

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461359

研究課題名(和文) SNP・環境因子統合エピジェネティクスによるレジスチン遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of the human resistin gene expression by SNPs, epigenetics, and environmental factors

研究代表者

大澤 春彦 (OSAWA, HARUHIKO)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90294800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：レジスチンは、2型糖尿病の成因であるインスリン抵抗性を引き起こす。本研究では、レジスチンを標的として、SNP・環境因子を統合したエピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構を解明することを目的とした。日本人一般住民2078名において、血中レジスチンとSNP-420のメチル化率を定量した。SNP-420は、Cの場合にのみメチル化され、メチル化率はC/C型 > C/G型 > G/G型の順であった。逆に、血中レジスチンはC/C型 < C/G型 < G/G型の順に高かった。また、同じ遺伝子型の群ごとに比較すると、メチル化しうるC/C型とC/G型において、メチル化率と血中レジスチンが負に関連した。

研究成果の概要(英文)：Resistin causes insulin resistance, a feature of type 2 diabetes. We analyzed how genetic, epigenetic, and environmental factors affected resistin gene expression. In 2078 subjects in the Japanese general population, plasma resistin was highest in the G/G genotype, followed by C/G and C/C. In contrast, the methylation at SNP-420 was highest in the C/C genotype, followed by C/G and G/G. When the methylation was assessed in the C/C or C/G genotype, the methylation was inversely associated with plasma resistin. Therefore, plasma resistin was associated with both the genotype and methylation at SNP-420.

研究分野：医歯薬学 代謝学 糖尿病 人類遺伝学 分子生物学

キーワード：レジスチン インスリン抵抗性 SNP エピジェネティクス 遺伝子発現 2型糖尿病 遺伝子 環境因子

1. 研究開始当初の背景

マウスにおいて、レジスチンは、主として脂肪細胞から分泌され、インスリン作用に拮抗するサイトカインである(Nature 409: 307, 2001)。実際、レジスチンの過剰発現はインスリン抵抗性を引き起こす。また、ノックアウトは空腹時血糖を低下させる(Science 303:1195, 2004)。一方、ヒトでは、レジスチンの主たる発現部位は単球・マクロファージである。高脂肪食は腸内細菌叢を変化させ、血中エンドトキシン(細菌の内毒素)を増やす。エンドトキシンはレジスチン発現を増強する。すなわち、ヒトにおいて、レジスチンは、環境因子、炎症、インスリン抵抗性をリンクする鍵分子である。

2 型糖尿病は、インスリン抵抗性やインスリン分泌を規定する遺伝子に、運動不足などの環境因子が作用して発症する。その発症予防法やオーダーメイド医療の確立には、原因遺伝子の同定と遺伝子・環境因子相互作用の解明が鍵である。疾患感受性遺伝子の解析法としては、2007 年以降、ゲノムワイド関連解析(GWAS)が盛んに行われている。申請者らも日本のプロジェクトに参加し、KCNQ1 等を同定した(Nat Genet 40:1092, 2008, Am J Hum Genet 86: 1, 2010)。

これまでに、主として GWAS により 60 以上の 2 型糖尿病感受性一塩基多型(SNP)が同定された。しかし、これら全てをあわせても遺伝性のせいぜい 5-10%を説明できるにすぎない。残りは、”missing heritability (見失われた遺伝性)”と呼ばれている(Nature 461: 747, 2009)。”見失われた遺伝性”の可能性として、環境因子が DNA やヒストンを修飾して遺伝子発現に影響を与えるエピジェネティクスが注目されている。

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列の変化を伴わずに、細胞分裂の際に記憶として子孫や娘細胞に伝達される遺伝子機能の変化をさす。環境因子は、DNA のメチル化等を介して遺伝子発現に影響し、表現型を変化させる。メチル化は DNA の CG 配列の C に起こるので SNP によっても変化しうる。

申請者らは、世界に先駆けて、レジスチン

遺伝子の転写調節領域の SNP が、ヒト 2 型糖尿病の原因遺伝子であることを見出した(Am J Hum Genet 75: 678, 2004)。すなわち、SNP-420 の遺伝子型が G/G の場合、2 型糖尿病発症リスクが約 2 倍に高まった。その機序として、SNP-420 が G の場合に転写因子 Sp1/3 が特異的に DNA エlement に結合し、転写活性及び血中濃度を高めた。

血中レジスチンは、レジスチンの単球 mRNA と正に関連し、SNP-420 の G が多い型ほど高く、C/C < C/G < G/G の順であった(BBRC 335: 596, 2005)。さらに、血中レジスチンは、インスリン抵抗性と正に関連し、2 型糖尿病、メタボリック症候群、動脈硬化性疾患で高かった。一般住民 2078 名の解析でも、血中レジスチンは C/C < C/G < G/G 型の順に高かった(Diabetes Care 30: 1501, 2007)。統計解析の結果、血中レジスチンの全変動の 26%は SNP-420 の遺伝子型により説明された。通常、SNP で説明される量的形質はせいぜい 1%であり、これは例外的に強い。すなわち、レジスチンは、遺伝子・環境因子相互作用の解析モデルとして最適である(Diabetologia 53:795, 2010, PLoS ONE 5: e9718, 2010, Diabetes 62: 649-652, 2013)。

最近、申請者らは、レジスチンプロモーター領域の複数の CpG についてシトシンメチル化率をパイロシーケンス法により解析した。その結果、特定部位のメチル化と血中レジスチンが関連した(未発表)。こうして、独自の知見であるレジスチン遺伝子発現・血中濃度調節機構の研究を進展させ、SNP・環境因子・エピジェネティクスを統合的に解析しようという着想に至った。

2. 研究の目的

レジスチンは、インスリン抵抗性惹起性サイトカインである。申請者らは、その遺伝子発現・血中濃度が転写調節領域の SNP により例外的に強く規定されることを見出した。一方、環境因子はエピジェネティクスを介して遺伝子発現に影響しうる。本研究では、独自の知見であるレジスチンに焦点を絞り、SNP・環境因子・エピジェネティクスを統合した遺伝子発現調節機構を解明する。具体的

には、レジスチン転写調節領域を中心とした DNA メチル化、ヒストン修飾、及び miRNA をエピジェネティクスの解析対象とする。培養細胞を用いた環境因子液性 mimetics による分子機構の解析、ヒトの単離単球を用いた生体内意義の解析、定量化環境因子データを用いた遺伝疫学解析を体系的かつ有機的に組み合わせる。こうして、2 型糖尿病、動脈硬化等のインスリン抵抗性関連疾患の新たな発症予防・治療戦略を見出す。

3. 研究の方法

本研究では、レジスチンを標的として、SNP・環境因子を統合したエピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構を解明する。具体的には、レジスチン転写調節領域を中心とした DNA メチル化、ヒストン修飾、及び miRNA を対象とする。まず、in vitro において、ヒト単球培養細胞を用いて、レジスチンのプロモーター活性、mRNA、エピジェネティクスに対する環境因子液性 mimetics の効果を解析する。次に、ヒト in vivo での意義について、単離単球を用いて、レジスチン SNP のエピジェネティクス・遺伝子発現・血中濃度への効果を解明する。さらに、一般住民約 4500 例の遺伝疫学的解析により、SNP・定量化環境因子のエピジェネティクス・血中濃度への効果を解析する。SNP としては、特に、一塩基の違いによりメチル化を変化させる epiSNP を同定し、主たる解析対象とする。こうして、独自の知見であるレジスチン SNP に、環境因子・エピジェネティクスを統合することにより、レジスチン遺伝子発現調節機構を体系的に解明する。

4. 研究成果

レジスチン SNP-420 とメチル化、血中濃度の関係を主に遺伝疫学的に解析した。その結果、まず、血中レジスチンとレジスチンプロモーター領域のメチル化が負に関連する可能性を見出した。そこで、日本人一般住民 203 人について、血中レジスチンと SNP-420 のメチル化率を定量した。塩基配列からは、SNP-420 が C の場合はメチル化され、G の場合はされないことが予想される。実際に、C

アレルが多いとメチル化率が高いことを見出した。さらに、日本人一般住民 2078 名において、血中レジスチンと SNP-420 部位のメチル化率を定量した。解析の結果、やはり、C アレルが多いとメチル化率が高く、C/C 型 > C/G 型 > G/G 型の順であった。逆に、血中レジスチンは C/C 型 < C/G 型 < G/G 型の順に高かった。また、同じ遺伝子型の群ごとに比較すると、メチル化しうる C/C 型と C/G 型において、メチル化の程度と血中レジスチンが負に関連した。

THP-1 ヒト単球細胞において、いくつかの液性 mimetics によりレジスチン mRNA が変化することを確認した。さらに、一部の液性 mimetics について、時間及び濃度依存性を確認した。

ヒト単離単球において、SNP-420 の遺伝子型の違いによる標的 mRNA への効果を解析した。

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 4 件)

1. 大沼 裕、大澤 春彦. レジスチン. 循環器内科 77: 554-560, 2015. (査読なし)

2. 大沼 裕、大澤 春彦. レジスチン血中濃度を規定する遺伝性素因. Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2015: 111-115, 2015. (査読なし)

3. 大沼 裕、大澤 春彦. **レジスチン**. 日本臨床 72 巻増刊 5 最新臨床脳卒中学(上): 245-249, 2014. (査読なし)

4. 大沼 裕、大澤 春彦. 2 型糖尿病原因遺伝子レジスチンの SNP による血中濃度調節機構. 日本体質医学会雑誌 76: 24-29, 2014. (査読なし)

[学会発表](計 4 件)

1. 大沼 裕、田原康玄、川本龍一、門田優子、川村良一、高田康徳、西田 互、小原克彦、

牧野英一、三木哲郎、大澤春彦。糖尿病感受性遺伝子レジスチンSNP-420のメチル化は血中レジスチンと関連する。第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015年5月21-24日、山口県下関市、海峡メッセ下関。

2. Hiroshi Onuma, Yasuharu Tabara, Ryoichi Kawamura, Jun Ohashi, Yasunori Takata, Ryuichi Kawamoto, Katsuhiko Kohara, Tetsuro Miki, Hideichi Makino, and Haruhiko Osawa.

The DNA methylation of single nucleotide polymorphism (SNP)-420 in *RETN* affects resistin gene expression in human monocytes. Keystone symposia (Dendritic Cells and Macrophages Reunited). March 8-13, 2015, Montreal, Canada.

3. Hiroshi Onuma, Yasuharu Tabara, Ryoichi Kawamura, Ryuichi Kawamoto, Wataru Nishida, Yasunori Takata, Hideichi Makino, Katsuhiko Kohara, Tetsuro Miki, and Haruhiko Osawa.

The DNA methylation at single nucleotide polymorphism (SNP)-420 in the promoter of the human resistin gene is inversely associated with plasma resistin in the general Japanese population. American Diabetes Association 74th scientific sessions, Jun 13-17, 2014. San Francisco, USA.

4. 大沼 裕、田原康玄、門田優子、川本龍一、小原克彦、三木哲郎、川村良一、高田康徳、西田 互、牧野英一、大澤春彦。血中レジスチンと糖尿病感受性遺伝子レジスチンSNP-420のメチル化との関連。第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月22-24日、大阪府大阪市、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル・ホテルNCB。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/clab/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

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

川村 良一 (KAWAMURA RYOICHI)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90533092

(3)連携研究者

田原 康玄 (TABARA YASUHARU)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
(現在京都大学ゲノム医学センター准教授)
研究者番号：00268749