

氏名(本籍)	永谷真貴(埼玉県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第29号
学位授与年月日	令和4年7月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 岩橋和彦 (副査) 栗林尚志 古畑勝則

論文内容の要旨

【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 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。

論文審査の結果の要旨

6月22日の発表会における発表は滞りなく行われ、本論文の内容は、世界で初めてアルコール依存症という疾患の脆弱性（なり易さ）に、MTHFR 遺伝子多型やそのハプロタイプに着目し、それらとの相関があることを見出した論文で要旨は以下の通りである。

【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 ($\chi^2(3) = 8.02$, 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 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このことを指摘した。

(以上要旨)

この論文の内容は、従来からわかっていた、飲酒時にアルコール代謝が強い体質でアルコール依存症へのなりやすさを示す ALDH2*1/*1 遺伝子多型以外で、MTHFR 遺伝子多型もアルコール依存症の発症への脆弱性と関係があることを初めて示唆したもので、この点が学位論文にふさわしいものと認められた。さらに学識の確認の要旨ならびに試験の結果はしかるべき生理学、遺伝学、統計学の学識を有し、論文作成における英語の学力も身につけており、合格（優）であり、しかるべき学識と英語力があることが認められた。

以上、主査、副査による審査において、麻布大学大学院環境保健学研究科の博士（学術）授与にふさわしいという意見で一致した。