

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01877

研究課題名(和文)先制医療を実現するための動脈硬化発症前診断を可能にするバイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of the atherosclerosis biomarker for preemptive medicine

研究代表者

市野 直浩 (ICHINO, Naohiro)

藤田医科大学・保健学研究科・教授

研究者番号：50278280

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)：本研究の目的は、動脈硬化の上流にある内臓脂肪蓄積に関連したエピジェネティックな変化を受けた遺伝子を明らかにし動脈硬化バイオマーカーを開発することである。

某地域住民検診(n=486)の超音波検査から内臓脂肪蓄積と動脈硬化に関連する項目の解析を行った。DNAメチル化解析はLINE-1、LPL、CETP、ABCA1、TXNIP、SOCS、HIF3Aのメチル化率の解析を行った。

その結果、粥状動脈硬化の初期段階を反映するStiffness parameter と内臓脂肪蓄積量との関係が明らかとなった。しかし、今回検討した遺伝子のメチル化と内臓脂肪蓄積量との間には、明らかな関係は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により動脈硬化発症前期に高い精度で予測・診断することが可能となれば、ハイリスク群の絞り込みを行うことができ、それに対し生活習慣の改善指導や発症前の治療的介入ができる。それにより動脈硬化の発症遅延や防止ができれば、その先にある心疾患や脳血管疾患、そして新たな国民病とも言われる慢性腎臓病などの発症を確実に減少させることができる。

本研究は、わが国が目指す「ライフ・イノベーション」の実現に寄与するものであり、国民の健康維持・健康寿命の延伸に寄与する。また、少子高齢化が進むわが国の大きな課題のひとつである医療費高騰を軽減させることもでき、本研究の意義は非常に大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop of the biomarkers for atherosclerosis.

On that account, DNA methylation levels has been investigated the associations of visceral fat that is the basis atherosclerosis.

A total of 486 subjects living in Hokkaido, Japan, were enrolled residents who attended a health check-up program. In this program, the variables related to visceral fat such as visceral fat accumulation, fatty liver and others, and the variables related to atherosclerosis such as Stiffness parameter, IMT and plaque formation were measured using an ultrasonography. DNA methylation levels of LINE-1, LPL, CETP, ABCA1, TXNIP, SOCS and HIF3A genes which were related to visceral fat were measured by pyrosequencing method. Stiffness parameter that proves the early stage of atherosclerosis was correlated with visceral fat accumulation by multiple linear regression analysis. However, there are no correlation between visceral fat accumulation and DNA methylation levels of seven genes.

研究分野：臨床生理検査学

キーワード：動脈硬化 バイオマーカー 超音波検査 Stiffness parameter 内臓脂肪蓄積 DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では、「先制医療」という新しい医療のパラダイムシフトが期待されている。先制医療とは、バイオマーカーを用いることで発症よりも早期(以下、発症前期とする)に高い精度で発症予測・診断を行うことで、障害が起こる前の適切な時期に治療的介入を実施して発症を予防・遅らせるという、新しい医療のパラダイムシフトである。慢性疾患の多くで先制医療が期待されており、その1つに動脈硬化がある。動脈硬化は心疾患、脳血管疾患、さらに慢性腎臓病のリスクファクターであり、動脈硬化のバイオマーカー探索の臨床的意義は非常に大きい。これまで、多くの動脈硬化に関するバイオマーカーの研究がされてきたが、エピジェネティクスからのアプローチは、ほとんど行われてこなかった。動脈硬化には、粥状硬化(atherosclerosis)と動脈硬化(arteriosclerosis)という概念がある。ともに加齢と共に進展するが、前者は生活習慣が大きく関与し、心疾患や脳血管疾患、さらに慢性腎臓病のリスクファクターである。粥状硬化には生活習慣が大きく関与することから、エピジェネティクスの関与が注目されている。

2. 研究の目的

報告者は、超音波検査から得られる血管の硬さの指標である Stiffness Parameter がプラーク形成のバイオマーカーに成り得る可能性を証明した¹⁾。しかし、プラーク形成は動脈硬化が進展した状態であり、動脈硬化の発症予測を行うことはできない。動脈硬化の進展は生活習慣に深く関連する。つまり、分子基盤的にみれば DNA メチル化などの後天的 DNA 修飾によるエピジェネティックな変化が動脈硬化を促進させることが推測される。一方で、動脈硬化の上流には内臓脂肪の蓄積が関与していることが明らかとなっている。

本研究の目的は、先制医療のための動脈硬化バイオマーカーの開発である。報告者は動脈硬化の上流にある内臓脂肪蓄積と脂質代謝に着目し、それに伴う DNA メチル化などのエピジェネティックな変化を受けた遺伝子を明らかにし、その遺伝子と動脈硬化との関連を検討する。それにより、動脈硬化の発症前に予測・診断し得る遺伝子レベルのバイオマーカーの検索を行う。さらに、超音波検査から得られる血管の硬さの指標と組み合わせれば、より高精度なバイオマーカーの開発ができると考え、これにより先制医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、住民検診(参加者:約550名、リポート率:約60%)を研究基盤とする。検診受診者を対象に、頸動脈超音波検査および腹部超音波検査を施行し、得られた画像データから以下に示す項目について解析を行った。同時に、動脈硬化と密接に関係する脂質異常症あるいは脂質代謝関連の遺伝子群のメチル化解析を行い、内臓脂肪蓄積あるいは動脈硬化に関連する遺伝子を検索した。それらの解析データをデータベース化し、統計学的に解析・検討した。

なお、当初の計画では2017年の検診受診者を対象とする予定であったが、DNAメチル化の遺伝子解析に関するインフォームドコンセントが不十分であることが判明した。そのため、本研究の遂行に支障を来さない超音波検査データを有し、かつDNAメチル化の遺伝子解析に関しても住民へのインフォームドコンセントが十分行われ、かつ遺伝子解析を行うのに必要量ストックされている2015年度住民検診の超音波検査データおよび試料を用いて研究を継続した。

(1) 研究対象者の内訳

2015年度検診受診者の研究不同意者を除き、かつ超音波検査を施行し得た486名を対象とした。平均年齢は63.4±9.88歳、男女比は男性226例、女性260例であった。内訳の詳細は表1の通りである。

表1 対象者の内訳(%)

年齢	男性	女性	合計
40歳 -	19 (3.9)	26 (5.3)	45 (9.2)
50歳 -	39 (8.0)	67 (13.8)	106 (21.8)
60歳 -	105 (21.6)	113 (23.3)	218 (44.9)
70歳 -	48 (9.9)	45 (9.3)	93 (19.2)
80歳 -	15 (3.1)	9 (1.8)	24 (4.9)
合計	226 (46.5)	260 (53.5)	486 (100)

(2) 頸動脈超音波検査による画像解析項目

Stiffness parameter :「血管の硬さ」を定量的に評価することができる。

内膜中膜複合体厚 (IMT : intima media thickness): IMT は、客観性を担保するために超音波診断装置に搭載されている IMT 自動計測機能を用いて平均内膜中膜複合体厚 (mean IMT) を算出した。

プラーク形成 : 動脈硬化の進行した状態であるプラーク形成の有無を確認した。

(3) 腹部超音波検査による画像解析項目

内臓脂肪蓄積量 : 超音波画像より内臓脂肪蓄積量の解析を行い評価した。

脂肪肝の有無 : 内臓脂肪蓄積の表現型である脂肪肝の有無およびその程度の評価を行った。

皮下脂肪厚 : 超音波画像より皮下脂肪の厚みを解析し定量的な評価を行った。

その他 : 検診結果から得られた BMI および体脂肪率も検討項目とした。

(4) 遺伝子群のメチル化解析

対象とした遺伝子群 : 遺伝子群のメチル化解析に関しては、動脈硬化と密接に関係する脂質異常症と関連がある long interspersed nuclear element-1 (*LINE-1*)や脂質代謝関連の遺伝子である lipoprotein lipase (*LPL*)をはじめ、cholesterol ester transfer protein (*CETP*)、ATP-binding cassette transporter A1 (*ABCA1*)、thioredoxin interacting protein (*TXNIP*)、suppressor of cytokine signaling (*SOCS*)、hypoxia-inducible factor 3 (*HIF3A*)など脂質代謝に関連のある 7 種類の遺伝子のメチル化解析を実施した。

解析方法 : DNA のメチル化率の測定は、最も信頼性が高い PyroSequencing 法にて定量的に行った。*LINE-1* 遺伝子は 3 カ所、*LPL* 遺伝子では 4 カ所、*CETP* 遺伝子でも 4 カ所、*ABCA1* 遺伝子では 9 カ所、*TXNIP* 遺伝子では 1 カ所、*SOCS* 遺伝子では 4 カ所、*HIF3A* 遺伝子では 7 カ所の CpG アイランドのメチル化率をそれぞれ測定し、その平均値を算出して検討した。

4 . 研究成果

(1) 動脈硬化と内臓脂肪との関係

動脈硬化のメカニズムは炎症であり、我々が注目している粥状硬化についてみると、内膜の線維性肥厚、脂肪沈着、プラーク形成へと順に進展していく。つまり、我々が検討した血管の硬さの指標である Stiffness parameter 、内膜中膜複合体厚を捉えた mean IMT、そしてプラーク形成の有無が、まさに動脈硬化進展を評価する上で重要となる。それらと、内臓脂肪関連項目の関係について検討した。

まず Stiffness parameter についてみると、内臓脂肪蓄積量との間に相関関係が認められた ($y=7.914664 + 0.0324084x$, $r=0.12$, $P=0.0095$)。それ以外の項目では、明らかな関係は認められなかった。次に、mean IMT についても同様の検討を行ったが、いずれの項目においても明らかな関係は認められなかった。最後にプラーク形成の有無について同様の検討を行った。その結果、皮下脂肪厚 ($P=0.0021$)、BMI ($P=0.0498$)、体脂肪率 ($P<0.0001$) において、いずれもプラーク有がプラーク無に対して有意に低値を示す結果となった。これらの結果を踏まえ、動脈硬化に対しては年齢が強く影響し、また、さまざまな要因が関連することが考えられるので、Stiffness parameter とプラーク形成の有無に関して多変量解析を行った (表 2)。その結果、Stiff-ness parameter において内臓脂肪蓄積量は関連する因子であること

表 2 Stiffness Parameter β とプラークの有無における多変量解析

項目	Stiffness Parameter		プラーク形成の有無	
	標準	P値	標準	P値
脂肪肝の有無	0.257	0.8546	0.161	0.9817
内臓脂肪蓄積量	0.019	0.0186	0.012	0.4052
皮下脂肪厚	0.055	0.6587	0.038	0.1049
BMI	0.125	0.2017	0.086	0.2229
体脂肪率	0.066	0.9104	0.042	0.5217
性別	0.421	0.7172	0.264	0.4395
年齢	0.021	<0.0001	0.015	<0.0001
ウエスト	0.037	0.1916	0.024	0.3452
中性脂肪	0.003	0.0307	0.002	0.1565
HDLコレステロール	0.015	0.1818	0.009	0.7187
最高血圧	0.014	0.0027	0.009	0.2205
最低血圧	0.022	<0.0001	0.014	0.3031
空腹時血糖	0.013	0.6621	0.007	0.2705

が明らかとなった ($P=0.0186$)。また、プラーク形成の有無に関しては年齢のみが関連する因子であった。

これらの結果から、粥状動脈硬化の初期段階である内膜の線維性肥厚、つまり血管の硬さと内臓脂肪蓄積量との関係が明らかとなり、動脈硬化を極初期に評価するためには内臓脂肪蓄積量と関連する DNA メチル化の変化を受けた遺伝子を明らかにすれば、動脈硬化の発症前に予測・診断し得る遺伝子レベルのバイオマーカーを確立できる可能性が示唆された。

(2) 内臓脂肪と DNA メチル化遺伝子との関係

内臓脂肪に関連する内臓脂肪蓄積量、脂肪肝の有無、皮下脂肪厚、BMI、体脂肪率の各項目について、今回解析した 7 種類の遺伝子のメチル化率との関係を検討した。その結果を表 3 に示す。報告者が最も注目した内臓脂肪蓄積量では、*TXIPN* との間に負の相関関係が認められた ($y=81.482107 - 0.0715784x$, $r = -0.20$, $P=0.0126$)、また *HIF3A* との間にも負の相関関係が認められた ($y=45.939884 - 0.1029311x$, $r = -0.19$, $P<0.0001$)。それ以外にも、脂肪肝の有無において、*LPL* では脂肪肝有のメチル化率が有意に高値を示し ($P=0.0359$)、逆に *TXIPN* では脂肪肝有のメチル化率が有意に低値を示した ($P=0.0125$)。皮下脂肪厚と明らかな関係を認めたものは *TXIPN* ($r = -0.20$, $P=0.0122$) のみであり、体脂肪率では *ABCA1* ($r=0.11$, $P=0.0495$)、*TXIPN* ($r=0.16$, $P=0.0445$)、*HIF3A* ($r=0.25$, $P<0.0001$) とで明らかな関係が認められた。

今回検討した 7 種類の遺伝子と性別および年齢の関係を確認したところ、性別では *LPL* ($P=0.0007$)、*CETP* ($P=0.0243$)、*ABCA1* ($P=0.0281$)、*TXIPN* ($P=0.0041$)、*HIF3A* ($P<0.0001$) のいずれの遺伝子においても女性の方が男性より有意に高いメチル化率を示した。また、年齢とでは *TXIPN* ($r=0.27$, $P=0.0005$) と *HIF3A* ($r = -0.21$, $P<0.0001$) の遺伝子で明らかな関係が認められた。

表3 内臓脂肪関連項目と各遺伝子のメチル化率との関係

	脂肪肝の有無			内臓脂肪蓄積量		皮下脂肪厚		BMI		体脂肪率	
	有(mean ± SD)	無(mean ± SD)	P値	相関係数	P値	相関係数	P値	相関係数	P値	相関係数	P値
<i>LINE-1</i> (n=456)	56.9 ± 2.8	57.3 ± 2.7	0.11	0.05	0.26	0.03	0.47	0.05	0.27	-0.004	0.93
<i>LPL</i> (n=439)	22.6 ± 3.8	23.6 ± 3.6	0.0359	0.02	0.61	-0.03	0.49	-0.01	0.86	0.09	0.06
<i>CETP</i> (n=367)	76.1 ± 8.8	76.4 ± 8.3	0.86	-0.04	0.49	-0.03	0.57	-0.04	0.48	0.02	0.65
<i>ABCA1</i> (n=316)	35.2 ± 6.7	35.7 ± 6.3	0.64	-0.02	0.77	-0.03	0.61	-0.05	0.35	0.11	0.0495
<i>TXIPN</i> (n=158)	78.1 ± 4.5	75.5 ± 6.0	0.0125	-0.20	0.0126	-0.20	0.0122	0.03	0.69	0.16	0.0445
<i>SOCs</i> (n=157)	76.0 ± 4.7	76.5 ± 4.4	0.59	-0.02	0.81	-0.04	0.58	-0.07	0.33	-0.06	0.44
<i>HIF3A</i> (n=444)	40.1 ± 8.0	39.5 ± 7.8	0.55	-0.19	<0.0001	0.01	0.86	-0.03	0.54	0.25	<0.0001

そこで、内臓脂肪関連項目と関係が認められた遺伝子について、性別または(かつ)年齢にて補正を行い検討してみると、明らかな関係が認められたものは脂肪肝の有無と *LPL*、脂肪肝の有無と *TXIPN* の 2 つだけであり、内臓脂肪蓄積量と関係性が認められていた *TXIPN* と *HIF3A* では明らかな関係は認められなくなった(表 4)。

(3) 動脈硬化と DNA メチル化との関係

次に、動脈硬化と関連する Stiffness parameter、mean IMT、そしてプラーク形成の有無の各項目について、今回解析した 7 種類の遺伝子のメチル化率との関係を検討した。

その結果を表 5 に示す。Stiffness parameter と明らかな関係を認めた遺伝子は *CETP* ($r = -0.11$, $P=0.0291$) のみであった。一方、mean IMT と明らかな関係を認めた遺伝子は *CETP* ($r = -0.12$, $P=0.0143$)、*TXIPN* ($r=0.15$, $P=0.0478$)、*HIF3A* ($r = -0.11$, $P<0.0223$) であった。

表4 内臓脂肪関連項目と関連を認めた各遺伝子における性別・年齢による補正

	脂肪肝の有無		内臓脂肪蓄積量		皮下脂肪厚		体脂肪率	
	標準	P値	標準	P値	標準	P値	標準	P値
<i>LPL</i>	0.031	0.0124	-	-	-	-	-	-
性別	0.119	0.0053	-	-	-	-	-	-
<i>ABCA1</i>	-	-	-	-	-	-	0.043	0.2699
性別	-	-	-	-	-	-	0.284	<0.0001
<i>TXIPN</i>	0.039	0.0198	0.212	0.1626	0.072	0.1992	0.085	0.7812
性別	0.199	0.1633	1.056	<0.0001	0.360	0.0183	0.412	<0.0001
年齢	0.023	0.5726	0.124	0.4797	0.042	0.0341	0.047	0.5963
<i>HIF3A</i>	-	-	0.085	0.4876	-	-	0.034	0.8495
性別	-	-	0.664	<0.0001	-	-	0.272	<0.0001
年齢	-	-	0.065	0.2749	-	-	0.026	0.1080

プラーク形成の有無で

表5 動脈硬化関連項目と各遺伝子のメチル化率との関係

DNA メチル化率に差を認めた遺伝子は <i>HIF3A</i> ($P=0.0002$) のみでありプラーク有が有意に低値を示した。そこで、内臓	Stiffness parameter		mean IMT		プラーク形成の有無		
	相関係数	P値	相関係数	P値	有(mean±SD)	無(mean±SD)	P値
<i>LINE-1</i> (n=469)	0.07	0.11	-0.06	0.17	57.0±2.8	56.9±2.8	0.86
<i>LPL</i> (n=452)	-0.01	0.91	-0.05	0.30	22.6±3.7	22.7±4.1	0.83
<i>CETP</i> (n=378)	-0.11	0.0291	-0.13	0.0143	76.4±8.5	75.5±9.0	0.36
<i>ABCA1</i> (n=326)	0.08	0.16	0.001	0.99	35.0±6.8	35.8±6.2	0.27
<i>TXNIP</i> (n=164)	0.01	0.93	0.15	0.0478	77.3±4.8	77.9±5.5	0.29
<i>SOCS</i> (n=164)	-0.05	0.55	-0.05	0.51	76.2±4.4	76.0±5.2	0.89
<i>HIF3A</i> (n=457)	0.05	0.31	-0.11	0.0223	40.9±8.0	38.0±7.7	0.0002

脂肪関連項目と同様に関係が認められた遺伝子について、性別または(かつ)年齢にて補正を行い検討してみると、明らかな関係が認められたものは Stiffness parameter および mean IMT と *CETP* ($P=0.0332$, $P=0.0320$) のみとなり、*TXNIP* と *HIF3A* の明らかな関係は認められなくなった

表6 動脈硬化関連項目と関連を認めた各遺伝子における性別・年齢による補正

	Stiffness parameter		mean IMT		プラーク形成の有無	
	標準	P値	標準	P値	標準	P値
<i>CETP</i>	1.862	0.0332	0.001	0.0320	-	-
性別	0.212	0.6308	0.008	<0.0001	-	-
<i>TXNIP</i>	-	-	0.003	0.2842	-	-
性別	-	-	0.013	0.2469	-	-
年齢	-	-	0.001	<0.0001	-	-
<i>HIF3A</i>	-	-	0.001	0.5251	0.015	0.2064
性別	-	-	0.007	0.0016	0.118	0.0351
年齢	-	-	0.001	<0.0001	0.013	<0.0001

(表6)

(4) まとめ

まず初めに、動脈硬化と内臓脂肪の関係を明らかにするための検討を行った。その結果、唯一関係性が認められたものは、Stiffness parameter と内臓脂肪蓄積量との関係であった。血管の硬さを表す Stiffness parameter は、粥状動脈硬化の初期段階である内膜の線維性肥厚においても初期の状態を反映すると考えられ、また我々のこれまでの研究でも Stiffness parameter はプラーク形成の予測因子となり得ることが明らかとなっている¹⁾。つまり、動脈硬化を極初期に評価する、あるいは将来的に動脈硬化の発症を予測するためには、内臓脂肪蓄積量と関連する DNA メチル化の変化を受けた遺伝子を明らかにすれば、動脈硬化のバイオマーカー開発に繋がることが示唆された。

そこで次に、内臓脂肪蓄積に伴う DNA メチル化などのエピジェネティックな変化を受けた遺伝子を検索するための検討を行った。その結果、報告者が最も注目した内臓脂肪蓄積量と明らかな関係を認めた遺伝子は *TXNIP* と *HIF3A* であったが、これらの遺伝子は性別および年齢とも関係があり、それらで補正すると明らかな関係は認められなくなった。つまり、今回検討した7種類の遺伝子には内臓脂肪蓄積量と明らかな関係を示すものはなく、今後は内臓脂肪蓄積量と関連する遺伝子を検索する必要がある。内臓脂肪蓄積には、生活習慣、脂質代謝や糖代謝など様々な因子が複雑に関係するため、後天的な修飾である DNA メチル化も多くの要因が複雑に影響を及ぼすと考えられ、今後のさらなる検討が必要であると思われた。

残念ながら、現段階では動脈硬化に関連する内臓脂肪蓄積量と明らかな関係を認める遺伝子を検索できなかったため、今回検討した7種類の遺伝子と動脈硬化の指標となる Stiffness parameter、mean IMT、プラーク形成の有無についてそれぞれ検討した。その結果、*CETP* 遺伝子のみで Stiffness parameter および mean IMT との間いずれも負の相関関係が認められたことから、*CETP* 遺伝子のメチル化率の変化が動脈硬化のバイオマーカーになり得る可能性があることが示唆された。

<参考文献>

The stiffness parameter assessed by an ultrasonic phase-locked echo-tracking system is associated with plaque formation in the common carotid artery. Ichino N, et al. *J Med Ultrasonics*. 2012; 39: 3-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshitaka Ando, Hiroya Yamada, Naohiro Ichino, Suzuki Koji, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Association of circulating miR-20a, miR-27a, and miR-126 with non-alcoholic fatty liver disease in general population.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55076-z	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryosuke Fujii, Naohiro Ichino, Hiroya Yamada, Suzuki Koji, et al.
2. 発表標題 CD36 polymorphism (rs1761667) was associated with fatty liver in a Japanese population.
3. 学会等名 NUTRITION2020アメリカ栄養学会年次総会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔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	鈴木 康司 (SUZUKI Koji) (60288470)	藤田医科大学・保健学研究科・教授 (33916)	
研究分担者	山田 宏哉 (YAMADA Hiroya) (80610352)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究協力者	刑部 恵介 (OSAKABE Keisuke)		

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
研究 協力者	杉本 恵子 (SUGIMOTO Keiko)		
連携 研究者	齋藤 邦明 (SAITO Kuniaki) (80262765)	藤田医科大学・保健学研究科・教授 (33916)	