

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06179

研究課題名（和文）肥満感受性遺伝子群の網羅的なエピゲノム解析による肥満発症・進行メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of obesity development and progression by comprehensive epigenome analysis of obesity susceptibility genes

研究代表者

北本 綾 (Kitamoto, Aya)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術専門職員

研究者番号：30381627

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト白色脂肪前駆細胞を用いて、分化・成熟段階におけるリピドーム解析とプロテオーム解析、また肥満感受性遺伝子に着目したDNAメチル化解析を行った。分化・成熟段階において特定のCpG領域のメチル化レベルが有意に変動していた。リピドーム解析では145種の脂質が、プロテオーム解析では381種のタンパク質が有意に変動していた。変動タンパク質を用いたGene ontology (GO) 解析では167種類のGO termが有意に濃縮され、KEGGパスウェイ解析では14種類のパスウェイが有意に濃縮された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は、高血糖や高血圧、高脂血症などの代謝異常を引き起こす。その予防法や治療法の開発は急務となっている。本研究ではヒト白色脂肪前駆細胞を、脂肪細胞への分化後、脂肪蓄積初期、中期、成熟脂肪細胞の各段階に分けて、分化・成熟過程で生じる脂質プロファイルの変化とタンパク質プロファイルの変化を詳細に解析した。これらのマルチオミクスのデータセットは、脂肪細胞の分化・成熟の過程を理解し、肥満などの生活習慣病における診断や治療のターゲットの特定に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the changes in lipid and protein profiles and DNA methylation that occur during the differentiation and maturation of cultured human subcutaneous white preadipocytes into mature adipocytes. Methylation levels of specific CpG regions of obesity susceptibility genes were significantly altered during differentiation and maturation. Lipidome analysis showed that 145 lipid species and proteome analysis showed that 381 proteins were significantly altered. 167 GO terms were significantly enriched by Gene Ontology (GO) term enrichment analysis and 14 pathways were significantly enriched by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analysis.

研究分野：オミクス解析

キーワード：肥満 エピゲノム 肥満感受性遺伝子 次世代シーケンサー ゲノムワイド関連解析 質量分析 リピドーム解析 プロテオーム解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、日本における肥満は増加の一途をたどり、大きな社会問題となっている。特に内臓脂肪型肥満では、脂肪細胞から分泌されるさまざまな生理活性物質の分泌異常が生じる。その結果、高血糖や高血圧、高脂血症などの代謝異常を引き起こし、メタボリックシンドロームの原因になる。その予防法や治療法の開発は急務となっている。

肥満の発症や進行は、過食や運動不足だけでなく、遺伝素因が重要な役割を担っていると考えられ、世界中でマイクロアレイを用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) が行われてきた。その結果、具体的な肥満関連遺伝子と一塩基多型 (SNP) が多数報告されている。私たちも、日本人症例で皮下脂肪面積や内臓脂肪面積、脂肪組織由来の生理活性物質濃度と関連を認める SNP を報告し、肥満との関連を示してきた (1-4)。

肥満の発症や進行には遺伝素因に加え、DNA メチル化などの環境因子も密接に相互作用していると考えられている (Dick KJ, et al., Lancet. 2014, Burgio E, et al., Mol Biol Rep. 2015)。

私たちは、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型である非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) 症例の肝臓 DNA (日本人 60 人) を用いて、GWAS で見出した感受性遺伝子領域 (5, 6) に存在する全 CpG サイトについて次世代シーケンサーを用いたターゲットバイサルファイトシーケンスにより高密度に解析した。その結果、*PNPLA3* 遺伝子上流の CpG99 領域の CpG サイトが肝臓の線維化と強く関連し、また *PNPLA3* 遺伝子の発現とも関連していることを見出した。さらにこの CpG サイトのメチル化レベルは、NAFLD と非常に強い関連がみられる SNP (rs738409) の遺伝子型によって影響を受けることを明らかにし、NAFLD において感受性 SNP (遺伝素因) と DNA メチル化 (環境因子) との相互作用を示唆し、NAFLD の病態メカニズムを解明するうえで重要な知見を得た (7)。

2. 研究の目的

肥満の発症や進行には遺伝素因と DNA メチル化などの環境因子が密接に相互作用していると考えられている。肥満に関連する多くの感受性遺伝子が明らかとなってきたが、これら感受性遺伝子に着目した DNA メチル化の解析はこれまでほとんど行われていない。

そこで、肥満に関する形質と強い関連が報告されている肥満感受性遺伝子群を対象とし、遺伝子上流 CpG 領域の全ての CpG サイトの DNA メチル化レベルを次世代シーケンサーにより網羅的かつ詳細に解析を行う。また、それぞれの DNA メチル化レベルと下流遺伝子の発現との関連や、肥満感受性遺伝子間の相互作用の解析を行う。

肥満感受性遺伝子に着目したメチル化解析に加え、プロテオーム解析、さらにリピドーム解析の統合による新たな解析法を確立し、肥満の発症や進行のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

白人由来のヒト白色脂肪前駆細胞 (皮下脂肪) の 3 つの細胞株を用いた。脂肪前駆細胞増殖培地でコンフルエントになるまで増殖させ (Stage-1: 前駆細胞)、脂肪前駆細胞分化培地にて 72 時間培養し分化させた (Stage-2: 分化誘導後)。さらに脂肪細胞栄養培地にて培養し、脂肪を蓄積させた。脂肪蓄積の状態から、Stage-3 (脂肪蓄積初期)、Stage-4 (中期)、Stage-5 (成熟細胞) の 3 つのステージに分類した。

(2) 蛍光染色と画像解析

各ステージの細胞は、脂肪細胞蛍光染色キットを用いて脂肪球 (BODIPY) と核 (Hoechst 33342) を染色し、脂肪滴の蓄積は ImageJ Fiji ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD) を用いて解析した。

(3) 次世代シーケンサーを用いたターゲットバイサルファイトシーケンス

各ステージの細胞からゲノム DNA と Total RNA を抽出した。GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) に登録されている 4 つの GWAS 研究を参照して、P 値が $10E-20$ 未満の 7 遺伝子を候補とし、候補領域に存在する CpG 領域を全て含むように開発済みのプログラムでプライマーを設計した。MiSeq により 100 base の Paired-end で高深度なランを実施した。出力データの解析は、主にフリーの NGS 用解析ツール (Bismark, Bowtie2, SAMtools など) を用いた開発済みのパイプラインと、一部は独自開発のプログラムを組み合わせで行った。7 遺伝子の発現調節領域に存在する合計 10 ヶ所の CpG 領域のメチル化レベルを測定した。Total RNA を用いて定量的 RT-PCR 法により発現量を確認し、DNA メチル化と遺伝子発現量との関連を解析した。

(4) リピドーム解析

各ステージの細胞から Bligh and Dyer 法を用いて脂質を抽出し、UltiMate3000UHPLC-Q

Exactive 四重極-Orbitrap 質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて分析した。データは Xcalibur 4.3.73.11 (Thermo Scientific) を用いて取得し、LipidSearch 4.2.13 で解析した。主成分分析 (PCA)、階層的クラスタ分析 (デンドログラム)、階層的クラスタリングヒートマップ解析は MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) を用いた。統計解析は、MetaboAnalyst 5.0 の一元配置分散分析 (ANOVA) にて解析し、post hoc test は Fisher PLSD 法で検定した。内部標準物質は、Splash Lipidmix internal standards (Avanti, Alabaster, AL, USA) を用いた。

(5) プロテオーム解析

各ステージの細胞からタンパク質を抽出し、酵素処理後 EASY-nLC 1000-Q Exactive 四重極-Orbitrap 質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて分析した。データは Xcalibur 4.3.73.11 (Thermo Scientific) を用いて取得し、Proteome Discoverer 2.2 で解析した。部分的最小二乗回帰 (PLS-DA)、階層的クラスタリングヒートマップ解析は MetaboAnalyst 5.0 を用いた。統計解析は R ソフトウェア ver. 3.6.1 を用いて、一元配置反復測定分散分析 (ANOVA) にて解析し、post hoc test は Scheffe 法で検定した。DAVID Bioinformatics Resources 2021 を使用し、遺伝子オントロジー解析および KEGG パスウェイ解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 細胞培養

図 1 は、実験手順と概略図を示した。各ステージから、ゲノム DNA、Total RNA、脂質、タンパク質を抽出した。ディッシュと試薬瓶の画像は、DBCLS Togo Picture Gallery (c2016 DBCLS TogoTV / CC-BY-4.0;

<https://togotv.dbcls.jp/pics.html>) より提供いただきました。

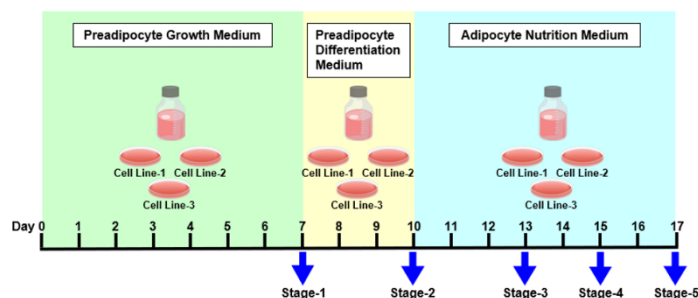


図 1 実験手順と概略図

(2) 蛍光染色と画像解析

図 2 は、細胞培養の様子を Olympus IX-83 倒立蛍光顕微鏡と cellSens Dimension ソフトウェア ver. 1.12 で画像解析した結果である。白人種由来のヒト白色脂肪前駆細胞を播種後、24 時間経過すると紡錘形の細胞が観察された。約 7 日後、脂肪前駆細胞増殖培地上で 100% コンフルエントに達した (Stage-1)。その後、脂肪前駆細胞を脂肪前駆細胞分化培地で 3 日間連続分化させた (Stage-2)。脂肪細胞栄養培地に交換してから 3 日後、小さな脂質滴が出現した (Stage-3)。脂質滴の数は徐々に増加し (Stage-4)、細胞質内が脂質滴で満たされるようになった (Stage-5)。

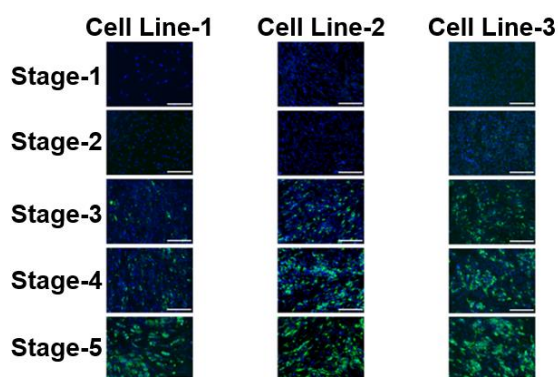


図 2 画像解析

(3) 次世代シーケンサーを用いたターゲットバイサルファイトシーケンス

ターゲットバイサルファイトシーケンスを行い、皮下脂肪細胞の分化・成熟段階で特定の CpG 領域のメチル化レベルが有意に異なることを見出した。CHG、CHH 領域については差が見られなかった。しかし Total RNA を用いた定量的 RT-PCR 法で標的遺伝子の発現量を確認したところ、発現量が低く安定した結果が得られなかった。DNA メチル化レベルと遺伝子発現量の解析は、デジタル PCR により解析する予定である。

(4) リピドーム解析

① 主成分分析と階層的クラスタ分析

図 3 は主成分分析 (PCA)、図 4 は階層的クラスタ分析 (デンドログラム) を示した。階層的クラスタ分析は、ピアソン距離と Ward クラスタリングを用いた。皮下脂肪前駆細胞 (Stage-1)、脂肪細胞への分化誘導後 (Stage-2) と、脂肪蓄積開始後 (Stage-3) から Stage-5) の細胞が明確に分離された。

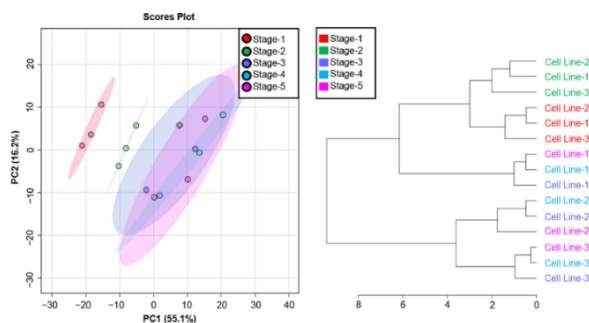


図 3 主成分分析 図 4 階層的クラスタ分析

②階層的クラスタリングヒートマップ解析と統計解析

図 5 のステージ間の階層的クラスタリングヒートマップ解析は、ユークリッド距離を用いた Ward の方法を用いて実施した解析結果を示した。5つのステージ間で差のある脂質上位 50 種を示すヒートマップであり、赤、緑、青、水色、ピンクの列はそれぞれ Stage-1~5 を示した。カラースケールは、脂質種の全体平均からの標準偏差の数を示し、赤色の部分は脂質種の量が多いことを、青色の部分は脂質種の量が少ないことを示す。脂肪滴の構成成分で中心部分にあるトリグリセリド(TG)が多く検出された。

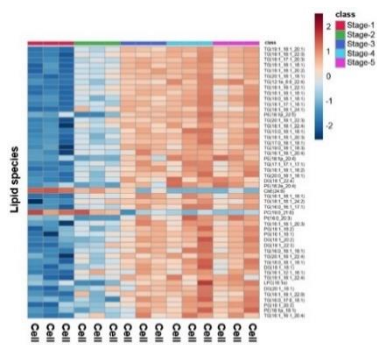


図 5 階層的クラスタリングヒートマップ解析

図 6 に TG(19:1_18:1_20:1)の箱ひげ図とチャートを示した。脂肪蓄積が進むにつれて量が増加していた。

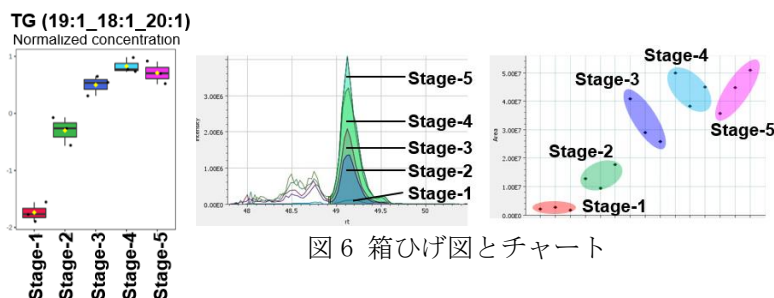


図 6 箱ひげ図とチャート

③統計解析

LipidSearch 4.2.13 を用いて検出された脂質種は、309 種類であった。図 7 は一元配置分散分析で得られた P 値の散布図である。309 種の脂質のうち、145 種 (6 LPC、7 PC、2 LPE、25 PE、2 PS、7PG、6 PI、14 DG、73 TG、および 3 ChE) が統計的に有意であった (FDR<0.05)。詳細を表 1 に示した。

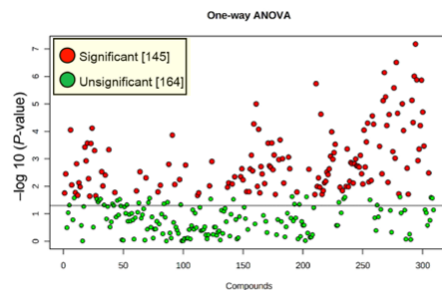


図 7 P 値の散布図

表 1 統計的に有意な脂質数

クラス	検出された脂質数	統計的に有意な脂質数 (FDR < 0.05)
LPC (Lysophosphatidylcholine)	34	6
PC (Phosphatidylcholine)	31	7
LPE (Lysophosphatidylethanolamine)	7	2
PE (Phosphatidylethanolamine)	70	25
PS (Phosphatidylserine)	16	2
PG (Phosphatidylglycerol)	11	7
PI (Phosphatidylinositol)	10	6
PA (Phosphatidic acid)	0	0
SM (Sphingomyelin)	4	0
DG (Diacylglycerol)	20	14
TG (Triacylglycerol)	100	73
ChE (Cholesterol ester)	6	3
Total	309	145

Raw データはデータベースに登録し、公開されている。

リポジトリ	Metabolomics Workbench
Study ID	ST001958
URL	https://www.metabolomicsworkbench.org/data/DRCCMetadata.php?Mode=Project&ProjectID=PR001245

(5) プロテオーム解析

①部分的最小二乗回帰 (PLS-DA)、階層的クラスタリングヒートマップ解析

図 8 は 5つのステージ間のタンパク質の部分的最小二乗回帰 (PLS-DA) を示した。皮下脂肪前駆細胞 (Stage-1)、脂肪細胞への分化誘導後 (Stage-2)、脂肪蓄積初期 (Stage-3)、中期 (Stage-4)、成熟細胞 (Stage-5) の細胞がそれぞれ明確に分離された。楕円は 95%信頼区間を表している。

図 9 はユークリッド距離による Ward 法を用いた 5 ステージ間の階層的クラスタリングヒートマップ解析を示した。5 つのステージ間で差があった上位 100 種のタンパク質を示すヒートマップであり、赤、緑、青、水色、ピンクの列はそれぞれ Stage-1~5 を示した。カラースケールは、タンパク質の全体平均値からの標準偏差の数を示した。

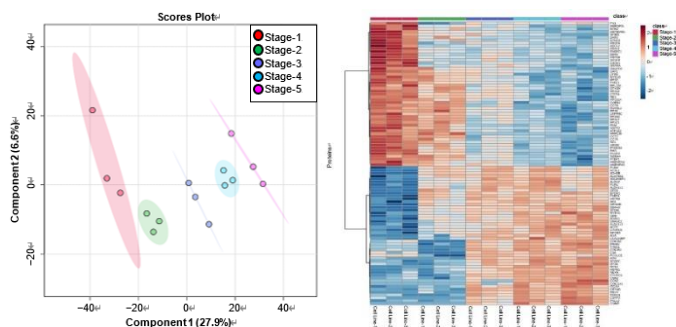


図 8 部分的最小二乗回帰 図 9 階層的クラスタリング

ヒートマップ解析

②統計解析

網羅的なタンパク質同定を行った結果、1,871 種のタンパク質が同定された。1,871 種のタンパク質データに対して一元配置反復測定分散分析 (ANOVA) にて解析した結果、803 種のタンパク質が有意に変動していると判定された (臨界値 $F_{0.05}(4, 8)=3.84$, P 値 <0.05)。さらに、これらの 803 種のタンパク質について、Scheffe 法の post hoc test を用いた対比較検定を行ったところ、381 種のタンパク質がいずれかのステージ間で有意に変動していた (臨界値 $F_{0.05}(4, 10)=3.48$, P 値 <0.05)。統計的に有意な 381 種のタンパク質のアクセッション番号を、DAVID Bioinformatics Resources 2021 (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて Entrez gene ID に変換した。DAVID Bioinformatics Resources 2021 を用いて、遺伝子オントロジー (Gene Ontology: GO) 解析および KEGG パスウェイ解析を実施した。合計で 167 種類の GO term (46 種類の分子機能、56 種類の生物学的プロセス、65 種類の細胞の構成要素) が有意に濃縮された ($FDR<0.05$)。さらに、KEGG パスウェイ解析では、合計 14 種類のパスウェイが有意に濃縮された ($FDR<0.05$)。上位 3 種類のパスウェイを表 2 に示した。興味深いことに、有意に変動したタンパク質のなかには、COVID-19 の重症化に関連すると最近報告があった Myosin regulatory light polypeptide 9 (MYL9) ミルナイン (Iwamura C, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2022) も含まれており、KEGG パスウェイ解析でも、上位に濃縮されたパスウェイの中に「Coronavirus disease—COVID-19」が含まれていた ($FDR=2.17 \times 10^{-7}$)。皮下脂肪細胞の分化・成熟段階と COVID-19 の重症化リスクとの関係を示唆する結果となった。

表 2 上位 3 種類のパスウェイ

Category	パスウェイ名	Count	P 値	FDR
hsa03010	Ribosome	28	1.84×10^{-13}	4.62×10^{-11}
hsa05171	Coronavirus disease - COVID-19	28	1.73×10^{-9}	2.17×10^{-7}
hsa04512	ECM-receptor interaction	15	3.71×10^{-7}	3.11×10^{-5}

Raw データはデータベースに登録し、公開されている。

リポジトリ	ProteomeXchange
データ ID	PXD035060
URL	http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PXD035060
リポジトリ	jPOST
データ ID	JPST001679
URL	https://repository.jpostdb.org/entry/JPST001679

皮下脂肪細胞の分化・成熟段階で有意に変動する脂質・タンパク質の同定に成功した。すでに内臓脂肪細胞でも、分化・成熟段階で有意に変動する脂質・タンパク質の同定に取り組んでいる。他のオミックス手法とも統合することで、肥満の発症や進行のメカニズムを明らかにできるのではないかと考えている。

引用文献

1. Kitamoto A, Kitamoto T, et al., Endocr J. 2013
2. Kitamoto A, Kitamoto T, et al., Endocr J. 2014
3. Kitamoto A, Kitamoto T, et al., Endocr J. 2015
4. Kitamoto A, Kitamoto T, et al., J Atheroscler Thromb. 2016
5. Kitamoto T, Kitamoto A, et al., Human genetics. 2013
6. Kitamoto T, Kitamoto A, et al., J Hum. Genet. 2014
7. Kitamoto T, Kitamoto A, et al., J Hepatol. 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kitamoto Takuya, Kitamoto Aya	4. 巻 48
2. 論文標題 Updating “ Data on changes in lipid profiles during the differentiation and maturation of human subcutaneous white adipocytes analyzed using chromatographic and bioinformatic tools ” with data on the changes in protein profiles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 109036 ~ 109036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dib.2023.109036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kitamoto Aya, Kitamoto Takuya	4. 巻 42
2. 論文標題 Data on changes in lipid profiles during the differentiation and maturation of human subcutaneous white adipocytes analyzed using chromatographic and bioinformatic tools	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 108245 ~ 108245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dib.2022.108245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Yoneda M, Imajo K, Tomeno W, Saito S, Nakajima A	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of differentially methylated region (DMR) networks associated with progression of nonalcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-31886-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北本綾、北本卓也
2. 発表標題 ヒト白色脂肪細胞（皮下脂肪）の分化・成熟過程におけるリポドーム解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北本綾、北本卓也、堀田紀久子
2. 発表標題 GCKR、TRIB1の遺伝子多型とメタボリックシンドローム及び非アルコール性脂肪肝疾患との関連
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北本綾、北本卓也、堀田紀久子
2. 発表標題 日本人症例を用いたゲノムワイド関連解析により、PNPLA3、SAMM50とPARVB遺伝子の多型が非アルコール性脂肪肝障害の発症と進行に関連していることが示唆された
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北本綾、北本卓也、内田千晴、堀田紀久子
2. 発表標題 CDH13遺伝子の多型は血中アディポネクチン、内臓脂肪と独立してメタボリックシンドロームに関連している
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田紀久子、北本綾、北本卓也、小川祐二、本多靖、結束貴臣、米田正人、今城健人、留野涉、斉藤聡、中島淳
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝疾患におけるdifferentially methylated regions (DMRs)のネットワーク解析
3. 学会等名 第40回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北本綾、北本卓也、内田千晴、堀田紀久子
2. 発表標題 ADIPOQ遺伝子の多型は日本人女性においてインスリン抵抗性に関連している
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田紀久子、北本綾、北本卓也、小川祐二、本多靖、結束貴臣、米田正人、今城健人、留野涉、斉藤聡、中島淳
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝疾患のゲノムワイドメチル化解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田紀久子、北本綾、北本卓也、小川祐二、本多靖、結束貴臣、米田正人、今城健人、留野涉、斉藤聡、中島淳
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝疾患のゲノムワイドメチル化解析
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田紀久子、北本卓也、北本綾、小川祐二、本多靖、結束貴臣、米田正人、今城健人、中島淳
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝疾患のゲノムワイドメチル化解析
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	北本 卓也 (Kitamoto Takuya) (10456882)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術専門職員 (13802)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	内田 千晴 (Uchida Chiharu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------