

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591676

研究課題名(和文) 精神疾患患者由来試料におけるハイドロキシメチルシトシンのゲノムマッピング

研究課題名(英文) Genome mapping of 5-hydroxymethylcytosine using human postmortem brains

## 研究代表者

文東 美紀 (Bundo, Miki)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00597221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNA構成塩基シトシンの修飾型の一つである5-ハイドロキシメチルシトシン(5-hmc)は、他の組織に比べて、脳組織に多く存在すると報告されているが、詳しい機能は不明である。我々は5-hmcが精神疾患の病因に關与する可能性を検証するため、ヒト死後脳を用いて5-hmcがゲノムのどの領域に多く含まれるか、ゲノムマッピングを行った。ヒト健常者1名の死後脳前頭葉組織から神経細胞・非神経細胞由来のゲノムDNAを調製し、それぞれを解析した結果、神経細胞において、LINE-1という反復配列の一部に5-hmcの蓄積が多く見られた。

研究成果の概要(英文)：Despite a huge number of studies, the etiology of psychiatric disorders has not been clarified. Recently, 5-hydroxymethylcytosine (5-hmc) was identified as a novel form of modified cytosine, and it is considered as an intermediate form in demethylation step of 5-methylcytosine (5-mc). As the content of 5-hmc in the brain tissues is higher than in any other tissues, it is expected to have the novel roles in the brains.

We have reported that the copy number of Long Interspersed Elements-1 (LINE-1), which has autonomous retrotransposition activity in human genome, increases genomic DNA derived from postmortem brains of patients with major mental disorders, but its mechanism remains unknown. In this study, we have studied the 5-hmc and 5-mc status at LINE-1 regions of genomic DNA from neurons and non-neuronal cells in a healthy human postmortem brain. We found that the content of 5-hmc is especially concentrated at evolutionarily young (active) LINE-1 region in neuronal cells.

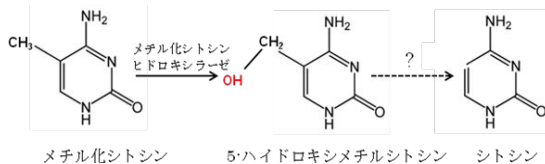
研究分野：精神疾患

キーワード：ハイドロキシメチルシトシン DNAメチル化 ヒト死後脳

### 1. 研究開始当初の背景

主要な精神疾患である統合失調症や躁うつ病は、発症原因がまだ良く分かっていないが、遺伝要因と環境要因の双方が複雑に関与していると考えられている。遺伝要因としては、特殊な症例を除くと、発症に確実に関与するような遺伝子群は同定されていない。一方、外部の環境によって変動すると考えられている因子に、DNA メチル化などのエピジェネティックな修飾がある。これらは塩基配列の変化をとまわずに長期的な遺伝子発現変化を可能にする機構であり、脳組織の病的な性質変化に密接に関わっている可能性がある。

近年、ヒトゲノムにおける新たな修飾塩基として、5-ハイドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine, 5-hmc) が報告された。5-hmc はメチル化シトシン (5-hydroxymethylcytosine, 5-mc) のメチル基が酵素反応により水酸化されることによって生じ (下図)、脳神経系の組織に豊富に存在することが報告されている。



5-hmc の機能的意義は不明であるが、5-mc が脱メチル化され、シトシンに戻る際の中間産物であるという説が有力である。これまで神経細胞での脱メチル化という現象の有無自体が不明であったが、5-hmc の発見によって、神経細胞でも能動的に脱メチル化が起きていることが示唆されることになった。このように、5-hmc は脳神経系における神経細胞機能発現のための重要な因子の1つである可能性がある。

### 2. 研究の目的

上記のように、5-hmc は脳組織において、脱メチル化反応に関与していると考えられており、精神疾患や高次脳機能との関連も疑われているが、その機能的意義はほとんど明らかにされていない。本研究では、我々が確立したヒト死後脳からの神経細胞核単離法及び、5-hmc 解析技術を用いて、ヒト死後脳由来の神経細胞・非神経細胞由来のゲノム DNA における 5-hmc のマッピングを行い、機能的意義を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 死後脳からの神経細胞・非神経細胞由来核の分画

ヒト健常者の死後脳前頭葉 1 検体より生化学的手法を用いて、全細胞核の分取を行った。神経細胞の核に特異的に発現している NeuN タンパク質に対する抗体を用いて、神経細胞核の蛍光標識を行ったのち、セルソーターを用いて神経細胞、非神経細胞核の分画

を行い、それぞれの分画に対して DNA の抽出を行った。

(2) 5-hmc を含む DNA 断片の濃縮

得られた DNA について、100-500 bp ほどのサイズに断片化を行ったのち、5-hmc のグルコシル化を行い、ビオチンを付加した。ビオチンを含む配列のプルダウンを行い、5-hmc を含む DNA 断片の濃縮を行った。

(3) 次世代シーケンサーを用いたゲノムマッピング

濃縮した DNA 断片について、次世代シーケンサー (Illumina 社 HiSeq) を用いてシーケンスを行った。得られたシーケンスがヒトゲノムのどこに相当するか、マッピングを行い、5-hmc が濃縮しているゲノム部位を同定した。以前の研究において同じサンプルで取得していた 5-mc のデータと比較・統合し、5-hmc の特異的パターンとその特性を解析した。

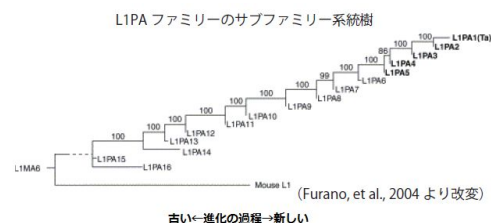
### 4. 研究成果

今回の解析では、我々は特にレトロトランスポゾン的一种である LINE-1 配列に着目した。LINE-1 配列はヒトゲノムの約 17% を占め、自らの配列にコードされたタンパク質だけを用いて、自らの配列をゲノム中に増幅することが可能である。このような LINE-1 配列のコピー数増加は、一般的には生殖細胞や発生初期にしか起きないとされている。成体の体細胞では LINE-1 配列上流にある転写制御領域のメチル化によって、転写・転移は抑制されていると考えられている。

しかし近年、成体の神経前駆細胞でもこのような LINE-1 の転移が起こることが示されてきている。さらに我々は昨年、健常者と比較すると、統合失調症患者の神経細胞では LINE-1 配列のコピー数が増幅していることを示した。この現象の機序は不明であるが、LINE-1 上流配列のメチル化・ハイドロキシメチル化に関わる可能性も考えられる。そこで我々は、神経細胞・非神経細胞 DNA の LINE-1 配列におけるメチル化・ハイドロキシメチル化状態の解析を行った。

(1) 神経細胞・非神経細胞におけるメチル化状態の比較

ヒトゲノムに含まれる LINE-1 は進化的に古いものから新しいものまで存在する。(下図)



我々は、全ゲノムバイサルファイトシーケン

ス法によって得られたデータを使用し、LINE-1配列の29種類のサブファミリーに関して、メチル化状態を解析した。その結果全てのLINE-1配列において、非神経細胞に比べて、神経細胞でメチル化が亢進(~10%)しているという結果が得られた。また進化的な観点では、新しいサブファミリーは神経細胞でメチル化率は低下している傾向が見られる一方、非神経細胞ではどのLINE-1でもメチル化率は一定である傾向が見られた。進化的に最も新しく、唯一転移活性を保っているといわれているL1Hsに関しては、神経細胞と非神経細胞のメチル化率の差は1%程度とわずかであった。

## (2) 神経細胞・非神経細胞におけるハイドロキシメチル化状態の比較

ハイドロキシメチル化について、メチル化と同様の解析を行った。その結果、神経細胞・非神経細胞ともに、進化的に比較的新しいLINE-1配列に5-hmcが多く検出された。特にL1-Hsに関しては、非神経細胞と比較して、神経細胞で20%ほどハイドロキシメチル化が亢進している結果になった。また神経細胞では、LINE-1の特に5'側において5-hmcの有意な集積が見られた。

このように、ヒト死後脳の成熟神経細胞において、LINE-1は進化的に新しいサブファミリーほどメチル化率が減少する一方で、ハイドロキシメチル化は増加する傾向が見られた。またハイドロキシメチルシトシンはL1Hsの5'端側に集積していることから、神経細胞中でL1Hsの転写活性が上昇している可能性があり、これらの現象が統合失調症患者の神経細胞で亢進している可能性も考えられる。今後は患者検体を使用して、同様の解析を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11件)

1. Sugawara H, Bundo M, Asai T, Sunaga F, Ueda J, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Effects of quetiapine on DNA methylation in neuroblastoma cells. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2014,56C:117-121. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.08.010. 査読有
2. Murata Y, Nishioka M, Bundo M, Sunaga F, Kasai K, Iwamoto K. Comprehensive DNA methylation analysis of human neuroblastoma cells treated with blonanserin. *Neuroscience Letters* 2014, 563:123-128. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.038. 査読有
3. Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K. Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron* 2014,81:306-313. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.053. 査読有
4. Nishioka M, Shimada T, Bundo M, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Kano Y, Sasaki T, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Neuronal cell-type specific DNA methylation patterns of the Cacna1c gene. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2013,31:89-95. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2012.11.007. 査読有
5. Bundo M, Sunaga F, Ueda J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. A systematic evaluation of whole genome amplification of bisulfite-modified DNA. *Clinical Epigenetics* 2012,4:22. doi: 10.1186/1868-7083-4-22. 査読有.
6. Ikegame T, Bundo M, Murata Y, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *Journal of Human Genetics* 2013,58:434-438. doi: 10.1038/jhg.2013.65. 査読無
7. Sugawara H, Bundo M, Ishigooka J, Iwamoto K, Kato T. Epigenetic regulation of serotonin transporter in psychiatric disorders. *Journal of Genetics and Genomics* 2013,40:325-329. doi: 10.1016/j.jgg.2012.10.002. 査読無
8. Nishioka M, Bundo M, Kasai K, Iwamoto K. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. *Genome Medicine* 2012,4:96. doi: 10.1186/gm397. 査読無
9. 文東美紀、加藤忠史、岩本和也 統合失調症の患者死後脳ではLINE-1配列が増加している、科学 2014,84:808-810. 査読無
10. 文東美紀、加藤忠史、岩本和也 統合失調症の神経細胞ゲノムではLINE-1の

ピー数が増加している、実験医学  
2014,32:1257-1260. 査読無

東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授  
研究者番号：40342753

11. 文東美紀、加藤忠史、岩本和也 LINE-1、  
分子精神医学 2014,14:138-139. 査読無

〔学会発表〕(計 5件)

1. 澤井大和、西岡将基、文東美紀、上田順子、石井貴男、鶴飼涉、橋本恵理、笠井清登、加藤忠史、岩本和也 「ヒト死後脳神経細胞・非神経細胞ゲノムにおけるLINE-1のハイドロキシメチル化状態の検証」第10回日本統合失調症学会(2015/3/27-28 都市センターホテル・東京)
2. 岩本和也、文東美紀、加藤忠史 「脳ゲノム解析と精神疾患」第37回日本分子生物学会ワークショップ「神経系の機能とその破綻」(2014/11/25-27 パシフィコ横浜・神奈川)
3. 岩本和也 「精神疾患のエピジェネティクス」第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学会公開シンポジウム「精神と神経のエピジェネティクス疾患」(2014/9/29-10/1 奈良県文化会館・奈良)
4. 文東美紀、加藤忠史、岩本和也 「統合失調症患者死後脳ではLINE-1コピー数が増大している」第8回日本エピジェネティクス研究会年会(2014/5/25-27 伊藤国際学術研究センター・東京)
5. Bundo M, Miyauchi T, Ueda J, Komori A, Sunaga F, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Increased copy number of LINE-1 in the prefrontal cortices of patients with schizophrenia. 21st World Congress of Psychiatric Genetics (Oct 17-21 2013, Boston, USA)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.molpsy.com/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

文東 美紀 (BUNDO, Miki)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00597221

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

岩本 和也 (IWAMOTO, Kazuya)