

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19242

研究課題名(和文) 発現ネットワーク解析とエピゲノム情報に基づくアディポネクチン発現パスウェイの解明

研究課題名(英文) Elucidation of adiponectin expression pathway based on the co-expression network and epigenome data analysis

研究代表者

中柄 昌弘 (Nakatochi, Masahiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：10559983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：アディポネクチンの分泌異常は生活習慣病の発症に深く関与する。その血中濃度は、遺伝因子の影響を受けることが知られているが、既知の遺伝子で説明できる割合は非常に少ない。本研究では、地域住民情報191名と公開データを基に、遺伝子発現ネットワーク解析及びDNAメチル化情報との統合解析により、アディポネクチンに関連する新規DNAメチル化サイトを探索した。その結果、アディポネクチン濃度及びその遺伝子発現量と有意に関連するDNAメチル化サイトを3か所同定できた。その内1か所の近傍遺伝子は、アディポネクチンの発現を調節することが知られている。以上の結果は、アディポネクチン制御に対する新たな知見となる。

研究成果の概要(英文)：Abnormal secretion of adiponectin is deeply involved in the development of lifestyle disease. The blood concentration is known to be affected by the genetic factors. However, the variance of the concentration explained by genes previously identified as associated genes with concentrations is very low.

In this study, we explored DNA methylation sites associated with the adiponectin based on a gene co-expression network analysis and an integration analysis with DNA methylation level using the data for 191 nondiabetic men from a general population and public available data sets. As a result, we identified three sites for both adiponectin level and the expression level of ADIPOQ gene. One site of them was located near a gene, which regulate of ADIPOQ. These results suggest new insights into the regulation of adiponectin via effects on epigenetics.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：エピゲノム レジスチン アディポネクチン バイオインフォマティクス DNAメチル化 SNP 生活習慣病 心筋梗塞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アディポネクチンは、主に脂肪細胞から産生され分泌されるアディポサイトカインの1種であるが、最近、他の組織でも、産生されることがわかってきた (FEBS Lett 579: 5163(2005))。その分泌異常である低アディポネクチン血症は、肥満や高血圧症、2型糖尿病、メタボリックシンドローム、冠動脈疾患など様々な病態において認められ、これらの生活習慣病の発症および進展に深く関与する。

この様な背景から、低アディポネクチン血症の改善によるこれらの疾患発症リスク低減の方策が求められている。そのため、アディポネクチンが変動する分子メカニズム解明と、そのメカニズムに沿った治療戦略の開発が必要とされる。

(2) アディポネクチンの血中濃度は、喫煙・飲酒・運動習慣等の環境因子と、遺伝因子の相互作用によって変動する事が知られている。近年、候補遺伝子解析やゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、これらの血中濃度に関連する遺伝子が次々に同定されてきた。しかしながら、現在までに報告された濃度関連遺伝子で説明できる遺伝因子の割合は未だ非常に少ない。

(3) ゲノムの後天的修飾の一つである DNA メチル化は、従来安定な化学修飾であると考えられてきたが、近年、喫煙の様な環境因子 (Am J Hum Genet 88: 450 (2011)) や年齢の様な個人因子 (Aging Cell 11: 1132 (2012)) により、血球の DNA メチル化サイトが大きく変動する事が報告されてきた。この様な DNA メチル化サイトの変動が、アディポネクチンの血中濃度や各種疾患の発症に影響を及ぼすならば、今後の予防医学に重要な情報になると考えられる。

(4) さらに近年、疾患を生体システムのネットワーク異常と捉え、当該疾患のネットワークに関わる分子の挙動や制御について解析する事で、複雑な疾患をより精密に理解しようという先進的な試みがなされている (Nat Rev Genet 9: 819 (2008))。このような、ゲノムの後天的修飾を含めた極めて複雑な統合解析が、アディポネクチンを始めとするバイオマーカーや、生活習慣病の分子疫学・ゲノム疫学研究に求められる時代となってきた。

## 2. 研究の目的

遺伝子発現ネットワーク解析と、遺伝子発現・DNA メチル化・SNP 情報の統合解析により、後天的ゲノム修飾が血中アディポネクチン濃度に如何なる影響を与えて最終的に疾患発症に至るのか、アディポネクチン発現パスウェイの調査・解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞の遺伝子発現ネットワーク解析  
公開データベース NCBI GEO 及び Array Express から、ヒト脂肪細胞由来のマイクロ

アレイデータの内、Affymetrix U133 Plus 2.0 で測定したデータ (CEL ファイル) を取得した。取得したデータセットを用いて遺伝子発現ネットワーク解析を実施し、アディポネクチン遺伝子 (*ADIPOQ*) 発現量と有意に関連のするアディポネクチンモジュールを探索した。解析方法には、Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) (BMC Bioinformatics 9: 559 (2008)) を用いた。

(2) *ADIPOQ* 発現量と関連する DNA メチル化サイトの探索

上記で同定した *ADIPOQ* モジュールを構成する遺伝子について近隣の DNA メチル化サイトに着目し、これらの DNA メチル化サイトが *ADIPOQ* 発現量と関連するかを評価した。データとして、現在公開されている MuTHER プロジェクトの脂肪細胞の遺伝子発現情報 (E-TABM-1140) と DNA メチル化情報 (E-MTAB-1866) を用いた。発現情報は、Illumina HumanHT-12 v3.0 Expression BeadChip、DNA メチル化情報は、Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip で測定されたものを用いた。解析方法には線形混合モデルを用いた。DNA メチル化強度の指標には、M-value を用い、*ADIPOQ* 発現量は対数変換した値を利用した。本プロジェクトデータは 626 名の女性の双子のデータである。血縁関係を補正するため、ランダム効果として兄弟情報を入力した。

また、我々はこれまでに北名古屋市保健センター (行政側) の全面的協力を得て、北名古屋市住民コホート (北名古屋ゲノム疫学研究: KING Study, NCT00262691) を構築した。この参加者の内、191 名の男性・非糖尿病患者に対して、血中のアディポネクチン濃度、血球の DNA メチル化アレイが測定済みである。本データを用いて (2) で同定した DNA メチル化と血中のアディポネクチン濃度に関連があるかを評価した。DNA メチル化情報は Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip で測定された。解析方法には、一般線形モデルを用いた。共変量には、年齢と血球の種類毎の割合を使用した。DNA メチル化強度の指標には M-value を用い、アディポネクチン濃度は対数変換した値を利用した。

(3) アディポネクチン濃度関連 SNP による補正解析

アディポネクチン血中濃度は、SNP の影響を受ける事が知られている (Hum Mol Genet 23(4): 1108 (2014), Eur J Hum Genet 19(3): 262 (2011))。KING study 対象者には、既知のアディポネクチン濃度関連 SNP (rs10937273, rs1656930, rs3865188) が Illumin OmniExpress により測定されている。そこで、これらの SNP データで補正し

て、血中濃度と DNA メチル化の関連を再評価した。SNP データは、マイナーアレル数として数値化した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脂肪細胞の遺伝子発現ネットワーク解析

表 1 に示した 7 種類のデータセットを基に遺伝子発現ネットワークの構築を行った。

表 1 使用した公開データセット

Accession ID	N	Reference
E-MTAB-54	71	PLoS Genet 8:e1002505 (2012)
E-TABM-325	150	PLoS Genet 8:e1002505 (2012)
GSE13070	70	Proc Natl Acad Sci U S A 106:18745 (2009)
GSE13506	49	Arterioscler Thromb Vasc Biol 29:147 (2009)
GSE17170	70	PLoS Genet 5:e1000642 (2009)
GSE27916	375	Mol Syst Biol 9:649 (2013)
GSE41168	70	Cell Metab 16:658-664 (2012)
Total	855	

今回構築したネットワークで同定されたモジュールに対して *ADIPOQ* 遺伝子発現量との関連を評価した所、30 種類のアディポネクチンモジュールが有意 ( $p < 0.05$ ) な関連を示した。その中で最も強い関連を示したモジュールは、small molecule metabolic process の遺伝子オントロジーを持つ遺伝子群が有意に存在していた。

##### (2) 脂肪細胞における *ADIPOQ* 発現量と関連する DNA メチル化サイトの探索

続いて MuTHER プロジェクトの脂肪細胞の *ADIPOQ* 発現量と DNA メチル化データを用いて、上記で同定したアディポネクチンモジュール構成遺伝子の近傍にある DNA メチル化サイトと *ADIPOQ* 発現量の関連を評価した。更に、我々の保有する血中アディポネクチン濃度と血球の DNA メチル化サイトの関連も評価した。その結果、3 種類の遺伝子の近傍に位置する DNA メチル化が *ADIPOQ* 発現量及びアディポネクチン血中濃度と有意な関連を示した (表 2, 表 3)。これらの関連の方向性は、MuTHER と KING study 間で一貫していた。

表 2. DNA メチル化サイトと *ADIPOQ* 発現量の関連

DNAメチル化 サイト	Chr	MuTHER (n=626)	
		Effect $\pm$ SE	P value
Site A	3	0.375 $\pm$ 0.105	0.0004
Site B	6	0.342 $\pm$ 0.104	0.0010
Site C	8	-0.306 $\pm$ 0.095	0.0013

表 3. DNA メチル化サイトとアディポネクチン濃度との関連

DNAメチル化 サイト	Chr	KING (n=191)	
		Effect $\pm$ SE	P value
Site A	3	0.340 $\pm$ 0.149	0.024
Site B	6	0.205 $\pm$ 0.091	0.025
Site C	8	-0.209 $\pm$ 0.092	0.023

##### (3) アディポネクチン濃度関連 SNP による補正解析

KING study で既知のアディポネクチン濃度関連 SNP (rs10937273, rs1656930, rs3865188) で補正して、再度血中アディポネクチン濃度と 3 種類の DNA メチル化の関連を評価した所、表 4 の様な結果が得られた。Site A, Site B は、SNP 補正後も有意な関連を維持していた。

表 4. アディポネクチン濃度関連 SNP で補正後の DNA メチル化サイトとアディポネクチン濃度との関連

DNAメチル化 サイト	Chr	KING (n=191)	
		Effect $\pm$ SE	P value
Site A	3	0.362 $\pm$ 0.163	0.028
Site B	6	0.208 $\pm$ 0.099	0.036
Site C	8	-0.165 $\pm$ 0.099	0.099

##### (4) 考察

本研究では、遺伝子発現ネットワーク解析と、DNA メチル化情報との統合解析により、アディポネクチンに関連がある新規 DNA メチル化サイトを 3 サイト同定できた。特に Site A の近傍にある遺伝子 X は、アディポネクチンの遺伝子発現に対して正の調節をすることが知られており、Site A と遺伝子 X も正の関連があることが報告されている。

更にアディポネクチン濃度関連 SNP で補正した解析を実施した所、Site A, Site B については、有意な関連を維持していた。補正に用いた SNP の内、rs10937273, rs1656930 については、*ADIPOQ* 遺伝子近傍に存在する SNP であり、*ADIPOQ* 遺伝子に直接影響を及ぼしていると予想される。そのため、本結果から、少なくとも Site A と Site B の DNA メチル化強度は、*ADIPOQ* 遺伝子発現量に起因して変動したわけではないと考えられる。

以上の Site A の結果をまとめると、Site A の DNA メチル化レベル上昇 遺伝子 X の遺伝子発現上昇 *ADIPOQ* の遺伝子発現上昇 アディポネクチン濃度上昇のアディポネクチン発現パスウェイが期待できる。また、Site B, Site C に関しては新たなアディポネクチン発現パスウェイが存在する可能性が

示唆されている。

以上の成果は、アディポネクチンの分泌異常から、生活習慣病発症に至るまでのエピジェネティクスの関与を理解するための重要な情報となり得ると期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

1. **中柘昌弘**, 市原佐保子, 山本健, 横田充弘: エピジェネティクスによる血漿レジスチン濃度調節機構の解明, バイオサイエンスとインダストリー, 2017年5月10日発行, 査読無
2. **Nakatochi M**, Ichihara S, Yamamoto K, Naruse K, Yokota S, Asano H, Matsubara T, Yokota M. Epigenome-wide association of myocardial infarction with DNA methylation sites at loci related to cardiovascular disease. *Clinical Epigenetics* 9:54 (2017), DOI: 10.1186/s13148-017-0353-3, 査読有
3. **Nakatochi M**, Ichihara S, Yamamoto K, Ohnaka K, Kato Y, Yokota S, Hirashiki A, Naruse K, Asano H, Izawa H, Matsubara T, Yokota M. Epigenome-wide association study suggests that SNPs in the promoter region of RETN influence plasma resistin level via effects on DNA methylation at neighbouring sites, *Diabetologia*, 58:2781–2790 (2015), DOI: 10.1007/s00125-015-3763-9, 査読有

[学会発表](計 7件)

1. **Nakatochi M**, Ichihara S, Yamamoto K, Matsubara T, Yokota M. Association analysis among myocardial infarction, cardiovascular disease-related single nucleotide polymorphisms, and DNA methylation sites utilizing the cluster analysis. IFCS 2017, Tokyo, Japan, August 8-10, 2017
2. **中柘昌弘**, 遺伝子発現ネットワーク解析に基づく、アディポサイトカインモジュールの探索. 第27回日本疫学会学術集会, P-042, ベルクラシック甲府(山梨県甲府市), 2017年1月25日~27日
3. **中柘昌弘**, 市原佐保子, 山本健, 松原達昭, 横田充弘. Epigenetic age と Chronological age の差分は非致死性心筋梗塞と関連しない. 第22回国際個別化医療学会, 演題番号7, 大崎ブライトコアホール(東京都品川区), 2016年10月29日
4. **Nakatochi M**, Ichihara S, Yamamoto K, Matsubara T, Yokota M. Epigenome-wide association study for myocardial infarction identified a DNA methylation site on the

loci related to atrial fibrillation and ischemic stroke, ASHG 2016, 418F, Vancouver, Canada, Oct 18-22, 2016

5. **Nakatochi M**, Ichihara S, Yamamoto K, Matsubara T, Yokota M. Analysis of the association between DNA methylation sites and cardiovascular disease-related single nucleotide polymorphisms in the Japanese population. 日本計算機統計学会 30周年記念国際研究集会, シアトル, USA, 2016年10月16日~17日

6. **中柘昌弘**, 市原佐保子, 山本健, 大中佳三, 加藤洋介, 横田成紀, 平敷安希博, 成瀬桂子, 浅野展行, 井澤英夫, 松原達昭, 横田充弘. エピゲノムワイド関連研究と一塩基多型(SNP)の統合解析による血漿レジスチン濃度調節機構の解明. 第26回日本疫学会学術総会, 鳥取県米子, 2016年1月21日~23日.

7. **Nakatochi M**, Ichihara S, Yamamoto K, Ohnaka K, Kato Y, Yokota S, Hirashiki A, Naruse K, Asano H, Izawa H, Matsubara T, Yokota M. Epigenome-wide association study suggests that SNPs in the promoter region of RETN influence plasma resistin level via effects on DNA methylation at neighboring sites, ASHG 2015, 418F, Baltimore, USA, Oct 6-10, 2015

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中柘 昌弘 (NAKATOCHI, Masahiro)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号: 10559983

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

横田 充弘 (YOKOTA, Mitsuhiro)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号: 50201851

松原 達明 (MATSUBARA, Tatsuaki)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号: 30209598

市原 佐保子 (ICHIHARA, Sahoko)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20378326

山本 健 (YAMAMOTO, Ken)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号: 60274528