

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293144

研究課題名(和文)長期追跡コホート研究の保存白血球を用いたDNAのメチル化解析

研究課題名(英文) Analysis of the methylation status of leukocytes DNA stored in a longitudinal cohort study

研究代表者

鈴木 康司 (Suzuki, Koji)

藤田保健衛生大学・保健学研究科・教授

研究者番号：60288470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクスの機構の1つにDNAのメチル化があり、DNAメチル化の変化による遺伝子発現調節が生活習慣病の発症に重要な役割を担うと考えられている。我々は白血球LINE-1 DNAメチル化率の測定法を確立し、住民健診受診者を対象としてメタボリックシンドロームとの関連、さらに縦断調査により死亡に及ぼす影響の評価を行った。その結果、白血球LINE-1 DNAの低メチル化はメタボリックシンドローム及び脂質異常と有意な関連を認めた。さらに白血球LINE-1 DNAの高メチル化群では癌死亡リスクが高かった。LINE-1 DNAメチル化率の変化がその後発生する癌死亡に影響を及ぼすことが推察された。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is one of epigenetic mechanism that regulate gene expression without alternations of DNA sequences. Alteration of DNA methylation is implicated to the regulation of genetic expression and several diseases. Methylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) LINE-1 has been associated with genome instability, and is a surrogate maker of global DNA methylation. We established a method for measuring leukocyte LINE-1 DNA methylation level and examined whether LINE-1 methylation is associated with metabolic syndrome in cross-sectional study and whether LINE-1 methylation related to mortality rate. We found that low LINE-1 DNA methylation in leukocyte was significantly associated with metabolic syndrome and dyslipidemia. In longitudinal study, high methylation status of LINE-1 in leukocyte is significantly associated with high cancer mortality rate. Alteration of DNA methylation may affect subsequent cancer deaths.

研究分野：疫学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 コホート 生活習慣病 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

我が国では増加する生活習慣病対策は重要な課題であり、生活習慣病の発症とライフスタイルとの関連については、多くの疫学研究により科学的エビデンスが蓄積され始めている。遺伝要因については遺伝子多型の研究が進められているが、遺伝子多型で説明可能な事象は当初の予想より少ないと考えられているのが現状である。近年、DNA 配列の変化を伴わず、後天的な修飾により遺伝子発現が制御される仕組みであるエピジェネティクスが、疾病発生に重要な役割を果たすことが様々な研究から示唆されている。エピジェネティクスの機構の1つに DNA のメチル化がある。DNA メチル化は、シトシンへのメチル基の付加反応であり、メチル化された遺伝子は不活性化される。癌細胞においては、DNA メチル化異常が多く報告され、発症との関連が注目を集めている。また、一般住民を対象とした疫学研究により性や年齢、喫煙習慣、飲酒習慣、などの相違により白血球 DNA メチル化レベルが異なることが報告されている。さらに、白血球 DNA メチル化の異常が癌リスクのバイオマーカーとなりうるということが報告されている。白血球 DNA のメチル化異常は、ライフスタイルなどの相違により様々な組織(細胞)で起こっているメチル化異常を反映している可能性が推察される。しかし生活習慣等による DNA メチル化の変化による遺伝子発現調節が生活習慣病の発症に重要な役割を担うと考えられているが、疫学分野における DNA メチル化に関する一般住民を対象とした研究は少なく、エピジェネティクスの観点からの科学的エビデンスは未だ乏しい状況にある。

我々は、昭和 57 年より北海道二海郡八雲町の住民検診に参画し、受診者を対象とした生活習慣病予防に関する血清疫学研究をおこなってきた。しかしながら、これら研究のみでは疾患発症の予測性は低く、メカニズム

も不明な点が多い。そこで我々は、エピジェネティクスの視点からの疾患発症に着目し研究を進めている。最近ではエピジェネティクスの機構の1つである microRNA (miRNA) に焦点を当て、血清 miRNA レベルと疾患との関連について研究も行い、非アルコール性脂肪肝では血清 miRNA-122 レベルが高く、さらに脂肪肝の重症度に比例することを報告するなどの成果を上げている。

これらの研究からも生活習慣がエピジェネティクスの機構に深く関わりを持ち、エピジェネティックな変化を明らかにすることで新たな疾病発生のメカニズムの解明に繋がる。我々は平成 2~3 年に住民検診を受診した者の白血球を、DNA 解析を行うために現在まで保存してきた。さらに住民検診受診者を対象とした縦断的研究のために、当時の健診結果、生活習慣等のアンケート調査結果および現在までの死亡データが保存されている。したがって、これらのデータと DNA メチル化との関連を調査することが可能である。このような縦断研究による DNA メチル化レベルの解析は今まで行われていない。そこで保存白血球の DNA メチル化を測定し、生活習慣などとの関連について調査を行い、さらに縦断研究により得られた癌や循環器疾患死亡に及ぼす影響を評価することにより、疾病発生のメカニズム解明に寄与する。

2. 研究の目的

本研究は、住民検診受診者を対象として、白血球 DNA メチル化レベルを測定し、白血球 DNA メチル化レベルとメタボリックシンドローム及びその構成要素との関連について検討を行い、さらに白血球 DNA メチル化レベルと癌および循環器疾患死亡に及ぼす影響の評価を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 解析対象

平成 2~3 年および平成 27~28 年に住民健診を受診した者のうち、研究参加に同意を得た者を対象とした。これらの対象者については、検診項目である身長、体重、body mass index、血圧、尿検査、血液検査（貧血、血糖、脂質、肝機能、腎機能、尿酸など）、食習慣、喫煙習慣、飲酒習慣、身体活動などについてアンケート調査により情報を得た。平成 2~3 年の対象者については現在までの死亡・転出データなどのエンドポイントデータについても保管している。

(2)DNA メチル化解析

白血球からゲノム DNA を抽出し、DNA のメチル化解析を行った。末梢血からのゲノム DNA の抽出はシリカメンブレン付きスピニングカラムを利用して抽出と精製を行った。DNA のメチル化解析の原理は測定機器（PyroMarkQ24 QIAGEN 社）を使用して、Pyrosequencing による定量的解析法を採用した。メチル化率の算出は PyroMark Q96 ID Software を使用した。本研究では、疾病発症や生活習慣などに関連が示唆されている最も代表的な繰り返し配列である long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) について解析を行った。LINE-1 メチル化レベルは、pyrosequencing 法によって LINE-1 の 3 つの CpG site を測定した。

(3)データベース作成

解析を行った白血球 DNA メチル化データは、アンケート調査データや検診結果と結合しデータベースの作成を行った。住民健診では、身長、体重、Body mass index、血圧、尿検査、血液検査（貧血、血糖、脂質、肝機能、腎機能、尿酸など）を行い、また食習慣、喫煙習慣、飲酒習慣、職業などについてアンケート調査を実施した。これらのデータは追跡調査のためにすべて保管しており、さらに現在までの死亡・転出データも含め、すべてのデータを結合し、データベースを作成した。

4 . 研究成果

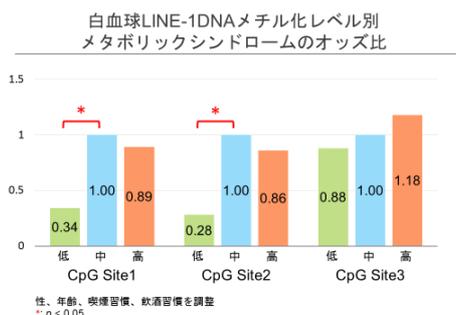
(1)白血球 LINE-1 DNA メチル化レベルとメタボリックシンドローム及びその構成要素との関連

血糖は 110mg/dl 以上、HbA1c は 6.2% 以上を高値群と定義し、白血球 DNA の LINE-1 メチル化レベルと血糖及びヘモグロビン A1c(HbA1c)との関連について検討を行った。LINE-1 メチル化レベル別の糖代謝指標高値のオッズ比および 95%信頼区間(95%CI)は、LINE-1 メチル化レベルを 3 等分し、中間群を基準としてロジスティック回帰分析により算出した。調整項目には性、年齢、喫煙習慣、飲酒習慣、BMI、拡張期血圧、中性脂肪値、好中球割合を用いた。その結果、白血球 LINE-1DNA の 2nd 及び 3rd CpG site の低メチル化群は、HbA1c 高値のオッズ比 (OR) がそれぞれ 3.99 (95%信頼区間 (95%CI) = 1.27-14.54)、3.44 (3.44 (1.07-13.38) と有意に高い結果を得た。血糖高値と有意な関連は認めなかった。

白血球 LINE-1DNA メチル化レベルと脂質異常 (中性脂肪、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール)との関連について検討を行った。中性脂肪、HDL-コレステロール、LDL-コレステロールは、それぞれ 150mg/ml 以上、140mg/dl 以上、40mg/dl 未満を異常とした。その結果、高 LDL-コレステロール群は LINE-1DNA のメチル化率が有意に高い結果を得た (LDL 高値群 : 57.55 ± 3.10% vs LDL 低値群 56.75 ± 2.74%)。さらに LDL/HDL 比の高値群でも LINE-1DNA のメチル化率が有意に高い結果を得た (高 L/H 比群 : 57.55 ± 3.10% vs 低 L/H 比群 56.75 ± 2.74%)。さらに中性脂肪、HDL-コレステロール、LDL-コレステロールの異常値の個数が多い者ほど、LINE-1DNA 低メチル化との関連を認めた。

白血球 LINE-1 DNA メチル化レベルとメタボリックシンドロームとの関連について検討を行った。その結果、白血球 LINE-1DNA の

1st CpG site 及び 2nd CpG site の低メチル化群はメタボリックシンドロームのオッズ比が有意に低い結果を得た (1st CpG site : OR=0.35(95%CI=0.13-0.84)、2nd CpG site : OR=0.28 (95%CI=0.10-0.68))



(2)白血球 LINE-1 DNA メチル化レベルと死亡との関連

平成 2~3 年の住民健診受診者 822 名を対象として、ベースライン時の白血球 DNA メチル化レベルとその後の死亡との関連について解析を行った。約 25 年間の追跡期間中に 258 名の死亡があり、そのうち 88 名が癌死亡、76 名が循環器疾患死亡であった。対象者を LINE-1 DNA メチル化レベルで 3 等分し、低メチル化群を reference として、LINE-1DNA メチル化レベルとがん死亡との関連を調査した結果、1st CpG site の中間群、高メチル化群で有意に高いハザード比を得た。全死亡においても同様に中間群と高メチル化群でハザード比が高い傾向を得た。

(3)考察

LINE-1 はヒトゲノム全体にわたって、その由来配列が存在する転位因子であり、ゲノム全体の約 17% を占める。そのため LINE-1 DNA メチル化はゲノム全体のメチル化レベルを知る有用なマーカーとされている。染色体不安定性や遺伝子変異に深く関与すると考えられており、癌の発育・進展に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。大腸がんなどの多くの癌細胞や前癌状態では LINE-1 の低メチル化が報告されている。今回の我々の解析結果からは白血球 LINE-1 DNA

高メチル化とがん死亡との関連が示唆された。白血球の LINE-1 DNA メチル化レベルの変化が起こる機序は明らかではないが、前がん病変などの変化を表している可能性が示唆される。今後慎重に解析し、さらに白血球 DNA メチル化レベルについては、代謝や炎症などに関与する個々の遺伝子のメチル化レベルの測定も含め今後検討を行っていく予定である。

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 1 件)

Suzuki K, Yamada H, Nagura A, Ohashi K., Ishikawa H, Yamazaki M, Ando Y, Ichino N, Osakabe K, Sugimoto K, Hamajima N, Inoue T. Association of cigarette smoking with serum microRNA expression among middle-aged Japanese adults. Fujita Medical Journal. 2016: 2(1), 1-5. (査読有)
DOI:10.20407/fmj.2.1_1

[学会発表] (計 9 件)

鈴木康司, 山田宏哉, 宗綱栄二, 山崎未来, 坪井良樹, 近藤真里, 水野元貴, 村瀬悠里, 近藤奏子, 太田駿瑠, 大橋鉦二, 石川浩章, 井上 孝, 橋本修二, 浜島信之. 住民健診受診者における白血球 DNA メチル化レベルと糖代謝指標値との関連. 第 27 回日本疫学会学術総会 2017.01.25-27, 山梨県・甲府・ベルクラシック甲府
坪井良樹, 山田宏哉, 宗綱栄二, 山崎未来, 近藤真里, 水野元貴, 村瀬悠里, 近藤奏子, 太田駿瑠, 大橋鉦二, 石川浩章, 井上 孝, 橋本修二, 浜島信之, 鈴木康司. 住民健診受診者における白血球 DNA

メチル化率と 脂質異常症との関連. 第 27 回日本疫学会学術総会 2017.01.25-27, 山梨県・甲府・ベルクラシック甲府
Suzuki K, Yamada H, Munetsuna E, Yamazaki M, Tsuboi Y, Kondo K, Ohashi K, Ishikawa H, Mizuno G, Murase Y, Kondo K, Ichino N, Sugimoto K, Osakabe K, Inoue T, Hashimoto S, Hamajima N. LINE-1 DNA methylation levels in leukocyte and hyperglycemia in a Japanese population. 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress., 2016.11.26-29., Taipei(China).
Tsuboi Y, Yamada H, Munetsuna E, Yamazaki M, Mizuno G, Murase Y, Kondo K, Ota T, Ohashi K, Ishikawa H, Ichino N, Sugimoto K, Osakabe K, Kondo M, Inoue T, Suzuki K. Association between LINE-1 DNA methylation levels in leukocyte and metabolic syndrome in a Japanese population., 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress., 2016.11.26-29., Taipei(China).
山田宏哉、菅沼萌果、鈴木康司、市野直浩、石川浩章、大橋鉦二、川戸美由紀、谷脇弘茂、栗田秀樹、橋本修二. Lipoprotein lipase promoter の定量的 DNA メチル化解析法の確立. 第 48 回藤田学園医学会, 愛知県・豊明・フジタホール 500
山田宏哉、鈴木康司、橋本修二. Pyrosequencing による脂質代謝関連遺伝子の定量的 DNA メチル化解析法の確立. 第 74 回日本公衆衛生学会総会, 長崎県長崎・長崎ブリックホール

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 康司 (SUZUKI, Koji)

藤田保健衛生大学・保健学研究科・教授
研究者番号: 60288470

(2) 研究分担者

山田 宏哉 (YAMADA, Hiroya)

藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号: 80610352

橋本 修二 (HASHIMOTO, Shuji)

藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 50148334

(3) 連携研究者

浜島 信之 (HAMAJIMA, Nobuyuki)

名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 30172969

〔図書〕(計 0 件)