

p<0.0001)を認めた。収縮期血圧を目的変数とした重回帰分析では、年齢、性別、BMI で補正後も推定塩分摂取量、8-OHdG はそれぞれ独立した因子として採択された。

#### D. 考察

酸化ストレスは、血管収縮、炎症、細胞増殖などを介して高血圧の発症や進展に寄与する可能性が指摘されている。モデル動物を使った実験では、抗酸化薬が降圧を引き起こすことも報告されている。

今回、地域住民を対象とした断面研究において、酸化ストレスマーカーである8-OHdG が血圧値と正の相関を示すことが明らかとなった。また8-OHdG は推定塩分摂取量と有意に相関することから、塩分の過剰摂取は酸化ストレスの増大を介して血圧上昇に寄与している可能性も考えられる。

塩分の過剰摂取が酸化ストレスを増大させる機序として、以下に示すようにいくつかの分子レベルでの報告がある。塩分は腎皮質でのNADPH オキシダーゼの活性化をもたらし、さらに抗酸化物質であるSODの減少を引き起こすことにより、酸化ストレスを増大させることが報告されている。また、塩分は循環血漿中のアルドステロンを減少させるが、一方で腎のミネラルコルチコイドレセプターの活性化を引き起こす。この機序の一部に酸化ストレスが関与していることが示され

ている。

今回の結果は塩分の過剰摂取が血圧上昇を引き起こす機序の一端を示したものであり、一般住民に対する減塩の啓蒙活動に一定のエビデンスを与えるものであると考えている。今後この集団を前向きに追跡することにより、塩分摂取量と心血管イベントの関連も解析が可能と考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表：

Oguro R, Kamide K, Katsuya T, Akasaka H, Sugimoto K, Congrains A, Arai Y, Hirose N, Saitoh S, Ohishi M, Miura T, Rakugi H. A single nucleotide polymorphism of the adenosine deaminase, RNA-specific gene is associated with the serum triglyceride level, abdominal circumference, and serum adiponectin concentration. *Exp Gerontol.* 2012 Feb;47(2):183-7.

Mitsumata K, Saitoh S, Ohnishi H, Akasaka H, Miura T. Effects of parental hypertension on longitudinal trends in blood pressure and plasma metabolic profile: mixed-effects model analysis. *Hypertension.* 2012 Nov;60(5):1124-30.

Furugen M, Saitoh S, Ohnishi H, Akasaka H, Mitsumata K, Chiba M, Furukawa T, Miyazaki Y, Shimamoto K, Miura T. Matsuda-DeFronzo insulin sensitivity

index is a better predictor than HOMA-IR of hypertension in Japanese: the Tanno-Sobetsu study. J Hum Hypertens. 2012 May;26(5):325-33.

2. 学会発表:

第 35 回日本高血圧学会総会(平成 24 年 9 月 20 日-22 日、愛知県名古屋市)において本研究の成果を発表した。

第 24 回国際高血圧学会(24<sup>th</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension、平成 24 年 9 月 30 日-10 月 4 日、オーストラリア、シドニー)において本研究の成果を発表した。

F. 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

G. 研究協力者

赤坂憲、斎藤重幸、大西浩文、三俣兼人、  
吉原真由美

分担研究報告書

地域一般住民における耐糖能レベルと悪性腫瘍死亡の関係:久山町研究

研究分担者 清原 裕 (九州大学大学院医学研究院環境医学分野・教授)

研究要旨

福岡県久山町における追跡調査の成績をもとに、空腹時・負荷後 2 時間血糖レベルおよび耐糖能レベルと癌死亡のリスクとの関係を検討した。

1988 年に福岡県久山町の循環器健診で 75g 経口糖負荷試験を受けた 40~79 歳の住民のうち、癌の既発症者を除いた 2,438 人を 19 年間追跡した。追跡期間内に 229 例が癌で死亡した。癌死亡のリスクは、多変量解析で交絡因子を調整しても、空腹時および負荷後 2 時間血糖レベルが最も低い者と比べ、空腹時血糖値 100mg/dl 以上のレベルの者、負荷後 2 時間血糖値 200mg/dl 以上のレベルの者で有意に高かった。耐糖能レベル別にみると、糖尿病のみならず空腹時血糖異常 (impaired fasting glucose: IFG) や耐糖能異常 (impaired glucose tolerance: IGT) も癌死亡の有意な危険因子であった (IFG の多変量調整後ハザード比 1.49 [95% 信頼区間 1.05-2.11]、IGT 1.52 [1.05-2.22]、糖尿病 2.10 [1.41-3.12])。部位別の癌については、空腹時血糖値あるいは負荷後 2 時間血糖値の上昇は、胃癌、肝臓癌、肺癌による死亡リスクの上昇と有意な関連を認めた。

以上の成績より、わが国の一般住民において、前糖尿病域の高血糖と糖尿病の両者が癌死亡の有意な危険因子であることが示唆される。

A. 研究目的

糖尿病と悪性腫瘍の患者はともに全世界で急速に増加している。両疾患の発症には多くの遺伝的要因、環境要因が関わっているが、近年糖尿病が悪性腫瘍のリスク上昇に関与するという疫学研究の報告が認められるようになった。両者の関係については主に欧米の疫学研究で指摘されているが、アジア人において一般住民を対象に 75g 経口糖負荷試験を用いて正確に耐糖能レベルを評価し、この問題を検討した研究はほとんどない。アジア人と欧米人の間には遺伝的背景や生活習慣に大きな違いが存在するため、アジアの一般住民において糖尿病を含む糖代謝異常が癌死亡のリスクに及ぼす影響を検証することは意義があると考えられる。

そこで本報告では、福岡県久山町における追跡調査の成績をもとに、75g 経口糖負荷試験で定義した前糖尿病、糖尿病と癌死亡との関係について検討した。

B. 研究方法

1988 年に久山町の循環器健診で 75g 経口糖負荷試験を受けた 40~79 歳の住民のうち、癌の既往歴のある者を除いた 2,438 人 (男性 1,054 人、女性 1,384 人) を本研究の対象とした。この集団を 19 年間追跡した結果、この間に 229 例 (男性 145 例、女性 84 例) が癌により死亡した。耐糖能レベルは WHO 基準およびアメリカ糖尿病学会の勧告に従い、正常耐糖能は空腹時血糖値 (fasting plasma glucose: FPG) < 100mg/dl かつ負荷後 2 時間血糖値 (2 時間 PG) < 140mg/dl、空腹時血糖異常 (impaired fasting glucose: IFG) は FPG 100-125mg/dl かつ 2 時間 PG < 140mg/dl、耐糖能異常 (impaired glucose tolerance: IGT) は FPG < 126mg/dl かつ 2 時間 PG 140-199mg/dl、糖尿病は FPG ≥ 126mg/dl または 2 時間 PG ≥ 200mg/dl と定義した。耐糖能レベルが癌死亡のリスクに与える影響については、Cox 比例ハザードモデルを用いて検討した。

## 倫理面の配慮

本研究は九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会による承認を受けて行われ、研究参加者から研究に関するインフォームドコンセントを取得した。

## C. 研究結果

### 1. 空腹時血糖値および負荷後 2 時間血糖値レベルと癌死亡の関係

年齢・性調整後の癌死亡率は、FPG レベルの上昇に伴い有意に上昇した。年齢、性、body mass index、血清総コレステロール値、喫煙、飲酒、身体活動度、癌の家族歴、食事性因子を調整した多変量解析においてもこの傾向は変わらず、癌死亡のハザード比は、FPG 100mg/dl 未満のレベルと比べて FPG 100-109mg/dl のレベルから有意に上昇した (FPG: 100-109mg/dl では 1.38 [95%信頼区間 1.00-1.90]、110-125mg/dl では 1.89 [1.30-2.74]、 $\geq 126$ mg/dl では 2.06 [1.35-3.14])。また、癌死亡率は 2 時間 PG レベルが高いほど上昇した。多変量調整後もその関係は変わらず、癌死亡のリスクは、2 時間 PG < 120mg/dl と比べて  $\geq 200$ mg/dl のレベルで有意に高かった (1.99 [1.34-2.94])。

### 2. 耐糖能レベルと癌死亡の関係

WHO 基準の耐糖能レベル別に癌死亡との関連を検討すると、多変量調整後の癌死亡のハザード比は、正常耐糖能者と比べて、糖尿病患者のみならず IFG、IGT を有する者においても有意に高かった (IFG では 1.49 [1.05-2.11]、IGT では 1.52 [1.05-2.22]、糖尿病では 2.10 [1.41-3.12]) (表 1)。さらに、糖尿病患者を既知の糖尿病患者と新規診断糖尿病患者に分けて検討すると、多変量調整後の癌の累積死亡率は、既知の糖尿病患者で最も高かった (図)。

### 3. 空腹時血糖値および負荷後 2 時間血糖値レベルと部位別にみた癌死亡の関係

年齢・性調整後の胃癌死亡のリスクは、FPG < 100mg/dl のレベルと比べて FPG  $\geq 100$ mg/dl のレベルで有意に高かった (表 2)。一方、2 時間 PG  $\geq 140$ mg/dl のレベルでは、肺癌、肝癌による死亡のリスクが高かった。

## D. 考察

わが国の地域住民を 19 年間追跡した本研究の成績では、FPG および 2 時間 PG 高値は癌死亡のリスク上昇と有意に関係しており、特に胃癌、肺癌、肝癌による死亡リスクとの間に有意な関連を認めた。また、癌死亡のリスクは、正常耐糖能に比べ糖尿病だけでなく前糖尿病のレベルでも高かった。

### ① 糖尿病と癌死亡の関係について

一般住民を対象としたいくつかの前向き研究において、糖尿病と癌死亡の関係が検討されている。ほとんどの研究は、糖尿病は癌発症・死亡に対して大きな影響を及ぼすことを報告しているが、いずれの研究も異なる基準に基づいて糖尿病を定義している。本研究では、FPG レベル、2 時間 PG レベル、両者の組み合わせで定義したいずれの糖尿病でも癌死亡のリスクは高かった。とりわけ既知の糖尿病は、新規診断糖尿病よりも癌死亡のリスクが高く、糖尿病への長期曝露が癌死亡率を上昇させることがうかがえる。以上より、糖尿病は癌の有意な危険因子であることが示唆される。

### ② 耐糖能レベルと癌死亡の関係について

本研究の重要な点は、IFG と IGT が癌死亡に与える影響を別々に評価したことであり、癌死亡のリスクは IFG と IGT の両者において上昇していた。IFG と IGT の癌に与える影響の違いを説明する生物学的機序は不明であるが、癌死亡の予防において、IGT のみならず IFG も重要な早期介入の対象である可能性が考えられる。

### ③ 空腹時血糖値および負荷後 2 時間血糖値と癌死亡の関係について

また本研究により、FPG 高値は胃癌死亡の、2 時間 PG 高値は肺癌、肝癌死亡のそれぞれ有意な危険因子であった。最近の統合研究によると、前糖尿病域は胃癌、肝癌死亡と関連することが報告されており、この結果は我々の成績を支持するものである。以前の我々の研究でも、前糖尿病域の FPG レベルにおいて胃癌発症率が高かった。また、他の疫学研究では、2 時間 PG と肝癌死亡の間に正の関係がみられた。FPG および 2 時間 PG レベルが部位別の癌に及ぼす影響を明らかにするには、今後更なる疫学研究が必要である。

### ④ 糖代謝異常が癌発症リスクを上昇させる機序に

## ついて

糖代謝異常が癌の発症リスクを上昇させる機序の一つとして、高血糖状態が直接的に発癌性因子として作用する可能性が挙げられる。糖尿病患者にみられる活性酸素産生の増加や高血糖自体がDNA損傷をもたらし、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の突然変異変化を引き起こすことで癌を進展させると考えられる。その他の機序として、高血糖と関連する高インスリン血症が発癌に関与することが挙げられる。高インスリン血症は癌細胞の細胞増殖経路を直接刺激することや、癌細胞の成長刺激因子であるインスリン様成長因子(IGF)-1を増加させ、間接的に発癌を促進することが報告されている。

## E. 結論

わが国の一般住民において、糖尿病のみならず75g経口糖負荷試験で定義された前糖尿病も癌死亡の独立した危険因子であった。癌発症における高血糖の影響を明らかにするには、さらなる大規模前向きコホート研究や、糖尿病患者や高血糖の者において強化血糖降下の癌予防効果を検討する臨床試験が必要である。

## F. 健康危険情報

糖尿病のみならず、前糖尿病も癌死亡の有意な危険因子である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Miyazaki M, Doi Y, Ikeda F, Ninomiya T, Hata J, Uchida K, Shirota T, Matsumoto T, Iida M, Kiyohara Y: Dietary vitamin A intake and incidence of gastric cancer in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Gastric Cancer* 15: 162-169, 2012
2. Ikeda F, Ninomiya T, Doi Y, Hata J, Fukuhara M, Matsumoto T, Kiyohara Y: Smoking cessation improves mortality in Japanese men: the Hisayama Study. *Tob Control* 21:416-421, 2012
3. Yoshida D, Ninomiya T, Doi Y, Hata J,

Fukuhara M, Ikeda F, Mukai N, Kiyohara Y: Prevalence and causes of functional disability in an elderly general population of Japanese: the Hisayama Study. *J Epidemiol* 22: 222-229, 2012

4. Fukuhara M, Arima H, Ninomiya T, Hata J, Yonemoto K, Doi Y, Hirakawa Y, Matsumura K, Kitazono T, Kiyohara Y: Impact of lower range of prehypertension on cardiovascular events in a general population: the Hisayama Study. *J Hypertens* 30: 893-900, 2012
5. Shikata K, Ninomiya T, Yonemoto K, Ikeda F, Hata J, Doi Y, Fukuhara M, Matsumoto T, Iida M, Kitazono T, Kiyohara Y: Optimal cutoff value of the serum pepsinogen level for prediction of gastric cancer incidence: the Hisayama Study. *Scand J Gastroenterol* 47: 669-675, 2012
6. Gotoh S, Doi Y, Hata J, Ninomiya T, Mukai N, Fukuhara M, Kamouchi M, Kitazono T, Kiyohara Y: Insulin resistance and the development of cardiovascular disease in a Japanese community: the Hisayama Study. *J Atheroscler Thromb* 19: 977-985, 2012
7. Ozawa M, Ninomiya T, Ohara T, Hirakawa Y, Doi Y, Hata J, Uchida K, Shirota T, Kitazono T, Kiyohara Y: Self-reported dietary intake of potassium, calcium, and magnesium and risk of dementia in the Japanese: the Hisayama Study. *J Am Geriatr Soc* 60: 1515-1520, 2012
8. Hirakawa Y, Ninomiya T, Mukai N, Doi Y, Hata J, Fukuhara M, Iwase M, Kitazono T, Kiyohara Y: Association between glucose tolerance level and cancer death in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Am J Epidemiol* 176: 856-864, 2012
9. Ohara T, Ninomiya T, Hirakawa Y, Ashikawa K, Monji A, Kiyohara Y, Kanba S, Kubo M: Association study of susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease in the

Japanese population. Psychiatr Genet 22: 290-293, 2012

10. Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Takahashi O, Mukai N, Hata J, Iwase M, Kitazono T, Oike Y, Kiyohara Y: Angiotensin-like protein 2 and risk of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama Study. Diabetes Care 36: 98-100, 2013
11. Ninomiya T, Kojima I, Doi Y, Fukuhara M, Hirakawa Y, Hata J, Kitazono T, Kiyohara Y: Brachial-ankle pulse wave velocity predicts the development of cardiovascular disease in a general Japanese population: the Hisayama Study. J Hypertension 31: 477-483, 2013
12. Nagata M, Ninomiya T, Doi Y, Hata J, Ikeda F, Mukai N, Tsuruya K, Oda Y, Kitazono T, Kiyohara Y: Temporal trends in sudden unexpected death in a general population: the Hisayama Study. Am Heart J, 2013 (in press)

## 2. 学会発表

1. 清原 裕. 脳卒中発症予防のためのrisk管理～best medical treatment を目指して～. 第37回日本脳卒中学会総会<シンポジウム>, 福岡市, 2012.4
2. 清原 裕. 地域住民における高血圧の実態:久山町研究の最新情報より. 第1回日本臨床高血圧フォーラム<イブニングセミナー>, 豊中市, 2012.5
3. 清原 裕. ヘリコバクター感染症と胃癌のコホート研究. 第18回日本ヘリコバクター学会学術集会<特別講演>, 岡山市, 2012.6
4. 清原 裕. 心血管病の時代的変遷と今日の課題:久山町研究. 第18回日本心臓リハビリテーション学会学術集会<ランチョンセミナー>, さいたま市, 2012.7
5. 清原 裕. 生活習慣病の疫学研究から動脈硬化を予防する. 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会<シンポジウム>, 福岡市, 2012.7
6. 清原 裕. 糖尿病と認知症:久山町研究一次予

防. 第2回日本認知症予防学会学術集会<シンポジウム>, 北九州市, 2012.9

7. 清原 裕. 疫学的エビデンスに基づいた提言. 第35回日本高血圧学会総会<特別企画>, 名古屋市, 2012.9
8. 清原 裕. 生活習慣病のゲノム疫学. 第84回日本遺伝学会大会公開市民講座<講演>, 福岡市, 2012.9
9. 清原 裕. 肥満症と動脈硬化. 第33回日本肥満学会<教育講演>, 京都市, 2012.10
10. 清原 裕. 血管性認知症の最先端. 第31回日本認知症学会学術集会<シンポジウム>, つくば市, 2012.10
11. 清原 裕. わが国において継続中の認知症疫学研究. 第31回日本認知症学会学術集会<シンポジウム>, つくば市, 2012.10
12. 清原 裕. 変貌する心血管病の危険因子:久山町研究. 第77回日本循環器学会学術集会<ランチョンセミナー>, 横浜市, 2013.3

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

## I. 研究協力者

永田雅治 (九州大学大学院医学研究院環境医学)  
平川洋一郎 (同上)

表 1. 耐糖能レベル別にみた全癌死亡のリスク, 1988-2007 年

耐糖能レベル	人年	症例数	年齢・(性)調整死亡率 (対 1000 PYs)	年齢・(性)調整 HR, (95% CI)	P 値	多変量調整 HR, (95% CI)	P 値
全体							
正常	18024	109	4.8	1.00		1.00	
IFG	10886	23	6.8	1.41	(1.12, 2.76)	1.49	(1.05, 2.11) 0.02
IGT	7607	53	6.8	1.43	(0.99, 1.99)	1.52	(1.05, 2.22) 0.03
糖尿病	4569	44	8.7	1.88	(1.28, 2.77)	2.10	(1.41, 3.12) <0.001
男性							
正常	6302	66	7.7	1.00		1.00	
IFG	5108	17	9.6	1.20	(0.78, 1.84)	1.37	(0.88, 2.13) 0.16
IGT	3172	31	9.6	1.22	(0.76, 1.95)	1.37	(0.84, 2.23) 0.21
糖尿病	2375	31	13.6	1.75	(1.10, 2.80)	2.07	(1.28, 3.35) 0.003
女性							
正常	11722	43	2.6	1.00		1.00	
IFG	5778	6	4.7	1.85	(1.05, 3.24)	1.68	(0.94, 2.98) 0.08
IGT	4435	22	4.6	1.82	(1.02, 3.27)	1.80	(0.99, 3.28) 0.06
糖尿病	2195	13	4.9	2.08	(1.05, 4.10)	2.04	(1.00, 4.16) 0.05

HR:ハザード比, CI:信頼区間, PYs:人年, IFG:空腹時血糖異常, IGT:耐糖能異常

性別の解析では、死亡率とハザード比は性で調整していない。

多変量調整は、年齢、(性別)、body mass index、血清総コレステロール、喫煙、飲酒、癌の家族歴、身体活動度、食事因子(総エネルギー、総脂肪、ビタミン A、ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>、ビタミン C、食物繊維摂取量)で行った。

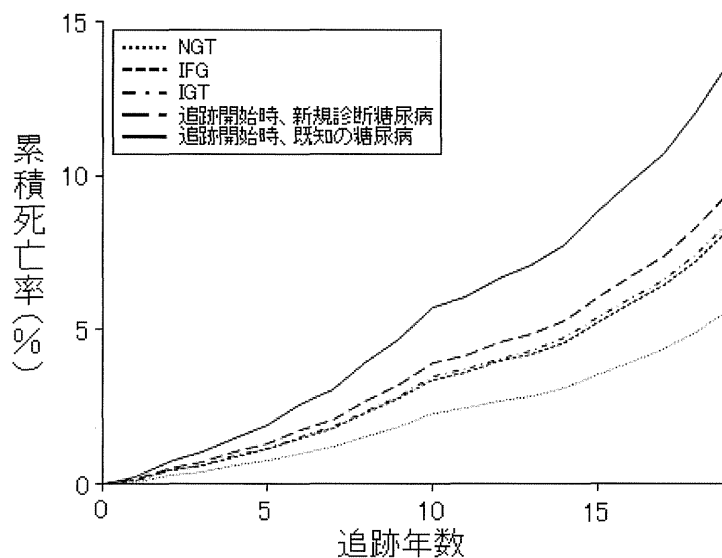


図: 耐糖能レベル別にみた多変量調整後の全癌の累積死亡率, 1988-2007 年

NGT:正常耐糖能、IFG:空腹時血糖異常、IGT:耐糖能異常

耐糖能レベル間の累積癌死亡率の差はCox 比例ハザードモデルを用いて検定

既知の糖尿病 vs. NGT: p<0.01、IFG・IGT・新規診断糖尿病 vs. NGT: p<0.05

表 2. 空腹時血糖または負荷後 2 時間血糖レベルの上昇が部位別の癌に与えるリスク, 1988-2007 年

癌の部位	空腹時血糖レベル			負荷後 2 時間血糖レベル		
	<100 mg/dl	≥100 mg/dl	P 値	<140 mg/dl	≥140 mg/dl	P 値
肺						
症例数 / 人年	17 / 21002	33 / 20083		24 / 29257	26 / 11828	
HR (95%CI)	1.00	1.53 (0.85, 2.76)	0.15	1.00	1.99 (1.14, 3.48)	0.02
胃						
症例数 / 人年	10 / 21002	26 / 20083		20 / 29257	16 / 11828	
HR (95%CI)	1.00	2.13 (1.03, 4.45)	0.04	1.00	1.59 (0.82, 3.08)	0.17
結腸直腸						
症例数 / 人年	14 / 21002	14 / 20083		22 / 29257	6 / 11828	
HR (95%CI)	1.00	0.84 (0.40, 1.78)	0.65	1.00	0.54 (0.22, 1.33)	0.54
肝						
症例数 / 人年	12 / 21002	28 / 20083		17 / 29257	23 / 11828	
HR (95%CI)	1.00	1.91 (0.97, 3.76)	0.06	1.00	2.69 (1.43, 5.05)	0.002
膵						
症例数 / 人年	4 / 21002	11 / 20083		10 / 29257	5 / 11828	
HR (95%CI)	1.00	2.27 (0.72, 7.16)	0.16	1.00	0.89 (0.30, 2.60)	0.89
その他						
症例数 / 人年	24 / 21002	36 / 20083		40 / 29257	20 / 11828	
HR (95%CI)	1.00	1.30 (0.77, 2.19)	0.32	1.00	1.00 (0.58, 1.71)	0.99

HR:ハザード比、CI:信頼区間  
 リスク評価は年齢・性で調整した。



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
清原 裕	3章 疾患の疫学 3. コホート研究: 久山町研究.	門脇 孝 永井良三	カラー版 内科学	西村書店	東京	2012	100-104
二宮利治 清原 裕	6. リスク層別化に用いる予後影響因子とその再評価. (1)メタボリックシンドローム.	土橋卓也 大屋祐輔 苅尾七臣	臨床高血圧ワークブック～エビデンスを超えた次の一手～. 第2巻 高血圧患者におけるリスクの層別化	医薬ジャーナル社	大阪	2012	58-64
秦 淳 清原 裕	日本のゲノムコホート構想.	林 正彦	理科年表 平成 25 年	丸善出版	東京	2012	93-94

原著論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyazaki M, et al.	Dietary vitamin A intake and incidence of gastric cancer in a general Japanese population: the Hisayama Study.	Gastric Cancer	15	162-169	2012
Ikeda F, et al.	Smoking cessation improves mortality in Japanese men: the Hisayama Study.	Tob Control	21	416-421	2012
Yoshida D, et al.	Prevalence and causes of functional disability in an elderly general population of Japanese: the Hisayama Study.	J Epidemiol	22	222-229	2012
Fukuhara M, et al.	Impact of lower range of prehypertension on cardiovascular events in a general population: the Hisayama Study.	J Hypertens	30	893-900	2012
Shikata K, et al.	Optimal cutoff value of the serum pepsinogen level for prediction of gastric cancer incidence: the Hisayama Study.	Scand J Gastroenterol	47	669-675	2012
Asakuma T, et al.	Prevalence and risk factors for myopic retinopathy in a Japanese population: the Hisayama Study.	Ophthalmology	119	1760-1765	2012
Gotoh S, et al.	Insulin resistance and the development of cardiovascular disease in a Japanese community: the Hisayama Study.	J Atheroscler Thromb	19	977-985	2012
Ozawa M, et al.	Self-reported dietary intake of potassium, calcium, and magnesium and risk of dementia in the Japanese: the Hisayama Study.	J Am Geriatr Soc	60	1515-1520	2012
Hirakawa Y, et al.	Association between glucose tolerance level and cancer death in a general Japanese population: the Hisayama Study.	Am J Epidemiol	176	856-864	2012

Ohara T, et al.	Association study of susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population.	Psychiatr Genet	22	290-293	2012
Doi Y, et al.	Angiotensin-like protein 2 and risk of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama Study.	Diabetes Care	36	98-100	2013
Ohkuma T, et al.	Impact of eating rate on obesity and cardiovascular risk factors according to glucose tolerance status: the Fukuoka Diabetes Registry and the Hisayama Study.	Diabetologia	56	70-77	2013
Ninomiya T, et al.	Brachial-ankle pulse wave velocity predicts the development of cardiovascular disease in a general Japanese population: the Hisayama Study.	J Hypertension	31	477-483	2013

厚生労働省科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）  
分担研究報告書

大血管障害危険因子としての、糖尿病、高血圧、等の確立した因子と  
遺伝因子、GNB3 遺伝子 C825T 多型、との相互作用の解析- 舟形研究 (Funagata study)-

分担研究者 大門 真 弘前大学大学院内分泌代謝内科 教授

研究要旨

GNB3 遺伝子 C825T 多型と大血管障害 (CVD) との関連を、高血圧、糖尿病等との相互作用を考慮の上解析した。[方法] 山形県舟形町住民検診に 2001-2005 年に参加し、同意を得られた 1,524 人 (男/女: 698/826; 平均年齢: 61.4±12.1) が対象。多型は TaqMan 法にて解析。CVD の発症は質問票で、死亡は死亡票で調査し、2008 年 3 月末まで追跡した。[結果] 追跡期間中 (最長 81 ヶ月、中央値 68 ヶ月) に、78 人が CVD 発症 (脳卒中: 54; 心血管障害: 30; 両方: 6)。CVD の累積発症率は TT 遺伝子型で CT+CC 遺伝子型よりも有意に高かった (0.077 vs. 0.042, P=0.004)。Cox 比例ハザード法にて、TT 遺伝子型は糖尿病、高血圧、等の CVD 危険因子と独立して CVD (ハザード比、1.93; P=0.012)、及び、脳卒中 (1.76; P=0.048) の危険因子であった。[結語] GNB3 遺伝子 C825T 多型の TT 遺伝子型は糖尿病、高血圧と独立した CVD の危険因子であった。

A. 研究目的

G 蛋白β3 サブユニット (GNB3) 遺伝子 C825T 多型は、高血圧に関連する遺伝子多型として 1998 年に始めて報告された。以来、高血圧のみならず、肥満や糖尿病等との関連も報告されている。私達も、先行する研究にて、本遺伝子多型と糖尿病とが食塩摂取量依存性に関連していることを報告した (BBRC, 374:576, 2008)。本遺伝子多型は、上記の大血管障害と関連していることより、大血管障害と関連していると思われる。そこで、本遺伝子多型と大血管障害との関連を、糖尿病、高血圧、肥満、喫煙、等の他の大血管障害危険因子との相互作用を考慮して解析した。

B. 研究方法

山形県舟形町住民検診 (舟形研究) に 2001-2005 年に参加し、遺伝子を含む本研究に協力の同意を得られた 1,524 人 (男/女: 698/826; 平均年齢: 61.4±12.1) を対象とした。GNB3 遺伝子 C825T 多型を TaqMan 法にて解析。大血管障害の発症をエンドポイントとし、発症は質問票で、死亡は死亡票で調査し、2008 年 3 月末日までの追跡データを用いた。

統計解析: 遺伝子型間の臨床値の違いは、連続変数は t テスト、カテゴリーデータはχ<sup>2</sup> 乗法で解析した。遺伝子型の危険度は、kaplan-Meier 法、及び、Cox 比例ハザード法にて調べた。

C. 研究結果

追跡期間中 (最長 81 ヶ月、中央値 68 ヶ月)

に、78人が大血管障害発症（脳卒中：54；心血管障害：30；両方：6）。大血管障害の危険因子である、年齢、性別、糖尿病、高血圧、脂質異常症、飲酒、喫煙はこの2群間で有意な差はなかった。大血管障害の累積発症率はTT遺伝子型でGT+CC遺伝子型よりも有意に高かった(0.077 vs. 0.042,  $P=0.004$ )。Cox 比例ハザード法にて、TT遺伝子型は上記の確立した大血管障害危険因子と独立して大血管障害(hazard ratio (HR)=1.93;  $P=0.012$ )、及び、脳卒中(HR=1.76;  $P=0.048$ )の有意な危険因子であることが示された。

#### D. 考察

GNB3 遺伝子 C825T 多型の TT 遺伝子型は糖尿病、高血圧、等の確立した大血管障害危険因子と独立した大血管障害、及び、脳卒中の危険因子であった。

#### E. 結論

GNB3 遺伝子 C825T 多型を調べることは、糖尿病、高血圧、等の確危険因子の有無に関わらず、大血管障害のリスク評価に有用と思われた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Daimon M, Sato H, Kaino W, Tada K,

Takase K, Karasawa S, Wada K, Kameda W, Susa S, Oizumi T, Kayama T, Muramatsu M, Kato T. Association of the G-protein Beta-3 Subunit Gene Polymorphism with the Incidence of Cardiovascular Disease Independent of Hypertension: The Funagata Study. J Human Hypertension 2013;in press.

2. Emerging Risk Factors Collaboration. Adult height and the risk of cause-specific death and vascular morbidity in 1 million people: individual participant meta-analysis. Int J Epidemiol. 2012;41:1419-1433.
3. Daimon M, Oizumi T, Kato T. Decreased serum levels of adiponectin as a risk for development of type 2 diabetes, and impaired glucose tolerance as a risk for stroke--the Funagata study. Nihon Rinsho. 2012;70 Suppl 3:256-259.

#### 2. 学会発表

1. 大門 真、曾我朋義、寶澤 篤、大泉俊英、海野 航、高瀬 薫、柄澤 繁、神部裕美、和田輝里子、亀田 亘、諏佐真治、嘉山孝正、齋藤香織、富田 勝、加藤丈夫：血清グリセロールリン酸は2型糖尿病で増加している。第55回日本糖尿病学会学術総会（横浜）2012年5月18日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

無

## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍 (0)

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌 (3)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Daimon M, et al.	Association of the G-protein Beta-3 Subunit Gene Polymorphism with the Incidence of Cardiovascular Disease Independent of Hypertension: The Funagata Study.	J Human Hypertnsion	印刷中		2013
Emerging Risk Factors Collaboration. (.....Daimon M, et al.)	Adult height and the risk of cause-specific death and vascular morbidity in 1 million people: individual participant meta-analysis.	Int J Epidemiol	41	1419-1433	2012
Daimon M, et al.	Decreased serum levels of adiponectin as a risk for development of type 2 diabetes, and impaired glucose tolerance as a risk for stroke--the Funagata study	Nihon Rinsho	70 Sup pl 3:	256-259.	2012

ORIGINAL ARTICLE

# Association of the G-protein $\beta 3$ subunit gene polymorphism with the incidence of cardiovascular disease independent of hypertension: the Funagata study

M Daimon<sup>1,2</sup>, H Sato<sup>1,3</sup>, W Kaino<sup>1</sup>, K Tada<sup>1</sup>, K Takase<sup>1</sup>, S Karasawa<sup>1</sup>, K Wada<sup>1</sup>, W Kameda<sup>1</sup>, S Susa<sup>1</sup>, T Oizumi<sup>1</sup>, T Kayama<sup>2</sup>, M Muramatsu<sup>3,4</sup> and T Kato<sup>1,2</sup>

Association of the C825T G-protein  $\beta 3$  subunit (GNB3) gene polymorphism with cardiovascular disease (CVD) incidence was examined in a population-based longitudinal study of the Japanese individuals. The incidence of CVD (stroke and coronary heart disease (CHD)) was assessed in a cohort population ( $n = 1524$ ) consisting of participants of the 2001–2005 Funagata study through March 2008. Cumulative incidences according to genotype were compared with the Kaplan–Meier product-limit method. During the follow-up, 78 subjects experienced a CVD event (stroke:  $n = 54$ ; CHD:  $n = 30$ ; both consecutively:  $n = 6$ ). At the end of the follow-up (longest and median follow-up periods: 81 and 68 months, respectively), the cumulative incidence of CVD for the TT genotype was significantly higher than that of the C-carriers (0.077 vs 0.042,  $P = 0.004$ ). Blood pressures and the prevalence of hypertension were not different between the genotypes. Cox's proportional hazard analysis showed that the TT genotype is a significant risk factor for CVD (hazard ratio (HR) = 1.82 (95% confidence interval (CI) 1.14–2.89);  $P = 0.012$ ) and stroke (HR = 1.76 (95% CI: 1.01–3.07);  $P = 0.048$ ) incidences after adjustment for age, sex, hypertension, hyperlipidemia, diabetes, alcohol drinking and smoking at baseline. The TT genotype of the C825T GNB3 gene polymorphism was found to be a significant risk factor for the incidence of CVD and stroke independent of hypertension and other established CVD risk factors in a Japanese population.

*Journal of Human Hypertension* (2013) **0**, 000–000. doi:10.1038/jhh.2013.28

**Keywords:** population-based study; Funagata study; G-protein  $\beta 3$  subunit; genetic variation; hypertension

## INTRODUCTION

G-proteins are heterotrimers, which consist of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits that relay information from cell surface receptors (that is, G-protein coupled receptors) to effectors in cells, such as adenylyl cyclases, phospholipases, tyrosine kinases, phosphoinositide 3-kinases, G-protein coupled receptor kinases and ion channels.<sup>1</sup> Because of their pivotal roles in many cellular functions, variations in the genes encoding the subunits of the G-protein may bear functional relevance in numerous clinical conditions.<sup>2</sup> Of these variations, the C825T polymorphism of the G-protein  $\beta 3$  subunit (GNB3) gene, which is a synonymous single nucleotide polymorphism consisting of a substitution for C by T at position 825 in exon 10,<sup>3</sup> has been predominantly examined.<sup>3–12</sup> The T allele of the C825T polymorphism has been shown to be associated with an in-frame deletion of 41 amino acids (nucleotides 498–620 of exon 9), which occurred due to alternative splicing.<sup>4</sup> The splice variant lacks one of its seven WD (tryptophan-aspartic acid) repeat domains, is functionally active and thus has been postulated to be associated with enhanced signaling activity.<sup>3–6</sup> Therefore, as the C825T polymorphism appears to be involved in pathophysiology leading to various conditions, associations of the C825T polymorphism have been examined with many clinical conditions, including hypertension,<sup>3,7–10</sup> obesity,<sup>8–10</sup> hyperlipidemia<sup>8,10,13</sup> and type 2 diabetes (diabetes),<sup>8–12</sup> which are all well-established risk factors for cardiovascular disease (CVD).

Initially, the 825T allele was found to be associated with hypertension.<sup>3</sup> Since then, many researchers have tried to replicate the association with hypertension in population samples, but their findings have been inconsistent.<sup>7–10</sup> Nonetheless, two meta-analyses confirmed slight, but significant, associations with hypertension (odds ratios: 1.08 and 1.07).<sup>7,8</sup> The association of the C825T polymorphism with obesity,<sup>8–10</sup> hyperlipidemia<sup>8,10,13</sup> and diabetes<sup>8–12</sup> has also been shown in several studies; however, the results have been conflicting.

Given that the C825T polymorphism appears to be associated with various CVD risk factors, including hypertension, the C825T polymorphism may be associated with CVD via its association with these various CVD risk factors, in particular hypertension. The association of the C825T polymorphism with the incidence of CVD has been examined in two prospective studies on Caucasian individuals.<sup>14,15</sup> One study showed positive association with CVD events in treated hypertensive men only,<sup>14</sup> whereas the other study showed a positive association with cerebrovascular (stroke) events but not with coronary (coronary heart disease (CHD)) events.<sup>15</sup> Surprisingly, in the latter very recent study, the association with stroke incidence was shown to be independent of blood pressure and other established CVD risk factors, including hypertension, indicating that the association with stroke is neither mediated through hypertension nor through other established CVD risk factors. To date, no similar prospective studies have been

<sup>1</sup>Department of Neurology, Hematology, Metabolism, Endocrinology and Diabetology (DNHMED), Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan; <sup>2</sup>Global Center of Excellence Program Study Group, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan; <sup>3</sup>HuBit Genomix Research Institute, Tokyo, Japan and <sup>4</sup>Department of Molecular Epidemiology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. Correspondence: Dr M Daimon, Department of Endocrinology and Metabolism, Hirosaki University Graduate School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki, Aomori 036-8562, Japan.  
E-mail: mdaimon@cc.hirosaki-u.ac.jp

Received 23 November 2012; revised 15 February 2013; accepted 15 March 2013

reported in other ethnicities. Therefore, it is unclear whether a similar association of the C825T polymorphism with the incidence of CVD is a common phenomenon across various ethnicities and whether such an association is limited in men or with the incidence of stroke.

Therefore, here we conducted a prospective study to examine the association of the C825T GNB3 gene polymorphism with CVD in a relatively large-scale population-based sample of Japanese individuals, with consideration given to established CVD risk factors, including hypertension.

## MATERIALS AND METHODS

### Study population

The Funagata Study is a population-based, longitudinal study that was conducted in Funagata, an agricultural area located about 400 km north of Tokyo, Japan. The details of the study have been reported previously.<sup>16,17</sup> Among the participants of the Funagata study held in 2001, 2002 and 2005, 1603 subjects with no previous history of CVD at baseline examinations were eligible for the present study. Of them, a total of 1524 subjects (males/females: 698/826; age: 61.4 ± 12.1 years) had completed follow-up examinations until March 2008, and thus these subjects were enrolled in the study. CVD events (fatal and non-fatal) were monitored by interviewing the subjects and their family members by area public health nurses using questionnaires. Death certificates were also reviewed to confirm the fatal events until March 2008. Of the study subjects, 58 subjects died and 20 moved away during the follow-up. The participants who moved away during the follow-up period were identified using residence transfer documents. Death certificates of the deceased participants were collected with the permission of the Management and Coordination Agency of the Japanese government once a year. The death code (ICD-10), date and place of death were reviewed. This study was approved by the Ethics Committee of the Yamagata University School of Medicine, and written informed consent to participate was obtained from all the participants.

The clinical characteristics of the study population according to the C825T GNB3 gene polymorphism are shown in Table 1. Hypertension was defined as systolic or diastolic blood pressure ≥ 140 or ≥ 90 mmHg, respectively, or as being on treatment for hypertension. Hyperlipidemia was defined as either a total cholesterol level ≥ 240 mg dl<sup>-1</sup>, triglyceride

level ≥ 150 mg dl<sup>-1</sup> based on the definition criteria set by the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults<sup>18</sup> or as being on treatment for hyperlipidemia. Diabetes was defined based on the 1998 World Health Organization criteria (fasting plasma glucose levels ≥ 126 mg dl<sup>-1</sup>).<sup>19</sup> In subjects (*n* = 40) whose fasting plasma glucose levels were not measured, diabetes was defined as a postprandial glucose levels ≥ 200 mg dl<sup>-1</sup> or hemoglobin A1c levels ≥ 6.5%, based on the definition criteria set by World Health Organization and International Diabetes Federation.<sup>20</sup> Those on medication for diabetes were defined as diabetic. Subjects known to have type 1 diabetes were excluded.

### Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. The C825T polymorphism of the GNB3 gene was analyzed with fluorogenic PCR, as described previously.<sup>21</sup>

### Statistical analysis

The clinical characteristics are shown as mean ± s.d. Differences between any two groups were assessed using an un-paired *t*-test. A case-control association between the genotypes and frequencies of the non-parametric condition were analyzed using a Chi-square test.

The cumulative incidences were compared among the genotypes using the Kaplan–Meier product-limit method, in which all events (fatal and non-fatal) corresponding to CVD (either stroke or CHD) were adopted as the endpoint. Multivariable Cox's regression models were used to estimate the hazard ratio (HR) of the C825T GNB3 gene polymorphism independent of possible confounding factors such as age, sex and hypertension. *P* < 0.050 was considered as statistically significant. All analyses were conducted on Stat View for Windows, version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

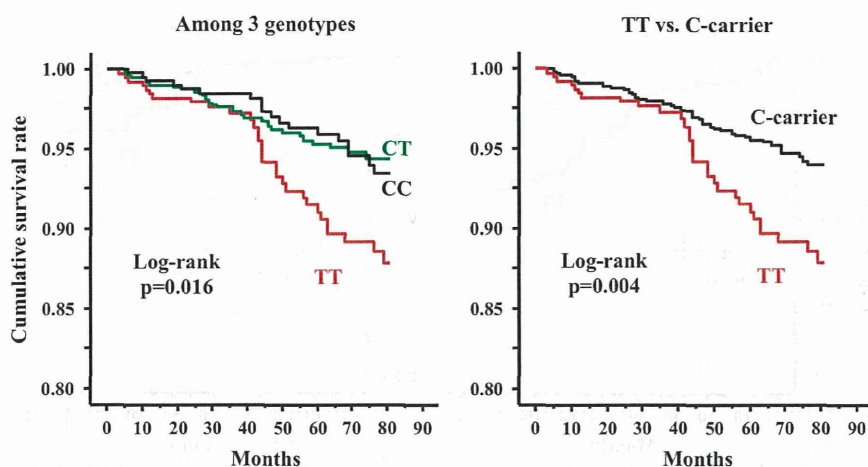
## RESULTS

The mean age (± s.d.) and sex ratio (male/female) of the genotype groups (CC, CT and TT) were 60.9 ± 12.2 and 185/220, 61.3 ± 12.2 and 334/339 and 62.1 ± 11.8 and 179/213, respectively. No statistical differences in the age and sex ratio were observed among the groups. The frequency of the T allele in our cohort was 49.6%, which is similar to that previously reported in other studies

**Table 1.** Baseline clinical characteristics based on C285T GNB3 genotype

Trait	Genotype (GNB3:C825T)		P-value
	C-carriers (CC + CT)	TT	
Number (sex: M/F)	1132 (519/613)	392 (179/213)	0.950
Age (years)	61.2 ± 12.2	62.1 ± 11.8	0.170
Height (cm)	155.6 ± 9.3	155.1 ± 8.9	0.357
Body weight (kg)	57.5 ± 10.6	57.7 ± 11.0	0.802
Body mass index (kg m <sup>-2</sup> )	23.7 ± 3.2	23.9 ± 3.7	0.202
Fat (%)	25.0 ± 7.1	25.2 ± 7.1	0.650
Fasting plasma glucose (mg dl <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	96.5 ± 16.7	97.2 ± 24.0	0.511
HbA1c (%)	5.17 ± 0.65	5.18 ± 0.57	0.842
Systolic blood pressure (mmHg)	129.4 ± 17.6	131.0 ± 18.6	0.136
Diastolic blood pressure (mmHg)	76.3 ± 10.5	76.8 ± 10.6	0.492
Total cholesterol (mg dl <sup>-1</sup> )	200.5 ± 32.6	201.6 ± 33.3	0.568
Triglyceride (mg dl <sup>-1</sup> )	119.8 ± 141.7	119.0 ± 110.7	0.918
HDL cholesterol (mg dl <sup>-1</sup> )	59.2 ± 14.6	59.3 ± 14.8	0.982
Hypertension, <i>n</i> (%)	481 (42.5)	160 (40.8)	0.563
Hyperlipidemia, <i>n</i> (%)	346 (30.6)	119 (30.4)	0.939
Diabetes/GI, <i>n</i> (%)	108/197 (9.5/17.4)	40/67 (10.2/17.1)	0.926
Drinking alcohol, <i>n</i> (%) <sup>b</sup>	531 (47.4)	177 (45.5)	0.525
Smoking (never/past/current) <sup>c</sup>	752/157/214	266/62/61	0.265

Abbreviations: F, female; GI, gastrointestinal; GNB3, G-protein β3 subunit; HbA1c, hemoglobin A1c; HDL, high-density lipoprotein; M, male. Differences were determined using an un-paired *t*-test or Chi-square test. <sup>a</sup>Data were not obtained from some of the subjects. Most of these subjects were diabetic before the examination (CT + CC: *n* = 33; TT: *n* = 14). <sup>b</sup>Data were not obtained from some of the subjects (CT + CC: *n* = 11; TT: *n* = 3). <sup>c</sup>Data were not obtained from some of the subjects (CT + CC: *n* = 9; TT: *n* = 3).



**Figure 1.** Kaplan–Meier curves for CVD events of subjects stratified according to their genotypes of C285T GNB3 gene polymorphism (left panel), as well as according to the TT genotype ( $n = 392$ ) or the C-carrier genotypes ( $n = 1132$ ; right panel). Differences among and between the groups were assessed using log-rank tests.  $P < 0.05$  was considered as significant. The cumulative incidence of CVD for the TT genotype was significantly higher than that for the other genotypes.

**Table 2.** Cardiovascular disease risk, according to the C285T GNB3 genotypes (TT vs C-carriers)

	Univariate			Model 1			Model 2		
	Hazard ratio	95% CI	P-value	Hazard ratio	95% CI	P-value	Hazard ratio	95% CI	P-value
CVD	1.93	1.22–3.04	0.005*	1.81	1.15–2.86	0.011*	1.82	1.14–2.89	0.012*
Stroke	1.95	1.13–3.36	0.017*	1.82	1.05–3.15	0.032*	1.76	1.01–3.07	0.048*
CHD	2.05	0.99–4.26	0.054	1.92	0.93–3.99	0.080	2.08	0.99–4.38	0.053

Abbreviations: CHD, coronary heart disease; CI, confidence interval; CVD, cardiovascular disease; GNB3, G-protein  $\beta$ 3 subunit. Model 1: adjusted for age and sex. Model 2: adjusted for age, sex, hypertension, hyperlipidemia, diabetes, alcohol drinking and smoking.

on Japanese individuals.<sup>10,22</sup> The frequencies of the three genotypes (26.6% for CC, 47.7% for CT and 25.7% for TT) were in agreement with those predicted by the Hardy–Weinberg equilibrium ( $P = 0.468$ ).

During the follow-up, 54 (3.5%) subjects experienced a stroke (fatal and non-fatal: 9 and 45, respectively; ischemic, hemorrhagic and unclassified: 34, 19 and 1, respectively), and 30 (2.0%) subjects experienced CHD (fatal and non-fatal: 8 and 22, respectively). Six subjects suffered from both events (stroke and CHD) consecutively, and thus in the analysis for the incidence of CVD ( $n = 78$ ), these subjects were considered to have suffered a CVD event counted whenever either condition occurred first.

As shown in Figure 1, at the end of the follow-up (longest and median follow-up periods: 81 and 68 months, respectively), the cumulative incidences of CVD for the TT genotype of the C825T GNB3 gene polymorphism were significantly higher than those of the other genotypes (CC, CT and TT: 0.044, 0.041 and 0.077, respectively;  $P = 0.016$  and 0.004 for among the three genotypes and between the CC+CT vs TT genotypes, respectively). The differences became evident following the fourth year of follow-up. As the cumulative incidences of CVD for the CC and CT genotypes were similar, these two groups were combined for further analyses.

As shown in Table 1, no clinical characteristics at baseline were significantly different between the CC+CT and TT genotypes. Most importantly, neither systolic nor diastolic blood pressures were different between the groups. The prevalence of hypertension among subjects was also not different.

As shown in Table 2, Cox's proportional hazard model analyses showed that the TT genotype was a significant risk factor for the

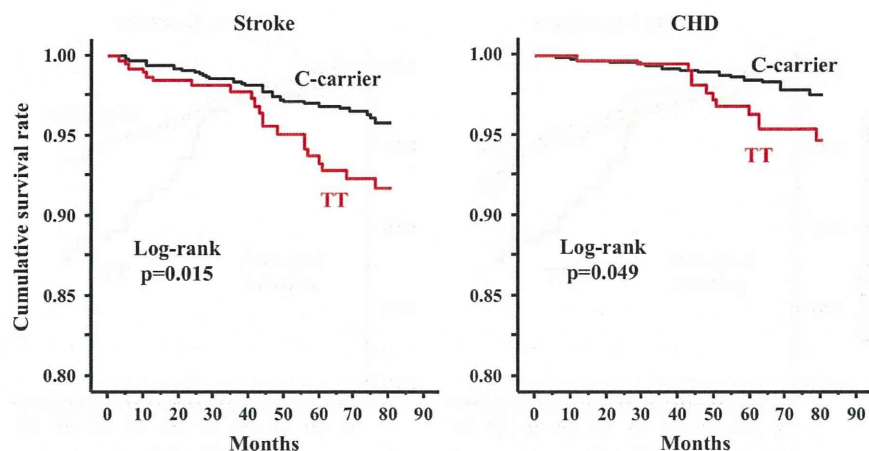
incidence of CVD with a HR of 1.93 (95% confidence interval (CI): 1.22–3.04). The TT genotype remained a significant risk factor for the incidence of CVD even after adjusting for age and sex (model 1) and also for established risk factors of CVD, including hypertension, hyperlipidemia, diabetes and smoking (model 2).

The risk of the TT genotype for the incidences of stroke and CHD were also evaluated. Kaplan–Meier product-limit method analyses followed by log-rank test revealed that the TT genotype was a significant risk factor for incidences of both stroke ( $P = 0.015$ ) and CHD ( $P = 0.049$ ) (Figure 2). Cox's proportional hazard model analyses showed that the TT genotype was a significant risk factor for stroke, even after adjusting for all the factors used for the analysis for CVD (model 2; HR: 1.76; 95% CI: 1.01–3.07). However, the TT genotype was a nearly significant risk factor for CHD (model 2; HR: 2.08; 95% CI: 0.99–4.38; Table 2). Taken together, these results indicate that the TT genotype is a significant risk factor for CVD and stroke, and potentially for CHD, in a Japanese population.

## DISCUSSION

Based on the data from a 7-year longitudinal, population-based study on Japanese individuals, the TT genotype of the C825T GNB3 gene polymorphism was shown to be a significant risk factor for the incidence of CVD. Multivariable Cox's regression analysis revealed that this association was independent of hypertension and other established CVD risk factors. Similar results have been reported in prospective studies on Caucasian individuals but not in other ethnicities. Therefore, our findings in Japanese subjects indicate that there is an association of the





**Figure 2.** Kaplan–Meier curves of subjects stratified into two groups (that is, the TT genotype ( $n = 392$ ) and the C-carriers ( $n = 1132$ )) for stroke (left panel) and CHD events (right panel). Differences between the groups were assessed using log-rank tests.  $P < 0.05$  was considered as significant. The cumulative incidences of stroke and CHD for the TT genotype were significantly higher than that for the other genotypes.

C825T GNB3 gene polymorphism with the incidence of CVD, independent of hypertension and other established CVD risk factors. Thus, given that this association appears to be a common phenomenon across different ethnicities, further studies in other ethnicities are warranted to confirm this notion.

CVD encompasses several medical conditions, including stroke and CHD. Therefore, the observed risks for CVD are a combined outcome of these medical conditions. As a result, we separately evaluated the association of the C825T GNB3 gene polymorphism with the incidences of stroke and CHD and found that there was a significant association between the C825T GNB3 gene polymorphism and the incidences of both stroke and CHD. However, the association between the C825T GNB3 gene polymorphism and the incidence of CHD was nearly significant, according to the Cox's proportional hazard model. In a very recent study conducted by Casiglia *et al.*<sup>15</sup> where the association of the C825T GNB3 gene polymorphism with the incidences of stroke and CHD were separately examined, it was also determined that there was an association between the polymorphism and stroke but not CHD. However, in their study, the incidence of coronary events was higher, although not significant, in those with the TT genotype than in those with the CC+CT genotypes (14.1 vs 10.6%;  $P = 0.145$ ). Therefore, our findings corroborate those of Casiglia *et al.*<sup>15</sup> We believe that these observations do not undermine the association between the C825T GNB3 gene polymorphism and incidence of CHD, because these studies appear to have insufficient statistical power. The frequency of the T allele appears to be lower in Caucasian individuals than in Japanese individuals,<sup>8,10,14,15,22</sup> as was evident in these studies (33.1 vs 49.6%). This lower frequency may have contributed to the lower statistical power of the study by Casiglia *et al.*<sup>15</sup> The incidence of CHD is much lower in Japanese individuals than in Caucasian individuals,<sup>23–27</sup> as was confirmed in these studies (2.0 vs 11.0%). This lower incidence of CHD may contribute to the lower statistical power of our study. Taken together, the TT genotype is a significant risk factor for CVD and stroke, and potentially for CHD, independent of established CVD risk factors, including hypertension, in a Japanese population.

The splice variant of GNB3 (GNB3s) is known to be in tight association with the C825T GNB3 gene polymorphism and has been shown to activate mitogen-activated protein kinase through a chain reaction involving ras and raf protein kinases, which then activate the sodium–proton exchanger (NHE).<sup>28,29</sup> Correlation of the T allele of the C825T GNB3 gene polymorphism with increased NHE activity has been previously reported in a human study.<sup>3</sup> Therefore, NHE activation via GNB3 has been postulated to be

involved in CVD pathophysiology and links the GNB3 gene polymorphism to various clinical conditions.<sup>30,31</sup> In transgenic mice with NHE subtype 1, blood pressure was not altered on a normal-salt diet but was elevated on a high-salt diet.<sup>32</sup> Increases in NHE activity in the lymphocytes of normotensive subjects induced by an excessive consumption of sodium have also been reported.<sup>33</sup> Therefore, higher sodium consumption appears to increase NHE activity similar to how the C825T GNB3 gene polymorphism does. Salt consumption thus seems to have some influence on the association between the C825T GNB3 gene polymorphism and certain clinical conditions, particularly hypertension. Interactions between the GNB3 gene and markers of sodium homeostasis (that is, urinary excretion and consumption) with respect to diabetes and hypertension have been previously reported.<sup>21,34</sup> In these studies, the associations between the C825T GNB3 gene polymorphism with diabetes and hypertension were more evident in those with low salt consumption. Here, we did not find associations between the C825T GNB3 gene polymorphism and diabetes or hypertension (Table 1). Furthermore, according to government files, the residents of the study area consumed a high amount of salt (mean (men/women): 12.7/10.8 g day<sup>-1</sup>).<sup>35</sup> Therefore, although sodium variables were not evaluated, our findings seem to represent individuals with high salt consumption. Studies that take salt consumption into account have to be carried out in the future to examine whether the association between the C825T GNB3 gene polymorphism and CVD is salt-dependent.

This study has several strengths and limitations that need to be mentioned. In terms of its strengths, the sample size was relatively large and consisted of a 'general' population of Japanese individuals. Furthermore, this study is a prospective study, which monitored fatal and non-fatal CVD events for a median follow-up time of 68 months. In terms of the limitations, as described above, sodium consumption was not evaluated. Therefore, we were not able to evaluate the sodium-dependent effects on the findings.

In conclusion, the TT genotype of the C825T GNB3 gene polymorphism was found to be a risk factor for incidence of CVD and stroke, and potentially for CHD, independent of hypertension and other established CVD risk factors, in a Japanese population.

Determination of the C825T GNB3 gene polymorphism appears to be useful for predicting the future development of CVD, independent of established CVD risk factors, including diabetes, hyperlipidemia, smoking and hypertension. Further studies are needed to clarify whether this observation is applicable to other ethnicities/races.

**What is known about the topic**

- The C825T GNB3 gene polymorphism appears to be associated with various CVD risk factors, including hypertension.
- The C825T GNB3 gene polymorphism was found to be associated with the incidence of CVD *per se* in two prospective studies on Caucasian individuals.
- The association with stroke incidence was shown to be independent of blood pressure and other established CVD risk factors, including hypertension in the prospective study on Caucasian individuals.

**What this study adds**

- The TT genotype of the C825T GNB3 gene polymorphism was found to be a risk factor for incidence of CVD and stroke in a Japanese population.
- Determination of the C825T GNB3 gene polymorphism appears to be useful for predicting the future development of CVD, independent of established CVD risk factors, including diabetes, hyperlipidemia, smoking and hypertension.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported, in part, by the Global Center of Excellence Program (no. F03) of the Japan Society for the Promotion of Science (Japan) and Health Sciences Research Grants (H23-seishuu-005) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

**REFERENCES**

- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR *et al*. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 2003; **24**: 765–781.
- Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med* 1999; **340**: 1012–1020.
- Siffert W, Roszkopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R *et al*. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet* 1998; **18**: 45–48.
- Roszkopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W. G protein beta 3 gene: structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension* 2000; **36**: 33–41.
- Siffert W, Roszkopf D, Moritz A, Wieland T, Kaldenberg-Stasch S, Kettler N *et al*. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J Clin Invest* 1995; **96**: 759–766.
- Virchow S, Ansoerge N, Rübber H, Siffert G, Siffert W. Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein beta3 subunit 825 T-allele. *FEBS Lett* 1998; **436**: 155–158.
- Bagos PG, Elefanti AL, Nikolopoulos GK, Hamodrakas SJ. The GNB3 C825T polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis of 34 studies including 14,094 cases and 17,760 controls. *J Hypertens* 2007; **25**: 487–500.
- Andersen G, Overgaard J, Albrechtsen A, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T *et al*. Studies of the association of the GNB3 825C>T polymorphism with components of the metabolic syndrome in white Danes. *Diabetologia* 2006; **49**: 75–82.
- Danoviz ME, Pereira AC, Mill JG, Krieger JE. Hypertension, obesity and GNB 3 gene variants. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; **33**: 248–252.
- Hayakawa T, Takamura T, Abe T, Kaneko S. Association of the C825T polymorphism of the G-protein beta3 subunit gene with hypertension, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance, diabetes, diabetic complications, and diabetic therapies among Japanese. *Metabolism* 2007; **56**: 44–48.
- Roszkopf D, Frey U, Eckhardt S, Schmidt S, Ritz E, Hofmann S *et al*. Interaction of the G protein beta 3 subunit T825 allele and the IRS-1 Arg972 variant in type 2 diabetes. *Eur J Med Res* 2000; **5**: 484–490.
- Kiani JG, Saeed M, Parvez SH, Frossard PM. Association of G-protein beta-3 subunit gene (GNB3) T825 allele with Type II diabetes. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; **26**: 87–88.
- Ishikawa K, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K *et al*. Human G-protein beta3 subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure. *Am J Hypertens* 2000; **13**: 140–145.
- Holmen OL, Romundstad S, Melien O. Association between the G protein beta3 subunit C825T polymorphism and the occurrence of cardiovascular disease in

- hypertensives: the Nord-Trøndelag Health Study (HUNT). *Am J Hypertens* 2010; **23**: 1121–1127.
- Casiglia E, Tikhonoff V, Boschetti G, Bascelli A, Saugo M, Guglielmi G *et al*. The C825T GNB3 polymorphism, independent of blood pressure, predicts cerebrovascular risk at a population level. *Am J Hypertens* 2012; **25**: 451–457.
- Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Hirata A, Yamaguchi H *et al*. Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study. *Diabetes Care* 2003; **26**: 2015–2020.
- Oizumi T, Daimon M, Jimbu Y, Wada K, Kameda W, Susa S *et al*. Impaired glucose tolerance is a risk factor for stroke in a Japanese sample—the Funagata study. *Metabolism* 2008; **57**: 333–338.
- Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; **285**: 2508–2509.
- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet Med* 1998; **15**: 539–553.
- World Health Organization. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Abbreviated Report of a WHO Consultation*. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2011.
- Daimon M, Sato H, Sasaki S, Toriyama S, Emi M, Muramatsu M *et al*. Salt consumption-dependent association of the GNB3 gene polymorphism with type 2 DM. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **374**: 576–580.
- Yamamoto M, Abe M, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M *et al*. Association of GNB3 gene with pulse pressure and clustering of risk factors for cardiovascular disease in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **316**: 744–748.
- DECODE Study Group, the European Diabetes Epidemiology Group. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med* 2001; **161**: 397–405.
- Brunner EJ, Shipley MJ, Witte DR, Fuller JH, Marmot MG. Relation between blood glucose and coronary mortality over 33 years in the Whitehall Study. *Diabetes Care* 2006; **29**: 26–31.
- Kubo M, Kiyohara Y, Kato I, Tanizaki Y, Arima H, Tanaka K *et al*. Trends in the incidence, mortality, and survival rate of cardiovascular disease in a Japanese community: the Hisayama study. *Stroke* 2003; **34**: 2349–2354.
- Shimamoto K, Kita T, Mabuchi H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Nakaya N *et al*. The risk of cardiovascular events in Japanese hypertensive patients with hypercholesterolemia: sub-analysis of the Japan Lipid Intervention Trial (J-LIT) Study, a large-scale observational cohort study. *Hypertens Res* 2005; **28**: 879–887.
- Nakamura Y, Ueshima H, Okamura T, Kadowaki T, Hayakawa T, Kita Y *et al*. Association between fish consumption and all-cause and cause-specific mortality in Japan: NIPPON DATA80, 1980–99. *Am J Med* 2005; **118**: 239–245.
- Roszkopf D, Manthey I, Habich C, Kielbik M, Eisenhardt A, Nikula C *et al*. Identification and characterization of G beta 3s2, a novel splice variant of the G-protein beta 3 subunit. *Biochem J* 2003; **371**: 223–232.
- Moor AN, Gan XT, Karmazyn M, Fliegel ML. Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-directed protein kinases in the ischemic and ischemic-reperfused rat myocardium. *J Biol Chem* 2001; **276**: 16113–16122.
- Siffert W, Düsing R. Sodium-proton exchange and primary hypertension. An update. *Hypertension* 1995; **26**: 649–655.
- Kedzierska K, Ciechanowski K, Safranow K, Bober J, Golembiewska E, Kwiatkowska E *et al*. GNB3 C825T and ACE I/D polymorphisms on the sodium-proton exchanger and the prevalence of essential hypertension in males. *Arch Med Res* 2006; **37**: 150–157.
- Kuro-o M, Hanaoka K, Hiroi Y, Noguchi T, Fujimori Y, Takewaki S *et al*. Salt-sensitive hypertension in transgenic mice overexpressing Na<sup>(+)</sup>-proton exchanger. *Circ Res* 1995; **76**: 148–153.
- Göbel BO, Hoffmann G, Ruppert M, Stumpe KO, Vetter H, Siffert W *et al*. The lymphocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter: activation in primary hypertension and during chronic NaCl-loading. *Eur J Clin Invest* 1994; **24**: 529–539.
- Yamagishi K, Tanigawa T, Cui R, Tabata M, Ikeda A, Yao M *et al*. G-protein beta-3 subunit C825T polymorphism, sodium and arterial blood pressure: a community-based study of Japanese men and women. *Ann Hum Genet* 2006; **70**: 759–766.
- Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. *Summary Report, National Health and Nutritional Survey*. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: Tokyo, Japan, 2010, pp 36.

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業）  
分担研究報告書

Adiponectin 測定による Metabolic syndrome スクリーニング精度に関する検討  
分担研究者 伊藤千賀子（医）グランドタワーメディカルコート 理事長

研究要旨：総・高分子量 Adiponectin を測定した 5,435 例(男性 2,975、女性 2,460) について内臓脂肪の蓄積を予測できるかを検討した。男性では Adiponectin の 3 分位法の低群では約 50%が内臓脂肪蓄積 100cm<sup>2</sup> 以上であった。女性でも Adiponectin 3 分位法の低群、中群、高群の順に有意に高率であった。Adiponectin の測定はメタボリックシンドロームの診断に非常に有用であると考えられる。

A. 研究目的

Adiponectin は脂肪細胞から分泌される善玉アディポカインであり、内臓脂肪蓄積により Adiponectin は低下する。

Adiponectin 測定は 1 滴の血液で可能であり、簡単にメタボリックシンドロームのスクリーニングができる。そこで、メタボリックシンドロームの基本となる内臓脂肪面積の蓄積が Adiponectin 値から推測できるか否かを検討した。

B. 研究方法

対象は 2005 年 11 月から 2012 年 12 月の間に当所の人間ドック健診を受診した 5,435 例（男性 2,975 例、女性 2,460 例）で、早朝空腹時の血清脂質、血糖値、IRI、血圧値を測定した。WC 径は臍周囲、WHO（肋骨下縁と腸骨上縁の中間点）と NCEP（腸骨上縁）の方法で測定した。低線量 CT で内臓脂肪面積と皮下脂肪面積を測定した。対象の平均年齢は 45.8 歳であった。

総・高分子量 Adiponectin 値はモノクロナル抗体を用いた ELISA 法（積水化学）で測定した。総 Adiponectin を 3 分位法で最も低い群を低群、中群と最も高い群を高群とした。

FPG $\geq$ 110mg/dl または糖尿病治療中のものを糖代謝以上あり、収縮期血圧 130 以上または拡張期血圧 85 以上、高血圧治療中を血圧異常あり、TG150 以上または HDL コレステロール 40 未満、脂質異常症治療中を脂質異常ありとした。

本研究は Grand Tower Medical Court Life Care Clinic 治験審査委員会で承認を受け、対象例は全て文書による同意を得ている

C. 研究結果

1) Adiponectin を 3 分位法で区分して内臓脂肪面積 100cm<sup>2</sup> 以上の比率とリスクファクターの保有数を比較

Adiponectin 3 分位法での内臓脂肪面積 100cm<sup>2</sup> 以上の比率は男性で低群（3.3  $\mu$ g/ml 未満）46.7%、中群（3.3~4.8）34.9%、高群（4.9 以上）20.1%であった。内臓脂肪面積 100cm<sup>2</sup> 以上でリスクファクターを 1 項目以上保有している比率は低群 88.0%、中群 88.0%、高群 89.1%であった。

女性における内臓脂肪面積 100cm<sup>2</sup> 以上の比率は低群（5.6  $\mu$ g/ml 未満）10.0%、中群（5.6~8.2）4.0%、高群（8.3 以上）1.5%であった。内臓脂肪面積 100cm<sup>2</sup> 以上でリスクファクターを 1 項目以上保有している比率は低群 80.2%、中群 85.0%、高群 93.3%であった。男女とも内臓脂肪面積 100cm<sup>2</sup> 以上の比率は低群、中群、高群の順に有意に高率であった。

2) Adiponectin 低群と高群の臨床データの比較

男女ともに、Adiponectin 低群において年齢は有意に若く、BMI、臍周囲径、血圧値、脂質（TG LDL-コレステロール）は有意に高く、HDL-コレステロールは有意に低値であった。内臓脂肪面積は男性の低群では 101.4cm<sup>2</sup> 高群の 69.8cm<sup>2</sup> に比して有意に大きく、女性でもそれぞれ 51.2 および 28.5 と大差が見られた。そのほか低群では FPG、HbA1c、F-IRI および hs-CRP が有意に高値であった。

3) 多変量解析を用いた内臓脂肪面積と関

#### 連する要因の検討

男性についてみると有意な関連が見られた項目は収縮期血圧、TG、FPG、F-IRI、年齢、臍周囲径と正の関連、総 Adiponectin とは  $\beta$  -2.283 と負の関連が見られた。

女性についてみると収縮期血圧、TG、FPG、F-IRI、臍周囲径とは正の関連、総 Adiponectin とは  $\beta$  -0.679 と負の関連が見られ、HDL-コレステロールとも -0.118 と有意な関連が見られた。

#### 4) ROC curve を用いた Adiponectin のメタボリックシンドロームのスクリーニング精度の検討

危険因子が 2 項目以上のスクリーニング精度を見ると男性では Adiponectin 3.8  $\mu$ g/ml が感度と特異度が共に 58% で最も精度が高かった。女性では Adiponectin 6.0  $\mu$ g/ml が感度と特異度が 65% で最も精度が高かった。

#### D. 考察

健診を受診した 5,435 例（男性 2,259 例、女性 2,460 例）において Adiponectin の測定が内臓脂肪面積の蓄積を予測できるか検討した。また、Adiponectin は抗動脈硬化作用や糖尿病発症とも関連しており、単に内臓脂肪面積のみならず、生活習慣病予防には極めて有効と思われる。

Adiponectin を 3 分位法で区分して内臓脂肪面積 100cm<sup>2</sup> 以上の比率をみると男性では低群 46.7%、中群 34.9%、高群 20.1% で低値では高値群の 2.3 倍であり、効率的に内臓脂肪面積が把握できると思われる。女性でも同様でそれぞれ 10.0%、4.0%、1.5% で、低値群では 6.7 倍もあって、女性では内臓脂肪面積がもともと少ないが効率的にスクリーニングできると思われる。

男女共に Adiponectin 低群は高群に比し血圧、TG、LDL-C、FPG、HbA1c、IRI、hs CRP が高値、HDL-C が低値であり、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積も有意に大であった。一方、内臓脂肪面積の有意な因子は、男性で TG、総 Adiponectin、年齢、臍周囲径、FPG、IRI であった。女性では TG、HDL-C、総 Adiponectin、年齢、臍周囲径、FPG、IRI、収縮期血圧であった。以上のべたように男女とも Adiponectin は明らかに内臓脂肪面積と有

意な関連が見られている。

リスクファクターの 2 個以上有するものをスクリーニングする精度を Adiponectin 値で検討したところ、男性では 3.8  $\mu$ g/ml、女性では 6  $\mu$ g/ml が最も精度が高く、感度と特異度は男性 58%、女性 65% であった。

Adiponectin 測定は他の生化学検査のために採血したものを活用して 1 滴の血液で可能である。また Adiponectin が低値の症例に対しては糖尿病、動脈硬化性疾患である心筋梗塞、脳梗塞を予防するための生活習慣への介入も可能である。一方、メタボリックシンドロームの基準である臍周囲径の名前は分かり易いが必ずしも内臓脂肪面積と一致するものではなく、臍周囲径と内臓脂肪面積は相関係数 0.65~0.75 の相関を報告している。

Adiponectin 低値群では高値群に比して危険因子を 1 項目以上もつものは男性では 2.3 倍、女性では 5.8 倍も多い。危険因子 0 のものは男性 12.0%、女性は 20% に過ぎない。

#### E. 結論

男性における Adiponectin 3 分位法の低群では半数が内臓脂肪蓄積 100cm<sup>2</sup> 以上であった。女性はメタボリックシンドロームの頻度が低いが、3 分位法の低群、中群、高群の順に有意に高率であった。

Adiponectin 測定は 1 滴の血液で可能であり、内臓脂肪面積との関連が強く、低値群をスクリーニングすることがより多数例について効率的にメタボリックシンドロームをスクリーニングすることが可能と思われる。