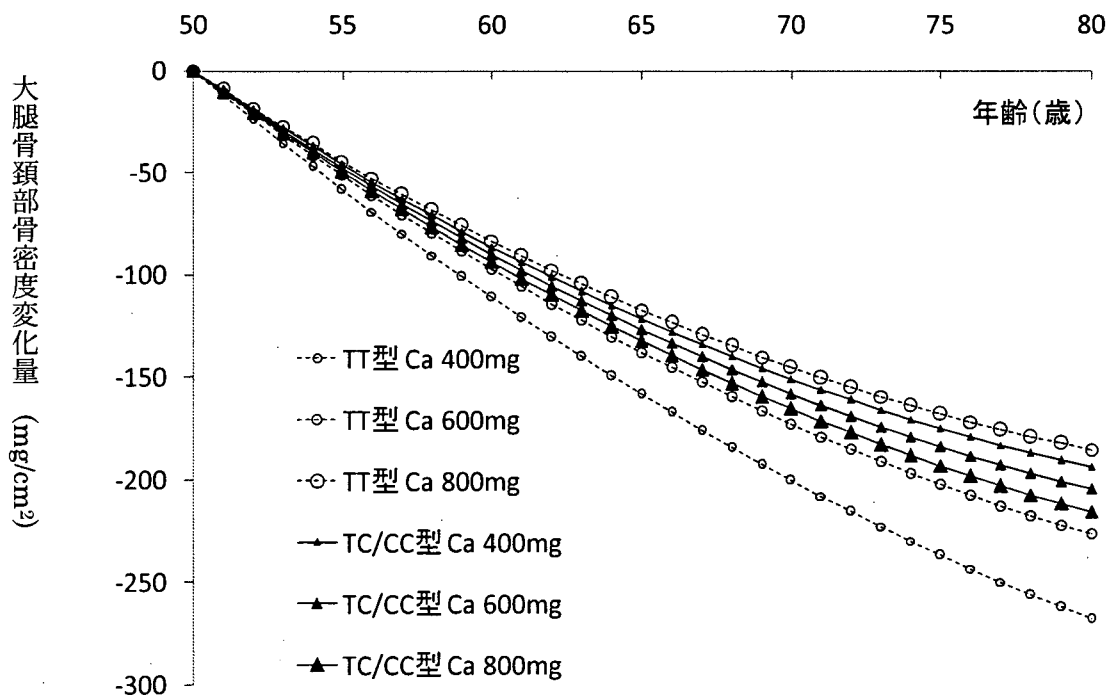


図2 閉経女性における ABCA 遺伝子多型による 50 歳以降 30 年間の骨密度変化予想図
 (カルシウム摂取量 400mg/日、600g/日、800mg/日の 3 群で検討、閉経年齢は 50 歳、BMI は 22kg/m² を維持した場合)



分担研究報告書

骨密度加齢変化に関連する背景要因の縦断的検討
—主効果および遺伝子多型との交互作用—

分担研究者 安藤 富士子

国立長寿医療センター疫学研究部長期縦断疫学研究室長

研究要旨 老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)の第1次調査に参加した男性及び閉経女性の中で、第1次調査から6年後の第4次調査までの間に、連続した2回の調査に少なくとも1度は参加した者を対象とし、右大腿骨頸部骨密度の2年間の変化量に関連する背景要因(ただし他の班員が解析を行う、運動・体力、栄養、体格・身体組成、遺伝子多型を除く)を網羅的に検索した。男女ともに血清クレアチニンが高値の者ほど骨密度の低下量は少なく、一方、男性ではコーヒーの多飲者や喫煙者、血清リン値の高い者等、女性では糖尿病既往者や血清カルシウムの高い者等では骨密度の低下量が大きかった。続いて骨密度変化量に対してこれらの関連要因と交互作用を示す遺伝子多型を177種の候補遺伝子多型から抽出した。男性でコーヒー多飲、喫煙と交互作用を示す遺伝子多型はそれぞれ11種と10種(年齢を調整)、閉経女性で糖尿病既往と交互作用を示す遺伝子多型は9種(年齢・閉経年齢・BMIを調整)であった。

A. 研究目的

骨粗鬆症は多因子疾患であり、その発症には食事・運動・喫煙などの生活習慣や疾患、さらには人種・性・年齢・体格・閉経などの要因が関連することが知られている。遺伝子多型と骨密度との関連についても近年、内外で膨大な報告がなされている。しかし海外で報告は国内での結果と必ずしも一致せず、また国内の研究でも異なるコホート間での骨粗鬆症関連遺伝子多型の再現性は高くない。これはコホートの年齢・性の構成、運

動量、食習慣などの違いにより遺伝子多型と骨密度との関係が異なることが一因である。しかし、骨密度に対する生活習慣と遺伝子多型との交互作用についての研究は乏しく、十分なエビデンスは蓄積されていない。

本研究班では、生活習慣や背景要因と遺伝子多型が骨粗鬆症や骨密度に及ぼす影響について遺伝的要因と後天的要因との交互作用に着目して検討することを目標の一つとしている。本年度は特に骨密度の変

化量について①骨密度の変化量に影響を与える後天的要因の抽出と②この後天的要因と交互作用を示す遺伝子多型の抽出を行い、③これらから特定の遺伝子多型を有する特定年齢の個人の将来の骨密度変化量を予測する式を作成することを目的とした。また、この式を用いて、生活習慣等の後天的要因改善による将来の骨密度低下予防効果を定量的に示した。

後天的要因の中で「運動関連要因」、「栄養関連要因」、「体型関連要因」と骨密度変化量との関連については他の分担研究者が分析を行っているので、本分担研究では、これら以外の生活習慣および背景要因、血液データ等について、地域在住の中老年男性および閉経女性の大腿骨頸部骨密度変化量を指標として検討した。

B. 研究方法

1. 対象

対象は国立長寿医療センター研究所疫学研究部が1997年から行っている「国立長寿医療センター研究所・老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)」の参加者である。

NILS-LSAの参加者は愛知県大府市および知多郡東浦町の、初回調査時40歳から79歳までの住民から性・年齢層化無作為抽出で選ばれた者で、文書による合意の得られている者である。

NILS-LSA第1次調査(1997年11月～2000年4月)参加者2,267人の中で遺伝子多型解析用の血液採取が可能であったのは2,259人であった(99.6%)。このうち、第1次調査から第2次調査(2000年4月～2002年5月)、第3次調査(2002年5月～2004年6月)、第4次調査(2004年6月～2006

年7月)までの間に少なくとも一度は連続する2回の調査に参加した者から、骨粗鬆症の既往のある者、骨密度に影響を与える薬剤を服用している者を除いた男性883人(59.6歳±10.6歳)と閉経女性507人(62.5±8.2歳)を本研究の解析対象とした。連続する2回の調査結果から計算される、右大腿骨頸部骨密度変化量($\text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{年}$)を目的変数とする解析の、延べ人数は男性2,288人(1人あたり2.59データ)、閉経女性1,384人(1人あたり2.73データ)である。閉経の確認は自記式調査票を用いて月経の有無と閉経年齢について確認した。

2. 大腿骨頸部骨密度変化量

二重X線吸収装置(DXA, Hologic社, QDR4500)を用いて測定した右大腿骨頸部骨密度を用い、連続した2回の調査の骨密度差を2回の調査間の日数で除し、そこから年間骨密度変化量($\text{cm}^2/\text{年}$)を算出した。

3. 遺伝子多型

第1次調査時にEDTA採血血漿から分離凍結保存されたDNAを用い、蛍光法によるアレル特異DNAプライマー測定システム(東洋紡)を用いてタイピングを行った。本研究の解析時までNILS-LSAでタイピングが終了した老化・老年病関連候補遺伝子多型196種の中で解析に必要な多型の分布が得られた177種の遺伝多型について解析をおこなった。

4. 解析方法

(1) 大腿骨頸部骨密度変化量に関わる生活習慣・背景要因・血液データの抽出: 昨年度と同様に、内外の文献、特に日本での