

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成26年4月30日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学  
 職名 教授  
 研究代表者 荒川 浩一  
 勤務先所在地 〒371-8511  
 前橋市昭和町3-39-22  
 電話番号 027-220-8200  
 ファックス番号 027-220-8215  
 E-メール harakawa@gunma-u.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

(課題番号 11027)

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	プロジェクト名:「代謝疾患ゲノム研究プロジェクト」  共同研究課題名: 免疫系のエピゲノム破綻機構の研究																																														
2. 共同研究目的	共同研究により MIAMI 法やパイローシーケンス法などのエピゲノム解析、発現解析をおこない免疫系のエピゲノム破綻機構を明らかにする。																																														
3. 共同研究期間	平成 25年 4月 1日 ~ 平成 26年 3月 31日																																														
4. 共同研究組織	<table border="1"> <thead> <tr> <th>氏名</th> <th>年齢</th> <th>所属部局等</th> <th>職名等</th> <th colspan="2">役割分担</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(研究代表者) 荒川 浩一</td> <td>56</td> <td>小児科学</td> <td>教授</td> <td colspan="2">研究総括</td> </tr> <tr> <td>(分担研究者) 小林 靖子</td> <td>46</td> <td>大学院教育研究支援センター</td> <td>助教</td> <td colspan="2">検体収集、細胞抽出、DNA メチル化解析</td> </tr> <tr> <td>渡部 登志雄</td> <td>48</td> <td>小児科</td> <td>講師</td> <td colspan="2">検体収集</td> </tr> <tr> <td>相澤 明</td> <td>51</td> <td>小児科</td> <td>研究員</td> <td colspan="2">メチル化解析、データ解析</td> </tr> <tr> <td>林 佐智子</td> <td>53</td> <td>小児科</td> <td>技官</td> <td colspan="2">細胞抽出、メチル化解析</td> </tr> <tr> <td>石井 清絵</td> <td>34</td> <td>小児科</td> <td>技官</td> <td colspan="2">細胞抽出、メチル化解析</td> </tr> </tbody> </table>					氏名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担		(研究代表者) 荒川 浩一	56	小児科学	教授	研究総括		(分担研究者) 小林 靖子	46	大学院教育研究支援センター	助教	検体収集、細胞抽出、DNA メチル化解析		渡部 登志雄	48	小児科	講師	検体収集		相澤 明	51	小児科	研究員	メチル化解析、データ解析		林 佐智子	53	小児科	技官	細胞抽出、メチル化解析		石井 清絵	34	小児科	技官	細胞抽出、メチル化解析	
氏名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担																																											
(研究代表者) 荒川 浩一	56	小児科学	教授	研究総括																																											
(分担研究者) 小林 靖子	46	大学院教育研究支援センター	助教	検体収集、細胞抽出、DNA メチル化解析																																											
渡部 登志雄	48	小児科	講師	検体収集																																											
相澤 明	51	小児科	研究員	メチル化解析、データ解析																																											
林 佐智子	53	小児科	技官	細胞抽出、メチル化解析																																											
石井 清絵	34	小児科	技官	細胞抽出、メチル化解析																																											
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	生体情報ゲノムリソースセンター	氏名	畑田 出穂																																											

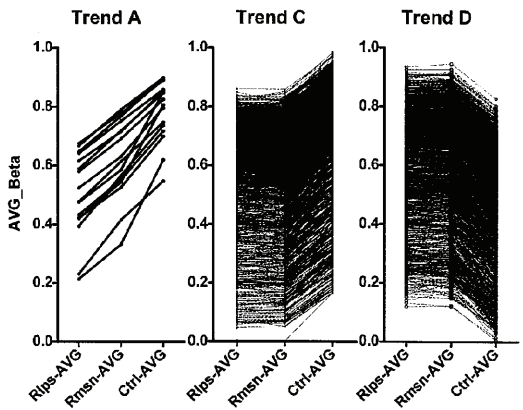
※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同研究計画

小児期発症のMCNS患者より倫理的配慮を行ったうえで、その再発時及び寛解時の末梢血を採取する。比重遠心法にて末梢血単核球分画を採取し、マイクロビーズを用いて単球細胞及びナイーブ Th(Th0)細胞を分取する。定法に従ってゲノム DNA 及び RNA を採取する。ゲノム DNA では MIAMI 法(Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers)及び Infinium Assay 法にて DNA メチル化をゲノムワイドに検討し、MCNS の病勢に伴って DNA メチル化が変化する遺伝子プロモーター領域を検出する。脱メチル化の変化を示す遺伝子領域については hydroxymethyl DNA の検討も行う。DNA メチル化に差を認めた部位についてはパイロシーケンス法でも DNA メチル化の程度を確認する。また上記細胞での遺伝子発現解析を行い、DNA メチル化によって発現が制御されている領域を検討し、MCNS の発症に関与する遺伝子を探索する。

## 7. 共同研究の成果

これまでの MIAMI 法による検討で、MCNS ではヘルパー T 細胞で、病勢(活動期、寛解期、健常コントロール)に応じて DNA メチル化が変化する遺伝子群、蛋白尿の出現に応じて変化する遺伝子群、同じく疾患の発症に応じて変化する遺伝子群を見いだした。患者群は男児 4 名での検討であり、発現解析は行えなかったため、患者数を増やして、男女別(各 10 名)に他の MCNS 患者群からサンプル採取し、同一の細胞から得た検体で発現アレイおよび Infinium Assay 法による DNA メチル化解析を行い、DNA メチル化により発現が制御される遺伝子を探索した。以下に疾患群女児のべ 10 名の再発時、寛解時と年齢、性別を一致させた健常コントロール群 9 名の結果を示す。男児についても解析は終了しており、コントロール群のデータの変換確認中である。



1) DNA メチル化解析: メチル化頻度の平均値が各群間で 10%以上変化し、病態に伴って再発で最もメチル化率が低下した(コントロール>寛解>再発)プローブ(TrendA)が 16 種見いだされた。一方でメチル化率が上昇するプローブは見いだされなかった。寛解・再発時を含む患者群がコントロール群に比べて 10%以上メチル化率が低下した(TrendC)ものは 1527 種、上昇している(TrendD)ものは 1207 種あった。

患者群再発-寛解間の比較でメチル化が 5%以上変化していたプローブ(上昇 147、低下 149)のうち特定の遺伝子と関連づけられているもの 222 を用いてパスウェイ解析を行ったところ、Regulation of Actin Cytoskeleton(KEGG: hsa04810,  $P < 1.2E-2$ ), Insulin signaling pathway(KEGG: map04910,  $P = 1.9E-2$ )に、エンリッチしていた。Gene Ontology Enrichment Analysis(GOEA)では、negative regulation of macromolecule biosynthetic process( $P < 2.30E-06$ ), negative regulation of transcription( $P < 1.20E-05$ )など、転写抑制に関連する遺伝子群がエンリッチしていた。再発-健常群間でメチル化が 10%以上変化していた遺伝子(307)をパスウェイ解析したところ、Type I diabetes mellitus pathway(KEGG: hsa04940  $P < 2.3E-4$ ), Rac 1 cell motility signaling pathway(BioCarta;  $P = 1.7E-2$ )などにエンリッチしていた。GOEA 解析では、regulation of Rho protein signal transduction ( $P < 2.80E-03$ ), induction of apoptosis by extracellular signals( $5.20E-03$ )などにエンリッチしていた。

2) 発現解析: 再発-寛解間で有意( $P < 0.05$ )に発現が変化する遺伝子(1057)のパスウェイ解析では、Intestinal immune network for IgA production(KEGG: hsa04672,  $P < 1.7E-4$ )にエンリッチしていることが分かった。一方再発-健常群間では、Ribosome(KEGG: hsa03010,  $P < 9.5E-15$ )が非常に高い確率でエンリッチしていた。

3) DNA メチル化により発現が制御される遺伝子: 今回の検討ではナイーブ T 細胞で検討を行ったためか、DNA メチル化と遺伝子発現が共同して変化する遺伝子は見いだされなかった。上記の結果より DNA メチル化で捉えられる変化がある可能性を示唆している。

DNA メチル化変化は以前の解析と同様に、疾患発症に関連して変化する遺伝子群と活動性ないしはタンパク尿の出現に関連して変化する遺伝子群とが検出された。今後はこれらの遺伝子の DNA メチル化が疾患活動性の指標となりうるか、また病因との関連について検討を進める。

## 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを 1 部提出してください。)

1. 小林靖子 荒川浩一 小児免疫疾患・生活習慣病におけるゲノム・エピゲノム解析による病因・病態の解明 2013年6月13日 生体調節研究所 キックオフシンポジウム ゲノム・エピゲノム解析による生活習慣病の病態解明とその制御を目指した分子標的の探索研究プロジェクト