

平成 28 年 1 月 27 日

＜研究課題＞ 一過性の有酸素運動が高齢者の遺伝子修復酵素 OGG1 の DNA メチル化と発現量に及ぼす影響

代表研究者 佐賀大学医学部社会医学講座予防医学分野 講師 西田 裕一郎

【まとめ】

本研究では、65 歳以上の健常高齢者 36 名を対象として、心音を用いて判定した無酸素性代謝閾値に相当する有酸素運動（ステップ台昇降運動）を 15 分間行い、その一過性の適度な運動が白血球の OGG1 遺伝子と PYCARD 遺伝子のメチル化に及ぼす影響を調査した。その結果、15 分という短時間の軽強度のステップ台昇降運動により OGG1 遺伝子と PYCARD 遺伝子のメチル化レベルが増加する可能性が示唆された。

1. 研究の目的

1-1 研究目的と遺伝子発現制御における DNA メチル化の役割

本研究は、健常高齢者を対象として、適度の有酸素運動が、末梢白血球の遺伝子修復酵素 OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1) と炎症関連遺伝子 PYD and CARD domain containing (PYCARD) の DNA メチル化レベルに及ぼす影響を調査することを目的として実施した。

DNA のメチル化は、遺伝子の発現量を調節するエピジェネティックな遺伝子発現機構の 1 つである。基本的には、プロモーター部位など DNA の遺伝子発現調節領域のメチル化が増加すると（シトシン塩基にメチル基が付加される）その遺伝子の転写が抑制され、発現量が減少する。一方、メチル化が減少すると遺伝子発現は増加する。

1-2 OGG1 遺伝子と PYCARD 遺伝子の機能

白血球を含む全ての細胞は酸素を消費して ATP を産生し、ATP に含有するエネルギーを利用してそれぞれの細胞の役割を果たしている。しかし、酸素消費に伴って生じる活性酸素により、生命の設計図としての DNA が常に損傷（酸化ダメージ）を受けている。DNA の構造上、4 つの塩基のうちグアニンが酸化ダメージを受けやすく、傷ついたグアニンは

修復されずに放置されるとグアニンからチミンへの遺伝子変異が起きやすい。遺伝子変異が起ると、遺伝子の発現量が正常でなくなったり、または、正常な蛋白が産生できなくなる場合が考えられる。OGG1 は、酸化ダメージを受けたグアニン塩基を正常のグアニンに戻すはたらきをもつ重要な遺伝子修復酵素であり、この遺伝子の高メチル化はその発現の低下により、遺伝子修復の低下につながる可能性がある。加えて、PYCARD は OGG1 と同様に白血球で発現する遺伝子であり、TNF- α や IL-1 β などの炎症性物質（炎症性サイトカインと呼ばれる）の白血球細胞からの産生・放出を促す働きをもつことが知られている。PYCARD 遺伝子のメチル化レベルが増加すれば、この遺伝子の発現低下が引き起こされ、炎症状態の低下につながると考えられる。

1-3 OGG1/PYCARD 遺伝子のメチル化と加齢、運動

OGG1 遺伝子と PYCARD 遺伝子の発現量は、それらの遺伝子の upstream に位置する遺伝子発現調節領域のメチル化により制御されることが知られている。従来、DNA のメチル化は子孫細胞にも受け継がれることから一過性の環境刺激（一回の運動など）で短時間に変化するものではないと一般的に考えられていたが、最近、骨格筋遺伝子のメチル化が 20 分という短時間の一過性の運動で変化することが報告された (Barres et al, Cell Metabolism, 2012)。一過性の運動が DNA メチル化に及ぼす影響についての研究は国際的にみても未だ緒についたばかりである。

白血球 OGG1/PYCARD 遺伝子のメチル化レベルが加齢の影響を受けることが報告されており (Madrigano et al, Epigenetics, 2012; Nakajima et al, Int J Sports Med, 2010)、PYCARD 遺伝子のメチル化については高齢者を対象としたトレーニング研究（運動の慢性効果に関する研究）が報告されている

が (Nakajima et al, Int J Sports Med, 2010)、これまでに運動の急性効果に関する研究は報告されていない。

無酸素性代謝閾値は、無酸素的なエネルギー供給に頼ることなく長時間楽に行うことができる運動強度である。平明にいうと、息が荒くなる一歩手前の(ゼーゼーハーハーしない)高齢者でも容易に行うことができる軽い有酸素運動である。代表研究者は、これまでの研究の蓄積から、無酸素性代謝閾値に相当する適度の有酸素運動が高齢者の介護予防と生活習慣病予防、さらにはアンチエイジングに最適であると考えている。綾部らにより開発されたステップ台を用いた体力測定 (Ayabe et al, Int J Sport Health Sci, 2003) を行えば、体力の低下した高齢者でも無酸素性代謝閾値の判定が可能であり、ステップ台さえ準備すれば、自宅で天候に関わらず、いつでも好きな時に、安全かつ効果的な運動トレーニングを行うことができる。加えて、ステップ台は固定式自転車エルゴメータやドレッドミルよりも小型で安価であり、高齢者のための在宅での運動習慣の形成に非常に有用性が高い。

本研究では高齢者を対象として、先行研究により加齢に関連すると報告されている白血球の OGG1/PYCARD 遺伝子のメチル化レベルが、一過性の適度な有酸素運動(ステップ台昇降)により変化するかどうかを調査することを主な目的とした。

2. 研究の方法と経過

2-1 対象とステップ台を使用した体力測定

65歳以上の健常高齢者36名(男性8名、女性28名)が本研究に被験者として参加した。血圧測定と身長、体重などの身体計測の後、ステップ台を用いた運動負荷テストを実施した。ステップ台の高さを15センチに設定し、徐々にテンポを上げることにより運動強度を漸増した (Ayabe et al, Int J Sport Health Sci, 2003)。運動負荷テストを実施する前に、心音測定のために胸部に心音測定用のマイクを装着した。各運動負荷ステージ(各テンポ)の継続時間は2分間とし、後半の1分間(1~2分の間)に心拍数を測定した。主観的運動強度(ボルグスケールを使用)と心音は、各運動負荷の運動終了直後に測定した。心音測定中は、心音以外の外部音がマイクに入ら

ないようにするために10秒間立位で静止した。田中らにより最近開発された心音を用いた方法により非観血的に無酸素性代謝閾値を決定した (Tanaka et al, Circ J, 2013)。この方法により判定された無酸素性代謝閾値を次の固定負荷運動(別の日に実施)の運動強度として用いた。

2-2 無酸素性代謝閾値に相当する固定負荷運動と運動前後における血液サンプル採取

上述の体力測定の影響を最小限にするために、体力測定の実施日から少なくとも5日間あけて固定負荷運動を実施した。被験者は、1分間に80回のテンポで、各々の無酸素性代謝閾値に相当する台高を使用して(すなわち、テンポは全被験者で同一だが[80回/分]、ステップ台の台高を各々の体力レベルに応じて調整した)、ステップ台昇降運動を15分間行い、運動前と運動直後に採血を行った。採取された血液は遠心分離後、DNAメチル化レベルの解析のためのバフィーコート(末梢白血球の分画)と血清・血漿を収集し、超低温槽(マイナス80度)で保存した。被験者の特性を調べるために、運動前に採取された血液の血清・血漿を使用して、一般的な血液検査(血糖、中性脂肪、HDLコレステロール、LDLコレステロール、尿酸値、高感度CRP[SRLに外注])を行った。

2-3 末梢血白血球OGG1/PYCARD遺伝子のメチル化状態の評価

先ず、バフィーコート(白血球分画)からDNAを抽出し、バイファルサイト処理を行った。この処理を行うとメチル化されていないシトシン塩基はウラシルに変換され、メチル化されているシトシンは変換されずシトシンのまま変化しないので、シトシンがメチル化されているか否かが塩基の配列の違いとして判別できるようになる。このDNAの化学的処理を行った後、OGG1/PYCARD遺伝子の発現調節領域を増幅するために設計したプライマーを用いてPCRを行い、PCR産物の塩基配列をパイロシーケエンシング法により決定することでDNAのメチル化を定量した。採取したDNA試料の測定を行う前に、メチル化率が既知の標準品を使用したバリデーション実験を行い、その結果250 ng以上のDNA量を使用すればDNAメチル化の正確な測定が出来

ることが確認できたので ($r^2 = 0.99$ 、傾き0.7以上を基準とした)、本研究のDNAサンプルのメチル化解析には250 ng以上のDNA量を使用した。OGG1遺伝子に関しては8か所のCpGサイト、PYCARD遺伝子に関しては7か所のCpGサイトのメチル化レベルを測定した。このようにバイファルサイト処理を行い、その後にパイロシークエンシングを実施してメチル化を評価する手法は、メチル化解析のゴールドスタンダードとされている。運動前と運動後のメチル化レベルの統計的比較には、ウィルコクソンの符号順位検定を使用した。本研究は、佐賀大学医学部研究倫理委員会の承認を得た後、全被験者から書面で同意を得た上で実施した。

3. 研究の成果

3-1 研究参加者の特徴

本研究に参加した高齢者の身体的・血液生化学的特徴を下の表1に示した。

表 1. 被検者特性

n	36
性別	男性 8名/女性 28名
身長 (cm)	154 ± 6.3
体重 (kg)	54.7 ± 6.7
BMI (kg/m ²)	23.0 ± 2.5
収縮期血圧 (mmHg)	141 ± 20
拡張期血圧 (mmHg)	79 ± 11
空腹時血糖 (mg/dL)	99 ± 10
中性脂肪 (mg/dL)	100 ± 45
HDL-C (mg/dL)	80 ± 17
LDL-C (mg/dL)	123 ± 26
尿酸 (mg/dL)	5.0 ± 1.0
高感度CRP (ng/mL)	555 ± 576
無酸素性代謝閾値 (メッツ)	4.3 ± 0.3
平均値 ± 標準偏差	

表1に示されたように、本研究に参加した高齢者は、一般的な健常高齢者と同様の身体的・血液生化学的特徴をもつことを確認した。心音を用いて評価した無酸素性代謝閾値も、4.3メッツと高齢者としては平均的な値を示

した。

3-2 無酸素性代謝閾値に相当する運動前後の OGG1 遺伝子のメチル化の変化 (表 2)

表 2. OGG1遺伝子メチル化の運動前後の比較

CpGサイト	運動前 (%)	運動後 (%)
1	1.48 ± 0.27	1.50 ± 0.72
2	1.86 ± 0.45	2.02 ± 0.70
3	3.02 ± 0.83	3.61 ± 1.89*
4	0.60 ± 0.32	0.66 ± 0.38
5	2.31 ± 0.79	2.61 ± 1.07
6	0.56 ± 0.22	0.65 ± 0.20
7	1.46 ± 0.38	1.54 ± 0.53
8	1.27 ± 0.27	1.42 ± 0.41
8つの平均	1.57 ± 0.24	1.75 ± 0.54

平均値 ± 標準偏差を示す。*運動前後で比較して統計的に有意

表2に、OGG1遺伝子の測定された8か所のCpGサイトのメチル化率を示した。全体としては、統計的に有意に到達しなかったものの平均値(8つのCpGサイトの平均)が増加する傾向があった ($P < 0.1$)。それぞれのCpGサイトを個別にみても、3番目のCpGサイト(CpGサイト3)では運動後に統計的に有意に増加しており、同様に、CpGサイト8でも増加傾向が認められた ($P < 0.1$)。

3-2 無酸素性代謝閾値に相当する運動前後の PYCARD 遺伝子のメチル化の変化 (表 3)

表 3. PYCARD遺伝子メチル化の運動前後の比較

CpGサイト	運動前 (%)	運動後 (%)
1	0.88 ± 0.33	0.94 ± 0.25
2	0.86 ± 0.26	1.00 ± 0.37
3	0.86 ± 0.32	0.83 ± 0.31
4	0.82 ± 0.41	0.84 ± 0.28
5	0.56 ± 0.22	0.71 ± 0.29*
6	0.64 ± 0.28	0.63 ± 0.30
7	1.99 ± 0.31	2.00 ± 0.39
7つの平均	0.94 ± 0.18	0.99 ± 0.22

平均値 ± 標準偏差を示す。*運動前後で比較して統計的に有意

表 3 に、PYCARD 遺伝子の測定された 7 か所の CpG サイトのメチル化率を示した。OGG1 遺伝子の結果と同様に、全体として平均値 (7 つの CpG サイトの平均) が増加する傾向が認められた ($P < 0.1$)。それぞれの CpG サイトを個別にみても、5 番目の CpG サイト (CpG サイト 5) では運動後に統計的に有意に増加していた。

本研究は高齢者を対象として、一過性の適度な有酸素運動が加齢関連の 2 つの白血球遺伝子 (OGG1/PYCARD) のメチル化レベルを増加させる可能性を初めて示した研究である。

OGG1 遺伝子のメチル化に関しては、研究開始の時点では、一過性の運動後に低下する (メチル化レベルの低下により OGG1 遺伝子が誘導され、それが遺伝子に修復につながる) と予想していたが、当初の予想と逆の結果となった。適度な有酸素運動により、DNA の損傷を引き起こす活性酸素を消去する機能をもつ複数の遺伝子が、誘導されることが報告されている。よって、一過性の運動により活性酸素を消去する機能をもつ遺伝子群が活性化し DNA 損傷を修復する必要性が減少したために、OGG1 遺伝子のメチル化レベルが増加したのではないかと推察している。

OGG1 遺伝子のメチル化の結果と同様に、もう一つの加齢関連遺伝子である PYCARD のメチル化レベルも一過性の運動後に増加した。本研究で観察された急性運動の効果は、6 ヶ月間のインターバルウォーキング (長期にわたるトレーニング) により高齢者の PYCARD 遺伝子のメチル化が増加したとの先行研究 (Nakajima et al, Int J Sports Med, 2010) と同じ方向 (すなわち、増加) の変化である。研究の目的で述べたように、PYCARD 遺伝子は TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの白血球からの放出を促すはたらきをもつ。高齢者において TNF- α や IL-1 β などの血中炎症物質が増加しているとの報告があり、その血中炎症物質の増加が、糖尿病や動脈硬化性疾患、認知症の発症につながると考えられている。本研究により、わずか 15 分という短時間の無酸素性代謝閾値に相当する適度の運動が、炎症促進遺伝子である PYCARD の遺伝子発現調節領域にメチル基を付加する (それにより遺伝子発現を抑制する) 生理学的刺激となっている可能性が示唆

された。

4. 今後の課題

本研究で運動直後に観察された OGG1/PYCARD 遺伝子のメチル化の増加に引き続いて、例えば運動終了の数時間後に、これら 2 つの遺伝子の発現が抑制されると想定される。しかし、今回の研究では遺伝子発現量 (mRNA) や蛋白量の変化が本当に引き起こされているかどうかという点までは追求できなかったため、今後の課題としたい。加えて、喫煙や飲酒習慣の有無、炎症状態 (高感度 CRP 濃度レベル) が遺伝子損傷の程度や炎症レベルに関わっている可能性があり、それらの生活習慣や炎症状態の違いにより OGG1/PYCARD 遺伝子のメチル化状態に対する運動効果が異なるかどうかという点 (すなわち、交互作用の有無) についても、今後検討していく価値があると考えている。

5. 研究成果の公表方法

平成 28 年 9 月に岩手で開催される第 71 回日本体力医学会大会で発表し、国際医学ジャーナル (候補としては *International Journal of Sports Medicine* 誌) に英文論文として出版する予定である。

以上