

令和 4 年 5 月 5 日現在

機関番号：72696

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22697

研究課題名（和文）神経細胞特異的な転写制御機構から迫るアルツハイマー病の病態

研究課題名（英文）Neuron-specific histone modification in the pathophysiology of Alzheimer's disease

研究代表者

間野 かがり (Mano, Kagari)

(財) 沖中記念成人病研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：00877780

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の神経変性過程で起こっている現象を明らかにするため、神経細胞特異的にヒストン修飾の解析を行った。複数のゲノム領域にヒストン修飾異常を検出することができ、これらの異常は神経細胞で特異的に起こっており、非神経細胞ではみられない現象であった。脳内にはさまざまな細胞種が存在し、それぞれの細胞ごとの役割をもって病態に関与している。今回得られた結果は、神経細胞の病態での役割を示すものであり、変性そのものが起きている神経細胞での機能低下に関係していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病の病態において、神経細胞特異的な解析を行うことによって、神経細胞の変性過程における機能低下を裏付けるような結果を得ることができた。このような結果は、脳全体を使った解析では実現できなかったものであり、神経細胞に特化した解析を行ったことの結果である。アルツハイマー病における脳機能低下は、神経細胞の機能低下の影響が大きいと考えられ、神経細胞で起きていることを明らかにすることで、治療法開発への手がかりとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the phenomena occurring in the neurodegenerative process of Alzheimer's disease, we analyzed histone modifications in a neuron-specific manner. Abnormal histone modifications could be detected in multiple genomic regions, and these abnormalities occurred specifically in neurons and not in non-neuronal cells. There are various cell types in the brain, and each cell has its own role in disease pathomechanism. Our results indicate the role of neurons in pathological conditions and are thought to be related to functional decline in neurons undergoing degeneration itself.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 ヒストン修飾 神経細胞特異的解析 クロマチン構造

1. 研究開始当初の背景

孤発性アルツハイマー病(AD)は最多の認知症性疾患で、その中核にある病態としてアミロイド・カスケード仮説が最も支持を得ている(Hardy J, et al., 2002)。一方で、脳内に蓄積するアミロイド (A β)が認知機能障害を起こすメカニズムについては不明な点が多く、様々な病態解明アプローチがなされてきた。ADの発症要因には、遺伝的素因に加えて様々な後天的因子が加齢と共に加わると考えられるが、この過程において、寄与度の小さい様々な因子が最終的には同一の中核病理に集約されていくと考えられる。この特徴を踏まえると、疾患の最終像である患者死後脳内の神経細胞における現象を網羅的に解析し病態仮説を立て検証することが病態解明には必要不可欠である。このような点から、神経変性を理解する上で、後天的要素が蓄積した結果として生じるエピゲノムを解析することが有用であろうと考えた。

死後脳を用いた従来のエピゲノム解析では、主として脳組織全体を用いた解析手法が取られてきた。しかし、脳組織は神経細胞だけでなく、多くのグリア細胞や血管内皮細胞を含んでいる。故に、脳機能を直接担う神経細胞における現象を捉えるためには解析対象を神経細胞だけに限定する必要があると考えた。実際、神経細胞に由来するゲノム DNA の DNA メチル化パターンと、脳全体に由来するゲノム DNA の DNA メチル化パターンを比較すると、神経細胞と非神経細胞では修飾パターンが異なっており、脳全体の修飾パターンはむしろ非神経細胞に近いことが報告されている(Iwamoto K, et al., *Genome Res*, 2011)。また、ADの病態を理解する上でも、神経細胞特異的な解析手法が有用であることを報告している(Mano T, et al., *PNAS*, 2017)。従って、脳組織を用いたエピゲノム解析を解析する上で、神経細胞特異的な解析が重要である。

エピゲノムは、ゲノム DNA のメチル化、ヒストン修飾、chromatin accessibility、ゲノム DNA の三次元構造、と階層的な構造をもって、発現機構の制御を行っている。ADにおけるゲノム DNA の異常が AD の病態と関与していることが示されており、より高次な構造であるヒストン修飾もまた病態に関与していることが想定された。エピゲノムは、各階層レベルでの理解とともに、階層を通貫しての理解が全体像の理解に必要であり、神経細胞特異的なヒストン修飾解析が AD の病態理解に必要である。

2. 研究の目的

本研究全体の目的は、ADの病態理解であり、そのための具体的なステップとして、AD剖検脳を用いた神経細胞特異的なヒストン修飾解析を行い、ゲノムワイドに神経細胞における病態特異的なヒストン修飾異常を探索する。ヒストン修飾は発現を制御しているため、見出されたヒストン修飾異常は発現の異常と関与すると考えられ、ヒストン修飾異常を通じて細胞機能の異常に関する仮説を立て、剖検脳で確認することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究の概略を図1に示す。

アルツハイマー病および非疾患コントロール、各20症例ずつの剖検脳から下側頭回を採取した。脳組織をhomogenizeした後、Percoll密度勾配遠心により核を回収し、Alexa 488で標識された抗NeuN抗体で染色し、神経細胞核の染色を行った。染色後、FACSを用いて神経細胞核と非神経細胞核をそれぞれ得ることができた。

得られた神経細胞および非神経細胞核から、適切な固定・超音波破碎を行った後、抗H3K4me3抗体および抗H3K27ac抗体を用いて免疫沈降を行った。DNA精製後、Illumina社のフォーマットに合わせたYアダプターを付与し、PCR増幅した。Size selectionの後、AMPureを用いて精製し、終了についてはqPCRを行って定量した。Chromatin accessibilityについては、Illumina社製Nextera XT DNA Library Prep Kitに付属のTn5 transposaseを用いてライブラリ調製を行った。作成したライブラリはIllumina社製HiSeq2000でシーケンスを行った。得られたリードはQuality controlの後にhg38にマッピングし、MACS2によりピークコールを行った。

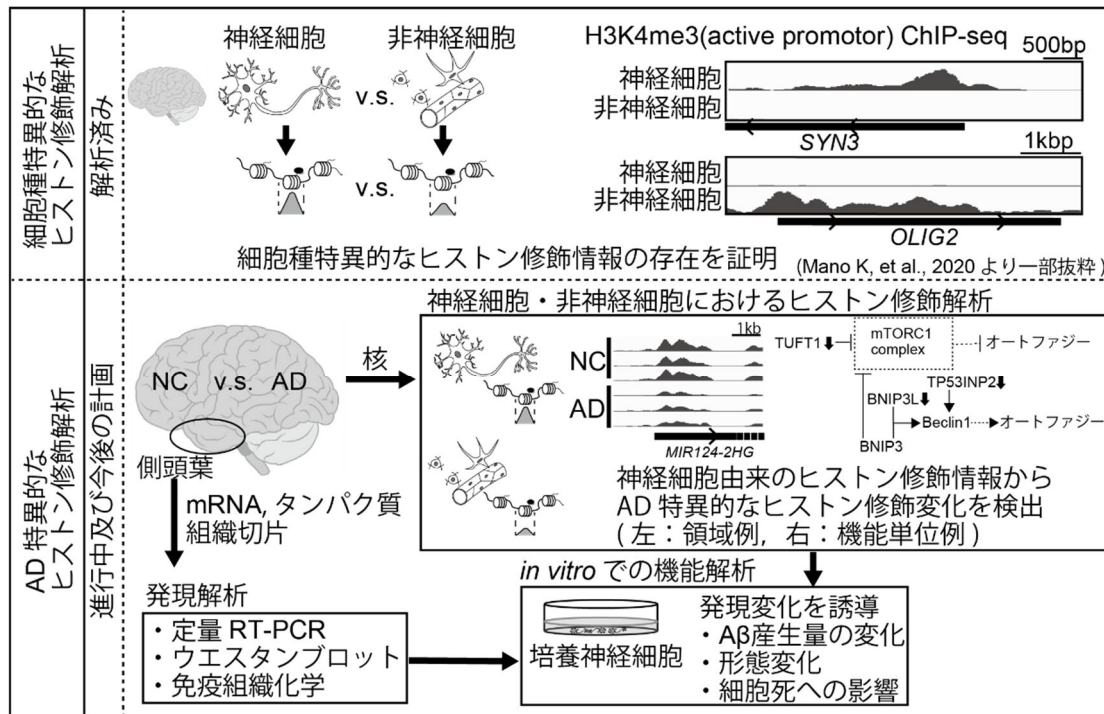


図 1. 研究の概要

4. 研究成果

(1) AD 特異的なヒストン修飾変化

AD およびコントロール 20 症例の下側頭回から神経細胞核を抽出し, H3K4me3 および H3K27ac について ChIP-seq を行った. 各サンプルから平均 4.7×10^7 リードを得ることができ, Quality control 後にマッピングを行ったところマッピング率は平均 98%であった. また, ピーク検出では平均 1.8 万ピークを検出することができた. 一方, AD およびコントロールを比較したところ, FDR < 0.05 を満たすピークは, H3K4me3 では見出すことができず, H3K27ac についても 4 ピークを認めたのみであった. 多重検定補正前の p 値で比較すると, ヒストン修飾変化領域の候補と考えられる領域は多く認めており, 検出力が不足している原因として, サンプル数に対して検回数が多いことが原因と考えた. 検出できたピークを詳細に検討すると, バックグラウンドレベルに近い小さなピークも多く検出されており, 本研究で実施した ChIP-seq が感度よくピーク検出できていたということとともに, 比較的小さな生物学的意義の少ないピークも検出していることが考えられた. このため, 生物学的な意義の大きいピーク, 具体的には, 発現変化に影響を与えていると考えられるピークを検出するために, chromatin accessibility の解析を追加して行った.

(2) chromatin accessibility を考慮した解析

ATAC-seq を行い, 神経細胞におけるオープンクロマチン領域を同定した. 同領域に関して, AD およびコントロールの比較を行ったところ, H3K4me3 では 80%程度まで, H3K27ac では 50%程度まで領域を絞り込むことができた. 結果として, H3K4me3 では 22 領域, H3K27ac では 4 領域のヒストン修飾変化領域を見出すことができた.

これらの領域は 42 遺伝子に annotation され, そのうち 14 遺伝子については他の方法で AD と関連が報告された遺伝子であった. このことは, 本研究の手法の妥当性を支持するものと考えられた. 一方で, 他の 28 遺伝子については DNA/RNA 代謝に関連した遺伝子, オートファジー関連遺伝子群を見出すことができ, 免疫染色およびウエスタンブロットによる発現変化の解析を追加して行った.

(3) CUT&Tag 法の導入

上述のように, ヒストン修飾の変化に加えて, 生物学的に重要な領域に解析ターゲットを限定することで, ヒストン修飾変化をより適切にとらえることができた. 従来の ChIP-seq の限界点として, 非特異的なリード検出のため, ヒストン修飾以外のリードがあり, S/N の高いピーク検出のためにはより背景となる非特異的なリードを減らし, 本来のピークにリードが集中する手法が望ましい. また, 従来の ChIP-seq では必要細胞数が多かった, という点も問題であった. このことを解決する手法として, protein A を結合させた Tn5 transposase を用いた手法が提案され(Kaya-Okur HS, et al., Nat Commun, 2019), 本研究でも導入した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsukawa Takashi, Kagari Koshi Mano, et al.,	4. 巻 2
2. 論文標題 Clinical efficacy of haematopoietic stem cell transplantation for adult adrenoleukodystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 fcz048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/braincomms/fcz048	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 間野かがり、間野達雄、鈴木稯、森島真帆、村山繁雄、戸田達史、岩田淳
2. 発表標題 神経細胞特異的な転写制御機構から見える孤発性アルツハイマー病の病態
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------