

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 年～2010 年

課題番号：20790425

研究課題名（和文）大規模コホート研究における疫学的指標のエピジェネティクス解析

研究課題名（英文）An assessment of the association between epigenetic alterations and epidemiological features

研究代表者

野島 正寛 (Masanori Nojima)

研究者番号：00457699

研究成果の概要（和文）：地域一般住民 206 名から 1989 年に提供された保存血清を用いて、DNA メチル化と生活習慣および発癌リスクとの関連を検討した。その結果、長鎖散在反復配列 LINE-1 のメチル化レベルが男性で 1%程度高いことが示されたが、運動を除く生活習慣や発癌との関連は明らかとはならなかった。本研究では、血清 DNA の LINE-1 メチル化と生活習慣・発癌の関連が限定的である点、長期保存された血清を用いた DNA メチル化研究の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We conducted a cohort-based epigenetic study for assessment of the association of DNA methylation with lifestyle factors and cancer incidence, using stored serum donated from 206 healthy people in 1989. As the results, higher methylation levels of LINE-1 were observed in male samples (approx. 1%), but we found no significant association of methylation levels with lifestyle factors (other than exercise) and cancer incidence. This study suggests that the association of LINE-1 methylation levels in serum DNA with lifestyle factors and cancer incidence is limited, and the possibility of the use of long-term stored serum samples for assessment for DNA methylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：衛生学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：生活習慣、癌、分子疫学、DNA メチル化、エピジェネティクス、LINE-1

1. 研究開始当初の背景

疾病発症に関連するエピジェネティクス研究は、特に癌の分野において大きな発展が見られ、発癌メカニズムの一つとしてその役割が明らかにされてきた。代表的な例は、癌細胞でのゲノムワイドな DNA 低メチル化や、プロモーター領域に存在する CpG アイラン

ドの DNA 高メチル化による癌抑制遺伝子の不活化などである。最近では、メチル化をマーカーとした癌の診断や予後予測などの臨床応用へ向けた努力も行われるようになっており、その適用範囲は予防、スクリーニングから治療まで幅広い。

DNA メチル化異常は、老化や慢性的な炎症

などに伴って蓄積されていくとされているが、生活習慣、とくに食習慣との関連も重要である。以前より葉酸代謝が DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT: DNA methyltransferase) の活性に関連があることが明らかであったが (Wainfan E. Cancer Res. 1992 など)、近年になり研究が進展し、葉酸摂取や飲酒量の違いにより大腸癌細胞での DNA メチル化異常の頻度が異なるという報告 (van Engeland M. Cancer Res 2003) や、葉酸欠乏食による DNMT の発現低下 (Ghoshal K. J Nutr 2006) などが報告されている。現在、生活習慣の改善などに基づく疾病の一次予防の重要性が強く認識されているが、以上のような研究報告から、エピジェネティックな異常を疫学的、予防医学的な観点からも検討していくことの必要性が伺われる。

また近年、癌細胞由来の異常メチル化を伴った DNA が血清中に遊離していることが明らかとなっており (Grady WM. Cancer Res 2001)、血清から抽出された DNA を用いた症例対照研究の報告なども増加している (Wallner M. Clin Cancer Res; 2006)。報告によると、血清 DNA の異常メチル化の程度によって癌の進行度や予後に差がみられるといった結果が得られており、エピジェネティクス研究における研究材料としての可能性が示されている。

以上のような背景により、癌罹患と生活習慣の調査を目的とした地域コホート研究 (旧穂別町コホート) の保存血清を用いた DNA メチル化解析、という本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

札幌医科大学公衆衛生学講座で追跡調査を行っている旧穂別町コホートにおいて、

(1) 前向き研究による血清 DNA メチル化異常と発癌リスクの解析、ならびに (2) 横断研究による各種生活習慣と血清 DNA メチル化異常リスクの解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 対象者

旧穂別町コホートにおける健常人 726 名に対し保存血清の DNA 研究への利用についての同意を確認するため、対象者全員に郵送にて説明文書と同意書の発送を行った。その結果、313 名から同意が得られ (返送なしが 385 名、拒否・書類不備が 28 名)、そのうち保存血清が利用可能であった 206 名 (男性 67 名、女性 139 名) を研究対象者とした。死亡者については、同意の確認が不可能であるためこれを除外した。

(2) 保存血清からの DNA 抽出

保存血清 200 μ l から DNA を抽出し、30 μ l の溶液としてその後の解析に利用した。血清 DNA 抽出キットには Qiagen 社の DNA Blood Mini Kit を利用した。

(3) メチル化解析

抽出された DNA に対し bisulfite 処理を行い、メチル化を受けていないシトシンをウラシルに変換。こうしたサンプルに対し Pyrosequencing 法を行い、多数のサンプルのメチル化を同時に解析し、定量的な評価を行った。今回の研究では、ゲノム上に広く存在し発癌との関連も知られる長鎖散在反復配列 (Long Interspersed Elements 1: LINE-1) のメチル化頻度を測定した。

(4) 統計解析

各遺伝子のメチル化解析の結果と、現在までに得られたコホート研究の情報を統合し統計学的な解析を行った。研究目的に示した項目を検討するため、混合モデルや Cox 回帰などを利用した。

4. 研究成果

研究の方法で述べた LINE-1 についてメチル化頻度の測定を行い、各種要因における差を検出するため比較検討を行った。対象者の背景は表 1 に示す通りである。

まず、男女差について検討したところ LINE-1 メチル化頻度が男性 69.7%、女性 68.6% で t 検定による P 値が 0.057 と有意ではないものの男性で 1% ほど高いという結果が得られた (図 1、表 2)。これについては過去の研究でも同様の結果が得られている (El Maarri O. PLoS One 2011, Zhu ZZ. Int J Epidemiol 2010)。年齢や BMI については特に傾向は見られなかった (表 2 上部)。

続いて、各種生活習慣と LINE-1 のメチル化の関連について検討を行った (表 2 中～下

表1 対象者の背景

		Male	Female
	N	67	139
Age	<40	6	21
	40-49	26	46
	50-59	16	43
	60-69	19	29
BMI	<=18.5	0	3
	18.6-25.0	22	56
	25.1-30.0	13	25
	30.1+	1	2
Smoker	Smoker	31	14
	Non-Smoker	19	118
	Former Smoker	16	2
Drinker	Drinker	42	26
	Seldom-Drinker	20	108
	Former Drinker	2	4

図1 性別LINE-1メチル化頻度

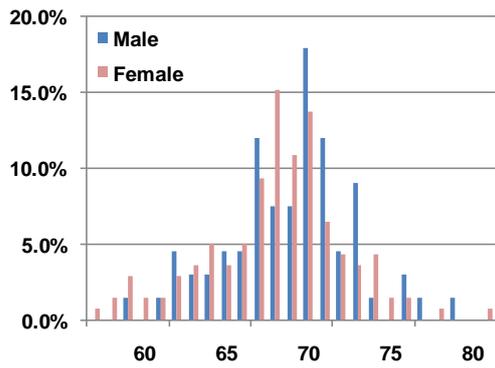


表2 各種生活習慣とLINE-1メチル化の関連

Sex	n	LINE1 methylation	95% CI		P value
			lower	upper	
Male	67	69.7	67.3	72.2	
Female	139	68.6	65.8	71.4	0.057

Age	n	LINE1 methylation	95% CI		P value
			lower	upper	
<40	27	67.9	65.6	70.3	
40 - 49	72	69.6	67.2	72.1	0.134
50 - 59	59	68.9	66.6	71.3	0.516
60<	48	69.3	67	71.6	0.309
P trend					0.251

BMI	n	LINE1 methylation	95% CI		P value
			lower	upper	
<21.8	31	68.2	65.6	70.8	
21.8-24.0	30	68.8	66.2	71.4	0.859
24.1-25.6	31	69.1	66.6	71.6	0.682
25.6<	30	68.1	65.5	70.7	1.000
P trend					0.989

Smoking	n	LINE1 methylation	95% CI		P value
			lower	upper	
Non-smoker	137	69.1	67.5	70.7	
Former	18	70.6	68.1	73	0.979
Current 19</day	21	68.8	66.6	71	0.964
Current <19/day	25	68.7	66.5	70.9	0.521

Drinking	n	LINE1 methylation	95% CI		P value
			lower	upper	
<1 day	128	69.3	67.7	70.9	
1-4 day	33	69.1	67.2	71	0.761
>4 days	35	68.5	66.5	70.4	0.343
Former	6	71	67.5	74.5	0.309
P trend					0.323

Exercise (hours/week)	n	LINE1 methylation	95% CI		P value
			lower	upper	
<1 hour	156	69.1	66.3	71.8	
1-2 hours	26	70.1	67.8	72.4	0.53
3-4 hours	12	68.4	65.6	71.2	0.915
>5 hours	10	66.4	63.5	69.4	0.121
P trend					0.020

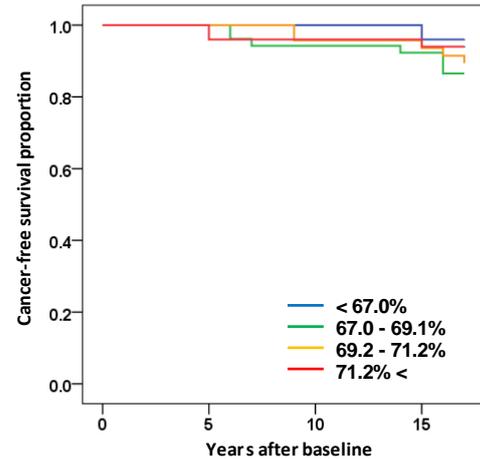
Green yellow vegetables (times/week)	n	LINE1 methylation	95% CI		P value
			lower	upper	
< 1.5	67	69.8	67.3	72.2	
1.5 - 2.5	37	69.7	67.3	72	0.999
2.5 - 4	60	68.2	65.8	70.7	0.090
>4	42	69.2	66.8	71.6	0.831
P trend					0.217

Japanese tea	n	LINE1 methylation	95% CI		P value
			lower	upper	
<1 times/month	43	68.6	66.3	70.8	
3-4 times/week	42	69.1	66.9	71.4	0.866
everyday	48	69	66.7	71.2	0.934
3 times/day	72	69.6	67.3	72	0.389
P trend					0.231

表3 LINE-1メチル化と発癌の関連

LINE1 methylation (%)	Cancer Incidence	N	P	HR*	95% CI	
					Lower	Upper
<67.0	2	50				
67.0 - 69.1	7	52	0.087	4.13	0.81	20.96
69.2 - 71.2	6	48	0.198	3.00	0.56	16.02
71.2 <	3	50	0.932	1.09	0.15	7.95
P for trend				0.926		

図2 LINE-1メチル化と発癌の発生に関するKaplan-Meier曲線



部)。項目は、喫煙、飲酒、運動、緑黄色野菜摂取、日本茶摂取の6項目である。性、年齢を調整して検討を行った結果、多くの項目について目立った関連性は見られなかったが、運動の頻度とLINE-1の低メチル化に有意な相関が見られた(P trend=0.020)。この結果については、異なった結果を示している研究もあり、解釈には注意を要する(Zhang FF Epigenetics, 2011)。ただし、いずれの検討においてもメチル化レベルの変動はごくわずかであり、影響が限定的であることが示唆された。

最後に、前向き研究として癌の発生について検討を行ったところ、有意ではないもののLINE-1中等度メチル化群で発症が多いという結果となった(表3)。こちらの結果についても、LINE-1低メチル化が発癌、癌の進展に関与するという従来の研究報告とは結果が一致していない(Zhu ZZ. Cancer Causes Control 2010など)。ただ、今回の研究の対象者は、過去の研究に比べ若年者が多く(死亡者が除外されている影響が大きい)、発症までの期間も長い為、従来の結果と一致しなかった可能性がある。

以上より、約20年を経て保存された血清を利用したDNAメチル化研究が可能であることが明らかとなり、健康人においては血清におけるLINE-1メチル化レベルのバラつきが小さく、生活習慣および発癌との関連を調べるには大規模なサンプルサイズが必要となると考えられた。今後の展望としては、新たに計画されたコホート研究における保存血清のエピジェネティクス研究への利用促

進などが挙げられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

(1) 野島 正寛ほか. 血清 DNA を用いた生活習慣と DNA メチル化の関連についての検討. 第 21 回日本疫学会学術総会 2011 年 1 月 21 日, 札幌

(2) Masanori Nojima, et al. An Assessment of the Association between Lifestyle Factors and DNA Methylation of Repetitive Elements in serum samples. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 23 日, 大阪

(3) 野島 正寛ほか. 血清 DNA を利用した DNA メチル化と生活習慣の関連についての検討. 文部科学省科学研究費がん特定領域大規模コホート研究 (JACC Study) 2010 年度第 1 回研究進捗状況報告会. 2010 年 6 月 14 日, 名古屋

(4) 野島 正寛ほか. JACC Study 保存血清を用いたエピジェネティクス解析の可能性 (第 2 報). 文部科学省科学研究費がん特定領域大規模コホート研究 (JACC Study) 2008 年度第 1 回研究進捗状況報告会. 2008 年 6 月 9 日, 名古屋

(5) 野島 正寛ほか. JACC Study 保存血清を用いたエピジェネティクス解析の可能性. 文部科学省科学研究費がん特定領域大規模コホート研究 (JACC Study) 2007 年度第 2 回研究進捗状況報告会. 2008 年 1 月 15 日, 名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

研究代表者

野島 正寛 (Masanori Nojima)

研究者番号: 00457699