

令和元年6月21日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16381

研究課題名(和文)白血球のDRD2メチル化率を用いたバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Detecting the biomarker with DRD2 DNA methylation of leukocyte

研究代表者

吉野 祐太 (Yosihno, Yuta)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10646243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：精神神経疾患のバイオマーカーを探索することを目的に、血液を用いた解析を行った。以前に報告したDRD2遺伝子プロモーター部位のDNAメチル化率を大うつ病性障害、パーキンソン病、レヴィー小体型認知症を対象に測定し、加えてDRD2遺伝子多型(-141C insertion/deletion多型)がDNAメチル化に影響するかを検討した。その結果、-141C ins/del多型がDRD2遺伝子のメチル化率に影響を与えていることを見出した。また、DRD2遺伝子メチル化率は、健常者と比較して大うつ病性障害では変化していないが、パーキンソン病とレヴィー小体型認知症ではメチル化率に差があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子DNAメチル化率は、遺伝子発現調節機構の一つであるが、私は既報で統合失調症において白血球中DRD2遺伝子DNAメチル化率が変化していることを報告していた。今回、このメチル化率が、大うつ病性障害では変化していないこと、パーキンソン病、レヴィー小体型認知症では変化していることがわかり、ドパミン系が関わる精神神経疾患のバイオマーカーとして用いられる可能性が示された。また、DRD2遺伝子-141C insertion/deletion多型もメチル化率に影響していたことから、精神神経疾患の発症には、様々な段階での調節が関わっていることが改めて確認されたことは意味深いと考える。

研究成果の概要(英文)：To our knowledge, any useful biomarkers are not available in clinical psychiatric field. The purpose of this study is to detect a useful biomarker using human blood sample. I focused on DNA methylation of the DRD2 gene already reported by myself and expanded the diseases from schizophrenia to major depressive disorder, Parkinson's disease, and Dementia with Lewy Bodies. In addition, I planned to reveal whether the -141C insertion/deletion polymorphism affects DRD2 DNA methylation or not. In results, it was revealed that the -141C insertion/deletion polymorphism relates DRD2 DNA methylation ratio. In Addition, DRD2 DNA methylation ratio were changed in Parkinson's disease and Dementia with Lewy Bodies from control subjects, but not in major depressive disorder.

研究分野：精神神経疾患

キーワード：統合失調症 大うつ病性障害 パーキンソン病 レヴィー小体型認知症 DRD2遺伝子 DNAメチル化

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

1. 研究開始当初の背景

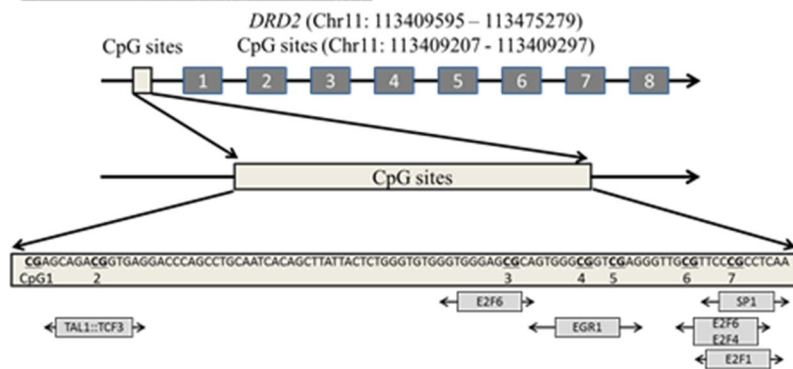
統合失調症は、1%の有病率をもつ common disease であるが、原因は未だ明らかではなく、臨床応用できるバイオマーカーもないため、現在も症候学的に診断し治療される疾患である。統合失調症の様々な仮説がある中、ドパミン仮説は 1960 年代から提唱され、現在もこの仮説に基づき創薬、研究がなされている。私は DNA メチル化が遺伝子発現に影響を与えること (Pacchierotti et al. 2015) から、DRD2 遺伝子プロモーター領域 DNA メチル化率が統合失調症のバイオマーカーとして用いることができると予想し解析を試みた。これまで、遺伝子メチル化の測定方法として、メチル化特異的 PCR 法やクローニング法を用いた解析など伝統的な手法があるが、パイロシーケンス法はクローニングバイアスがなく、わずか数%のメチル化率の差を検出できる点で定量性に優れていると考え注目した。しかし、パイロシーケンシング法は、装置とランニングコストが高価であることや、測定方法のプロトコール確立が難しいことから、未だ普及しているとは言えない欠点があった。私は、パイロシーケンサー PyroMark Q24 (Qiagen) を用い標準化した測定法を確立し、信頼性の高いデータを得ることで、末梢白血球 DNA の Dopamine receptor D2 遺伝子 (*DRD2*) のエクソン 1 上流のメチル化率が統合失調症患者において有意に低下していることを見出し、診断バイオマーカーとなりうることを報告した (Yoshino et al. 2016)。

DRD2 は統合失調症のみならず、1) 大うつ病性障害 (Kaalund et al. 2014)、2) 自閉スペクトラム症 (Gangi et al. 2016) などの精神疾患、ドパミン系が関与する 3) パーキンソン病 (Masellis et al. 2016) や 4) レヴィー小体型認知症 (Sun et al. 2013) などの神経変性疾患にも関与するため、注目に値すると考えられる。

2. 研究の目的

今回の研究では、DNA 配列から転写因子が結合する部位を計算するソフト (JASPAR) を用いて CG 配列に EGR1、E2F6 などの転写因子が結合する部位をターゲットに決定した (図 1)。

図1. *DRD2*メチル化率測定ターゲット領域



領域の DNA メチル化率を常法で測定したところ、データのバラつきが大きいことが判明したため、私は 1) DNA の精製効率を改善する、2) パイロセファイト処理後の PCR 産物をカラム法で濃縮する、3) メチル化率測定には通常以上の DNA 量を用いる、などの定量性を向上させるプロトコールを確立し、この

領域の解析を可能にした (Yoshino et al. 2016)。これまでの解析から、7CpG サイトの DNA メチル化率を用いた判別分析にて、統合失調症薬物内服群 (n = 50) では感度: 80%、特異度: 72%、薬物非内服群 (n = 18) では感度: 89%、特異度: 72%とバイオマーカーとして期待できるデータを得ることができている。今までの解析では、統合失調症のサンプルがまだ十分ではないこと、疾患特異性の検討ができていないことから、今回、1) 統合失調症に関してはサンプル数を増やして再現実験を行うこと、2) 他の精神疾患で *DRD2* の DNA メチル化率を測定し検証すること、3) ドパミンが明らかに関与するパーキンソン病などの神経疾患で調べることから、*DRD2* DNA メチル化率の変化が統合失調症に疾患特異的であるか、また鑑別に役立つバイオマーカーになりうるかどうか、4) この領域に存在する機能性多型-141C insertion/deletion 多型の影響を受けるかどうか、以上の 4 点を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

【サンプル】

採取時にそれぞれ以下の症状評価尺度を用い症状を数値化した

大うつ病性障害: Hamilton Depression Rating Scale

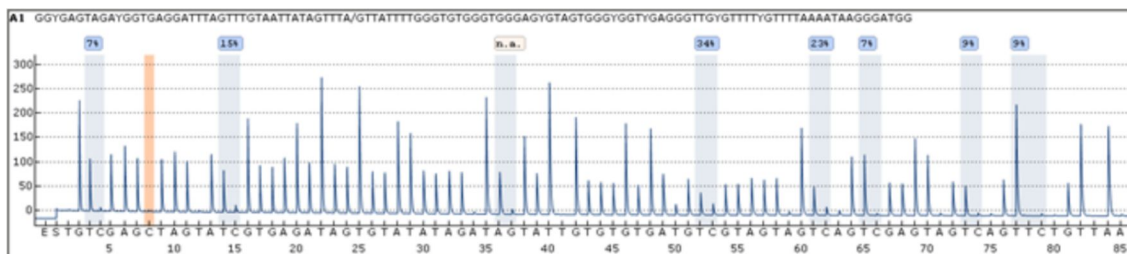
パーキンソン病: Unified Parkinson Disease Rating Scale、Mini Mental State Examination

レヴィー小体型認知症: Mini Mental State Examination

大うつ病性障害は精神科専門医、パーキンソン病は神経内科専門医、レヴィー小体型認知症は老年精神科専門医がそれぞれ診断を下した。

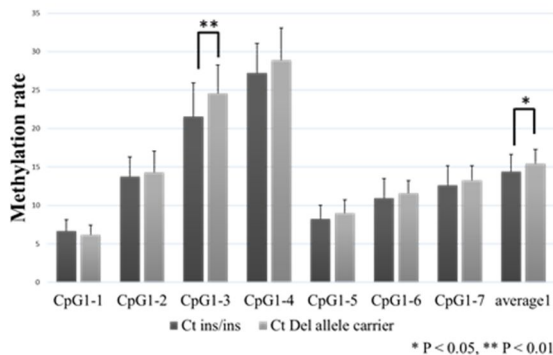
【メチル化率測定】

当科が所持している PyroMark Q24 を用いパイロシーケンス法にてメチル化率を測定した。今回のメチル化率を測定しようとする部位は *DRD2* のプロモーター領域であり、GC リッチな配列であるため、パイロシーケンス法による PCR がかりにくい部位である。PyroMark Q24 は、小数点以下のメチル化率まで測定できるためデータの信頼性は高いことが特徴であるが、微弱なシグナルを解析できるため、バラつきが大きくなる欠点がある。そのため、正確なデータを出すためには、DNA 量を増やし、質を上げるなどプロトコルを工夫する必要がある。私は、バイサルファイト変換後 PCR 法で増幅した後に、精製した DNA をカラム法を用いて定量し、解析する DNA 量を増やし定量化することにより、PyroMark Q24 の信頼度を上げるなど、抽出したデータの誤差範囲を小さくすることで、信頼性を向上させる方法を確立した (Yoshino et al., 2016)。下図のように信頼できるデータを得ることができるプロトコルを作成した。



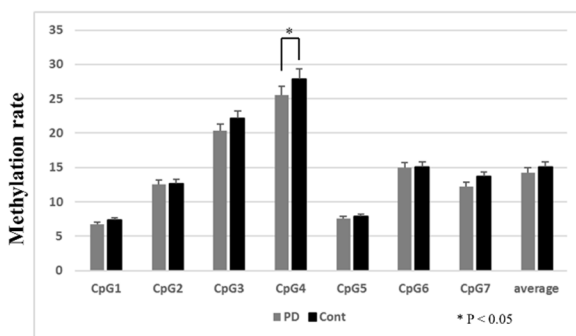
4. 研究成果

末梢血白血球 DNA のドパミン受容体 D2 (*DRD2*) 遺伝子プロモーター領域のメチル化率が統合失調症 (SCZ) で低下していることを確認していたが、今回、統合失調症以外の精神神経疾患、大うつ病性障害 (MDD)、パーキンソン病 (PD)、レヴィー小体型認知症 (DLB) などを追加し、

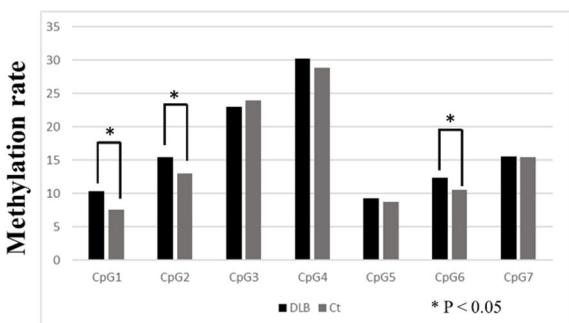


同部位のメチル化率を各々の疾患で測定し、健常対象者と比較することで、病態との関連について検討した。

まず、健常者を対照とした統合失調症のセカンドセット (n=50) において、これまで報告したパイロット研究 (Yoshino et al., 2016) と同様の結果が得られた。続いて、プロモーター領域の更に下流の -141C insertion/deletion 多型を含む領域のメチル化率を調べたところ、この多型がメチル化率に影響を与えていることを見出した。-141C insertion/deletion 多型は、これまで薬剤反応性など副作用と関連すると報告されているが、*DRD2* 遺伝子のメチル化率にも影響を与え、発現量が調節されている可能性が考えられた。



次に、*DRD2* メチル化率の解析を以下の精神神経疾患で行った。MDD (n=50) では有意な変化を認めなかった。続いて PD や DLB などの神経変性疾患で検証した。PD (n=37) では統合失調症同様メチル化率が低下していたが、DLB (n=30) では上昇していた。PD や DLB は、共にドパミン系が影響する疾患であり、*DRD2* 遺伝子発現が変化すると考えられる疾患であり、Lewy body の蓄積がみられる点では共通の病理を持つが、Lewy body の蓄積する部位が異なっている事がわかっている。末梢血白血球での *DRD2* メチル化率の変化の差は、Lewy body の蓄積部位の違いと関係があると考えている。



以上まとめると、*DRD2* 遺伝子プロモーター領域のメチル化率は -141C insertion/deletion による影響を受けて

いた。そして、SCZ で低下しているが MDD では変化しておらず、精神疾患では SCZ に特異的な変化であるかもしれない。PD や DLB でこの遺伝子のメチル化率は変化していることから、ドパミン系に関わる精神神経疾患では総じて変化しており、バイオマーカーとして用いること

ができる可能性がある。今回、バイオマーカーとなることを考え末梢血を試料としたが、今後、脳内でのメチル化率を含めた遺伝子発現変化と直接比較しながら解析する必要があると考えている。

【引用文献】

Gangi DN, Messinger DS, Martin ER, Cuccaro ML. Dopaminergic variants in siblings at high risk for autism: Associations with initiating joint attention. *Autism Res.* 2016 Nov;9(11):1142-1150. doi: 10.1002/aur.1623.

Kaalund SS, Newburn EN, Ye T, Tao R, Li C, Deep-Soboslay A, Herman MM, Hyde TM, Weinberger DR, Lipska BK, Kleinman JE. Contrasting changes in DRD1 and DRD2 splice variant expression in schizophrenia and affective disorders, and associations with SNPs in postmortem brain. *Mol Psychiatry.* 2014 Dec;19(12):1258-66. doi: 10.1038/mp.2013.165.

Masellis M, Collinson S, Freeman N, Tampakeras M, Levy J, Tchelet A, Eyal E, Berkovich E, Eliaz RE, Abler V, Grossman I, Fitzer-Attas C, Tiwari A, Hayden MR, Kennedy JL, Lang AE, Knight J; ADAGIO investigators. Dopamine D2 receptor gene variants and response to rasagiline in early Parkinson's disease: a pharmacogenetic study. *Brain.* 2016 Jul;139(Pt 7):2050-62. doi: 10.1093/brain/aww109.

Pacchierotti F, Spanò M. Environmental Impact on DNA Methylation in the Germline: State of the Art and Gaps of Knowledge. *Biomed Res Int.* 2015;2015:123484. doi: 10.1155/2015/123484.

Sun J, Cairns NJ, Perlmutter JS, Mach RH, Xu J. Regulation of dopamine D₃ receptor in the striatal regions and substantia nigra in diffuse Lewy body disease. *Neuroscience.* 2013 Sep 17;248:112-26. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.05.048.

Yoshino Y, Kawabe K, Mori T, Mori Y, Yamazaki K, Numata S, Nakata S, Yoshida T, Iga J, Ohmori T, Ueno S. Low methylation rates of dopamine receptor D2 gene promoter sites in Japanese schizophrenia subjects. *World J Biol Psychiatry.* 2016 Sep;17(6):449-56. doi: 10.1080/15622975.2016.1197424.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Yu Funahashi, Yuta Yoshino, Kiyohiro Yamazaki, Yuki Ozaki, Yoko Mori, Takaaki Mori, Shinichiro Ochi, Jun-ichi Iga, Shu-ichi Ueno. Analysis of methylation and -141C Ins/Del polymorphisms of the dopamine receptor D2 gene in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research.* 査読有. In press.

〔学会発表〕(計1件)

1. 吉野祐太 精神疾患とエピジェネティクス、精神神経疾患における DRD2 遺伝子メチル化の意義. 2017年 第39回日本生物学的精神医学会

〔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：

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：

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。