

主論文の要旨

Metallothionein *MT2A* A-5G polymorphism as a risk factor for chronic kidney disease and diabetes: Cross-sectional and cohort studies

慢性腎臓病および糖尿病のリスク要因としての
メタロチオネイン *MT2A* A-5G 多型：横断研究とコホート研究

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
社会生命科学講座 予防医学分野

(指導：若井 建志 教授)

服部 雄太

【緒言】

メタロチオネイン (MT) は、カドミウム (Cd) などの有害重金属や酸化ストレスに対する生体内防御因子として、また、細胞内亜鉛 (Zn) の調節因子として重要な役割を果たしていることが知られている。*MT2A* A-5G (rs28366003) は MT のサブタイプ *MT2A* 遺伝子のプロモーター領域の一塩基多型である。*MT2A* タンパク質は酸化ストレスや重金属などの曝露により転写誘導される。細胞レベルでは A アレルと比較し G アレルの転写活性が低く、また、ヒト剖検試料において G アレル保持者の腎臓の Cd レベルが高いことが報告されている。

Cd の主要な慢性毒性は腎毒性であり、Cd はコメなどの食品や喫煙を介して生涯にわたって身体に取り込まれるため、Cd の微量長期曝露による腎機能への影響が懸念されている。また、糖尿病発症への酸化ストレスおよび亜鉛の恒常性の破綻の関与が示唆されている。したがって、Cd や酸化ストレスへの防御能力が低い G アレル保有者での腎機能低下や糖尿病罹患が懸念される。しかしながら、*MT2A* A-5G 多型を検討した研究はいまだなく、他の疾患においても小標本数を対象とした研究にとどまる。

そこで、本研究では *MT2A* A-5G 遺伝子多型が慢性腎臓病 (CKD) と糖尿病リスクに与える影響を検討した。

【対象および方法】

日本多施設共同コホート研究 (J-MICC study) 大幸研究の第二次調査参加者 2,809 名のうち遺伝子解析に同意した 39 - 75 歳の 2,773 名 (うち女性 2,025 名) を解析対象者とした。2008-2010 年のベースライン調査および 2014 年の第二次調査の調査会場にて採血を行った。さらに、自記式質問票にて生活習慣、とくに食事摂取状況と服薬歴、喫煙習慣、飲酒習慣、運動習慣についての情報を得た。

CKD (重症度分類ステージ 3 以上) および糖尿病の有無はそれぞれ日本腎臓学会、日本糖尿病学会のガイドラインの診断基準に従って定義した。統計学的検討では基本的な調整因子として性、年齢、body mass index (BMI) と、さらに各疾患と関連が推測される要因とを共変量としたロジスティック回帰分析を行った。手順として、まず第二次調査時点で横断研究を実施した。さらにベースライン調査時点で CKD、糖尿病 (自己申告有病または服薬者) を有する者を除外したコホート研究で、第二次調査時点での有病状態について解析を行った (図 1)。

MT2A A-5G 多型の遺伝子型は polymerase chain reaction confronting two-pair primers (PCR-CTPP) 法を用いて決定した (図 2)。

また、第二次調査時点の血清試料を用いて *MT2A* A-5G 多型と MT I+II、血清亜鉛および Cd 濃度との関連を一部の標本で検討した。

【結果】

MT2A A-5G の遺伝子多型頻度は AA : AG : GG = 2,268 : 484 : 21 (81.7%, 17.5 %, 0.8 %) であり、Hardy-Weinberg 平衡に従っていた (χ^2 検定: $p=0.26$)。各群の CKD および糖尿

病の有病率 (%) はそれぞれ 15.2, 13.2, 33.3 および 5.4, 8.9, 0.0 であった (Fisher の直接確率法: $p=0.039, 0.011$)。各遺伝子型の群間の年齢 (Kruskal-Wallis 検定: $p=0.999$)、性別 (Fisher の直接確率法: $p=0.68$)、BMI (ANOVA: $p=0.272$) に有意差はなかった。

ロジスティック回帰分析の結果を表 1-4 に示す。CKD のオッズ比 (OR) [95%信頼区間] は AA 遺伝子型を基準群として GG 型で有意となり、第二次調査時の横断研究では 3.98 [1.50, 10.58] (表 1)、5 年間のコホート研究では 5.17 [1.39, 19.28] (表 2) であった。糖尿病については、AA 型を基準群とした GA アレル保有者の OR を算出した。第二次調査時点の横断研究では 1.86 [1.26, 2.75] (表 3)、5 年間のコホート研究では 2.06 [1.21, 3.50] (表 4) であった。

MT2A A-5G 多型と MT I+II (図 3、分散分析 (ANOVA) : $p=0.61$)、血清 Zn (図 4、ANOVA: $p=0.95$) および Cd (図 5、Kruskal-Wallis 検定: $p=0.973$, non-zero 標本) 濃度との関連は見出されなかった。血清 Cd については濃度が低く、1,915 標本中 78.0%の標本が濃度 0 ppb または検出限界未満であった。

【考察】

MT2A A-5G 多型の多型頻度は先行研究と概ね一致していた。GG 遺伝子型が年齢、血圧、糖尿病とは独立して CKD と関連し、GA 遺伝子型は年齢、BMI と独立して糖尿病のリスクと関連することが示唆された。さらに、いずれの疾患でも MT2A A-5G 多型はその他の主要なリスク因子からも独立していた。

MT は Zn や Cd の主要な細胞内調節因子であることから、MT2A A-5G 多型と Zn および Cd 血清中濃度への影響も検討したが、差は見られなかった。しかしながら、GG 型の多型頻度が 1%程度の MT2A A-5G 多型において検討を可能とした本研究の意義は大きい。

MT2A A-5G 多型は 5 つの他の SNP と強い ($r^2>0.9$) 連鎖不平衡にある。しかし、このうち 4 つは遺伝子間領域にあり、残りの 1 つは機能が特定されていない遺伝子のイントロンをコードしている。ここから、MT2A A-5G 多型は独立して効果を示している可能性が示され、本研究の結果を単独で説明しうると考えられる。

本研究の利点は、低い頻度の多型を捉えうる大きな標本数と、Cd に汚染されていない単一地域からの比較的均一な背景を持つ標本抽出である。また、本研究は MT2A A-5G 多型と CKD および糖尿病の関連を初めて報告した研究である。本研究の限界は、低い G アレル頻度と、それに起因する糖尿病での GG 型の症例の欠如と GA 型のみのリスクの解釈である。また、本研究で使用した MT 測定キットは MT-I も同時に検出するため特異性に疑問が残る。しかしながら、MT のアイソフォームの遺伝子の中で MT2 遺伝子が主に発現している遺伝子であることを踏まえ、MT2A A-5G 多型に関わらず血清 MT-I+II は均衡が保たれているか、細胞外への MT の分泌には MT2A A-5G 多型は影響を与えないと考えられる。

【結語】

本研究により、日本人の大規模な集団において、*MT2A* A-5G 多型と、CKD および糖尿病との関連が示された。また、*MT2A* A-5G 多型のリスクアレル保持者では Cd や活性酸素種による影響を受けやすい可能性が示唆された。これらを踏まえ、CKD および糖尿病に対する *MT2A* A-5G 多型のリスク予測因子としての有用性が期待される。