

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15053

研究課題名(和文)細胞・組織横断的ゲノムワイドメチル化解析によるナルコレプシーの神経脱落機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of neurodegeneration in narcolepsy by cross-tissue genome-wide methylation analysis

研究代表者

嶋多 美穂子(Shimada, Mihoko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：50792727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではナルコレプシーを対象とし、オレキシン神経の脱落が起こる後部視床下部を含む複数の脳領域ならびに疾患への寄与が示唆されるCD4及びCD8陽性T細胞におけるDNAメチル化の検討を行った。脳の疾患関連DNAメチル化部位は、後部視床下部特異的であり、関連部位は多発性硬化症関連メチル化部位と有意に重複していた。T細胞の解析では、免疫系遺伝子上流のメチル化領域の関連に加え、特にCD4陽性T細胞で患者・健常者間のメチル化率の違いが大きく、疾患関連メチル化部位の95%以上の部位で、患者でメチル化率が低下していた。これらの部位は特にCpG Islandやshore、プロモーター領域に有意に少なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、脳の解析ではナルコレプシー関連メチル化部位は後部視床下部特異的にみられ、多発性硬化症の関連メチル化部位と有意に重複することから、後部視床下部における免疫的機序の異常が疾患発症に関わる可能性が、DNAメチル化という観点からも示唆された。さらにナルコレプシーのCD4及びCD8陽性T細胞の双方において、メチル化率の低下傾向が観察された。ナルコレプシーと関連を示す遺伝子多型がDNAメチル化酵素であるDNMT1の上流領域に位置していることが報告されており、今後DNMT1の発現や全体的な低メチル化が与える影響についてより詳細に解析することで、発症メカニズムの解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined DNA methylation in narcolepsy in multiple brain regions, including the posterior hypothalamus, where orexin neural loss occurs, and in CD4 and CD8 positive T cells, which may contribute to the disease. The disease-associated DNA methylation sites in the brain were specific to the posterior hypothalamus, and the associated sites overlapped significantly with previously reported multiple sclerosis-associated methylation sites. In the analysis with T cells, in addition to the association of methylated regions upstream of immune-related genes, a large difference in methylation rates between patients and healthy controls was found, especially for CD4-positive T cells, with over 95% of disease-associated methylation sites having reduced methylation rates in patients. These CpGs hypomethylated in narcolepsy were significantly less common in CpG Island, shore and promoter regions.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：ナルコレプシー DNAメチル化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では、代表的な過眠症であるナルコレプシー（ナルコレプシー Type 1）を対象とし、その発症機序の解明を目指した。ナルコレプシーは睡眠障害の中でも、特に遺伝要因との強い関連が知られ、脳の後部視床下部におけるオレキシン神経の脱落が発症に関与する(Nishino 2000)。しかし、なぜオレキシン神経が脱落するのかわかっておらず、治療も対症療法にとどまる。これまでに遺伝要因としてヒト白血球抗原 (HLA) -DQB1\*06:02が同定され(Mignot 2001)、さらにゲノム全体を網羅的に探索するゲノムワイド関連解析 (GWAS) 研究の進展などにより、脂肪酸代謝に関わる遺伝子や免疫系関連遺伝子などの複数の遺伝要因の関連も報告されていた(Miyagawa 2019)。しかし、これらはナルコレプシーの遺伝率を説明するには十分でなく、なぜオレキシン神経の脱落が起こるかも不明のままであった。我々の研究室では、さらなる関連遺伝要因の同定を目指して国際共同研究によりサンプルサイズを増やしたメタ解析を実施していたが、ナルコレプシーのような稀な疾患では、全ての遺伝要因を GWAS で同定するのに十分なサンプルサイズを確保することは非常に困難であった。そのため、GWAS などによる疾患関連ゲノム要因の探索に加え、エピゲノム要因の探索を実施し、それらを総合的に評価するといった研究上の工夫が必須であると考え、本研究を実施した。

近年ナルコレプシーの神経脱落の過程において、免疫細胞、特に CD4+ T細胞と CD8+ T細胞の重要性が示唆されている。ナルコレプシー患者の血液中に、オレキシン特異的な自己反応性 CD4+ T細胞が存在することが明らかとなっただけでなく (Latorre 2018) CD8+ T細胞に関して、オレキシン産生細胞特異的に発現するタンパクを認識する自己反応性 CD8+ T細胞が存在し、HLA-DQB1\*06:02との共在が疾患に関与することが報告された (Pedersen 2019)。そこで本研究では脳組織、免疫細胞 (CD4+ / CD8+ T細胞) 双方における DNA メチル化の探索を実施した。

### 2. 研究の目的

CD4+ T細胞と CD8+ T細胞を分離し、各々における疾患関連 DNA メチル化部位の探索を行う。さらにそれぞれの細胞において検出された関連メチル化部位が細胞種特異的なのか、共通して関連が見られる部位なのかについても検討を行う。

またすでに取得済みであるナルコレプシー患者と健常者の死後脳の後部視床下部から抽出した DNA を用いたメチル化解析データを活用し、脳で関連を示すメチル化部位と本計画で探索する免疫細胞で疾患に関連を示すメチル化部位を比較することで、それぞれの関連メチル化部位が影響する遺伝子群が疾患の発症機序において果たす役割を推定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) T細胞の分離と DNA メチル化解析

収集済みであり、-80 で凍結保存している日本人ナルコレプシー患者 (N = 28)・対照群 (N = 28) の PBMC から、CD4+ T細胞ならびに CD8+ T細胞を、各細胞特異的な抗体にナノサイズの磁気粒子を結合させて分離し、各々のサンプルから DNA を抽出した。DNA メチル化アレイ (Infinium® MethylationEPIC BeadChip (illumina)) を用いて蛍光強度の比率からメチル化率のデータを取得した。同様に再現性検討用のサンプルについても、患者 (N = 14)・対照群 (N = 14) から CD4+ T細胞ならびに CD8+ T細胞を分離し、メチル化率を測定した。

#### (2) T細胞ごとの疾患関連メチル化部位の特定

適切なフィルタリング法をもちいて質の悪いプローブを除去した (Zhou W 2017, Heiss JA 2019)。さらに本研究のデータに適切な標準化法の探索を実施し、プローブデザインのバイアスの補正 (Teschendorff AE 2013)、バッチ間バラツキの補正 (Johnson WE 2007)、quantile normalization を行った。それらの標準化済みデータを用いて *t* 検定を行い、各 T細胞において疾患と関連を示す個々の CpG 部位を探索した。メチル化に影響を与える可能性のある因子 (年齢、性別、BMI、細胞のサブタイプなど) についての評価を実施した。さらに、一定の領域のメチル化率が連続して疾患と関連を示す領域 (Differentially Methylated Region (DMR)) の探索は、Bump hunting method (Jaffe AE 2012) にて実施した。

#### (3) 脳・各 T細胞の疾患関連メチル化部位、特性の比較

CD4+ T細胞と CD8+ T細胞において疾患に対して異なる挙動を示すメチル化部位を同定するために (細胞) × (疾患) の交互作用を考慮した回帰分析を実施した。また各細胞で見られた DMR の比較を実施すると共に、脳で検出された DMR との比較も行った。

### 4. 研究成果

#### (1) CD4+ T細胞と CD8+ T細胞における DNA メチル化率の関連解析

実験で得たデータを対象に、フィルタリングならびに標準化を行い、常染色体上に存在する 746,913 の CpG 部位のメチル化率のデータを得た。それらを用いて *t* 検定を行った結果、CD4+ 及

び CD8+ T 細胞双方において、特に *HLA* 領域に示すプローブが強い関連を示した(図1)。*HLA* 領域は遺伝的多型性に富むことから、これらのプローブ配列中に日本人において 1%以上の頻度がある変異が存在しないかについてのより詳細な検討も行い、変異が存在せず、測定結果が信頼できると考えられるプローブにおいても、特に *HLA* Class II 領域でナルコレプシーと有意な関連を示す複数の CpG 部位を同定した。

関連解析についての Q-Q plot を作成したところ、P 値が大きくインフレーションしていたが(図1)、ナルコレプシーで低メチル化している CpG 部位と高メチル化している CpG 部位とを分けて作成した Q-Q plot では、ナルコレプシーで低メチル化している CpG 部位では顕著なインフレーションがある一方、高メチル化部位ではインフレーションが抑えられていた。このようなインフレーションの原因となり得る因子(アレイのバッチ、アレイ上での位置、年齢、性別、BMI、DNA の質)について疾患との相関を検討したが、関連は認められなかった。そこで CD4+ 及び CD8+ T 細胞のサブタイプの影響について考慮するために、各々のサンプルに潜在的に含まれる可能性のあるサブタイプ (latent DNA methylation components: LMC) の数とその比率に関する推定を行い (MeDeCom 法, Lutsik P 2017)、それらの比率が患者・健常者間で大きく異なることがないかを検討した。その結果、関連解析における P 値のインフレーションを説明するような大きな差は見られなかった(図2)。

また、CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞において疾患に対して異なる挙動を示すメチル化部位を同定するために(細胞) × (疾患) の交互作用を考慮した回帰分析を実施したが、DMR のように連続して CD4+/CD8+ T 細胞の違いが疾患に対して異なる影響を与える有意な部位は検出されなかった。

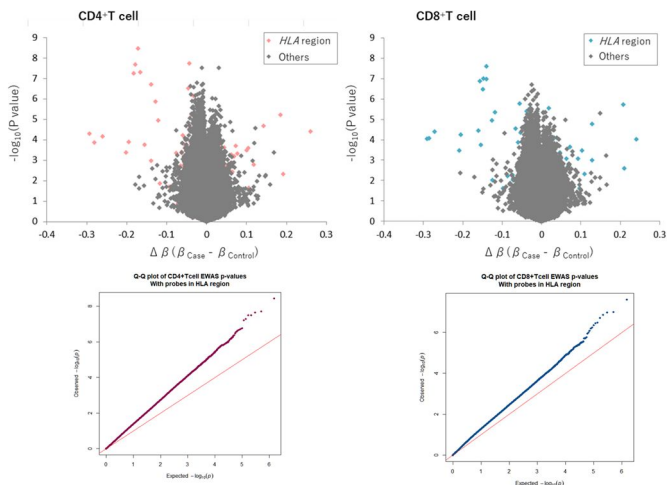


図1. 関連解析の結果

また、CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞において疾患に対して異なる挙動を示すメチル化部位を同定するために(細胞) × (疾患) の交互作用を考慮した回帰分析を実施したが、DMR のように連続して CD4+/CD8+ T 細胞の違いが疾患に対して異なる影響を与える有意な部位は検出されなかった。

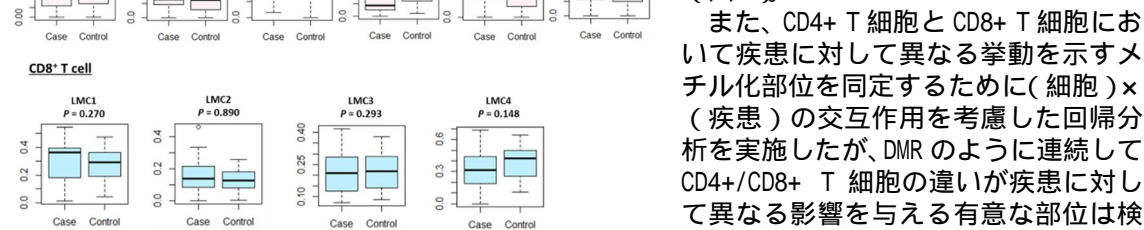


図2. CD4+ /CD8+ T cell の推定サブタイプの患者・健常者間での比率の比較

## (2) ナルコレプシーにおける低メチル化部位の検討と脳のメチル化部位との比較

特に CD4+ T 細胞の関連解析において P 値の顕著なインフレーションが見られ、インフレーションに寄与する可能性のある因子の疾患との関連が否定されたことから、ナルコレプシーにおける低メチル化傾向は疾患に起因する可能性があると考え、CD4+ T 細胞の解析で得られた低メチル化 CpG 部位についての検討を実施した。はじめの解析の P 値について複数の閾値を設定し ( $P < 1E-4, 1E-3, 1E-2$ ) 検討したところ、再現性が得られる部位の 95%以上は、患者で低メチル化しており(低メチル化 CpG 部位数/再現された部位数: 19/20, 192/195, 1,675/1,710)、これは解析 CpG 部位 ( $N = 735,578$ ) のうち患者で低メチル化している部位の数 ( $N = 448,407$ ) と比較した際にも有意に多かった ( $P$  の閾値  $1E-3$  の場合  $P < 2.2E-16$ ,  $OR = 41.0$ )。再現性の得られた低メチル化部位 ( $N = 1,675$ ) は特に遺伝子のプロモーター領域に有意に少なく ( $P = 2.63E-5$ ,  $OR = 0.29$ ) CpG Island、shore にも有意に少なかった (Island:  $P = 8.5E-53$ ,  $OR = 0.090$ ,  $N_{Shore}: P = 9.5E-05$ ,  $OR = 0.65$ ,  $S_{Shore}: P = 1.5E-06$ ,  $OR = 0.55$ )。このようなナルコレプシーにおける低メチル化傾向は、我々が以前実施した全血を用いたメチル化解析でも見られていたが (Shimada 2018)、脳の後部視床下部における解析では見られなかった。

## (3) ナルコレプシー関連メチル化領域 (DMR) の検出

CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞において、CpG 部位間の距離が 1000bp 以内であり、最低 3 部位が連続して関連する領域を Bump hunting 法にて探索したところ、CD4+ T 細胞の解析では 73 DMR、CD8+ T 細胞の解析では 45 DMR が検出された。これらのうち再現性確認用のサンプルセットでも DMR として検出された領域は CD4+ T 細胞の解析では 5 DMR、CD8+ T 細胞の解析では 4 DMR であった。さらに再現性検出用サンプルでは DMR として検出はされなかったものの、DMR 内に有意となる CpG 部位が 2カ所以上存在している領域も候補としたところ、CD4+ T 細胞の解析では 7 DMR、CD8+ T 細胞の解析では 6 DMR が疾患関連候補メチル化領域となった。これらの中には *IRF6* (Interferon Regulatory Factor 6)、*C1R* (Complement C1r)、*CCR5* (C-C Motif Chemokine Receptor 5)、*CCL5* (C-C Motif Chemokine Ligand 5) などの免疫系遺伝子の近位領域が含まれ

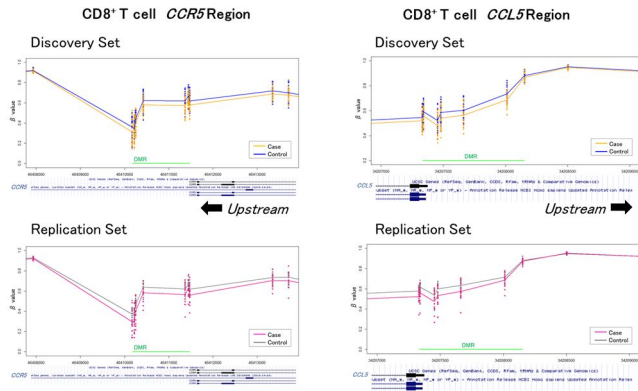


図3. CCR5とCCL5上流のDMR

細胞の解析では検出されず、異なる組織・細胞におけるメチル化は、独立したパスウェイで疾患発症に関連している可能性が示唆された。

ていた。特に CD8+ T 細胞の解析で関連が見られた *CCR5*、*CCL5* は、先行研究でナルコレプシーと *CCR3* の関連が報告されていること (Toyoda 2015, 2017, Shimada 2018) また *CCR5* と *CCL5* が機能的に相互作用する (Shih-Wei Wang 2012) などの観点から興味深い関連候補遺伝子であると考えられる (図 3)。

なお、これら T 細胞で検出された DMR は脳サンプルを用いたメチル化解析では検出されなかった。また脳サンプルで検出された中枢神経系のミエリン鞘を構成する蛋白である *MBP* (*myelin basic protein*) の上流に位置する DMR は T

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 Shimada M, Miyagawa T, Takeshima A, Kakita A, Toyoda H, Niizato K, Oshima K, Tokunaga K, Honda M	4. 巻 41(4)
2. 論文標題 Epigenome-wide association study of narcolepsy-affected lateral hypothalamic brains, and overlapping DNA methylation profiles between narcolepsy and multiple sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sleep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/sleep/zsz198	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 Mihoko Shimada, Taku Miyagawa, Tohru Kodama, Hiromi Toyoda, Katsushi Tokunaga, Makoto Honda	4. 巻 43(11)
2. 論文標題 Metabolome Analysis Using Cerebrospinal Fluid From Narcolepsy Type 1 Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sleep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/sleep/zsaa095	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 嶋多美穂子, 宮川卓, 徳永勝士, 本多真
2. 発表標題 EWAS of narcolepsy-affected brain and overlapping methylation profile between narcolepsy and neurological disorders
3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mihoko Shimada, Taku Miyagawa, Hiromi Toyoda, Katsushi Tokunaga, Makoto Honda
2. 発表標題 An integrated genetic and epigenetic approach identified new candidate genetic loci for narcolepsy
3. 学会等名 アメリカ人類遺伝学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋多美穂子
2. 発表標題 ナルコレプシーのDNAメチル化解析
3. 学会等名 日本睡眠学会第43回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mihoko Shimada, Taku Miyagawa, Katsushi Tokunaga, Makoto Honda
2. 発表標題 EWAS of narcolepsy-affected lateral hypothalamic brain and overlapping methylation profile between narcolepsy and multiple sclerosis
3. 学会等名 国際ゲノム会議（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋多美穂子
2. 発表標題 後部視床下部と側頭葉皮質サンプルを用いたナルコレプシーに関連するDNAメチル化の探索
3. 学会等名 日本睡眠学会第44回定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mihoko Shimada, Taku Miyagawa, Katsushi Tokunaga, Makoto Honda
2. 発表標題 DNA methylation profile of narcolepsy-affected brain and overlapping methylation profile between narcolepsy and multiple sclerosis
3. 学会等名 アメリカ人類遺伝学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋多美穂子, 宮川卓, 本多真
2. 発表標題 後部視床下部と側頭葉皮質サンプルを用いたナルコレプシーに関連するDNAメチル化の探索
3. 学会等名 日本睡眠学会第44回定期学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------