

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：26201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24172

研究課題名（和文）白血球DNAメチル化を標的としたNAFLDの発症予測マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of a predictive marker for the development of NAFLD based on targeting leukocyte DNA methylation

研究代表者

山崎 未来（YAMAZAKI, Mirai）

香川県立保健医療大学・保健医療学部・助教

研究者番号：10778096

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の新しいバイオマーカー開発のための基礎的検討として、住民検診受診者を対象に白血球DNAメチル化率を測定し、脂肪肝との関連を解析した。本研究ではHIF3A、TXNIP、SOCSの3種類の遺伝子のメチル化率を測定し、脂肪肝との関連を解析した。その結果、脂肪肝が認められなかった者と比較して脂肪肝が認められた者ではTXNIP遺伝子メチル化率が低値を示した。さらに脂肪肝を重症度別に分けて解析したところ、TXNIP遺伝子メチル化率は重度脂肪肝との関連を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年先進国においてNAFLDが急増しており、国内においても1000万人以上に達すると推定されている。NAFLDは肝硬変・肝がんに進展するだけでなく、生活習慣病の発症・発展にも関わっているため、早期発見が重要課題となっている。DNAメチル化は後天的に遺伝子発現を制御するエピジェネティクス機構の一つであり、疾患の発症・発展に寄与するとされている。疫学研究によりNAFLDとDNAメチル化との関連についてエビデンスを構築することは、DNAメチル化を利用した新たな検査法の開発に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the association between fatty liver and leukocyte DNA methylation in a population-based study to establish a novel biomarker for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The association between methylation levels of three genes, HIF3A, TXNIP and SOCS, and fatty liver was analyzed. As a result, the TXNIP methylation level was significantly lower in those with fatty liver than in those without fatty liver. Furthermore, categorization of fatty liver by severity and analysis of the association with DNA methylation levels showed that the TXNIP methylation level was significantly lower in those with severe fatty liver than in those without fatty liver.

研究分野：検査医学

キーワード：DNAメチル化 NAFLD 脂肪肝 TXNIP

1. 研究開始当初の背景

近年先進国において非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) が急増しており、国内で 1000 万人以上と推定されている。NAFLD はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型である。肝硬変・肝がんに進展するだけでなく、生活習慣病の発症・発展にも関わってくる。加えて、自覚症状がないため見過ごされやすく、重症化した状態で発見されることが多い。そのため、集団検診レベルで早期にスクリーニングすることが重要課題となっている。しかし NAFLD の診断には肝生検による組織学的診断が唯一であるため、検診で容易に鑑別できる新たな検査法の開発が強く望まれている。

DNA メチル化とは遺伝子の配列を変えずにメチル化修飾によって転写活性を制御するエピジェネティクスの一つである。DNA メチル化は食事・喫煙・飲酒などの生活習慣によって変化する。メチル化修飾は非常に安定であり、一旦異常が生じると長期的に遺伝子発現に影響するため、種々の疾患の誘因となると考えられている。NAFLD 発症において生活習慣が危険因子となることを考えると、それを反映する DNA メチル化は NAFLD の新しいバイオマーカーとして期待できる。

2. 研究の目的

スクリーニング法を確立するための新たなバイオマーカーを開発するためには、患者ではなく一般人を対象に研究を進める必要がある。そこで本研究では NAFLD の新しいバイオマーカー開発のための基礎的検討として、住民検診受診者を対象に白血球 DNA メチル化レベルと脂肪肝との関連を明らかにすることを目的にした。

3. 研究の方法

(1) 解析対象

本研究では 2015 年に実施された住民検診の受診者のうち、腹部超音波検査を受け、かつ研究参加に同意が得られた 499 名を対象とした。対象者から採血で得られた末梢血からシリカメンブレン付きスピカラムを用いて DNA の抽出・精製を行った。

(2) 腹部超音波検査による脂肪肝の判定

脂肪肝の有無は腹部超音波検査にて判定した。脂肪肝が認められた者はさらに重症度別に Grade1~3 に分類した。Grade1 は肝腎コントラストが認められる者、Grade2 は肝脾コントラストが認められる者、Grade3 は深部エコーの減衰が認められる者とした。

(3) DNA メチル化解析

末梢血から抽出・精製した DNA をバイサルファイト処理し、PyroMarkQ24 Advanced (QIAGEN 社) を用いた Pyrosequencing 法にてメチル化率を測定した。本研究では NAFLD 発症要因である肥満、脂質異常症、喫煙などとの関連が報告されている Thioredoxin interacting protein (TXNIP)、Suppressor of cytokine signaling (SOCS)、Hypoxia Inducible Factor 3 Subunit Alpha (HIF3A) の 3 種類の遺伝子のメチル化解析を行った。TXNIP では 1 CpG site、SOCS では 4 CpG sites、HIF3A では 7 CpG site の DNA メチル化率を測定し、各 CpG site のメチル化率の平均値を算出して脂肪肝との関連について解析した。

4. 研究成果

研究対象者のうち脂肪肝が認められなかったものは 397 名、脂肪肝が認められた者は 102 名であった。脂肪肝が認められた者のうち Grade 1 と判定された者は 36 名、Grade 2 と判定された者は 35 名、Grade 3 と判定された者は 31 名であった。

対象者の末梢血から抽出した DNA のメチル化率を Pyrosequencing 法にて測定した。TXNIP、SOCS、HIF3A の 3 種類の遺伝子のメチル化率を脂肪肝の有無で比較した (表 1)。その結果、HIF3A および SOCS の遺伝子メチル化率は脂肪肝の有無によって差は認められなかった。TXNIP 遺伝子の DNA メチル化率は脂肪肝が認められなかった者と比較して脂肪肝が認められた者において有意に低値を示した (脂肪肝無 $77.2 \pm 6.4\%$ 、脂肪肝有 $75.6 \pm 5.3\%$, $p < 0.05$)。

表1. 脂肪肝の有無別での各遺伝子のDNAメチル化率の比較

遺伝子名	脂肪肝無 (平均±SD)	脂肪肝有 (平均±SD)	p値
TXNIP	77.2±6.4	75.6±5.3	0.02
SOCS	72.3±4.8	71.9±4.2	0.49
HIF3A	29.5±5.2	28.6±6.0	0.21

脂肪肝が認められた者を重症度別に分け、各遺伝子の DNA メチル化率を脂肪肝無と比較をした (表 2)。SOCS と HIF3A 遺伝子メチル化率は脂肪肝の有無別での比較と同様に、いずれの Grade

においても脂肪肝が認められなかった者との間に有意な差は認められなかった。TXNIP 遺伝子メチル化率を重症度別で比較した結果、脂肪肝が認められなかった者と比べて Grade 3 の者では有意に低値を示した（脂肪肝無 77.2±6.4%, Grade 3 72.8%±5.5%, p<0.01）。しかし、Grade 1 および Grade 2 との間には有意な差は認められなかった。

表2. 脂肪肝の重症度別での各遺伝子のDNAメチル化率の比較

遺伝子名	脂肪肝無 (平均±SD)	Grade 1 (平均±SD)	p値	Grade 2 (平均±SD)	p値	Grade 3 (平均±SD)	p値
TXNIP	77.2±6.4	77.9±4.7	0.93	75.7±4.7	0.50	72.8±5.5	<0.01
SOCS	72.3±4.8	71.3±4.5	0.69	72.0±3.7	0.99	72.5±4.3	0.99
HIF3A	29.5±5.2	27.9±5.5	0.68	29.1±6.2	0.99	29.0±6.6	0.99

本研究では肥満、脂質異常症、喫煙などとの関連が報告されている TXNIP、SOCS、HIF3A 遺伝子の DNA メチル化率と脂肪肝との関連を解析した。その結果、脂肪肝が認められた者では TXNIP 遺伝子メチル化率は低値を示すことが明らかになった。脂肪肝を重症度別に分け、DNA メチル化率との関連を解析した結果、TXNIP 遺伝子メチル化率は重度の脂肪肝を反映していることが明らかになった。研究計画当初の予定では脂質代謝関連遺伝子である PPAR および CPT1A 遺伝子のメチル化解析を行う予定であったが、本研究期間中ではアッセイ系の確立に至らず、今後の課題の一つである。本研究の対象者については質問紙法によるアルコール摂取量を調査している。今後は脂肪肝から NAFLD を抽出し、DNA メチル化率との関連を調査する。さらに本研究が基盤とする住民検診は毎年実施しているため追跡調査が可能である。2015 年度の検診受診者を対象に、DNA メチル化率と NAFLD 発症との関係についても縦断的に解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水野元貴、山田宏哉、宗網栄二、山崎未来、安藤嘉崇、藤井亮輔、勅使川原篤志、杉本恵子、刑部恵介、石川浩章、市野直浩、大橋鉦二、石井潤一、鈴木康司
2. 発表標題 末梢血におけるHypoxia-inducible factor 3A遺伝子のDNAメチル化率と内臓脂肪組織量及び皮下脂肪組織量との関連
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井亮輔、山田宏哉、安藤嘉崇、山崎未来、宗網栄二、水野元貴、大橋鉦二、石川浩章、前田圭介、萩原千晴、橋本修二、鈴木康司
2. 発表標題 一般住民を対象としたABCA1遺伝子のメチル化関連SNPおよびn-3多価不飽和脂肪酸摂取量とHDLコレステロールとの関連
3. 学会等名 第30回日本疫学学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田圭介、山田宏哉、宗網栄二、山崎未来、安藤嘉崇、水野元貴、大橋鉦二、石川浩章、藤井亮輔、坪井良樹、萩原千晴、橋本修二、浜島信之、鈴木康司
2. 発表標題 住民健診受診者における飲酒習慣と白血球中TXNIP遺伝子のDNAメチル化率との関連
3. 学会等名 第30回日本疫学学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井亮輔、山田宏哉、宗網栄二、山崎未来、安藤嘉崇、水野元貴、大橋鉦二、石川浩章、前田圭介、萩原千晴、橋本修二、鈴木康司
2. 発表標題 一般住民を対象とした脂質クオリティとABCA1遺伝子 DNA メチル化率との関連
3. 学会等名 第90回日本衛生学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野元貴、山田宏哉、宗網栄二、山崎未来、安藤嘉崇、藤井亮輔、勅使川原篤志、石川浩章、市野直浩、大橋鉦二、鈴木康司
2. 発表標題 末梢血におけるHypoxia-inducible factor 3A遺伝子のDNAメチル化率と肥満指標との関連
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坪井良樹、山田宏哉、宗網栄二、藤井亮輔、山崎未来、安藤嘉崇、水野元貴、前田圭介、服部裕次、石原裕也、大橋鉦二、石川浩章、橋本修二、浜島信之、鈴木康司
2. 発表標題 住民健診受診者を対象とした喫煙習慣とSOCS-3遺伝子の白血球DNAメチル化率との関連
3. 学会等名 第31回日本疫学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井亮輔、山田宏哉、安藤嘉崇、山崎未来、宗網栄二、水野元貴、前田圭介、坪井良樹、石原裕也、服部裕次、大橋鉦二、石川浩章、今枝奈保美、後藤千穂、橋本修二、若井建志、浜島信之、鈴木康司
2. 発表標題 一般住民を対象とした縮小ランク回帰による食事パターンとABCA1遺伝子のDNAメチル化率との関連
3. 学会等名 第31回日本疫学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------