

令和 5 年 6 月 15 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：21K21205

研究課題名（和文）DNAメチル化ダイナミクスと生活習慣病との関連解明のための分子疫学研究

研究課題名（英文）Molecular epidemiological study to elucidate the association between dynamics of DNA methylation and lifestyle-related diseases

研究代表者

坪井 良樹 (Tsuboi, Yoshiki)

藤田医科大学・医療科学部・助手

研究者番号：60908466

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）：住民健診受診者を対象にして白血球DNAを抽出し、ヒトゲノム全体のDNAメチル化指標である5-メチルシトシン（5mC）とDNA脱メチル化の中間産物である5-ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）の割合を測定し、生活習慣病との関連について解析を実施した。その結果、5hmC高値群において心疾患および脳血管疾患の既往歴者が有意に多く、日本人集団においてDNA脱メチル化が循環器疾患と関連することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAメチル化及びDNA脱メチル化は、遺伝子配列に依存しない遺伝子発現の制御機構であり、様々な生活習慣病の発症と進展に関与していることが明らかとなっている。従来、DNAメチル化レベルと生活習慣病に焦点を当てた疫学研究が主体であり、DNA脱メチル化に焦点を当てた疫学研究は限定的である。DNAメチル化およびDNA脱メチル化の双方と生活習慣病との関連についてエビデンスを構築することは、発症メカニズム解明およびバイオマーカー確立に寄与することができると考えている。

研究成果の概要（英文）：The ratio of 5-methylcytosine (5mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) were measured for residents undergoing medical examinations. We examined whether 5mC and 5hmC in leukocytes were associated with lifestyle-related diseases. As a result, participant with a history of cardiovascular diseases had a high 5hmC levels in leukocytes. Therefore, we suggested that DNA demethylation could be associated with cardiovascular diseases in Japanese population.

研究分野：疫学

キーワード：分子疫学 エピジェネティクス DNAメチル化 5メチルシトシン 5ヒドロキシメチルシトシン

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人口動態統計(2019年)によると、本邦における死因のうち、悪性新生物、心疾患、脳血管疾患の三大生活習慣病が50%を占めており、生活習慣病発症・重症化予防対策は取り組むべき重要な課題である。新たな予防対策の開発に向けて、更なる生活習慣病発症の分子メカニズム解明が期待されている。

DNAメチル化及びDNA脱メチル化は、遺伝子発現を制御する分子機構である。DNAメチル化酵素により、遺伝子配列上のシトシン(C)にメチル基が付与されると遺伝子発現がOFFになり、DNA脱メチル化酵素により、メチル基が外れることで遺伝子発現がONになる。DNAメチル化の変動傾向は、細胞や動物実験において生体機能に重要な役割を担っていることが示されている。

2. 研究の目的

従来、DNAメチル化レベルと生活習慣病に焦点を当てた疫学研究が主体であり、DNA脱メチル化に焦点を当てた疫学研究は限定的である。DNAメチル化の変動傾向が生体機能に重要であることが示されていることから、DNAメチル化およびDNA脱メチル化の双方と生活習慣病との関連についてのエビデンス構築が求められている。そこで本研究では、住民健診受診者を対象にDNAメチル化およびDNA脱メチル化と生活習慣病との関連を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 対象者

2022年の北海道二世郡八雲町住民健診受診者のうち、DNAメチル化指標である5-メチル化シトシン(5mC)およびDNA脱メチル化の中間産物である5-ヒドロキシシトシン(5hmC)の割合を測定した249名(男性100名、女性149名)を解析対象とした。

2) DNAメチル化およびDNA脱メチル化測定

末梢血からのゲノムDNAはシリカメンブレン付きスピナラムを利用して抽出と精製を行った。5mCおよび5hmCはELISA法にて測定した(MethylFlash Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit, MethylFlash Global DNA Hydroxymethylation ELISA Easy Kit, Epigentek, USA)。5mCおよび5hmCは、全てDNA量で補正し、ヒトDNAに含まれるシトシン量(約21%)に対する割合を算出した。5mCおよび5hmCは中央値より低い集団を低値群、高い集団を高値群と定義した。

3) 既往歴

生活習慣病の既往歴は、アンケート調査を用いて心疾患、脳血管疾患、がんを調査した。また、心疾患および脳血管疾患は循環器疾患として解析に使用した。

4) 統計解析

5mCおよび5hmCの低値群に対する高値群の各生活習慣病のオッズ比をロジスティック回帰分析にて解析した。調整項目は、性、年齢、喫煙習慣、飲酒習慣、Body mass index(BMI)を加えた。解析ソフトは、R software ver4.2.2を使用した。

4. 研究成果

研究対象者のうち、心疾患の既往歴者は11名(4.4%)、脳血管疾患は6名(2.4%)、がんは28名(11.2%)であった。5mCと5hmCは有意な正相関を示した($r=0.422$, $p<0.001$)。表1に対象者の特性を示す。5mCに関しては、性別、年齢、喫煙習慣、飲酒習慣、BMIとの関連は認められなかった。一方、5hmCは低値群と比較して高値群で男性の割合が多く認められた(低値群42(33.6%)、高値群58(46.8%))。年齢、喫煙習慣、飲酒習慣、BMIにおいては、5mCと同様に有意な関連を認めなかった。

表2に5mCおよび5hmCの低値群に対する高値群の各生活習慣病の割合およびオッズ比を示す。心疾患の既往歴者は5hmC高値群において有意に多いことが分かった(低値群1名(0.8%)、高値群10名(8.1%)、Fisher's exact test $p=0.005$)。また、ロジスティック回帰分析でも同様に高値群で有意に高いオッズ比を示した。一方、5mCでは有意な関連を認めなかった。脳血管疾患の既往歴者は、5mC、5hmCともに高値群に多かった(低値群0名(0%)、高値群6名(4.8%)、Fisher's exact test $p=0.014$)。がん既往歴者に関しては、5mCおよび5hmCともに有意な関連を示さなかった。

表1 対象者の特性

	5mC			5hmC			
	低値群	高値群	p値	低値群	高値群	p値	
人数	125	124		125	124		
男性 ^a	52 (41.6%)	48 (38.7%)	0.641 ^c	42 (33.6%)	58 (46.8%)	0.034 ^c	
年齢 ^b	65.1 ± 11.2	63.7 ± 11.6	0.319 ^d	64.1 ± 11.5	64.7 ± 11.3	0.672 ^d	
喫煙習慣 ^a	なし	60 (48.0%)	59 (47.6%)	0.998 ^c	62 (49.6%)	57 (46.0%)	0.614 ^c
	やめた	40 (32.0%)	40 (32.3%)		41 (32.8%)	39 (31.5%)	
	あり	25 (20.0%)	25 (20.0%)		22 (17.6%)	28 (22.6%)	
飲酒習慣 ^a	なし	59 (47.2%)	69 (55.6%)	0.337 ^c	67 (53.6%)	61 (49.2%)	0.519 ^c
	やめた	4 (3.2%)	5 (4.0%)		3 (2.4%)	6 (4.8%)	
	あり	62 (49.6%)	50 (40.3%)		55 (44.0%)	57 (46.0%)	
Body mass index ^b	24.1 ± 3.8	24.0 ± 4.8	0.820 ^d	23.9 ± 3.9	24.2 ± 4.8	0.510 ^d	

a: 人数 (%)
 b: 平均 ± 標準偏差
 c: 2検定
 d: Studentのt検定

表2 5mCおよび5hmCと各生活習慣病との関連

	心疾患		脳血管疾患		がん		
	n (%)	オッズ比 ^a (95%信頼区間)	n (%)	オッズ比 ^a (95%信頼区間)	n (%)	オッズ比 ^a (95%信頼区間)	
5mC	低値群	6(4.8%)	ref	0(0.0%)	-	12(10.6%)	ref
	高値群	5(4.0%)	0.56 (0.13-2.16)	6(4.8%)	-	16(13.6%)	1.67 (0.70-4.16)
5hmC	低値群	1(0.8%)	ref	0(0.0%)	-	14(12.1%)	ref
	高値群	10(8.1%)	9.88 (1.71-188.1)	6(4.8%)	-	14(12.2%)	1.00 (0.42-2.37)

a: 性別、年齢、喫煙習慣、飲酒習慣、BMIを調整

表3に循環器疾患既往歴者の割合およびオッズ比を示す。循環器疾患既往歴者は、5hmCの低値群に対して高値群で有意に多いことが分かった(低値群1名(0.8%)、高値群16名(13.0%)、Fisher's exact test p<0.001)。また、ロジスティック回帰分析でも同様に高値群で有意に高いオッズ比を示した。5mCに関しては有意な関連を認めなかった。

以上の結果から、日本人集団において循環器疾患既往歴者では5hmCが高値を示すことが明らかとなった。本研究結果は、DNA脱メチル化が循環器疾患の病態に關与する可能性を示唆している。本研究対象の住民健診は毎年実施されており、5hmCの縦断的調査および生活習慣病の死亡リスクとの関連の調査が可能である。引き続き分析および解析を進める予定である。

表3 5mCおよび5hmCと循環器疾患との関連

	循環器疾患		
	n (%)	オッズ比 ^a (95%信頼区間)	
5mC	低値群	6(4.8%)	ref
	高値群	11(8.9%)	1.84 (0.61-6.02)
5hmC	低値群	1(0.8%)	ref
	高値群	16(13.0%)	19.09 (3.56-356.8)

a: 性別、年齢、喫煙習慣、飲酒習慣、BMIを調整

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------