

若年女性の最大骨量獲得に対するカルシウム摂取量と ビタミンD受容体遺伝子多型との交互作用 - 陰膳法 (Duplicate Portion Sampling) を用いて -

新潟大学大学院医歯学総合研究科教授 中村 和利
地域予防医学講座 社会・環境医学分野

要 約

本研究の目的は、日本人若年女性のカルシウム摂取量およびビタミンDの栄養状態とビタミンD受容体遺伝子多型の骨密度に対する交互作用を明らかにし、効果的な骨量増加方法をみいだすことである。ビタミンD受容体遺伝子Apa 1、Taq 1、およびBsm 1の多型を、restriction fragment length polymorphism (RFLP)法により解析した。食事のカルシウム摂取量は3日間の陰膳法を用いて、ビタミンDの栄養状態は血中の25(OH)Dを測定することにより評価した。腰椎正面と大腿骨頸部左側の骨密度をDXA法で測定した。若年成人女性の大腿骨頸部骨密度に対してカルシウム摂取量とApa 1多型およびTaq 1多型の交互作用がみられた。最大骨量をなるべく増やすためAA型、Aa型またはTt型をもつ者は特に十分なカルシウムを摂取すべきである。また、血中25(OH)D濃度はAA型またはBB型をもつ者でより低く、それらの人は十分な量のビタミンDまたはカルシウムを摂取することが望ましい。

キーワード：陰膳法、カルシウム、交互作用、骨密度、若年女性、ビタミンD受容体遺伝子多型

緒 言

骨粗鬆症はADL、QOLの低下および「寝たきり」の重要な原因疾患の一つである。また、骨粗鬆症増加による医療費の増加も予想され、骨粗鬆症予防のための早急な対策が必要とされている。骨粗鬆症の予防は高齢者だけでなく、あらゆる年代において求められる。若年時において最大骨量ができるだけ多く獲得しておくことは骨粗鬆症予防の重要な戦略の一つである。

若年女性にはダイエットが普通にみられ¹⁾、カルシウムをはじめとした栄養の摂取不足が懸念される。そこで著者は若年女性のカルシウム、ビタミンDの栄養状態およびそれらの骨量に及ぼす影響を調査した²⁾。その結果、若年女性のカルシウム、ビタミンDの栄養状態は他の年代の女性より明らかに不良で、最大骨量獲得にも悪影響を与えていることが示唆された。これらの結果より、カルシウム、ビタミンDの低栄養状態の改善を柱とした若年女性への骨量低下予防対策の必要性が強調された。

最大骨量を規定する要因として、食事や運動などの外的要因(環境要因)と同等かそれ以上に遺伝的素因が重要であることが知られている。環境要因と異なり、遺伝的要因をコントロールすることは現時点では不可能である。しかしながら、遺伝的要因の解析を行い、骨粗鬆症のハイリスク群を特

定することができれば、その群に対して健康教育などの介入を行うことが可能であり、効果的な予防対策立案が可能となる。

近年の遺伝子解析技術の進歩により、いくつかの骨粗鬆症関連遺伝子が同定され、それらの多型性が骨量と関連していると報告された。ビタミンD受容体の遺伝子多型は骨粗鬆症関連遺伝子の中で最も代表的なものの一つであり、Morrisonら³⁾が初めて報告して以来、欧米を中心に多くの研究がなされてきた。最近のメタアナリシス^{4, 6)}では、ビタミンD受容体の遺伝子多型は骨量に関連していると結論付けている。

最近著者らは、若年女性を対象に陰膳法を用いてカルシウムをはじめとする栄養摂取状況を調査し、骨密度および骨代謝との関連を検討した。今回は、この対象者における遺伝子多型を解析する機会を得た。本研究の目的は日本人若年女性のカルシウム摂取およびビタミンDの栄養状態とビタミンD受容体の遺伝子多型の骨密度に対する交互作用を明らかにすることである。それにより、個人差を考慮した効果的な骨量増加方法を見いだしたいと考えている。

方 法

対象者

N大学看護学科の2、3年女子学生148人より本研究への参加者を募った。事前に説明会を開催し、本調査研究の趣旨、すなわち、研究目的、研究方法、遺伝子解析を行うこと、もたらされる利益および不利益、個人情報保護、研究成果の公表、研究から生じる知的財産権の帰属、遺伝子解析研究終了後の試料等の取り扱いの方針、研究協力の任意性と撤回の自由、費用負担に関する事項、遺伝カウンセリングについて等を十分説明し、調査への協力を依頼した。148人中、112人が本研究の参加に同意した。インフォームドコンセントは書面で行った。112人中、年齢がはずれ値である2人、および骨代謝に影響を与える治療薬を服用中の者2人を分析から除外し、最終的に108人を統計解析の対象とした。医学的検査として採血、骨密度測定、採尿を行った。採血、採尿（第2尿）は午前中の8時から10時の間に空腹状態で行った。

DNA解析

ビタミンD受容体遺伝子の3' regionの多型、すなわち、Apa 1、Taq 1、およびBsm 1の多型を、制限酵素を用いたrestriction fragment length polymorphism (RFLP) 法により解析した。末梢血より採取された白血球よりDNA Extractor WB-Rapid Kit (和光純薬工業) を用いて、DNAを抽出した。Apa 1およびTaq 1多型解析のため、forwardプライマー5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3'およびbackwardプライマー5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いてpolymerase chain reaction (PCR) によるDNAの増幅を行った。PCR用に、蒸留水 14.4 μ L、10倍バッファー 2 μ L、dNTPS 2 μ L、2種のプライマー液をそれぞれ0.2 μ g、Taq酵素 (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems) 0.2 μ L、およびDNA液 1 μ Lを

混合し、95 で2分間維持した後、95 30秒、60 45秒、72 60秒の一連の過程を35繰り返し、最後に72 で7分間維持した。Bsm 1多型解析のためのDNA増幅用にはforwardプライマーとして5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3'、backwardプライマーは5'-AACCGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3'を使用し、Apa 1およびTaq 1と同様な試薬を用いて、94 で2分間維持した後、94 20秒、62 40秒、72 60秒の一連の過程を35回繰り返し、最後に72 で6分間維持した。

次に、蒸留水16.3 μ L、RE10倍バッファ-2 μ L、Acetylated BSA 0.2 μ L、Apa 1制限酵素 (Promega, USA) 0.5 μ L、およびPCR産物1 μ Lを混和し37 で4時間インキュベートした。得られたものを2%アガロースゲルで電気泳動し、ethidium bromide染色を行った。Apa 1の消化により、3種類のバンド740 bp、530 bp、または210 bpが出現し(図1)、次の3つの遺伝子型AA (740 bp)、Aa (740, 530, 210 bp)、aa (530, 210 bp)のいずれかが判別された。Taq 1多型の解析には、Taq 1制限酵素 (Promega, USA) を用いることと、およびインキュベートの温度が65 であることを除いて、Apa 1の消化と同様の過程を経た。Taq 1の消化により、4種類のバンド495 bp、290 bp、245 bp、または205 bpが出現し(図2)、次の3つの遺伝子型TT (495, 245 bp)、Tt (495, 290, 245, 205 bp)、tt (290, 245, 205 bp)のいずれかが判別された。Bsm 1多型解析には、蒸留水6 μ L、NEバッファ-2 1 μ L、Bsm 1制限酵素 (New England BioLabs, USA) 1 μ L、およびPCR産物1 μ Lを混和し65 で1時間インキュベートした。Bsm 1の消化により、3種類のバンド825 bp、650 bp、または175 bpが出現し(図3)、次の3つの遺伝子型BB (825 bp)、Bb (825, 650, 175 bp)、bb (650, 175 bp)のいずれかが判別された。

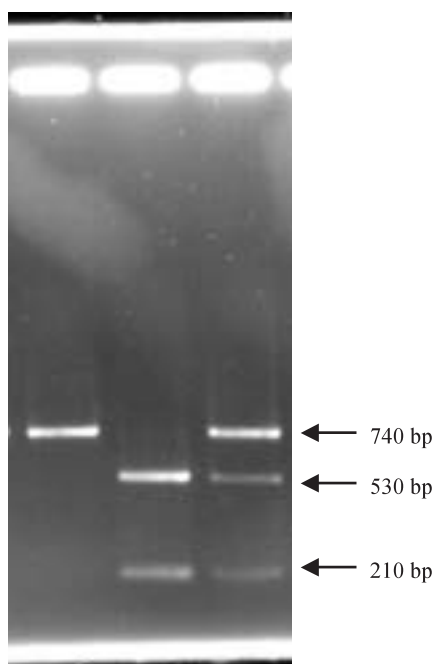


図 1

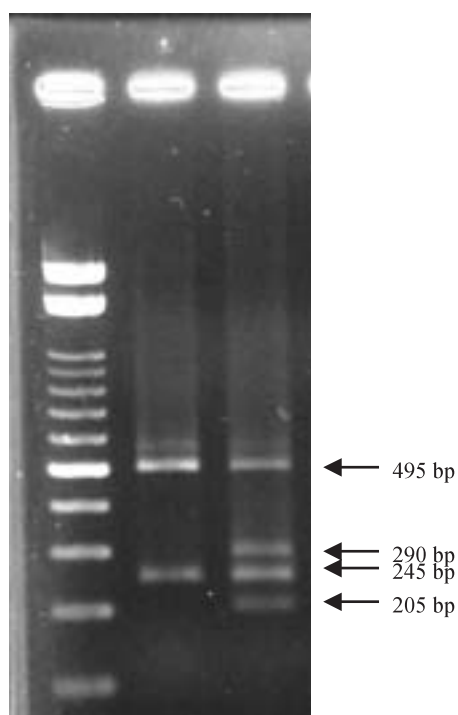


図 2

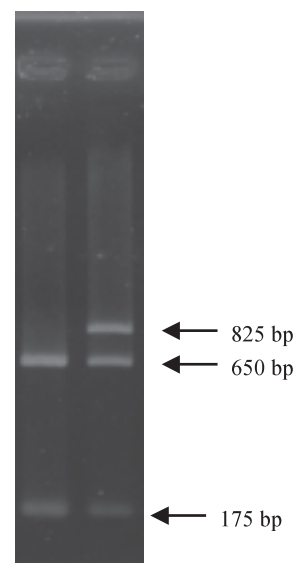


図 3

食事調査

食事調査は陰膳法duplicate portion samplingにより行った。検査日の前日から3日間全ての食事を持参し提供してもらった。食事試料はミキサーで粉碎攪拌し、その中のミネラル(Ca、P)を原子吸光光度法で、タンパク質をセミマイクロケルダール法で測定した。

骨量測定

腰椎正面と大腿骨頸部左側の骨塩量および骨密度をDXA法(Hologic 2000, MediTech A/S, Rødovre, Denmark)で測定した。その他身長、体重、握力を測定した。

血液検査

血清中のCa代謝関連ホルモンとして25-hydroxyvitamin D3(25(OH)D3、HPLC法)、1,25-dihydroxyvitamin D3(1,25(OH)2D3、RIA法)、副甲状腺ホルモン(intact PTH、IRMA法)を測定した。骨代謝(骨形成)マーカーに関しては、オステオカルシン(OC、IRMA法)、骨型アルカリフォスファターゼ(Bone ALP、EIA法)を測定した。尿中の骨代謝(骨吸収)マーカーに関しては、デオキシピリジノリン(DPD、EIAマイクロプレート法)とI型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTX-I、ELISA法)を測定した。また尿中の電解質は、Ca(MXB法)を測定した。尿中物質の濃度は、尿中クレアチニン濃度で補正した。

その他

基本属性、既往歴、月経周期、ライフスタイル・運動量の評価には面接にて聞き取り調査を行った。現在の運動量は、行った運動の強度・時間・頻度よりMETSインデックス(安静時代謝量を1としたときの倍数)を算出することにより評価した。

統計

遺伝子型の違いによる諸変数の平均値の差の検定には分散分析(ANOVA)を用い、そのうち任意の2つの差の検定にはBonferroniの多重比較を用いた。連続変数は正規分布となるような変換あるいははずれ値の除外を行った。カルシウム摂取量と遺伝子多型の交互作用を調べるため、カルシウム摂取量と遺伝子多型の積からなる変数を新たに作成し、その変数の有意性を検定した。遺伝子多型の変数として、Apa 1多型は3つの変数Apa_aa(1:aaなし, 2:aaあり)、Apa_Aa(1:Aaなし, 2:Aaあり)、Apa_AA(1:AAなし, 2:AAあり)、Taq 1多型は1つの変数Taq_(1:Tt, 2:TT)、Bsm 1多型は3つの変数Bsm_bb(1:bbなし, 2:bbあり)、Bsm_Bb(1:Bbなし, 2:Bbあり)、Bsm_BB(1:BBなし, 2:BBあり)を用いた。

結果

対象者108名の特徴を表1に示した。Apa 1、Taq 1およびBsm 1の多型における各遺伝子型の発現頻度を表2に示した。Taq 1多型におけるtt型はみられなかった。

各遺伝子多型における遺伝子型別の年齢、身体的特徴、栄養摂取量、血液・尿検査値、骨量の平均値を表3-5に示した。Apa 1多型については、Aa群でカルシウム、リン、タンパク質の摂取量が多い傾向にあった。血中25(OH)D3濃度について、AA群における濃度がAa群、aa群より有意に低かった。aa群の尿中カルシウムはAA、Aa群より有意に高かった。腰椎および大腿骨頸部の骨密度に関しては、3群に有意な差はみられなかった。Taq 1多型については、Ti群とTT群の尿中カルシウムに差がみられた以外は、他に有意な差はみられなかった。Bsm 1多型については、BB群の血中25(OH)D3濃度がBb群、bb群より有意に低かった。また、bb群の尿中カルシウムはBb群より有意に高かった。

カルシウム摂取量と各遺伝子多型の交互作用の変数と骨密度との関連を調べるため、単回帰分析を行った。その結果有意な変数は大腿骨頸部骨密度におけるApa_aa ($p=0.0219$)とTaq_ ($p=0.0266$)であった。これらの結果を視覚的に理解するため、Apa 1多型について、aa群とAAまたはAa群に分けた場合のカルシウム摂取量と大腿骨頸部骨密度の関連性を図4に示した。aa群においては回帰直線の傾きが小さい(傾きは有意でない)が、AAまたはAa群においては傾きがより大きかった。これ

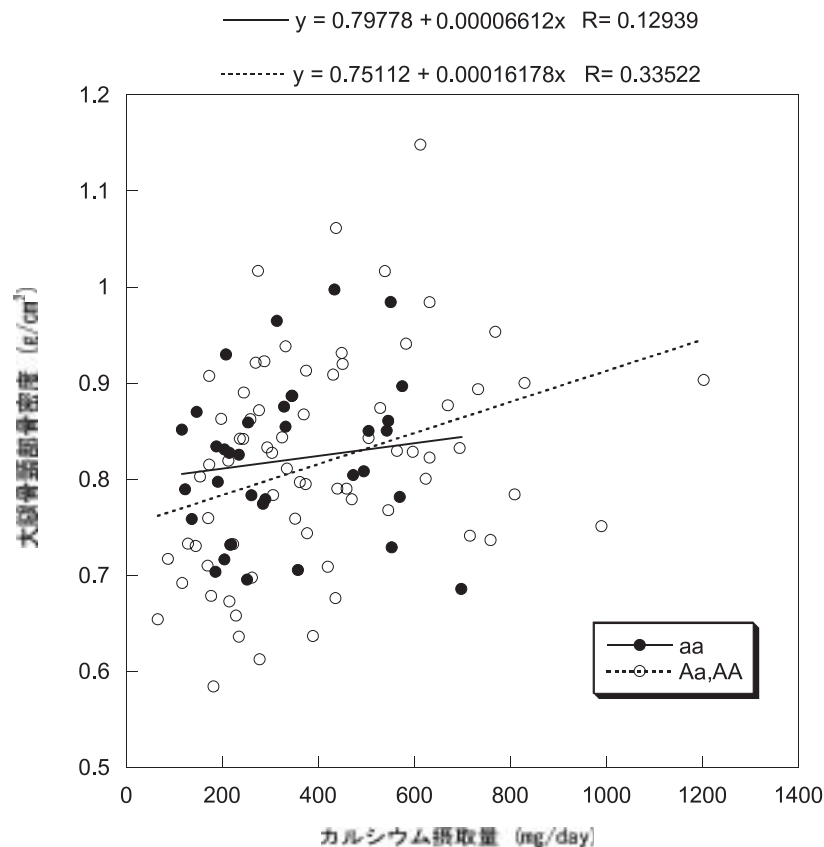


図4

はAAおよびAa群においてカルシウム摂取量が大腿骨頸部骨密度により強く関連していると解釈できる。Taq 1多型においても同様であり、Tt群における回帰直線の傾きがTT群より大きかった(図5)。

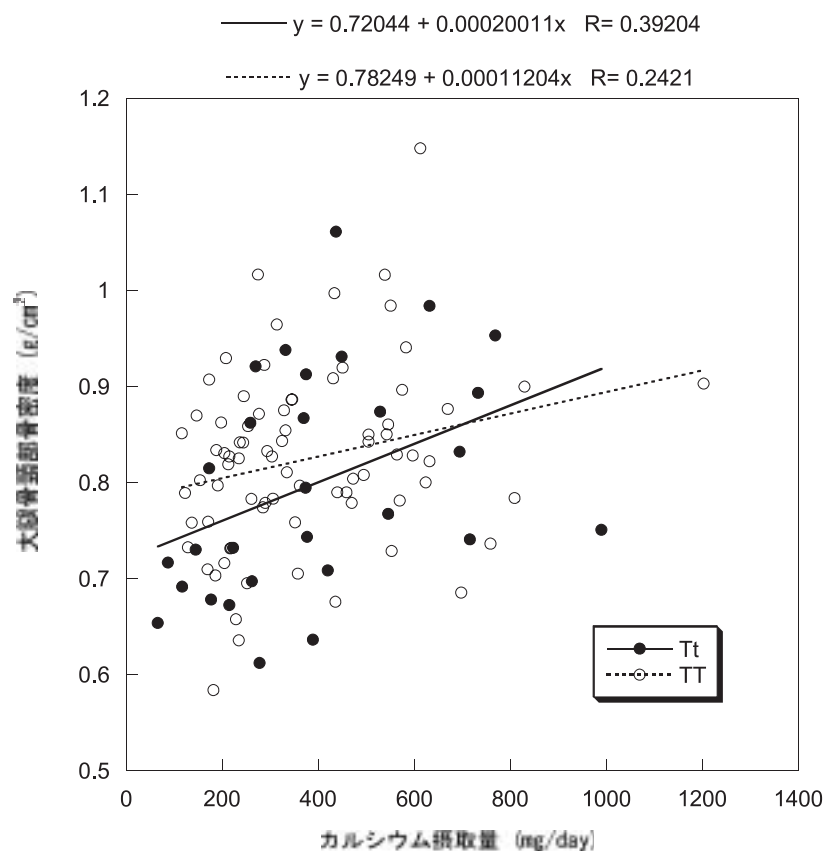


図5

考 察

本研究におけるビタミンD受容体遺伝子多型における遺伝子型の発現頻度は過去に日本人を対象とした研究^{7,8)}と比較すると、Apa 1多型におけるaa型の頻度がやや少ない。しかしながら、他の頻度は過去の報告と比較しほぼ等しい。

ビタミンD受容体遺伝子多型と骨量の関連性についてはMorrisonら³⁾が初めて報告して以来、欧米を中心に多くの追試研究がなされてきた。その後、ビタミンD受容体遺伝子多型の骨密度への影響は当初よりはかなり小さいとの見解が一般的であるが、最近のメタアナリシスの論文はビタミンD受容体遺伝子多型と骨密度との関連性あり、すなわちA、t、Bアレルが低骨密度と関連するとの仮説を支持している^{4,6)}。本研究では、ビタミンD受容体遺伝子3' region多型と腰椎または大腿骨頸部の骨密度との関連はみいだせなかった。最近行われた日本人における若年女性を対象とした研究^{7,8)}や、大規模なpopulation-basedの疫学研究⁹⁾においても本研究と同様な結果であった。本研究は比較的均質な20歳前後の成人女性を対象に行った点で優れており、3' region多型と骨密度の明らかな関連性の存在を支持しない。

Krallら¹⁰⁾は、高齢者女性の骨量に対するカルシウム摂取量とビタミンD受容体遺伝子Bsm 1多型の交互作用について言及した。彼らは、カルシウムサプリメントを受けていないBB型の閉経後女性の骨密度の低下が約-2%と大きかったのに対し、カルシウムサプリメントを受けているBB型の者およびbb、Bb型では骨密度の低下がほとんどみられないことを報告した。本研究におけるカルシウム摂取量とApa 1多型およびTaq 1多型の交互作用の結果は基本的にはKrallらの結果と同質のものであると考えられる。本研究は若年女性の大腿骨頸部骨密度、すなわち最大骨量獲得におけるビタミンD受容体遺伝子多型の重要性をみいだした。AA型、Aa型およびTt型の若年女性にとって、最大骨量をできるだけ多く獲得することを期待する場合、カルシウム摂取増加が特に重要であるといえる。

本研究におけるもう一つの注目すべき所見は血中25(OH)DとビタミンD受容体遺伝子多型との関連である。血中25(OH)DはAA型およびBB型で有意に低値であった。一般にビタミンDの栄養状態の指標と考えられている血中25(OH)Dは皮膚での産生量またはビタミンDの摂取量により決定され¹¹⁾、腸管でのカルシウム吸収を促進する¹²⁾。ところが、著者らは以前血中25(OH)D濃度には環境または栄養要因以外の個人差が存在する事実を報告しており¹³⁾、本研究によりその個人差が遺伝要因である可能性が示唆された。AA型、BB型の血中25(OH)D濃度が低いとすれば、それらの遺伝子型をもつ人は腸管でのカルシウム吸収率がより低く、良好なカルシウムの栄養状態を保つには不利といえる。また、他の研究でAA型、BB型で骨密度が低いとする報告とも矛盾しない。AA型、BB型の尿中カルシウムが少ないという結果は、尿中へのカルシウム排泄を低下させることで(血中25(OH)D濃度低値による)低カルシウム摂取率を補っていると解釈できる。以上より、AA型またはBB型には、サプリメントなどでビタミンDの栄養状態を改善するか、またはカルシウムの摂取量を増やすことが効果的であると考えられる。

本研究の特徴は比較的信頼性の高い方法で食事からの栄養摂取量を評価した点である。しかしながら、本研究にはいくつかの限界が存在する。第一にサンプルサイズが十分に大きくない点である。これにより、今回の陽性所見以外の弱い関連性をみいだせなかった可能性がある。第二に統計解析において、多くの検定を行ったことである。これにより、今回の陽性所見は偶然有意差としてみいだされた可能性がある。これらの限界を克服するため、より大きな規模での疫学研究を重ね、メタアナリシスなどを行う必要がある。

結 論

本研究はビタミンD受容体3'regionの多型性、カルシウムまたはビタミンDの栄養、および骨密度の関連性を調査し、以下の結論を得た¹⁾。若年成人女性の大腿骨頸部骨密度に対してカルシウム摂取量とApa 1多型およびTaq 1多型の交互作用がみいだされた、すなわち最大骨量をなるべく増やすためAA型、Aa型またはTt型をもつ者は特に十分なカルシウムを摂取する必要がある²⁾。若年成人女性の血中25(OH)D濃度はAA型またはBB型をもつ者でより低く、それらの人は十分な量のビタミ

ンDまたはカルシウムを摂取することが望ましい。

引用文献

- 1) Nakamura K, Hoshino Y, Watanabe A, Honda K, Niwa S, Yamamoto M. Eating problems and related weight control behaviour in Japanese adult women. *Psychother Psychosom* 1999;68:51-55.
- 1) 中村和利 . 若年女性のカルシウム及びビタミンD摂取量と骨密度の関連について 陰膳法 (Duplicate Portion Sampling) を用いて . 平成14年度牛乳学術研究会委託研究費による研究報告書.
- 3) Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367:284-7.
- 4) Gong G, Stern HS, Cheng SC, Fong N, Mordeson J, Deng HW, Recker RR. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Osteoporos Int* 1999;9:55-64.
- 5) Thakkestian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res.* 2004;19:419-28.
- 6) Thakkestian A, D'Este C, Attia J. Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2004;15:729-34.
- 7) Kitagawa I, Kitagawa Y, Nagaya T, Tokudome S. Interplay of physical activity and vitamin D receptor gene polymorphism on bone mineral density. *J Epidemiol* 2001;11:229-32.
- 8) Katsumata K, Nishizawa K, Unno A, Fujita Y, Tokita A. Association of gene polymorphisms and bone density in Japanese girls. *J Bone Miner Metab* 2002;20:164-9.
- 9) Morita A, Iki M, Dohi Y, Ikeda Y, Kagamimori S, Kagawa Y, Matsuzaki T, Yoneshima H, Marumo F; JPOS Study Group. Prediction of bone mineral density from vitamin D receptor polymorphisms is uncertain in representative samples of Japanese Women. The Japanese Population- based Osteoporosis (JPOS) Study. *Int J Epidemiol* 2004;33:979-88.
- 10) Krall EA, Parry P, Lichter JB, Dawson-Hughes B. Vitamin D receptor alleles and rates of bone loss: influences of years since menopause and calcium intake. *J Bone Miner Res.* 1995;10:978-84.
- 11) 中村和利 . 骨粗鬆症の予防医学的研究 : 地域住民のビタミンD低下症について . 新潟医学会雑誌 2004;118:501-6.
- 12) Devine A, Wilson SG, Dick IM, Prince RL. Effects of vitamin D metabolites on intestinal calcium absorption and bone turnover in elderly women. *Am J Clin Nutr* 2002;75:283-8.

13) Nakamura K, Nashimoto M, Yamamoto M. Summer/winter difference in the serum 25-hydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone levels of Japanese women. Int J Biometeorol 2000;44:186-9.

図 1 Apa 1の消化によるPCR産物の電気泳動の例。左からAA型、aa型、Aa型。

図 2 Taq 1の消化によるPCR産物の電気泳動の例。左はTT型、右はTt型。

図 3 Bsm 1の消化によるPCR産物の電気泳動の例。左はbb型、右はBb型。

図 4 Apa 1多型のaa群とAAまたはAa群の2群に分けた場合のカルシウム摂取量と大腿骨頸部骨密度との関連性。AAまたはAa群においてカルシウム摂取量が大腿骨頸部骨密度により強く関連している。

図 5 Taq 1多型のTt群とTT群の2群に分けた場合のカルシウム摂取量と大腿骨頸部骨密度との関連性。Tt群においてカルシウム摂取量が大腿骨頸部骨密度により強く関連している。