

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08290

研究課題名(和文) ヒトにおける加齢に伴うエピゲノム変化の捕捉とその病的意義の解明

研究課題名(英文) A role of age-related DNA methylation change in disease pathogenesis

研究代表者

山本 健 (Yamamoto, Ken)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60274528

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)：加齢に伴いメチル化レベルが変化するDNAメチル化領域を7遺伝子領域に同定した。この中には、EPAやDHAの血中濃度に関与するELOVL2や2型糖尿病に関与するKLF14が含まれていた。ELOVL2領域の加齢応答エピゲノム領域をマウスで認め、肺、脾臓、大腸にて顕著であることを明らかにし、臓器特異性と種を越えて保存された現象であることを示した。心筋梗塞の発症あるいは病態形成に影響を与えるエピゲノム変化を同定した。また、ヒト由来不死化細胞におけるエピゲノムの特徴を解明した。さらに、加齢に伴うKLF14のDNAメチル化上昇をマウス脂肪細胞にて再現し、高脂肪食によってそれが助長されることを示した。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation sites whose methylation level changes with aging were identified on 7 gene regions. Among them, ELOVL2 involved in blood levels of EPA and DHA, and KLF14 involved in type 2 diabetes were included. The age-responsive epigenome region of the ELOVL2 was observed in mice, and it is remarkable in the lung, spleen and large intestine. This suggested that it is fundamental biological phenomenon conserved beyond species. Epigenomic changes affecting onset of myocardial infarction were identified. We also elucidated the characteristics of the epigenome in LCL derived from human. In addition, the increase in DNA methylation of KLF14 with aging was reproduced in mouse adipocytes and showed that it is promoted by a high fat diet.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：DNAメチレーション 加齢 ELOVL2 KLF14

## 1. 研究開始当初の背景

組織特異的な遺伝子発現制御の一端を担う DNA メチル化やヒストン修飾 (エピゲノム) は、細胞分裂後も維持されるクロマチンメモリーとして機能し、細胞の正常な分化・増殖に重要な役割を演じている。ゲノム配列と異なり、エピゲノムは環境因子による変化を許容すると考えられており、これは、個体が環境に適応し、生命活動の恒常性を維持するために不可欠な生体反応の一つである。このエピゲノムの生命維持における重要性に鑑みれば、その破綻が疾病発症をもたらすことは強く推測されるが、どのような環境因子がどのようにエピゲノムを変化させ、疾病罹患をはじめとする個体の表現型形成に寄与するかは、一部の単一遺伝病を除き、多くの疾病では不明であり、解明すべき重要な課題として残されていた。

モデル動物と異なり、ヒトは様々な環境に様々な程度で暴露されており、環境がエピゲノムに与える影響を捕捉するためには、臨床情報や詳細な生活習慣アンケートを備えた一定規模の検体数が必要となる。申請者らは加齢による DNA メチル化変化の可能性に着目し、約 480 名の一般住民集団より得た末梢血由来 DNA 検体を用い、45 万 DNA メチル化サイトのメチル化レベルと加齢との関連を解析し、補正後も有意となる加齢に伴う DNA メチル化変化を 10 サイト 7 遺伝子領域に同定した。

興味深いことに、それらの遺伝子には、エイコサペンタエン酸 (EPA) ドコサヘキサエン酸 (DHA) の血中濃度との遺伝的相関が明らかとなった ELOVL2、心筋細胞分化、血管新生に寄与する FHL2、2 型糖尿病との遺伝的相関が知られる KLF14 や前立腺がん、肺がん、乳がんなど複数のがん細胞で発現変化し、がん治療の標的分子となる可能性が最近報告された TRIM59 などが含まれていた。したがって、これらの CpG サイトのメチル化レベル変化は、単に加齢のバイオマーカーとなるのみに留まらず、加齢がもたらす生理的变化や、加齢によって発症頻度が増す疾患の発症機構を理解するための重要なヒントとなることが強く示唆された。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、7 遺伝子のうち代謝性疾患に関与することが知られる、ELOVL2、KLF14、に焦点をあて研究を進める。具体的な目標として、ヒトで認められた加齢との相関がマウスでも種を越えて観察されるかを明らかにする。また、ヒト末梢血で得られた DNA メチル化変化の臓器特異性を明らかにする。さらに高脂肪食下での当該メチル化サイトの変化を臓器別に明らかにし、加齢のみならず外的因子による変化の有無を明らかにする。これらを通して、加齢のエピジェネティックバイオマーカーの代謝における機能的意義、DNA メチル化変化の病的意義を

解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 加齢に伴う DNA メチル化変化 CpG サイト (加齢 CpG サイト) 周辺領域の転写制御機能解析: 加齢 CpG サイトは、必ずしも典型的なプロモーター領域に存在しない。したがって、加齢 CpG サイト周辺のゲノムが、近傍の遺伝子発現を制御するエンハンサー活性、あるいはプロモーター活性を有し、機能性配列を保有するか否かを検討する。具体的には、ヒストン修飾 (H3K27 アセチル化およびメチル化、H3K4 および 9 メチル化) をヒト不死化 B 細胞株からのクロマチン免疫沈降にて解析し、このゲノム領域のエンハンサー活性など転写に及ぼす影響を解明する。またこのクロマチン修飾について、マウスにおいても加齢 CpG サイトとして再現された組織を用い、若齢マウスと老齢マウス間で比較検討する。ゲノム断片を挿入したコンストラクトを用いたレポーターアッセイにて転写活性化能 (抑制能) を検討する。

上記実験により、加齢 CpG サイト周辺ゲノムの転写制御能を明らかにする。

(2) 加齢 CpG サイトのマウスを用いた解析: ヒトで観察された加齢 CpG サイトの変化が種を越えて保存された機能変化であることを明らかにする。これまで尾部由来 DNA について再現性が得られている。4 週齢マウスおよび 50 週齢マウス (各々 10 匹) について、大脳、小脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、大腸、卵巣、精巣、尾部より DNA を抽出し、ヒトで同定した加齢 CpG サイトと相同の領域の DNA メチル化レベルをパイロシーケンスあるいはバイサルファイトクローニングにより検討し、再現性と臓器特異性を検討する。上述の臓器から抽出した RNA を用い発現との関連を検討する。

(3) 加齢 CpG サイトの疾患発症への寄与、および臨床検査値との関連に関する解析: 大中研究分担者は、血糖値 (HbA1c)、コレステロール値、高感度 CRP、血圧値などの検査値や既往歴、手術歴などの臨床情報が付与された九州大学福岡コホート約 14,000 検体を管理している。この集団より、健康人、2 型糖尿病、高脂血症、冠動脈疾患、を抽出し、それぞれ 100 名についてパイロシーケンスにてメチル化レベルを算出し、検査値ならびに疾病との関連の有無を代表者とともに解析する。

(4) 加齢 CpG サイト近傍に位置する遺伝子多型の疾患発症への寄与に関する解析: KLF14 遺伝子領域内の SNP が 2 型糖尿病と相関することは報告されているが、他の多因子疾患との関連は知られていない。また ELOVL2 遺伝子領域内の SNP と EPA、DHA 血中濃度、HDL コレステロール血中濃度との関連は報告され

ているが、疾患との関連は知られていない。したがって、加齢 CpG サイトの疾患発症における重要性を明らかにする目的で、ELOVL2、KLF14、FHL2 遺伝子領域内の SNP と 2 型糖尿病、肥満、高血圧、冠動脈疾患、との関連解析を定法に従って実施する。SNP タイピングは新たに行わず、既に論文化したデータについて、該当する遺伝子領域の SNP を解析することとする。

#### 4. 研究成果

(1) マウスにおける ELOVL2 領域 DNA メチレーション変化の再現：ヒトで認められた加齢との相関がマウスでも種を越えて観察されるか、そしてその臓器特異性の有無を明らかにするために、4 週齢と 100 週齢のマウスの各臓器を解析対象として当該メチル化部位のメチレーションレベルを検討した。マウスは各 15 匹ずつ、大脳、小脳、肺、心臓、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、大腸、精巣/卵巣、尾を対象臓器とした。メチル化レベルの測定にはパイロシーケンス法を用いた。解析の結果、メチル化変化が種差を超えて起こることが明らかとなり、特に肺( $P_c = 1.7E-07$ )、脾臓( $P_c = 1.4E-09$ )、大腸( $P = 4.3E-08$ )、尾( $P_c = 0.0001$ )に有意な差を認めた(図 1)。

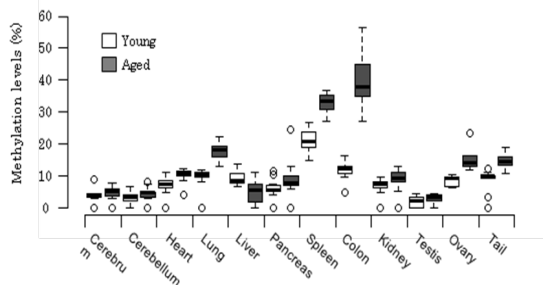
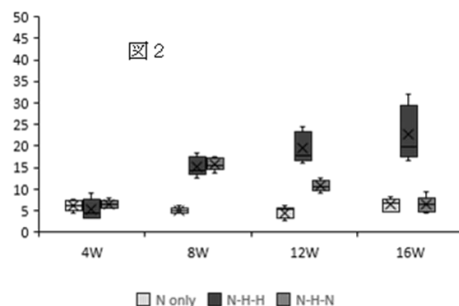


図 1 若年および老齢マウスにおける ELOVL2 領域 DNA メチレーションレベルの臓器別比較

(2) マウスにおける KLF14 領域 DNA メチレーションレベルは高脂肪食で加齢型になる：まず糖尿病マウスと正常マウスを比較したところ、脂肪細胞における KLF14 領域 DNA メチレーションレベルが加齢型になっていることを明らかにした。次に正常マウスを正常餌、高脂肪食で飼育したところ、図 2 にあるように、高脂肪食での飼育を継続した群では加齢型になり、途中で正常餌に戻した群ではメチレーションレベルが正常型に戻ることが示



された。これは、高脂肪食負荷がエピゲノムのレベルで脂肪細胞に加齢と同様の変化をもたらすことを示唆している。

(3) 日本人心筋梗塞発症のマーカーとなる DNA メチレーション部位を同定：健康人、心筋梗塞患者それぞれ 192 名についてエピゲノムワイド相関解析を実施し、心筋梗塞患者群で有意に変化している DNA メチレーション部位を 3 か所同定した。

(4) 血液細胞と不死化 B 細胞における DNA メチレーションレベルの差を明らかにした：不死化細胞では低 CpG プロモーター領域において有意に低メチル化状態になっていることを明らかにした。不死化細胞では多くのサイトにおいて低メチル化状態となっており、疾患エピゲノム研究に試料として用いる場合には注意が必要である(図 3)。

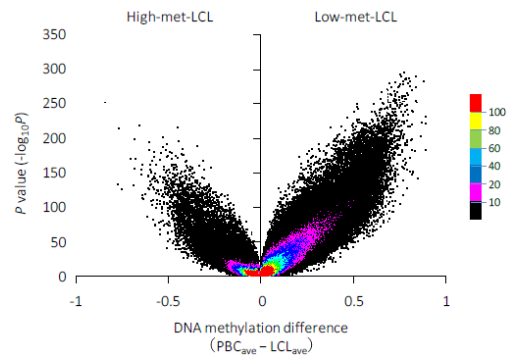


図 3 血液細胞と不死化 B 細胞における DNA メチレーションレベルの差異

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Iwaya C, Kitajima H, Yamamoto K, Maeda Y, Sonoda N, Shibata H, Inoguchi T: DNA methylation of the Klf14 gene region in whole blood cells provides prediction for the chronic inflammation in the adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Mar 11; 497 (3): 908-915. (査読有り)

Harada J, Shibata Y, Teramura M, Mizoguchi T, Kinoshita Y, Yamamoto K, Tamiaki H: In vivo Excited Energy Transfer of Bacteriochlorophyll c, d, e, or f to Bacteriochlorophyll a in the Wild-Type and Mutant Cells of the Green Sulfur Bacterium *Chlorobaculum limnaeum* *ChemPhotoChem.* 2018 Mar; 2 (3): 190-195. (査読有り)

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. Clin Epigenetics 2017 May 15; 9: 54. (査読有り)

Taniguchi I, Iwaya C, Ohnaka K, Shibata H, Yamamoto K: Genome-wide DNA methylation analysis reveals hypomethylation in the low-CpG promoter regions in lymphoblastoid cell lines. Hum Genomics 2017 May 12; 11 (1): 8. (査読有り)

Matsuo H, Yamamoto K, Nakaoka H, Nakayama A, Sakiyama M, Chiba T, Takahashi A, Nakamura T, Nakashima H, Takada Y, Danjoh I, Shimizu S, Abe J, Kawamura Y, Terashige S, Ogata H, Tatsukawa S, Yin G, Okada R, Morita E, Naito M, Tokumasu A, Onoue H, Iwaya K, Ito T, Takada T, Inoue K, Kato Y, Nakamura Y, Sakurai Y, Suzuki H, Kanai Y, Hosoya T, Hamajima N, Inoue I, Kubo M, Ichida K, Ooyama H, Shimizu T, Shinomiya N: Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. Ann Rheum Dis. 2016 Apr; 75 (4): 652-659. (査読有り)

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 2015 Dec; 58 (12): 2781-2790. (査読有り)

Harada J, Teramura M, Mizoguchi T, Tsukatani Y, Yamamoto K, Tamiaki H: Stereochemical conversion of C3-vinyl group to 1-hydroxyethyl group in bacteriochlorophyll c by the hydratases BchF and BchV: adaptation of green sulfur bacteria to limited-light environments. Mol Microbiol. 2015 Dec; 98 (6): 1184-1198. (査読有り)

[学会発表](計3件)

原田二郎, 山本 健, 高市真一: 繊維状非酸素発生型光合成細菌 Chloroflexus aurantiacus のカロテノイド合成経路: ゲノムに見られる3つのCrtI ホモログとCrtYの大腸菌内での機能解析. 第31

回カロテノイド研究談話会, 2017年9月16-17日, 京都市.

Harada J, Teramura M, Mizoguchi T, Tsukatani Y, Yamamoto K, Tamiaki H: Adaptation of green sulfur bacteria to limited-light conditions by transcriptional regulation of two C3-vinyl hydratase genes, bchF and bchV. Light Harvesting Satellite Meeting of the 17th International Congress on Photosynthesis Research, 2016年8月4-7日, オランダ.

Harada J, Shibata Y, Ryono M, Teramura M, Yamamoto K, Mizoguchi T, Tamiaki H: Constructions and characterizations of mutants containing bacteriochlorophyll c, d, e, or f of the green sulfur bacterium Chlorobaculum limnaeum. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), 2015年12月15-20日, Honolulu.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/ikagaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 健 (YAMAMOTO Ken)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 60274528

(2) 研究分担者

原田 二郎 (HARADA Jiro)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 10373094

大中佳三 (ONAKA Keizo)

九州大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 30325518