

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04151

研究課題名(和文) DNAメチル化情報に基づく細胞加齢尺度の開発

研究課題名(英文) Genome-wide methylation profiles to develop a predictive model for the human biological age

研究代表者

人見 次郎 (Hitomi, Jiro)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：00218728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：「東北メディカル・メガバンク計画」登録者の中の196名の末梢血単核球について、DNAメチル化状態の個人間バリエーションの高いCpG領域の中から、20%以上の個人間バリエーションを示す2MCpG領域についてキャプチャシーケンス法によりDNAメチル化解析を行ない、145名の末梢血単核球のDNAメチローム情報を取得した。既に取得済の384名(男性113名)の末梢血単核球のDNAメチローム情報を探索群、145名(男性75名)を検証群として、細胞年齢のDNAメチル化マーカーを探索した。個人間のバリエーションはおおよそ20%の範囲にあると見積もられ、このパラツキは老年層では拡大する傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は老化のメカニズムを解明することを目的としている。老化はDNAのメチル化が深く関わっていると考えられており、これまでの研究では「細胞分化に関与しているゲノム領域が加齢のDNAマーカーになりやすい」との仮説に基づき、細胞分化に係るDNAのCpG領域を中心にDNAのメチル化解析が進められてきた。しかし、本研究では個人間バリエーションの高い領域に注目し、解析を行なったが、個人間のバリエーションのパラツキは老年層でさらに拡大する傾向を示した。個人間バリエーションの高い領域に注目することで、個人間の「年の取り易さ」の差異を考慮した精度の高い「細胞加齢尺度」の開発できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：We have established the idea that common DNA methylation (DNAm) variations (CDMV) are more likely to be associated with environmental exposures or biomedical traits than rare DNAm variations(Hachiya et al., 2017). Based on this CDMV strategy, we have developed methyl-capture sequencing method with newly designed catalogues of inter-individually variable CpG sites as targets for DNAm profiling, whose efficacy were estimated significantly higher than that of the most frequently used EWAS methods. Utilizing this novel method, we obtained genome-wide CDMV profiles of peripheral blood mononuclear cells from 529 individuals recruited as part of the Tohoku Medical Megabank Project. Participants were divided into two groups, G1(384, including 113 males), G2 (145, including 75 males) aged 20 to 86 years. We attempted to establish the calculation method to identify the DNAm biomarkers of cellular biological age as a predicting model for the human biological age.

研究分野：解剖学

キーワード：エピゲノム メチローム 生物学的年齢 末梢血単核球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

CpG サイトのシトシンにメチル基が付加される DNA メチル化のようなエピジェネティック機構は、遺伝子発現を制御し、個体の発生過程で不可欠な役割を果たしている。加えて、SNP などのゲノムの変異とは異なり、個体が生きている全期間を通じて、様々な組織の細胞の DNA メチル化の状態は様々な曝露因子により影響を受けて変化する。

そこで、DNA メチル化情報を解析することが、疾患発症の早期マーカーを見つけることに繋がる可能性が高いと考えられ、ヒトの集団を対象に、特に血液細胞を用いて、全ゲノム範囲で DNA メチル化解析を行う研究がなされてきた。現在、DNA メチル化プロファイルは加齢・喫煙・飲酒・ヒ素・血圧・BMI・2 型糖尿病・関節リウマチ・IgE・肺がん・統合失調症等の形質や疾患について、環境因子への曝露、疾患関連形質、疾患発症リスクとの関連が証明されている(図1)。

すなわち、精度の高い DNA メチル化プロファイルを測定することで、環境因子への曝露やリスク因子の進展という個体レベルの現象を、血球細胞を取り巻く生体内ストレス(酸化ストレス、炎症ストレス等)という細胞レベルの観点から捉えることが可能になる。

申請者らは、このプロファイリングの結果を「**細胞年齢尺度**」と呼んでいる。細胞年齢尺度は、個人の生理もしくは病態機能状態をモニタリングするツールとなる可能性が高く、個別の疾患、もしくは中間形質の DNA のメチル化マーカーの探索もまた効率化される。

ところで、「**細胞年齢尺度**」を考える際に、考慮すべきは、加齢の指標となる**生物学的年齢**である。「加齢」もしくは「高齢」は心血管疾患、がん、認知症など多くの疾患の発症リスクを増大させる危険因子であり、加齢性的変化と経年の生体内ストレスによる DNA メチル化の変化を区分することが、真の意味での疾患発症の

マーカーの発見の近道である。一方、生体内ストレスを取り除くことが出来れば(実際には不可能であるが)、生物学的年齢は皆等しいものになるのであろうか? ストレスに因らず、生物学的年齢の加速を規定するもの

も、それが DNA の SNP などの変異なのかメチル化(「**加齢尺度**」)なのか不明であるが、考慮するべきである。

加齢による DNA メチル化状態の変化について、2 つの研究がよく知られている。いずれも全ゲノム範囲の規模で CpG サイトの DNA メチル化状態を測定し、暦年齢を予測することを可能にした。例えば、Hannum ら<sup>1)</sup>はコホートの全血検体の DNA メチル化状態を測定して年齢予測法を考案し、また、Horvath<sup>2)</sup>は複数の組織の DNA メチル化の公開データを用いて年齢予測法を考案している。

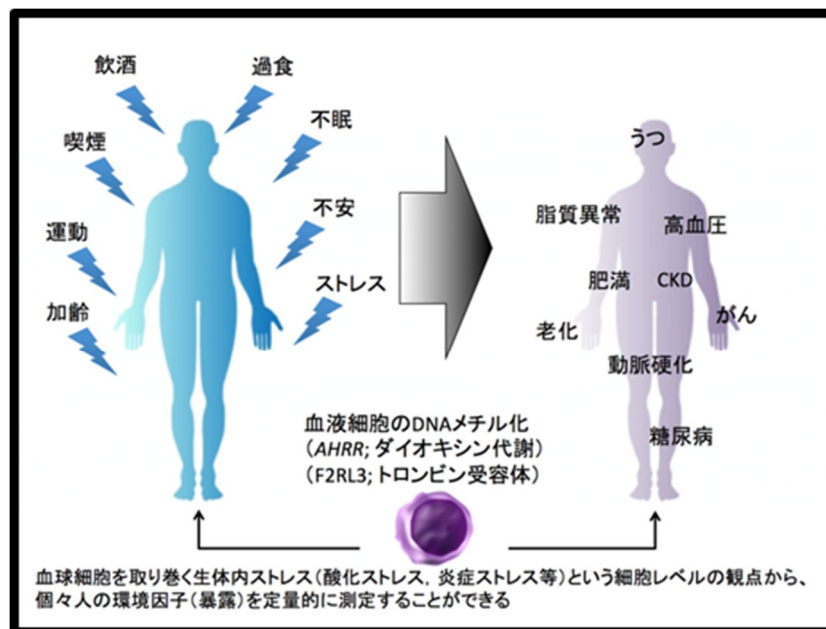


図 1

Marioni ら<sup>3)</sup>は、The Framingham heart Study も含めた 4 つのコホートの同一の検体(全血)を用いて、両者の予測法を比較検討しているが、Hannum らのメチル化年齢はいずれのコホートにおいても歴年齢よりも平均 2-6 歳上回り(標準偏差; 5 歳)、メチル化年齢と暦年齢との相関係数は 0.83 であったが、Horvath のメチル化年齢は 3 つのコホートで暦年齢よりも 1-5 歳下回り(標準偏差; 6 歳)、相関係数は 0.75 であった。両者のメチル化年齢の相関係数は 0.77 であった。さらに、メチル化年齢と暦年齢との差 age が、加齢に伴う疾病の発症と死亡のリスクに関係すると仮説し、4 つのコホートでコックス比例ハザードモデルを作成し、メタ解析したところ、Hannum らのメチル化年齢について、age が 5 歳以上であれば、性・年齢調整後、死亡リスクは 21%高くなることが示された。また、IQ、教育、社会階層、高血圧、糖尿病、心血管疾患、APOE 遺伝子異常を調整しても、死亡リスクはまだ 16%高いことが証明された。また、家系図に基づき、age の遺伝率を計算したところ、遺伝率は 43%と示された。

このことは、血液細胞の DNA メチル化プロファイルから導き出されるメチル化年齢は、遺伝形質であるとともに、健康状態、ライフスタイル、あるいは遺伝要因とは独立した生命予後の規定因子である可能性を示している。

## 2 . 研究の目的

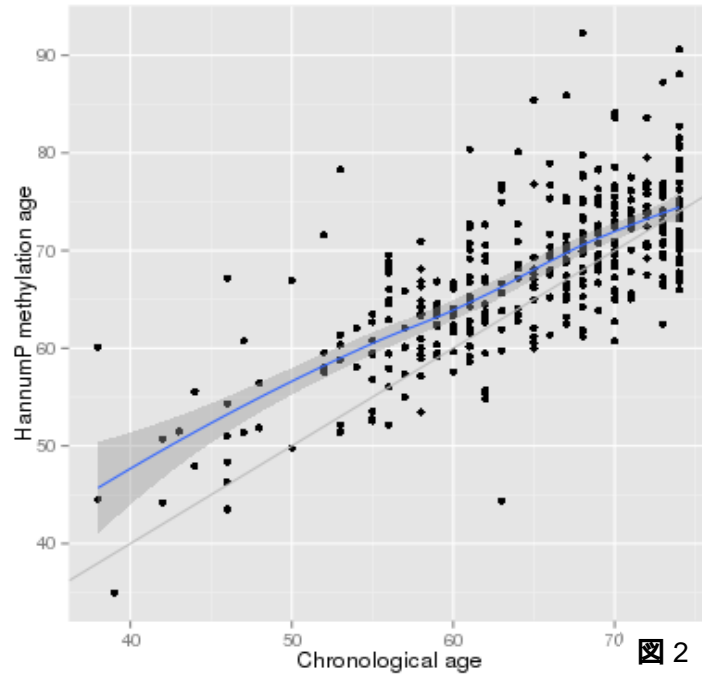
Hannum らの DNA メチル化年齢の予測法は、それぞれ暦年齢と高い一致率を示している、さらに全死因死亡率への関与も示された。では、もはや、彼らの予測法が生物学的年齢を捉えているといえるだろうか? 彼らの DNA メチル化年齢の算出に用いた CpG マーカーは 71 個で、アルツハイマー病やがんなどの疾患や肥満・代謝、DNA 修復に関係する遺伝子内やその近傍にあり、メチル化変化が遺伝子発現に影響を与えているとしている。このことから、Hannum らのメチル化年齢は、加齢による DNA のメチル化の生物学的変化を捉えている可能性が高いが、生物学的年齢の多様性を規定する因子(加齢の加速の差異)を見出すことが出来ない。そこで、本研究では、新しい手法を用いて、ヒトの生物学的年齢の多様性を規定する血液細胞の DNA メチル化プロファイル「細胞加齢尺度」を開発する。

## 3 . 研究の方法

全ゲノム範囲のジェノタイピングを行った 25 年度の登録者の 8740 人から、性・年齢層化抽出した 145 人について、20%以上の個人間バリエーションを示す領域をターゲットとするキャプチャシーケンス法(Hachiya et al., 2017)により、DNA メチル化プロファイルを取得した。具体的には、1 $\mu$ g の末梢血単核球(PMBC)由来のゲノム DNA を用いて、agilent SureSelectXT Methyl-seq ターゲットエンリッチメントシステムプロトコルに従いメチル化ライブラリーを作成した。ゲノムを 150-200bp に断片化後、アダプターライゲーションを行い、オリゴ DNA ライブラリー(Hachiya et al., 2017)とハイブリダイゼーションさせることによりキャプチャを行い、キャプチャされた DNA ライブラリーのバイサルファイト処理を行った。PCR によってインデックスタグを付加、増幅し、プールライブラリーを作成した。Illumina マルチプレックスシーケンシングを行い、得られた DNA メチル化情報を基に、「細胞年齢尺度」を検証した。

#### 4. 研究成果

老化は DNA のメチル化が深く関わっていると考えられており、これまでの研究では「細胞分化に参与しているゲノム領域が加齢の DNA マーカーになりやすい」との仮説に基づき、細胞分化に係る DNA の CpG 領域を中心に DNA のメチル化解析が進められてきた。しかし、本研究では個人間バリエーションの高い領域に注目し、解析を行なったが、個人間のバリエーションのバラツキは老年層でさらに拡大する傾向を示した（図 2）。個人間バリエーション



の低い領域に注目することで、個人間の「年の取り易さ」の差異を考慮した精度の高い「細胞加齢尺度」の開発できる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hachiya Tsuyoshi, Narita Akira, Ohmomo Hideki, Sutoh Yoichi, Komaki Shohei, Tanno Kozo, Satoh Mamoru, Sakata Kiyomi, Hitomi Jiro, Nakamura Motoyuki, Ogasawara Kuniaki, Yamamoto Masayuki, Sasaki Makoto, Hozawa Atsushi, Shimizu Atsushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Genome-wide analysis of polymorphism × sodium interaction effect on blood pressure identifies a novel 3'-BCL11B gene desert locus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-32074-1	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 Komaki Shohei, Shiwa Yuh, Furukawa Ryohei, Hachiya Tsuyoshi, Ohmomo Hideki, Otomo Ryo, Satoh Mamoru, Hitomi Jiro, Sobue Kenji, Sasaki Makoto, Shimizu Atsushi	4. 巻 5
2. 論文標題 iMETHYL: an integrative database of human DNA methylation, gene expression, and genomic variation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 18008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/hgv.2018.8	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 Hachiya Tsuyoshi, Furukawa Ryohei, Shiwa Yuh, Ohmomo Hideki, Ono Kanako, Katsuoka Fumiki, Nagasaki Masao, Yasuda Jun, Fuse Nobuo, Kinoshita Kengo, Yamamoto Masayuki, Tanno Kozo, Satoh Mamoru, Endo Ryujin, Sasaki Makoto, Sakata Kiyomi, Kobayashi Seiichiro, Ogasawara Kuniaki, Hitomi Jiro, Sobue Kenji, Shimizu Atsushi	4. 巻 2
2. 論文標題 Genome-wide identification of inter-individually variable DNA methylation sites improves the efficacy of epigenetic association studies	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 npj Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41525-017-0016-5	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 -

1. 著者名 Hachiya Tsuyoshi, Komaki Shohei, Hasegawa Yutaka, Ohmomo Hideki, Tanno Kozo, Hozawa Atsushi, Tamiya Gen, Yamamoto Masayuki, Ogasawara Kuniaki, Nakamura Motoyuki, Hitomi Jiro, Ishigaki Yasushi, Sasaki Makoto, Shimizu Atsushi	4. 巻 7
2. 論文標題 Genome-wide meta-analysis in Japanese populations identifies novel variants at the TMC6/TMC8 and SIX3/SIX2 loci associated with HbA1c	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-16493-0	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0件

〔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	三上 貴浩  (Mikami Takahiro)  (90804419)	岩手医科大学・医学部・助教   (31201)	
研究分担者	村嶋 亜紀  (Murashima Aki)  (50637105)	岩手医科大学・医学部・助教   (31201)	
研究分担者	丹野 高三  (Tanno Kozo)  (20327026)	岩手医科大学・医学部・准教授   (31201)	
研究分担者	寺山 靖夫  (Terayama Yasuo)  (70146596)	岩手医科大学・医学部・教授   (31201)	