

助成番号 0829

網羅的エピゲノム解析システムを用いた食塩感受性高血圧症発症機構の解明と 影響を与えるリスクに関する症例対照研究

有馬 隆博¹, 牧野 直樹²¹東北大学未来医工学治療開発センター, ²九州大学生体防御医学研究所

概要 1) 遺伝性食塩感受性マウスを用いた網羅的エピジェネティックな分子機構の解析

SHR マウスは遺伝性食塩感受性マウスであり、高食塩負荷摂取により全身性高血圧・心肥大を発症する。高食塩負荷の持続により比較的短期間のうちに重症心不全へと移行するため、ヒトの心不全発症機構の良いモデル動物となる。そこで各病期の SHR マウス心筋を用いて DNA メチル化の変化を網羅的に解析し、高食塩負荷前後のマウス DNA を用い、ゲノムタイリングアレイと ChIP-on-Chip システムによる網羅的 DNA メチル化の解析を行った。メチル化のプロファイリングを生物学的特性として解析している。およそ 400 の領域に着目したが、細胞周期、アポトーシス、ゲノムインプリンティング、癌抑制遺伝子に関わる遺伝子が抽出された。

2) ヒト本態性高血圧症患者の DNA メチル化の変異と疫学調査

① 実際の患者(58人)と対照(123人)についてインプリント遺伝子について DNA メチル化の解析を行った。その結果、PEG1、PEG3 のインプリント遺伝子においては、症例群では有意にメチル化されていることが判明した ($P < 0.01$)。

② 高危険因子の抽出

症例対照研究手法で、環境要因などについて 50 項目に及ぶ記述式アンケートと食物摂取頻度調査票を用いて、141 の食品項目について摂取頻度を調査した。独立した危険因子は高齢、喫煙と BMI が高いことが明らかになった。天ぷらの摂取頻度やレチノール等は、発症リスク上昇と関連していた。一方、コーヒー摂取頻度と緑茶摂取頻度が高まるに従い、リスクは低下していた。

日本人における本態性高血圧症の罹患率は、年々増加してきている。我が国における本態性高血圧症の漸増の原因を探求する意味でも、病因を解明することは重要であり、本研究の結論が国民の生活、行政指導に有益な情報をもたらすものと考えられる。しかし本研究のような前方視的な研究にあっては、中途での解析は研究結果に影響する恐れがあるために解析を行ってはいけないとされている。現在のサンプルサイズでは十分な統計学的パワー(検出力)が得られないため、本態性高血圧症の病因について結論を導き出すことはできず、結論は今後さらに詳細な解析を行った後に報告する。

1. 緒言

食塩感受性(本態性)高血圧症は遺伝的素因の関与が示唆される代表的な生活習慣病であるが、本疾患が具体的にどのような遺伝子異常を背景としているかは今なお殆ど不明である。また近年、ゲノムの遺伝情報が正しく発現するためには、エピジェネティクスによる制御が重要で、その破綻が生活習慣病にも関わることが報告され、注目され

ている¹⁾。エピジェネティクスとは、DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチン構造などを介する遺伝子発現制御を指す。また、このエピジェネティックな変異は環境や栄養で改善する可塑性も持ち合わせている^{2,3)}。このエピジェネティクスの解明は医療に新しい展開をもたらす大いなる可能性を秘めている。

本研究は、これまで候補アプローチと試行錯誤により行

われていたエピジェネティクスの標的遺伝子の同定について、ゲノムタイリングアレイと ChIP-on-Chip 技術を導入し、網羅的・体系的なエピゲノム研究の基盤を確立することを目的とする。さらに、この解析技術を本態性高血圧症の発症に適用し、病気のメカニズムの解明や新しい診断・治療マーカーの開発を目指す。また、得られたデータを新たに構築されるデータベースに登録し、エピゲノム計画の基盤作りに貢献することも目的の一つである。同時にヒト健康影響を評価するには、動物やヒト細胞などを用いた実験の知見に加えて、ヒトそのものを対象とする疫学研究による証拠が不可欠である。本研究では、症例・対照研究の手法を用いて、本態性高血圧症治療群および対照群のエピジェネティックな修飾や遺伝子変異の解析を行う。また、生活習慣アンケートと食物摂取頻度調査票 (FFQ) で食物摂取頻度の解析の結果と各遺伝子のエピジェネティックな変異の解析結果との関連性を疫学的手法にて用いて明らかにし、比例ハザードモデルによる交絡要因に十分考慮し、より確実に検証する。

2. 研究方法

2.1 遺伝性食塩感受性マウスを用いた系統的・網羅的エピジェネティックな分子機構の解析

●ChIP-on-Chip システムによる解析

SHR マウスは遺伝性食塩感受性マウスであり、高食塩負荷摂取により全身性高血圧・心肥大を発症する。高食塩負荷の持続により比較的短期間のうちに重症心不全へと移行するため、ヒトの心不全発症機構の良いモデル動物である。そこで各病期の SHR マウス心筋を用いて、病期特異性 (健常期、心肥大期、心不全期)、標的の選択性や作用機序を明らかにするため、網羅的・系統的なエピジェネティックな相違について調べた。各病期の DNA を抽出。DNA は超音波ソニケーターで粉砕後 500 bp 程度に断片化した。抗メチル化シトシン抗体で免疫沈降し、抗体に結合する DNA をビオチン標識。200-300 bp のプロモーター配列、エンハンサー配列、転写調節領域を含むおよそ 20,000 個のスポットを解析するゲノムタイリングアレイでメチル化に富む領域をストレプトアビジンで標識し、ハイブリダイズした。統計学的な解析は、(1) 機能的、構造分類による統計学的解析 (2) 生物学的機能分類 (3) 配列モチーフ解析 (4) 染色体分布解析を行った。

2.2 ヒト本態性高血圧症患者のエピジェネティックな分子機構と疫学調査

●症例、対照の登録:九州大学老年内科及びその関連病院を受診し、本態性高血圧症と診断された患者で、研究に対する同意を得た方 58 人を対象とした。対照は症例と同期間内に同施設にて人間ドックを希望受診し、年齢や居住地をマッチングさせた者 123 人であった。

●血中の葉酸、ビタミン B6 等の栄養素濃度をガストロクロマトグラフィーで測定

●ChIP-on-Chip で得られた結果について実際に多数例の患者心筋サンプルで DNA メチル化は Bisulphite-PCR 法をヒストン修飾の解析には Chip-PCR 法を用いて確認。その結果は年齢、進行度、治療抵抗性、予後など臨床病態との相関について検討。

●ヒトインプリント遺伝子調節領域の DNA メチル化の解析
DNA メチル化の解析は、七つのヒトインプリント遺伝子 (H19、GTL2、PEG1 (MEST)、LIT1 (KCNQ1OT1)、ZAC (PLAGL1)、PEG3 と SNRPN) の調節領域で行った。各 DNA は、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) によりバイサルファイト処理され、PCR が行われた (これらプライマー情報を表 1 にまとめた) (表 1)。

まず PCR 産物は制限酵素処理解析 (COBRA) を行った。制限酵素処理によりメチル化しているテンプレート DNA (バイサルファイト処理済み) のみが切断された。TaqI で H19、GTL2、PEG1、LIT1、ZAC、PEG3、SNRPN、MluI で H19、NruI で GTL2、MboI で PEG1 をそれぞれ切断した。制限酵素反応後、2.5% アガロースゲルで電気泳動した。制限酵素で切断された断片はメチル化、切断されなかった断片はメチル化していないテンプレートであることを示す。各遺伝子でのメチル化の割合は Lumiimager analyzer と Lumianalyst ソフトウェアパッケージ (Roche Diagnostics) で定量化された。そして、制限酵素認識部位における各々のゲノムサンプルのメチル化のパーセンテージは、酵素で切断された PCR 産物量と PCR 産物総量との比率から計算された。PCR 産物は pGEM-T ベクター (Promega) によりクローニングされた。シークエンスには、M13 Reverse プライマーと ABI Prism 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) が用いられた。またインプリントを受けない反復配列 (LINE1 と Alu) メチル化も同じ方法で解析された。制限酵素はそれぞれ HinfI と MboI が使

表 1. 解析に用いたプライマー配列

遺伝子名	プライマー配列(5'-3')	増幅断片長 (bp)
父性インプリント遺伝子		
H19	F1: AGGTGTTTTAGTTTTATGGATGATGG F2: TATATGGGTATTTTTGGAGGTTTTT R1: ATAAATATCCTATTTCCCAAATAACCCC	220
GTL2	F: GGGTTGGGTTTTGTAGTTGTT R: CCAATTACAATACCACAAAATTAC	259
母性インプリント遺伝子		
PEG1	F: TYGTTGTTGGTTAGTTTTGTAYGGTT R: CCCAAAAACAACCCCAACTC	219
LIT1	F: TTTTGGTAGGATTTTTGTTGAGGAGT R: CCTCACACCCAACCAATACCTC	307
ZAC	F: GGGGTAGTYGTGTTTATAGTTTAGTA R: CRAACACCCAAACACCTACCCTA	152
PEG3	F: AAAAGGTATTAATTATTTATAGTTTGGT R: AAAAATATCCACCCTAAACTAATAA	322
SNRPN	F1: GTGTTGTGGGTTTTAGGGGTTTAG F2: AGGGAGTTGGGATTTTTGTATTG R1: CTCCCCAAACTATCTCTTAAAAAAAACC	240
非インプリント反復配列		
LINE-1	F: TTGAGTTGTGGTGGGTTTTATTTAG R: TCATCTCACTAAAAAATACCAAACA	413
Alu	F: GATCTTTTTATTTAAAAATATAAAAAATTAGT R: GATCCCCAACTAAAAATACAATAA	152

用された。これらの実験は二つ以上の異なる DNA サンプル(バイサルファイト処理)を用いて行われ、そして3回以上の独立したPCR実験により解析された。これらの解析方法は論文投稿した⁴⁾。測定した二つの比率データについては、二群の比率の差の検定(STATISTICA)により解析された。有意差検定(P値)は0.05とした。

●生活習慣等に関する記述式アンケート調査:身長、体重、月経歴、妊娠出産歴、授乳歴、経口避妊薬の使用、ホルモン補充療法、子宮内避妊具の使用、不妊歴、既往症、年収、学歴、喫煙歴など50項目に及ぶ記述式アンケートを施行した。

●食物摂取頻度調査票(FFQ)を用いた食品項目の摂取頻度調査

すでに再現性と妥当性について検証されているFFQを用いて、141の食品項目について摂取頻度を調査する。栄養素はエネルギー、たんぱく質、脂質、炭水化物、カルシウム、リン、鉄、ナトリウム、カリウム、レチノール、カロテン、ビタミンB1、ビタミンB2、ナイアシン、ビタミンCの摂取

量を残差法で補正した。

2.3 解析、評価

症例群と対照群で、生活習慣(食生活)とエピジェネティックな変異の関連について比例ハザードモデルにより解析を行い、ハザード比を算出。その際、交絡要因を補正することにより、その関連をより確実に検証。

3. 結果

3.1 ChIP-on-Chip システムによる解析

各病期で、連続3点で500bp以上の大きさで有意にメチル化の変化を受ける(P値8-16倍以上)429領域を同定した。この領域には、細胞周期に関連する遺伝子のプロモーター(P14, P16)やアポトーシスに関連する遺伝子、既知のインプリント制御領域(アレル特異的メチル化領域)、DNA修復遺伝子(14-3-3遺伝子)発現調節領域も含まれていた。そのうちインプリンティング遺伝子群は共通に有意な変異を示した。その他の遺伝子については、現在統計学的解析を行っている(図1)。

3. 2 インプリント遺伝子の解析

実際の患者についてインプリント遺伝子について DNA メチル化の解析を行った(図 2)。その結果、PEG1、PEG3 のインプリント遺伝子においては、症例群では有意にメチル化されていることが判明した($P < 0.01$)。この結果は Sequence 法でも同様であった。一方、H19、LIT1 のインプリント遺伝子に関して有意差は認められなかった。さらに、年齢、症状、重症度で比較したが、いずれも有意な差は認めなかった。

3. 3 本態性高血圧症の高危険因子の解析

本態性高血圧症の発症リスクに関する疫学研究を行う

場合、独立した因子を評価するためには、本態性高血圧症の発症に関わるその他の高危険因子で補正する必要がある。本研究では、症例群と対照群で発症に関与すると考えられる生活習慣、栄養素についてオッズ比を求めた。両群の平均年齢は症例 66.1 歳、対照群 69.5 歳であった。BMI に関しては、20.04 未満を 1.0 とすると、21.64 - 23.92、23.93 以上のオッズ比は 1.24、1.92 であり trend では統計学的に有意に増加していた($p = 0.01$)。喫煙歴に関しては、喫煙したことがある場合はない場合にくらべてオッズ比が 0.97 (97% 信頼区間 0.17-0.82) と高くなり統計学的に有意にリスクが上昇していた($p = 0.013$)。降圧剤の使用に関し

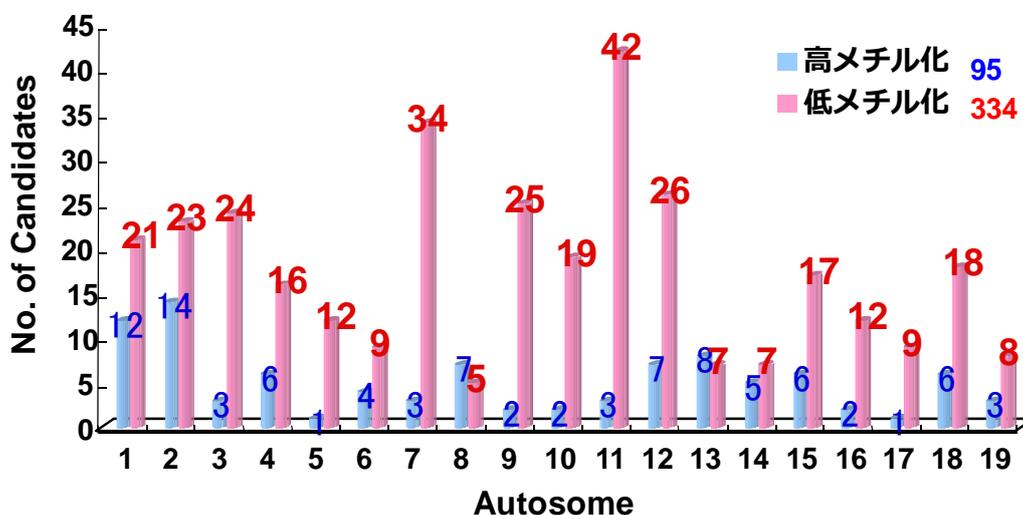


図 1. ChIP-on-Chip による網羅的メチル化の解析

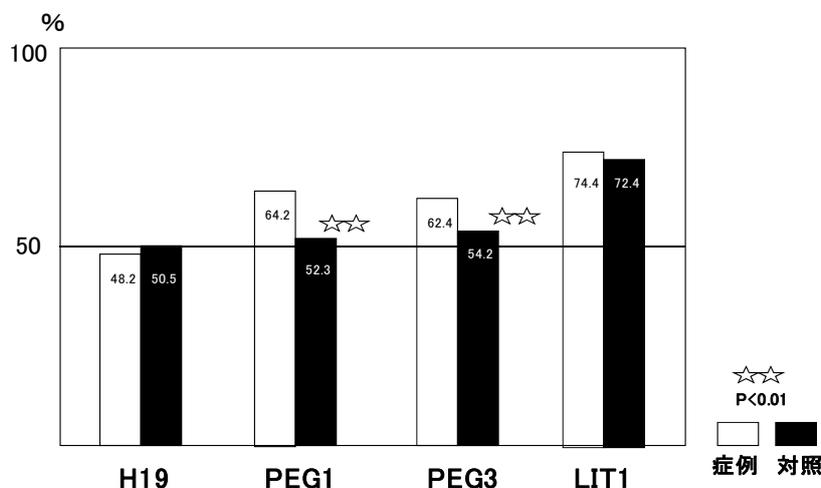


図 2. ヒトインプリント遺伝子のDNAメチル化の解析

ては、服用したことがある場合はない場合にくらべてオッズ比が0.16(95%信頼区間0.04-0.66)と低くなり、統計学的に有意にリスクが低下していた($p=0.01$)。独立した危険因子は高齢、喫煙とBMIが高いことであり、降圧剤の使用はリスクを低くすることが明らかになった。

3.4 栄養素との関連についての研究

食事との関連について、肉類・魚類・野菜・揚げ物・天ぷら摂取頻度項目について解析した。野菜摂取頻度の上昇によりリスクが低下した($p=0.062$)。しかし、摂取総カロリーやBMI、糖尿病などの交絡因子を考慮し解析すると有意差は消失した。一方、天ぷらの摂取頻度の上昇が危険率を高める傾向にあった。栄養素の解析ではレチノールおよびナイアシンの摂取量がリスク上昇と関連していた($P=0.012$, $P=0.028$)。統計学的有意差はなかったものの、ビタミンAの摂取量がリスクを上昇させる傾向にあり($P=$

0.064)、ビタミンCの摂取量はリスクを低下させる傾向にあった($P=0.065$)。飲料とリスクとの関連では、コーヒー摂取頻度と緑茶摂取頻度が高まるに従い、リスクは低下していた($P=0.002$, $P=0.009$) (表2)。

4. 考察

日本人における本態性高血圧症の罹患率は、年々増加してきている。我が国における本態性高血圧症の漸増の原因を探求する意味でも、病因を解明することは重要であり、本研究の結論が国民の生活、行政指導に有益な情報をもたらすものと考えられる。しかし本研究のような前方視的な研究にあっては、中途での解析は研究結果に影響する恐れがあるために解析を行ってはならないとされている。前述したように、現在のサンプルサイズでは十分な統計学的パワー(検出力)が得られないため、本態性高

表2. 食事摂取頻度との相関

Drinks and frequency of consumption	Case Number (%)	Control Number (%)	OR (95% CI)†	P for trend	OR (95% CI)‡	P for trend
Milk						
Few	31 (32.3)	41 (21.4)	1.0 (referent)	0.31	1.0 (referent)	0.89
1 to 6 cups/week	36 (37.5)	86 (44.8)	0.6 (0.3-1.0)		0.6 (0.3-1.2)	
1 cups/week or more-	29 (30.2)	65 (33.9)	0.5 (0.3-1.1)		0.6 (0.3-1.4)	
Lactic acid drink						
Few	29 (30.2)	84 (43.8)	1.0 (referent)	0.17	1.0 (referent)	0.31
1 to 2 cups/week	32 (33.3)	47 (24.5)	2.0 (1.1-3.8)		2.4 (1.1-5.1)	
3 to 6 cups/week or more-	35 (36.5)	61 (31.8)	1.6 (0.9-3.0)		1.9 (1.0-3.9)	
Coffee						
-3 to 4 cups/week	42 (43.8)	49 (25.5)	1.0 (referent)	0.002	1.0 (referent)	0.004
5 to 6 cups/week-1 cups/day	24 (25.0)	66 (34.4)	0.4 (0.2-0.8)		0.5 (0.3-1.1)	
2 to 3 cups/day or more-	30 (31.3)	77 (40.1)	0.5 (0.2-0.8)		0.4 (0.2-0.8)	
Green tea						
-5 to 6 cups/week	35 (36.5)	54 (28.1)	1.0 (referent)	0.009	1.0 (referent)	0.001
1 to 3 cups/day	43 (44.5)	88 (45.8)	0.7 (0.4-1.3)		0.5 (0.3-0.9)	
4 cups/day or more-	18 (18.8)	50 (26.0)	0.4 (0.2-0.9)		0.3 (0.1-0.7)	
Tea						
Few	48 (50.0)	61 (31.8)	1.0 (referent)	0.04	1.0 (referent)	0.08
1 to 2 cups/week	25 (26.0)	70 (36.5)	0.5 (0.3-0.8)		0.6 (0.3-1.1)	
3 to 6 cups/week or more-	23 (24.0)	61 (31.8)	0.4 (0.2-0.9)		0.4 (0.2-0.9)	
Oolong tea						
Few	31 (32.3)	67 (34.9)	1.0 (referent)		1.0 (referent)	
1 to 4 cups/week	43 (44.8)	71 (37.0)	1.3 (0.7-2.2)		1.4 (0.7-2.6)	
5 to 6 cups/week or more-	22 (22.9)	54 (28.1)	0.9 (0.4-1.6)	0.81	0.5 (0.2-1.1)	0.13

† Adjusted for total calory (continuous variables).

‡ Adjusted for total calory (continuous variables), BMI in kg/m^2 ($24.9 \geq$, $25.0 \leq$, or unknown), and diabetes mellitus (sbsebce, presence).

血圧症の病因について結論を導き出すことはできず、結論は今後さらに詳細な解析を行った後に報告する。

本研究をすすめるのと同時に、栄養素や生活習慣に関する本態性高血圧症の高危険因子の抽出を行った。本態性高血圧症の高危険因子としては、肥満、高齢、喫煙が抽出されたが、これらはこれまでの報告を裏付けるものであった。

栄養素との関連ではレチノールの摂取がリスクを上昇させ、ナイアシンの摂取がリスクを低下させることが多変量解析の結果から証明された。これらの生物学的意義については今後検証していく必要があると思われる。飲料と本態性高血圧症との関連については興味深い結果が得られた。コーヒーの摂取はリスクも低下させることが明らかになった。コーヒーは豆類がもとになっており、このことがリスクを低下させる要因となっているのかもしれない。緑茶については、他の症例対照研究でも発症のリスクを低下させることがいわれているが、より信頼性の高いコホート研究では有意な差は認められていないため、結論を出すにはより慎重な解析が必要と思われる。

これまで報告された文献によるエビデンスの検討では、疫学研究は極めて乏しいことがわかった。有機塩素系化合物に関しても同様に十分な知見とはいえなかった。今後我が国で、増加することが予想される本態性高血圧症の病態解明は重要であり、その成果は国民の生活、行政

指導に有益な情報をもたらすものと考えられる。

5. 結 語

本態性高血圧症の予防となる生活習慣や食品栄養に注意を払い、また今後、有効かつ安全な効果的な治療の確立により、早期に治療し、その後の質の高い豊かな生活を安心して送れるようになることを期待します。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただいたソルト財団に深く深謝申し上げます。

文 献

1. Paulsen, M. and Ferguson-Smith, A.C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol*, 195, 97-110, 2001.
2. Milner JA. Nutrition in the 'omics' era. *Forum Nutr*. 60, 1-24. Review 2007.
3. Cobiac L. Epigenomics and nutrition. *Forum Nutr*. 60, 31-41. 2007.
4. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Mol. Genet*. 16. 2542-51. 2007.

No. 0829

A Systematic Epigenetic Analysis on ChIP-on-Chip Method in the Cause of Salt Sensitivity High Blood Pressure and Case-Control Study about the Risk Factor

Takahiro Arima MD, PhD

Innovation of New Biomedical Engineering Center, University of Tohoku

Summary

(1) An epigenetic analysis using the hereditary salt sensitivity mouse.

An SHR mouse is a hereditary salt sensitivity hypertension mouse and develops systemic high blood pressure / cardiac hypertrophy by a high salt loading intake, become a good animal model of the heart failure onset mechanism. Therefore we analyzed a change of the DNA methylation with the SHR mouse myocardium of each stage of a disease. We applied the whole genome tiling array the ChIP-on-Chip system of the mouse DNA of high salt loading before and after. We analyzed profiling of the methylation as biochemical character and identified about 400 domains, which changed the methylation status. These domains were included cell cycle-related genes, apoptosis genes, genomic imprinted genes and cancer-restraining gene.

(2) DNA methylation in the patients of essential hypertension and their epidemiology.

① We analyzed the DNA methylation about several imprinted genes in the DNA of the patients (58 cases) and their contrast (123 cases). As a result, PEG1, PEG3 genes were significantly changed the methylation status between two groups (P 0.01).

② The high risk factor

By case-control study technique, I used a description for 50 items-type questionnaire about environmental factors and food intake frequency questionnaire about 141 food items. The independent high risk factor were smoking and BMI. The intake frequency of the tempura the retinol were related with an onset risk. On the other hand, the lower risk factor was coffee and green tea intake frequency.

The prevalence of the essential hypertension in the Japanese increases year by year. It is important that even a meaning to search the cause of the gradual increase of the essential hypertension in our country elucidates etiology, and it is thought that the conclusion of this study brings useful information for the life of the nation, administrative advice. However, we could not a conclusion about etiology of the essential hypertension because enough statistical power (the detection power) is not enough. We will analyse it more detailed in future.