

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月24日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05319

研究課題名（和文）変性性認知症の新規病態解明のためのneuro-epigenetics方法論の応用

研究課題名（英文）Neuro-epigenetics for the discover of novel pathomechanism of neurodegeneration.

研究代表者

岩田 淳（Iwata, Atsushi）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40401038

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：疾患脳を利用し、どれだけ疾患特異的かつ重要と考えられる情報を抽出出来るかに挑戦した。死後変化への抵抗性や神経細胞特異的な情報抽出が可能となる方法論として神経細胞核を精製し、そこからepigenome情報を抽出する事で、間接的なトランスクリプトーム解析を行った。本方法を利用することで、アルツハイマー病の新規病態に迫る事が出来た。すなわち、神経細胞内でのDNA修復タンパク質BRCA1の機能低下が生じ、それにより神経細胞機能の低下が生じていた。この方法を応用し、神経細胞特異的なヒストン修飾解析を行い、アルツハイマー病に関係する遺伝子の発現変化がepigeneticに制御されている事を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全く新しい方法論を用いて剖検脳を用いることによって神経細胞内の遺伝子発現環境を推定、解析する方法論を確立し、それによる疾患特異的遺伝子発現異常を捉えることに成功した。これにより、アルツハイマー病の疾患発症メカニズムのより深い理解へとつながり、更には新規治療方法論の立案の一助となった。本方法論は、疾患脳発の情報抽出、すなわちボトムアップによる疾患理解という新しい疾患解析法となった。

研究成果の概要（英文）：We challenged how we could use the diseased brain to extract information that might be specific and important to the disease. We performed indirect transcriptome analysis by purifying neuronal nuclei and extracting epigenome information from them as a methodology that enables resistance to postmortem changes and neural cell specific information extraction. By using this method, we were able to approach a new pathological condition of Alzheimer's disease. In other words, the function of DNA repair protein BRCA1 in nerve cells was reduced, which resulted in the reduction of nerve cell function. By applying this method, we performed neural cell-specific analysis of histone modification and found that expression changes of genes related to Alzheimer's disease are controlled by epigenetic.

研究分野：神経学

キーワード：エピゲノム アルツハイマー病 ヒストン修飾 発現変化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞特異的なエピゲノム異常を検出し、アルツハイマー病(AD)やレビー小体病(LBD)といった孤発性神経変性症疾患による認知症の新規病態の探索を行い、その分子病態の妥当性をモデル系や疾患脳を用いて検証する事が目的である。新規方法論として Fluorescence-activated cell sorting(FACS)を使用した細胞核の分取技術を用いて神経、オリゴデンドログリアなどの細胞特異的なエピゲノム変化を網羅的に解析する事で疾患特異的な遺伝子発現変動パターンを今までにない精度、かつ細胞特異性を持って解析可能である。この技術を用いて孤発性二大認知症の新規病態の解明を実現し、創薬ターゲットを見いだす事を目標とする。その結果 Neuroepigenetics の応用という方法論が確立されることも期待される。

2. 研究の目的

アルツハイマー病の大半は孤発性であり、その根本的原因は未だ不明である。遺伝的素因としては発症者の 50%程度を占める APOE 遺伝子の 4 アレル以外はゲノムワイドの single nucleotide polymorphism(SNP)解析や全ゲノムシーケンシングを施行しても十分に影響の大きいものは見いだせていない。また、アルツハイマー病に次いで患者の多い孤発性レビー小体病については遺伝的素因ですら影響の大きいものはほとんど知られていない。これらの疾患では病理学的にも脳内において生じている分子病態メカニズムについての理解は進んでいるものの、その上流にある根本原因については未だに解かれてはいないのが現状である。これらの疾患の病態解明は現在までは同様の病態、症状を呈する遺伝性認知症の遺伝子異常の解析を元に進められてきた。その結果、家族性アルツハイマー病、家族性レビー小体病の遺伝子異常が孤発性のそれらの疾患においても何らかの異常を来していることが示唆はされてきたが、その本質に迫る事のできた研究はない。よって、二大孤発性認知症の根本的な治療法の開発のためにはより病態の本質に迫る解析方法が必要である事は疑問の余地がない。

中枢神経疾患の病態解析の方法論には様々なものがある。遺伝情報を出発点として結果としての症状との関連を解析するゲノム解析の様なトップダウン型の方法論は単一遺伝子の異常を前提とした疾患の原因解析については最も強力な方法論として確立している。しかしながら、単一遺伝子の異常に基づかないと考えられる孤発性疾患については、膨大な数の症例解析を必要とする事が想定され、解析数が増大すればするほど考慮すべきパラメーターが増えて解析が困難となる。さらに、遺伝情報には結果として疾患を発症したかどうかという情報は存在しないため、疑陽性の増加も問題となる。一方で、剖検脳を開始地点としたボトムアップ型研究にも大きな問題点がある。中枢神経疾患の診断のゴールドスタンダードである古典的病理学的解析は、病態を最も詳細に検討可能な方法論であるが、様々な仮説をハイスループットに探索する手段としては最も不適な方法論である。よりハイスループットな方法論としてはトランスクリプトーム解析が存在するが、細胞種ごとに検討する為にマイクロダイセクションが必要であるため、同時に解析可能な細胞数はごく少数にとどまり、病態を正確に反映しているかは疑問となる。その様な中で、私たちはエピゲノム解析に注目した。エピゲノム情報とは遺伝子の配列以外の情報で、遺伝子の発現に密接に関連している情報である。ヒストン修飾、DNA のメチル化修飾が主であり、FACS を使用した神経細胞核、オリゴデンドログリア細胞核を分離する方法と組み合わせることで、数十万という数の細胞核から得られる情報をハイスループットに解析する事が可能となる。また、表に示すように、死後の分解に抵抗性であり、今まで使用されてきている様々な方法の中で非常にバランスの良い方法であるといえる。

申請者は、過去の検討の中で、パーキンソン病で α -synuclein のプロモーター領域のメチル化異常を見だし(Matsumoto, 2010)、その結果は他の研究者によっても確認され、応用されている (Jowaeed 2010, Ai 2014, Tan 2014, Song 2014, Pihlstrom 2015 etc)。そして、その方法論をアルツハイマー病へと拡大したことで、孤発性アルツハイマー病において APP, MAPT, GSK3B の 3 遺伝子のメチル化異常が生じている事も見いだした(Iwata, 2014)。これらのメチル化異常は、今までの病態仮説に沿った発現変化をもたらすに足るメチル化異常であり、孤発アルツハイマー病の発症プロセスにそれらの発現異常が関与するという仮説がエピジェネティクスによって裏付けられたことで、“Neuroepigenetics” という解析方法が疾患の病態把握の全く新しい方法として注目されるに至った。

さらに、申請者はこれらの過去の報告の中で、FACS を使用した神経細胞核の精製法を使用した結果、アルツハイマー病で観察される DNA のメチル化異常が神経細胞特異的に生じている場合、もしくは非神経細胞核も含めて生じている場合の両方の場合がある事も特定した(Iwata, 2014)。

この研究を含めたその後の preliminary な解析で 30 例程度のアルツハイマー病脳の神経細胞核特異的 DNA メチレーション解析を行い、今まで全く報告されていなかった疾患関与遺伝子を最低限 3 つ同定している。本提案ではまずはその解析サンプル数を倍増させた上、解析部位を複数に増やし、対象細胞種を神経細胞、オリゴデンドロサイトに拡張、疾患対象はレビー小体病に拡大し、DNA メチレーション解析のみならずヒストンアセチル化解析を行った上で、二大孤発性認知症性疾患の発症に関与する新規病態異常を探索する。

探索によって得られた結果をふまえて当研究室で維持しているアルツハイマー病モデルマウスやモデル細胞、初代神経培養細胞システム、患者由来 iPS 細胞を利用して、病態仮説に立脚した課題解決型実験を遂行することで、二大孤発認知症の新規の病態解明を目指すしつつ、新しい学問としての Neuroepigenetics という分野を確立したいと考えた。

3. 研究の方法

FACS を用いて剖検脳より神経細胞核,オリゴデンドログリア細胞核を分離し,それぞれのゲノムを抽出する.抽出したゲノムを用いて1)バイサルファイト変換後にメチレーションアレイを使用して網羅的 DNA メチル化を解析,2)抗ヒストン修飾抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い,得られた DNA 断片を次世代シーケンサーによって解析し,遺伝子発現に關与する間接的な情報を得る.それによって得られた情報を元にアルツハイマー病,レビー小体病の新規病態に關与する分子群を同定し,一定の仮説を立て,モデル細胞,患者由来 iPS 細胞,モデル動物を用いた in vitro の実験によって証明を試みる.

4. 研究成果

多検体の処理とゲノム DNA の品質管理

Biorad 社製 S3e FACS を用いた神経細胞核,オリゴデンドサロイト細胞核の分離は既出の方法(Iwamoto 2011, Iwata 2014)を用いて行った.現在までに終了した正常コントロール 30,アルツハイマー病 30,レビー小体病 30 例をもちいて,暫定的な解析を行った結果,アルツハイマー型認知症,レビー小体型認知症において複数数遺伝子のプロモーター CpG アイランドのメチル化異常を同定している.それらの遺伝子には,先行研究によりその機能が判明しており,他の疾患領域においては精力的に研究が続けられている分子をコードしているものが複数あるものの,現在までに中枢神経疾患での役割は全くと言って良い程知られていないものが多数含まれていた.特に左下に示すように,神経原線維変化の一部をも染色する新規タンパク質をコードする遺伝子も見いだす事が出来ている.従って,この neuroepigenetics 解析は神経変性疾患の根本的原因に迫る全く新しい方法論であるといえる.

本研究では,サンプル数や解析部位を増加することで,統計学的パワーを上げ,より疾患への關与が強い遺伝子群の絞り込みを行う事を目標とする.初年度は脳よりの神経細胞核及びオリゴデンドログリア細胞核を抽出し,それぞれのゲノム DNA を生成し,エピゲノム解析を行う.使用する脳は正常コントロール,アルツハイマー病,レビー小体病と病理診断された患者の剖検脳で,下側頭回,前帯状回,小脳皮質を使用する.それぞれ 2g 程度の脳より FACS を使用し,100 万程度の細胞核を抽出することで,マイクログラム単位のゲノム DNA を抽出可能となる.FACS に細胞核を供する方法としては,確立された方法(Iwamoto 2011, Iwata, 2014)を用いて,抗 NeuN 抗体,抗 Olig2 抗体(Naruse 2015)を使用して成熟神経細胞核,オリゴデンドログリア核を精製する.ここで得られた細胞核の一部をバイサルファイト変換後に DNA メチル化解析に,一部をクロマチン免疫沈降の後にヒストンメチル化,アセチル化の解析を行う.サンプルの全体量は限られ,クロマチン免疫沈降法で必要とされる DNA 量は多いため,ヒストンの修飾は代表的な H3K4me3, H3K27me3 を中心に解析する事とする.これらはそれぞれマイクログラム単位の DNA を必要とするため,FACS では 10g 程度の脳から 1000 万程度の細胞核を生成する必要があるため,既存の FACS のアップグレードを行う必要がある.ヒストンの修飾解析のためには,クロマチン免疫沈降法を使用する.生成した細胞核から標準的な方法で抗 H3K4me3 抗体,抗 H3K27me3 抗体を使用して免疫沈降を行い,結合している DNA 断片を精製する.初年度はサンプルよりの DNA 抽出に注力するが,FACS を用いて精度良く DNA メチル化及びヒストン修飾の双方の解析を可能とする程の DNA を抽出する為には,1 サンプルあたり最低 2 日程度の作業が必要となる事を考慮すると,全 100 サンプル程度の処理には優に当該年度一杯かかる事が想定される.抽出されたゲノム DNA については標準的な方法でその品質を測定し,必要であれば前ステップを反復する.

データ解析,探索

前年度に抽出した神経細胞核を 2 つに分け一方はメチル化解析に,もう一方はヒストンアセチル化解析を行う.まず,メチル化は,EZ ENA Methylation (ZYMO)を用いて,得られたゲノム DNA をバイサルファイト変換し,Illumina Human Methylation 450k Beadchip (Dedeurwaerder, 2011)もしくは Methylation EPIC を用いて,ゲノム上の CpG についてメチル化レベルを測定する.得られた idt 形式データは Bioconductor の ChAMP パッケージを使用して読み込み,まず Quality check のため Detection p value < 0.01 のデータについて除去する.Illumina Human Methylation 450k Beadchip は 2 種の probe から構成されているため,これらの probe 間のデータを補正するために BMIQ (Beta Mixture Quantile dilation)(Teschendorff, 2013)を使用して正規化する.各 probe 毎に正常群,疾患群のメチル化レベル(値)を比較し,統計学的に有意なかつ平均値の差が一定以上の probe を DMP(Differentially methylated probe)として検索する.DNA メチル化による遺伝子の発現制御が一つの CpG ではなく領域単位に行われていることをふまえて,3probe 以上の DMP が連続している領域を DMR(Differentially methylated region)として定義する.その様にして得られてきた遺伝子群の CpG アイランドについて Qiagen 社 Pyrosequencer を用いて確認を行い,統計的有意差のある事を確定する.

一方,ヒストン修飾についてはクロマチン免疫沈降法を用いて抽出したゲノム DNA を精製し,当施設にある HiSeq, MiSeq 次世代シーケンサーを用いて網羅的にシーケンスし両者のヒストン修飾の重い領域の配列を取得する.得られたデータは同様に Bioconductor を使用して解析し,正常群,アルツハイマー病群,レビー小体病群の結果を比較し,疾患特異的な領域を取得する.この解析では Illumina の解析とは異なり塩基単位でのデータ取得が可能であるため,プロモーター部位のヒストン修飾について既存の研究では未知であったものも見いだす事が可能と考えた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Taro Bannai, Tatsuo Mano, Xigui Chen, Gaku Ohtomo, Ryo Ohtomo, Takeyuki Tsuchida, Kagari Koshi-Mano, Tadafumi Hashimoto, Hitoshi Okazawa, Takeshi Iwatsubo, Shoji Tsuji, Tatsushi Toda, Atsushi Iwata (CO) Chronic cerebral hypoperfusion shifts the equilibrium of amyloid oligomers to aggregation-prone species with higher molecular weight. *Sci Rep* 9 2827 2019
2. Takeyuki Tsuchida, Tatsuo Mano, Kagari-Koshi-Mano, Taro Bannai, Satoshi Yamashita, Toshikazu Ushijima, Kenichi Nagata, Shigeo Murayama, Tatsushi Toda, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata (CO) Methylation changes and aberrant expression of FGFR3 in Lewy body disease neurons. *Brain Res* 1697 59-66 2018
3. Ryo Ohtomo, Taro Bannai, Gaku Ohtomo, Akihiro Shindo, Hidekazu Tomimoto, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata (CO) Therapeutic effect of cilostazol towards chronic cerebral hypoperfusion in mice: Implication from gene expression analysis. *Neurosci Lett* 662 247-252 2018
4. Kenichi Nagata, Tatsuo Mano, Shigeo Murayama, Takaomi C. Saido, Atsushi Iwata (CO) DNA methylation level of the neprilysin promoter in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 670 8-13 2018
5. Ryo Ohtomo, Atsushi Iwata, Ken Arai Molecular mechanisms of oligodendrocyte regeneration in white matter-related diseases. *Int J Mol Sci* 19(6) 1743 2018
6. 間野かがり, 岩田淳 パーキンソン病・アルツハイマー病のエピゲノム *Clinical Neuroscience* 36(2) 227-229 2018
7. 間野達雄, 岩田淳 神経細胞特異的メチル化解析から明らかになったアルツハイマー病における DNA 修復の障害 *実験医学* 36(4) 556-559 2018
8. 間野 達雄, 岩田 淳 神経変性疾患とエピジェネティクス *アンチエイジング医学* 12(6) 776-782 2017
9. 土田 剛行, 岩田 淳 パーキンソン病とエピジェネティクス *医学のあゆみ* 262(6) 622-626 2017
10. 間野 達雄, 岩田 淳 認知症のエピジェネティクス *実験医学* 35(12) 2030-2033 2017
11. Tatsuo Mano, Kenichi Nagata, Takashi Nonaka, Airi Tarutani, Tomohiro Imamura, Tadafumi Hashimoto, Taro Bannai, Kagari Koshi-Mano, Takeyuki Tsuchida, Ryo Ohtomo, Junko Takahashi-Fujigasaki, Satoshi Yamashita, Yasumasa Ohyagi, Ryo Yamazaki, Shoji Tsuji, Akira Tamaoka, Takeshi Ikeuchi, Takaomi C. Saido, Takeshi Iwatsubo, Toshikazu Ushijima, Shigeo Murayama, Masato Hasegawa, Atsushi Iwata (CO) Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation of BRCA1 and its tau-related dysfunction in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 114(45) E9645-E9654 2017

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Tatsuo Mano, Kenichi Nagata, Shigeo Murayama, Takaomi C Saido, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation of BRCA1 against A β -induced DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Society for Neuroscience* 2016 2016 San Diego, CA, USA
2. Atsushi Iwata, Tatsuo Mano, Ryo Ohtomo, Kenichi Nagata, Takaomi Saido, Satoshi Yamashita, Toshikazu Ushijima, Tadafumi Hashimoto, Akira Tamaoka, Takeshi Iwatsubo, Shoji Tsuji Neuron-specific methylome analysis reveals new pathomechanism in Alzheimer's disease brains. *AAIC (Alzheimer's association International Conference)* 2016 Toronto, ON, Canada
3. Tatsuo Mano, Shigeo Murayama, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata Epigenetic regulation of BRCA1 in Alzheimer's disease. Evaluation of post-mortem brain and model mice reveals importance of aggregated tau. *AAIC (Alzheimer's association International Conference)* 2016 Toronto, ON, Canada
4. Ryo Ohtomo, Taro Bannai, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata Cilostazol protects the white matter from demyelination caused by chronic cerebral ischemia. *American Academy of Neurology, annual meeting* 2016 Vancouver, BC, Canada
5. Tatsuo Mano, Kenichi Nagata, Shigeo Murayama, Takaomi C. Saido, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata Epigenome wide analysis of neuron specific DNA methylation in Alzheimer disease. *The 13th International Congress of Human Genetics* 2016 Kyoto, Japan
6. Tatsuo Mano, Atsushi Iwata In vitro AD model with human neuronal progenitor cells demonstrates BRCA1 involvement in DNA repair in differentiated neuronal cells. *23th World Congress of Neurology* 2017 Kyoto, Japan
7. Kagari Koshi-Mano, Tatsuo Mano, Atsushi Iwata Analysis of Neuron-specific histone modifications. *23th World Congress of Neurology* 2017 Kyoto, Japan
8. Taro Bannai, Ryo Ohtomo, Tatsuo Mano, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposits in APP/PS1 transgenic mice.

- 23th World Congress of Neurology 2017 Kyoto, Japan
9. Atsushi Iwata Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation and tau-related dysfunction of BRCA1 in Alzheimer's disease. The 7th BRI International Symposium 2017 Niigata, Japan
 10. Tatsuo Mano, Atsushi Iwata, Takashi Nonaka, Airi Tarutani, Tadafumi Hashimoto, Masato Hasegawa, Takeshi Iwatsubo, Tatsushi Toda Tau-related dysfunction of BRCA1 lead to reduced neuronal plasticity in Alzheimer's disease AAIC 2018 Chicago, USA
 11. Taro Bannai, Atsushi Iwata, Tatsuo Mano, Ryo Ohtomo, Gaku Ohtomo, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo, Tatsushi Toda Chronic cerebral hypoperfusion increases amyloid plaques by accelerating amyloid beta aggregation in APP/PS1 transgenic mice. AAIC 2018 2018 Chicago, USA
 12. Kagari Mano, Tatsuo Mano, Atsushi Iwata, Shigeo Murayama, Tatsushi Toda Neuron-specific histone modification analysis of sporadic Alzheimer's disease AAIC 2018 2018 Chicago, USA
 13. Tatsuo Mano, Atsushi Iwata, Takashi Nonaka, Airi Tarutani, Tadafumi Hashimoto, Masato Hasegawa, Takeshi Iwatsubo, Tatsushi Toda Tau-related dysfunction of BRCA1 lead to reduced neuronal plasticity in Alzheimer's disease American Academy of Neurology 70th Annual Meeting 2018 Los Angeles, CA

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。