

授与番号	甲第 1815 号
------	-----------

論文内容の要旨

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, 2020 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

MethylationT 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 2 箇所の CpG 部位 (chromosome 5 position 2928021 および 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 5 position 2928021: β value 0.57 vs. 0.92, $P = 1.16 \times 10^{-9}$; 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。一方、Chromosome 5 position 2928021 は非コード領域の CpG 部位であった。

Validation study : 上記 2 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, $P = 1.51 \times 10^{-6}$)。一方、Chromosome 5 position 2928021 は両群間で有意差を認めなかった ($p = 0.24$)。

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, $P = 2.23 \times 10^{-9}$)。chromosome 5 position 2928021 のメチル化は、両群間で有意差を認めなかった ($p = 0.31$)。

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. 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。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 松本 主之 (内科学講座：消化器内科消化管分野)

副査 准教授 房崎 哲也 (内科学講座：循環器内科分野)

副査 准教授 田代 敦 (臨床検査医学講座)

大動脈弁狭窄 (AS) は頻度の高い弁膜性疾患の一つである。本研究の目的は、エピゲノムワイド関連研究 (EWAS) を用いて AS の疾患特異的 DNA メチル化を検索することである。先行研究として、44 例の重症 AS 症例を対象に治療前および術後 12 ヶ月後に末梢血白血球 (PBMC) を採取した。年齢・性を一致させた東北メディカルメガバンク (TMM) 登録例 44 例を対照として DNA メチル化シークエンス法による EWAS を施行し候補メチル化領域を検索した。さらに、それらの候補遺伝子領域についてパイロシークエンス法を用いて CpG 領域を確認した。次に、AS50 例および年齢・性を一致させた TMM の対照 50 例を用いて再現試験を行った。先行研究の EWAS では、AS 群で第 5 染色体 2928021 と第 8 染色体 126448033 の脱メチル化が確認された。パイロシークエンス法では、AS 群で第 8 染色体 126448033 が対照よりも高率に脱メチル化を受け、同領域は *TRIB1* 遺伝子に位置することが確認された。PBMC における *TRIB1* 遺伝子の mRNA 発現は AS 群で対照群よりも有意に高かった。AS における同領域の低メチル化は再現試験でも確認された。さらに、AS 群では治療 12 月後に第 8 染色体 126448033 の DNA 脱メチル化が有意に改善し、*TRIB1* 遺伝子 mRNA 発現が有意に低下していた。以上の結果から *TRIB1* 遺伝子の脱メチル化が AS の病態に関与すること、および同遺伝子の脱メチル化改善が AS の外科的治療の指標となる可能性が示唆された。

試験・試問の結果の要旨

AS の病態、遺伝子メチル化の解析法とその解釈、本研究の結果の解釈、臨床における本研究結果の意義について試問を行い、適切な回答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。

参考論文

- 1) Expression of miR-23a induces telomere shortening and is associated with poor clinical outcomes in patients with coronary artery disease

冠動脈疾患患者では miR-23a 発現がテロメア短縮を惹起し臨床的予後不良因子となる (佐藤 衛 他 5 名と共著)

Clinical Science, 131 巻, 13 July (2017): p2007-2017.

- 2) Thrombospondin-1 contributes to slower aortic aneurysm growth by inhibiting maladaptive remodeling of extracellular matrix .

トロンボスポンジン 1 は細胞外マトリックスの不適合リモデリング抑制を介して大動脈瘤増大を抑制する

(佐藤 衛 他 2 名と共著)

Clinical Science, 131 巻, 7 June (2017): p1283-1285.