

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21177

研究課題名（和文）エピゲノムワイド関連解析による閉塞性睡眠時無呼吸のバイオマーカーの探索的研究

研究課題名（英文）Study of Biomarkers of Obstructive Sleep Apnea by Epigenome-Wide Association Studies

研究代表者

前田 圭介（Maeda, Keisuke）

藤田医科大学・医療科学部・助教

研究者番号：50906344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：OSA患者を対象に無呼吸低呼吸指数（AHI）低値群と高値群における全ゲノムDNAメチル化プロファイルの比較を実施した。その結果、AHI高値群において、MYT1L（cg09460712）やFOXP1（cg18804229）等のDNA高メチル化、RERE（cg16908156）やSEMA4C（cg13275176）等のDNA低メチル化が認められた。またMIR365A遺伝子、JRK遺伝子、CAT遺伝子領域において、両群のDNAメチル化率に差を認めた。OSA患者を対象にしたDNAメチル化関連解析の先行研究の報告はいくつかあるが、本研究にて認められたこれらのDNAメチル化サイトは新規のものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、OSA患者のいくつかの遺伝子においてDNAメチル化が変化していることが明らかとなった。今後、さらに詳細な解析が必要ではあるが、本研究にて認められたOSAに関連する特定のまたは複数のメチル化サイトの変化を捉えることでOSAの早期発見・発症予測バイオマーカーとなる可能性が期待される。さらに将来的には循環器疾患等の合併症予測バイオマーカーの開発や合併症発生のメカニズム解明に貢献できる礎となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：A comparison of whole genome DNA methylation profiles in low and high AHI groups was performed in patients with OSA. The results showed that in the high AHI group, high DNA methylation levels such as MYT1L (cg09460712) and FOXP1 (cg18804229) and low DNA methylation levels such as RERE (cg16908156) and SEMA4C (cg13275176) were observed. In the MIR365A gene, JRK gene, and CAT gene regions, the two groups showed differences in DNA methylation levels. Although several previous studies have reported DNA methylation-related analyses in OSA patients, these DNA methylation sites observed in this study are novel.

研究分野：医学

キーワード：閉塞性睡眠時無呼吸 DNAメチル化 バイオマーカー エピゲノムワイド関連解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

閉塞性睡眠時無呼吸 (OSA) は、睡眠中に上気道の狭窄または閉塞により、呼吸努力は認められるものの 10 秒以上の無呼吸または低呼吸が睡眠中にくり返し引き起こされるものである。そのうち、症状があり、無呼吸低呼吸指数 (AHI) が 5 以上または症状がなくとも AHI が 15 以上のものを閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (OSAS) といい、有病率は男性 9.0%、女性 2.8%と推定されている。しかし、OSA と診断されている者は一部にすぎず、多くの潜在患者の存在が問題視されている。さらに OSA は様々な循環器疾患の合併症を引き起こすことが明らかとなっている。先行研究では、心不全患者の 11~37%に OSA が合併し、心血管疾患や脳血管疾患への合併も報告されており、死に至る危険があることが OSA の最大の問題である。したがって OSA の早期治療介入のために、症状がなく未診断となっている多くの OSA を捉えることが可能なバイオマーカーの開発が課題の 1 つである。

近年、エピジェネティクス機構の一つである DNA メチル化が、疾病発生に重要な役割を果たすことが示唆されており、疾患発症を予測するバイオマーカーとして注目されている。しかし、OSA については関連する DNA メチル化サイトが明らかではなく、新規バイオマーカーとしての有用性を検証することが必須である。

2. 研究の目的

本研究は、OSA 患者の末梢血を用いてエピゲノムワイド関連解析 (EWAS) により、ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行い、OSA と DNA メチル化との関連を明らかにすることを目的とした。DNA メチル化は、遺伝素因のほか、生活習慣・環境要因などにより影響を受ける。低酸素環境や酸化ストレスが特定の遺伝子の DNA メチル化変化を誘発することが報告されており、OSA は夜間の無呼吸による低酸素血症及び虚血再灌流による酸化ストレス亢進を来すため、DNA メチル化パターンに影響を及ぼしている可能性が高い。この DNA メチル化パターンの変化を捉えることで、疾患の発症予測や早期診断のための新規バイオマーカーとして利用できる。しかし、これまでに OSA と DNA メチル化との関連を調査した研究は、動脈硬化症や血栓症に関連する内皮一酸化窒素合成酵素 (endothelial NOS) 遺伝子などの限られた遺伝子の DNA メチル化解析のみである。EWAS は、ヒトゲノム内の 45 万か所以上のメチル化サイトのメチル化状態のゲノムワイドな同時計測が可能であるが、OSA 患者を対象として EWAS を行った研究はこれまでにない。

本研究により、OSA 患者の DNA メチル化プロファイルが明らかとなり、OSA に関連する特定のまたは複数のメチル化サイトの変化を捉えることで OSA の早期発見・発症予測バイオマーカーとなることが期待される。さらに将来的には縦断的な調査を実施することにより、循環器疾患等の合併症予測バイオマーカーの開発や合併症発生のメカニズム解明に貢献できる礎となることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 対象者

対象者は、2022 年 1 月から 2022 年 12 月にかけて、藤田医科大学病院を受診し終夜睡眠ポリグラフ検査を実施し、過去に睡眠障害の診断を受けたことがない患者であり、各患者からは書面によるインフォームドコンセントを取得した。対象者のうち、CPAP などの OSA 治療歴のある患者は除外した。OSA は、藤田医科大学病院にて実施された終夜睡眠ポリグラフ検査の結果を元に日本睡眠学会専門医によって診断された。終夜睡眠ポリグラフ検査の結果は、日本睡眠学会認定検査技師によって解析された。解析の結果から睡眠構築指数、覚醒反応指数、呼吸障害関連指数、体位別睡眠障害関連指数、酸素飽和度関連指標等を算出した。その内、1 時間あたりの無呼吸と低呼吸を合わせた回数である無呼吸低呼吸指数 (AHI) < 15 の患者を AHI 低値群、AHI 15 の患者を AHI 高値群とし、対象者を 2 群に分けた。AHI 15 の患者は自覚症状がなくとも OSA と診断されること、また AHI 15 での CPAP 導入が OSAS 合併心不全患者の死亡・心不全による入院を減少させるという報告があるため、AHI 15 をカットオフ値として対象者を分けた。

(2) ゲノム網羅的 DNA メチル化解析

対象者から静脈血 (7mL) を採取し、遠心分離後、末梢血白血球を単離し、ゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA を用いて、Illumina Infinium Methylation EPIC 解析によるゲノム網羅的 DNA メチル化解析を実施した。解析を実施したサンプルは OSA 患者及び非 OSA 患者を含む計 23 サンプルとした。サンプルはゲノム DNA のバイサルファイト処理を行った後、iScan System を用いて Infinium Methylation EPIC-8 BeadChip のセッティングでデータ取得を行った。その後以下の通りインフォーマティクス解析を実施した。まず、プローブのインポートを行った後、解析に適さないプローブのフィルタリングを実施した。プローブのフィルタリングは、a) 検出 p 値によるフィルタリング (detection p-value)、b) ビーズ数によるフィルタリング (beadcount)、c) 標的配列によるフィルタリング (NoCG)、d) SNP 関連プロ

ープのフィルタリング (SNPs)、e) 一意でないプローブのフィルタリング (MultiHit)、f) XY 染色体上にあるプローブフィルタリング (XY) の 6 つのカテゴリーで行い、最終的に 739,653 のプローブ数にて解析を行った。フィルタリング後、BMIQ 正規化、バッチ効果除去を行った後の値に対して Differentially methylated probes (DMP) の検出及び Differentially methylated regions (DMR) の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 対象者の特性

AHI 低値群と高値群の対象者特性を示す (Table 1)。性、BMI、HbA1c、総コレステロール、中性脂肪等において両群に有意な差を認めなかった。

Table 1. Basic characteristics of the study subjects.

	AHI <15 (n = 7)	AHI ≤15 (n = 16)	p
Age (years) ^a	45.0 ± 11.5	56.6 ± 7.9	0.010 ^c
Men (n, %)	6 (85.7)	9 (56.3)	0.172 ^d
BMI (kg/m ²) ^a	23.5 ± 3.4	26.9 ± 5.2	0.123 ^c
AHI (events/hour) ^a	7.1 ± 4.9	51.3 ± 30.4	0.001 ^c
Apnea Index (events/hour) ^a	2.6 ± 3.0	26.3 ± 28.2	0.040 ^c
Obstructive apnea (events/hour) ^a	1.9 ± 2.8	19.5 ± 27.5	0.111 ^c
Central apnea (events/hour) ^a	0.0 ± 0.0	0.4 ± 1.2	0.384 ^c
Mixed apnea (events/hour) ^a	0.7 ± 0.7	6.4 ± 9.7	0.141 ^c
Hypopnea Index (events/hour) ^a	4.5 ± 3.1	25.0 ± 15.8	0.002 ^c
Lowest SpO ₂ (%) ^a	88.9 ± 4.6	79.9 ± 8.5	0.017 ^c
Arousal Index (events/hour) ^a	17.3 ± 9.8	49.3 ± 26.9	0.006 ^c
HbA1c (%) ^a	5.8 ± 0.3	5.9 ± 0.5	0.717 ^c
Total cholesterol (mg/dL) ^a	209.7 ± 37.3	183.2 ± 55.3	0.300 ^c
Triglyceride (mg/dL) ^b	80.5 (75.8-118.8)	148 (114.3-171.0)	0.278 ^c

(2) AHI 低値群と高値群における白血球中のゲノム DNA メチル化プロファイルの比較

両群において、DNA メチル化率が有意に異なる DMP は 190,644 部位を同定した。AHI 高値群において DNA 高メチル化を認めた DMP は 84,526 部位に対し、DNA 低メチル化を認めた DMP は 106,118 部位であった。DNA 高メチル化を認めた DMP のうち、特に有意な関連を示したのは、*MYT1L* (cg09460712)、*FOXP1* (cg18804229)、*PCDHA6* (cg21887309)、*ATP13A3* (cg15945782)、*SPPL3* (cg04069757) であった。一方で、DNA 低メチル化を認めた DMP のうち、特に有意な関連を示したのは、*RERE* (cg16908156)、*SEMA4C* (cg13275176)、*GRN* (cg24212517)、*CCM2* (cg10626261)、*PTPRN2* (cg21280014) であった (Table 2)。

Table 2. Most associated differentially methylated positions (DMPs).

	ColumnID	Gene Symbol	Chromosome
Hypermethylated	cg09460712	<i>MYT1L</i>	2
	cg18804229	<i>FOXP1</i>	3
	cg21887309	<i>PCDHA6</i>	5
	cg15945782	<i>ATP13A3</i>	3
	cg04069757	<i>SPPL3</i>	12
Hypomethylated	cg16908156	<i>RERE</i>	1
	cg13275176	<i>SEMA4C</i>	2
	cg24212517	<i>GRN</i>	17
	cg10626261	<i>CCM2</i>	7
	cg21280014	<i>PTPRN2</i>	7

また、両群において、DNA メチル化率が有意に異なる DMR は 405 領域を同定した。AHI 高値群において DNA 高メチル化を認めた DMR は 288 領域に対し、DNA 低メチル化を認めた DMR は 117 領域であった。DNA 高メチル化を認めた DMR のうち、特に有意な関連を示したのは、*MIR365A* 遺伝子領域、*LOC441666* 遺伝子領域、*ZNF214* 遺伝子領域、*EYA4* 遺伝子領域であった。一方で、DNA 低メチル化を認めた DMR のうち、特に有意な関連を示したのは、*JRK* 遺伝子領域、*CAT* 遺伝子領域、*TMEM232* 遺伝子領域、*RHOJ* 遺伝子領域であった (Table 3)。

Table 3. Most associated differentially methylated regions (DMRs).

	Start of DMR (bp)	End of DMR (bp)	Gene Symbol	Chromosome
Hypermethylated	14402939	14403425	<i>MIR365A</i>	16
	24536077	24537469	NA	3
	42862876	42863594	<i>LOC441666</i>	10
	7041080	7042021	<i>ZNF214</i>	11
	133562087	133562776	<i>EYA4</i>	6
Hypomethylated	143751447	143751796	<i>JRK</i>	8
	34460107	34461028	<i>CAT</i>	11
	73712491	73712967	NA	14
	110062343	110062837	<i>TMEM232</i>	5
	63671126	63671737	<i>RHOJ</i>	14

(3) 考察と今後の検討

本研究では、OSA 患者を対象に AHI 低値群と高値群における末梢血白血球中の全ゲノム DNA メチル化プロファイルの比較を実施した。その結果、AHI 高値群の OSA 患者において、*MYT1L* (cg09460712) や *FOXP1* (cg18804229) 等の DNA 高メチル化、*RERE* (cg16908156) や *SEMA4C* (cg13275176) 等の DNA 低メチル化を示すことが明らかになった。また、AHI 高値群の OSA 患者において、*MIR365A* 遺伝子領域等の DNA 高メチル化、*JRK* 遺伝子領域や *CAT* 遺伝子領域等の DNA 低メチル化を示すことが明らかになった。OSA 患者を対象にした DNA メチル化関連解析の先行研究の報告はいくつかあるが、本研究において認められた OSA に関連する DNA メチル化サイトとしては新規のものであった。

本研究により関連の認められた DNA メチル化サイトのうち、*CAT* 遺伝子は第 11 番染色体 (11p13) に存在し、この遺伝子の DNA 低メチル化はカタラーゼの発現が増加することが報告されている。カタラーゼは、抗酸化酵素の一つであり、過酸化水素を水と酸素に分解する反応を触媒する。生体内では、活性酸素種 (ROS) を水と酸素に分解することにより、酸化ストレスから生体を守るのに重要な役割を担っている。睡眠時の無呼吸による周期的低酸素血症は、過剰な ROS の産生を引き起こし、生体内の酸化ストレスを増大させることが明らかとなっている。したがって、AHI 高値群においては、*CAT* 遺伝子の DNA 低メチル化によりカタラーゼ発現を増加させ、抗酸化能を上昇させている可能性が考えられた。この *CAT* 遺伝子の DNA 低メチル化を中心にいくつかの遺伝子の DNA メチル化をバイオマーカーとすることで OSA の早期発見が可能となるかもしれない。また酸化ストレス亢進による心不全などの合併症の発症予測マーカーとして機能するかもしれない。

今後は、Gene Ontology 解析及び Pathway 解析を実施し、本研究にて同定した DNA メチル化サイトの生物学的・医学的意味付けを確認し、形質との関連を検討する予定である。加えて、独立したサンプルにてパイロシーケンス法を用いて同定した DNA メチル化サイトの再現性の確認を実施する予定である。これらの遂行により、DNA メチル化測定を基盤とした末梢血検体を用いた OSA の早期発見・発症予測バイオマーカーとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Maeda Keisuke, Yamada Hiroya, Munetsuna Eiji, Fujii Ryosuke, Yamazaki Mirai, Ando Yoshitaka, Mizuno Genki, Ishikawa Hiroaki, Ohashi Koji, Tsuboi Yoshiki, Hattori Yuji, Ishihara Yuya, Hashimoto Shuji, Hamajima Nobuyuki, Suzuki Koji	4. 巻 48
2. 論文標題 Association of drinking behaviors with <i>TXNIP</i> DNA methylation levels in leukocytes among the general Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Drug and Alcohol Abuse	6. 最初と最後の頁 302 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00952990.2022.2037137	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 -

1. 著者名 Yamazaki Mirai, Yamada Hiroya, Munetsuna Eiji, Maeda Keisuke, Ando Yoshitaka, Mizuno Genki, Fujii Ryosuke, Tsuboi Yoshiki, Ohashi Koji, Ishikawa Hiroaki, Hashimoto Shuji, Hamajima Nobuyuki, Suzuki Koji	4. 巻 69
2. 論文標題 DNA methylation level of the gene encoding thioredoxin-interacting protein in peripheral blood cells is associated with metabolic syndrome in the Japanese general population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 319 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ21-0339	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前田 圭介, 山田 宏哉, 宗網 栄二, 藤井 亮輔, 坪井 良樹, 石原 裕也, 山崎 未来, 安藤 嘉崇, 水野 元貴, 石川 浩章, 大橋 鉦二, 刑部 恵介, 杉本 恵子, 市野 直浩, 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白血球中TXNIP遺伝子のDNAメチル化率と頸部動脈硬化指標との関連
3. 学会等名 第32回日本疫学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keisuke Maeda, Hiroya Yamada, Eiji Munetsuna, Ryosuke Fujii, Mirai Yamazaki, Yoshitaka Ando, Genki Mizuno, Hiroaki Ishikawa, Koji Ohashi, Yoshiki Tsuboi, Shuji Hashimoto, Nobuyuki Hamajima, Koji Suzuki
2. 発表標題 Association of drinking habits with TXNIP DNA methylation levels in leukocytes among general Japanese population.
3. 学会等名 The 22nd World Congress of Epidemiology 2021 (国際学会)
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
---------	---------