

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09781

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝疾患のゲノム・エピゲノム解析による病態解明と診断方法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiology and development of diagnosis method of non-alcoholic fatty liver disease by genomic and epigenomic analysis

研究代表者

堀田 紀久子(Hotta, Kikuko)

大阪大学・医学部附属病院・特任講師(常勤)

研究者番号：30360639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝疾患の肝臓RNAシーケンスと遺伝子ネットワーク解析を行い4つのハブ遺伝子(PAPLN、LBH、DPYSL3、JAG1)を有するスケールフリーネットワークとランダムネットワークを同定した。肝臓のゲノムワイドメチル化解析を行い、肝臓の線維化進行に伴いメチル化レベルが変化する領域(DMR)を同定した。DMRのネットワーク解析方法を開発し2個のDMRネットワークを同定した。以上の解析から病態進行に伴い肝臓線維化や癌化に関連する遺伝子のメチル化レベルが低下し発現量が増加していた。脂質代謝や酸化還元に関連する遺伝子のメチル化レベルは増加し発現が低下し減量での可逆性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝疾患のゲノムワイドな発現解析、メチル化解析により病態進行に伴う変化が2-3個の遺伝子群に分類されることを明らかにすることが出来た。2-3個の遺伝子群の発現やメチル化レベルの変動には年齢、血糖値が重要であり、1つの遺伝子群は減量による可逆性が認められ、非アルコール性脂肪肝疾患における減量や血糖値コントロールの重要性が分子レベルで証明された。病態進行に関連する遺伝子群が少数のグループに分かれることから、メチル化レベルや発現量を調節する因子の存在が示唆された。それらの因子を同定することで新たな治療方法の開発が期待される結果となった。

研究成果の概要(英文)：RNA-sequencing and subsequent weighted gene co-expression network analysis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) revealed 2 networks associated with NAFLD, one of which is a scale-free network with 4 hub genes and the other is a random network. The genomic region that is under epigenetic regulation during NAFLD progression were identified using differentially methylated region (DMR) analyses. The average values of topological overlap measures for the CpG matrix combining two different DMRs were calculated and two DMR networks correlated with the stages of fibrosis were identified. The annotated genes of one network included genes involved in fibrosis and cellular proliferation. The annotated genes of the second network were associated with metabolic pathways. The CpG methylation levels in these networks were strongly affected by age and fasting plasma glucose levels. The methylation status of five DMRs in the second network was reversible following weight loss.

研究分野：医歯薬学

キーワード：非アルコール性脂肪肝疾患 RNAシーケンス DNAメチル化 遺伝子共発現ネットワーク解析 DMR

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年カロリーの過剰摂取により必要以上の異所性脂肪蓄積（内臓脂肪蓄積、脂肪肝）が生じ健康障害をもたらすことが問題になってきている。内臓脂肪蓄積によりアディポネクチンやレプチンなどのアディポサイトカインの血中濃度が変化し、インスリン抵抗性、脂質代謝異常、高血圧などの代謝異常を発症する。アディポネクチンの血中濃度は糖尿病患者では正常耐糖能者に比較して低値であり、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。ヒト内臓脂肪の発現プロファイルから新規の脂肪組織特異的発現遺伝子、ガレクチン12を同定し脂肪細胞のアポトーシスを誘導し、大型脂肪細胞数を減少させ、小型脂肪細胞数の増加させることにより、アディポサイトカインの分泌を適度な濃度にする作用があることを報告してきた。肥満や異所性脂肪蓄積の発症機序には遺伝素因が重要である。SNP (single-nucleotide polymorphism: 一塩基多型) を用いたゲノムワイド解析 (GWAS) を行い、肥満関連遺伝子として SCG3 と MTMR9 を同定し、これらの遺伝子が食欲調節に関連していることを明らかにしてきた。SCG3 は SCG2 を介して食欲調節ペプチド (オレキシン、NPY、POMC) と分泌顆粒を形成し食欲調節に関与していることを明らかにした。

もう1つの重要な異所性脂肪蓄積である非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の GWAS を行い、PNPLA3、SAMM50、PARVB を含む領域の遺伝子多型が非常に強い相関を示すことを報告した。この領域は NAFLD 発症だけでなく進行 (線維化) にも重要であることも明らかにした。NAFLD の線維化の進行には遺伝子多型以外の因子の関与が推測されたので、次世代シーケンサーの技術を応用し、PNPLA3 領域の DNA メチル化解析と発現解析を行い、PNPLA3 遺伝子上の CpG99 のメチル化増加と PNPLA3 の発現量低下、PARVB 遺伝子上流の CpG26 のメチル化低下が NAFLD の線維化の進行に関連していることを見出した。さらに PNPLA3 rs738409 (Ile148Met) のリスクアレルを持つ人で CpG99 のメチル化増加と PNPLA3 の発現低下が著しく、遺伝子多型がエピゲノムに影響することを見出した。

### 2. 研究の目的

同一人物から採取した肝生検組織より RNA とゲノムを抽出し、RNA シークエンス、メチル化解析を行う。臨床情報との総合的な解析を行い NAFLD の進行に関連する遺伝子を同定し NAFLD の発症・進行の病態を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は大阪大学、横浜市立大学医学部での倫理委員会での承認を受けた。また参加者から書面によるインフォームドコンセントにて同意を得た。

#### (1) 肝臓 RNA シークエンスと遺伝子ネットワーク解析

60 人 (軽度線維化群 39 名、高度線維化群 21 名) の NAFLD 患者の肝生検組織より RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出した。Total RNA から SureSelectXT RNA Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies) を用いて cDNA ライブラリを作成し、Illumina HiSeq2500 Platform (Illumina, San Diego, CA, USA) にて RNA シークエンスを行った (100-bp paired-end)。得られた fastq ファイルを cutadapt にてアダプター配列を除去し、TopHat2 を用いて reference human genome (UCSC hg19) にアライメントを行った。Cufflinks にて発現量を決定し、高度線維化群と軽度線維化群間で差がある遺伝子を同定した。

Weighted gene coexpression network analysis (WGCNA) を用いて共発現解析と遺伝子ネットワーク解析を行った。Cytoscape にてネットワークを可視化した。

#### (2) 肝臓のゲノムワイドメチル化解析

60 人 (軽度線維化群 34 名、高度線維化群 25 名、内 56 人は RNA シークエンス解析を行った症例) の NAFLD 患者の肝生検組織よりゲノム DNA を抽出した。500ng の DNA のバイサルファイト処理を行い Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip にてゲノムワイドメチル化レベルを測定した。GenomeStudio v2011.1 and Methylation Module v1.9.0 にて各サイトのメチル化レベル ( $\beta$ -value) を決定した。クオリティーコントロールを行い、beta-mixture quantile normalization にてプローブの種類による補正を行った。バッチ間補正を ComBat normalization method にて行った結果、431,736 の CpG サイトが抽出された。高度線維化群と軽度線維化群間で差を ChAMP にて同定した。複数の連続した CpG サイトから形成される differentially methylated region (DMRs) を ChAMP にて同定した。Co-methylation 解析を WGCNA にて行った。再現性の確認のためにアメリカ人の NAFLD のデータ (GSE31803) を用いた。コントロール及び NAFLD の減量効果の検討のためドイツ人正常、NAFLD のデータ (GSE48325) を用いた。

#### (3) DMR のネットワーク解析

日本人 NAFLD の DMR を ChAMP にて同定した。610 ヶ所の DMR がアメリカ人 NAFLD でも再現出来た。この 610 DMR を構成する 3,683 ヶ所の CpG サイトについて WGCNA を用いて topological overlap measures を計算し、DMR ごとに並び替えた。DMR 内の topological overlap measures 平均値を DMR のごとの topological overlap measures としてネットワーク解析を行った (図 1)。

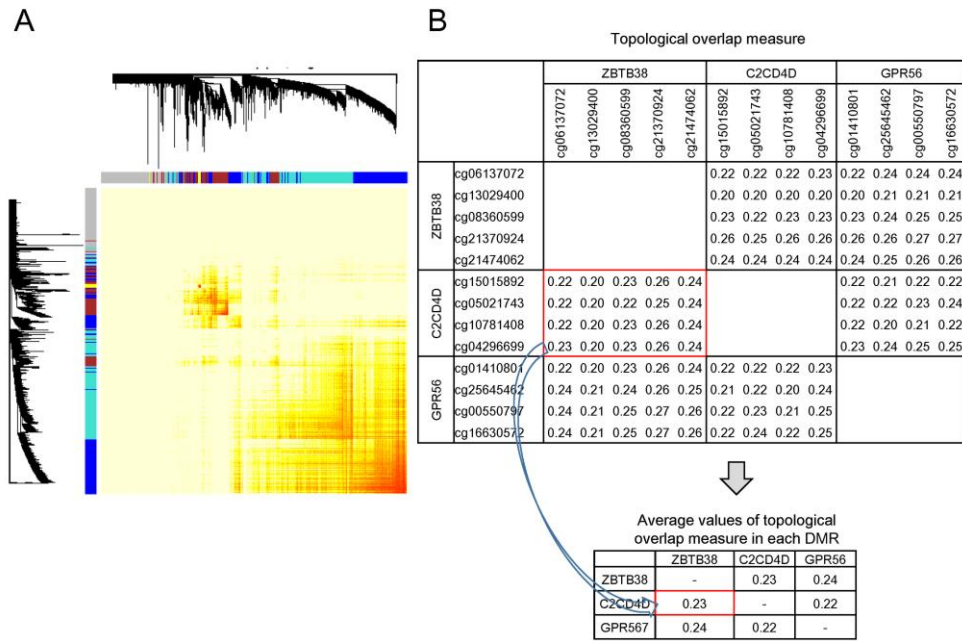


図1. DMRのネットワーク解析方法

A. topological overlap measures B. topological overlap measuresの平均値の計算例

#### 4. 研究成果

##### (1) 肝臓RNAシーケンスと遺伝子ネットワーク解析

NAFLDで線維化stageが0-2を軽度線維化群、3-4を高度線維化群とし1,777個の発現変動遺伝子を同定した。遺伝子共発現ネットワーク解析(WGCNA)にて発現変動遺伝子は3個のmoduleに分類された(図2)。一番大きいmodule1に属する遺伝子は4つのハブ遺伝子(PAPLN、LBH、DPYSL3、JAG1)を有するスケールフリーネットワークを形成した。ハブ遺伝子とそれらと共発現している遺伝子はNAFLDの進行に伴い発現量が増加していた。Module1には細胞外マトリックスやシグナルと関連している遺伝子が集簇していた。PAPLNは細胞外マトリックスであり、NAFLDでの肝臓線維化に関与していることが考えられた。LBHとDPYSL3は癌抑制的な作用を持ち、JAG1は癌化作用を持っている。この結果はNAFLDの進行症例では癌化と癌抑制の遺伝子の両方の発現が増加し、発現レベルで癌化しやすい状態になっていることが示唆された。二番目のmodule2にはミトコンドリアに存在する遺伝子が集簇しており、ハブ遺伝子を持たないランダムネットワークを形成していた。ランダムネットワークの遺伝子はNAFLDの進行に伴い発現が減少しており、NAFLDの進行に伴うミトコンドリア機能異常と関連していると考えられた。Module3には核内に存在する遺伝子が集簇していたが、明らかなネットワークは形成しなかった。NAFLDの進行に伴いミトコンドリア機能の低下、線維化の進行、発癌リスクの増加が認められるが、ネットワーク解析は、これらの知見が発現レベルで生じていることを明らかにした。

##### (2) 肝臓のゲノムワイドメチル化解析

RNAシーケンスと同様に、線維化レベルで2群に分けてメチル化レベルが異なるCpGサイトを同定した。測定誤差やサンプル数の影響を考慮して、アメリカ人のデータベースを用いて再現性を検討した。再現性が確認された25,936ヶ所のCpGサイトについて、RNAシーケンスで用いたWGCNAをメチル化に応用したco-methylation解析を行った。RNAシーケンスと同様に3個のmoduleに分類された。一番大きいmodule1には免疫反応、リンパ球や白血球活動性に関連する遺伝子上にあるCpGが集簇していた。肝臓の線維化の進行とともにメチル化が低下しており、遺伝子発現が増加していることが示唆された。NAFLD進行に伴い、免疫反応が活発になり、肝細胞の炎症が増悪することと関連していると考えられる。Module2に属するCpGサイトはミトコンドリアに存在する遺伝子、脂質代謝関連遺伝子、酸化還元反応に関連する遺伝子が集簇していた。Module2のCpGサイトは線維化の進行に伴いメチル化レベルが高くなり、遺伝子発現が低下することが示された。ミトコンドリアは脂質代謝だけでなく、酸化還元反応にも重要なオルガネラである。NAFLD進行に伴い、ミトコンドリアの形態異常や機能異常が生じるが、それはゲノムのメチル化レベルで生じていることが示された。

メチル化解析においては個々のCpGサイトのメチル化レベルも重要であるが、CpG islandに見られるようにCpGサイトは連続して存在するので、連続した領域のメチル化の変化(DMR)を調べることが重要である。日本人で同定したDMRのうち610ヶ所のDMRがアメリカ人NAFLDでも再現することが出来た。DMRとそれに伴う遺伝子発現変動が23ヶ所の遺伝子領域に認められた。その中には癌関連遺伝子のFGFR2、PTGFRN、ZBTB38、PDGFAが含まれており、高度線維化群でメチル化の割合が低下し、発現が増加していた。癌抑制遺伝子のMGMTはメチル化が増加し、

発現が低下していた。一方で細胞増殖を抑制する FBLIM1 と CYR61 に存在する DMR ではメチル化が低下し発現が増加していた。RNA シークエンスの結果同様に NAFLD の進行例では発がん傾向が高まっており、ゲノムのメチル化の変化が重要であることを見出した。酸化還元反応の酵素である NQO1 と SOD3 は DMR のメチル化が低下し、遺伝子発現が増加していた。全体的には酸化還元反応作用が低下している中で、これらの遺伝子発現は代償的に増加していることが考えられた。

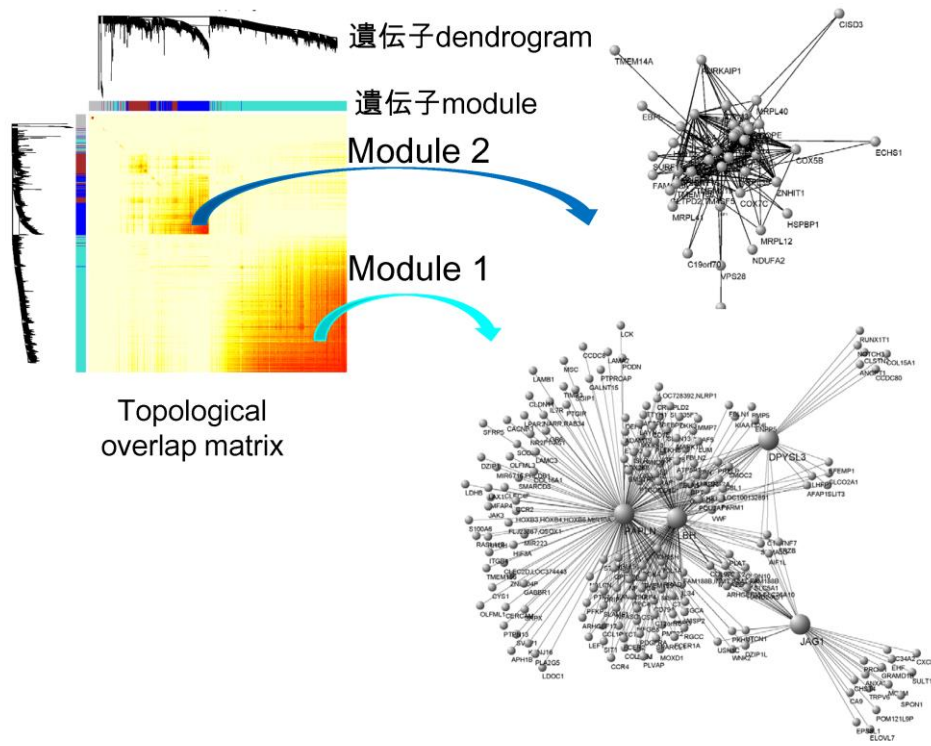


図 2. 遺伝子共発現ネットワーク解析

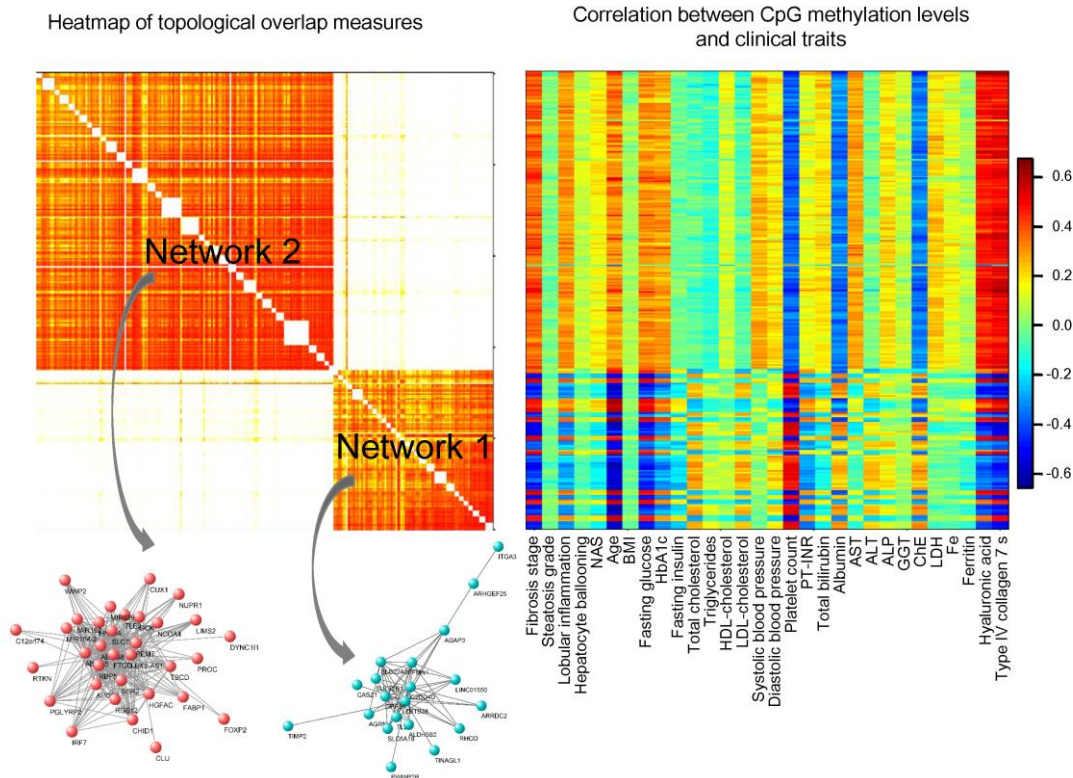


図 3. DMR ネットワーク解析

### (3) DMR のネットワーク解析

図 1 で示した方法により、DMR のネットワークを同定した (図 3)。ネットワーク 2 の DMR は線維化の進行とともにメチル化レベルが増加し、多くは代謝関連遺伝子であった。このネット

ワークには減量によるメチル化レベルの可逆性が認められた DMR が含まれていた。ネットワーク 1 には転写調節、細胞骨格調節、RhoA シグナル系、細胞増殖、がん関連遺伝子が存在しメチル化レベルは線維化レベル、年齢、空腹時血糖と強い相関を認めた。ネットワーク 1 はコントロールの肝臓にも存在し年齢と相関を認めたが、可逆性のある DMR は存在していなかった。NAFLD 発症前から存在し、加齢、血糖値により不可逆性のメチル化レベルの変化を起こすネットワーク 1 と NAFLD の発症後に認められ減量によるメチル化レベルの可逆性変化を示すネットワーク 2 の存在を報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Yoneda M, Imajo K, Tomeno W, Saito S, Nakajima A: Identification of differentially methylated region (DMR) networks associated with progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* 査読有 8(1):13567 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-31886-5.
2. Hotta K, Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Yoneda M, Imajo K, Tomeno W, Saito S, Nakajima A: Identification of the genomic region under epigenetic regulation during nonalcoholic fatty liver disease progression. *Hepatol Res* 査読有 48(3):E320-E334 (2018). doi: 10.1111/hepr.12992.
3. Hotta K, Kikuchi M, Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Kobayashi K, Yoneda M, Imajo K, Tomeno W, Nakaya A, Suzuki Y, Saito S, Nakajima A: Identification of core gene networks and hub genes associated with progression of nonalcoholic fatty liver disease by RNA sequencing. *Hepatol Res* 査読有 47(13):1445-1458 (2017). doi: 10.1111/hepr.12877.
4. 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: Characteristics of non-obese non-alcoholic fatty liver disease: Effect of genetic and environmental factors. *Hepatol Res* 査読有 46(10):1011-1018 (2016). doi: 10.1111/hepr.12648.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 堀田紀久子、北本綾、北本卓也、小川祐二、本多靖、結束貴臣、米田正人、今城健人、留野渉、斉藤聡、中島淳：非アルコール性脂肪肝疾患のゲノムワイドメチル化解析 日本人類遺伝学会第 63 回大会 (神奈川県横浜市、10 月 10 日~13 日、2018 年)
2. 堀田紀久子、北本綾、北本卓也、小川祐二、本多靖、結束貴臣、米田正人、今城健人、留野渉、斉藤聡、中島淳：非アルコール性脂肪肝疾患のゲノムワイドメチル化解析 第 39 回日本肥満学会 (兵庫県神戸市、10 月 7 日~8 日、2018 年)
3. 堀田紀久子、北本卓也、北本綾、小川祐二、本多靖、結束貴臣、米田正人、今城健人、中島淳：非アルコール性脂肪肝疾患のゲノムワイドメチル化解析 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 (東京都千代田区、5 月 24 日~26 日、2018 年)
4. 堀田紀久子、北本卓也、北本綾、小川祐二、本多靖、米田正人、今城健人、鈴木穰、中島淳：非アルコール性脂肪肝疾患の肝生検組織の RNA シークエンスと遺伝子共発現ネットワーク解析 日本人類遺伝学会第 62 回大会 (兵庫県神戸市、11 月 15 日~18 日、2017 年)
5. 堀田紀久子、北本卓也、北本綾、小川祐二、本多靖、米田正人、今城健人、鈴木穰、中島淳：非アルコール性脂肪肝疾患の肝生検組織の RNA シークエンスによる遺伝子共発現ネットワーク解析 第 38 回日本肥満学会 (大阪府大阪市、10 月 7 日~8 日、2017 年)
6. 堀田紀久子、北本卓也、北本綾、小川祐二、本多靖、米田正人、今城健人、鈴木穰、中島淳：非アルコール性脂肪肝疾患の肝生検組織の RNA シークエンスと遺伝子共発現ネットワークの探索 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 (愛知県名古屋市、5 月 18 日~20 日、2017 年)
7. 堀田紀久子、和田淳、宮崎茂、徳永勝人、益崎裕章、浜口和之、山田研太郎、花房俊昭、及川眞一、田中喜代次、船橋徹、松澤佑次：CDH13 遺伝子多型は内臓脂肪、アディポネクチン値と独立してメタボリックシンドロームに関連する 第 37 回日本肥満学会 (東京都港区、10 月 7 日~8 日、2016 年)
8. 堀田紀久子、小谷一晃、嶺尾郁夫、和田淳、宮崎滋、徳永勝人、益崎裕章、濱口和之、山田研太郎、花房俊昭、及川眞一、坂田利家、船橋徹、松澤佑次：CDH13 と ADIPOQ 多型、内臓脂肪、アディポネクチン、メタボリックシンドロームとの関連 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 (京都府京都市、5 月 19 日~21 日、2016 年)

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：中島 淳

ローマ字氏名：Atsushi Nakajima

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学（系）研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：30326037

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。