

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290067

研究課題名(和文) Genomic/non-genomic手法の統合による代謝関連遺伝子機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of metabolic disorder-associated genes by the integration of genomic and non-genomic approaches

研究代表者

加藤 規弘 (Kato, Norihiro)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：80293934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイド関連解析などの探索的なゲノム解析により同定された遺伝的座位/染色体領域内の責任遺伝子(群)を絞り込み、それらが引き起こす遺伝子発現変化等の生物学的機序を解明すべく、我々は代謝性疾患をモデルとして大きく3つの課題に取り組んだ。近交系ラットでの、代謝性疾患に関連する遺伝的座位の精密マッピングを通じて責任遺伝子(群)を絞り込み、その遺伝子発現制御におけるエピゲノム(特にDNAメチル化)の影響を検討した。さらに、遺伝-環境相互作用におけるmiRNAの臨床的意義を評価して、一部、病態バイオマーカーとして有用であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To narrow down the possible list of causative genes at loci or chromosomal regions, where genetic associations are detected through exploratory analyses such as genome-wide association study (GWAS) and to further elucidate the biological mechanisms of mRNA expression changes by such causative genes, we have addressed three principal themes in the case of metabolic disorders as follows. First, we have performed fine mapping of loci, which are found to be associated with metabolic disorders phenotypes in the inbred rats, thereby narrowing down the list of causative genes. Second, we have investigated impacts of epigenomic changes, in particular, DNA methylation changes, on the regulation of mRNA expression. Third, we have evaluated clinical significance of microRNA, another key component of epigenomic changes, in the gene-environment interaction and have successfully found its usefulness as a pathological biomarker.

研究分野：総合生物

キーワード：疾患モデル生物ゲノム 遺伝子 トランスクリプトーム ゲノム エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

(1) 一塩基多型 (SNP) を用いた多因子疾患 / 形質のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、過去数年間に、多くの染色体領域に責任遺伝子座位が見いだされてきた。これらの領域には、従来、全く注目されていなかった(あるいは機能未知の) 遺伝子が含まれており、病因・病態に関する新たな機序の解明に繋がると期待されている。高血圧、脂質異常症、糖尿病、心血管病などの代謝関連疾患形質に関する GWAS で同定された遺伝的座位 (責任遺伝子座位) の >80% は非コード領域にあり、近傍遺伝子から大きく離れた遺伝子間領域に位置するものが多い。また、推定領域内に複数の遺伝子が含まれていて、その何れであるかが不明なことも多い。

(2) GWAS などの探索的ゲノム解析における、こうした「位置的絞り込み」の限界を打破する手法の一つと目されているのが、遺伝子型と遺伝子産物 (mRNA や蛋白) の発現量を直接紐付ける eQTL (expression Quantitative Trait Locus) 解析である。eQTL 解析は、“Genomic approach” の展開形として、GWAS 等での遺伝子型決定と組み合わせられるようになった。米国では Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project という、ヒトの多様な組織における、遺伝子の発現と制御に関する「アトラス (地図)」の作成計画が野心的に進められている。eQTL 解析は、単一の遺伝子の同定だけでなく、下流 (downstream) で作用する遺伝子群の同定を通じて複雑な疾患形質の key regulators/network の解明にも繋がりが得る。

(3) 一方、セントラル・ドグマで想定される「DNA (複製と転写) mRNA (翻訳) 蛋白」の経路において、DNA の塩基配列のバリエーション以外に、遺伝子産物の産生量に影響を与え得る分子機構として、主に癌の研究分野などで、epigenetics と microRNA (miRNA) が注目されるようになった。主要な epigenetic 変化である DNA メチル化について、その一部分は、遺伝的機序によるものである可能性が示唆されている (Schmitz *et al.* Nature 2013)。また miRNA (とその標的配列) の多型が疾患関連形質と関わり得ることも分かってきた (PolymiRTS Database: Bhattacharya *et al.* Nucleic Acids Res. 2013)。代謝関連疾患形質について、これらの“non-genomic” な要素の病因的・病態的関与が徐々に調べられつつあるが、全容解明にはまだ程遠い状況である。

(4) これまでの、GWAS などの探索的ゲノム解析の結果、多因子疾患の責任遺伝子座は相当な数にのぼり個々の影響は比較的マイルドなものであること、各責任遺伝子座の本体を突き止めるには、eQTL などの「遺伝子機能」に結びつくデータの活用が必要なこと、

及び “genomic” な要素だけでは遺伝的要因の影響を十分に説明できないこと (いわゆる missing heritability の議論) などが判明してきた。

2. 研究の目的

(1) eQTL や epigenetics、miRNA は少なからず組織特異的に制御されるが、ヒト個体からの標的組織の試料収集が容易でなく、また外部環境 (食事や薬物) の影響を調べる介入実験を行う必要があるため、本研究ではモデル動物 (ラット) を解析対象とする。

(2) モデル動物の活用による、探索的ゲノム解析に続く研究段階での、Genomic と Non-genomic approach を組み合わせた、代謝関連疾患の統合的理解を目的とする。

(3) 具体的命題は、探索的ゲノム解析で見いだされた責任遺伝子座位の本体と、その作用機序としての、epigenetic 変化 (DNA メチル化) や miRNA の関与の有無、ネットワークとしての広がりを検証する。

(4) 包括的命題は、外部環境の変化である介入 (食事負荷等) に対する、主な標的組織での DNA メチル化と miRNA 発現量の変動の程度及びプロフィールを検証する。

3. 研究の方法

(1) 代謝関連疾患形質の責任遺伝子座における eQTL の探究: 研究代表者らがこれまでに作成したコンジェニックシステムを活用して、モデル動物 (近交系ラット) の多因子疾患形質に係る、主要な責任遺伝子座位の eQTL に関連した遺伝子発現変動を調べて、関連地図の作成とリスト化を行う。

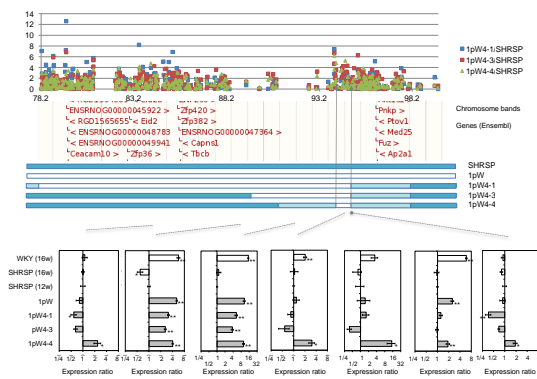
(2) エピゲノム (DNA メチル化) の検討: 遺伝的要因に由来する eQTL と DNA メチル化の系統差との間の重複 (遺伝的機序の可能性) や、食事負荷等の外部環境変化に伴う DNA メチル化の変動 (後天的修飾) を調べる。具体的には、12 週齢の Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) 系統 (インスリン抵抗性のモデル) と対照の Wistar Kyoto rat (WKY) 系統から各々抽出した組織を用いて、MeDIP (methylated DNA immunoprecipitation) で高品質な DNA を抽出し、この DNA を、Rat DNA Methylation Array に hybridization して DNA methylation の系統差を調べる。また同じ組織より、常法で抽出した DNA を Rat Gene Expression 44K Microarray に hybridization して遺伝子発現の系統差を調べる。SHR 系統で、食事 (食塩及び高脂肪食) 介入を 12 週齢から 16 週齢までの 4 週間、薬物 (糖質コルチコイド) 介入を 12 週齢からの 3 日間行い、介入前後での DNA methylation と遺伝子発現の変化をゲノムワイドに調べる。

(3) miRNA の変動と分子ネットワークの探究：公的データベースに搭載されている miRNA を網羅した microarray で、同じく、遺伝的機序と後天的修飾の 2 つの観点から miRNA の変動を調べる。そして遺伝子過剰発現など、培養細胞の実験系で分子ネットワークの検証を試みる。具体的には、ゲノムワイドな Rat miRNA microarray を用いて、DNA メチル化解析と同様、組織間での発現プロファイルの違いを検討する。その際、大きく 2 種類の命題に取り組む。一つ目の命題は、miRNA (とその標的配列) の多型が代謝関連疾患形質の責任遺伝子座位 (positional QTL : pQTL と略) 本体であるかどうかである。もう一つの命題は、代謝関連疾患に関わる介入に伴うゲノムワイドな miRNA 発現プロファイルの変化を調べて、それを遺伝子発現変動と突き合わせることで、遺伝-環境相互作用における miRNA の意義と病態バイオマーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

(1) 代謝関連疾患形質の責任遺伝子座における eQTL の探究：

SHR 系統と WKY 系統間で主要な遺伝的効果を示す、代謝関連疾患形質の pQTL の近傍領域に関して、SNP の系統分布様式や遺伝子発現量の系統差を調べた。そして、脳、腎臓、肝臓等を対象に pQTL-eQTL の相関地図を作成し精密マッピングを行った。血圧、脳卒中に関する、ラット染色体 1 番のコンジェニックシステムを活用した解析結果を例として示す。



Differential gene expression in the congenic intervals on RNO1

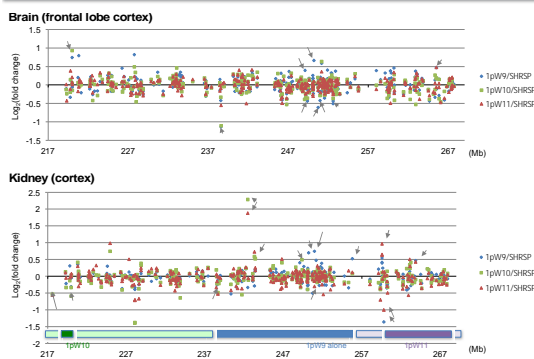


図 1. ラット染色体 1 番の精密マッピング

ヒトの GWAS で見いだされた血中脂質レベルの責任遺伝子座位と、ラット homolog との組み合わせをもとに “ functional fine mapping ” という解析手法を開発した。これは、ラットでの高脂肪食負荷に伴う遺伝子発現変動をもとに、種間の相同性を利用して、ヒトでの pQTL-eQTL 相関を推測するアプローチである (発表論文 7)。

(2) エピゲノム (DNA メチル化) の検討：

ゲノムワイドな Rat DNA Methylation Array を用いて、腎臓、肝臓、脂肪を主な解析対象として、組織間での DNA メチル化の違いを検討し、大きく 2 種類の命題に取り組んだ。一つ目の命題は DNA メチル化 (分散) に影響する因子の、相対的 “ 貢献度 ” はどれくらいかを評価することである。DNA メチル化 (分散) への影響の強さは 「 臓器の差 > 年齢 ≈ 系統差 (遺伝的背景) ≈ 食餌 (高脂肪食負荷) 」 の順であった。

Contribution of known factors to the variance of methylation level

Factor	Estimate	P-value	σ in original scale of methylation proportion (which ranges 0-1)
Strain (SHR as baseline)			
SHRsp	3.3E-5	9.5E-5	0.006
WKY	4.2E-5	6.2E-7	0.006
Organ (liver as baseline)			
Brain	1.1E-4	1.3E-84	0.011
Diet or drug (sp diet as baseline)			
1% NaCl	8.1E-6	0.303	0.003
HFC	3.8E-5	6.9E-6	0.006
Age (normalized)			
Residual error	4.1E-5	4.0E-15	0.006
	1.0E-3	3.4E-186	0.032

Difference between brain and liver is larger than the difference between WKY and SHR.

表 1. DNA メチル化への影響因子の強さ

もう一つの命題は、代謝関連疾患に関わる介入 (食塩負荷、高脂肪食負荷、及び糖質コルチコイド負荷) に伴う DNA メチル化変動を調べて、それを遺伝子発現変動と突き合わせることで、遺伝-環境相互作用としての epigenetics の意義を検討した。

中でも、高脂肪食負荷に関しては、食餌負荷の直接的影響による DNA メチル化変動と、負荷後の 4 週間通常餌に戻して、メチル化変動も戻るかを調べた。

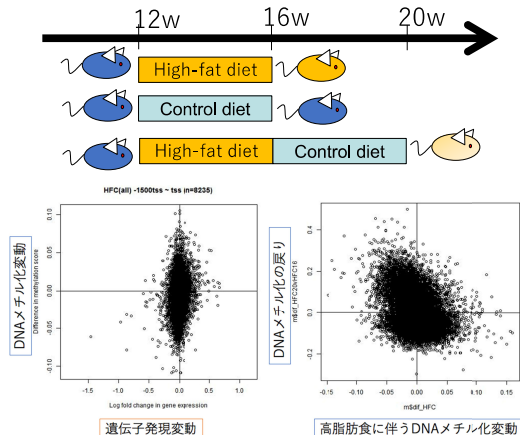


図 2. 高脂肪食負荷に伴う DNA メチル化変動

12週齢からの4週間の高脂肪食負荷では、顕著な発現変化を示す遺伝子はあるものの、DNAメチル化変動は全体としてマイルドなものであった。通常餌に戻すことにより、こうしたDNAメチル化変動も基線に復帰する傾向があり、可変的なものであると推測された。

(3) miRNAの変動と分子ネットワークの探究: Rat miRNA microarrayを用いて、DNAメチル化解析と同様、組織間での発現プロファイルの違いを検討した。組織ごとに有意に変動するmiRNAの数は少なかったが、一部の病態(脳卒中など)では病態バイオマーカーとしての有用性が見いだされた(論文化準備中)。

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7件)

(1) Zahid HM, Ferdaus MZ, Ohara H, Isomura M, Nabika T. Effect of p22phox depletion on sympathetic regulation of blood pressure in SHRSP: evaluation in a new congenic strain. *Sci Rep*. 2016 Nov 8;6:36739. 査読有.doi: 10.1038/srep36739.

(2) Ohara H, Nabika T. A nonsense mutation of Stim1 identified in stroke-prone spontaneously hypertensive rats decreased the store-operated calcium entry in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Aug 5;476(4):406-11. 査読有.doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.134.

(3) Yamagata K, Sone N, Suguyama S, Nabika T. Different effects of arginine vasopressin on high-mobility group box 1 expression in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats and congenic SHRpch1_18 rats. *Int J Exp Pathol*. 2016 Apr;97(2):97-106. 査読有.doi: 10.1111/iep.12172. Epub 2016 Apr 29.

(4) Yao H, Ferdaus MZ, Zahid HM, Ohara H, Nakahara T, Nabika T. Focal Ischemic Injury with Complex Middle Cerebral Artery in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats with Loss-Of-Function in NADPH Oxidases. *PLoS One*. 2015 Sep 21;10(9):e0138551. 査読有.doi: 10.1371/journal.pone.0138551.

(5) Isomura M, Saar K, Ohara H, Hübner N, Kato N, Nabika T. 1A.05: COMPARISON OF THE WHOLE GENOME SEQUENCE REVEALED GENETICALLY DISTINCT LOCI BETWEEN SHR/IZM AND SHRSP/IZM. *J Hypertens*. 2015 Jun;33

Suppl 1:e2. 査読有.doi:

10.1097/01.hjh.0000467355.97086.6a.

(6) Ferdaus MZ, Xiao B, Ohara H, Nemoto K, Harada Y, Saar K, Hübner N, Isomura M, Nabika T. Identification of Stim1 as a candidate gene for exaggerated sympathetic response to stress in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e95091. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0095091

(7) Akiyama K, Liang YQ, Isono M, Kato N. Investigation of Functional Genes at Homologous Loci Identified Based on Genome-wide Association Studies of Blood Lipids via High-fat Diet Intervention in Rats using an in vivo Approach. *J Atheroscler Thromb*. 2015;22(5):455-80. 査読有. doi: 10.5551/jat.27706.

[学会発表](計14件)

(1) Shimizu-Furusawa H, Takeuchi F, Isono M, Akiyama K, Liang Y-Q, Kato N. Epigenetic changes in the brain with high-salt intervention in SHR. *Cardiovascular Genetics, Satellite Symposium of ISH 2016*. Tokyo, Japan, September 22-23, 2016.

(2) Shimizu-Furusawa H, Takeuchi F, Isono M, Akiyama K, Liang Y-Q, Kato N. Epigenetic changes in the liver with high-fat-diet intervention in SHR. *Cardiovascular Genetics, Satellite Symposium of ISH 2016*. Tokyo, Japan, September 22-23, 2016.

(3) Shimizu-Furusawa H, Takeuchi F, Isono M, Akiyama K, Liang Y-Q, Kato N. Epigenetic changes in the liver with dexamethasone administration in SHR. *Cardiovascular Genetics, Satellite Symposium of ISH 2016*. Tokyo, Japan, September 22-23, 2016.

(4) Shimizu-Furusawa H, Takeuchi F, Isono M, Akiyama K, Liang Y-Q, Kato N. Comparison of epigenetic changes in the liver between Tg-CETP rat and SHR. *Cardiovascular Genetics, Satellite Symposium of ISH 2016*. Tokyo, Japan, September 22-23, 2016.

(5) Shimizu-Furusawa H, Takeuchi F, Isono M, Akiyama K, Liang Y-Q, Kato N. Comparison of epigenetic changes in the liver between RN04-derived congenic rat and progenitor strains. *Cardiovascular Genetics, Satellite Symposium of ISH 2016*. Tokyo, Japan, September 22-23, 2016.

(6) Kato N. DNA methylation and hypertension. *Cardiovascular Genetics, Satellite Symposium of ISH 2016*. Tokyo, Japan, September 22-23, 2016.

(7) 竹内史比古、磯野正人、梁一強、秋山康一、加藤規弘. 6クラスの降圧剤間での、ラットにおける心肥大抑制と遺伝子発現変動の比較: 続報. 第51回高血圧関連疾患モデル学会総会, 大阪, 10月30-31日, 2015.

(8)竹内史比古、磯野正人、梁一強、秋山康一、加藤規弘. 3種のレニン-アンジオテンシン系関連降圧剤間での、ラットにおける降圧効果と腎臓での遺伝子発現変動の比較. 第51回高血圧関連疾患モデル学会総会, 大阪, 10月30-31日, 2015.

(9)梁一強、秋山康一、磯野正人、竹内史比古、加藤規弘. ラット染色体1番上の、心血管合併症遺伝子座の同定とその病態機序の探究. 第51回高血圧関連疾患モデル学会総会, 大阪, 10月30-31日, 2015.

(10)梁一強、磯野正人、秋山康一、岡村匡史、竹内史比古、加藤規弘. ヒト cholesteryl ester transfer protein のトランスジェニックラットにおける肝臓での脂質代謝解析. 第51回高血圧関連疾患モデル学会総会, 大阪, 10月30-31日, 2015.

(11)磯野正人、梁一強、秋山康一、竹内史比古、加藤規弘. 降圧、心肥大抑制と遺伝子発現変動に関する、6クラスの降圧剤間での比較. 第50回高血圧関連疾患モデル学会総会, 和歌山, 12月5-6日, 2014.

(12)梁一強、Nitish Mehta、秋山康一、磯野正人、加藤規弘. ラット染色体1番における、心血管合併症遺伝子座の多面的探索. 第37回日本高血圧学会総会, 横浜, 10月17-19日, 2014.

(13)加藤規弘. コンジェニック系統解析による新たな臓器障害 QTL の同定. 第50回高血圧関連疾患モデル学会総会, 和歌山, 12月5-6日, 2014.

(14) Kato N. Can rat genetics help to improve human genetics? Cardiovascular Genetics Satellite 2014. Rome, Italy, June 18, 2014.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤規弘 (KATO NORIHIRO)

国立国際医療研究センター・研究所・部長
研究者番号：80293934

(2)研究分担者

並河 徹 (NABIKI TORU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50180534

(3)連携研究者

岡村匡史 (OKAMURA TADASHI)

国立国際医療研究センター・研究所・室長
研究者番号：00333790

(4)研究協力者

竹内史比古 (TAKEUCHI FUMIHIKO)

国立国際医療研究センター・研究所・室長