

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893087

研究課題名(和文) エピゲノム情報を用いた統合的データ解析によるアディポネクチン発現パスウェイの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the expression pathway of adiponectin based on the integrated data analysis using epigenetic data

研究代表者

中柄 昌弘 (Masahiro, Nakatochi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10559983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：アディポネクチンやレジスチンの分泌異常は生活習慣病の発症に深く関与する。これらの血中濃度は、遺伝因子の影響を受けることが知られているが、既知の濃度関連遺伝子で説明できる割合は非常に少ない。本研究では192名の一般住民男性を対象に、これらの血中濃度、SNP情報、DNAメチル化アレイデータを使用して、これらの血中濃度に関連するDNAメチル化サイトを探索した。その結果、アディポネクチンに対して5カ所、レジスチンに対して1カ所のサイトを特定した。更に、レジスチンと関連したサイトは、近隣に存在するSNPとの関連も確認された。これらの結果は、後天的ゲノム修飾を介した血中濃度の制御に対する新たな知見となる。

研究成果の概要(英文)： Abnormal secretion of adiponectin and resistin is deeply involved in the development of lifestyle disease. These blood concentrations are known to be affected by the genetic factors. However, the variance of these concentrations explained by genes previously identified as associated genes with concentrations is very low.

In this study, we explored DNA methylation sites associated with the blood concentration of adiponectin and resistin using the data of blood concentration of them, SNP, and DNA methylation array for 192 nondiabetic men from a general population. As a result, we identified five sites for adiponectin and one site for resistin. Furthermore, DNA methylation level at the site associated with blood concentration of resistin was associated with SNP in vicinity of the site. These results suggest new insights into the regulation of blood concentration via effects on DNA methylation.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード： エピゲノム アディポネクチン バイオインフォマティクス DNAメチル化 SNP 生活習慣 レジスチン

1. 研究開始当初の背景

(1)アディポネクチンやレジスチンは、主に、脂肪細胞から産生され分泌されるアディポサイトカインの1種であるが、最近、他の組織でも、産生されることがわかってきた(FEBS Lett 579: 5163(2005))。その分泌異常である低アディポネクチン血症・高レジスチン血症は、肥満や高血圧、2型糖尿病、メタボリックシンドローム、冠動脈疾患など様々な病態において認められ、これらの生活習慣病の発症および進展に深く関与する。

この様な背景から、低アディポネクチン血症・高レジスチン血症の改善によるこれらの疾患発症リスク低減の方策が求められている。そのため、アディポネクチンやレジスチンが変動する分子メカニズム解明と、そのメカニズムに沿った治療戦略の開発が必要とされる。

(2)アディポネクチンやレジスチンの血中濃度は、喫煙・飲酒・運動習慣等の環境因子と、遺伝因子の相互作用によって変動する事が知られている。近年、候補遺伝子解析やゲノムワイド関連解析(GWAS)により、これらの血中濃度に関連する遺伝子が次々に同定されてきた。しかしながら、現在までに報告された濃度関連遺伝子で説明できる遺伝因子の割合は未だ非常に少ない。

(3)ゲノムの後天的修飾の一つである DNA メチル化は、従来安定な化学修飾であると考えられてきたが、近年、喫煙の様な環境因子(Am J Hum Genet 88: 450 (2011))や年齢の様な個人因子(Aging Cell 11: 1132 (2012))により、血球の DNA メチル化サイトが大きく変動する事が報告されてきた。この様な DNA メチル化サイトの変動が、アディポネクチンやレジスチンの血中濃度や各種疾患の発症に影響を及ぼすならば、今後の予防医学に重要な情報になると考えられる。

2. 研究の目的

日本人一般住民男性に対して DNA メチル化アレイを用いたエピゲノムワイド関連研究を実施し、後天的ゲノム修飾が血中アディポネクチン濃度やレジスチン濃度に如何なる影響を与えるかを調査する事を目的とする。

3. 研究の方法

我々は、これまでに北名古屋市保健センター(行政側)の全面的協力を得て、北名古屋市住民コホート(北名古屋ゲノム疫学研究: KING Study, NCT00262691)を構築した。この参加者の内、192名の男性・非糖尿病患者(HbA1c < 5.6%, 糖尿病の既往歴・治療歴無し)に対して、アディポネクチン、レジスチンの血中濃度、SNP アレイ、DNA メチル化アレイが測定済みである。KING study は、愛知学院大学、三重大学、名古屋大学、九州大学

の倫理委員会の承認を得ており、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して行われている。また、本研究で解析対象となった参加者からは全て同意書を取得済みである。

アディポネクチン濃度は、latex turbidometric immunoassay (Otsuka

Pharmaceutical Corporation, Osaka, Japan)を用いて血清中の濃度が測定され、レジスチン濃度は、ELISA kit for human resistin (LINCO Research, St Charles, MS, USA)を用いて血漿中の濃度が測定された。これらの濃度は、対数正規分布の形で分布していたことから、対数値化して統計解析に使用した。SNP データは、Illumina HumanOmniExpress-12 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いて測定され、メチル化アレイのデータは、Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いて測定された。

本研究では、これらのデータを用いて、(1)~(2)の手順で研究を進め、ゲノムの後天的修飾である DNA メチル化がアディポネクチン濃度やレジスチン濃度に如何なる影響を及ぼすか調査した。

(1)アディポネクチン濃度・レジスチン濃度に関連するメチル化サイトの探索を行う。前述の男性・非糖尿病患者 192 名を対象に、測定した 45 万カ所の DNA メチル化サイトのメチル化強度と血中アディポネクチン濃度・レジスチン濃度の関連解析を行った。解析手法にはメチル化解析の分野で広く用いられている一般化線形モデル(GLM)を使用した。DNA メチル化強度の指標には、M-value を用いた。M-value はメチル化強度の解析において、統計的妥当性を持つ指標である(BMC Bioinformatics 11: 587 (2010))。また、HumanMethylation450をはじめとする DNA メチル化アレイの、測定間のバイアスを補正するため、empirical Bayes method (Biostatistics 8: 118 (2007))により測定間のバイアスを除去した。更に、Chenらにより、クロスハイブリダイゼーションの可能性が報告されているメチル化サイトは解析対象から除外した(Epigenetics 8: 203 (2013))。

(2)上記(1)で同定したアディポネクチン濃度・レジスチン濃度と有意に関連する DNA メチル化サイトについて、そのメチル化サイトの近隣に存在する SNP との関連を調査した。解析手法には(1)と同様一般化線形モデル(GLM)を使用した。SNP 情報は、マイナーアレルの数として数値化した。

4. 研究成果

(1)結果

本研究では、男性・非糖尿病患者 192 名をエピゲノムワイド関連研究の研究対象とし

た。解析対象の背景を表 1 に示す。

表 1. 解析対象者 192 名の背景

変数名	中央値 (1st, 3rd 分位点)
男性, <i>n</i> (%)	192 (100%)
年齢 (歳)	66 (62, 71)
HbA _{1c} (%)	5.1 (5.0, 5.3)
アディポネクチンの 血清濃度(μg/ml)	9.4 (7.0, 12.6)
レジスチンの 血漿濃度 (ng/ml)	9.4 (6.6, 13.9)

これら 192 名を対象に、まず DNA メチル化強度と血中アディポネクチン濃度及び血中レジスチン濃度の関連解析を実施した。関連解析の結果、図 1 及び図 2 のような Quantile-Quantile (QQ) plot が得られた。この図から、アディポネクチン、レジスチンの両方において、期待される P 値(破線)から逸脱したメチル化サイトが複数確認された。

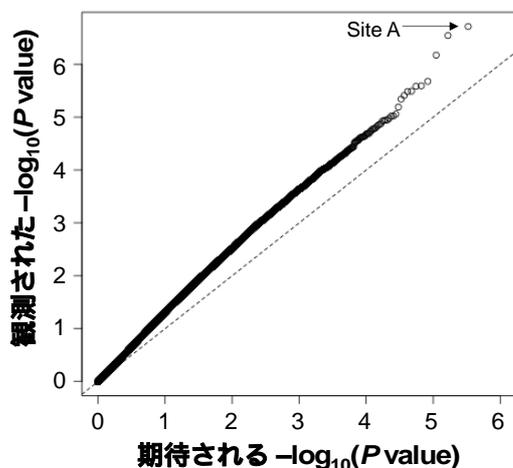


図 1. アディポネクチンの QQ-plot

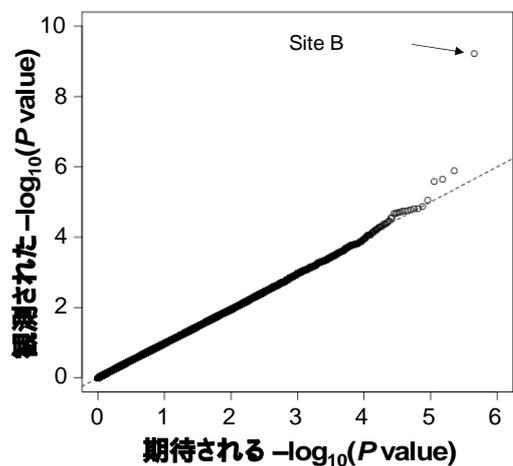


図 2. レジスチンの QQ-plot

これらの関連解析の結果から、アディポネクチン濃度と $P < 1.0 \times 10^{-6}$ で関連するメチル化サイトを 5 カ所 (4 座位) 同定した。同様に、レジスチン濃度と $P < 1.0 \times 10^{-6}$ で関連するメチル化サイトを 1 カ所 (1 座位) 同定した。アディポネクチン、レジスチンそれぞれに対して最も強く関連したメチル化サイト (Site A, Site B と呼称) と各血中濃度の関係を図 3 と図 4 に示した。図に示した通り、アディポネクチン濃度と Site A のメチル化強度は、正の関連を示し、また、レジスチン濃度と Site B のメチル化強度は負の関連を示した。

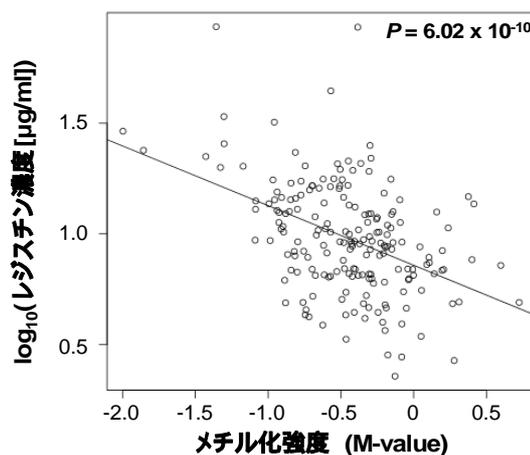


図 3. アディポネクチン濃度と Site A の関連

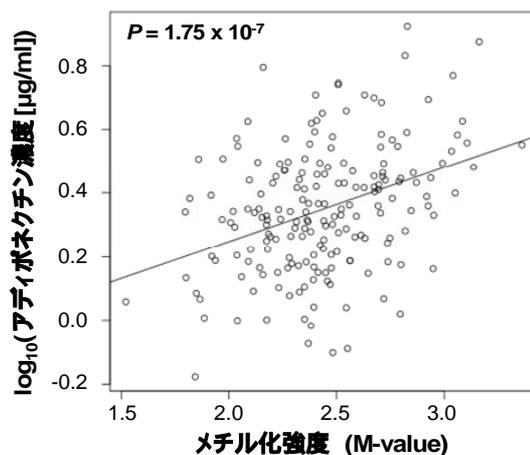


図 4. レジスチン濃度と Site B の関連

更に、これらのメチル化サイトについて、近隣に存在する SNP とメチル化強度の関連を調査した。その結果、Site A については $P < 1.0 \times 10^{-6}$ の関連を示す SNP は確認できなかったが、Site B について、極めて有意な関連を示した SNP C を同定した。具体的には、図 5 に示す通り、この SNP C のマイナーアレル A の数と Site のメチル化強度 B には、有意な負の関連が確認できた。

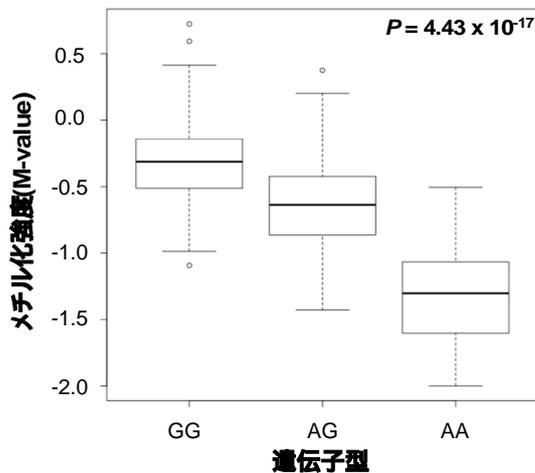


図5. Site B と近隣 SNP C の関連

(2) 考察

本研究で、我々は日本人一般住民男性に対して DNA メチル化アレイを用いたエピゲノムワイド関連研究を実施し、アディポネクチン濃度と $P < 1.0 \times 10^{-6}$ で関連するメチル化サイトを 5 カ所 (4 座位)、レジスチン濃度と $P < 1.0 \times 10^{-6}$ で関連するメチル化サイトを 1 カ所 (1 座位) 同定した。

DNA メチル化は近隣の遺伝子発現を制御するという報告があることから、これらのメチル化サイトもまた、近隣の遺伝子発現を制御し、その結果アディポネクチンやレジスチンの発現に関与していると考えられる。そこで、アディポネクチンとの関連が確認された Site A に関して、その近隣に存在する遺伝子とアディポネクチンとの関係性を調査したが、アディポネクチンと直接的に関わりがある遺伝子は見出されなかった。マイクロアレイデータ等の他の研究データと照合して、Site A の寄与のメカニズム・妥当性について、調査を進める必要がある。また、レジスチン濃度と強い負の関連が確認された Site B についても近隣の遺伝子を調査した所、Site B の近傍にレジスチンタンパク質をコードしている *RETN* 遺伝子が存在していた。このことから、Site B は近隣にある *RETN* の遺伝子発現を調節し、その結果、血中レジスチン濃度へ影響を及ぼしたと考えられ、今回の結果は、極めて妥当なものであると考えられる。更に、Site B と負の関連が確認された SNP C は、ヒトゲノム上で Site B の近隣、すなわち *RETN* 遺伝子の近傍に位置していた。SNP が近隣の DNA メチル化サイトのメチル化強度に影響を及ぼす事もまた知られているため、今回確認された *RETN* 遺伝子近傍に位置する SNP C が Site B のメチル化レベルと関連する結果も妥当であると考えられる。

レジスチンは単球やマクロファージでも生産・分泌されていることが知られている (Biochem Biophys Res Commun 309, 286 (2003))。また、UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) では、単球

(CD13+)における DNA メチル化以外のゲノム修飾情報が公開されている (Nucleic Acids Res 41, D56 (2013))。そこで UCSC Genome Browser を用いて、今回我々が同定した Site B 近傍のゲノム修飾情報を調査した所、Site B の位置は、DNase I 高感受性部位やヒストン修飾部位 (H3K4m1/2/3, H3K27ac) と重複していた。この点からも、Site B を含む領域が、何らかの機能的部位であることが期待される。

以上のことから、SNP C が Site B のメチル化を調節し、その結果、レジスチン濃度へ影響を及ぼすという調節メカニズムが期待できる。これらの結果は、後天的ゲノム修飾を介したレジスチンの血中濃度制御に対する新たな知見となる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中枋 昌弘 (NAKATOCHI, Masahiro)
 名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
 研究者番号: 10559983

(2) 研究協力者

横田 充弘 (YOKOTA, Mitsuhiro)
 愛知学院大学・歯学部・教授
 研究者番号: 50201851

松原 達明 (MATSUBARA, Tatsuaki)
 愛知学院大学・歯学部・教授
 研究者番号: 30209598

市原 佐保子 (ICHIHARA, Sahoko)
 三重大学大学院・地域イノベーション学
 研究科・准教授
 研究者番号: 20378326

山本 健 (YAMAMOTO, Ken)
 久留米大学・医学部・教授
 研究者番号: 60274528