

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670539

研究課題名(和文) 自閉症脳におけるエピジェネティクス解析

研究課題名(英文) Genome-wide DNA methylation profiles in post-mortem autistic brains

研究代表者

岩田 泰秀 (IWATA, YASUhide)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10285025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム(ASD)の脳内遺伝子のエピジェネティック過程がその病態に関与している可能性を考え、特にDNAメチル化についてASD死後脳での変化の有無を検証した。6名のASD男性および年齢がマッチする7名の定型発達男性の凍結死後脳サンプル(縫線核)よりゲノムDNAを抽出し、約45万CpGサイトのメチル化レベルを測定した。

その結果、ASD特異的に81 CpGサイトのメチル化変化を見出した。そのうち44サイトのメチル化は有意に増加し、37サイトのメチル化は有意に減少していた。さらにこの中には、ASDとの関連が示唆されている複数の遺伝子(DAB1 やGR1A1など)の領域が含まれていた。

研究成果の概要(英文)：Previous studies indicate that autism has a strong genetic component; however, the underlying genetic mechanisms remain unclear. Recently, it was reported that genetic heritability is lower than previously estimated, and that environmental factors have a greater influence on the development of autism spectrum disorder (ASD). Epigenetic processes such as DNA methylation are considered to be at the interface of genetic and environmental factors. We investigated genome-wide DNA methylation profiles in the dorsal raphe region of post-mortem brain from individuals with autism. We found differentially methylated regions (DMRs) not only in promoters, but also in gene bodies, 3-untranslated regions (UTR) and intergenic regions in autism. In addition, because autism is a highly heterogeneous disorder, we screened for individual-specific DNA methylation (IS-DMRs) and found differentially methylated CpG sites at promoters, gene bodies, 3-UTRs and intergenic regions in autism.

研究分野：精神医学

キーワード：DNAメチル化 エピジェネティック過程 死後脳 自閉症スペクトラム障害

1. 研究開始当初の背景

自閉症の病因は遺伝的要素が強いと考えられてきた。そのため世界中で原因遺伝子の同定が試みられ、これまでに多数の候補遺伝子が報告されているが、その同定には至っていない (Folstein and Rosen-Sheidley, 2001; Toro et al., 2010)。近年、自閉症の遺伝的要因はこれまで見積もられていたよりも低いこと、さらに環境要因が本疾病に大きな影響を与えていることが報告された (Hallmayer et al., 2011)。一方、環境要因は DNA メチル化やヒストン修飾のようなエピジェネティック過程に影響を与えることが解明されつつあり、エピジェネティック過程は遺伝的要因と環境要因のインターフェースであると考えられている。以前より自閉症スペクトラム障害やその辺縁疾患 (アンジェルマン症候群、フラダー・ビリー症候群、レット症候群、脆弱 X 症候群など) には、DNA メチル化制御を受けるゲノムインプリンティングや X 染色体不活性化の異常が関与していると言われてきた (Reviewed in Dagli et al., 2012; Cassidy et al., 2012; LaSalle et al., 2009; Cedar et al., 2012)。これらのことから、エピジェネティック過程、特に DNA メチル化が自閉症の病因に関与していると考えられる。

一方、自閉症の病態にはセロトニン神経系の異常が強く示唆されている (Schain and Freedman, 1961; Hanley et al., 1977; Cook, 1990; Anderson et al., 1990; McBride et al., 1998; Mulder et al., 2004; Hranilovic et al., 2007)。さらに、我々はセロトニン・トランスポーターをポジトロン断層法により、自閉症者の脳内で広範囲にわたりセロトニン・トランスポーターの機能が低下していることを見出している (Nakamura et al., 2010)。以上の学術的背景から、セロトニン神経系に關与す

る遺伝子群の DNA メチル化の異常が自閉症の病因である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

アメリカ脳バンク (autism tissue program) から提供を受けた自閉症者死後脳および健常者死後脳を用いる。まず、メチル化解析アレイを用い、網羅的にメチル化異常サイトを解析・同定する。続いて、特にメチル化異常が顕著だったサイトおよびセロトニン神経系に關与する遺伝子のサイトについてのメチル化率の変化を定量的に解析する。最後に、本研究で見出されたメチル化異常が遺伝子発現に影響を与えるかについて検討する。これら一連の解析により見出された結果を自閉症の病因・病態メカニズム解明に寄与する。

3. 研究の方法

男性健常コントロールサンプル (n=7)、男性自閉症サンプル (n=6) を使用する。これらサンプルについて、様々な年齢、死後経過時間および人種などがあるが、それらについてコントロールサンプルと自閉症サンプルの間に有意な差が無いことを確認している。

また、我々は、セロトニン神経の異常を報告しており (Nakamura et al., 2010)、この神経核が縫線核にあること、また、縫線核に存在する神経が環境に反応しやすい (Hollis et al., 2006; Takahashi et al., 2012) という報告がある。そこで本研究では自閉症の病因・病態に直接關与する部位として縫線核を使用する。

メチル化異常の網羅的解析

1) AllPrep DNA/RNA Mini Kit を用いて、死後脳縫線核組織から gDNA および mRNA (平成 27 年度に使用) を抽出する。gDNA および mRNA がその後の実験に耐え得るクオリティーを有しているかについて

Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて確認する。

2) gDNA についてメチル化解析用アレイ (Infinium HumanMethylation450 BeadsChip) を用いて、メチル化異常サイトを網羅的に解析・同定する。本アレイは全ゲノムを包括的にカバーした 45 万以上のメチル化サイトをターゲットとしており、ゲノムワイドなエピゲノム解析に最適なアレイである。また、メチル化サイトを 1 塩基の解像度で検出と定量することができ、遺伝子領域の 99% をカバーしており、遺伝子領域 (プロモーター、5' UTR、第 1 エクソン、遺伝子内、3' UTR) あたり平均 17 CpG サイトを搭載している。さらに CpG アイランドは全体の 96% をカバーしており、これらは近辺領域の CpG ショア、CpG アイランドも含んでいる。

3) ここで得られた結果について遺伝子解析用ソフト (GenomStudio) を用いて解析する。まずコントロールのメチル化率の平均と自閉症のメチル化率の平均を比較・検討する。統計解析は Mann-Whitney U test をもちい $p < 0.05$ を有意とする。さらに、有意な差があった中で、コントロールから 10% 増減したサイトをピックアップする。また、自閉症は単一因子による疾患でないことが示唆され、個々で要因が異なる可能性が示唆されている (Baron-Cohen et al., 2011) そこで、コントロールの平均に対する個々の自閉症サンプルの値の差も検討する。これに関しては、コントロール間でのメチル化率の値にバラつきがないこと ($SD < 0.05$)、コントロールに対して増減率 30% 以上を条件にする。なお、SNPs によってメチル化率が影響を受ける可能性があるため、SNPs が報告されているサイトは予め解析から除外する。

以上の解析より、自閉症脳においてメチル化異常の認められたサイトおよびそのサ

イトを持つ遺伝子を網羅的に同定する。

予備実験にて、複数のサイトにおいてメチル化異常が見出されている。メチル化異常の定量的解析

Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) 法を用いる。

1) Bisulfite 変換

Bisulfite 変換として、gDNA に亜硫酸水素ナトリウムを作用させ、非メチル化シトシン基をウラシル基に変換する。これには QIAGEN Epiect Bisulfite Kit を用いる。この変換により、メチル化 DNA を効率よく特定できる。

2) COBRA 法 (Brena et al., 2006, Xiong et al., 1997)

Bisulfite 処理した gDNA を用いて、対象遺伝子を PCR で増幅後、メチル化部位特異的制限酵素を用いて PCR 産物を切断する。これによって、メチル化された DNA は断片化し、非メチル化 DNA は断片化しない。続いて、Agilent Bioanalyzer 2100 にてキャピラリー電気泳動を行うことで、断片長の違いによって異なるバンドが得られる。最後にその比から DNA メチル化率を算出する。

メチル化異常による遺伝子発現への影響

1) 26 年度に抽出した mRNA から cDNA を合成する。

2) これまでに同定されたメチル化異常サイトを持つ遺伝子 (特にセロトニン神経系関連遺伝子) の発現をリアルタイム PCR 法によって解析する。コントロールは ACTB, GAPDH を用いる。これらの解析から、メチル化異常の認められた遺伝子で、その発現が変化しているかを確認する。また、メチル化率と遺伝子発現の相関を解析し、その関連性についても検討する。

以上、自閉症死後脳におけるメチル化異常、およびそのために起こる遺伝子発現異常から自閉症発症・病態メカニズムを特に

セロトニン神経系に着目し考察する。

4. 研究成果

本研究では Autism Tissue Program (プリンストン、米国) より入手した ASD 死後脳のうち、6 名の ASD 男性および年齢がマッチする 7 名の定型発達男性の凍結死後脳の縫線核をえらび、抽出したゲノム DNA の約 45 万 CpG サイトのメチル化レベルを Infinium HumanMethylation450 BeadsChip (illumina 社製、米国) で測定した。その結果、ASD 特異的に 81CpG サイトのメチル化変化を見出した。そのうち 44 サイトのメチル化は有意に増加し、37 サイトのメチル化は有意に減少していた。さらにこの中には、ASD との関連が示唆されている複数の遺伝子 (DAB1 や GRIA1 など) の領域が含まれていた。本研究で明らかにされた ASD 脳における DNA メチル化異常、特に ASD 関連遺伝子の DNA メチル化異常は、環境要因が ASD の発症や病態にどのように関与しているかを解明する重要な手掛かりとなる。今後、個々のメチル化異常に関して詳細な検討も必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Maekawa M, Iwayama Y, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Hisano Y, Toyota T, Balan S, Matsuzaki H, **Iwata Y**, Takagai S, **Yamada K**, Ota M, Fukuchi S, Okada Y, Akamatsu W, Tsujii M, Kojima N, Owada Y, Okano H, Mori N and Yoshikawa T. Investigation of the fatty acid transporter-encoding genes SLC27A3 and SLC27A4 in autism Sci Rep. 5: 16239, 2015.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田泰秀 (Yasuhide, Iwata)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10285025

(2) 研究分担者

亀野陽亮 (Yousuke, Kamenno)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40537255

(3) 連携研究者

山田浩平 (Kohei, Yamada)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・講師

研究者番号: 50588879