

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19434

研究課題名（和文）レジスチンの大規模エピゲノムワイドメタ解析による生活習慣病の発症機構解明

研究課題名（英文）Large-scale epigenome-wide meta-analysis of resistin to elucidate the pathogenesis of lifestyle-related diseases.

研究代表者

中柄 昌弘（Nakatochi, Masahiro）

名古屋大学・医学系研究科（保健）・准教授

研究者番号：10559983

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：DNAメチル化が血中レジスチン濃度を介して生活習慣病の発症に如何なる影響を与え、それが調査・解明を行うため、我々が保有するコホート研究と公開されている海外のデータでレジスチンのエピゲノムワイド関連研究(EWAS)のメタ解析を実施した。その結果、レジスチンと関連するDNAメチル化サイトを新たに2か所同定した。これらのDNAメチル化サイトはいずれもレジスチンをコードするRETN遺伝子近傍には存在しなかった。レジスチン濃度はRETN遺伝子以外の遺伝子によってエピジェネティックに制御されている可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レジスチンの分泌異常である高レジスチン血症は、肥満、メタボリックシンドローム、冠動脈疾患など様々な病態において認められ、これらの生活習慣病の発症および進展に深く関与する。高レジスチン血症の改善による疾患発症リスク低減の方策を考えるためには、レジスチンが増加する分子メカニズムの解明と、そのメカニズムに沿った介入戦略・治療戦略の開発が必要である。本研究で得られた成果は、これまでに分かっていたRETN遺伝子以外によるレジスチン濃度増減メカニズムの可能性を提示しており、レジスチン濃度調節機構の全貌解明の手掛かりとなる。

研究成果の概要（英文）：To investigate how DNA methylation affects the development of lifestyle-related diseases via blood resistin levels, we conducted a meta-analysis of epigenome-wide association studies (EWASs) for resistin level in our own cohort study and in public available data. As a result, we identified two new DNA methylation sites associated with resistin. None of these DNA methylation sites were located near the RETN gene encoding resistin. This indicates that resistin levels may be epigenetically regulated by genes other than the RETN gene.

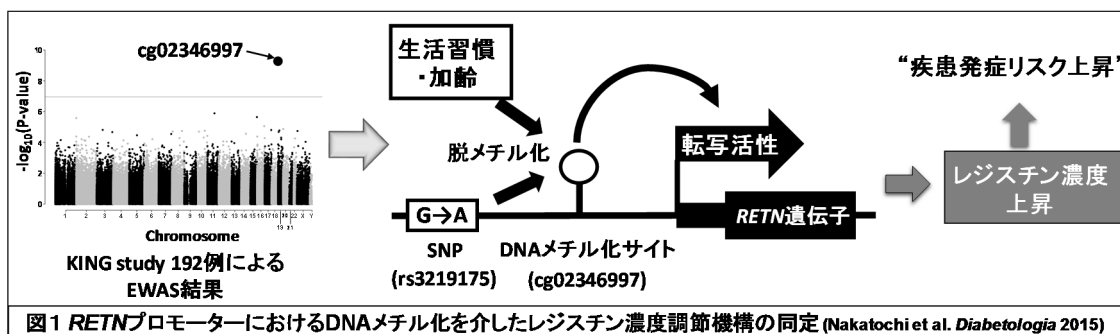
研究分野：バイオインフォマティクス、遺伝疫学

キーワード：エピゲノム レジスチン バイオインフォマティクス DNAメチル化 生活習慣病

### 1. 研究開始当初の背景

レジスチンは、マウスの脂肪細胞より分泌されるインスリン抵抗性誘導物質として最初に発見された(Nature 409: 307 (2001)。その後ヒトにおいては、脂肪細胞ではなく、主に単球やマクロファージで産生・分泌されていることが分かってきた(PLoS Med 1: e45 (2004))。その分泌異常である高レジスチン血症は、肥満や高血圧、2型糖尿病、メタボリックシンドローム、冠動脈疾患など様々な病態において認められ、これらの生活習慣病の発症および進展に深く関与する(Science 303: 1195(2004), Circulation 111: 932 (2005), J Am Coll Cardiol 53: 754 (2009), Am Heart J 163:119 (2012), Atherosclerosis 239:101 (2015))。この様な背景から、高レジスチン血症の改善による疾患発症リスク低減の方策が求められている。そのためには、レジスチンが増加する分子メカニズムの解明と、そのメカニズムに沿った介入戦略・治療戦略の開発が必要である。血中レジスチン濃度が変動する病態の多くでは、レジスチン遺伝子の発現に転写レベルの制御を伴っている事から、このタンパク質の発現機構の解明は急務である。

血中のレジスチン濃度は、喫煙・飲酒・運動習慣等の環境因子と、一塩基多型(SNP)等の遺伝因子の相互作用によって変動する事が知られている。これらの因子に加え、近年、遺伝子の発現や働きは、DNA のメチル化を初めとする後天的ゲノム修飾を受けて決定されることが明らかになってきた。我々はこれまでに地域住民を対象としたコホート集団(北名古屋ゲノム疫学研究:KING study) 192 例の血球において DNA メチル化アレイ(45 万メチル化サイト)を測定し、血中レジスチン濃度と関連する DNA メチル化サイトの探索研究(エピゲノムワイド関連研究, EWAS)を実施した。その結果、図 1 に示すようにレジスチン遺伝子(*RETN*)近傍にある SNP(rs3219175)の G から A への変化が、近隣の DNA メチル化サイト(CG02346997)を介して *RETN* 遺伝子発現を調節し、結果として血中レジスチン濃度を上昇させていることをつきとめた(Diabetologia 58:2781 (2015))。このように DNA メチル化を介したレジスチンの調節機構を同定できたものの、レジスチン濃度の変動の半分以上は未だ説明がついていない。そこで、“*RETN* 遺伝子以外にある多くの DNA メチル化サイトがレジスチン濃度の調節に寄与しているのではないか?”という可能性が考えられる。



### 2. 研究の目的

本研究では、KING study を含めた国内外のコホートの血球のメチル化アレイデータを基に、レジスチン濃度の大規模エピゲノムワイドメタ解析を実施し、レジスチン濃度に関連する新規 DNA メチル化サイトを同定する。同定したメチル化サイトを通して後天的ゲノム修飾が血中レジスチン濃度を介して疾患発症に如何なる影響を与えるか、調査・解明する。

### 3. 研究の方法

エピゲノムワイドメタ解析のために、日本人 622 名とドイツ人 422 名(合計 1044 名)からなる 4 つの研究を対象とした。これらすべての研究で、イルミナ社製 DNA メチル化アレイのデータが取得された。DNA メチル化レベルは白血球から取得したものをを用い、M-value として定量化した後、Z 値に変換した。血中レジスチン濃度は  $\log_2$  変換した後 Z 値に変換した。

一般線形モデルを用いて、各 DNA メチル化サイトのメチル化レベルと血中レジスチン値との関連を評価した。調整因子には年齢、性別、喫煙状況、BMI、レジスチン濃度と関連する一塩基多型を用いた。各研究の関連解析結果を、固定効果逆分散加重法を用いて統合した。ゲノムワイド有意水準は偽発見率(FDR) < 1%とした。

以上のエピゲノムワイドメタ解析で同定した 4 つの DNA メチル化サイトについて、公開されているスウェーデン人 732 名のデータを用いて再現性を評価した。有意水準は  $p < 1.25\%$ (=5%/4)とした。

更に同定した 4 つの DNA メチル化サイトについて、公開されている単球の *RETN* mRNA 量との関連を評価した。メチル化レベルには M-value, *RETN* mRNA 量は  $\log_2$  変換した発現量を採用した。有意水準は  $p < 1.25\%$ (=5%/4)とした。

#### 4. 研究成果

人種横断型エピゲノムワイドメタ解析によって、5つのDNAメチル化サイトがゲノムワイド有意水準に到達した(表1)。このうち、レジスチン濃度と最も強い関連を示した cg22322184 は、我々が過去に報告した *RETN* 遺伝子内に存在するメチル化サイトであった。残りの4つのメチル化サイトはこれまでに報告されていない新規のものであった。

表1. レジスチン濃度とゲノムワイド有意な関連を示した DNA メチル化サイト

DNAメチル化 サイト	遺伝子の 位置関係	$\beta$	SE	$P$ 値 <sub>GC</sub>	Q 値	$r^2$	HetP
cg22322184	5'UTR	-0.140	0.022	7.11E-10	2.67E-04	61.5	0.051
Site A	Body	-0.156	0.026	1.95E-08	3.65E-03	36.4	0.194
Site B	Body	-0.103	0.018	8.59E-08	8.66E-03	18.8	0.296
Site D	5'UTR	-0.123	0.022	1.14E-07	8.66E-03	0	0.529
Site E	Body	-0.138	0.025	1.15E-07	8.66E-03	0	0.767

$\beta$ : 回帰係数 SE: 標準誤差  $P$ 値<sub>GC</sub>: genomic control 補正後のP値

HetP: 不均一性の検定結果 青: 新規DNAメチル化サイト

次にこれら新たに同定した4つのメチル化サイトについてスウェーデン人のサンプルで再現性を評価したところ、表2に示す通り、2つのサイトがレジスチン濃度と有意な関連を示した。このうち一つは、*RETN* 遺伝子以外の遺伝子の5'UTRに存在するSite Cであり、*RETN* 遺伝子以外の遺伝子のbodyに存在するSite Dであった。これらのDNAメチル化サイトは他の研究で喫煙や他の疾患との有意な関連が報告されていた。

表2. 独立したサンプルでの再現解析の結果

DNAメチル化 サイト	遺伝子の 位置関係	$\beta$	SE	$P$ 値
Site A	Body	-0.027	0.033	0.418
Site B	Body	-0.045	0.019	0.021
Site C	5'UTR	-0.072	0.026	0.005
Site D	Body	-0.091	0.029	0.002

$\beta$ : 回帰係数 SE: 標準誤差

青: 有意なDNAメチル化サイト ( $P$ 値 < 0.0125 (=0.05/4))

最後にこれら4つのメチル化サイトについて多人種コホートの単球のデータで、*RETN* の mRNA 量とDNAメチル化レベルの関連性を評価した。その結果、表3に示す通り、Site Cのみが単球の*RETN* mRNA量と有意な関連を示した。このことから、Site Cは単球中の*RETN* mRNA量を調節することで血中のレジスチン濃度を調節し、それ以外のSite Dは他のメカニズムでレジスチン濃度を調節していることが考えられる。

表3. 多人種コホートにおける単球の *RETN* mRNA 量と DNA メチル化レベルの関連

DNAメチル化 サイト	遺伝子の 位置関係	$\beta$	SE	$P$ 値
Site A	Body	-0.040	0.046	3.87E-01
Site B	Body	0.023	0.034	5.09E-01
Site C	5'UTR	-0.040	0.015	6.73E-03
Site D	Body	-0.032	0.031	2.99E-01

$\beta$ : 回帰係数 SE: 標準誤差

青: 有意なDNAメチル化サイト ( $P$ 値 < 0.0125 (=0.05/4))

以上の結果を通して、レジスチン濃度は *RETN* 遺伝子以外の遺伝子によってエピジェネティックに制御されている可能性を明らかにした。本研究の成果は将来的にレジスチンを標的とした介入戦略・治療戦略の一助になると期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakatochi M, Toyoda Y, Kanai M, Nakayama A, Kawamura Y, Hishida A, Mikami H, Matsuo K, Takezaki T, Momozawa Y, Biobank Japan Project, Kamatani Y, Ichihara S, Shinomiya N, Yokota M, Wakai K, Okada Y, Matsuo H	4. 巻 60
2. 論文標題 An X chromosome-wide meta-analysis based on Japanese cohorts revealed that non-autosomal variations are associated with serum urate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 4430-4432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keab404	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 Graham S E, Clarke S L, Wu K H, Kanoni S, Zajac G J M, ..., Nakatochi M et al.	4. 巻 600
2. 論文標題 The power of genetic diversity in genome-wide association studies of lipids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 675-679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-04064-3	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 該当する

1. 著者名 Chen J, Spracklen CN, Marenne G, Varshney A, Corbin L, ..., Nakatochi M et al.	4. 巻 53
2. 論文標題 The Trans-Ancestral Genomic Architecture of Glycemic Traits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 840-860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5281/zenodo.4607311	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 該当する

1. 著者名 1.Yengo L, Vedantam S, Marouli E, Sidorenko J, Bartell E, ..., Nakatochi M et al.	4. 巻 610
2. 論文標題 A saturated map of common genetic variants associated with human height	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 704 ~ 712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05275-y	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 該当する

1. 著者名 2. Ramdas S, Judd J, Graham S E, Kanoni S, Wang Y, ..., Nakatochi M et al.	4. 巻 109
2. 論文標題 A multi-layer functional genomic analysis to understand noncoding genetic variation in lipids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1366 ~ 1387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2022.06.012	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 該当する

1. 著者名 3. Kanoni S, Graham S E, Wang Y, Surakka I, Ramdas S, ..., Nakatochi M et al.	4. 巻 23
2. 論文標題 Implicating genes, pleiotropy, and sexual dimorphism at blood lipid loci through multi-ancestry meta-analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13059-022-02837-1	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 Toyoda Yu, Nakayama Akiyoshi, Nakatochi Masahiro, Kawamura Yusuke, Nakaoka Hirofumi, Yamamoto Ken, Shimizu Seiko, Ooyama Hiroshi, Ooyama Keiko, Shimizu Toru, Nagase Mitsuo, Hidaka Yuji, Ichida Kimiyoshi, Inoue Ituro, Shinomiya Nariyoshi, Matsuo Hirota	4. 巻 136
2. 論文標題 Genome-wide meta-analysis between renal overload type and renal underexcretion type of clinically defined gout in Japanese populations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism	6. 最初と最後の頁 186 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgme.2022.01.100	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 中枋 昌弘	4. 巻 2
2. 論文標題 エピゲノムワイド関連研究 (EWAS) による形質関連DNAメチル化サイトの探索	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JSBi Bioinformatics Review	6. 最初と最後の頁 58 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11234/jsbibr.2021.8	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中枋昌弘, 市原佐保子, 山本 健, 大中佳三, 松原達昭, 横田充弘
2. 発表標題 血中レジスチン濃度の人種横断型エピゲノムワイドメタ解析による新規DNAメチル化サイトの同定
3. 学会等名 第22回分子予防環境医学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiro Nakatochi, Sahoko Ichihara, Ken Yamamoto, Keizo Ohnaka, Tatsuaki Matsubara, Mitsuhiro Yokoya
2. 発表標題 Identification of DNA methylation sites by a trans-ethnic epigenome-wide meta-analysis for circulating resistin levels.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022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
研究協力者	横田 充弘  (Yokota Mitsuhiro)  (50201851)	久留米大学・医学部・客員教授   (37104)	
研究協力者	松原 達昭  (Matsubara Tatsuaki)  (30209598)	愛知みずほ大学・人間科学研究科・教授   (33928)	
研究協力者	市原 佐保子  (Ichihara Sahoko)  (20378326)	自治医科大学・医学部環境予防医学講座・教授   (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	山本 健  (Yamamoto Ken)  (60274528)	久留米大学・医学部医学科医科学講座・教授    (37104)	

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