

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03934

研究課題名（和文）アルツハイマー病の未病・早期診断のためのDNAメチル化バイオマーカーの開発と検証

研究課題名（英文）Exploration of DNA methylation biomarkers for preclinical and early diagnoses of Alzheimer's disease

研究代表者

佐々木 真理（Sasaki, Makoto）

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・教授

研究者番号：80205864

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：血液検体によるアルツハイマー病（AD）の未病・早期診断法の確立を目的に、AD患者と健常者群の血液DNAを用い、有望なAD感受性多型に対する変異解析およびAD関連DNAメチル化バイオマーカーの探索を行った。高頻度コモンバリエーションであるTF遺伝子（rs1049296）はAD群に比し対照群において高頻度に認められ、NOS3遺伝子（rs1799983）はAD群において高頻度に認められた。また、DNAメチル化状態の個人差が大きいCpG部位（CDMV）に着目した独自のキャプチャ法プローブセットを用いたエピゲノム関連解析（EWAS）を実施したが、ADと有意に関連するDNAメチル化部位の同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いた独自のCDMV探索用キャプチャプローブは、報告済の他疾患（腎細胞癌や心臓弁膜症など）における50名対50名規模のEWASでは十分な検出力を有していたが、本研究ではADに関連したDNAメチル化部位を同定できなかった。ADなどの神経変性疾患を対象とした当該キャプチャプローブによるEWASに関しては50名規模の解析では検出力が不十分である可能性が示唆された。血液検体によるゲノム・エピゲノム情報を用いたADの未病・早期診断は重要な課題であり、今後、キャプチャプローブを最適化し解析対象数を増やして検討する予定である。

研究成果の概要（英文）：To establish biomarkers for preclinical and early diagnoses of Alzheimer's disease (AD), we performed mutation analyses of promising polymorphisms related to AD susceptibility and explored AD-related DNA methylation sites using blood-derived DNA samples from 50 patients with AD and 50 healthy controls. The TF gene (rs1049296), known as a high-frequency common variant, was more prevalent in the control group than in the AD group, whereas the NOS3 gene (rs1799983) showed a higher frequency in the AD group. No significant differences were observed for other genes. Epigenome-wide association studies (EWAS) based on the bisulfite sequencing data obtained with the capture probe set that we designed to detect common DNA methylation variants (CDMV) did not reveal any DNA methylation sites significantly associated with AD in this study.

研究分野：神経科学

キーワード：認知症 アルツハイマー病 軽度認知障害 DNAメチル化 エピゲノム関連解析 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む国内においてアルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) に代表される認知症の増加が大きな社会問題となっている。これまで AD の主病変であるアミロイド β を標的とした疾患修飾薬やワクチンの開発が精力的に進められてきたが、現時点で有効な治療薬は登場していない。一方、多角的な生活習慣介入によって発症予防・遅延が可能であることが報告され (Ngandu T. *Lancet* 2015)、国内でも多施設臨床試験 (J-MINT) が進行中である。これらの治療・予防介入の標的は AD の前段階の軽度認知障害 (mild cognitive impairment, MCI) や未病状態の preclinical AD であるが、その診断には認知機能検査や PET・MRI 検査などが必要であり、より平易な血液検体を用いた早期診断法は未だ確立されていない。

近年のゲノム解析によって AD の疾患感受性遺伝子が明らかとなってきた。Apolipoprotein E type 4 (APOE4) が代表的な遺伝子多型で、そのほかにもゲノムワイド関連解析 (GWAS) やメタ解析によって複数の遺伝子座位のコモンバリエーション (*CLU*, *BIN*, *CRI*, *PICALM* など) が同定されてきた。さらに、日本人の GWAS では *SORL1* (Miyashita A. *PLoS ONE* 2013) や *CLTNAP2* (Hirano A. *Psychiatr Genet* 2015) などが報告されている。しかしながら、これらの遺伝的素因だけでは AD の発症リスク予測は困難である。

近年、エピゲノムの一つである DNA の CpG 部位メチル化状態が環境要因等によって変化し、遺伝子発現の抑制・促進を介して種々の疾患の発症原因となりうることが注目されている。血液細胞の DNA メチル化を測定することでがんや精神疾患などの未病状態を捉えることが可能となりつつあり (Li L. *J Epidemiol* 2012, Dong L. *J Proteomics Bioinform* 2018, Kim H. *J Genet Genomics* 2018) AD においても APOE や TOMM40 遺伝子上の CpG 部位の低メチル化が報告されている (Shao Y. *J Hum Genet* 2018)。しかしながら、既存の DNA メチル化アレイを用いたエピゲノムワイド関連解析では全ゲノムの CpG 部位のうち約 2% 程度しか対象とならないため、臨床応用可能なバイオマーカーの発見・開発には至っていない。

我々はいわて東北メディカル・メガバンク機構 (IMM) として、東日本大震災の被災者を中心としたゲノムコホート・バイオバンク事業である東北メディカル・メガバンク (TMM) 計画を平成 25 年から東北大学と連携して推進しており (Kuriyama S. *J Epidemiol* 2016) 特に DNA メチル化解析を主軸とした解析研究を進めてきた。その過程で、DNA メチル化状態の個人差が特に大きい CpG 部位 (common DNA methylation variant, CDMV) が従来の手法に比し DNA メチル化バイオマーカー探索に有効であることを見出した (Hachiya T. *npj Genom Med* 2017)。また、150 万箇所の CDMV を安価かつ高精度に測定できる独自のキャプチャ法プローブセットの開発に成功した。

以上の経緯から、独自の CDMV を基盤とする DNA メチル化マーカー探索法を適用することによって、AD の高リスク者を未病段階で捉える新規バイオマーカーを同定・検証し、AD の新たな早期診断法を確立できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、独自のキャプチャ法プローブセットを用いた網羅的 DNA メチル化解析によって、AD 患者に特徴的な全血 CDMV マーカーを見出し、地域住民コホートを用いて精度と妥当性を検証することで、AD の未病・早期診断を可能とする新規 DNA メチル化バイオマーカーを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AD患者・健常高齢者の全血DNA・遺伝子多型情報の収集

1. 複数のブレインバンク・コホート・プラットフォームなどに検体利用・検体情報利用に関する申請を行い、AD患者50名、健常高齢者50名(AD患者と性別・年齢でマッチング)の全血DNA検体、基本情報(年齢、性別等)や病態情報の分譲を受ける。
2. 入手した全血DNA検体に対し、最新のGWAS報告を踏まえ、APOEやPSEN1などAD感受性遺伝子多型(14遺伝子75 SNPs)を対象としたPyroMarkによる変異解析(SNP解析)を実施する。

(2) AD患者の全血DNAを用いたDNAメチル化マーカーの探索

1. (1)で分譲を受けたAD患者および健常者のDNAをバイサルファイト処理し、独自のCDMV検出プローブセットを用いてDNAメチル化解析用ライブラリーを作製し、シーケンシングする。
2. シークエンスデータを解析用コンピュータへ移送し、DNAメチル化情報を取得後、エピゲノムワイド関連解析(epigenome wide association study, EWAS)を実施する。

4. 研究成果

(1) AD患者・健常高齢者の全血DNA・遺伝子多型情報の収集

当初計画では、複数のブレインバンク・コホート・プラットフォームへ申請し、AD患者の死後脳組織由来DNAおよび血液由来DNA、検体情報を入手し、本研究を遂行する計画だったが、AD患者の死後脳組織由来DNAの入手には至らなかった。そこで計画を変更し、AD患者の血液由来DNAおよび検体情報の利用についてバイオバンクジャパンへ申請し、承認を受け、入手した。また、AD患者の性別・年齢マッチングした対照群を東北メディカル・メガバンク計画参加者の健常者から選定し、血液由来DNAおよび検体情報を入手した。両群の血液由来DNAの品質確認の結果を表1に示した。両群のDNA検体ともにDIN値が8以上と断片化の生じていない高品質なDNAであった。

表1. AD患者群および対照群の血液由来DNAおよび作製したライブラリーの品質

	AD群	対照群
N	50	50
A _{260/280}	1.75 ± 0.05	1.81 ± 0.10
A _{260/230}	1.16 ± 0.13	0.75 ± 0.12
Concentration (ng/μL)	20.1 ± 2.3	28.0 ± 7.8
DIN値	8.4 ± 0.8	9.4 ± 0.2
Library size (bp)	397.6 ± 11.5	400.9 ± 9.5
Library concentration (nM)	44.0 ± 12.3	68.0 ± 15.0

次いで、AD患者の遺伝的背景を調べるために、過去のGWAS研究で有望なAD感受性遺伝子多型として示唆されている11遺伝子17 SNPsのPyroMarkによる変異解析を実施した(表2)。TF遺伝子(rs1049296)は、global minor allele frequency(GMAF)が0.15635と高頻

度なコモンバリエーションとして知られるが、AD 群に比べ対照群のほうが高い割合で確認された。一方、*NOS3* 遺伝子 (rs1799983) は、AD 群のほうが高頻度に確認された。その他については、AD 群と対照群でアレル頻度に大きな違いは確認されなかった。

表 1 には含まれていないが、人種を超えて最も有名かつ強い AD 感受性遺伝子多型の 1 つとして知られる *APOE* 遺伝子について同様に変異解析を行ったが、PyroMark の技術的な課題があり、解析結果の取得に至らなかった。そこで別の解析手法を検討し、TaqMan probe を使用した SNP 解析に切り替え、現在解析を行っている。また、他の遺伝子や SNP についての追加解析も予定している。

表 2. 11 遺伝子 17SNPs の変異解析の結果

Gene	Chr	Position	rsID	Genotype	GMAF	Genotype, frequency					
						AD, n (%)		Ctrl, n (%)		AD, n (%)	
PSEN2	1	227071413	rs143501870	A>G	-	A/A		A/G		G/G	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PSEN2	1	227071426	-	G>C	0.00080 (C)	G/G		G/C		C/C	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TF	3	133494354	rs1049296	C>T	0.15635 (T)	C/C		C/T		T/T	
						32 (64)	26 (52)	16 (32)	15 (30)	2 (4)	6 (12)
HFE	6	26091184	-	A>T	-	A/A		A/T		T/T	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
HFE	6	26091179	rs1799945	C>G	0.07308 (G)	C/C		C/G		G/G	
						47 (94)	47 (94)	3 (6)	3 (6)	0 (0)	0 (0)
NOS3	7	150696111	rs1799983	T>G	0.17632 (T)	T/T		T/G		G/G	
						2 (4)	0 (0)	7 (14)	5 (10)	41 (82)	45 (90)
SORL1	11	121393322	-	G>C	-	G/G		G/C		C/C	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PSEN1	14	73664823	rs63751139	C>T	-	C/C		C/T		T/T	
						11 (22)	11 (22)	39 (78)	39 (78)	0 (0)	0 (0)
PSEN1	14	73664825	rs63751235	C>G	-	C/C		C/G		G/G	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PSEN1	14	73683929	rs63750227	G>A	-	G/G		G/A		A/A	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PSEN1	14	73683933	rs661	G>A	-	G/G		G/A		A/A	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PSEN1	14	73683951	-	T>C	-	T/T		T/C		C/C	
						23 (46)	17 (34)	27 (54)	33 (66)	0 (0)	0 (0)
MAPT	17	44096070	rs1568339995	C>T	-	C/C		C/T		T/T	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ABCA7	19	1054255	rs201060968	G>A	0.00060 (A)	G/G		G/A		A/A	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
PRNP	20	4680251	-	A>G	-	A/A		A/T		T/T	
						46 (92)	45 (95)	4 (8)	5 (5)	0 (0)	0 (0)
PCDH11X	X	91133518	rs781770086	A>T	-	A/A		A/T		T/T	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MT-ND1	MT	3397	rs199476120	A>G	-	A/A		A/G		G/G	
						50 (100)	50 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Genome Reference: GRCh37

GMAF: global minor allele frequency referenced to ClinVar

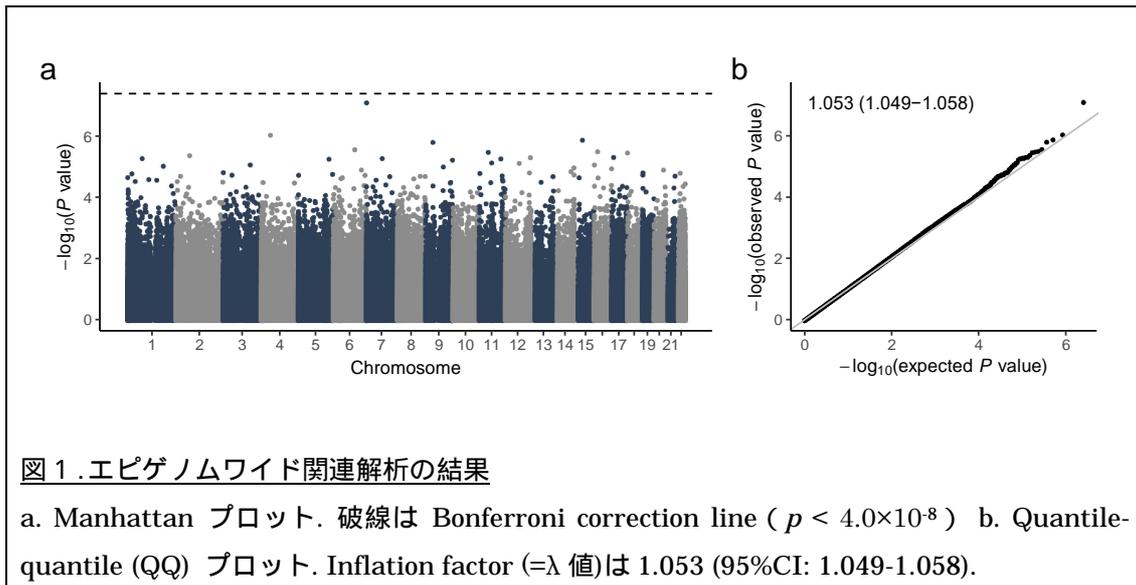
(2) AD患者の全血DNAを用いたDNAメチル化マーカーの探索

CDMV に基づくプローブセットを用いた DNA メチル化解析用のライブラリーを作製した。表 1 で示すように、ライブラリーのサイズは両群ほぼ同等で、シーケンシングに十分量の高品質なライブラリーが作製できた。

シーケンシングを行い、情報解析により取得した DNA メチル化情報に基づいて EWAS を実施した。その結果、AD と有意に関連する CpG 部位は検出されなかった (図 1a)。

一方で、AD との関連が示唆される CpG 部位 ($p < 1.0 \times 10^{-5}$) は 22 ヶ所あった。また、図 1b で示す expected P value と observed P value に基づく QQ プロットならびに 値 (inflation factor): 1.053 (95%CI: 1.049-1.058) から、EWAS 結果は交絡因子等のデータバイアスがほとんど認められない均一なデータであることが示された。

これまで我々が行ってきた腎細胞がんや心臓弁膜症を対象にした DNA メチル化バイオマーカー探索では本研究同様に 50 名対 50 名で EWAS を行って有意な関連を示す CpG を検出することに成功したが、本研究対象のように神経変性疾患では血液細胞の DNA メチル化変化は生じにくい可能性が考えられた。また、AD との関連が示唆された 22 ヶ所の CpG 部位については、解析対象者を増やして検出力を上げた解析を行うことでより顕著な関連を示すことができる可能性があることから、今後、対象者数を増やした解析について検討する。



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 2件）

1. 著者名 Ohmomo Hideki, Komaki Shohei, Ono Kanako, Sutoh Yoichi, Hachiya Tsuyoshi, Arai Eri, Fujimoto Hiroyuki, Yoshida Teruhiko, Kanai Yae, Sasaki Makoto, Shimizu Atsushi	4. 巻 71
2. 論文標題 Evaluation of clinical formalin fixed paraffin embedded tissue quality for targeted bisulfite sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 135 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Komaki Shohei, Nagata Masatoshi, Arai Eri, Otomo Ryo, Ono Kanako, Abe Yukiko, Ohmomo Hideki, Umekage So, Shinozaki Natsuko O, Hachiya Tsuyoshi, Sutoh Yoichi, Otsuka-Yamasaki Yayoi, Arai Yasumichi, Hirose Nobuyoshi, Yoneyama Akio, Okano Hideyuki, Sasaki Makoto, Kanai Yae, Shimizu Atsushi	4. 巻 4
2. 論文標題 Epigenetic profile of Japanese supercentenarians: a cross-sectional study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Lancet Healthy Longevity	6. 最初と最後の頁 e83 ~ e90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S2666-7568(23)00002-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 8件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木真理
2. 発表標題 いわて東北メディカル・メガバンク機構の9年間
3. 学会等名 第45回日本遺伝カウンセリング学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水厚志
2. 発表標題 東北メディカル・メガバンク計画における大規模ゲノム・オミックス解析と疾患発症リスク予測
3. 学会等名 第42回日本生物学的精神医学会・第4回日本精神薬学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水厚志
2. 発表標題 大規模ゲノムコホート研究における疾患発症リスク予測
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水厚志
2. 発表標題 ゲノム・オミックスデータを利用した疾患発症リスク算出と個別化予防
3. 学会等名 第31回日本疫学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水厚志
2. 発表標題 東北メディカル・メガバンク計画におけるDNAメチル化解析によるDOHaD研究の取り組み
3. 学会等名 第9回日本DOHaD学（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水厚志
2. 発表標題 ゲノムコホート研究におけるマルチオミックス解析
3. 学会等名 第67回日本人類遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水厚志
2. 発表標題 いわて東北メディカル・メガバンク機構におけるエピゲノム研究とエピゲノム年齢
3. 学会等名 第16回日本エピジェネティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水厚志
2. 発表標題 ゲノム・オミックス情報による疾患発症予測と生物学的年齢推定
3. 学会等名 第32回日本脳ドック学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大桃秀樹
2. 発表標題 オミックス解析における品質管理の重要性 - いわて東北メディカル・メガバンクにおける取り組み -
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 DNAメチル化情報を用いた生物学的年齢および老化状態の評価手法	発明者 小巻翔平，清水厚志，八谷剛史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-182688	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	清水 厚志 (Shimizu Atsushi) (30327655)	岩手医科大学・医歯薬総合研究所・教授 (31201)	
研究分担者	前田 哲也 (Maeda Tetsuya) (70359496)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	
研究分担者	大桃 秀樹 (Ohmomo Hideki) (90453406)	岩手医科大学・医歯薬総合研究所・講師 (31201)	

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