

S13-3

# 生活習慣病発症における ゲノム・エピゲノムの 統合的理解

竹内史比古

国立国際医療研究センター(NCGM)

<http://www.fumihiko.takeuchi.name>

2018年5月25日

日本糖尿病学会年次学術集会 @JPタワー



# 日本糖尿病学会 COI 開示

発表者名：竹内史比古

演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある  
企業などはありません。

1. エピゲノムワイド関連解析(EWAS)
2. CpGメチル化は疾患の原因か結果か
3. 喫煙・飲酒によるEWASの交絡
4. 末梢血でメチル化を調べるだけでよいのか

# ゲノムワイド関連解析の成功と限界

## • 成功

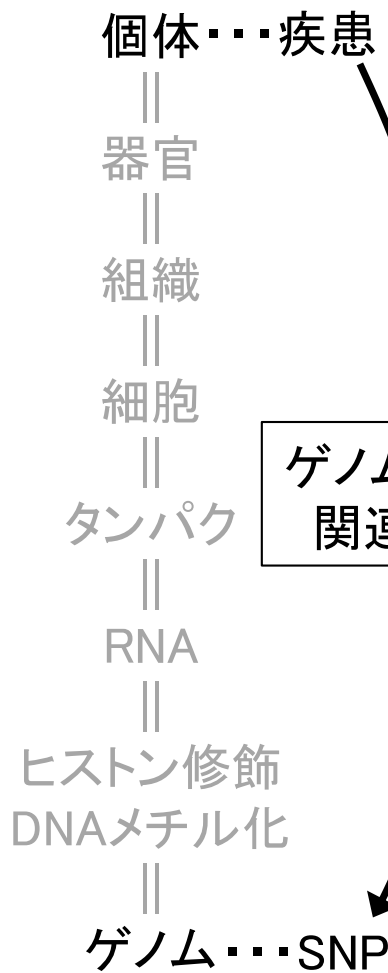
- ゲノムワイド関連解析(GWAS)では、多数の罹患者と健常者についてSNPsをゲノム全体に渡って測定し、両群で有意に頻度が異なるSNPsを探索する。
- これまでに数百の疾患や形質についてGWASが行われ、万以上のSNPsとの関連が同定された。

## • 限界

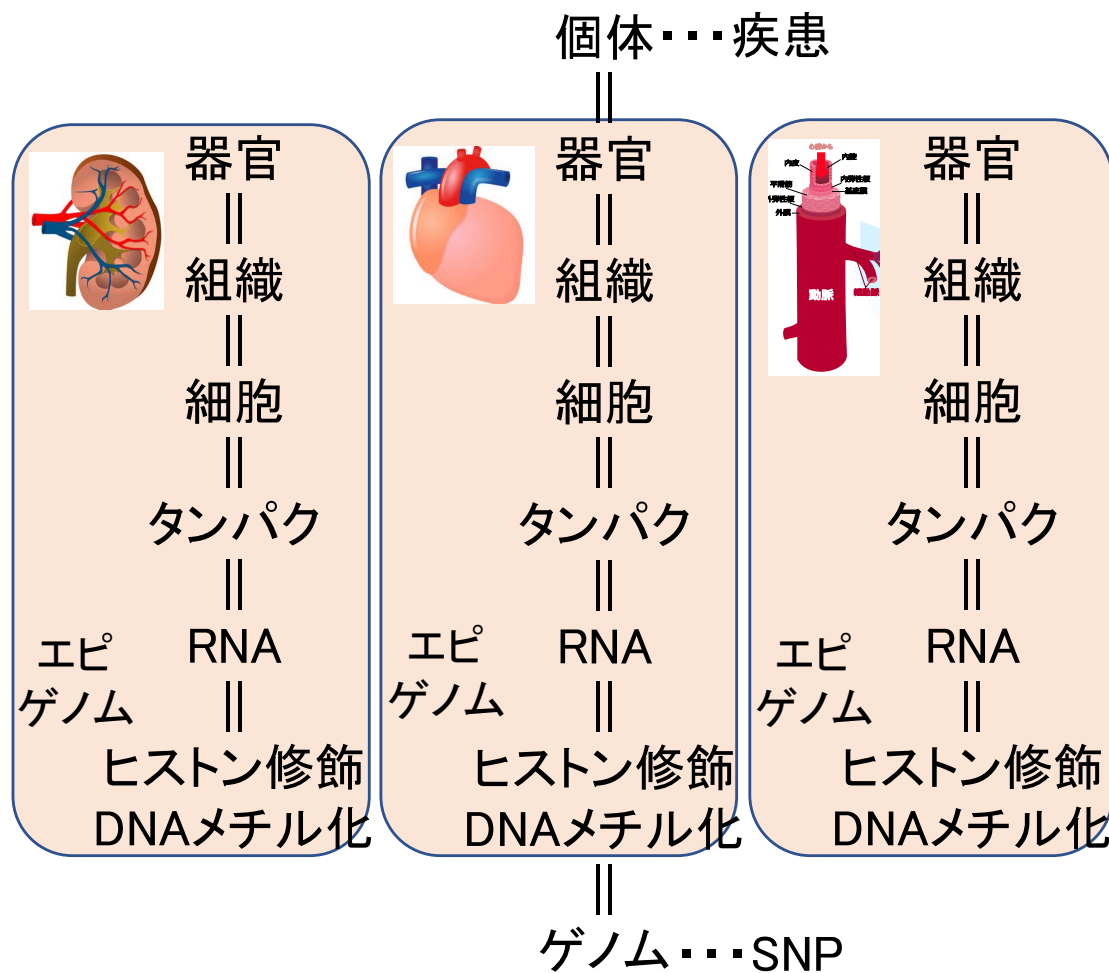
- 互いに連鎖不平衡にある複数の疾患関連SNPsが同定されることが多い。その染色体領域に、複数の遺伝子があるときは、どれが疾患感受性遺伝子か絞り込めない。
- 疾患感受性遺伝子が、**どの組織？ どのような機能？**で働くかの解明は、post-GWAS解析が必要。

GWASで解明  
できたこと

Post-GWASで解析  
どの組織？ どのような機能？



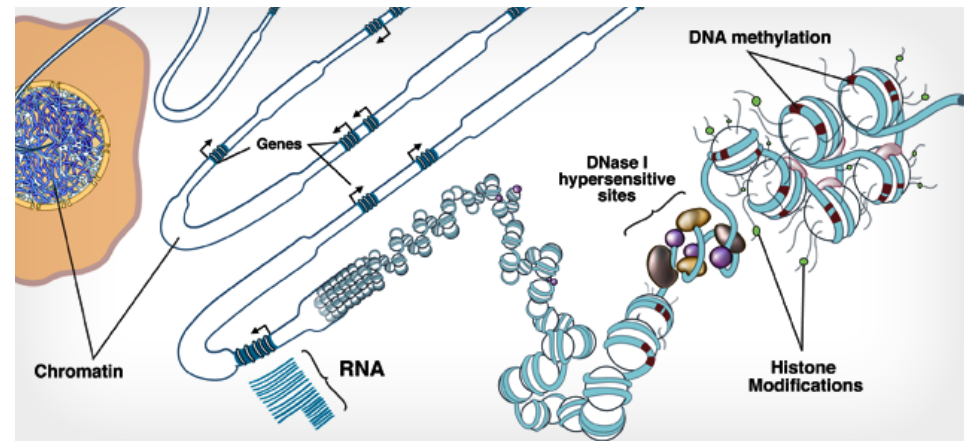
ゲノムワイド  
関連解析



エピゲノム  
解析

# エピゲノム解析

- エピジェネティックな現象
  - DNA塩基配列の変化によらず、染色体の変化から生じる、細胞分裂を超えて安定的に継承される現象
  - 発現機構は、DNAやヒストンの化学修飾、非コードRNA、クロマチンの高次構造
  - 形質発現は、発生・分化、リプログラミング、X染色体不活性化、ゲノムインプリンティング、老化など
  - 生活習慣病についてもエピジェネティックな遺伝子発現制御の関与が示唆されている
- 組織差を調べる
  - NIH Roadmap Epigenome Consortium [Nature (2015) 518:317]
  - 様々なエピゲノム測定
  - **111もの組織・細胞株**
  - 組織毎のサンプル数は小さく、**個人差は調べていない**



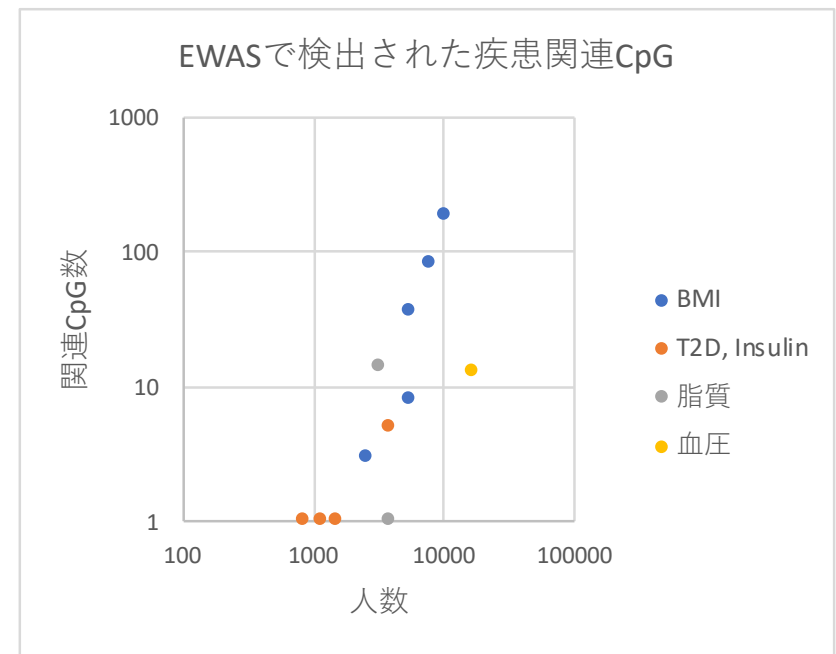
# エピゲノムワイド関連解析 (EWAS)

- GWASと似た発想。多数の罹患者と健常者についてCpGメチル化をゲノム全体に渡って測定し、両群で有意にメチル化率が異なるCpGを探索する。
- EWASでいま簡便・現実的なのは
  - CpGメチル化のマイクロアレイによる測定
    - 450 K CpGを測定 → 多重検定補正した有意水準は  $P < 10^{-7}$
    - 全CpG (28 M)のうちの数%だけで、網羅していない
  - 末梢血を用いることが多い
    - 疾患発症で適切な時期・組織ではなく、代用

# 生活習慣病のエピゲノムワイド関連解析

- BMI, T2D, 脂質, 血圧それぞれと関連するCpGメチル化が数個～数百個報告されている

疾患	論文	人数	CpG数
BMI	Lancet (2014) 383:1990	2607	3
BMI	Obesity (2015) 23:1493	5465	8
BMI	Hum Mol Genet (2015) 24:4464	5465	37
BMI	PLoS Med (2017) 14:e1002215	7798	83
BMI	Nature (2017) 541:81	10261	187
T2D	Diabetologia (2015) 59:130	1515	1
T2D	Lancet Diab End (2015) 3:526	3805	5
T2D	Hum Mol Genet (2016) 25:609	1167	1
Insulin	Diabetes (2014) 63:801	837	1
脂質	Circulation (2014) 130:565	3837	1
脂質	Hum Mol Genet (2016) 25:4556	3187	14
血圧	Am J Hum Genet (2017) 101:888	17010	13



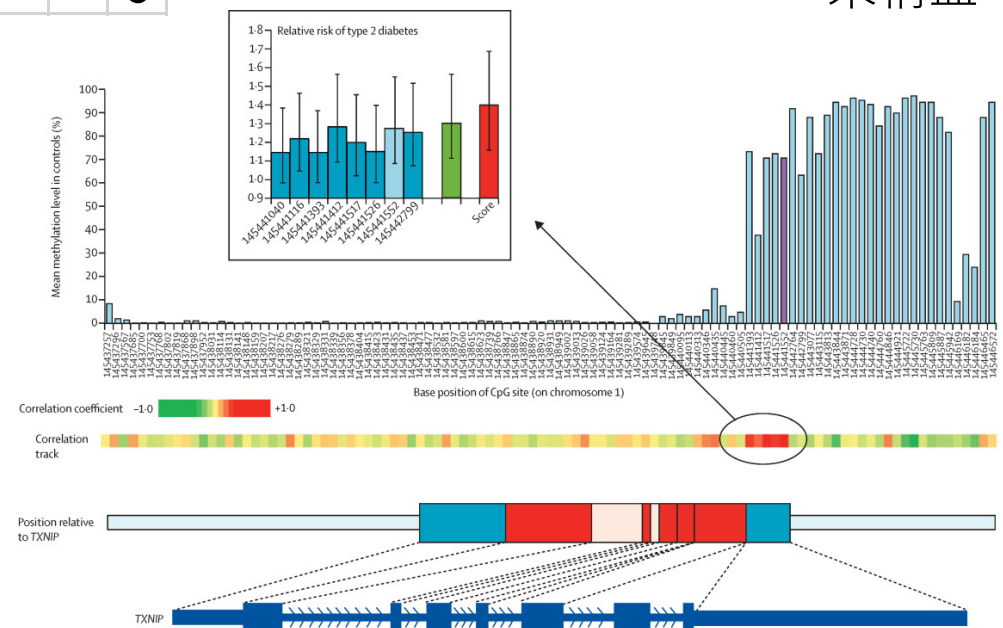


# 糖尿病のエピゲノムワイド関連解析

疾患	論文	人数	CpG数	TXNIP	SREBF1	PHOSPHO1	SOCS3	ABCG1
				cg19693031	cg11024682	cg02650017	cg18181703	cg06500161
T2D	Diabetologia (2015) 59:130	1515	1	●				
T2D	Lancet Diab End (2015) 3:526	3805	5	●	●	●	●	●
T2D	Hum Mol Genet (2016) 25:609	1167	1	●				
Insulin	Diabetes (2014) 63:801	837	1					●

- よく再現されている関連は、  
cg19693031 (TXNIP 3'-UTR)メチル化↓  
T2D↑ 空腹時血糖↑ HbA<sub>1c</sub>↑
- thioredoxin interacting protein  
は糖代謝への関与が知られている

Lancet Diab End (2015) 3:526  
末梢血



# 小括

- エピゲノムワイド関連解析では、疾患と関連するCpGを、ゲノム全体に渡って探索する。
- 関連CpGは、BMIについては数百個、T2D, 脂質, 血圧については十前後報告されている。

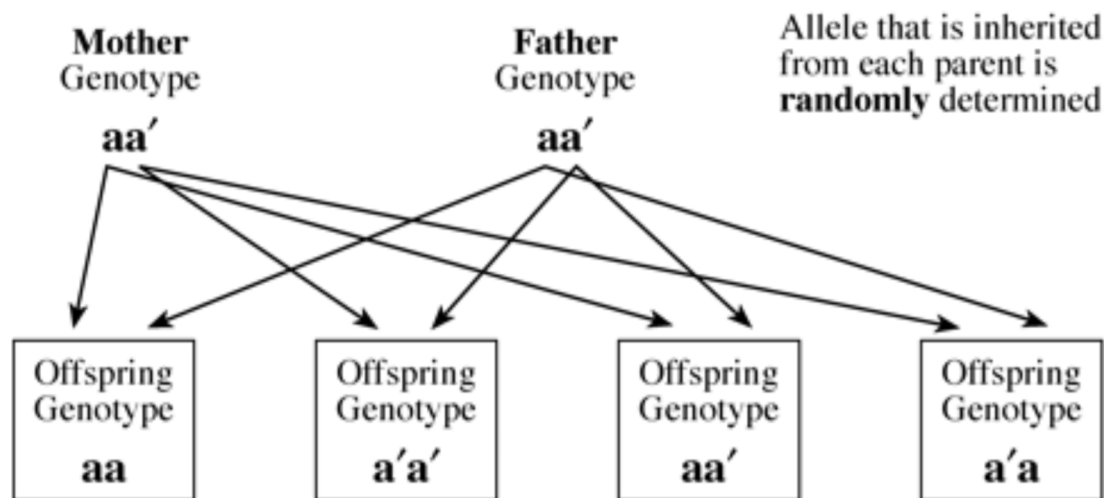
1. エピゲノムワイド関連解析(EWAS)
2. CpGメチル化は疾患の原因か結果か
3. 喫煙・飲酒によるEWASの交絡
4. 末梢血でメチル化を調べるだけでよいのか

# CpGメチル化と疾患の因果関係

- 疾患関連CpGについて、疾患との因果関係を知りたい
  - 原因なら、発症機序解明・治療開発につながる
  - 結果なら、バイオマーカー開発につながる
  - 原因かつ結果という可能性もある
- 因果関係の解明
  - ランダム化比較試験により、「薬→疾患」の関係が解明できる
  - メンデル無作為化法(Mendelian Randomization)により「暴露→疾患」の関係が解明できる

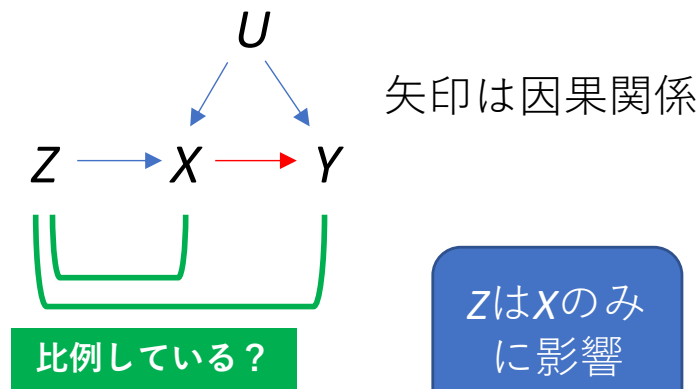
# メンデル無作為化法 (1/2)

- 注目している「**暴露**」のみに**影響する** SNPを選ぶ
- SNPの遺伝子型で、個々人をランダム割り付けできる
  - 子が親から受け継ぐアレルはランダム
  - 個々人の遺伝子型は、集団でのアレル頻度のもとでランダム
  - ランダムなので、生活習慣・健康状態・環境などの「**交絡因子**」に**影響されない**！



# メンデル無作為化法 (2/2)

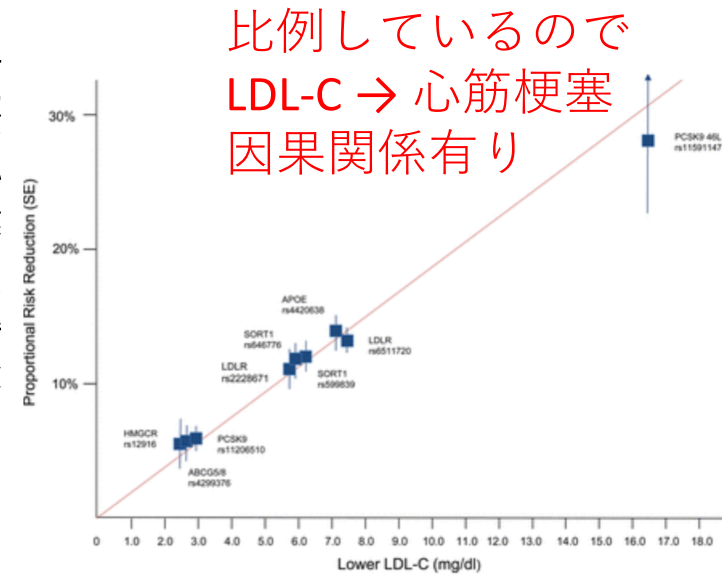
	ランダム化変数 Z	検証したい原因 X	結果 Y
ランダム化比較試験	割り付け	薬の服用	疾患
メンデル無作為化法の例	LDL-C代謝遺伝子のSNP	血中LDL-C (暴露)	心筋梗塞 (疾患)



$$\begin{aligned}
 XからYへの効果 &= \frac{ZからYへの効果}{ZからXへの効果} \\
 &= \frac{ZとYの関連}{ZとXの関連}
 \end{aligned}$$

Zは他に影響されない

SNPの心筋梗塞減少効果



SNP Zが複数あると精度が上がる

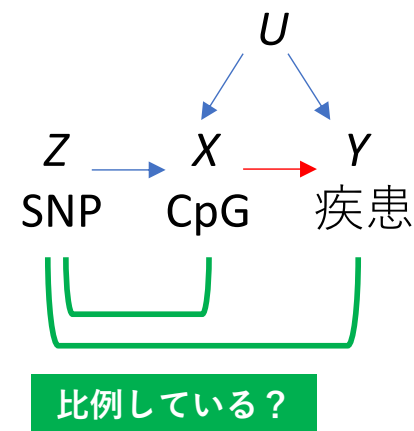
# CpGメチル化の疾患への効果

着目している特定のCpGについて

ランダム化変数 $Z$	検証したい原因 $X$	結果 $Y$
対象組織で、CpGメチル化に影響するSNP	CpGのメチル化	疾患

用いるSNPs  $Z$ の要件

- CpGメチル化以外を経由して、疾患に影響しない
  - 多少なら統計的補正できる。  
それには多くのSNPsが必要
- SNPsは互いに独立している

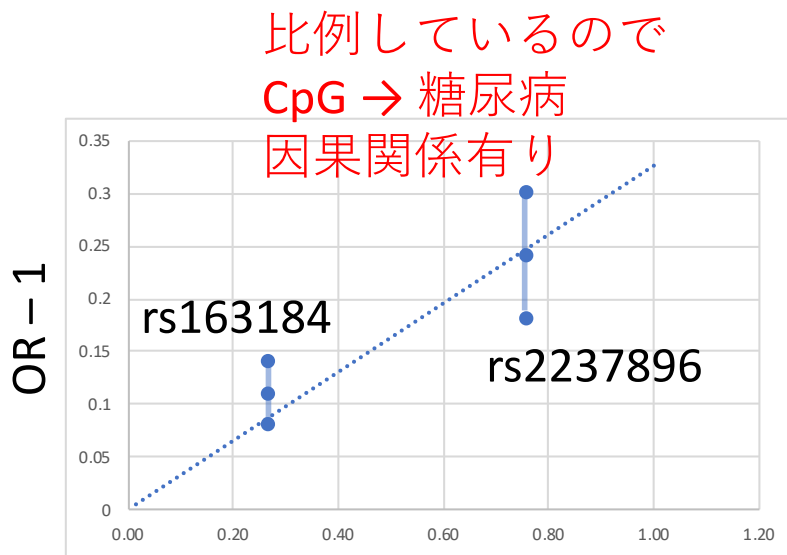


$$\text{CpGメチル化の疾患への効果} = \frac{\text{SNPと疾患の関連}}{\text{SNPとCpGメチル化の関連}}$$

# KCNQ1のCpGが糖尿病に影響

ランダム化変数 $Z$	検証したい原因 $X$	結果 $Y$
CpGメチル化に影響する SNPs rs163184, rs2237896	CpG cg14637411 ( <i>KCNQ1</i> , intron) のメチル化	2型糖尿病

SNPの糖尿病増悪効果



SNPのcg14637411低メチル化効果

Diabetes (2017) 66:1713

- CpGメチル化は、健常な青年の末梢血で測定
  - 疾患の影響は受けない
  - 疾患発症組織の代用
- SNPの糖尿病関連はDIAGRAM GWAS (26488 cases, 83964 controls)
- 2型糖尿病患者と健常者では、脂肪組織と膵島で*KCNQ1*のメチル化が異なることが知られている



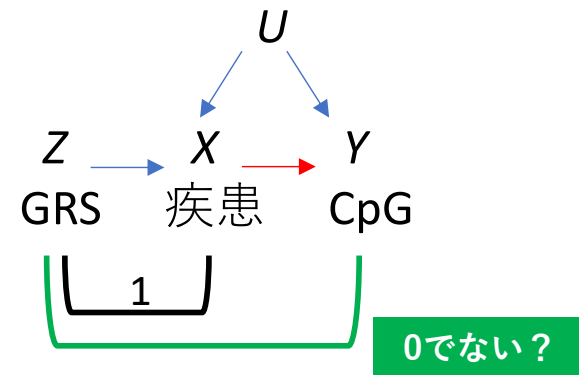
# 疾患のCpGメチル化への効果

着目している特定のCpGについて

ランダム化変数 Z	検証したい原因 X	結果 Y
疾患関連SNPsで作った 遺伝的リスクスコア (GRS)	疾患	CpGのメチル化

## GRSに用いるSNPs

- ゲノムワイド関連解析で同定されたもの
- 弱い効果のSNPsが多数
- CpGと単独で相関するSNPは除外
- 多面的な効果は少しある
  - 統計的補正も可能



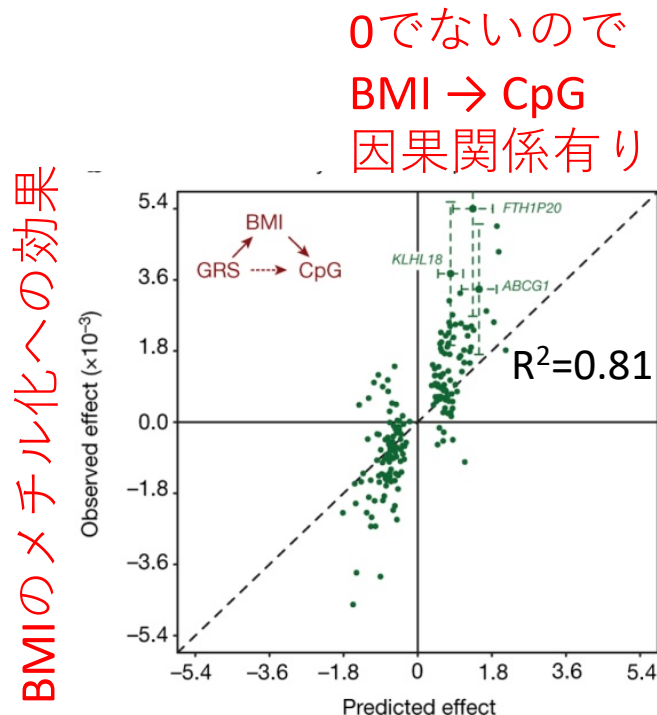
疾患のCpGメチル化への効果

=  $\frac{\text{GRSとCpGメチル化の関連}}{\text{GRSと疾患の関連}}$

=  $\text{GRSとCpGメチル化の関連}$  ← 1になるようGRSはスケールされている

# BMIと（末梢血で）関連するCpGの多くは、BMIに影響されている

ランダム化変数 $Z$	検証したい原因 $X$	結果 $Y$
BMIに関連する29 SNPsで作った遺伝的リスクスコア(GRS)	BMI	EWASでBMIと関連したCpG 187箇所（個々に検討）



BMIとメチル化の関連

- 3つのCpGにおいて、**BMIのメチル化への効果**が統計的有意
- （有意水準に達しなかったのも含め）**CpGは全般的にBMIに影響される傾向**があった
  - (y軸: BMIのメチル化への効果)  
α (x軸: BMIとメチル化の関連)

# 小括

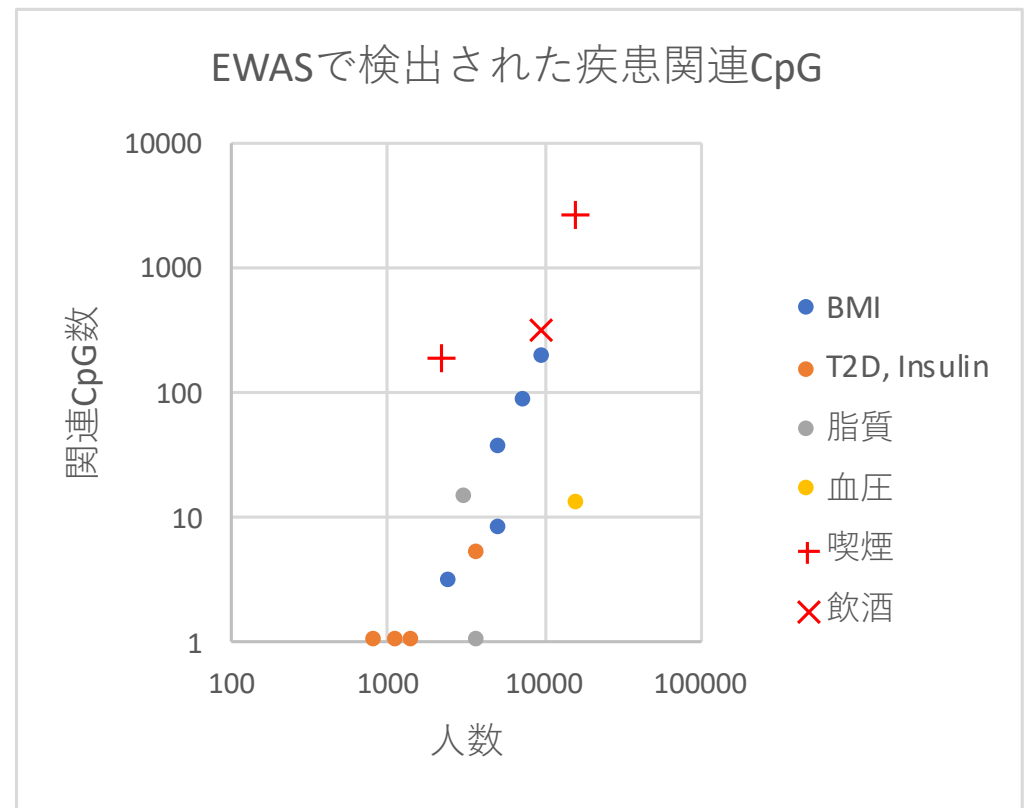
- メンデル無作為化法によりCpGメチル化と疾患の因果関係を統計的に推定できる
- 「CpGメチル化→疾患」は少ない
  - BMI 1/187
  - 血圧 1/13
- 「疾患→CpGメチル化」は多い
  - BMI 3/187が有意。全般的に傾向あり
  - 血圧 3/13
- しかし、これらは測定法のせいかもしれない
  - 手っ取り早く末梢血で測定しているが、本来は疾患該当組織で、疾患が発生する時期に測るべき

1. エピゲノムワイド関連解析(EWAS)
2. CpGメチル化は疾患の原因か結果か
3. 喫煙・飲酒によるEWASの交絡
4. 末梢血でメチル化を調べるだけでよいのか

# 喫煙・飲酒のエピゲノムワイド関連解析

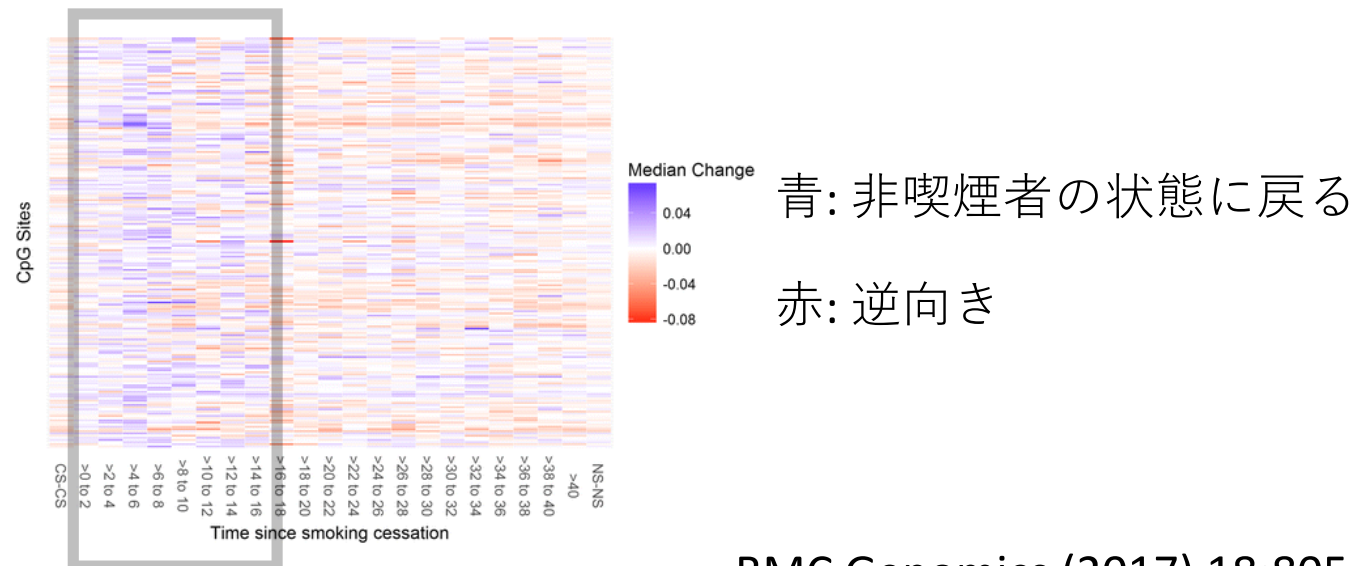
- 喫煙・飲酒とは多くのCpGが関連する
  - 喫煙と関連するCpG数は、生活習慣病の約10倍

疾患	論文	人数	CpG数
BMI	Lancet (2014) 383:1990	2607	3
BMI	Obesity (2015) 23:1493	5465	8
BMI	Hum Mol Genet (2015) 24:4464	5465	37
BMI	PLoS Med (2017) 14:e1002215	7798	83
BMI	Nature (2017) 541:81	10261	187
T2D	Diabetologia (2015) 59:130	1515	1
T2D	Lancet Diab End (2015) 3:526	3805	5
T2D	Hum Mol Genet (2016) 25:609	1167	1
Insulin	Diabetes (2014) 63:801	837	1
脂質	Circulation (2014) 130:565	3837	1
脂質	Hum Mol Genet (2016) 25:4556	3187	14
血圧	Am J Hum Genet (2017) 101:888	17010	13
喫煙	PLoS ONE (2013) 8:e63812	2272	187
喫煙	Circ Cardiovasc Genet (2016) 9:436	15907	2623
飲酒	Mol Psych (2018) 23:422	9643	328



# 禁煙とCpGメチル化

- 喫煙により、CpGメチル化は大きく変動
- 禁煙により、非喫煙者の状態に20年かけて戻っていく (52 CpGが有意。N=1344名)
- 禁煙者のエピゲノムは禁煙期間に依存
  - [喫煙, 禁煙, 非喫煙]のカテゴリによる統計的補正はエピゲノムワイド関連解析では不十分かもしれない



禁煙後0-16年

BMC Genomics (2017) 18:805

# エピゲノムワイド関連解析への喫煙・飲酒の交絡

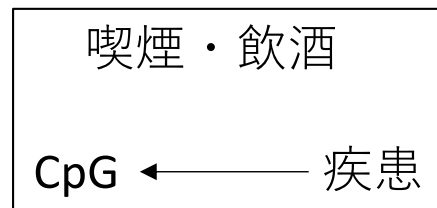
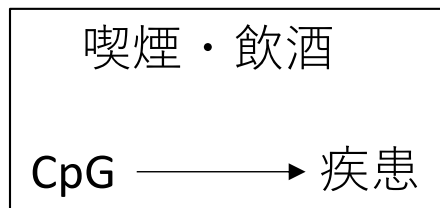
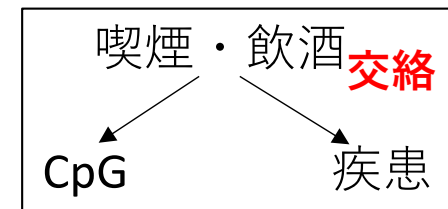
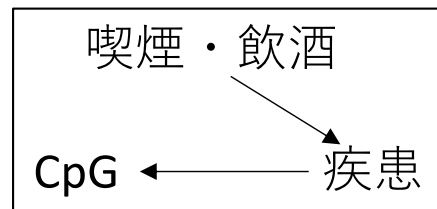
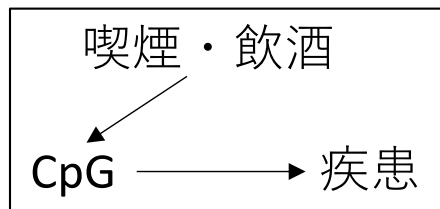
- 生活習慣病のEWASで報告された関連CpGの一部は、喫煙・飲酒EWASのものと同重複する
- 喫煙・飲酒が交絡因子になっている可能性もある

疾患	論文	人数	CpG数	喫煙と重複	飲酒と重複
BMI	Lancet (2014) 383:1990	2607	3		
BMI	Obesity (2015) 23:1493	5465	8		
BMI	Hum Mol Genet (2015) 24:4464	5465	37		
BMI	PLoS Med (2017) 14:e1002215	7798	83		
BMI	Nature (2017) 541:81	10261	187	22	10
T2D	Diabetologia (2015) 59:130	1515	1	0	1
T2D	Lancet Diab End (2015) 3:526	3805	5	1	1
T2D	Hum Mol Genet (2016) 25:609	1167	1	0	1
Insulin	Diabetes (2014) 63:801	837	1	0	0
脂質	Circulation (2014) 130:565	3837	1		
脂質	Hum Mol Genet (2016) 25:4556	3187	14	0	0
血圧	Am J Hum Genet (2017) 101:888	17010	13	1	7
喫煙	PLoS ONE (2013) 8:e63812	2272	187		
喫煙	Circ Cardiovasc Genet (2016) 9:436	15907	2623		
飲酒	Mol Psych (2018) 23:422	9643	328		

# 小括

- 喫煙・飲酒とは多くのCpGが関連する
- 生活習慣病のEWASで報告された関連CpGの一部は、喫煙・飲酒による交絡の可能性はある
- このためにも、メンデル無作為化法による検証は有用

いずれの場合も、EWASでCpGと疾患の関連が検出されてしまう





1. エピゲノムワイド関連解析(EWAS)
2. CpGメチル化は疾患の原因か結果か
3. 喫煙・飲酒によるEWASの交絡
4. 末梢血でメチル化を調べるだけでよいのか

# CpGメチル化の組織による異同

- エピゲノムワイド関連解析は簡便に採取できる末梢血で行われている
- 疾患発生の該当臓器・タイミングを反映しているか？
- 小規模ながらmeQTL (SNPとCpGメチル化の相関) の組織共通性が報告されている
  - 末梢血 vs 他は8~51%
- 複数の組織でEWASを行うのは大変
- 参照できるような標準データセットが望まれる
  - 遺伝子発現におけるGTEx [Nature (2017) 550:204] のように

Number of meQTLs detected in each dataset and the number and percent overlapping between datasets, in the form number (percent)

	# of	PB	CB A	CB B	FCTX	TCTX	CRBLM	PONS
<b>Cohort</b>	<b>meQTLs</b>	<b>724</b>	<b>629</b>	<b>2055</b>	<b>2853</b>	<b>3029</b>	<b>2802</b>	<b>2150</b>
<b>PB</b>	724	-	319 (50.7)	366 (17.8)	254 (8.9)	234 (7.7)	185 (6.6)	203 (9.4)
<b>CB A</b>	629	319 (44.1)	-	437 (21.3)	205 (7.2)	196 (6.5)	165 (5.9)	211 (9.8)
<b>CB B</b>	2055	366 (50.6)	437 (69.5)	-	650 (22.8)	649 (21.4)	517 (18.5)	587 (27.3)
<b>FCTX</b>	2853	254 (35.1)	205 (32.6)	650 (31.6)	-	2046 (67.6)	1078 (38.5)	1414 (65.8)
<b>TCTX</b>	3029	234 (33.3)	196 (31.2)	649 (31.6)	2046 (71.7)	-	1091 (38.9)	1480 (68.9)
<b>CRBLM</b>	2802	185 (25.6)	165 (26.2)	517 (25.2)	1078 (37.8)	1091 (36.0)	-	1004 (46.7)
<b>PONS</b>	2150	203 (28.0)	211 (33.6)	587 (28.6)	1414 (49.6)	1480 (48.9)	1004 (35.8)	-

末梢血   臍帯血   臍帯血   前頭葉   側頭葉   小脳   橋

# まとめ

1. エピゲノムワイド関連解析(EWAS)により、生活習慣病と関連するCpGメチル化が数個～数百個報告されている。
2. 疾患関連を示したCpGメチル化のうち、一部は疾患原因であるものの、多くは疾患の結果と推測される。(ただし4)
3. 喫煙・飲酒と関連するCpGが多く、生活習慣病EWASでも注意が必要。
4. EWAS結果の解釈においては、末梢血で、全CpGの数%のみ測定していることに留意。
5. メンデル無作為化法のように、GWASとEWASを統合した疾患解明の進展が期待される。