

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08979

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝疾患のゲノム・エピゲノム統合的解析による発症・進行機序の解明

研究課題名(英文)Genomic and epigenomic analysis of non-alcoholic fatty liver disease

研究代表者

堀田 紀久子(Hotta, Kikuko)

大阪大谷大学・薬学部・教授

研究者番号：30360639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：NAFLD患者で同定した2個のdifferentially methylated region (DMR)ネットワークがC型肝炎や肝臓癌でも保存されているかを肝炎、肝臓の2種類のデータベースを用いて検討した。NAFLDで線維化進行に伴いメチル化が低下するDMRネットワークは正常やC型肝炎、肝臓癌で認められなかった。一方NAFLDで線維化進行に伴いメチル化が増加するDMRネットワークはC型肝炎、肝臓癌でも認められた。NAFLDから肝硬変、肝臓癌発症過程でDMRsネットワークが変化すること、及びネットワークに存在する重要な遺伝子が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLDから肝臓癌発症機序は不明な点が多い。NAFLDは脂肪肝から脂肪肝炎、肝硬変へと進行する。線維化が進行しているほど肝臓癌発症リスクが高まる。NAFLDの線維化に関連する2個のDMRネットワークを報告してきた。本研究では1つのネットワークはウイルス性肝炎や肝臓癌で保存されており、ネットワークに存在する遺伝子はNAFLDの線維化に伴い発症する肝臓癌に関連していることが示された。もう1つのネットワークはNAFLD特異的で、細胞増殖に関連する遺伝子が含まれており、NAFLDから発症する肝臓癌に関連していると考えられる。これらの遺伝子はNAFLDの治療や肝臓癌発症予防のターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that two differentially methylated region (DMR) networks correlated with the fibrosis stages of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). We examined these DMR networks in viral hepatitis and hepatocellular carcinoma (HCC). One DMR network was clearly observed in viral hepatitis and two HCC populations. Methylation levels of genes in this network were higher in viral hepatitis and lower in HCC. The other DMR network was observed in NAFLD, but not in viral hepatitis or HCC. This second network included genes involved in transcriptional regulation, cytoskeleton organization, and cellular proliferation, which are specifically related to fibrosis and/or tumorigenesis in NAFLD. We found that several genes would be candidate targets for the prevention and treatment of HCC.

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 メチル化 ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

近年、カロリーの過剰摂取による異所性脂肪蓄積(内臓脂肪蓄積、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD))から生じるメタボリックシンドロームによる健康障害が問題になっている。NAFLDは脂肪肝から炎症、線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、肝硬変に至る幅広い症状を呈する疾患である。NAFLDの発症、進行のメカニズムを明らかにするためゲノム・エピゲノム研究や解析方法の開発を行ってきた。ゲノムワイド関連解析 (GWAS)にて *PNPLA3*、*SAMM50*、*PARVB*を含む領域の遺伝子多型がNAFLD発症だけでなく線維化進行に重要であることを報告してきた(1-3)。次世代シーケンシング技術を応用した targeted-bisulfite sequence法を開発し *PNPLA3* 遺伝子上の CpG99 のメチル化増加と *PNPLA3* の発現量低下、*PARVB* 遺伝子上の CpG26 のメチル化低下がNAFLDの線維化進行に関連していることを見出した。*PNPLA3* rs738409 の遺伝子多型がCpG99のメチル化増加と *PNPLA3* の発現低下に影響することを明らかにしてきた(4)。

NAFLDの肝生検組織を用いたRNAシーケンシングを行い線維化進行に伴い発現量が変動する遺伝子を同定した。遺伝子共発現解析(WGCNA)にてこれらの遺伝子は3つのmoduleにクラスタリングされることが明らかとなった。Module 1には細胞外マトリックス、細胞シグナル関連遺伝子が集簇し、4個のハブ遺伝子(*PAPLN*、*LBH*、*DPYSL3*、*JAG1*)を伴うスケールフリーネットワークを形成していた。*PAPLN*は細胞外マトリックス、*LBH*と*DPYSL3*は癌抑制、*JAG1*は発癌に関連する遺伝子で線維化進行に伴い発現が増加し線維化や前癌状態に関連していることが示唆された。Module 2にはミトコンドリア、酸化還元関連遺伝子が集簇しておりランダムネットワークを形成し線維化進行に伴い発現が低下しNAFLD進行に伴うミトコンドリア機能低下に関与することが示唆された(5)。ゲノムワイドメチル化解析にてNAFLDの軽度及び重度線維化の2群間で有意差を認めた約6万ヶ所のCpGについてWGCNAを用いたco-methylation解析を行い、3個のmoduleにクラスタリングされることを明らかにした。Module 1に属するCpGは免疫反応に関連している遺伝子が多く、高度線維化群でメチル化が低下していた。Module 2に属するCpGはミトコンドリアでの酸化還元、脂質代謝に関連する遺伝子が多く、高度線維化群でメチル化が増加しミトコンドリア機能低下や代謝異常と関連することが示唆された(6)。Probe Lasso法を用いてNAFLDの高度線維化群と軽度線維化群間で連続した複数のCpGのメチル化レベルが変化するゲノム領域(differentially methylated region; DMR)を610ヶ所同定した。WGCNAで得られたCpG間のtopological overlap値を各DMR内で平均値を計算しDMRのネットワーク解析を行う手法を開発した。この手法を用いて2個のDMRネットワークを同定した(7)。NAFLDの症例のみで認められコントロールでは認められなかったネットワーク2に属する遺伝子は*PEMT*など重要な代謝遺伝子が多く、線維化の進行に伴いメチル化が増加していた。このネットワークに存在する*HNF4A*、*MIR192/MIR194-2*、*ABCG5/ABCG8*、*CHIDI1*、*NUPR1* 遺伝子上のDMRは肥満外科手術による減量でメチル化レベルが低下し可逆性変化が認められた。別のDMRネットワーク1はNAFLDだけでなくコントロールの肝臓でも認められた。転写制御(*ZBTB38*、*TLE3*、*CASZ1*)、細胞増殖(*RHOD*、*ARHGEF25*)、細胞内シグナル(*GPR56*、*ITGA3*)、oncogene (*AGRN*)に存在するDMRが含まれておりNAFLDの進行に重要な働きをしていると考えられた。メチル化レベルは線維化stage、年齢、空腹時血糖と強い相関を示し、減量による可逆性が認められなかったことから、長期の高カロリーが肝臓のDNAメチル化レベルに不可逆的な変化をもたらすNAFLDの線維化、前癌状態に関連していることが示唆された。

2. 研究の目的

NAFLDは多様な表現型を示すにもかかわらず、発現変動遺伝子やDMRが2-3の限られたネットワークに集約されることが明らかとなった。これはNAFLD発症・進行に伴い発現やDNAメチル化を制御する少数の因子の存在を示唆する。その因子を同定することはNAFLDの病態解明、治療方法の開発に有用である。NAFLDでは加齢に伴い早期から癌化に関連する遺伝子上のDMRのメチル化レベルが不可逆的に変化する。本研究ではNAFLDで認められた線維化に関連したDMRネットワークが他の線維化を起こすC型肝炎やアルコール性肝障害でも存在するかどうか、また肝癌発症後でもネットワークが保存されているかについて検討した。

3. 研究の方法

NAFLDで同定した線維化に関連するDMRネットワークが他の肝臓疾患で存在するかを検討するため、データベースGSE89852(37のウイルス性肝炎サンプル、37の肝癌サンプル)とGSE56588(224人のイタリア人肝癌サンプル)を用いた。ネットワークから抽出した重要な遺伝子のメチル化レベルについて、データベースGSE60753を用いて検討した。日本人NAFLD(n = 60)、アメリカ人NAFLD(n = 56)、ドイツ人コントロール(n = 34)についてはすでに報告しているデータを用いた(7)。これらのデータベースはInfinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いてメチル化レベルが測定されている。

すでに報告しているNAFLDの線維化に関連している610カ所のDMRに存在する3,683カ所のCpGs sitesをデータベースから抽出し、WGCNAを用いて共分散分析を行った(6, 7)。具体的に

はWGCNA R packageを用いて3,683 CpG sitesの共分散分析を行った。ネットワークはadjacency matrix $A = [\alpha_{ij}]$ で示される。 α_{ij} は $PCC_{i,j}/\beta$ であり、 $PCC_{i,j}$ はi番目とj番目のサンプル間のPearsonの相関係数である。この β はsoft thresholdと言い、各サンプル群で決定する。今回はスケールフリーモデルの適合度が $R^2 > 0.70$ になる β を選択した。日本人NAFLDは16、アメリカ人NALFDは14、ドイツ人コントロールは14、日本人ウイルス性肝炎は7、日本人肝癌は6、イタリア人肝癌は6に設定した。WGCNAで計算した各CpGサイトのtopological overlap measuresをDMR単位で平均値を計算し、ネットワークをCytoscape softwareを用いて可視化した。

DMRのメチル化レベルの差はHotelling's T -squared testを用いて検定した。

4. 研究成果

図1に示すように、NAFLD線維化に関連した2個のネットワークのうちネットワーク1はNAFLDとコントロールのみで認められ、ウイルス性肝炎、肝癌では認められなかった。ネットワーク2はC型肝炎、肝癌でも認められた。ネットワーク1はNAFLD特異的で、ネットワーク2はC型肝炎や肝癌にも共通するネットワークであることが明らかとなった。

図2に示すようにネットワーク2ではウイルス性肝炎、肝癌で共通の遺伝子がネットワークの中心部に存在していることが明らかとなった。Fatty acid binding protein 1 (*FABP1*)、serum/glucocorticoid regulated kinase 2 (*SGK2*)、hepatocyte nuclear factor 4 α (*HNF4A*)がネットワーク2のハブ遺伝子である可能性が高いと考えられた。

データベースGSE89852では*FABP1*、*SGK2*、*HNF4A*遺伝子のメチル化レベルは非癌部に比較して、肝癌部位で低下していた(図3)。データベースGSE56588には肝癌以外に11人の正常肝臓部位と10人の肝硬変の肝臓サンプルのメチル化データが含まれていた。肝硬変では正常よりメチル化レベルが増加しており、肝癌では正常近くまで低下していた。

GSE89852はB型あるいはC型肝炎から発症した肝癌患者の肝癌部位と非癌部のメチル化を比較しているの、非癌部は線維化が進行していることが考えられる。データベースGSE56588を用いて、肝硬変、肝癌での*FABP1*、*SGK2*、*HNF4A*遺伝子のメチル化レベルを詳細に検討した。GSE56588には34の正常肝臓サンプル、39のC型肝炎ウイルスによる肝硬変サンプル、21のアルコール性肝硬変サンプル、12のC型肝炎から発症した肝癌サンプル、15のアルコール性肝障害から発症した肝癌サンプル、8の肝癌培養細胞のメチル化データが含まれている。*FABP1*、*SGK2*、*HNF4A*遺伝子のメチル化レベルは、C型肝炎とアルコール性肝疾患のいずれの原因であっても肝硬変では正常より増加することが示された(図4)。C型肝炎ウイルスあるいはアルコール性肝障害から発症した肝癌ではメチル化レベルが正常まで低下することが明らかとなった。

以上の結果より、NAFLD特異的なDMRネットワークとNAFLD、ウイルス性肝炎、アルコール性肝障害、肝癌に共通するDMRネットワークが存在することを明らかにした。*FABP1*、*SGK2*、*HNF4A*遺伝子のメチル化レベルは肝臓の線維化や癌化に重要な働きがあることを明らかにした。

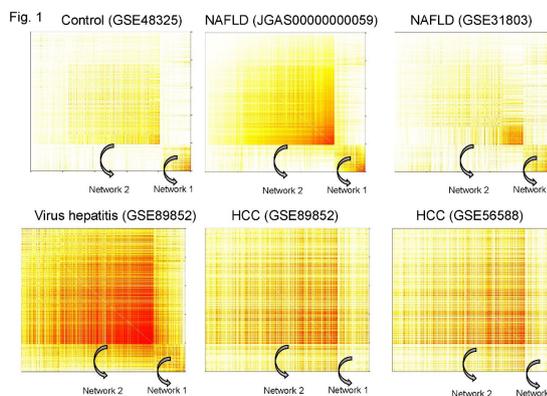


Fig 2

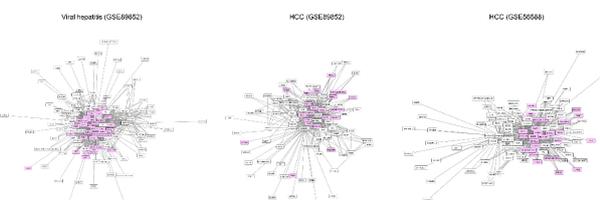


Fig. 3

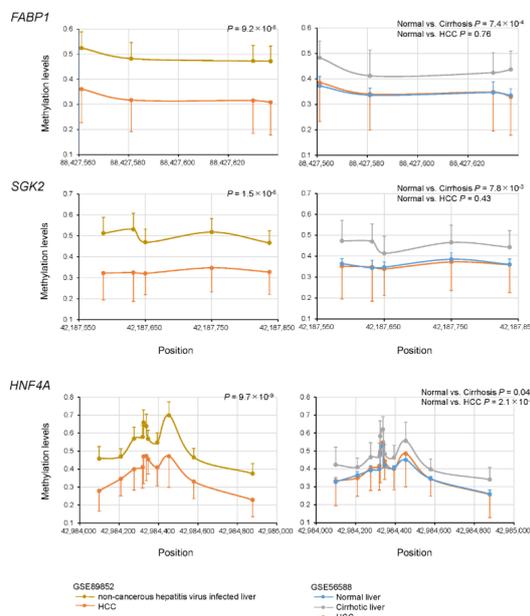
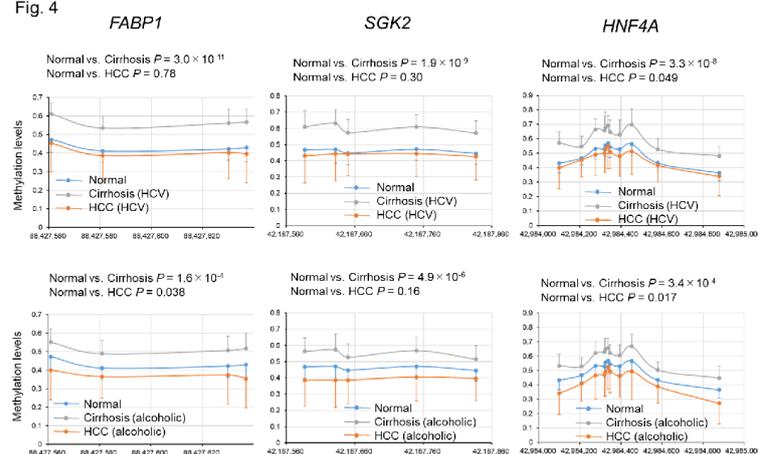


Fig. 4



引用文献

1. Hotta K, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A. Association of the rs738409 polymorphism in PNPLA3 with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *BMC Med Genet* 11:172-181, 2010
2. Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Nakamura T, Teranishi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A, Hotta K. Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hum Genet* 132:783-792, 2013
3. Kitamoto T, Kitamoto A, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Nakao K, Sekine A, Chayama K, Nakajima A, Hotta K. Targeted next-generation sequencing and fine linkage disequilibrium mapping reveals association of PNPLA3 and PARVB with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *J Hum Genet* 59:241-246, 2014
4. Kitamoto T, Kitamoto A, Ogawa Y, Honda Y, Imajo K, Saito S, Yoneda M, Nakamura T, Nakajima A, Hotta K. Targeted-bisulfite sequence analysis of the methylation of CpG islands in genes encoding PNPLA3, SAMM50, and PARVB of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 63:494-502, 2015
5. 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 non-alcoholic fatty liver disease by RNA sequencing. *Hepatol Res* 47:1445-1458, 2017
6. 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 non-alcoholic fatty liver disease progression. *Hepatol Res* 48:E320-E334, 2018
7. 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* 8:13567, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Shigeru, Morimoto Takeshi, Tanaka Sayaka, Hotta Kikuko, Fujikado Takashi, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 20
2. 論文標題 Novel mutation identified in Leber congenital amaurosis - a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12886-020-01577-9	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 Yamakage Hajime, Konishi Yousuke, Muranaka Kazuya, Hotta Kikuko, Miyamoto Yoshihiro, Morisaki Hiroko, Morisaki Takayuki, Satoh Asahara Noriko	4. 巻 -
2. 論文標題 Association of protein tyrosine phosphatase 1B gene polymorphism with the effects of weight reduction therapy on bodyweight and glycolipid profiles in obese patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	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） 10.1111/jdi.13492	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 Sato S, Morimoto T, Hotta K, Fujikado T, Nishida K	4. 巻 40
2. 論文標題 Eleven-year follow-up of a Japanese retinitis pigmentosa patient with an HK1 gene mutation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ophthalmic Genet.	6. 最初と最後の頁 466-469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13816810.2019.1678179.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀田紀久子
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝疾患、C型肝炎、肝臓癌でのメチル化レベルの比較
3. 学会等名 第42回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀田紀久子
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝疾患と肝臓癌でのメチル化解析
3. 学会等名 第41回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅原哲子、山蔭一、小西陽介、村中和哉、堀田紀久子、宮本恵宏、森崎裕子、森崎隆幸
2. 発表標題 PTP1B遺伝子多型は日本人のBMI及び減量治療抵抗性に関連する
3. 学会等名 第41回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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、留野涉、斉藤聡、中島淳
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝疾患におけるdifferentially methylated regions (DMRs) のネットワーク解析
3. 学会等名 第40回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北本綾、北本卓也、内田千晴、堀田紀久子
2. 発表標題 CDH13遺伝子の多型は血中アディポネクチン、内臓脂肪と独立してメタボリックシンドロームに関連している
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------