

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461343

研究課題名(和文) 異所性脂肪蓄積の遺伝素因と環境因子の検索と前向き追跡調査での検証

研究課題名(英文) The search and prospective follow-up study of genetic predisposition and environmental factors of ectopic fat accumulation

研究代表者

堀田 紀久子 (Hotta, Kikuko)

大阪大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30360639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイド関連解析にて非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) と強い相関を示す PNPLA3 遺伝子領域を同定した。この領域のターゲット・リシーケンスを行い、PNPLA3 遺伝子領域が NAFLD の発症と進行に、PARVB 遺伝子領域が進行に関連していることを明らかにした。ターゲット・バイサルファイトシーケンスを行い、進行した NAFLD では PNPLA3 遺伝子上の CpG99 のメチル化が増加し、PNPLA3 の発現が低下していることを示した。rs738409 の MM 型でその傾向が強く表れ、遺伝子多型がエピゲノムに影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide association study (GWAS) was performed and revealed that SNP rs738409 in the PNPLA3 plays a key role in the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). We performed targeted next-generation sequence analysis and fine mapping of the linkage disequilibrium block containing PNPLA3 rs738409 and found that polymorphisms in the encoding the SAMM50 and PARVB are associated with the development and progression of NAFLD as well. We performed targeted-bisulfite sequencing and found that hypomethylation of CpG26 and hypermethylation of CpG99 may contribute to the severity of fibrosis in NAFLD. The levels of CpG99 methylation and PNPLA3 mRNA were affected by the rs738409 genotype.

研究分野：遺伝学

キーワード：非アルコール性脂肪肝疾患 内臓脂肪蓄積 次世代シーケンサー エピゲノム 遺伝子多型 メタボリックシンドローム

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内の脂肪蓄積はエネルギーの備蓄として意義が大きい。近年、カロリーの過剰摂取による必要以上の脂肪蓄積がもたらす健康障害が問題になってきている。皮下脂肪以外に蓄積される脂肪は異所性脂肪蓄積と称され、生活習慣病の発症に強く関与している。内臓脂肪蓄積は糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化症などの合併症、すなわちメタボリックシンドロームの基盤となる。これまで内臓脂肪蓄積が肥満合併症を惹起するメカニズムを明らかにするための研究を行ってきた。ヒト内臓脂肪の発現プロファイルを作成し新規の脂肪組織特異的発現遺伝子、ガレクチン 12 を同定した。アディポネクチンの血中濃度が糖尿病患者では正常耐糖能者に比較して低値であること、その機序としてアディポネクチンがインスリン感受性に関与していることを明らかにしてきた。

肥満や異所性脂肪蓄積に遺伝素因が重要である。SNP (single-nucleotide polymorphism) を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、新規の肥満関連遺伝子 SCG3 と MTMR9 を同定した。SCG3 は SCG2 を介して食欲調節ペプチドと分泌顆粒を形成することを明らかにし、遺伝子解析アプローチから視床下部における食欲調節機構の解明に発展させてきた。

異所性脂肪の代表である内臓脂肪蓄積に関連した遺伝子を検索するため、CT で測定した内臓脂肪面積と皮下脂肪面積のデータを用いた解析も進めてきた。

内臓脂肪以外での異所性脂肪蓄積では非アルコール性脂肪肝障害 (NAFLD) が注目されている。我々は NAFLD が PNPLA3 遺伝子上の SNP と強く相関し、線維化の進行とも相関していることを報告してきた。

## 2. 研究の目的

配列特異的なプライマーを設計し、long PCR にて 100kb 以上の大きな連鎖不平衡 (LD) 領域を解析する方法を確立する。この方法を用いて、内臓脂肪面積や NAFLD に関連する領域のリシークエンスを行い、異所性脂肪蓄積に関連している多型を同定し関連解析を行うことを目的とする。候補領域の肝臓でのエピゲノム解析と遺伝子多型解析を行う。

## 3. 研究の方法

京都大学医学部、大阪大学、横浜市立大学医学部での倫理委員会での承認を受けた。また参加者に書面によるインフォームドコンセントを行い、同意を得た。

### (1) NAFLD 候補遺伝子多型の解析

既報の LYPLAL1、ZP4、GCKR、HSD17B13、PALLD、PPP1R3B、FDFT1、TRIB1、COL13A1、CPN1、ERLIN1、CWF19L1、EFCAB4B、PZP、NCAN 遺伝子上や近傍に存在する 18 カ所の SNP についてインベーター法にてタイピングを行った。540 人の NAFLD 患者と 1012 人のコントロールでこれら

の SNP と NAFLD との関連解析を行った。

### (2) NAFLD の GWAS 研究

NAFLD 症例 392 人、コントロール 934 人の血液ゲノムを用いて GWAS を行った。P 値が  $5.0 \times 10^{-5}$  未満の SNP について NAFLD 症例 172 人、コントロール 1012 人でインベーター法にてタイピングを行い PLINK、R で解析した。

### (3) Long PCR によるターゲットゲノム領域の増幅と次世代シーケンサーによる解析

28 人の NAFLD 患者の血液ゲノムを用いて、GWAS により同定した PNPLA3 遺伝子領域を含む約 100kb の領域を PCR にて増幅し、次世代シーケンサーにて解析した。BWA にて UCSC hg19 にマッピングを行い、SAMtools と Picard でフォーマット変換、ソート、インデックス付与、重複除去を行った。多型抽出は GATK を用い、ANNOVAR にてアノテーション付与を行った。同定した多型を 540 人の NAFLD と 1012 人のコントロールの血液ゲノムを用いてタイピングを行った。結果を PLINK と R で解析した。

### (4) Targeted-bisulfite sequence によるメチル化解析

60 人の NAFLD 患者の肝生検時の肝臓組織からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った。PNPLA3、SAMM50、PARVB 遺伝子の発現調節領域に存在する CpG island (CpG99、CpG71、CpG26、CpG101) を PCR にて増幅した。PCR 産物を次世代シーケンサーにてシーケンスを行った。UCSC hg19 に対するアライメントは Bismark と Bowtie 2 にて行った。フォーマット変換、ソート、インデックス付与は SAMtools を用いた。重複除去には Picard を用いた。メチル化シトシン抽出には Bismark を用いた。NAFLD 患者を繊維化レベルに応じて、軽症群 (繊維化 0-1)、進行群 (繊維化 2-3) に分けて解析した。

### (5) NAFLD の肝臓での発現解析及びメチル化、遺伝子多型との総合解析

(4) と同じ症例の肝生検組織より RNA を抽出した。PNPLA3、SAMM50、PARVB 遺伝子を qPCR にて定量した。mRNA レベルとメチル化の関連を検討した。NAFLD 発症に最も強く関連している rs738409 (I148M) について血液ゲノムでタイピングを行い、リスクアレル MM 型とそれ以外 (IM+II 型) に分けて、メチル化及び発現に及ぼす影響を検討した。

### (6) アディポネクチン、内臓脂肪面積、メタボリックシンドロームに及ぼす遺伝子多型の検討

CT で測定した内臓脂肪面積のある 945 人の血液ゲノムを用いて、ADIPOQ 遺伝子とその結合タンパク遺伝子である CDH13 に存在する SNP をインベーター法にてタイピングを行った。血中アディポネクチン値を測定し、インスリン抵抗性、内臓脂肪面積、メタボリックシンドロームとの関連を構造方程式モデリング (SEM) にて検討した。

## 4. 研究成果

( 1 ) NAFLD 候補遺伝子多型の解析

TRIB rs2954021 と GCKR rs780094 多型が日本人でも NAFLD と関連することを明らかにした。これらの SNP は PNPLA3 rs738409 多型と独立に NAFLD 発症に関与していた (表 1)。GCKR rs780094 は内臓脂肪面積 / 皮下脂肪面積の比の増加、中性脂肪の増加、血糖値の低下と関連していた。GCKR 遺伝子はメタボリックシンドロームとしての NAFLD 発症に関連していることが示唆された。

表 1 . 3SNP と NAFLD の関連性

SNP	P-value	OR (95% CI)
PNPLA3 rs738409	$4.1 \times 10^{-13}$	2.20 (1.78 - 2.72)
TRIB1 rs2954021	$9.7 \times 10^{-5}$	1.52 (1.23 - 1.88)
GCKR rs780094	0.0011	1.42 (1.15 - 1.76)

( 2 ) NAFLD の GWAS 研究

クオリティーチェックをクリアした 261,540 SNPs のうち p 値が  $5.0 \times 10^{-5}$  未満の SNP について第 2 セットで解析した結果、PNPLA3 遺伝子領域が最も強い相関を示した (図 1)。

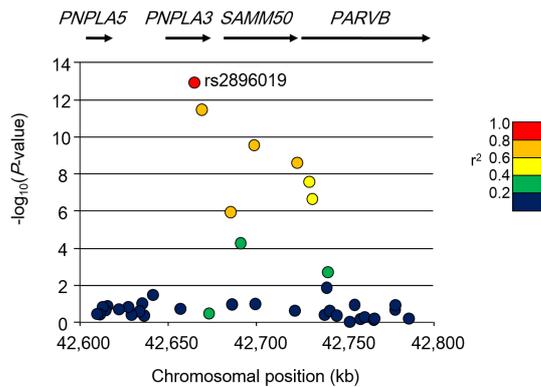


図 1 .GWAS で有意差を認めた領域

( 3 ) Long PCR によるターゲットゲノム領域の増幅と次世代シーケンサーによる解析

配列特異的プライマーを設計し PNPLA3、SAMM50、PARVB 遺伝子領域を増幅した (図 2)。173 SNPs と 7 個の挿入/欠失をタイピングし詳細な LD マップを作製した (図 3)。この領域は 4 つのブロックに分かれ、ブロック 2-4 の多型は NAFLD 発症と強く相関していた (図 4)。ブロック 4 の多型は組織所見の hepatocyte ballooning と NAS に、ブロック 2 の多型は NAFLD の進行指標の NAS と有意な相関を認めた (図 5)。

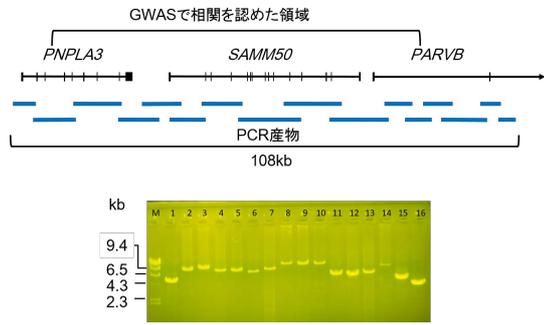


図 2 . ターゲットゲノム領域の増幅

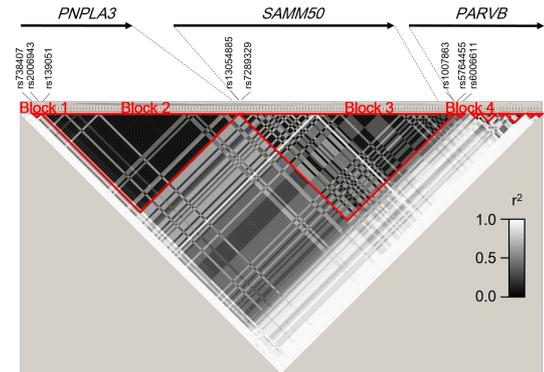


図 3 . 詳細な LD マップ

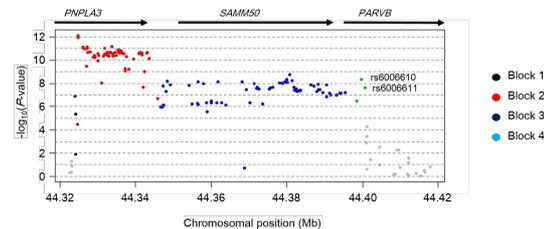


図 4 . ケース・コントロール相関解析

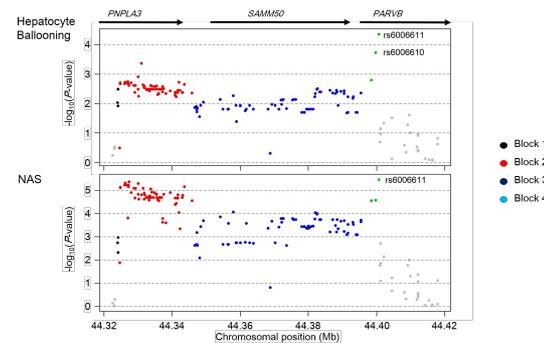


図 5 . 組織所見と遺伝子多型の関連解析

( 4 ) Targeted-bisulfite sequence によるメチル化解析

バイサルファイト処理した肝臓ゲノム DNA を特異的配列のプライマーを用いて PCR で増幅した (図 6)。CpG99 では進行群の方でメチル化レベルが有意に上昇していた。CpG26 では進行群で有意に低下していた (図 7)。rs738409 (I148M) の MM 型では CpG99 の有意差が認められたが、IM あるいは II 型では有意差を認めなかった。CpG26 では MM 型でも

IMまたはII型でも有意差を認めた。rs738409 (I148M)の多型は CpG99 のメチル化レベルに影響することが判明した。

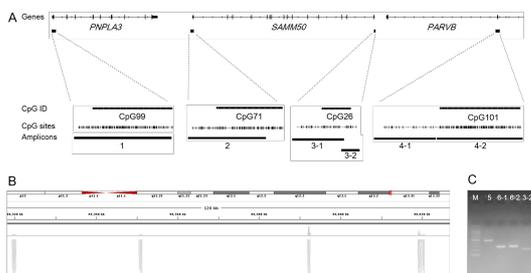


図6 . CpG island と PCR にて増幅した領域

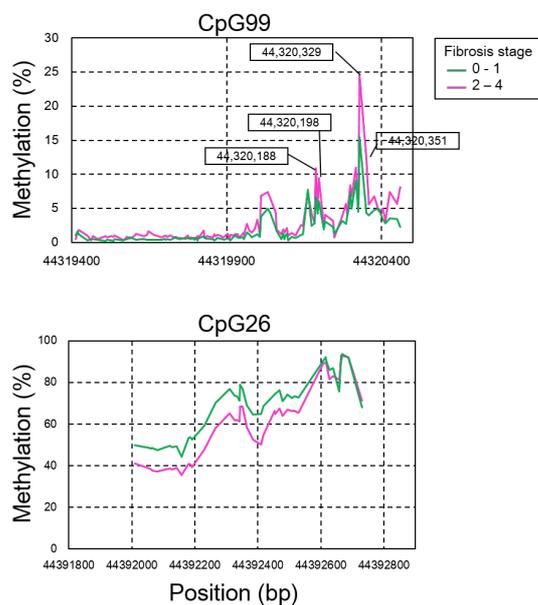


図7 . CpG99 と CpG26 のメチル化レベル

(5) NAFLD の肝臓での発現解析及びメチル化、遺伝子多型との総合解析

PNPLA 3mRNA は rs738409 (I148M)の MM 型の進行群で発現低下していた。IM 型と II 型では軽症群と進行群で有意差は認められなかった。MM 群では mRNA レベルとメチル化レベルが逆相関していた(図8)。PNPLA3 に関しては MM 多型でメチル化が増加し、発現を低下させること、その結果繊維化が進行していることが推察された。

(6) アディポネクチン、内臓脂肪面積、メタボリックシンドロームに及ぼす遺伝子多型の検討

ADIPOQ 遺伝子の rs10937273 と rs1648707 は血中アディポネクチン低下とインスリン抵抗性指標の HOMA-1R 上昇と女性のみで有意な相関を認めた ( $P=0.0030$ ,  $P=0.00074$ )。これの SNP は脂肪量とは独立にアディポネクチンを低下させ、インスリン抵抗性を惹起することが示された。

アディポネクチンに結合する T-cadherin

の遺伝子である CDH13 の SNP は血中アディポネクチンの増加と関連していた。アディポネクチンの増加はメタボリックシンドロームに対して予防的に作用するが、CDH13 の遺伝子多型は有意に増悪させていた。CDH13 の多型はアディポネクチンと結合する T-cadherin の発現を低下させ、アディポネクチンの作用が悪くなりメタボリックシンドロームを発症する機序が考えられた。

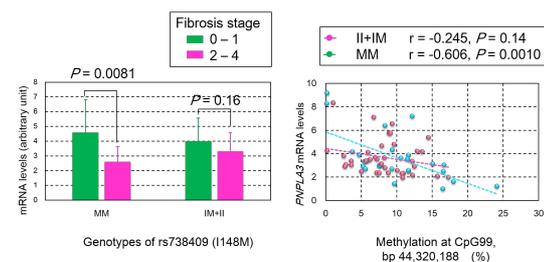


図8 . PNPLA3 の発現とメチル化レベル

## 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 11 件)

Honda Y, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Tomeno W, Imajo K, Mawatari H, Fujita K, Hyogo H, Ueno T, Chayama K, Saito S, Nakajima A, Hotta K. The characteristics of non-obese NAFLD: Effect of genetic and environmental factors. Hepatol Res, in press. doi: 10.1111/hepr.12648. 査読有

Kitamoto A, Kitamoto T, Nakamura T, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Mineo I, Wada J, Ogawa Y, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Hotta K. CDH13 Polymorphisms are Associated with Adiponectin Levels and Metabolic Syndrome Traits Independently of Visceral Fat Mass. J Atheroscler Thromb 2016;23(3):309-319. doi: 10.5551/jat.31567. 査読有

Kan H, Hyogo H, Ochi H, Hotta K, Fukuhara T, Kobayashi T, Naeshiro N, Honda Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Chayama K. Influence of the rs738409 polymorphism in patatin-like phospholipase 3 on the treatment efficacy of non-alcoholic fatty liver

disease with type 2 diabetes mellitus. *Hepatol Res* 2016;46(3):E146-153. doi: 10.1111/hepr.12552. 査読有

Kitamoto A, Kitamoto T, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Mineo I, Wada J, Ogawa Y, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Hotta K. ADIPOQ polymorphisms are associated with insulin resistance in Japanese women. *Endocr J* 2015;62(6):513-521. doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0574. 査読有

Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Imajo K, Saito S, Yoneda M, Nakamura T, Nakajima A, Hotta K. Targeted-bisulfite sequence analysis of the methylation of CpG islands in genes encoding PNPLA3, SAMM50, and PARVB of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2015;63(2):494-502. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.049. 査読有

Matsuo T, Nakata Y, Hotta K, Tanaka K. The FTO genotype as a useful predictor of body weight maintenance: initial data from a 5-year follow-up study. *Metabolism* 2014;63(7):912-917. doi: 10.1016/j.metabol.2014.03.013. 査読有

Kitamoto A, Kitamoto T, Nakamura T, Ogawa Y, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Nakao K, Sekine A, Chayama K, Nakajima A, Hotta K. Association of polymorphisms in GCKR and TRIB1 with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome traits. *Endocr J* 2014;61(7):683-689. 査読有

He D, Fu M, Miao S, Hotta K, Chandak GR, Xi B. FTO gene variant and risk of hypertension: a meta-analysis of 57,464 hypertensive cases and 41,256 controls. *Metabolism* 2014;63(5):633-639. doi: 10.1016/j.metabol.2014.02.008. 査読有

Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Nakao K, Sekine A, Chayama K, Nakajima A, Hotta K. Targeted next-generation

sequencing and fine linkage disequilibrium mapping reveals association of PNPLA3 and PARVB with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *J Hum Genet* 2014;59(5):241-246. doi: 10.1038/jhg.2014.17. 査読有

Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Chayama K, Hamaguchi K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Sakata T, Tanaka K, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A, Hotta K. NUDT3 rs206936 is associated with body mass index in obese Japanese women. *Endocr J* 2013;60(8):991-1000. 査読有

Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Teranishi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A, Hotta K. Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hum Genet* 2013;132(7):783-792. doi: 10.1007/s00439-013-1294-3. 査読有

〔学会発表〕(計 11件)

堀田紀久子、北本卓也、北本綾、小川祐二、中島淳「非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) のエピゲノム解析」日本人類遺伝学会第 60 回大会 (2015 年 10 月、東京都新宿区)

堀田紀久子、小川祐二、本多靖、米田正人、中島淳「非アルコール性脂肪肝疾患のエピゲノム解析」第 36 回日本肥満学会 (2015 年 10 月、愛知県名古屋市)

堀田紀久子、北本卓也、北本綾、米田正人、小川裕二、中島淳「非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) のエピゲノム解析」第 2 回肝臓と糖尿病・代謝研究 (2015 年 5 月、山口県下関市)

堀田紀久子、北本卓也、北本綾、兵庫秀幸、越智秀典、上野隆登、茶山一彰、米田正人、小川裕二、中島淳「非アルコール性脂肪肝疾患感受性領域の次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンス」日本人類遺伝学会第 59 回大会 (2014 年

11月、東京都江戸川区)

堀田紀久子, 北本綾, 北本卓也, 小川裕二, 米田正人, 上野隆登, 兵庫秀幸, 越智秀典, 茶山一彰, 中島淳「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」第35回日本肥満学会(2014年10月、宮崎県宮崎市)

Hotta K, Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Ueno T, Chayama K, Nakajima A「Targeted next-generation sequencing and fine linkage disequilibrium mapping reveals association of PNPLA3 and PARVB with the severity of nonalcoholic fatty liver disease」9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress(2014年9月、京都府京都市)

堀田紀久子「シンポジウム4: 肥満症の成因と疫学~成因のコントロールによる効果的な予防~ 肥満症の遺伝素因」第34回日本肥満学会(2013年10月、東京都千代田区)

堀田紀久子, 中尾一和「非アルコール性脂肪肝疾患のゲノムワイド関連解析」第34回日本肥満学会(2013年10月、東京都千代田区)

堀田紀久子「ランチョンセミナー2 異所性脂肪蓄積の遺伝要因」第45回日本臨床分子形態学会総会・学術集会(2013年9月、福岡県福岡市)

堀田紀久子「特別シンポジウム4: 糖尿病関連遺伝子研究の進化 肥満及び肥満症関連遺伝子」第56回日本糖尿病学会年次学術集会(2013年5月、熊本県熊本市)

堀田紀久子, 松尾知明, 中田由夫, 兵庫秀幸, 越智秀典, 蒲原聖可, 小谷一晃, 伊藤直人, 嶺尾郁夫, 和田淳, 米田正人, 中島淳, 船橋徹, 宮崎滋, 徳永勝人, 益崎裕章, 茶山一彰, 上野隆登, 浜口和之, 山田研太郎, 花房俊昭, 及川眞一, 坂田利家, 田中喜代次, 松澤佑次, 中尾一和「ウエスト: ヒップ比及びBMI感受性遺伝子多型の内臓脂肪及び皮下脂肪面積に及ぼす効果」第56回日本糖尿病学会年次学術集会(2013年5月、熊本県熊本市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

堀田 紀久子 (HOTTA, Kikuko)  
大阪大学医学部附属病院・講師  
研究者番号: 30360639

##### (2) 研究分担者

北本 卓也 (KITAMOO, Takuya)  
京都大学大学院医学研究科・特定技術職員  
研究者番号: 10456882

北本 綾 (KITAMOO, Aya)  
京都大学大学院医学研究科・教務補佐  
研究者番号: 30381627

##### (3) 連携研究者

米田 正人 (YONEDA, Masato)  
横浜市立大学大学院・助教  
研究者番号: 10423831

兵庫 秀幸 (HYOGO, Hideyuki)  
広島大学学内共同利用施設等・助教  
研究者番号: 40397930