様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２５年　３月３１日現在

機関番号：16301
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2010～2012
課題番号：22590985
研究課題名（和文）　ＤＮＡメチル化修飾を統合したレジスチン遺伝子発現制御因子の網羅的解析

研究課題名（英文）Regulation of human resistin gene expression integrating the DNA methylation

研究代表者
大沼 裕（Onuma Hiroshi）
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00294794

研究成果の概要（和文）：レジスチン遺伝子発現の調節機構を明らかにする目的で、レジスチン遺伝子発現を制御する遺伝的因子および環境因子のマーカーとなる DNA メチル化を解析した。Single nucleotide polymorphsm (SNP)-420 はレジスチン遺伝子調節領域に存在し、血中レジスチンを強く規定する。レジスチン遺伝子転写調節領域の SNP-420 周囲近傍に存在する 5 か所の CpG をメチル化解析した。これらが、レジスチン遺伝子発現に関連する有用なマーカーとなり得､量的形質解析に使用可能であることが明らかになった。さらに、5 か所のうち、解析に最も有用と考えられる１か所の DNA メチル化部位を決定し､血中レジスチンとメチル化率について 500 サンプルの解析を終了した。2000 サンプルを目指して、現在、当該シトシンのメチル化率を解析中である。

研究成果の概要（英文）：To determine the involvement of DNA methylation in the regulation of the resistin gene expression, we analyzed the DNA methylation of the resistin gene in the general Japanese population.　Serum resistin is strongly regulated by genotypes of single nucleotide polymorphysm (SNP)-420 in the promoter region of the resistin gene.　We selected 5 CpG loci for the methylation analyses around SNP-420 in the promoter region of the resistin gene.　We found that these CpG loci could be available for the analyses of the association between serum resistin and the DNA methylation.　Of five loci, we found the most useful CpG locus and used it for further analysis.　We have analyzed the DNA methylation in about 500 subjects in the general Japanese population.　Methylation analysis is now goin on with a goal of 2000 samples.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学
キーワード：レジスチン、DNA メチル化、ＳＮＰ、遺伝子発現

１．研究開始当初の背景

インスリン抵抗性や 2 型糖尿病と関連するレジスチンの血中濃度は、レジスチン遺伝子の転写調節領域にある一塩基多型 SNP-420 に強く規定される。遺伝子の発現調節は、転写調節領域のシスエレメントや、そこに結合する転写因子群に加え、DNA メチル化やヒストン修飾なども関与することが明らかになっている。

２．研究の目的

レジスチン遺伝子発現を制御する遺伝的因子および環境因子のマーカーとなる DNA メチル化を体系的に解析し、統合的なレジスチン遺伝子発現の調節機構を明らかにする。

３．研究の方法

一般住民より既に収集した genomic DNA を用いて、レジスチン遺伝子の転写調節領域の約１ｋｂの領域のメチル化候補シトシンのメチル化をパイロシーケンス法により解析した。白血球より抽出した genomic DNA をバイサルファイト処理後、目的部位を PCR で増幅後、至適なプライマーを設定し、パイロシーケンスサーにより、メチル化部位およびメチル化率を同定、定量した。この結果と、既に測定した血中レジスチン濃度（**Diabetes Care** 30: 1501, 2007）の結果を用いて、量的形質解析を行い、血中レジスチン濃度と DNA メチル化の関連を解析する。さらに、同定済みの主要 SNP の結果を加えて、関連解析を行った。

４．研究成果

レジスチン遺伝子転写調節領域の SNP-420周囲近傍に存在する5か所のCpG をメチル化解析候補として選択し、シトシンメチル化率をパイロシーケンス法により評価した。パイロシーケンス法は、我々が新規に導入したシーケンス法でるため、5か所のシトシンメチル化測定について基礎検討を行なった。メチル化解析の定量性について検討し、それぞれ至適プライマーを設定した。糖尿病患者５０名の解析を行った結果、解析した５か所のシトシンメチル化率は、約２０%から８０％と、それぞれのシトシン間で差が認められた（図１）。周囲のSNPの遺伝子型を考慮した場合に、それぞれのCpGのメチル化率に差があることが明らかにな

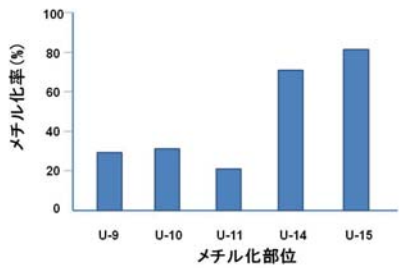
った。この5か所のDNAメチル化が、レジスチン遺伝子発現に関連するマーカーとなり得、量的形質解析に使用可能であると考えられた。

この5か所のDNAメチル化部位をさらに絞り込み、解析に最も有用と考えられる、DNAメチル化部位１か所を決定した。培養細胞系を用いた検討で、決定したメチル化部位の妥当性を確認した。

一方、糖尿病患者において、入院による血糖コントロール前後の、単球における当該メチル化部位のメチル化率変化を検討した。約２週間の入院治療により、体重、空腹時血糖はいずれも有意な低下したが、血中レジスチン、単球レジスチンｍＲＮA、５か所のメチル化率（治療開始時　それぞれ29.6±5.1％、26.5±4.3％、24.6±5.5％、75.3±4.7％、82.7±4.2％、治療後それぞれ29.0±6.4 ％、26.0±6.0％、24.5±4.7％、75.1±4.2％、82.8±3.6％）と治療前後で有意な変化は認められなかった。

以上より、多サンプル解析の目途が立ったため、患者サンプルの解析を開始した。現時点で500サンプルのメチル化解析が終了した。2000サンプルを目指して、現在、当該シトシンのメチル化率を解析中である。

図1



5か所のシトシンメチル化率は、約20%から80%とシトシン間で差が認められた

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１件）

1.大沼裕，大澤春彦　　血中レジスチン規定因子としての SNP の意義　　愛媛医学 31 巻　4 号　　161-165　2012.12.1

〔学会発表〕（計２件）

1.２型糖尿病患者入院前後における単球レジスチン遺伝子発現とシトシンメチル化の解析
大沼裕、川村良一、門田優子、松下由美、相引真代、芝　真希、能美幸信、高田康徳、西田亙、牧野英一、大澤春彦　第５５回日本糖尿病学会年次学術集会　平成２４年５月１７（木）、１８（金）、１９日（土）　横浜

2.血中レジスチンはプロモーターSNPによるシス作用、および他遺伝子のトランス作用に規定される
大沼　裕、田原　康玄、川村良一、田中高志、大橋　順、西田　亙、高田　康徳、越智　正昭、山田　一哉、川本　龍一、小原　克彦、三木　哲郎、牧野　英一、大澤　春彦　　第３２回日本肥満学会，平成２３年９月２３日、２４日、　淡路

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
大沼 裕（Onuma Hiroshi）
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00294794

(2)研究分担者
高田　康徳（Takata Yasunori）
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20432792

(3)連携研究者
西田　亙（Nishida Wataru）
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80271089

大澤　春彦（Osawa Haruhiko）
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90294800