

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03206

研究課題名(和文) 地域住民を対象とした生活習慣病の包括的リスクアルゴリズムの検証的疫学研究

研究課題名(英文) A validation epidemiological study of a comprehensive risk algorithm for lifestyle-related diseases in a community-based population

研究代表者

横田 充弘 (Yokota, Mitsuhiro)

久留米大学・医学部・客員教授

研究者番号：50201851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会を迎えた現在の我が国において、循環器疾患を含む生活習慣病に対する予防法の確立は、医学・医療における重要な課題となっている。本研究では、過去に我々が蓄積してきた研究基盤を基に、国内・国際コンソーシアムへ参画してゲノムワイド関連解析を行い、2型糖尿病、高血圧症、脂質異常症、体格指標(肥満)の4大生活習慣病のリスクマーカーの更なる同定に成功した。さらに、独自研究として血中のmicroRNAに着目し、我々の前向きコホート研究の検体を用いることで心疾患と関連するmicroRNAの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を迎えた現在の我が国において、循環器疾患を含む生活習慣病に対する予防法の確立は、医学・医療における重要な課題である。本研究で同定されたリスクマーカーと従来の古典的リスクマーカーを統合したリスク診断アルゴリズムによって、従来よりも高精度なリスク予測が可能になる。最終的には、このアルゴリズムが生活習慣病の発症予防(個別化予防)に貢献し、健康寿命の延長に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In today's aging society, the establishment of preventive methods against lifestyle-related diseases, including cardiovascular diseases, is an important issue in medicine and medical care in Japan. In this study, using the cross-sectional research platform we have accumulated in the past, we participated in domestic and international consortiums to conduct genome-wide association analysis and succeeded in further identification of risk markers for four major lifestyle-related diseases: type 2 diabetes, hypertension, dyslipidemia, and obesity. Furthermore, as an independent study, we focused on microRNAs in blood and succeeded in identifying microRNAs associated with coronary artery disease by using samples from our prospective cohort study.

研究分野：循環器内科学

キーワード：生活習慣病 GWAS 心疾患 miRNA ゲノム疫学 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患や2型糖尿病、脂質異常症、高血圧症、肥満などの生活習慣病は、遺伝因子と環境因子の相互作用によって発症する多因子疾患である。従来の家族研究や一卵性双生児研究から、ほとんどの生活習慣病は、平均するとリスクの約20-30%は遺伝因子によると認識され、主として遺伝子配列の違いが分かれば、パーソナルゲノム医療、個別化医療が可能になると理解されてきた。しかし、現在までに報告されたリスク遺伝子解析から説明できる遺伝因子は、各々の生活習慣病の未だ10%未満であろうと考えられている。近年、遺伝子は、環境曝露による後天的ゲノム修飾を受けてその発現や働きが決定されること(エピジェネティクス)が明らかになってきた。即ち、これまで遺伝素因によるところが大きいと考えられてきた「生活習慣病になりやすい」体質の獲得に、栄養環境による代謝関連遺伝子等のエピジェネティクス制御が影響を与えていることが明らかになりつつある。ゲノムの後天的修飾を含めた極めて複雑な統合的解析が生活習慣病のリスク予知に求められる時代となってきた。生活習慣病のリスクファクターとしてゲノムワイド関連研究(GWAS)から求められる遺伝子リスクファクターの寄与度は比較的小さく、新規感受性遺伝子の同定のためには50,000人~100,000人以上の大規模集団を対象とすることが必要であり、単独の研究グループではなく、国内・国際コンソーシアムとして挑む課題になっている。

一方、後天的ゲノム修飾が、これらの生活習慣病関連遺伝子の発現に如何なる影響を及ぼすか?(エピジェネティクス)についての検討は緒についたばかりである。1990年代に異常DNAメチル化による癌抑制遺伝子の不活化機序が解明され、エピゲノム変化が癌化の原因として関与することは疑いのないものになった。その後、癌以外の生活習慣病でもエピゲノム異常の存在が示され、原因となっている異常の同定に向け猛烈な研究が展開されている。現在、生活習慣病の感受性遺伝子探索研究の主流はGWASであり、次世代シーケンサーを用いた疾患感受性遺伝子の探索研究も始まったところである。

2. 研究の目的

本研究では、我々が保有する検体を用いて、GWASおよびエピゲノムワイド関連研究(EWAS)により冠動脈疾患、2型糖尿病、高血圧症、肥満の4大生活習慣病のリスクマーカーを同定し、従来の古典的リスクマーカーを統合したリスク診断アルゴリズムを確立する。さらに、エピジェネティクスの担い手の一つであり non-coding RNA の一つである microRNA に着目し、循環器疾患の発症と関連する候補血清 microRNA を同定することを目的とする

3. 研究の方法

本研究は北名古屋ゲノム疫学研究(KING Study)の検体・データを基盤に実施した。KING Studyは、ベースライン調査の段階からゲノム疫学研究を目指した前向きコホート研究である。また、KING Studyにおいては、大規模な検体を有するばかりでなく、臨床情報、新しいバイオマーカーを含む検査情報も揃い、血清も保有しており、GWASによって得られるリスク遺伝子多型と生活習慣、DNAメチル化情報を有している。

本研究では以下の3種類のアプローチを実施した。国内・国際コンソーシアムに参画して生活習慣病のGWASを実施し、新たな疾患関連遺伝子座の同定及び、リスク予測モデルの開発に寄与する。我々が保有する又は現時点までに公開されているDNAメチル化データを活用し、生活習慣病に関わるDNAメチル化の探索を行う。我々が保有するKING studyの追跡データから、冠動脈疾患を新規に発症した人を特定し、冠動脈疾患の発症に寄与するmicroRNAを探索する。、については以降で、より具体的なアプローチについて説明する。

まず、について、我々はこれまでにKING Study参加者の内、368例のDNAメチル化アレイデータを取得してきた。このデータを基に、生活習慣病の各種形質とDNAメチル化の関連解析を実施した。解析には一般線形モデルを用い、調整因子として年齢、性別、喫煙歴を加えて評価した。

について、KING studyの追跡データから、冠動脈疾患を新規に発症した人20例を特定し、さらに性年齢・検体採取時期でマッチングした非罹患者20例をピックアップした。合計40例の血清検体について、Agilent製microRNAアレイ(Agilent SurePrint G3 Human miRNAマイクロアレイ 8x60K Rel.21.0)を使用して網羅的にmicroRNA濃度を測定した。測定後、罹患者6例、非罹患者6例は検体採取時期が異なり他の検体と比べて異なるプロファイルを示したため、解析から除外した。最終的に同時期に採取された罹患者14例、非罹患者14例のみを統計解析の対象とした。この28例のデータを用いてCAD罹患の有無の2群比較を実施した。2群比較の解析にはlimmaを用いた。調整因子には、年齢、性別を使用した。有意水準は探索的研究であることから多重補正を実施せず5%とした。有意水準に到達したmicroRNAに対して関連するパスウェイを同定するため、Eichrを使用して標的遺伝子をデータベースから予測し、さらに遺伝子セット

解析を実施した。遺伝子セットの定義は、Biocarta、KEGG, Panther の3種類のデータベースを用いた。

4. 研究成果

について、我々は、糖尿病、脂質、体格指標の国際コンソーシアムに参画し多数の生活習慣病関連遺伝子座の同定に成功した(参考: 5. 主な発表論文等)。また、尿酸の国内コンソーシアムにも参画し、X染色体上にある新たな尿酸関連遺伝子座の同定にも成功した。各プロジェクトにおいて、GWAS 要約統計量からポリジェニックリスクスコアの開発にも成功してきた。

DNA メチル化を対象とした解析では、我々のデータのみでゲノムワイド有意水準に到達したものは確認できなかったが、既報の EWAS で報告されている DNA メチル化の再現性確認に成功した。例えば、脂質と関わりが知られている *ABCG1* の DNA メチル化サイトと HDL や中性脂肪濃度と名義上有意($P < 0.05$)な関連を確認した。

microRNA の解析について、解析対象者 28 例の平均年齢は、それぞれ 66.2 歳および 66.2 歳であった。男性の割合は、それぞれ 71.4% および 71.4% であり、年齢と性別のマッチングが適切に実施できていることを示している。続いて、冠動脈疾患の罹患の有無で 2 群比較を行った結果、P 値の低い上位 10 microRNA は以下の表 2 の通りになった。このうち、 $P < 0.05$ を示した miRNA は miRNA_A をはじめ 6 種類確認された。

表 2 P 値の低い上位 10 microRNA

miRNA	t 値	P 値
miRNA_A	-3.6	0.001
miRNA_B	-2.6	0.013
miRNA_C	2.4	0.025
miRNA_D	2.3	0.030
miRNA_E	2.3	0.031
miRNA_F	2.2	0.038
miRNA_G	-2.0	0.052
miRNA_H	2.0	0.059
miRNA_I	-1.9	0.061
miRNA_J	-1.8	0.076

t 値が正の場合、罹患者で高値、t 値が負の場合非罹患者で高値であることを示す。
太字: $P < 0.05$ の microRNA

続いて、 $P < 0.05$ を示した microRNA について遺伝子セット解析を実施した。その結果を図 1 ~ 図 3 に示す。それぞれ異なる遺伝子セットデータベースでの結果である。図 1 は BioCarta データベースによるパスウェイ解析の結果で、Erk and PI-3 kinase、Rho cell motility signaling、integrin signaling、toll-like receptor pathway、signal transduction through IL1R との関連が示され、図 2 の KEGG データベースによるパスウェイ解析では、PI3K-Akt signaling、MAPK signaling、RAS signaling、AMPK signaling との関連が示された。最後に図 3 から、Panther データベースでは、integrin signaling、Ras pathway、EGF receptor signaling、FGF signaling、angiogenesis、toll receptor signaling、cytoskeletal regulation by Rho GTPase、p38 MAPK pathway、T cell activation、glycolysis との関与が示唆された。

このように本研究では、冠動脈疾患関連 microRNA の探索を行い、6 種類の microRNA の同定に成功した。近年、冠動脈疾患における microRNA のバイオマーカーとしての評価をしたシステマティックレビューが報告された(Kaur et al. *Cardiovasc Res.* 116:1113-1124 (2020))。このレビューでは心疾患との関わりが報告されている microRNA が一覧化されていたが、我々が同定した 6 種類の microRNA はそのいずれとも一致してなかった。一方、6 つの microRNA のうち、最も有意に発現変動が認められた miRNA_A は、実験研究としてヒヒに高脂肪食を与えた後の血清および

動脈硬化薬で変化した microRNA(Karere Sci Rep 13:3467 (2023))と同じであった。このことから、我々が同定した 6 種類の microRNA は新規に同定されたものであり、これらは心血管疾患を予測するバイオマーカーとなる可能性を示唆している。

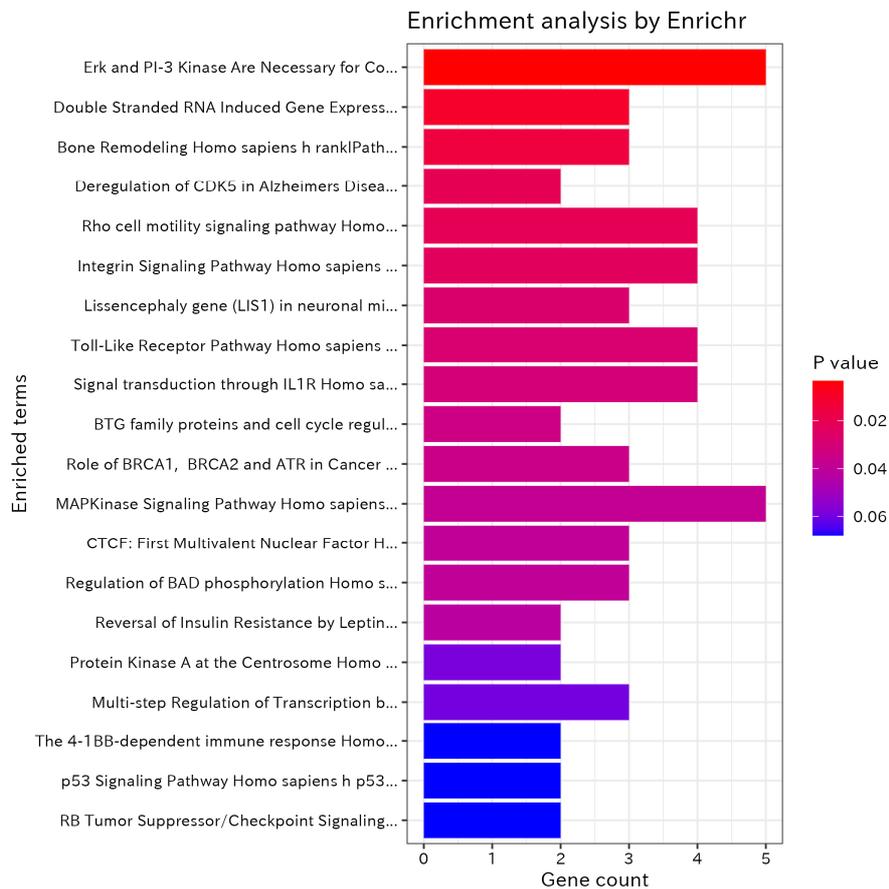


図 1. Biocarta データベースの遺伝子セット解析結果

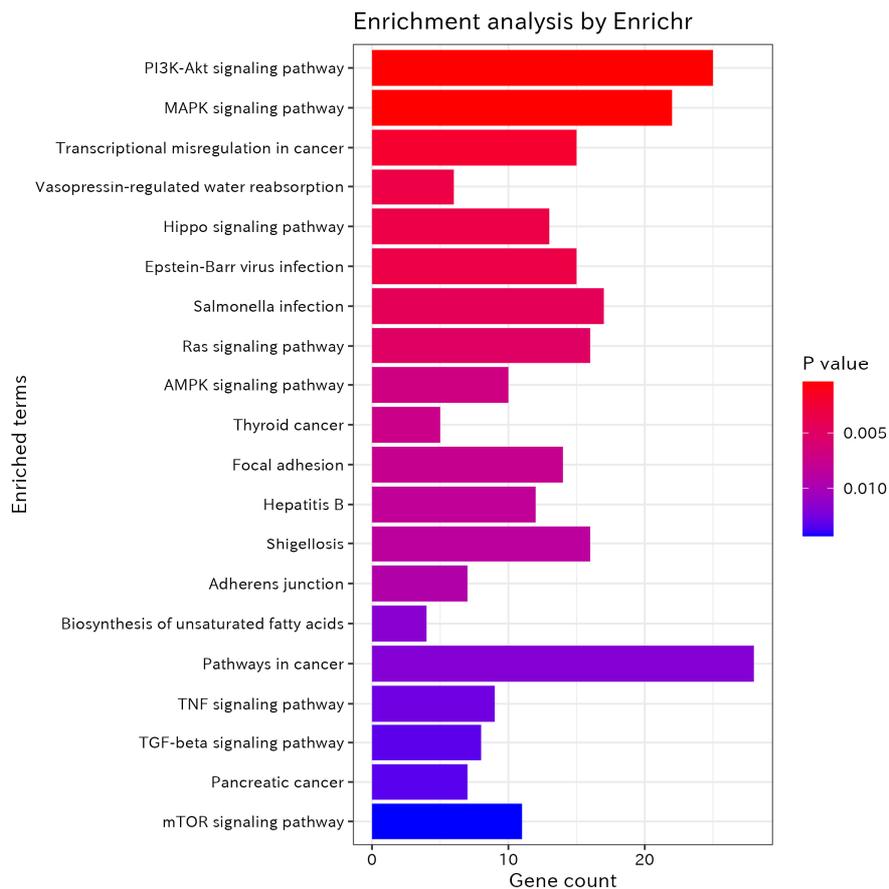


図 2. KEGG データベースによる遺伝子セット解析結果

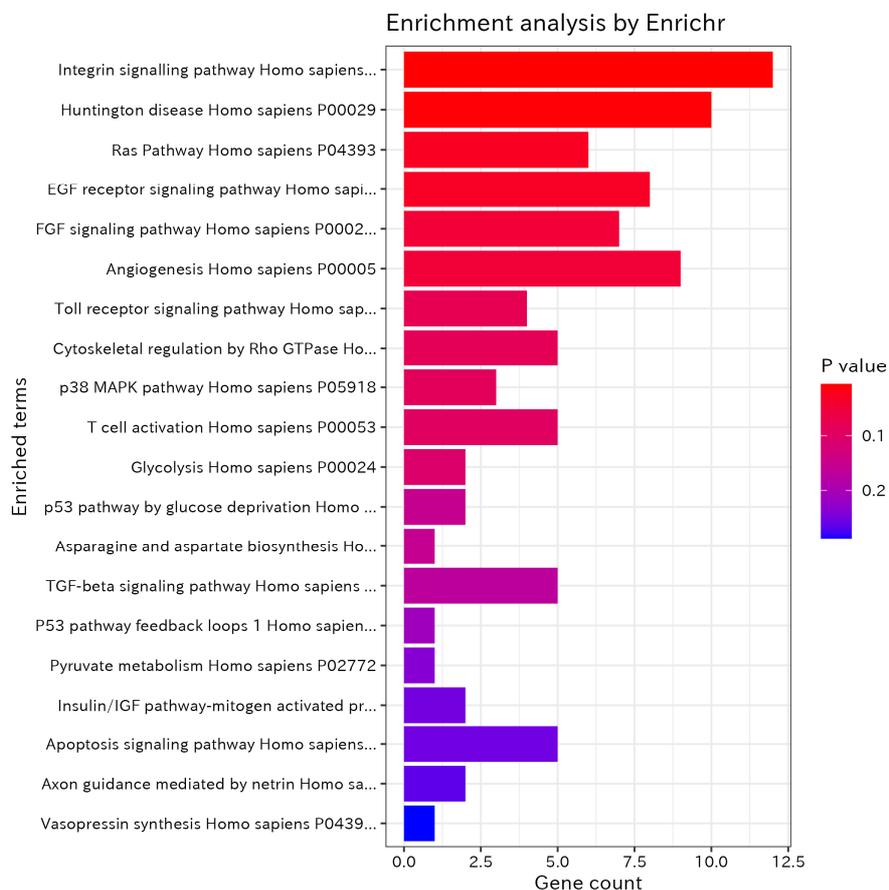


図 3. Panther データベースによる遺伝子セット解析結果

本研究活動を通して、生活習慣病発症に関わる一塩基多型(SNP)情報、DNA メチル化情報、microRNA の同定に成功した。SNP 情報については同定された SNP を統合したポリジェニック リスクスコアの開発にも成功した。本研究で新たに同定されたリスクマーカーを従来の古典的 リスクマーカーに統合したリスク診断アルゴリズムは、従来よりも高精度なリスク予測が可能 になり、今後の個別化医療に役立つことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 1.Suzuki K, Hatzikotoulas K, Southam L, Taylor H J, Yin X, ..., Yokota M et al	4. 巻 627
2. 論文標題 Genetic drivers of heterogeneity in type 2 diabetes pathophysiology	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 347 ~ 357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-024-07019-6	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 Yengo L, Vedantam S, Marouli E, Sidorenko J, Bartell E, ..., Yokota 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 無
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 Ramdas S, Judd J, Graham S E, Kanoni S, Wang Y, ..., Yokota 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 無
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 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, Japan Uric Acid Genomics Consortium	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, ..., Yokota 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

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masahiro Nakatochi, Sahoko Ichihara, Ken Yamamoto, Tatsuaki Matsubara, Mitsuhiro Yokota.
2. 発表標題 Identification of DNA methylation sites by a trans-ethnic epigenome-wide meta-analysis for circulating adiponectin levels
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第68回大会 & Human Genetics Asia 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

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 2. Masahiro Nakatochi, Sahoko Ichihara, Ken Yamamoto, Keizo Ohnaka, Tatsuaki Matsubara, Mitsuhiro Yokota
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

1. 発表者名 三瀬名丹, 中枋昌弘, 松原達昭, 横田充弘, 山本健, 市原佐保子
2. 発表標題 喫煙によりDNAメチル化が低下するゲノム領域のマウス相同領域におけるメチル化解析
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023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	中枋 昌弘 (Nakatochi Masahiro) (10559983)	名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授 (13901)	
研究分担者	市原 佐保子 (Ichihara Sahoko) (20378326)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	松原 達昭 (Matsubara Tatsuaki) (30209598)	愛知みずほ大学・人間科学部・教授 (33928)	
研究分担者	加藤 倫子 (Kato Tomoko) (30450886)	国際医療福祉大学・国際医療福祉大学成田病院・准教授 (32206)	
研究分担者	山本 健 (Yamamoto Ken) (60274528)	久留米大学・医学部・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
---------	---------