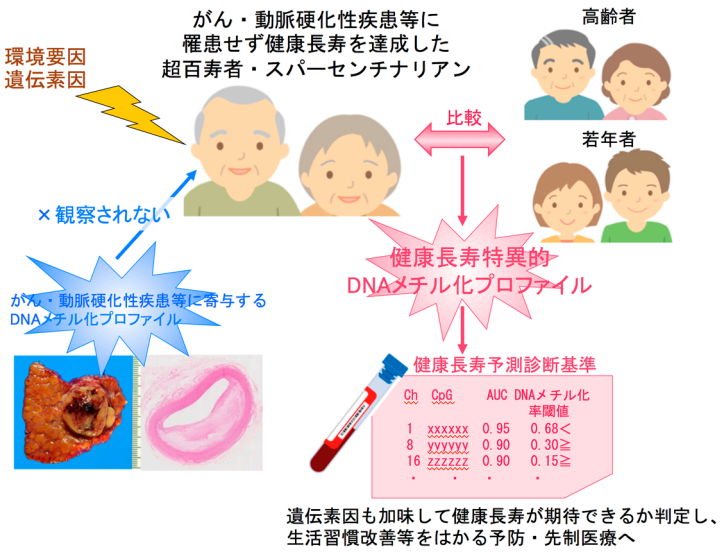
| 4　超百寿者エピゲノム解析による健康長寿規定要因の解明 | 金井　弥栄 |
|---|---|

**【目的】**健康長寿は古来人類の願いであり、顕著な高齢化社会を迎える我が国では、個々人が疾病を避け健康長寿を達成できるように、健康長寿を規定する要因の解明が望まれる。本研究では、若年者・高齢者・超百寿者（105 歳以上）ならびにスーパーセンチナリアン（110 歳以上）の血液検体のゲノム網羅的 DNA メチル化解析結果を、生活習慣等の問診情報やゲノム情報と照合することで、生活習慣等環境要因と遺伝素因が誘導する DNA メチル化プロファイルが、健康長寿を規定する機構を解明し、予防・先制医療の基盤となる知見を得ることを目的とした。

**【方法】**「慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター」が収集し、全ゲノム解析が終了している血液検体を、「いわて東北メディカルメガバンク機構」の支援を受けて、次世代シークエンサを用いた DNA メチル化キャプチャ法によるゲノム網羅的 DNA メチル化解析（SureSelect XT Human Methyl-Seq［Illumina］によるバイサルファイトシークエンシング［84 Mb、370 万 CpG 対象］）に供した。本報告書作成時点で、一部検体においてシークエンシングを完了し、一部検体においてはライブラリ作製まで終了した。比較の対象として、「いわて東北メディカルメガバンク機構」が実施した、住民コホートの若年者（40～50 歳程度）・高齢者（80～90 歳程度）の血液検体におけるエピゲノム解析結果の提供を受けることになった。

**【結果】**当研究室で蓄積してきた 2,000 検体程度の諸臓器がん組織・がん症例手術検体の非がん組織　（既に発がん要因の影響を受け前がん段階にある可能性がある）・当該臓器がんを有さない症例の手術検体より得られた正常組織における DNA メチル化解析結果を再検討した。超百寿者・スーパーセンチナリアンが発がんに対する耐性を獲得しているか知るために、重点的に確認すべき CpG 部位として、肺・胃・腎・乳腺・肝等の諸臓器に共通して、前がん段階から DNA メチル化異常が起こり、その異常ががん組織そのものに継承される 489 CpG 部位を同定した。同様に、糖尿病・動脈硬化性疾患に対する耐性を獲得しているか知るために重点的に解析すべき CpG 部位の候補を、共同研究機関とともに絞り込んだ。研究体制整備に時間を要し、研究期間内に DNA メチル化キャプチャ法によるゲノム網羅的 DNA メチル化解析を全検体で完了することができなかったが、解析は当初計画の手順で進行した。超百寿者・スーパーセンチナリアン血液検体のエピゲノムデータを取得次第、対照となる若年者・高齢者の血液検体と比較し、DNA メチル化率が異なる CpG 部位を抽出して、健康長寿特異的 DNA メチル化プロファイルを同定できると見込まれた。がん等の疾患促進的 DNA メチル化異常が、超百寿者・スーパーセンチナリアンの血液検体には認められないことが証明できると期待された。健康長寿特異的 DNA メチル化プロファイルを特徴付けるマーカーCpG 部位を絞り込めば、近未来の予防・先制医療戦略につながる「健康長寿予測診断基準」が策定できると期待された。

本研究全体の概念図



# 4. 超百寿者エピゲノム解析による健康長寿規定要因の解明

金井　弥栄

慶應義塾大学 医学部 病理学教室

Key words：超百寿，スーパーセンチナリアン，エピゲノム，ゲノム，環境要因

## 緒　言

健康長寿は古来人類の願いであり、顕著な高齢化社会を迎える我が国では、個々人が疾病を避け健康長寿を達成できるように、健康長寿を規定する要因の解明が望まれる。健康長寿は、遺伝子多型等の遺伝素因すなわち内的要因と、生活習慣を含む環境要因すなわち外的要因の、双方で規定されると考えられる。他方で健康長寿は、がん・糖尿病・動脈硬化性疾患等の生命予後に影響する疾患への易罹患性に依存し、直接的には疾患の発生母地となる細胞の遺伝子発現プロファイルに規定され得る。加えて、諸臓器が正常な機能を長く維持するため、諸臓器の構成細胞が長寿に適した遺伝子発現プロファイルを示すことが肝要と推測される。

エピゲノム情報は、諸臓器の細胞の遺伝子発現プロファイルを制御することができ、環境要因に大きく依存し遺伝素因とも相互作用するので、個体が疾病を避け健康長寿を達成するために重要と推測される。ヒトが環境要因に曝露され長く生きると、ゲノム情報よりエピゲノム情報の表現型への寄与が高まるので、健康長寿研究の鍵はエピゲノム情報が握っている。エピゲノム情報の中でも、ヒストン修飾より可塑性の低い DNA メチル化プロファイルは、一旦変化すると DNA メチル化酵素 DNMT1 の担う維持メチル化機構で安定にゲノム上に保存されるので、疾患への耐性や長寿命を規定し得ると考えられる。

そこで本研究では、ゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイル・生活習慣情報・遺伝子多型情報に焦点を当て、疾病を避け健康長寿を達成する機構の理解を目指した。若年者・高齢者・超百寿者（105 歳以上）ならびにスーパーセンチナリアン（110 歳以上）の血液検体のゲノム網羅的 DNA メチル化解析結果を、生活習慣等の問診情報やゲノム情報と照合することで、生活習慣等環境要因と遺伝素因が誘導する DNA メチル化プロファイルが健康長寿を規定する機構を解明し、予防・先制医療の基盤となる知見を得ることを目的とする。本研究の全体構想を図 1 に示した。

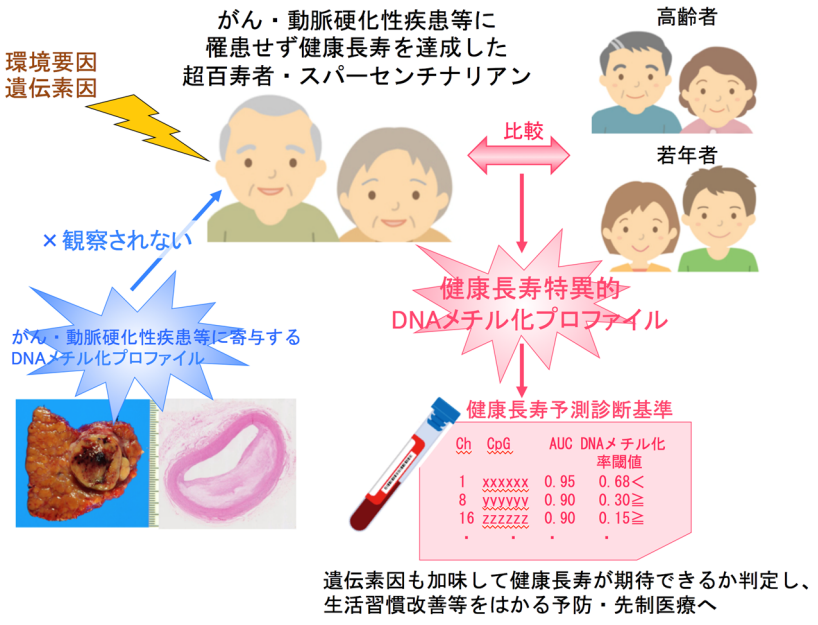



図 1. 本研究全体の概念図

## 方法および結果

「慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター」が収集する血液検体［1〜3］を本研究に供すための倫理申請を行い、慶應義塾大学医学部倫理審査委員会より研究の承認を得て、機関の長による研究許可を受けた。「慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター」の研究者が、全国に亘るその居住地を訪問して生活習慣等の問診情報を収集し採血を行った、超百寿者ならびにスーパーセンチナリアンの血液検体の提供を受けることになった。HiSeq PE Cluster kit v4 ならびに HiSeq HiSeq SBS kit v4（Illumina、San Diego、CA）による全ゲノム解析を終了している 50 検体を、本研究によるエピゲノム解析対象として選択した。解析対象を表 1 に示す。次世代シークエンサを用いた DNA メチル化キャプチャ法によるゲノム網羅的 DNA メチル化解析（SureSelect XT Human Methyl-Seq［Illumina］によるバイサルファイトシークエンシング［84 Mb、370 万 CpG 対象］）を行うこととした。本法は、東北メディカルメガバンク機構のエピゲノム部門である「いわて東北メディカルメガバンク機構」の清水らが、年齢依存的に DNA メチル化率が変化する CpG 部位等の解析に供すためにカスタムマイズした試薬を用いて実施し、得られたデータには日本人検体を用いたエピゲノムワイド関連解析のためのパイプライン［4，5］を適用することとした。本報告書作成時点で、一部検体においてシークエンシングを完了し、一部検体においてはライブラリ作製まで終了した。比較の対象として、「いわて東北メディカルメガバンク機構」が実施した、住民コホートの若年者（40〜50 歳程度）・高齢者（80〜90 歳程度）の血液検体 100 検体程度におけるエピゲノム解析結果の提供を受けることになった。

表 1．エピゲノム解析対象とした血液検体

| 年齢階層 | 性別 | 人数 | 検体数[b] |
|---|---|---|---|
| スーパーセンチナリアン | –[a] | 14 | 20 |
| 超百寿者 | 男性 | 14 | 14 |
| | 女性 | 14 | 16 |
| 合計 | | 42 | 50 |

[a]個人情報保護のため記載していない。[b]4 人においては複数回訪問し採血を行っている。

当研究室で蓄積してきた 2000 検体程度の諸臓器がん組織・がん症例手術検体の非がん組織 （既に発がん要因の影響を受け前がん段階にある可能性がある）・当該臓器がんを有さない症例の手術検体より得られた正常組織における DNA メチル化解析結果を再検討した［6〜8］。超百寿者・スーパーセンチナリアンにおいて、発がん促進的 DNA メチル化異常が惹起されず発がんに対する耐性を獲得しているか知るために、血液検体のエピゲノム解析結果を取得後に重点的に確認すべき CpG 部位として、肺・胃・腎・乳腺・肝等の諸臓器に共通して、前がん段階から DNA メチル化異常が起こり、その異常ががん組織そのものに継承される 489 CpG 部位を同定した［9］。ジーンオントロジーエンリッチメント解析で、諸臓器がんに共通して DNA メチル化異常を呈する遺伝子の多くは、発生・分化に寄与する転写因子であることがわかった（表 2）。具体的な遺伝子名は表 3 に示す。

表 2. MetaCore ソフトウエアによるジーンオントロジーエンリッチメント解析で、諸臓器がんで共通して前がん段階から DNA メチル化異常を呈する遺伝子の有意な集積を認めた主要なプロセス

| 生物学的プロセス | *P* |
|---|---|
| Multicellular organismal development | $9.259 \times 10^{-30}$ |
| System development | $3.543 \times 10^{-28}$ |
| Organ development | $5.112 \times 10^{-26}$ |
| Anatomical structure development | $5.424 \times 10^{-26}$ |
| Developmental process | $1.017 \times 10^{-25}$ |
| Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter | $1.545 \times 10^{-25}$ |
| Regulation of cell differentiation | $1.902 \times 10^{-22}$ |
| Cell differentiation | $6.829 \times 10^{-22}$ |
| Cellular developmental process | $8.912 \times 10^{-21}$ |
| Regulation of multicellular organismal development | $2.728 \times 10^{-20}$ |

注：基盤となるデータは文献 9 において報告している。

同様に、糖尿病・動脈硬化性疾患に対する耐性を獲得しているか知るために重点的に解析すべき CpG 部位の候補を、共同研究機関とともに絞り込んだ。

表 3. 複数臓器がんで DNA メチル化異常を示した発生・分化に関わる転写因子

| 遺伝子名 | DNAメチル化異常を示すがん種 | 遺伝子名 | DNAメチル化異常を示すがん種 |
|---|---|---|---|
| *ALX1* | Lu, S, K, B , Li | *NR2E1* | Lu, K, B, Li |
| *ALX4* | Li, Lu, S, B | *PAX7* | Lu, S, B, Li |
| *ASCL2* | Lu, K, B, Li | *POU3F3* | Lu, S, B, Li |
| *BARHL2* | Lu, K, B, Li | *POU4F1* | Lu, S, K, B, Li |
| *DLX5* | Lu, S, K, Li | *POU4F2* | Lu, S, K, B, Li |
| *EBF1* | Lu, S, B, Li | *PRDM14* | Lu, S, B, Li |
| *EGR2* | Lu, S, B, Li | *RAX* | Lu, S, K, B |
| *EMX2* | Lu, S, B, Li | *RUNX3* | Lu, S, K, B, Li |
| *EOMES* | Lu, S, B, Li | *SALL3* | Lu, K, B, Li |
| *FOXD3* | Lu, K, B, Li | *SALL4* | Lu, K, B, Li |
| *FOXE3* | Lu, K, B, Li | *SIX6* | Lu, S, B, Li |
| *FOXG1* | Lu, S, B, Li | *SOX11* | Lu, S, K, Li |
| *GBX2* | Lu, K, B, Li | *SOX14* | Lu, K, B, Li |
| *GCM2* | Lu, K, B, Li | *SOX17* | Lu, S, K, B, Li |
| *GFI1* | Lu, S, B, Li | *TBX20* | Lu, S, K, B, Li |
| *H,2* | Lu, S, K, B, Li | *TLX3* | Lu, K, B, Li |
| *HOXA7* | Lu, S, B, Li, K | *TP73* | Lu, S, B, Li |
| *HOXA9* | Lu, S, B, Li | *TWIST1* | Lu, S, K, Li |
| *HOXB4* | Lu, S, B, Li | *WT1* | Lu, S, K, B |
| *HOXB6* | Lu, S, K, B | *ZIC1* | Lu, K, B, Li |
| *HOXD12* | Lu, S, K, B | *NR2E1* | Lu, K, B, Li |
| *HOXD9* | Lu, S, B, Li | *PAX7* | Lu, S, B, Li |
| *IRF4* | Lu, S, B, Li | *POU3F3* | Lu, S, B, Li |
| *MKX* | Lu, S, B, Li | *POU4F1* | Lu, S, K, B, Li |
| *MSC* | Lu, S, B, Li | *POU4F2* | Lu, S, K, B, Li |
| *MYOD1* | Lu, K, B, Li | *PRDM14* | Lu, S, B, Li |
| *NKX3-2* | Lu, S, B, Li | *RAX* | Lu, S, K, B |
| *NKX6-2* | Lu, K, B, Li | *RUNX3* | Lu, S, K, B, Li |

Lu：肺がん、S：胃がん、K：腎がん、B：乳がん、Li：肝がん。

## 考　察

研究体制整備に時間を要し、研究期間内に DNA メチル化キャプチャ法によるゲノム網羅的 DNA メチル化解析を全検体で完了することができなかったが、解析は当初計画の手順で進行している。超百寿者・スーパーセンチナリアン血液検体のエピゲノムデータを取得次第、対照となる若年者・高齢者の血液検体と比較し、DNA メチル化率が異なる CpG 部位を抽出して、健康長寿特異的 DNA メチル化プロファイルを同定できる見込みである。その DNA メチル化異常が諸臓器がん・糖尿病・動脈硬化性疾患等の発症に早期から寄与すると考えられる CpG 部位を既に同定しているので、そのような疾患促進的 DNA メチル化異常が、超百寿者・スーパーセンチナリアンの血液検体には認められないことが証明できると期待される。さらには、問診情報・ゲノム情報と統合することで、健康長寿特異的 DNA メチル化プロファイルを誘導する生活習慣等の環境要因や遺伝素因が明らかになると期待されるが、これは既存の知識に基づく仮説ではなく、ヒト試料と研究対象者の生活実態に基づくリアリティーのある知見になる。

健康長寿特異的 DNA メチル化プロファイルを特徴付ける CpG 部位を絞り込んで、その DNA メチル化率を用いて、超百寿者ならびにスーパーセンチナリアンを見分ける受信者操作特性曲線解析を行い、曲線下面積が大きい CpG 部位に診断閾値を設定することで、若年のうちに健康長寿が期待できるか判定する「健康長寿予測診断基準」を策定する予定である。当研究室では、がんの病態診断等を医療実装する目的で、病院・健診機関にも導入の容易な高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を基盤とする DNA メチル化診断機器を積水メディカル株式会社と共同研究開発し[10]、国内・国際特許取得済みである。本研究で策定する「健康長寿予測診断基準」をこの DNA メチル化診断システムに適合させれば、国民等への普及も可能であると考えている。本研究を完遂することによって、遺伝素因も加味して健康長寿が期待できるか若年のうちに判定し、健康長寿を阻害する生活習慣等を排除するか、健康長寿を促進する生活習慣等を取り入れる等して、健康長寿の達成を目指すといった近未来の予防・先制医療戦略につなげたい。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部百寿総合研究センターの新井康通専任講師、佐々木貴史専任講師、岩手医科大学医歯薬総合研究所生体情報解析部門の清水厚志教授である。

## 文　献

1) Gondo Y, Hirose N, Arai Y, Inagaki H, Masui Y, Yamamura K, Shimizu K, Takayama M, Ebihara Y, Nakazawa S, Kitagawa K. Functional status of centenarians in Tokyo, Japan: developing better phenotypes of exceptional longevity. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2006 Mar;61(3):305-10. PMID: 16567382 DOI: 10.1093/gerona/61.3.305

2) Arai Y, Inagaki H, Takayama M, Abe Y, Saito Y, Takebayashi T, Gondo Y, Hirose N. Physical independence and mortality at the extreme limit of life span: supercentenarians study in Japan. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014;69:486–94. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24225329 DOI: 10.1093/gerona/glt146

3) Arai Y, Iinuma T, Takayama M, Takayama M, Abe Y, Fukuda R, Ando J, Ohta K, Hanabusa H, Asakura K, Nishiwaki Y, Gondo Y, Akiyama H, Komiyama K, Gionhaku N, Hirose N. The Tokyo Oldest Old survey on Total Health (TOOTH): a longitudinal cohort study of multidimen- sional components of health and well-being. BMC Geriatr. 2010;10:35. PMID: 20529368 PMCID: PMC2893189 DOI: 10.1186/1471-2318-10-35

4) Hachiya T, Furukawa R, Shiwa Y, Ohmomo H, Ono K, Katsuoka F, Nagasaki M, Yasuda J, Fuse N, Kinoshita K, Yamamoto M, Tanno K, Satoh M, Endo R, Sasaki M, Sakata K, Kobayashi S, Ogasawara K, Hitomi J, Sobue K, Shimizu A. Genome-wide identification of inter-individually variable DNA methylation sites improves the efficacy of epigenetic association studies. NPJ Genom Med. 2017 Apr 13;2:11. PMID: 29263827 PMCID: PMC5677974 DOI: 10.1038/s41525-017-0016-5

5) Shiwa Y, Hachiya T, Furukawa R, Ohmomo H, Ono K, Kudo H, Hata J, Hozawa A, Iwasaki M, Matsuda K, Minegishi N, Satoh M, Tanno K, Yamaji T, Wakai K, Hitomi J, Kiyohara Y, Kubo M, Tanaka H, Tsugane S, Yamamoto M, Sobue K, Shimizu A. Adjustment of Cell-Type Composition Minimizes Systematic Bias in Blood DNA Methylation Profiles Derived by DNA Collection Protocols. PLoS One. 2016 Jan 22;11(1):e0147519. PMID: 26799745 PMCID: PMC4723336 DOI: 10.1371/journal.pone.0147519
6) Tsumura K, Arai E, Tian Y, Shibuya A, Nishihara H, Yotani T, Yamada Y, Takahashi Y, Maeshima AM, Fujimoto H, Nakagawa T, Kume H, Homma Y, Yoshida T, Kanai Y. Establishment of permutation for cancer risk estimation in the urothelium based on genome-wide DNA methylation analysis. Carcinogenesis. 2019 Nov 25;40(11):1308-19. PMID: 31241739 DOI: 10.1093/carcin/bgz112
7) Makabe T, Arai E, Hirano T, Ito N, Fukamachi Y, Takahashi Y, Hirasawa A, Yamagami W, Susumu N, Aoki D, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profile of early-onset endometrial cancer: its correlation with genetic aberrations and comparison with late-onset endometrial cancer. Carcinogenesis. 2019 Jul 4;40(5):611-23. PMID: 30850842 PMCID: PMC6610171 DOI: 10.1093/carcin/bgz046
8) Kuramoto J, Arai E, Tian Y, Funahashi N, Hiramoto M, Nammo T, Nozaki Y, Takahashi Y, Ito N, Shibuya A, Ojima H, Sukeda A, Seki Y, Kasama K, Yasuda K, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation analysis during non-alcoholic steatohepatitis-related multistage hepatocarcinogenesis: comparison with hepatitis virus-related carcinogenesis. Carcinogenesis. 2017 Mar 1;38(3):261-70. PMID: 28426876 PMCID: PMC5862314 DOI: 10.1093/carcin/bgx005
9) Ohara K, Arai E, Takahashi Y, Ito N, Shibuya A, Tsuta K, Kushima R, Tsuda H, Ojima H, Fujimoto H, Watanabe SI, Katai H, Kinoshita T, Shibata T, Kohno T, Kanai Y. Genes involved in development and differentiation are commonly methylated in cancers derived from multiple organs: a single-institutional methylome analysis using 1007 tissue specimens. Carcinogenesis. 2017 Mar 1;38(3):241-51. PMID: 28069692 PMCID: PMC5862281 DOI: 10.1093/carcin/bgw209
10) Yotani T, Yamada Y, Arai E, Tian Y, Gotoh M, Komiyama M, Fujimoto H, Sakamoto M, Kanai Y. Novel method for DNA methylation analysis using high-performance liquid chromatography and its clinical application. Cancer Sci. 2018 May;109(5):1690-1700. Epub 2018 Apr 17. PMID: 29520901 PMCID: PMC5980336 DOI: 10.1111/cas.13566