

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03261

研究課題名（和文）病態不一致の双生児を対象とした、生活習慣病の病態に及ぼす環境要因の厳密な解明

研究課題名（英文）Rigorous analysis of epigenetic factors associating with the clinical course of diseases using discordant monozygotic twin pairs

研究代表者

渡邊 幹夫（WATANABE, Mikio）

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50294088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：疾患あるいは病態に關与する環境要因としてエピゲノム要因をターゲットにし、遺伝要因が一致しているにも関わらず病態が不一致な一卵性双生児を対象に厳密に解析した。さまざまな疾患の中で自己免疫疾患に着目し、自己抗体の出現に不一致な一卵性双生児を探索した結果、抗サイログロブリン抗体の陽性率が高いことから、抗サイログロブリン抗体が陽性の個体と陰性の個体の一卵性双生児ペアを19組見出し、双方陽性あるいは陰性の一一致ペアも含めて解析した。その結果、19組全体でペア間でエピゲノム変化の代表であるDNAメチル化率に有意な違いはなかったが、特定の遺伝背景を有する不一致ペアで有意なメチル化率の違いを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピゲノム変化のような環境因子を解析するには、一般集団ではなく一卵性双生児ペアを対象とするのが重要であるが、その中でも、環境因子に感受性のある遺伝的背景をもっている個体でのみ、環境因子が表現型に影響すると考えられる。

本研究結果では、遺伝子多型により環境因子に感受性をもつ一卵性双生児ペア、すなわち特定の表現型が不一致なペアに特異的な遺伝的背景を見出し、その遺伝的背景をもつ個体で環境因子が表現型に關与する機序をはじめて解明した。遺伝因子と環境因子のクロストークを解析する上で必須の研究手法を用いたはじめての双生児研究であり、ゲノム・エピゲノム情報とヒトの表現型の關連を解明する手法の先鞭といえる。

研究成果の概要（英文）：We targeted epigenomic factors as environmental factors involved in the disease or its clinical condition, and rigorously analyzed identical twins, whose genetic background are the same but showing discordant phenotype. Focusing on autoimmune diseases among various diseases, we searched for monozygotic twins discordant for the positivity of autoantibodies and found 19 pairs of monozygotic twins discordant for the positivity of anti-thyroglobulin antibodies. We found no significant differences in DNA methylation levels, representative of epigenomic changes, between twins using all 19 discordant pairs, but significant differences in methylation levels were found when we only analyzed discordant pairs with specific genetic backgrounds.

研究分野：臨床検査学・ゲノム検査学

キーワード：エピゲノム 双生児 臨床検査 自己抗体 自己免疫疾患 甲状腺 環境因子 遺伝因子

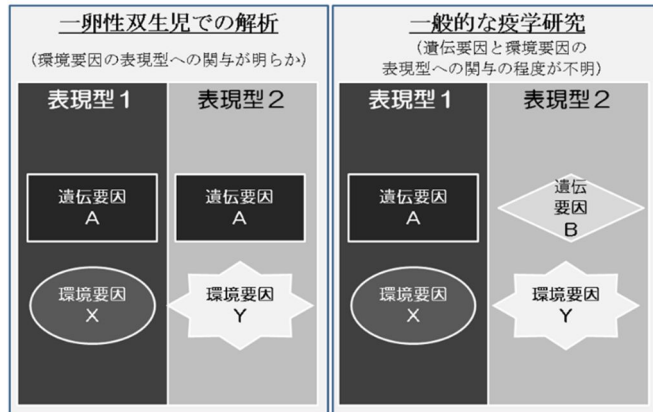
1. 研究開始当初の背景

【一般集団による環境因子探索の限界】

臨床検査値におよぼす影響について、遺伝的な因子と環境的な因子が存在することは広く知られており、すでに個々の検査についての遺伝因子・環境因子が多数報告されている。しかしながら厳密な遺伝因子寄与率の解析のためには環境因子を一致させることが必要であり、厳密な環境因子寄与率の解析のためには遺伝因子を一致させる必要があるにもかかわらず、特に後者の解析はヒトを対象とした場合には基本的には不可能である。従って、環境因子については疫学的な調査をもとに集団として解析することとなり、厳密な解析には限界がある。

【一卵性双生児を対象とする利点と現状】

一卵性双生児は遺伝的背景が完全に同一であり、ヒトにおける環境因子の厳密な解析対象としては唯一無二のものである。一卵性双生児や二卵性双生児を用い、臨床検査値に環境因子が及ぼす影響について研究した成果についての報告はあるが、ACE モデル解析法(Genet Epidemiol. 34(3), 238-45, 2010 他) を用いて遺伝因子寄与率と環境因子寄与率の理論的な算出に留まっているものが多く、具体的な環境因子ごとの寄与について体系的に明らかにしているものはほとんどない。研究代表者は以下の先行研究により、双生児のエピゲノム変化を解析し、環境因子との関連を探索することとした



(先行研究) 男性の多くの遺伝子は環境因子への感受性が高い男女の性別がさまざまなヒトの表現型に影響していることはよく知られている。これらの多くは男女におけるホルモン環境の差などの先天的(遺伝的)な要因が大きい、男女での生活習慣の違いや、職種の違い、運動量の違い、食習慣の違いなどの環境要因も少なからず存在する。しかしながら、同じ環境であった場合にヒトが受ける環境要因に性差が存在するかについてはこれまで明らかでなかった。応募者は、一卵性双生児を対象とした網羅的な解析により、環境要因のひとつであるゲノム DNA のメチル化率の個体差を同じ遺伝背景の個体で比較したところ、常染色体において男性でより大きいことを世界で初めて明らかにした。(BMC Medical Genomics, 9, 55-63, 2016)これにより、男性ではそもそも遺伝的に環境変化への感受性が女性より高い可能性や発症率に性差のある疾患と関連する可能性が明らかになった。また、常染色体の中でも女性のメチル化感受性が高い遺伝子や、X 染色体の中でも男性のメチル化感受性が高い遺伝子も少なくなく、おそらくは遺伝子ごとにメチル化感受性に性差があり、その総体が染色体ごとの性差に表れていると考えた

【応募者の研究活動とツインリサーチセンターへの参画】

研究代表者はこれまでに、遺伝因子と環境因子を用いた自己免疫性甲状腺疾患の病態予後予測検査法を開発してきた。その中で、環境因子による遺伝子のエピゲノム変化を解析し、環境因子が表現型に及ぼす影響の機序についても明らかにしようとしてきているが、2009 年より大阪大学大学院医学系研究科附属ツインリサーチセンターにコアメンバーとして参画し、一卵性双生児を対象として環境因子が疾患予後に及ぼす影響を厳密に解析できる環境を得た。

同センターでは約 2500 組の双生児が登録されており、順次、血清および核酸サンプルの採取を行うとともに、疾患のスクリーニング検査(検体検査(血球計数、生化学的検査、尿検査、自己抗体測定など)・生体検査(身長、体重、骨密度、心電図、血圧・内臓脂肪率測定・頸動脈超音波など))を行い、さらに、疫学的調査(病歴の調査: Cornell Medical Index、生活習慣調査: Health Practice Index、睡眠調査: Pittsburgh Sleep Quality Index、生活の質の調査: WHO-QOL26 または SF-36、主観的健康感・満足感調査: WHO-Subjective Well-being Inventory、気分調査: POMS)を、認知症のスクリーニング検査として Mini-Mental State Examination および Wechsler Memory Scale-Revised を、食習慣調査として、BDHQ-1-1-L を実施しているところであった。収集した核酸サンプルでは、基本的な遺伝子変異を解析するとともに、エピゲノム情報として遺伝子のメチル化情報と、遺伝子の発現情報を網羅的に解析する計画であった。サンプリングそのものに対する諸経費(謝金・被験者旅費・検査機器整備費など)のみ、文部科学省のプロジェクト経費として承認されていた。

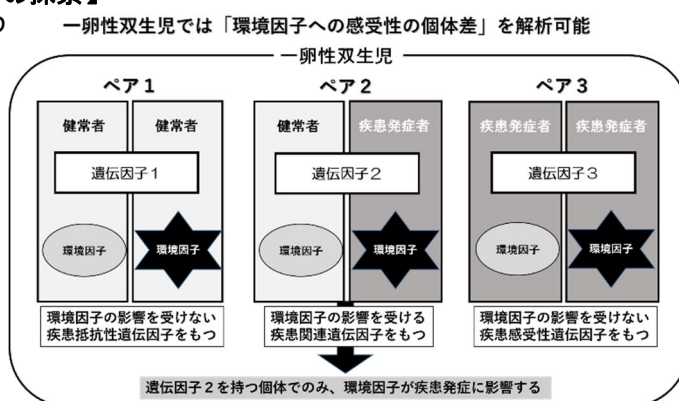
2. 研究の目的

サンプリングにより得られた血清検体の臨床検査値をそれぞれ比較することにより、それぞれの検査医学的な病態変動に環境因子が及ぼす影響の度合を明らかにすることができる。環境因子寄与率の大きい病態は生活習慣の改善により正常化できる可能性が高いが、遺伝因子寄与率の大きい病態は、生活習慣の改善では正常化できないため早急に積極的な医学的介入（治療）が必要となるため、生活習慣の改善が奏功する検査医学的な病態をリストアップすることができる。

なお、本研究で行う臨床検査は、市原清志教授（山口大学）による臨床検査値の国際的正常値標準化プロジェクトと同一の測定法・測定機器により実施するため、測定値の検証は容易である。

【寄与率の大きい具体的な環境因子の探索】

環境因子寄与率の大きい病態について、具体的にどのような環境因子が影響しているかを解明するために、一卵性双生児で検査結果の乖離が生じているペアを見出す。このことにより、それぞれの臨床検査値に影響する環境因子が明らかにできる基礎データがとれる。遺伝因子の相違により、環境因子の寄与率が変化することも予想されるため、遺伝因子（多型など）ごとに環境因子寄与率を明らかにすることも試みる。環境因子としては、疫学的なものよりもエピゲノム変化をまず解析する。



【環境因子が病態に影響するメカニズムの、エピゲノムおよびRNA発現レベルでの解明】

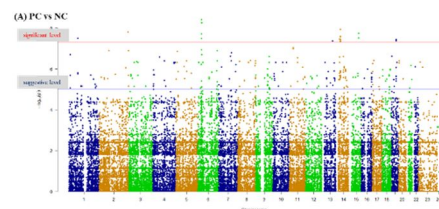
環境因子がどのようなメカニズムで検査医学的な病態に影響するのかを明らかにするために、核酸上のエピジェネティックな変化（DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化など）を、それぞれの臨床検査項目に密接に関係するDNA部位において解析し、環境因子の影響がエピジェネティックな変化として定量できる可能性を探る。さらに理化学研究所が開発した最新の技術を用いてmRNAを用いた発現解析を行い、実際にDNAのエピジェネティックな変化がヒトの表現型に影響するメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

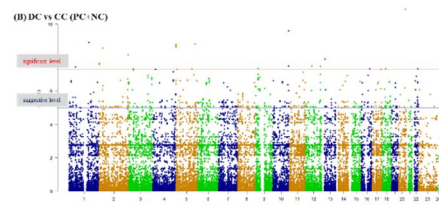
- (1) 大阪大学大学院医学系研究科附属ツインリサーチセンターの協力を得て、センターに登録されている成人一卵性および二卵性双生児のサンプリング時に血清検体および核酸検体を得る。核酸検体のうち、ゲノムDNAは分離保存し、RNAサンプルは安定化試薬で処理して凍結保存する。
- (2) サンプリングした血清検体を用いて、検体検査を臨床検査値の国際的正常値標準化プロジェクトと同一の測定法・測定機器により行う。
- (3) 核酸検体を用いた多型解析のデータを臨床検査データと併せて蓄積する。（多型解析はツインリサーチセンターで実施）
- (4) 遺伝因子寄与率と環境因子寄与率の解析を行う
実施した臨床検査項目をACEモデリング手法により解析し、検査項目によるさまざまな病態について遺伝因子寄与率および環境因子寄与率を理論的に算出する。
- (5) 遺伝的要因に依存した環境要因を明らかにする
ある環境要因の違いが要因となり臨床検査値などの表現型が不一致となった一卵性双生児と、不一致とならなかった一卵性双生児について遺伝的背景の相違を検索し、遺伝的要因に依存した環境要因の感受性を明らかにする。具体的には、環境要因に感受性のあるペアの遺伝子多型と感受性のないペアの遺伝子多型を比較し、環境要因に感受性のある遺伝子特定する
- (6) 環境因子がエピゲノムに及ぼす影響を解明する
環境因子寄与率の高い臨床検査について、当該臨床検査値の変動要因もしくは関連疾患に関係する遺伝子をターゲットに、バイサルファイトパイロシーケンス法によりエピゲノム変化を解析する。具体的には、標的遺伝子のプロモーター部位のDNAメチル化・ヒストンのアセチル化やメチル化などを候補とする。

4. 研究成果

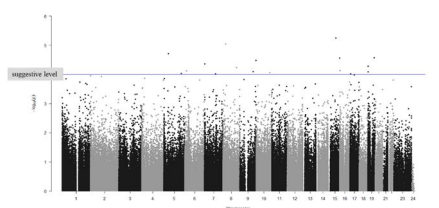
- (1) 甲状腺自己抗体価について、一卵性双生児で出現が一致するペアと不一致ペアを見出した。Positive concordant (ふたりとも自己抗体陽性)、Negative concordant (ふたりとも自己抗体陰性)、Discordant (一人が陽性で一人が陰性)の三種類の一卵性双生児ペアに分類した。



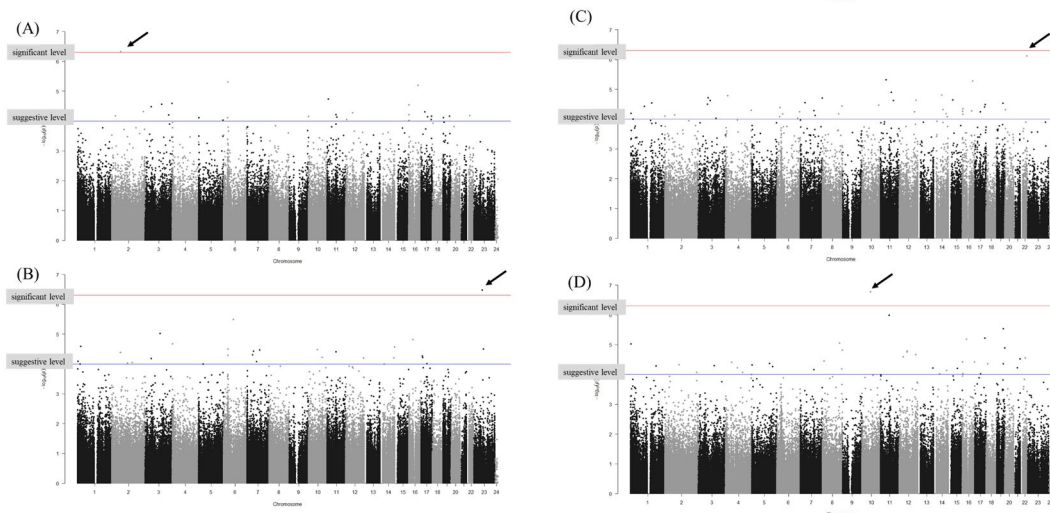
- (2) 自己抗体出現が一致したペアに特異的な遺伝的バックグラウンドと、不一致ペアに特異的な遺伝的バックグラウンドを明らかにした。不一致ペアに特異的な遺伝的バックグラウンド(右図 B)は、環境要因に感受性のある遺伝的背景を示唆し、一致ペアに特異的な遺伝的バックグラウンドは(右図 A)、環境要因に関係なく独立して自己抗体産生に關与する遺伝的背景を示唆していることを示した。



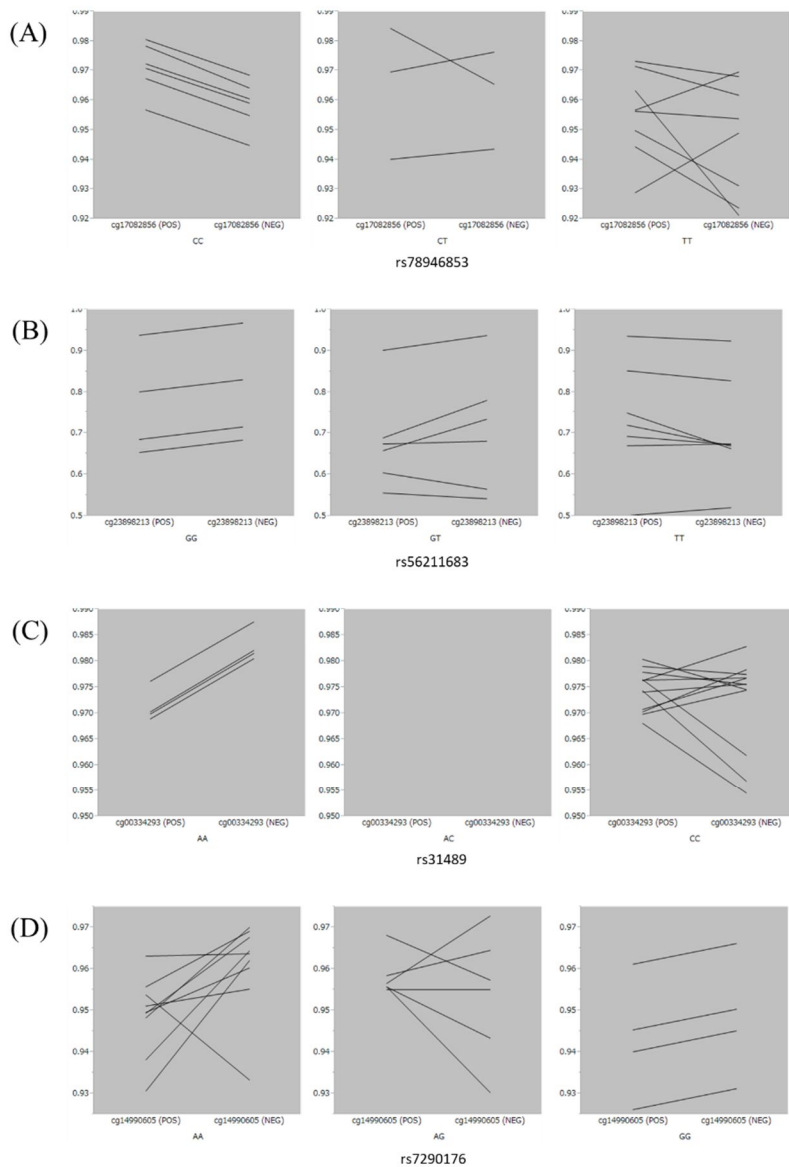
- (3) DNA メチル化率を、自己抗体出現した側と出現しなかった側をペアごとに比較したときに、不一致ペア全体では自己抗体出現と有意な關連を示す部位がなかった。これは遺伝的背景が多様な集団で解析したためと考えられた(右図)



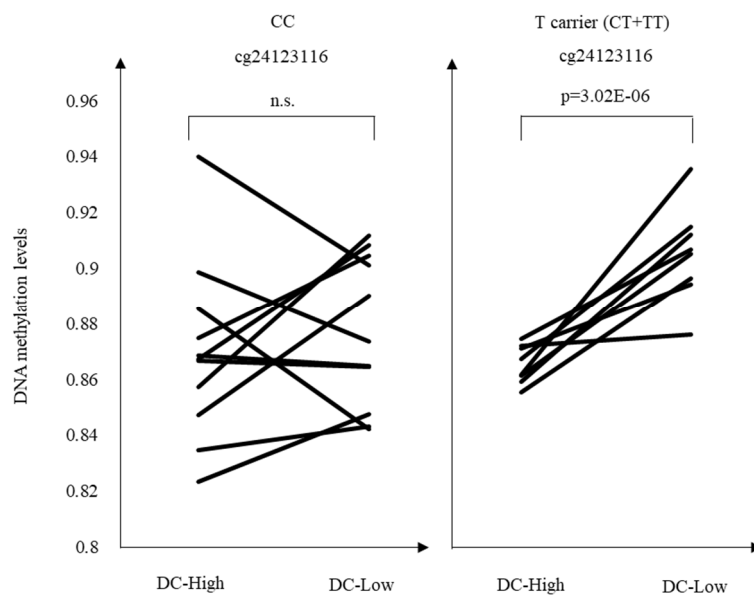
- (4) メチル化率を、自己抗体出現した側と出現しなかった側をペアごとに比較したときに、不一致ペアに特異的な遺伝的バックグラウンドを有する不一致ペアで比較すると、自己抗体出現と有意に關連するメチル化部位が複数存在した。(下図 A~D、それぞれ特異的の遺伝子型をもつペアに限った比較。(A) rs78946853CC, (B) rs56211683GG, (C) rs31489AA, and (D) rs7290178AA における各 CpG 部位のメチル化率を不一致ペアの二人ごと paired-t 検定)



- (5) 以上より、自己抗体は、特定の遺伝的背景をもつ個体では DNA メチル化率が出現に影響を与えるが、そうでない個体では必ずしも DNA メチル化率が關与しないことがわかった。(次ページの図。上図で有意であった CpG 部位の遺伝子型ごと比較パラレルプロット。(A) rs78946853, (B) rs56211683, (C) rs31489, and (D) rs7290178 における各 CpG 部位のメチル化率を不一致ペアの二人ごと paired-t 検定)



(6) HbA1c を対象とした解析でも、同様に遺伝的背景に依存した DNA メチル化の関与が示唆された。(下図・一部マスク・未発表データ)



(7) その他、一般集団を対象としての自己免疫性甲状腺疾患の病態に関するエピゲノム因子をいくつか同定し発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Morita, E., Watanabe, M., Inoue, N., Hashimoto, H., Haga, E., Hidaka, Y., Iwatani, Y.	4. 巻 51
2. 論文標題 Methylation levels of the TNFA gene are different between Graves' and Hashimoto's diseases and influenced by the TNFA polymorphism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 118-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2018.1448078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe, M., Takenaka, Y., Honda, C., Osaka Twin Research Group, Iwatani, Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Genotype-based epigenetic differences in monozygotic twins discordant for positive anti-thyroglobulin autoantibodies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 110-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2017.0273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Piirtola, N., Jelenkovic, A., Latvala, A., Sund, R., Honda, C., Inui, F., Watanabe, M. et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Association of current and former smoking with body mass index: a study of smoking discordant twin pairs from 21 twin cohorts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOSOne	6. 最初と最後の頁 e020014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0200140	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 該当する
1. 著者名 Inoue, N., Watanabe, M., Katsumata, Y., Ishido, N., Hidaka, Y., Iwatani, Y.	4. 巻 47
2. 論文標題 Functional polymorphisms of the type 1 and type 2 iodothyronine deiodinase genes in autoimmune thyroid diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunol Invest	6. 最初と最後の頁 534-542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08820139.2018.1458861	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kunisato, T., Watanabe, M., Inoue, N., Okada, A., Nanba, T., Kobayashi, W., Inoue, Y., Katsumata, Y., Omori, N., Nobuhara, T., Takemura, K., Hidaka, Y., Iwatani, Y	4. 巻 51
2. 論文標題 Polymorphisms in Th17-related genes and the pathogenesis of autoimmune thyroid disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 360-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2018.1534963	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe, M., Honda, C., The Osaka Twin Research Group, Iwatani, Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Within-pair differences of DNA methylation levels between monozygotic twins are different between male and female pairs.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 BMC Medical Genomics	6. 最初と最後の頁 55-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12920-016-0217-2	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 Saeki, M., Watanabe, M., Inoue, N., Tokiyoshi, E. Takuse, Y., Arakawa, Y. Hidaka, Y., Iwatani, Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 DICER and DROSHA gene expression and polymorphisms in autoimmune thyroid diseases	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Autoimmunity,	6. 最初と最後の頁 514-522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2016.1230846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kagawa, T., Watanabe, M., Inoue, N., Otsu, H., Saeki, M., Katsumata, Y., Takuse, Y., Iwatani, Y.	4. 巻 63
2. 論文標題 Increases of microRNA let-7e in peripheral blood mononuclear cells in Hashimoto 's disease.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Endocrine J	6. 最初と最後の頁 375-380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ15-0577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jelenkovic, A., Hur, Y., Sund, R. et al	4. 巻 5
2. 論文標題 Genetic and environmental influences on adult human height across birth cohorts from 1886 to 1994	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e20320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.20320	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 該当する

1. 著者名 Fujii, A., Inoue, N., Watanabe, M., Kawakami, C., Hidaka, Y., Hayashizaki, Y. and Iwatani, Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 TSHR gene polymorphisms in the enhancer regions are most strongly associated with the development of Graves' disease, especially intractable disease, and with that of Hashimoto's disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 111-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2016.0345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsu, H., Watanabe, M., Inoue, N., Masutani, R., Iwatani, Y.	4. 巻 55
2. 論文標題 Intra-individual variation of microRNA expression levels in plasma and peripheral blood mononuclear cells and the associations of these levels with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Chem Lab Med	6. 最初と最後の頁 626-635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/ccIm-2016-0449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Watanabe, M., Takenaka, Y., Honda, C., Osaka Twin Research Group, Iwatani, Y.
2. 発表標題 Genotype specific for monozygotic twins discordant for anti-thyroglobulin autoantibody (TgAb) positivity.
3. 学会等名 The 16th Congress of the International Society for Twin Studies (ISTS), Madrid, Nov. 16-18, 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Watanabe, M., Takenaka, Y., Honda, C., Osaka Twin Research Group, Iwatani, Y.
2. 発表標題 Genotype-based epigenetic factors in identical twins discordant for positive TgAb
3. 学会等名 AACC Annual Meeting & Clinical Lab Expo 2018, Chicago, Jul 31st, 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊幹夫、竹中要一、本多智佳、大阪ツインリサーチグループ、岩谷良則、
2. 発表標題 TgAb出現が一致しない一卵性双生児ペアを対象とした、自己抗体出現に関するエピゲノム要因の解析
3. 学会等名 第61回日本甲状腺学会学術集会(川越)、2018.11.23
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊幹夫
2. 発表標題 受賞講演「臨床検査へのゲノム・エピゲノム情報の応用」
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会(名古屋)、2018.8.25(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平井那知、渡邊幹夫、井上直哉、日高洋、岩谷良則
2. 発表標題 自己免疫性甲状腺疾患の発症・病態予後とIL6プロモータ領域のCpGのメチル化率との関連
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会(名古屋)、2018.8.25-26
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Watanabe, M., Honda, C., Osaka Twin Research Group, Iwatani, Y
2. 発表標題 Sex-related Individual Differences in DNA Methylation in Monozygotic Twin Pairs.
3. 学会等名 Behavior genetics Association 46th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 渡邊幹夫、本多智佳、大阪ツインリサーチグループ、岩谷良則
2. 発表標題 一卵性双生児におけるDNAメチル化ペア内差の男女間比較
3. 学会等名 第10回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Suetake, I., Watanabe, M., Takeshita, K., Takahashi, S., Carlton, P.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 622
3. 書名 DNA and Histone Methylation as Cancer Targets (分担執筆)	

〔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	竹中 要一 (TAKENAKA Youichi) (00324830)	関西大学・総合情報学部・教授 (34416)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	岩谷 良則 (IWATANI Yoshinori) (60168581)	大阪大学・医学系研究科・招へい教授 (14401)	