

日本人における
メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型と
アルコール依存症との関連研究

2022年7月

麻布大学大学院 環境保健学研究科
環境保健科学専攻 博士後期課程
精神機能学

永谷（沼尻）真貴

Association between MTHFR haplotype
and alcohol dependence in Japanese

July 2022

Nagatani (Numajiri) Maki

Laboratory of Physiology,
Graduate School of Environmental Health Sciences,
Azabu University

目次

要旨	1
英文要旨	5
論文	13
日本人におけるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型と アルコール依存症との関連研究	
出典	22
謝辞	23

要旨

【はじめに】

アルコール依存症は、アルコールに対する身体的及び心理的依存の薬物中毒の一形態である。また、多因子遺伝によって引き起こされる可能性もあり、50%～60%の遺伝率を有すると考えられている。

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) は、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸の5-メチルテトラヒドロ葉酸への不可逆的な還元を触媒し、ホモシステインからメチオニンへのメチル化に有用な役割を果たす。MTHFR 遺伝子の欠損による DNA メチル化の異常は、遺伝子調節に影響を与える可能性があり、脳のドーパミン作動性神経伝達システムを変化させ、認知行動と依存症に影響を与えることが知られている。このことから MTHFR 遺伝子変異はアルコール依存症の発生に間接的に影響を与える可能性があると考えられている。MTHFR 遺伝子は染色体 1p36.3 に存在し、MTHFR 遺伝子多型としてエクソン 4 に位置する C677T (rs1801133) やエクソン 7 に位置する A1298C

(rs1801131) が知られている。MTHFR 遺伝子多型 C677T の T allele 頻度は男性のアルコール依存症患者において、有意に高いことが報告されており MTHFR 遺伝子上に位置する一塩基多型 (SNP) が本疾患発症の脆弱性に関与する可能性がある。これまでに C677T とアルコール依存症との関連性についての検討は日本人を対象とした研究は行われていない。また、A1298C との関連性については他集団においても検討されていない。

本研究では、アルコール依存形成の遺伝子要因解明の一助として、MTHFR 遺伝子多型頻度をアルコール依存症患者群と健常者群間で比較し、ハプロタイプ解析も行い検討した。

さらに MTHFR 遺伝子多型の影響についてより詳細に検討するため、アルコール代謝が強く依存症になりやすいといわれる ALDH2*1/*1 を有するアルコール依存症患者群及び健常者群間の比較解析も行った。

【対象と方法】

書面においてインフォームド・コンセントの得られた DSM-IV の診断基準において精神保健指定医によりアルコール依存症と診断されたアルコール依存症患者 64 人 (男性 57 人 ; 女性 7 人)、アルコール依存経歴または家族歴のない健常者 73 人 (男性 22 人 ; 女性 51 人) を対象とした。これらの対象者から採血を行い、指定された管理者におい

て匿名化を行った。患者群の発症時の年齢と健常者群の年齢で有意差はなかった。本研究は麻布大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得て行った。

ゲノム DNA は、フェノール・クロロホルム法により抽出・精製し、*MTHFR* 遺伝子多型 C677T、A1298C の解析は、Frosst ら、Weisberg らの方法に従い Polymorphism Chain Reaction (PCR) - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法により、それぞれ制限酵素 *Hinf*I (New England BioLabs)、*Mbo* II (New England BioLabs) を用いて行った。*ALDH2* 遺伝子多型の解析は、Wu らの方法に従い PCR-RFLP 法により制限酵素 *Mbo* II (New England BioLabs) を用いて行った。

統計学的解析は、アルコール依存症患者群と健常者群において、上記 2 つの *MTHFR* 遺伝子多型の遺伝子型及び対立遺伝子頻度に差があるかどうか検討するために χ^2 検定及び Yates の補正を行った。また、連鎖不平衡及びハプロタイプ解析に gPLINK v. 2.050 と Haploview v. 4.2 を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

C677T では両群との間で、遺伝子型及び対立遺伝子頻度に有意な差は認められなかった。また、A1298C では遺伝子型頻度に有意な差は認められなかったが、Yates の補正後の χ^2 検定において対立遺伝子頻度の差に有意な傾向が見られ ($\chi^2(1) = 3.57, p = 0.0589$)、C allele がアルコール依存症患者群で出現頻度が高かった。

また、*ALDH2* 遺伝子多型*1/*1 を保持している被検者を対象とした比較解析を行ったところ、A1298C の遺伝子型頻度に有意な差は認められなかった。しかし、対立遺伝子頻度においては有意な差が認められ ($\chi^2(1) = 7.66, p = 0.00566$)、アルコール患者群で C allele の出現頻度が有意に高かった。

同一染色体上の対立遺伝子の組み合わせからなるハプロタイプは 4 種類存在し、*ALDH2* 遺伝子多型*1/*1 を保持している被験者を対象とした比較解析では、有意な差が認められ ($\chi^2(3) = 8.02, \text{global } p = 0.0456$)、アルコール依存症患者群でハプロタイプ C-C の出現頻度が有意に高かった ($\chi^2(1) = 7.28, p = 0.00697$)。C677T と A1298C の相関を示す指標値は $D' = 0.708$ 、 $r^2 = 0.103$ であり、連鎖不平衡を示さなかった (D' および r^2 は連鎖不平衡係数であり、0~1 の数値で表される。 D' は連鎖の程度、 r^2 は連鎖の強さを示す。)

【考察】

今回の研究では、*MTHFR* 遺伝子多型とアルコール依存症発生との関係をアルコール感受性の遺伝的背景 (*ALDH2**1/*1) も揃えて検討した。C677T 多型では遺伝子型及び

対立遺伝子頻度に差は見られなかったが、A1298C 多型では活性の低い C 型で出現頻度が高く、さらに、ALDH2 遺伝子多型 *1/*1 (wild type; non flasher) を持つアルコール依存症患者群と健常者群との比較解析において両多型間のハプロタイプ頻度に有意な差が認められ、C-C ハプロタイプの頻度がアルコール依存症患者群で有意に高かった ($\chi^2(3) = 8.02$, global $p = 0.0456$)。

MTHFR 遺伝子多型 C677T の T allele 出現頻度はアルコール依存症患者において、有意に高いことが報告されている。Singh, H.らは MTHFR 遺伝子多型 C677T の T allele が飲酒者の間で将来的に健康リスクを悪化させる可能性があることを指摘している。今回、我々はこの対立遺伝子がアルコール依存症発症のリスクファクターの一つではないかという仮説を立てたが、今回の結果では有意な関連は認められなかった。これまでに C677T とアルコール依存症との研究はいくつか行われているが一貫した結果は得られていない。この理由の 1 つとしては、人種間における対立遺伝子頻度の違いが起因していると考えられている。T allele 出現頻度は、地理的領域間及び民族の違いにより変動し、今回の研究結果では日本人の健常者での T allele 出現頻度は 42.5%であった一方で最も多いヨーロッパ諸国では 24.1%から 64.3%、最も少ないアフリカ諸国では 0.0%であることが報告されている。なお、データベース (dbSNP <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>) から習得した T allele 出現頻度はヨーロッパで 34.9%、アフリカで 12.1%であった。このよう分布の違いはアルコールを取り巻く環境や人種差 (白人や有色人種) に起因すると考えられる。

また、677TT 遺伝子型頻度はアルコール依存症患者群において健常者群と比較し低いことが報告されており、677TT 遺伝子型はアルコール依存症に対して保護的な役割を果たすことを示唆している。その一方で 677TT 遺伝子型がアルコール依存症患者群においてわずかに高いという報告も存在し 677TT 遺伝子型がアルコール依存症に対して保護的役割があるかはさらなる関連研究が必要だと考える。

A1298C とアルコール依存症との関連研究はこれまで行われていなかったが、食道癌、胃癌、膵臓癌、並びに大腸癌における研究は行われている。大腸癌との関連研究では 1298CC 遺伝子型は、アルコール消費量が高かった個体では統計的大腸がんの危険性の有意な増加と関連している。今回の我々の解析結果から C allele が健常者群よりアルコール依存症患者群で有意に高値を示したことから、アルコール依存症への脆弱性に関与する可能性が示唆された。

本研究の連鎖不平衡解析において C677T と A1298C に連鎖関係は認められなかった。したがって、C677T の T allele 及び A1298C の C allele は MTHFR 活性を低下させる機能を有するが、一方をタグ SNP として遺伝型判定の代用に用いることは難しいと考えら

れる。

さらにハプロタイプ解析の結果、4種類からなるハプロタイプと *ALDH2* 遺伝子多型 *1/*1 のアルコール依存症患者群と健常者群間において有意差を認めた。アルコール依存症患者群は健常者群と比較しハプロタイプ C-C の出現頻度が高かった ($\chi^2(1) = 7.28$, global $p = 0.00697$)。各ハプロタイプの *MTHFR* 活性は高活性 C-A、中活性 C-C 及び T-A、低活性 T-C と推定される。本研究で中活性のハプロタイプ C-C が高い出現頻度を示したことは、*ALDH2* 遺伝子多型 *1/*1 の遺伝子を持つ個体にとって *MTHFR* の遺伝子多型 rs1801133 と rs1801131 の C-C 連鎖がアルコール依存症発症に関与している可能性を示唆する。ただし、*MTHFR* 活性が依存症発症の脆弱性に関与しているのかはこの研究だけでは不明である。

結論として、本研究では *MTHFR* 遺伝子多型は、特にアルコール(アセトアルデヒド)代謝活性が強く飲酒量が増えやすいといわれる *ALDH2** 1/*1 を持つ個体は C677T (rs1801133) の C allele を持ち A1298C (rs1801131) の C allele を持つ個体に、アルコール依存症が発症しやすいのではないかとすることを指摘した。

Abstract

[Introduction]

Alcohol addiction is a drug addiction involving physical and psychological dependence on alcohol. It is said to exhibit multifactorial inheritance and is thought to have a heritability incidence of 50% to 60%.

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) catalyzes the irreversible reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, and plays a useful role in the methylation of homocysteine to methionine. Abnormal DNA methylation due to deletion of the *MTHFR* gene may affect gene regulation, and it is known that it alters the dopaminergic neurotransmitter system in the brain, and affects cognitive behavior and addiction. Therefore, it is considered that a *MTHFR* gene mutation may indirectly affect the development of alcohol dependence. The *MTHFR* gene is located on chromosome 1p36.3, and C677T (rs1801133) located in exon 4 and A1298C (rs1801131) located in exon 7 are known as *MTHFR* gene polymorphisms. The T allele frequency of *MTHFR* gene polymorphism C677T has been reported to be significantly higher in male alcohol-dependent patients, and single nucleotide polymorphisms (SNPs) located on the *MTHFR* gene may be involved in the vulnerability to the

onset of this disease.

So far, no studies have been conducted on Japanese subjects regarding the relationship between C677T and alcohol dependence. Also, the relationship with A1298C has not been investigated in other populations.

In this study, we compared the frequency of *MTHFR* polymorphisms between alcohol-dependent patients and healthy controls, and also performed haplotype analysis to clarify the genetic factors for alcohol dependence formation.

Furthermore, in order to investigate the effect of *MTHFR* gene polymorphisms on alcohol dependence in more detail, we examined a group of alcoholics with *ALDH2**1/*1 who are said to be prone to addiction due to high alcohol metabolism. A comparative analysis with healthy subjects was also performed.

[Materials and Methods]

The subjects in this study were 64 patients (male: 57, female: 7) with a diagnosis of alcohol dependence according to DSM-IV criteria and 73 unrelated healthy people (male: 22, female: 51).

There was no significant difference in age between the two groups. Blood samples were

collected and all subjects provided written informed consent for genetic studies. The study was approved by the ethics committee of Azabu University.

MTHFR and *ALDH2* polymorphisms were genotyped by means of the polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method according to Frosst, Weisberg and Wu. The PCR products were digested with restrictive enzymes *NinI* and *MboII*, and the digested products were subjected to electrophoresis on a polyacrylamide gel and then visualized using the ethidium bromide staining method.

The *MTHFR* polymorphism difference between the patients with alcohol dependence and healthy control subjects were assessed using the χ^2 test or Yates' correction. In addition, linkage disequilibrium (LD) coefficients (D' and r^2) and haplotype frequencies were calculated with gPLINK 2.050 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) and Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>) respectively. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

[Results]

It was shown that the genotypic and allelic frequencies of rs1801133 polymorphisms were not associated with alcohol dependence. For A1298C, there was no significant difference in

genotype frequency, but there was a significant trend toward a difference in allele frequency in the χ^2 test after Yates' correction ($\chi^2 (1) = 3.57, p = 0.0589$), with the C allele appearing more frequently in the alcoholic patient group.

A comparative analysis of subjects carrying the *ALDH2* gene polymorphism *1/*1 showed no significant difference in genotype frequency of A1298C. However, a significant difference was found in allele frequency ($\chi^2 (1) = 7.66, p = 0.00566$), with the C allele appearing significantly more frequently in the alcohol patient group.

There are four haplotypes involving combinations of alleles on the same chromosome, and haplotype analysis of the two SNPs showed a significant higher frequency of haplotype 2 (C677-1298C) in alcoholics with *ALDH2* *1/*1 than in controls with *ALDH2* *1/*1 ($p = 0.00697$).

The index values indicating the correlation between C677T and A1298C were $D' = 0.708$ and $r^2 = 0.103$, which indicated no linkage disequilibrium.

[Discussion]

This study suggested that on *MTHFR* gene haplotypes (C-C) may be related to alcohol dependence.

The relationship between *MTHFR* gene polymorphisms haplotypes and the development of

alcohol dependence was investigated using the genetic background of alcohol sensitivity (*ALDH2* *1/*1). As a result, four haplotypes involving combinations of alleles on the same chromosome were found, and haplotype analysis of the two SNPs showed a significantly higher frequency of haplotype 2 (C677 -1298C) in alcoholics with *ALDH2* *1/*1 than in controls with *ALDH2* *1/*1 ($p = 0.00697$). In a comparative analysis between an alcoholic patient group with *ALDH2* gene polymorphism *1/*1 (wild type; non flasher) and a healthy subject group, significant differences were observed in the haplotype frequency between the two polymorphisms and the C-C haplotype. The frequency was significantly higher in the alcoholics group ($\chi^2 (3) = 8.02$, global $p = 0.0456$).

It has been reported that the frequency of T allele occurrence of *MTHFR* gene polymorphism C677T is significantly higher in alcoholics. H Singh. et al. reported that the T allele of *MTHFR* gene polymorphism C677T may exacerbate adverse health risks in the future among drinkers. Based on this study, we hypothesize that these alleles may be some of the risk factors for the development of alcohol dependence, but the results show no significant association. Several studies on C677T and alcoholism have been conducted so far, but consistent results have not been obtained. One of the reasons for this is thought to be the

difference in the frequencies of alleles between races. The frequencies of occurrence of alleles vary depending on the geographical region and ethnicity. According to the results of this study, the frequency of occurrence of alleles in healthy Japanese subjects is 42.5%. It is reported that it is 24.1% to 64.3% in the most European countries and 0.0% in the least African countries.

However, the frequency of occurrence of alleles determined from a database (dbSNP https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801131#frequency_tab) was 34.9% in Europe and 12.1% in Africa. Such differences in distribution are thought to be due to the environment surrounding alcohol, and racial differences (white and colored races).

It has been reported that the 677TT genotype frequency is lower in an alcohol-dependent patient group than in a healthy subject group, suggesting that the 677TT genotype plays a protective role against alcohol dependence. On the other hand, there are reports that the 677TT genotype frequency is slightly higher in a group of alcoholics, and it is necessary to further study whether the 677TT genotype has a protective role against alcohol dependence. No studies have been conducted on the association between A1298C and alcoholism, but studies on esophageal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, and colorectal cancer have been conducted. In a study involving colorectal cancer, the 1298CC genotype was associated with a significant

increase statistically in the risk of colorectal cancer in individuals with high alcohol consumption. Our results showed that the C allele frequency was significantly higher in the alcohol-dependent group than in the healthy group, suggesting that it may be involved in the vulnerability to alcohol dependence. In addition, no linkage was found between C677T and A1298C in the linkage disequilibrium analysis in this study. Therefore, it is considered difficult to use one of them as a tag SNP as a substitute for genotyping, although the C677T allele and the A1298C allele have the ability to reduce MTHFR activity.

Furthermore, on haplotype analysis, a significant difference was found between the alcohol-dependent patient group consisting of four types of haplotypes and *ALDH2* gene polymorphism *1/*1 and the healthy subject group. Haplotype C-C occurred more frequently in the alcohol-dependent group than in the healthy group ($\chi^2(1) = 7.28$, global $p = 0.00697$). The *MTHFR* activities of the haplotypes are presumed to be high activity C-A, medium activity C-C and T-A, and low activity T-C, respectively. The high frequency of occurrence of moderately active haplotype C-C in this study indicates that the C-C linkage of *MTHFR* gene polymorphisms rs1801133 and rs1801131 causes alcohol dependence in individuals with *ALDH2* *1/*1. However, it is unclear from this study alone whether *MTHFR* activity is involved

in the vulnerability to addiction development.

In conclusion, in this study, both individuals with *ALDH2**1/*1, which are said to have high alcohol (acetaldehyde) metabolic activity and are likely to exhibit increased alcohol consumption, and with the *MTHFR* C677T (rs1801133) C and A1298C (rs1801131) C alleles may be likely to develop alcohol dependence.

原著

日本人における
メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型と
アルコール依存症との関連研究

永谷（沼尻）真貴，金剛左京，坂上美恵，
柳澤えりか，小野澤裕也*，岩橋和彦

麻布大学 臨床検査技術学科 生理学研究室
(受付：令和3年10月27日；受理：令和4年3月16日)

Association between MTHFR haplotype and alcohol dependence in Japanese

Maki (NUMAJIRI) NAGATANI, Sakyō KONGO, Emi SAKAUE,
Erika YANAGISAWA, Yuya ONOZAWA* and Kazuhiko IWAHASHI

Laboratory of Physiology, Department of Medical Technology, Azabu University,
1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara-shi, Kanagawa 252-5201, Japan
(Received : October 27, 2021 ; Accepted : March 16, 2022)

Summary

In this study, the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene, C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131), and alcohol dependence was studied in Japanese between 64 alcoholics and 73 controls.

It was shown that the genotypic and allelic frequencies of these polymorphisms were not associated with alcohol dependence. However, the haplotype analysis of the two SNPs showed a significant higher frequency of haplotype 2 (C677 -1298C) in alcoholics with *ALDH2* *1/*1 than controls with *ALDH2* 1/*1 ($p = 0.00697$).

This study suggested that *MTHFR* gene haplotype (C-C) may be related to alcohol dependence.

Key words: MTHFR, alcoholism, haplotype

MTHFR, アルコール依存, ハプロタイプ

*責任著者：小野澤裕也，麻布大学臨床検査技術学科生理学研究室

〒252-0206 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-71 mail: onzwy@kitasato-u.ac.jp

はじめに

アルコール依存症は、アルコールに対する身体的及び心理的依存、アルコール消費に対する制御の喪失を含む薬物中毒の一形態である¹⁾。また、複数の遺伝子によって引き起こされる可能性があり、50%～60%の遺伝率を有する家族性障害であると考えられている²⁾。

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) は、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸の5-メチルテトラヒドロ葉酸への不可逆的な還元を触媒し、メチル基を付加することによりホモシステインからメチオニンへのメチル化に有用な役割を果たす³⁾。MTHFR 遺伝子の欠損は酵素活性を低下させ、血漿ホモシステインの増加がDNAメチル化の減少をもたらす^{4,5)}。DNAメチル化の異常は、エピジェネティックパターンのリプログラミングの変化をもたらす。遺伝子調節に影響を与える可能性があり⁶⁾、脳のドーパミン作動性神経伝達システムを変化させ、認知行動と依存症に影響を与えることが知られている⁷⁾。このことからMTHFR 遺伝子変異はホモシステイン代謝を損なうことにより、アルコール依存症の発生に間接的に影響を与える可能性があると考えられている⁸⁾。MTHFR 遺伝子は染色体1p36.3に存在し、MTHFR 遺伝子多型としてエクソン4に位置するC677T (rs1801133) やエクソン7に位置するA1298C (rs1801131) が知られている⁹⁾。これまでにMTHFR 遺伝子多型C677TのT allele 頻度は男性のアルコール依存症患者において、有意に高いことが報告されており¹⁰⁾、MTHFR 遺伝子上に位置する一塩基多型 (SNP) が本疾患発症の脆弱性に寄与することが予測される。C677Tとアルコール依存症との関連性についての検討は日本人を対象とした研究は行われていない。また、A1298Cとの関連性については他集団においても検討されてない。

本研究では、アルコール依存形成の遺伝子要因解明の一助として、MTHFR 遺伝子多型頻度をアルコール依存症患者群と健常者群間で比較し、ハプロタイプ解析も行い検討した。

さらに今回我々は飲酒様態に関与するといわれ、アルコール感受性に影響するといわれる2型アルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) 遺伝子にも着目した。ALDH2 遺伝子多型 (rs671) には野生型ホモ接合体*1/*1、ヘテロ接合体*1/*2、変異型ホモ接合体*2/*2がある。*1/*1と比較すると*1/*2では活性が1/16程度に低下し、*2/*2では活性がほとんどないことが知られている¹¹⁾。さらに*2保有者はアルコール依存症全体の約1割しかおらず¹²⁾、ALDH2*2 allele は非飲酒と強い関連性がある¹³⁾。このことから、今回の研究ではMTHFR 遺伝子多型の影響についてより詳細に検討するため、アルコール依存症になりやすいといわれるALDH2*1/*1¹²⁾を有するアルコール依存症患者群及び健常者群間の比較解析も行った。

対象と方法

書面においてインフォームド・コンセントの得られたDSM-IVの診断基準において精神保健指定医によりアルコール依存症と診断されたアルコール依存症患者64人 (男性57人；女性7人)、アルコール依存経歴または家族歴のない健常者73人 (男性22人；女性51人) を対象とした。これらの対象者から採血を行い、指定された管理者において匿名化を行った。患者群の発症時の年齢と健常者群の年齢で有意差はなかった。ALDH2*1/*1を有するアルコール依存症患者は62人、健常者は46人であった。本研究は麻布大学ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理審査委員会の承認を得て行った。

ゲノムDNAは、フェノール・クロロホルム法により抽出・精製し、*MTHFR* 遺伝子多型 C677T, A1298Cの解析は、Frosstら, Weisbergらの方法に従い、Polymorphism Chain Reaction (PCR) - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法により、それぞれ制限酵素 *Hinf*I (New England BioLabs), *Mbo* II (New England BioLabs) を用いて行った^{5,14)}. *ALDH2* 遺伝子多型の解析は、Wuらの方法に従い、PCR-RFLP法により、制限酵素 *Mbo* II (New England BioLabs) を用いて行った¹⁵⁾.

統計学的解析は、アルコール依存症患者群と健常者群において、上記2つの *MTHFR* 遺伝子多型の遺伝子型及び対立遺伝子頻度に差があるかどうか検討するために χ^2 検定及び Yates の補正を行った。また、連鎖不平衡及びハプロタイプ解析を行い、gPLINK v. 2.050 と Haploview v. 4.2 を用いた^{16,17)}。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

アルコール依存症患者群と健常者群における *MTHFR* 遺伝子多型の判定結果と対立遺伝子頻度を Table 1 に示した。

C677T では両群との間で、遺伝子型及び対立遺伝子頻度に有意な差は認められなかった。ま

Table 1 Genotype and allele frequencies of the *MTHFR* polymorphism in alcohol-dependent and control subjects.

SNP	Subject	n	Genotype (%)			Allele (%)	
			C/C	C/T	T/T	C	T
C677T (rs1801133)	Alcohol dependence	64	22 (34.4)	37 (57.8)	5 (7.8)	81 (63.3)	47 (36.7)
	Control	73	21 (28.8)	42 (57.5)	10 (13.7)	84 (57.5)	62 (42.5)
			$X^2 (2) = 0.803, p = 0.491$			$X^2 (1) = 0.940, p = 0.332$	
	Alcohol dependence (with <i>AALDH2</i> *1/*1)	62	22 (35.5)	35 (56.4)	5 (8.1)	79 (63.7)	45 (36.3)
	Control (with <i>ALDH2</i> *1/*1)	46	12 (26.1)	27 (58.7)	7 (15.2)	51 (55.4)	41 (44.6)
			$X^2 (2) = 1.13, p = 0.568$			$X^2 (1) = 1.51, p = 0.219$	
A1298C (rs1801131)	Alcohol dependence	64	34 (53.1)	23 (35.9)	7 (10.9)	91 (71.1)	37 (28.9)
	Control	73	51 (69.9)	16 (21.9)	6 (8.2)	118 (80.8)	28 (19.2)
			$X^2 (2) = 3.23, p = 0.199$			$X^2 (1) = 3.57, p = 0.0589$	
	Alcohol dependence (with <i>ALDH2</i> *1/*1)	62	34 (54.8)	22 (35.5)	6 (9.7)	90 (73.0)	34 (27.0)
	Control (with <i>ALDH2</i> *1/*1)	46	36 (75.0)	9 (18.8)	1 (2.2)	81 (88.0)	11 (12.0)
			$X^2 (2) = 4.98, p = 0.0829$			$X^2 (1) = 7.66, p = 0.00566^*$	

MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase gene, SNP: single nucleotide polymorphism, *ALDH2*: aldehyde dehydrogenase 2 gene.

* The allele distributions showed a significantly difference between alcoholisms (with *ALDH2* *1/*1) and controls (with *ALDH2* *1/*1) subjects (global $p = 0.046$). C allele was associated with Alcohol dependence ($p = 0.00566$)

た、A1298Cでは遺伝子型頻度に有意な差は認められなかったが、Yatesの補正後の χ^2 検定にて対立遺伝子頻度の差に有意な傾向が見られ ($\chi^2(1) = 3.57, p = 0.0589$), C alleleがアルコール依存症患者群で出現頻度が高かった。

また、ALDH2遺伝子多型*1/*1を保持している被検者を対象とした比較解析を行ったところ、A1298Cの遺伝子型頻度に有意な差は認められなかった。しかし、対立遺伝子頻度においては有意な差が認められ ($\chi^2(1) = 7.66, p = 0.00566$), アルコール患者群でC alleleの出現頻度が有意に高かった。

次に、両群におけるMTHFR遺伝子多型C677T, A1298Cのハプロタイプ頻度をTable 2に示した。同一染色体上の対立遺伝子の組み合わせからなるハプロタイプは4種類存在し、アルコール依存症患者群と健常者群を比較したすべてのハプロタイプ出現頻度に有意な差異は認められなかった ($\chi^2(3) = 4.18, \text{global } p = 0.243$)。しかしながら、Table 3に示すように、ALDH2遺伝子多型*1/*1を保持している被験者を対象とした比較解析では、有意な差が認められ ($\chi^2(3) = 8.02, \text{global } p = 0.0456$), アルコール依存症患者群でハプロタイプC-Cの出現頻度

Table 2 Haplotype frequencies of the MTHFR polymorphisms in alcohol-dependent and control subjects.

Haplotype	C677T (rs1801133)	A1298C (rs1801131)	Frequency (%)		χ^2	Haplotype P value	Global P value
			Alcohol dependence	Control			
1	T	C	3.87	1.77	1.12	0.290	0.243
2	C	C	25.00	17.41	2.40	0.122	
3	T	A	32.90	40.69	1.80	0.180	
4	C	A	38.30	40.13	0.100	0.750	

MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase gene.

^a Haplotype distributions were not significantly different between alcohol-dependent and control subjects (global $p = 0.243$).

Table 3 Haplotype frequencies of the MTHFR polymorphisms in alcohol-dependent and control (with ALDH2 *1/*1) subjects.

Haplotype	C677T (rs1801133)	A1298C (rs1801131)	Frequency (%)		χ^2	Haplotype P value	Global p value
			Alcohol dependence (with ALDH2 *1/*1)	Control (with ALDH2 *1/*1)			
1	T	C	3.65	2.37	0.290	0.591	0.0456*
2	C	C	23.80	9.59	7.28	0.00697*	
3	T	A	32.60	42.20	2.08	0.150	
4	C	A	39.90	45.90	0.750	0.385	

MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase gene, ALDH2: aldehyde dehydrogenase 2 gene.

*The haplotype distributions showed a significant difference between alcoholisms (with ALDH2 *1/*1) and controls (with ALDH2 *1/*1) subjects (global $p = 0.0456$). Haplotype 2 (C-C) was associated with Alcohol dependence ($p = 0.00697$)

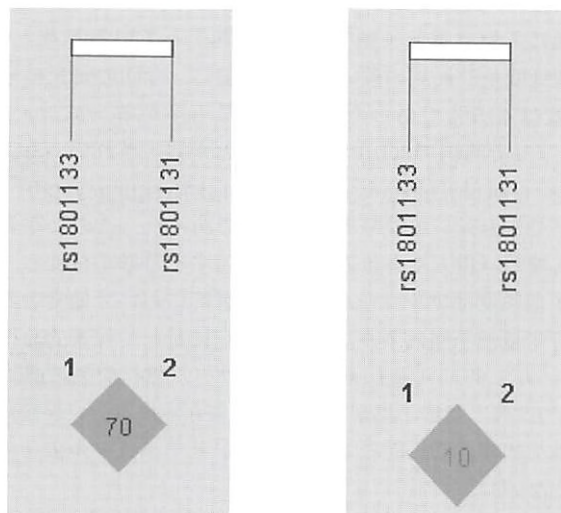


Figure 1 Linkage disequilibrium (LD) map of the *MTHFR* locus in the analyzed population. a: D' value, b: r^2 value, rs1801133: C677T, rs1801131: A1298C. *MTHFR*: methylenetetrahydrofolate reductase gene. The figures in the squares are rounded percentage of the calculated D' and r^2 values (color scale ranges from red to white, denser color means closer linkage).

が有意に高かった ($\chi^2(1) = 7.28, p = 0.00697$)。また、Figure 1に *MTHFR* 遺伝子の上記2多型間の連鎖不平衡の指標値を示した。C677TとA1298Cの相関を示す指標値は、 $D' = 0.708$, $r^2 = 0.103$ であり、連鎖不平衡を示さなかった。(D' および r^2 は連鎖不平衡係数であり、0~1の数値で表される。 D' は連鎖の程度、 r^2 は連鎖の強さを示す¹⁸⁾。)

考 察

今回の研究では、*MTHFR* 遺伝子多型とアルコール依存症発生との関係をC677Tのみならずまだアルコール依存症との関係が検討されていないA1298C多型を新たに加え、アルコール感受性の遺伝的背景を *ALDH2*1/*1* に揃えて検討した。C677T多型では遺伝子型及び対立遺伝子頻度に差は見られなかったが、A1298C多型では活性の低いC型で出現頻度が高く、さらに、*ALDH2* 遺伝子多型 **1/*1* (wild type; non flasher) を持つアルコール依存症患者群と健常者群との比較解析において両多型間のハプロタイプ頻度に有意な差が認められ、C-Cハプロタイプの頻度がアルコール依存症患者群で有意に高かった ($\chi^2(3) = 8.02, \text{global } p = 0.0456$)。

MTHFR 遺伝子多型C677TのT allele出現頻度はアルコール依存症患者において、有意に高いことが報告されている^{8,10,19)}。また、Singh, H.らは *MTHFR* 遺伝子多型C677TのT対立遺伝子が飲酒者の間で将来的に有害な健康リスクを悪化させる可能性があることを指摘している⁸⁾。我々はこの対立遺伝子がアルコール依存症発症のリスクファクターの一つではないかという仮説を立てたが、今回の結果では有意な関連は認められなかった。これまでC677Tとアルコール依存

症との研究はいくつか行われているが、一貫した結果は得られていない^{10,19,20,21}。この理由の1つとしては、人種間における対立遺伝子頻度の違いが起因していると考えられている⁸。T allele 出現頻度は、地理的領域間及び民族の違いにより変動し、今回の研究結果では日本人の健常者での T allele 出現頻度は 42.5%であった一方で、最も多いヨーロッパ諸国では 24.1%から 64.3%、最も少ないアフリカ諸国では 0.0%であることが報告されている。なお、データベース (dbSNP : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801131#frequency_tab) から習得した T allele 出現頻度はヨーロッパで 34.9%、アフリカで 12.1%であった。このような分布の違いはアルコールを取り巻く環境や人種差 (白人や有色人種) に起因すると考えられる。

また、677TT 遺伝子型頻度はアルコール依存症患者群において健常者群と比較して低いことが報告されており、677TT 遺伝子型はアルコール依存症に対して保護的な役割を果たすことを示唆している^{21,22}。その一方で 677TT 遺伝子型がアルコール依存症患者群においてわずかに高いという報告も存在し⁸、677TT 遺伝子型がアルコール依存症に対して保護的役割があるかは、さらなる関連研究が必要だと考える。従って、この SNP とアルコール依存症の関係はまだ明らかになっていないとは言えない。

A1298C とアルコール依存症との関連研究はこれまで行われていなかったが、食道癌、胃癌、膵臓癌、並びに大腸癌における研究は行われている^{23,24}。大腸癌との関連研究では 1298CC 遺伝子型は、アルコール消費量が高かった個体では統計的大腸がんの危険性の有意な増加と関連している²⁴。今回の我々の解析結果から C allele が健常者群よりアルコール依存症患者群で有意に高値を示したことから、アルコール依存症への脆弱性に関与する可能性が示唆された。

また本研究の連鎖不平衡解析において、C677T (rs1801133) と A1298C (rs1801131) 間の連鎖不平衡係数 D' では比較的強い相関が認められた ($D' = 0.708$) が、 r^2 では相関は認められなかった ($r^2 = 0.103$)。 D' は 1 遺伝子の組み換えの程度を判断できるが、サンプル数に依存する性質を持つため、サンプル数に依存しにくく、 D' を補完する性質を持つ r^2 を考慮する必要がある。 r^2 は D' よりシビアな値を取り、 $1/3$ (つまり 0.330) 以上の場合、強い連鎖不平衡であるといえる¹⁸。ゆえに、C677T と A1298C に連鎖関係は認められなかった。したがって、C677T の T allele 及び A1298C の C allele は MTHFR 活性を低下させる機能を有するが、一方をタグ SNP として遺伝型判定の代用に用いることは難しいと考えられる。

さらに、ハプロタイプ解析の結果、4種類からなるハプロタイプと *ALDH2* 遺伝子多型 *1/*1 のアルコール依存症患者群と健常者群間において有意差を認め、アルコール依存症患者群は健常者群と比較し、ハプロタイプ C-C の出現頻度が高かった ($\chi^2(1) = 7.28$, global $p = 0.00697$)。各ハプロタイプの MTHFR 活性は高活性 C-A、中活性 C-C 及び T-A、低活性 T-C と推定される。本研究で中活性のハプロタイプ C-C が高い出現頻度を示したことは、*ALDH2* 遺伝子多型 *1/*1 の遺伝子を持つ個体にとって MTHFR の遺伝子多型 rs1801133 と rs1801131 の C-C 連鎖がアルコール依存症発症に関与している可能性を示唆するが、MTHFR 活性が依存症発症の脆弱性に関与しているのかはこの研究だけでは不明である。

本研究では MTHFR 遺伝子多型は、特にアルコール (アセトアルデヒド) 代謝活性が強く飲酒量が増えやすいといわれる *ALDH2* *1/*1 を持つ個体間で¹²、C677T (rs1801133) の C allele を持ち A1298C (rs1801131) の C allele を持つ個体に、アルコール依存症が発症しやすいのではないかとこの可能性があることを指摘した。今後はアルコール依存症発症機序解明の一助として、検体数を増やして、食事や性別などの他の交絡因子及び総ホモシステイン濃度や葉酸、ビタミン B12 などの生化学データを考慮し、さらなる研究が必要と思われる。

要 約

本研究では、非可逆的に5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸を5-メチルテトラヒドロ葉酸に変換する反応を触媒し、脳のドーパミン作動性神経伝達システムにも関与するといわれるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) に着目し、MTHFRの遺伝子多型C677T (rs1801133) とA1298C (rs1801131) がアルコール依存脆弱性に寄与するかどうか、ハプロタイプ解析を行い検討した。

書面においてインフォームド・コンセントの得られたDSM-IVの診断基準においてアルコール依存症と診断されたアルコール依存症患者64人、アルコール依存の経歴のない健常者73人を対象とした。MTHFR及びALDH2遺伝子多型の解析には、Polymorphism Chain Reaction (PCR) - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法を用いた。

解析の結果、A1298Cの対立遺伝子頻度において有意な差が認められ ($p < 0.00566$)、アルコール依存症患者群でC alleleの出現頻度が有意に高かった。また、ALDH2遺伝子多型*1/*1を持つアルコール依存症患者群と健常者群との2群間の比較解析において、4種類のハプロタイプが存在し、ハプロタイプ頻度に有意な差異が認められた ($p < 0.00697$)。以上のことから、MTHFR遺伝子多型のC677TとA1298Cのハプロタイプにおいてアルコール依存症のリスクファクターである可能性があると考えられる。

謝 辞

本研究は麻布大学より支援を受けたものである。

文 献

- 1) Nishizawa, D., Han, W., Hasegawa, J., Ishida, T., Numata, Y., Sato, T., Kawai, A. and Ikeda, K.: Association of mu-opioid receptor gene polymorphism A118G with alcohol dependence in a Japanese population. *Neuropsychobiology*, **53**: 137-141, 2006.
- 2) Pickens, R. W., Svikis, D. S., McGue, M., Lykken, D. T., Heston, L. L. and Clayton, P. J.: Heterogeneity in the inheritance of alcoholism: a study of male and female twins. *Arch. Gen. Psychiatry*, **48**: 19-28, 1991.
- 3) Saraswathy, K. N., Asghar, M., Samtani, R., Murry, B., Mondal, P. R., Ghosh, P. K. and Sachdeva, M. P.: Spectrum of MTHFR gene SNPs C677T and A1298C: a study among 23 population groups of India. *Mol. Biol. Rep.*, **39**: 5025-5031, 2011.
- 4) Friso, S., Choi, S. W., Girelli, D., Mason, J. B., Dolnikowski, G. G., Bagley, P. J., Olivieri, O., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., Corrocher, R. and Selhub, J.: A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**: 5606-5611, 2002.
- 5) Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., Boers, G. J., den Heijer, M., Kluijtmans, L. A. and van den Heuvel, L. P.: A candidate genetic risk factor vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.*, **10**: 111-113, 1995.
- 6) Fuso, A., Seminara, L., Cavallaro, R. A., D' Anselmi, F. and Scarpa, S.: S-adenosylmethionine/homo-

- cysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol. Cell. Neurosci.*, **28**: 195-204, 2005.
- 7) Bönsch, D., Lenz, B., Kornhuber, J. and Bleich, S.: DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in patients with alcoholism. *NeuroReport*, **16**: 167-170, 2005.
 - 8) Singh, H. S., Salam, K. and Saraswathy, K. N.: A study on MTHFR C677T gene polymorphism and alcohol dependence among Meiteis of Manipur, India. *J. Biomark.*: 1-5, 2014.
 - 9) Goyette, P., Pai, A., Milos, R., Frosst, P., Tran, P., Chen, M. and Rozen, R.: Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*, **9**: 652-656, 1998.
 - 10) Lutz, U. C., Batra, A., Kolb, W., Machicao, F., Maurer, S. and Köhnke, M. D.: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T-polymorphism and its association with alcohol withdrawal seizure. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **30**: 1966-1971, 2006.
 - 11) 吉原達也, 笹栗俊之: ALDH2 遺伝子多型と臨床医学. *福岡医誌*, **103**: 82-90, 2012.
 - 12) Higuchi, A., Matsushita, S., Murayama, M., Takagi, S. and Hayashida, M.: Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and the risk for alcoholism. *Am. J. Psychiatry*, **152**: 1219-1221, 1995.
 - 13) Matsuo, K., Wakai, K., Hirose, K., Ito, H., Saito, T. and Tajima, K.: Alcohol dehydrogenase 2 His47Arg polymorphism influences drinking habit independently of aldehyde dehydrogenase 2 Glu487Lys polymorphism: analysis of 2,299 Japanese subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **15**: 1009-1013, 2006.
 - 14) Wilcken, B., Bamforth, F., Li, Z., Zhu, H., Ritvanen, A., Redlund, M., Stoll, C., Alembik, Y., Dott, B., Czeizel, A. E., Gelman-Kohan, Z., Scarano, G., Bianca, S., Ettore, G., Tenconi, R., Bellato, S., Scala, I., Mutchinick, O. M., López, M. A., de Walle, H., Hofstra, R., Joutchenko, L., Kavteladze, L., Bermejo, E., Martínez-Frias, M. L., Gallagher, M., Erickson, J. D., Vollset, S. E., Mastroiacovo, P., Andria, G. and Botto, L. D.: Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J. Med. Genet.*, **40**: 619-625, 2003.
 - 15) Wu, C. F., Wu, D. C., Hsu, H. K., Kao, E. L., Lee, J. M., Lin, C. C. and Wu, M. T.: Relationship between genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and esophageal squamous cell carcinoma risk in males. *World J. Gastroenterol.*, **11**: 5103-5108, 2005
 - 16) Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. and Daly, M.J.: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, **21**: 263-265, 2005.
 - 17) Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J. and Sham, P.C.: PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.*, **81**: 559-575, 2007.
 - 18) Ardlie, K.G., Kruglyak, L. and Seielstad, M.: Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, **3**: 299-309, 2002.
 - 19) Benyamina, A., Saffroy, R., Blecha, L., Pham, P., Karila, L., Debuire, B., Lemoine, A. and Reynaud, M.: Association between *MTHFR* 677C-T polymorphism and alcohol dependence according to Lesch and Babor typology. *Addict. Biol.*, **14**: 503-505, 2009.
 - 20) Rai, V., and Kumar, P.: Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene C677T (rs1801133) polymorphism and risk of alcohol dependence: a meta-analysis. *AIMS Neurosci.*, **8**(2): 212-225, 2021.
 - 21) Saffroy, R., Benyamina, A., Pham, P., Marill, C., Karila, L., Reffas, M., Dubuire, B., Reynaud, M. and Lemoine, A.: Protective effect against alcohol dependence of the thermolabile variant of *MTHFR*. *Drug Alcohol Depend.*, **96**: 30-36, 2008.
 - 22) Yadav, U., Kumar, P., Gupta, S. and Rai, V.: Distribution of *MTHFR* C677T gene polymorphism in

healthy north indian population and an updated Meta-analysis. *Ind J Clin Biochem.* **32**: 399-410, 2018.

- 23) Larsson, S.C., Giovannucci, E. and Wolk, A.: Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology.* **131**: 1271-1283, 2006.
- 24) Yin, G., Kono, S., Toyomura, K., Hagiwara, T., Nagano, J., Mizoue, T., Mibu, R., Tanaka, M., Kakeji, Y., Maehara, Y., Okamura, T., Ikejiri, K., Futami, K., Yasunami, Y., Maekawa, T., Takenaka, K., Ichimiya, H. and Imaizumi, N.: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Sci.* **95**: 908-913, 2004.

出典

本学位論文は以下に公表した。

永谷（沼尻）真貴，金剛左京，坂上美恵，柳澤えりか，小野澤裕也，岩橋和彦：日本人におけるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型とアルコール依存症との関連研究. 日本アルコール・薬物医学雑誌, 57(2): 109-117, 2022.

謝辞

本論文を作成するにあたり、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました指導教官の岩橋和彦教授に深謝の意を表します。また、本論文に対して懇篤な校閲を賜りました古畑勝則教授、栗林尚志教授に深謝の意を表します。さらに、数々のご助言を賜りました小野澤裕也准教授に感謝の意を表します。