

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：35308

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07575

研究課題名(和文) ゲノム編集を用いたBDNFメチル化操作による新規うつ病モデル・マーカー・治療開発

研究課題名(英文) Development of newer animal model, biomarker, and treatment of depression by regulation of BDNF gene methylation using genome editing

研究代表者

森信 繁 (Morinobu, Shigeru)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：30191042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病の病態に脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現の低下が関与し、その機序がBDNF遺伝子のexon 1Vのpromoter領域のシトシンのメチル化率亢進にある事を実証する目的で、遺伝子編集技術を用いたBDNF遺伝子のメチル化率の人工的操作法を開発した。BDNF遺伝子の上記領域にあるシトシンのメチル化率を変化させるため、dCas9-Tet1(メチル化率の減少)或いはdCas9-Dnmt3a(亢進)を発現するレンチウイルスベクターと、上記領域に特異的なgRNAを一緒にマウス初代培養細胞に導入した結果、BDNF遺伝子のメチル化率を制御する事(Tet1で減少・Dnmt3aで亢進)が出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病動物モデルの脳およびうつ病患者の末梢血・脳由来DNAを対象としたBDNF遺伝子のシトシンのメチル化研究から、BDNF遺伝子exon 1Vのpromoter領域のメチル化率の低下が報告されている。しかしながらこれらのメチル化率の変化が、うつ病の原因として特異的な変化であるかは不明である。本研究の成果によってマウスを対象にBDNF遺伝子のメチル化を特異的に変動させる技術が開発された事になり、今後本実験で得られた手法をマウス脳に適用する事によって、うつ病の病態のエピジェネティクス領域からの一層の解明が進むと思われる。

研究成果の概要(英文)：It is known that the decreased expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus is associated with the pathophysiology of depression. To verify the involvement of the decreased cytosine methylation rates (CMRs) within the promoter of exon IV of the BDNF gene in the pathophysiology of depression, we developed the method of the artificial manipulation of the CMRs of the BDNF gene. Lentiviruses expressing the Fuv-dCas9-Tet1CD and Fuv-dCas9-Dnmt3a and guide RNA were produced by transfecting HEK239T cells with standard packaging vectors. After calculating the virus titer, the constructs with higher titer were transfected into the primary mouse cell culture to examine whether CMRs were altered by dCas9-Tet1 or dCas9-Dnmt3a. We found that while the dCas9-Tet1 fusion protein increased the levels of BDNF mRNA and BDNF protein with the decrease in the CMRs, the dCas9-Dnmt3a fusion protein decreased the levels of BDNF mRNA and BDNF protein with the increase in the CMRs.

研究分野：分子精神医学

キーワード：脳由来神経栄養因子(BDNF) うつ病 DNA methylation Tet1 DNMT3a

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本申請者らがラット脳で脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現が、ストレスで低下し抗うつ薬及び電気けいれん処置がストレスによる発現低下を抑制する事を世界で初めて報告¹⁾して以来、多数のうつ病の病態解明を目的とした BDNF 研究が行われてきた。中でも BDNF 遺伝子の海馬でのノックアウトマウスでは抗うつ薬の効果が得られないという報告²⁾や、ヒト末梢血 BDNF 濃度のうつ病状態での低下と治療後の回復という結果³⁾は、本申請者らの提唱した「BDNF 低下によるうつ病発症仮説」を支持する成果である。上記成果を踏まえ本申請者らは、遺伝子の転写がプロモーター領域のシトシンのメチル化率によって制御されているというエピジェネティック機構に着目し、未治療うつ病患者の末梢血 DNA を用いて BDNF 遺伝子のエクソン I, IV のプロモーター領域のメチル化プロファイルを解析した⁴⁾。その解析結果から BDNF 遺伝子エクソン I, IV のプロモーター領域のメチル化プロファイルはうつ病特異的な変化を示し、うつ病の診断バイオマーカーとなる可能性を指摘した⁴⁾。しかしうつ病モデルラット側坐核では BDNF 発現は亢進しており、脳部位ごとに BDNF 発現も異なる可能性が指摘されていた。側坐核はアンヘドニア形成に重要な部位と考えられ、海馬は情動記憶の障害に密接に関与していると考えられていた。臨床医学的にもうつ病の症状は多様であり、その原因として障害される脳部位の異種性があると推測される。同時にうつ病モデル動物の脳内では BDNF 以外にも、複数の遺伝子発現の変動があり、BDNF 発現の異常が直接うつ病の病態とリンクしているかは明らかでなかった。

またうつ病とは多くの点で精神症状の異なる統合失調症でも、ヒト末梢血 DNA を対象とした BDNF 遺伝子のメチル化の障害が報告⁵⁾され、うつ病と統合失調症との BDNF 遺伝子のメチル化プロファイルの異同についての解明も求められていた。

2. 研究の目的

上記のような本申請者らの「うつ病の発症に関する BDNF 低下仮説」の提唱を受けて、本研究ではこの仮説をエピジェネティック機構(シトシンのメチル化率の障害)から実証するために以下の課題を解明することを目的とした。

(1) BDNF 遺伝子のエクソン IV のプロモーター領域のメチル化障害が、BDNF 遺伝子発現の異常を引き起こすかを実証する。

(2) このようなプロモーター領域のシトシン・メチル化率の変動が、うつ病の発症に関与しているかを解明する。

(3) このような病態研究と同時に、うつ病の診断及び治療に応用できるバイオマーカーの開発が必要とされ、特に脳内での動態を反映した末梢血バイオマーカーが望まれている。従って本申請者らがこれまで行ってきた、未治療うつ病患者を対象とした BDNF 遺伝子のメチル化のプロファイルを統合失調症患者で検索して、うつ病に特異的なメチル化障害としてバイオマーカーとなる可能性について解明した。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集技術を用いた BDNF 遺伝子メチル化操作法の開発

マウス個体において BDNF 遺伝子のメチル化状態を CRISPR/Cas9 システムを用いて操作した。ヌクレアーゼ不活化型の Cas9 (dead Cas9; dCas9) にエフェクタードメインを融合させた。エフェクタードメインとして、脱メチル化亢進用には Ten-eleven translocation 1 (Tet1) を、メチル化亢進用には DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) を用いた。dCas9 と Tet1 の触媒ドメインの融合遺伝子を作製し、レンチウイルスベクタープラスミドに挿入した。このプラスミド

ドとウイルスのパッケージングに必要な遺伝子の、発現プラスミドを 293T 細胞に導入した。形成されたウイルス粒子（ウイルスベクター）を回収し、力価測定を行った。guide RNA は BDNF 遺伝子エクソン IV のプロモーター上の 12 個の CpG に、結合するように設計を行った。得られた高力価のウイルス粒子を用いて、培養細胞内の BDNF 遺伝子エクソン IV のプロモーター領域のメチル化率の操作を試みた。細胞には 17 日齢のマウス胎児脳から単離した初代神経培養細胞を用いた。この細胞に dCas9-Tet1 或いは dCas-Dnmt3a と各 gRNA を感染させ、BDNF mRNA の発現量は real-time PCR 法で、BDNF タンパク発現は Western blot 法で、メチル化率は MassARRAY 法で、それぞれ解析した。

(2) Mass ARRAY を用いたメチル化率の計測

末梢血及び培養細胞よりの DNA 抽出は、DNeasy® (Quiagen) を用いて行った。その後のシトシンのメチル化解析は、Agena Bioscience 社の MassARRAY® System を用いて行った。システム内の sodium bisulfite 処理キットを用い、非メチル化シトシンのウラシルへの置換を行った。BDNF 遺伝子のエクソン I, IV のプロモーター上の CpG アイランド領域をカバーする、PCR 用プライマーを MassARRAY® System 上の Epidesigner を用いて設計し、Methylation specific PCR の後、In vitro transcription を施行した。U 特異的切断の後、MassARRAY MALDI-TOF MS を用いてシトシンのメチル化率を質量分析法にて定量した後、Epityper を用いてシトシンのメチル化率のデータを取得した。

4. 研究成果

(1) ゲノム編集技術を用いた BDNF 遺伝子メチル化操作法の開発

dCas9-Tet1 と各 gRNA のウイルス粒子を初代神経培養細胞に感染させ、感染 2 日後に細胞から RNA を抽出した。Real-time PCR により BDNF mRNA の発現を調べたところ、gRNA を感染させない dCas9-Tet1 のみの対照群に比べて発現の増加がみられた。また、抗 BDNF 抗体を用いた Western blot にて、タンパク質レベルでの発現上昇も確認された。次に、細胞から抽出したゲノム DNA を用いて MassARRAY 法により、プロモーター上のシトシン・メチル化率を解析した。その結果、メチル化率も有意に低下していることが明らかとなった。

dCas9-Dnmt3a と各 gRNA のウイルス粒子を Neuro-2A 細胞に感染させ、BDNF mRNA と BDNF タンパク発現及びエクソン IV のシトシン・メチル化率について計測した。Real-time PCR により BDNF mRNA の発現を調べたところ、対照群に比べて発現の減少がみられた。また、抗 BDNF 抗体を用いた Western blot にて、タンパク質レベルでの発現減少も確認された。次に、細胞から抽出したゲノム DNA を用いて MassARRAY 法により、プロモーター上のシトシン・メチル化率を解析した。その結果、メチル化率も有意に亢進していることが明らかとなった。

これらの研究結果から培養細胞において、レンチウイルスベクターを用いた dCas9-Tet1 あるいは dCas9-Dnmt3a と gRNA の感染によって、BDNF 遺伝子のシトシンのメチル化状態を操作できることが分かった。今後は本研究で開発した方法を用いて、マウス大脳皮質前頭部や海馬での BDNF 遺伝子のシトシン・メチル化率を亢進させることで、うつ病様行動がみられるかを試すことが可能になると考えられる。

(2) Mass ARRAY を用いたメチル化率の計測

統合失調症患者(抗精神病薬による治療中)と健康対象者それぞれ 22 例で末梢血 DNA を対象にエクソン I のプロモーター上の CpG 35 か所のシトシン・メチル化率を比較したところ、有意なメチル化率の変化は 4 か所で検出された⁶⁾。本結果は未治療うつ病患者と健康対照者の比較で 28 か所のシトシン・メチル化率に有意な変化のみられた本申請者らの結果⁴⁾に比べ顕著に異

なることから、統合失調症とうつ病の間ではBDNF 遺伝子プロモーターのメチル化プロフィールに大きな違いのあることが示された。

<引用文献>

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15:7539-7547, 1995.

Adachi M, Barrot M, Autry AE, Theobald D, Monteggia LM. Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy. *Biol Psychiatry* 63:642-649, 2008.

Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacology* 11:1169-1180, 2008.

Fuchikami M, Morinobu S, Segawa M, Okamoto Y, Yamawaki S, Ozaki N, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. *PLoS One* 6:e23881, 2011.

Ikegame T, Bundo M, Sunaga F, Asai T, Nishimura F, Yoshikawa A, Kawamura Y, Hibino H, Tochigi M, Kakiuchi C, Sasaki T, Kato T, Kasai K, Iwamoto K. DNA methylation analysis of BDNF gene promoters in peripheral blood cells of schizophrenia patients. *Neurosci Res* 77:208-214, 2013.

Nojima S, Fuchikami M, Kataoka T, Araki M, Omura J, Miyagi T, Okamoto Y, Hishimoto A, Morinobu S. Alterations in DNA methylation rates of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia. *Eur J Psychiatry* 35:67-74, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kataoka T, Fuchikami M, Nojima S, Nagashima N, Araki M, Omura J, Miyagi T, Okamoto Y, Morinobu S	4. 巻 18
2. 論文標題 Combined brain-derived neurotrophic factor with extinction training alleviate impaired fear extinction in an animal model of post-traumatic stress disorder.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Brain & Behavior	6. 最初と最後の頁 e12520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gbb.12520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nojima S, Fuchikami M, Kataoka T, Araki M, Omura J, Miyagi T, Okamoto Y, Hishimoto A, Morinobu S	4. 巻 35
2. 論文標題 Alterations in DNA methylation rates of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The European Journal of Psychiatry	6. 最初と最後の頁 67-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejpsy.2020.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森信 繁、淵上 学
2. 発表標題 新たなうつ病の病態仮説<Imbalance of excitation-inhibition within the PFC>
3. 学会等名 第38回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	淵上 学 (Fuchikami Manabu) (40403571)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田尻 直輝 (Tajiri Noki) (80782119)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	津田 雅之 (Tsuda Masayuki) (90406182)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授 (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関