

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08011

研究課題名(和文) DNAメチル化制御機構を標的にした新規精神疾患治療薬の創薬シーズの探索

研究課題名(英文) Discovery of new drug seeds for psychiatric disorders targeting DNA methylation

研究代表者

稲富 由香 (INATOMI, Yuka)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：00258089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：BDNF遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化が精神疾患の発症に関与する可能性が示されている。本研究では、BDNF遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子をNeuro2A細胞のゲノムに挿入することで、プロモーター領域のメチル化状態を簡便に評価できるアッセイ系を構築した。本アッセイ系は、BDNF遺伝子のプロモーター領域を脱メチル化できる創薬シーズを探索する際に有用である可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Several studies have suggested that DNA methylation in the promoter regions of Bdnf gene is involved in the development of mood and psychiatric disorders such as depression and schizophrenia. In this study, we established the convenient assay system for evaluation of DNA methylation levels in the bdnf promoter region, by the incorporation of the reporter construct into the genome of Neuro2A cells. The assay system may be a useful screening tool for drug candidates which have DNA demethylation activities.

研究分野：天然物化学

キーワード：DNAメチル化 生理活性物質 天然物化学 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

うつ病や統合失調症などの精神疾患の発症には、遺伝的要因が関与するものと考えられている。しかしながら、これまでに大規模なゲノム解析が行われてきたにも関わらず、これら精神疾患の発症メカニズムが未だ解明されていないことから、精神疾患の発症メカニズムを遺伝的要因のみで説明することは不可能であるものと認識されている。すなわち、精神疾患の発症には後天的な環境要因の寄与が大きいものと推測される。こうしたなか近年、環境要因による病態発症の分子基盤として、DNA のメチル化による遺伝子制御機構、所謂エピジェネティクスが注目されている。

これまでに基礎研究や臨床研究から、精神疾患の原因の1つとして、脳由来神経栄養因子 BDNF の発現量の減少が指摘されている。最近では、BDNF の発現量の減少には、BDNF 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化の増加が関与することが明らかとなってきた。こうした知見から、これら DNA のメチル化を減少させることが疾患の治療につながるものと期待される。

近年まで、神経細胞などの分化・成熟した細胞では、DNA メチル化反応のみが起こり、積極的な脱メチル化は生じないものと考えられてきた。しかしながら最近、能動的な DNA 脱メチル化反応の存在が徐々に明らかとなり、現在では、各細胞は DNA のメチル化と脱メチル化を繰り返すことで遺伝子発現を制御しているものと考えられている。したがって、DNA 脱メチル化機構を調節する化合物が精神疾患を含めた種々の疾患の治療薬になり得るものと推測できるが、DNA 脱メチル化機構については未だほとんど明らかとなっておらず、特定の分子を標的とした化合物のスクリーニングを行うことはできない。また、DNA のメチル化を減少させる方法として DNA メチル化酵素の阻害が考えられるが、DNA メチル化酵素を阻害した場合、グローバルな DNA メチル化の減少が生じ、幅広い遺伝子の発現に影響を及ぼすことが危惧される。すなわち、治療薬として用いる場合には、標的遺伝子プロモーター領域に特異的な DNA の脱メチル化が求められる。

2. 研究の目的

こうした背景から本研究では、BDNF 遺伝子のプロモーター領域において、DNA の脱メチル化を引き起こす化合物を探索することのできる簡便なアッセイ系を構築する。

3. 研究の方法

(1) DNA メチル化処理を施したレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ系の構築

マウス *bdnf* 遺伝子エキソンのプロモ-

ーター領域 (*pbdnf4*) として転写開始点から上流 500 塩基対をクローニングし、pGL3 basic vector (PROMEGA) のホタルルシフェラーゼ配列 (*luc*) の上流に組み込んだレポータープラスミド (*pbdnf4-luc* レポータープラスミド) を作製した。DNA メチル化酵素である *sssl* とメチルドナーである *S*-アデノシルメチオニンを用いて、作製したレポータープラスミドをメチル化させた後、補正用ベクターである pRL-TK vector (PROMEGA) と共に、神経芽細胞腫 Neuro2A にトランスフェクションした。ルシフェラーゼの活性はトランスフェクションの 24 時間後に測定した。

(2) レポーター遺伝子をゲノムに組み込んだ細胞を用いたルシフェラーゼアッセイ系の構築

pbdnf4 と *luc* を pLenti6/R4R2/V5-DEST vector (Invitrogen) に組み込み、組換えレンチウイルス発現プラスミドを作製した。作製した組換えレンチウイルス発現プラスミドを用いて、組換えレンチウイルスベクターを作製し、ウイルス精製後に、神経芽細胞腫 Neuro2A に感染させ、Neuro2A のゲノム DNA に、*pbdnf4-luc* を組み込んだ。その後、プラスチジンを用いて、*pbdnf4-luc* が組み込まれた細胞をセレクションし、ルシフェラーゼアッセイに供した。

(3) バイサルファイトシーケンス解析

各細胞から DNA を抽出後、バイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理後の DNA を鋳型として *pbdnf4* を含む領域を PCR 法にて増幅しクローニングした後、シーケンスを解析することで、メチル化シトシン量を定量した。DNA のメチル化割合は *pbdnf4* 内に存在する 11 個の CpG 部位におけるシトシンのメチル化を合計して算出した。

4. 研究成果

(1) DNA メチル化処理を施したレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ

遺伝子発現に影響を及ぼす化合物の簡便なアッセイ方法として、ルシフェラーゼアッセイが知られているが、本アッセイ系では、レポータープラスミドを細胞内に導入した後に、プロモーター領域において DNA のメチル化が生じることで転写活性が低下する現象が見られる。この現象は、ルシフェラーゼアッセイにおいては不都合なものでないが、本研究ではこの現象を利用して DNA メチル化レベルの評価を試みた。

まず、*pbdnf4-luc* レポータープラスミドにおける DNA メチル化の有無が、ルシフェラーゼ活性に及ぼす影響について検討を行った。その結果、プロモーター領域を含まない promoterless プラスミドと比べて、*pbdnf4-luc* レポータープラスミドをトラン-

スフェクションすることで、ルシフェラーゼ活性が増加することが確認できたが、このルシフェラーゼ活性の増加は、予め *pbdnf4-luc* レポータープラスミドに対して DNA メチル化処理することにより消失した (図 1)。本結果から、DNA のメチル化により *pbdnf4* の活性が減少することが確認できた。

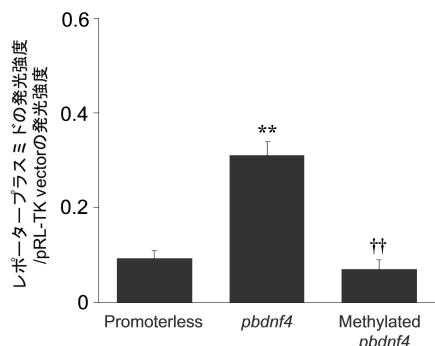


図 1 *pbdnf4* の活性に対する DNA メチル化の影響 (** $p < 0.01$ vs Promoterless, †† $p < 0.01$ vs *pbdnf4*.)

(2) レポーター遺伝子をゲノムに組み込んだ細胞を用いたルシフェラーゼアッセイ

生体内における DNA のメチル化は、ヒストン修飾と密接に関連しながら遺伝子の転写を調節していることが知られている。こうした点を考慮すると、DNA のメチル化による遺伝子の転写活性を評価する場合には、目的遺伝子のプロモーター領域はゲノム上に存在しているときのようにヌクレオソームを形成していることが望ましい。しかしながら、上述(1)の方法では、*pbdnf4-luc* がヌクレオソームを形成しないと考えられるため、ヌクレオソームの構造変化を介したエピジェネティックな転写制御機構を評価することは難しいと考えられる。

そこでこの問題を解決するために、組換えレンチウイルスベクターを用いて、神経芽細胞腫 Neuro2A のゲノムに *pbdnf4-luc* を組み込んだ細胞を作製し、DNA のメチル化が *pbdnf4* の活性に及ぼす影響を評価した。まず、作製した細胞において、継代を繰り返すことによるルシフェラーゼ活性の変化を解析した。その結果、継代を重ねることでルシフェラーゼ活性が顕著に減少することを見出した (図 2)。また、能動的に *pbdnf4* における DNA のメチル化を誘導することでルシフェラーゼ活性を減少させるために、組換えアデノウイルスベクターを用いて DNA メチル基転移酵素 (DNMT1) の過剰発現を行った。しかしながら、DNMT1 の過剰発現では顕著なルシフェラーゼ活性の減少は見られなかった (データ省略)。

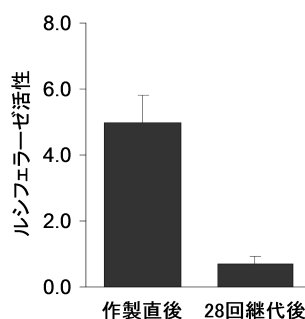


図 2 細胞の継代がルシフェラーゼ活性に及ぼす影響

継代を重ねることでルシフェラーゼ活性が減少した細胞において、DNA メチル化の関与を明らかにするために *pbdnf4* の DNA メチル化状態を評価したところ、作製直後の細胞と比べて継代を重ねた細胞では DNA メチル化割合が大幅に増加していることが明らかとなった (図 3)。

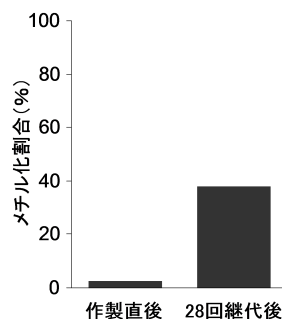


図 3 細胞の継代が *pbdnf4* の DNA メチル化に及ぼす影響

pbdnf4 における DNA のメチル化が確認できたことから、次にアッセイ系におけるポジティブコントロール、すなわち脱メチル化によるルシフェラーゼ活性の増加について検討を行った。これまでに、*pbdnf4* において効率的に DNA の脱メチル化を引き起こす化合物は発見されていない。そこで、DNA メチル基転移酵素の阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine を添加しルシフェラーゼ活性を測定したところ、0.3 μM の用量において経時的なルシフェラーゼ活性の増加が観察された (データ省略)。そこで、5-Aza-2'-deoxycytidine をポジティブコントロールとして、アッセイ系のバリデーションを試みた。5-Aza-2'-deoxycytidine を用いて Signal/Background ratio (S/B 比) を測定したところ、試行毎に S/B 比の変動が大きく、再現性の高いデータを得ることができなかった。これは、5-Aza-2'-deoxycytidine による DNA の脱メチル化が細胞増殖に大きく依存する受動的な脱メチル化であるためだと考えられる。また、細胞増殖に依存した DNA

脱メチル化（受動的脱メチル化）活性を有する化合物では細胞増殖が見られない神経細胞に対して作用を示さない可能性が高く、神経細胞を標的とした化合物を探索する本研究の目的には合致しない。そこで今後、本アッセイ系のポジティブコントロールとして、細胞増殖に依存しないDNA脱メチル化（能動的脱メチル化）を引き起こす化合物や刺激を検討する必要があると考えられる。

本研究結果から、*pbdnf4*におけるDNAのメチル化を簡便に評価できるアッセイ系を構築できたものと考えられる。しかしながら、ポジティブコントロールの設定や再現性の確認など、今後、アッセイ系の更なるバリデーションが必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

板原倭、平城陽介、土屋友美、小林佑至、荒木良太、矢部武士
漢方薬・天然物由来化合物のセロトニン受容体に対する作用の評価系の構築
日本薬学会第138年会 2018年3月25日～
2018年3月28日

角田幸祐、稲富由香、邑田裕子、矢部武士、Miguel A. P. FARRERA
メキシコ産 *Juniperus comitana* の成分研究
（3）
日本薬学会第137年会 2017年03月24日～
2017年03月27日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲富 由香 (INATOMI, Yuka)
摂南大学・薬学部・助教
研究者番号：00258089

(2) 研究分担者

荒木 良太 (ARAKI, Ryota)
摂南大学・薬学部・助教
研究者番号：90710682

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()