

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19770

研究課題名(和文) ダウン症候群とアルツハイマー病のAPP遺伝子DNAメチル化ヒドロキシメチル化解析

研究課題名(英文) Analysis of methylation of APP gene in Alzheimer's disease and Down syndrome

研究代表者

森 蓉子(Mori, Yoko)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30646245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病はアミロイドβの異常蓄積によって発症することが知られる。このことからアミロイド蛋白をコードするAPP遺伝子の発現調節機構に着目し、アルツハイマー病患者とAPP遺伝子が存在する21番染色体トリソミーであるダウン症候群患者の末梢血を用いたAPP遺伝子プロモーター領域におけるDNAメチル化割合の解析を行った。ダウン症患者ではメチル化割合の増加が認められ、また年齢と共に高くなる傾向がみられた。アルツハイマー病患者では重症群でメチル化割合の増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は現在65歳以上の5人に1人が認知症と言われる我が国において早期診断を確実に行うことが求められている疾患の一つである。本研究では末梢血を用いてアルツハイマー病とダウン症候群患者でのAPP遺伝子のメチル化割合を解析することでその発現調節機構の一端を解明し、脳内でアミロイドβが蓄積されつつある段階で末梢血でAPP遺伝子のメチル化割合の解析を行うことが早期診断につながる可能性について検討した

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is known as the most frequent causes of degenerative dementia that is produced by the abnormal accumulation of beta amyloid (Aβ). Aβ derives from amyloid precursor protein (APP) that is one of the responsible gene for familial AD. Down syndrome (DS) is caused by triplication of chromosome 21 which includes APP gene (21q21). In DS, the cognitive decline occurs in early 40s caused by similarly pathology with AD. In this study, we analyzed the DNA methylation rate at 27 CpG site in APP promoter region in AD patients and DS patients compared to each control subjects. Genomic DNA from peripheral leukocytes was analyzed. In DS, the methylation rate was significantly higher than control subjects and was tend to increase with advancing age. In AD patients the methylation rate was higher in severe cognitive dysfunction group than mild dysfunction group.

研究分野：生物学的精神医学

キーワード：アルツハイマー病 ダウン症候群 メチル化解析 遺伝子発現 APP遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)は約 6 割を占める認知症であり、加齢とともに発症リスクが増加することや APOE 遺伝子 $\epsilon 4$ アレルの保有が発症リスクに関わることが知られている。アミロイド β タンパク ($A\beta$) 沈着による老人斑の出現やリン酸化タウタンパクに由来する神経原線維変化などの病理学的な脳の変化が主体で、精神神経症状が出現し、我々精神科医が診断、治療に関わることも多い。高齢化が進み、65 歳以上の 5 人に 1 人が認知症患者と言われるわが国において、早期から確実な臨床診断を行えるようにすることは、治療やケアを確実にを行うために急務であり、正しい診断に基づき治療することは、精神科医のみならず、一般内科医にも求められるようになってきている。幸い、近年では PET によるアミロイドイメージング、髄液 $A\beta$ の定量、髄液リン酸化タウタンパクの定量などが現実的となってきたが、まだ研究段階に過ぎない。なぜなら、アミロイドイメージングはごく限定された施設でしか施行できず、髄液採取は侵襲性が高く一般外来で施行するのは困難であるためである。このため、血液、尿などの侵襲性の低い材料を利用した早期からの診断可能なバイオマーカーの発見が望まれている。

老人斑の主要分子である $A\beta$ は、21 番染色体上の amyloid precursor protein (APP) 遺伝子に由来する。APP 遺伝子変異により発症する家族性若年性アルツハイマー病も報告されているが、遺伝子変異による AD はごくわずかであり、ほとんどの AD 患者は、高齢発症であり、遺伝子解析では診断確定には到らない。そのため、近年、遺伝子変異のみならず、発現を調節するエピジェネティクスが注目されている。中でも DNA メチル化は、主要な発現調節機構であり、遺伝子 DNA 上のシトシンの高メチル化により発現を抑制するとされてきた。

一方ダウン症候群 (Down syndrome; DS) は、21 番染色体が 3 本あることにより生ずる、最も多い染色体異常症である。知的障害、行動障害などの精神障害の他、心疾患、白血病、甲状腺疾患、消化器疾患など多数の身体的合併症を伴う。その臨床的な表現型には 80 以上のタイプがあるとされ、例えば同じ 20 歳のダウン症患者でも、就労も可能な者と会話すら困難な者がいる。同じ 21 番染色体トリソミーであるにも関わらず、なぜこのような違いが生じるのかは明らかでない。理論的には 21 番染色体上の遺伝子は DS 患者では健常者の 1.5 倍増加すると考えられるが、実際には 1.5 倍以上、1.5 倍以下、健常者と同程度と、21 番染色体上の遺伝子発現も様々であることも知られている。このように遺伝子発現が理論的にならない理由の一つに DNA メチル化による発現調節機構の関与があると推察されている。また DS では 21 番染色体だけでなく様々な染色体上にある遺伝子の発現や DNA メチル化が変化していることも示唆されている。これらのことから、網羅的な発現調節機構が病態に関与していると考えられる必要がある。

DS では 40 代頃より AD と同様、脳に $A\beta$ の過剰蓄積や神経原線維変化が見られ、早発性に認知機能障害を来することが知られている。成人の DS 脳では正常の 4 倍以上の APP 遺伝子の過剰発現が認められるとの報告や、PET イメージング研究でも DS では認知症発症前から年齢依存的に $A\beta$ の過剰蓄積がみられることが報告されているが、末梢血などの採取の容易な組織を材料とした研究は少ない。DS 患者で年齢や認知機能の程度に相関してメチル化割合が変化する末梢血由来の遺伝子を同定することで、AD のバイオマーカー探索の手がかりになると思われる。

2. 研究の目的

DS における APP 遺伝子プロモーター領域及び、5'非翻訳領域の DNA メチル化割合を解析し、年齢や発達指数との関連を解析することで、アルツハイマー病における DNA メチル化割合の変化の成因について推測するとともに、アルツハイマー病のバイオマーカーの探索につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

全てのサンプルの DNA は EDTA 採血管にて採取した末梢血より抽出した白血球より QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社)を用いて、自動核酸精製装置である QIAcube (QIAGEN 社)により精製、抽出した。mRNA については PAXgene RNA 採血管 (日本 BD 社)にて採取した末梢血全血より PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN 社)を用いて精製、抽出した。

30ng/ μ l に調整した DNA を Epiect plus bisulfite kit (QIAGEN 社)を用いて、DNA のバイサルファイト変換を行い、非 5-メチル化シトシンをウラシルに変換した。バイサルファイト変換後 DNA を図 1 に示すプロトコルで PCR 法にて増幅し、PyroMark advanced (QIAGEN 社)を用いたパイロシーケンス法にて、5-メチル化シトシンの割合を測定した。解析した APP 遺伝子のプロモーター領域とその配列を図 2 に示した。図 1 の通り、プロモーター領域のうちの 2 領域(プロモーター A: -369 ~ -306、プロモーター B: -21 ~ +79)において、計 27 か所の CpG サイトで解析を行った(プロモーター A: CpG1 ~ CpG7、プロモーター B: CpG8 ~ CpG27)。ただし AD を対象としたものについてはプロモーター B のみを解析対象とした。

末梢血における APP 遺伝子の mRNA の発現は、Taqman プローブ (アプライドバイオシステムズ社) Step one plus (アプライドバイオシステムズ社)を用いた real time PCR 法で測

定し、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて解析した。

メチル化解析、遺伝子発現解析いずれも各サンプルについて同じ解析を三回行い、その平均値を用いて統計解析した。

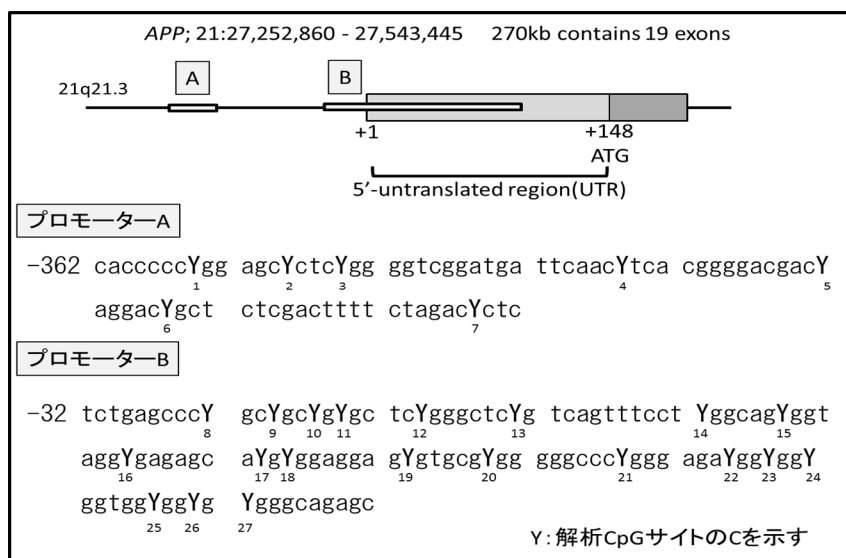
統計解析は各群のプロフィールについてはカイ二乗検定を用いた。DNA メチル化割合の解析及びmRNA 発現解析は student T 検定、Mann-Whitney U 検定を用いた。またそれぞれの二変量解析は Pearson の相関件数または Spearman の順位相関件数を用いた。全ての統計解析は SPSS Statics22 (IBM 社) にて行った。

ダウン症候群群 (DS 群) 5 名 (男性 2 名、女性 3 名、平均年齢 42.6 ± 22.5 歳) コントロール群 (DS-C 群) 6 名 (男性 3 名、女性 3 名、平均年齢 38.8 ± 21.7 歳) を対象とした。各群の性、年齢に有意な差は認めなかった。DS 群の診断については過去に染色体検査にて 21-trisomy が確認されていることを診療録より確認した。

また、アルツハイマー病群 (AD 群) 25 名 (男性 7 名、女性 18 名、平均年齢 79.4 ± 4.0 歳) コントロール群 (AD-C 群) 24 名 (男性 12 名、女性 12 名、平均年齢 77.3 ± 3.7 歳) を対象とした。各群の性、年齢に有意な差は認めず、MMSE (Mini Mental State Examination) の得点は AD 群で有意に低かった。AD 群は NIA-AA の診断基準で probable AD dematia を満たし 65 歳以上で発症したものを対象とした。AD-C 群は精神科医の診察で健常であると判断され、かつ MMSE が 30 点であるもの、もしくは MMSE が 28 点以上で頭部 CT や脳 MRI 検査で異常を認めないものとした。AD 群は介護者からの聴取をもとに CDR (Clinical Demantia Rating) を評価した。各群のプロフィールを表 1 に示した。

volume (μl) per one reaction	
bisulfite converted gDNA	4.5
10X PCR Buffer with 15mM MgCl ₂	3.0
2mM dNTP	3.0
Forward primer (10μM)	0.6
biotinated Reverse primer (10μM)	0.6
H ₂ O	18.1
AmpliTaQGold	0.2
total	30.0
promoter A Forward primer; AGAGTTTGGGGTTAGGAGAGG Reverse primer; CACCCTAACACAATCCTTTATAC-biotin	
promoter B Forward primer; GGGGTGGGTCGATTAGTTGAT Reverse primer; CAAACCACCAACAAAACAATACCAAAACC-biotin	

(図 1)



(図 2)

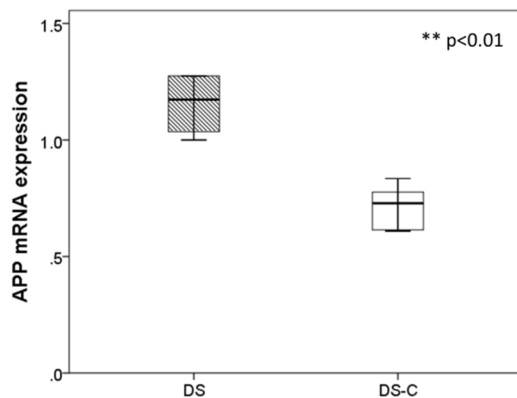
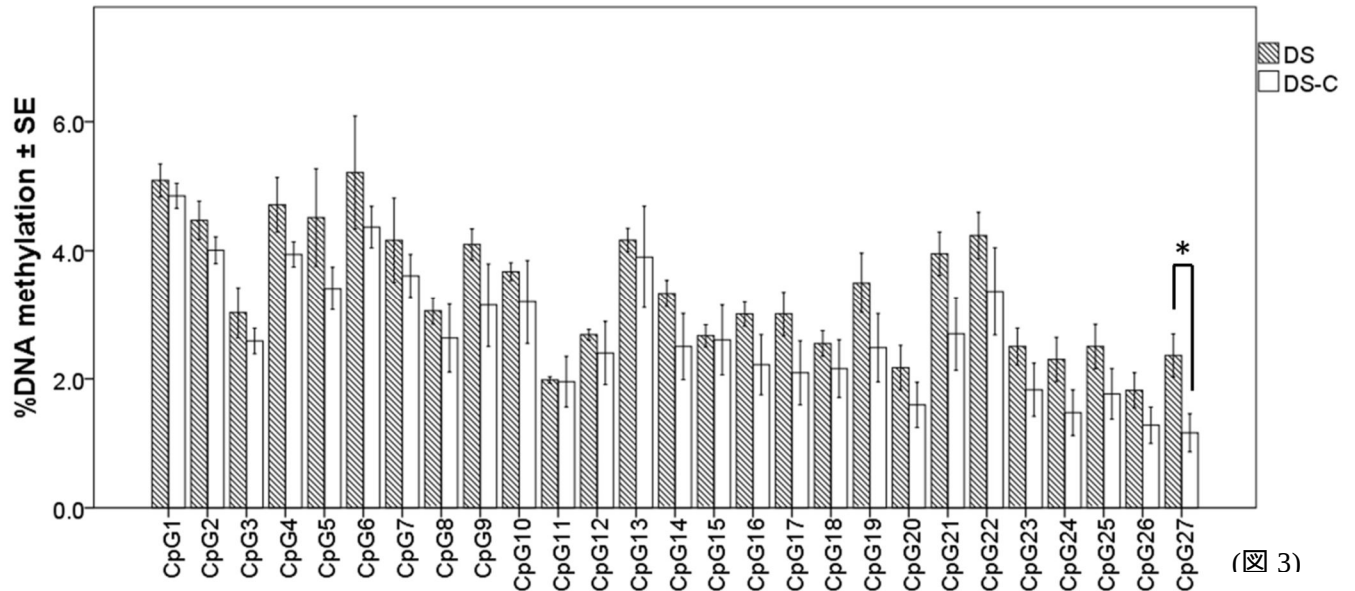
	(平均 ± SD)		
	DS (n = 5)	DS-C (n = 6)	
年齢 (歳)	42.6 ± 22.5	38.8 ± 21.7	p = 0.79
性別 (男性 : 女性)	3 : 2	3 : 3	p = 0.74
	AD (n = 25)	AD-C (n = 24)	
年齢 (歳)	79.4 ± 4.0	77.3 ± 3.7	p = 0.06
性別 (男性 : 女性)	7 : 18	12 : 12	p = 0.11
MMSE	18.0 ± 5.7	29.7 ± 0.62	p < 0.01
CDR	0 : 1 : 7 : 14 : 3	24 : 0 : 0 : 0 : 0	-

MMSE : Mini Mental State Examination
CDR : Clinical Dementia Rating

(表 1)

4. 研究成果

全ての CpG サイトにおいて DS 群でメチル化割合が高い傾向にあり、CpG27 においては有意差を持って DS 群でメチル化割合が高かった ($p=0.024$ 、図 3)。また、各群において DNA メチル化割合は年齢と正の相関をとる傾向がみられた (表 2)。APP 遺伝子 mRNA 発現は DS 群で有意に高かった ($p<0.01$ 、図 4)。



(図 4)

	DS		DS-C	
	r値	p値	r値	p値
CpG1	0.98	0.003 **	0.75	0.89
CpG2	0.89	0.046 *	-0.22	0.68
CpG3	0.85	0.07	0.15	0.78
CpG4	0.81	0.1	-0.18	0.74
CpG5	0.83	0.08	-0.06	0.91
CpG6	0.84	0.08	0.64	0.17
CpG7	0.80	0.1	0.64	0.17
CpG8	0.95	0.013 *	0.84	0.04 *
CpG9	0.95	0.014 *	0.90	0.02 *
CpG10	0.71	0.18	0.96	0.003 **
CpG11	0.74	0.15	0.41	0.43
CpG12	0.83	0.08	0.32	0.54
CpG13	0.69	0.2	0.99	<0.01 **
CpG14	0.93	0.02 *	0.41	0.43
CpG15	0.41	0.5	0.99	<0.01 **
CpG16	0.9	0.04 *	0.90	0.02 *
CpG17	0.85	0.07	0.82	0.047 *
CpG18	0.91	0.03 *	0.61	0.2
CpG19	0.81	0.9	0.60	0.21
CpG20	0.81	0.06	0.59	0.22
CpG21	0.84	0.08	0.93	0.01 **
CpG22	0.8	0.1	0.41	0.43
CpG23	0.9	0.04 *	0.77	0.07
CpG24	0.89	0.04 *	0.76	0.08
CpG25	0.9	0.04 *	0.76	0.08
CpG26	0.83	0.08	0.54	0.27
CpG27	0.87	0.06	0.79	0.06

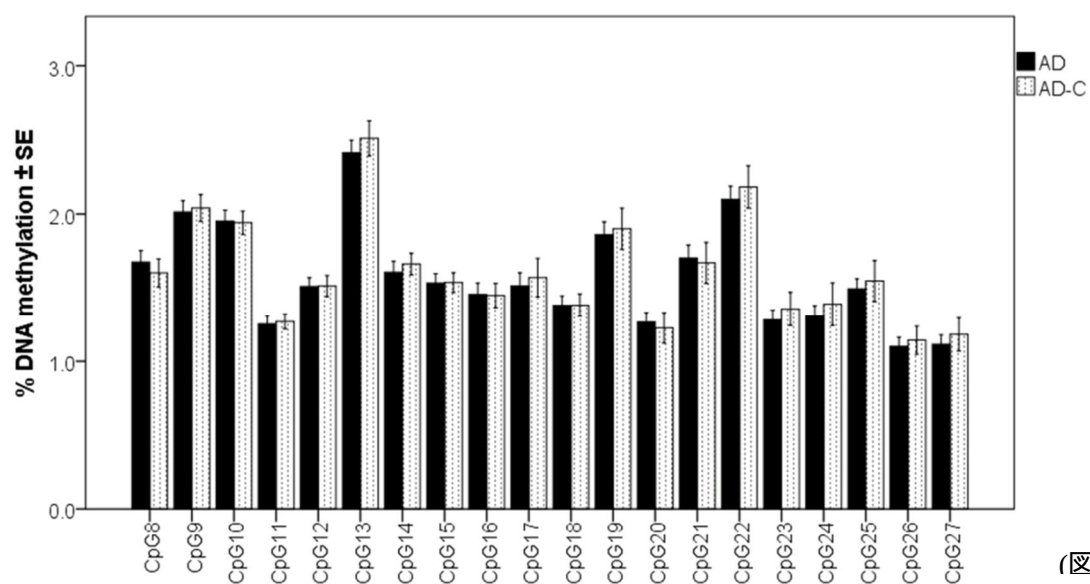
(表 2)

promoter B(CpG8 ~ CpG27)について AD 群と AD-C 群でメチル化割合に有意な差は認めなかった (図 5)。

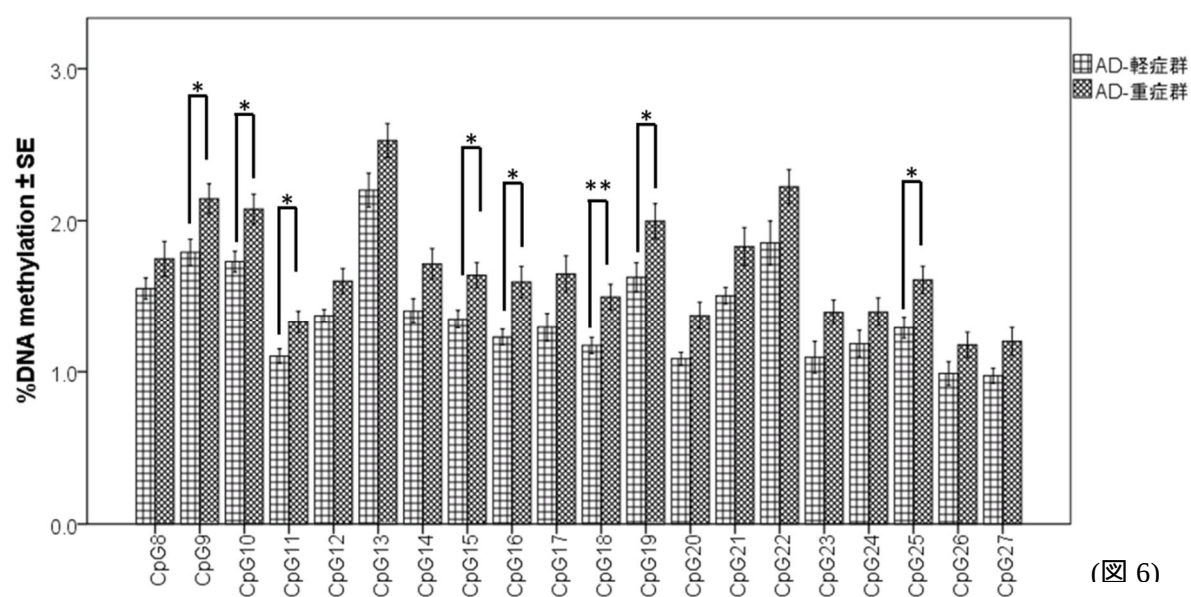
AD 群を CDR により AD-軽症群 (CDR:0.5 ~ 1)、AD-重症群 (CDR:2 ~ 3) に分類した。各群のプロフィールは表 3 の通りであった。重症群でメチル化割合が高い傾向があり、特に CpG9、CpG10、CpG11、CpG15、CpG16、CpG18、CpG19、CpG25 では有意にメチル化割合が高かった (図 6)。APP 遺伝子の mRNA 発現については AD 群と AD-C 群、AD 軽症群と AD 重症群の間に差は認めなかった。AD 群や AD-C 群においてはメチル化割合と年齢や MMSE (Mini Mental State Examination) の間で有意な相関は認めなかった。

	軽症群 (n = 8)	重症群 (n = 17)	
年齢(歳)	79.8 ± 3.1	79.2 ± 4.5	p = 0.77
性別 (男性: 女性)	2 : 6	5:12	p = 0.82

(表 3)



(图 5)



(图 6)

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 特記事項なし

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

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：大西千恵美

ローマ字氏名：Onishi Chiemi

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。