

岩手医科大学審査学位論文の要旨(博士)

Epigenome-wide association study identifies a novel DNA methylation in patients with severe aortic valve stenosis

(大動脈弁狭窄症における新規 DNA メチル化マーカーの探索)

(那須崇人, 佐藤衛, 大桃秀樹, 小野加奈子, 清水厚志, 高橋祐司, 大崎拓也, 森野禎浩, 祖父江憲治, 佐々木真理)

(Circulation: Genomic and Precision Medicine 13 巻, 1 号, 令和 2 年 1 月掲載)

I. 研究目的

研究への参加の同意を得た大動脈弁狭窄症(AS)群および対照群の末梢血単核細胞 (PBMC) を対象とし, AS 特異的 DNA メチル化異常をエピゲノムワイド関連解析(EWAS)により同定し, さらに, パイロシーケンス法により検証する. さらに, 候補 DNA メチル化部位をコードする遺伝子群の発現解析を行い, AS でのエピゲノム制御異常を明らかにする.

II. 研究対象ならび方法

1. 対 象

- Discovery study: 研究への参加同意を得られた手術適応を有す AS 群 44 例および年齢・性差がマッチしたいわて東北メディカルメガバンク (IMM) 参加者 44 例を対照群とした.
- Replication study: Discovery study とは異なる手術適応を有す AS 群 50 例および年齢・性差がマッチした IMM 参加者 50 例を対照群とした.

2. PBMC の分離: 末梢血液より Ficoll 密度勾配遠心分離を用いて分離保存する.

3. Discovery study: PBMC より Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega)を用いてゲノム DNA を分離した. ゲノム DNA をバイサルファイト処理 (EZ-96 DNA Methylation Kit) し, SureSelect^{XT} (Agilent) と HiSeq2500 (Illumin) を用いた capture 法にて DNA メチル化を網羅的に測定し, Bonferroni method にて候補 DNA メチル化部位を検索する.

4. Validation study : Pyromark PCR Kit and Pyromark Gold Q24 Reagents (Qiagen)を用いて pyrosequencing analysis により上記候補部位の DNA メチル化解析を行い, AS 特異的 DNA メチル化部位を同定する.
5. Replication study : pyrosequencing analysis にて AS 特異的 DNA メチル化部位を検証する.
6. mRNA 発現解析 : real-time PCR を施行し, AS 特異的 DNA メチル化遺伝子の mRNA の発現を定量化する.
7. Follow-up study : Discovery study の AS 群では, 術後 12 ヶ月後の PBMC での AS 特異的 DNA メチル化および mRNA 発現を解析し, 術前の結果と比較検討する.

III. 研究結果

Discovery study : AS群での1箇所のCpG部位(chromosome 8:position 126448033)で対照群と比較し有意に脱メチル化を認めた(chromosome 8:position 126448033: β value 0.46 vs. 0.83, $P = 6.63 \times 10^{-9}$, AS vs. controls, respectively). Chromosome 8 position 126448033 は, tribbles homolog 1 (TRIB1) 遺伝子をコードするCpG部位であった.

Validation study : 上記1つの候補CpG部位のうち, Chromosome 8 position 126448033は, AS群で対照群と比較し有意に脱メチル化を認めた(β -value 0.61 vs. 0.75, $P = 1.51 \times 10^{-6}$).

Replication study : Chromosome 8 position 126448033ではValidation studyと同様に, AS群で対照群と比較し有意に脱メチル化を認めた(β -value 0.83 vs. 0.46, $P = 2.23 \times 10^{-9}$).

外科治療前後での比較 : Chromosome 8 position 126448033のメチル化は, 外科治療1年後に有意に増加した. すなわち, DNAメチル化を認めた(β -value : 0.62 ± 0.17 vs. 0.69 ± 0.17 , $P < 0.01$).

mRNA発現解析 : AS群でのTRIB1 mRNAの発現は, 対照群と比較し有意に高値であった(3.27 ± 2.56 vs. 1.00 ± 0.85 , $P < 0.01$). 外科的治療1年後には, TRIB1 mRNAの発現は, 有意に減少した(3.27 ± 2.56 vs. 1.39 ± 1.43 , $P < 0.01$).

IV. 考察

本研究はAS発症機序に特定の遺伝子のメチル化率が関係しているかを調べる研究である。過去にTRIB1遺伝子とASの関連は報告がなく、全くの新しい知見であった。TRIB1遺伝子のメチル化率が低下しているが、この遺伝子は過去に脂質代謝に関連していると報告されている。脂質代謝とASの関連は過去に報告があり、AS発症・進行の機序として新規の知見が今回発見された。本研究ではさらにAS治療後にメチル化率が上昇していることからASの結果、TRIB1遺伝子の脱メチル化が起こっている可能性が示唆され、今後の治療効果判定に有用であると考えられた。

V. 結 語

TRIB1 遺伝子の DNA メチル化異常は、AS の発症に関連する可能性が示唆された。また、TRIB1 遺伝子の DNA メチル化および TRIB1 mRNA の発現の変化は、AS の治療効果および予後の評価に有用である可能性が示唆された。