

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09592

研究課題名(和文) 患者iPS細胞のエピゲノムタンパク質異常を改善させる発達障害疾患治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of epigenetic drugs for neurodevelopmental disorders

研究代表者

三宅 邦夫 (MIYAKE, Kunio)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：60550712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクス機構は可逆的な変化であることから、治療標的として有効であると考えられている。本研究は既存の抗精神病薬におけるエピジェネティクス変化を介した神経細胞機能への影響を解明することを目的とした。抗精神病薬AmitriptylineはAtf3, Hmox1プロモーターのヒストンH3K4トリメチル化し、遺伝子発現を増加させることがわかった。さらにAmitriptyline前処理により神経細胞死を抑制する効果があることを見出した。本研究結果から既存の抗精神病薬の中にエピジェネティクス遺伝子発現を変化させ、神経細胞死を抑制する効果があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Antidepressants are known to alter gene expression patterns by inducing changes in the epigenetic status of neuronal cells. We examined whether antidepressants exert an anti-apoptotic effect via epigenetic mechanisms. We analyzed global gene expression in mouse primary cortical neurons after treatment with antidepressants. The neuroprotection-associated genes, activating transcription factor 3 (Atf3) and heme oxygenase 1 (Hmox1), were up-regulated by treatment with amitriptyline. Quantitative chromatin immunoprecipitation assay revealed that amitriptyline increased enrichments of trimethylation of histone H3 lysine 4 in the promoter regions of Atf3 and Hmox1, which indicate an active epigenetic status. Amitriptyline pre-treatment attenuated 1-methyl-4-phenylpyridinium ion- or amyloid beta 1-42-induced neuronal cell death and inhibited the activation of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2. These findings suggest preconditioning and neuroprotective effects of amitriptyline.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 抗精神病薬 ヒストン修飾 神経変性疾患 神経細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化や社会の成熟に伴って、発達障害や精神・神経疾患の重要性が高まっている。自閉症などの発達障害やうつ病などの多くの精神疾患の原因が神経ネットワークを構築するシナプス形成・機能異常であると考えられるようになり、現在、シナプス形成分子の仕組みを解明する研究が盛んに行われている。しかしながら、シナプス形成・機能にかかわる分子は数が多いことから、これらの分子を標的とした治療薬の開発は困難である。

一方、DNA のメチル化やヒストン修飾に代表されるエピジェネティックな遺伝子の調節機構の異常がこれらの疾患に関与していることもわかってきた。その中でうつ病発症機構の1つとしてグルココルチコイドレセプター (GR) 遺伝子のプロモーター領域の高メチル化が関与している (Nat neurosci, 2011) ことや自閉症疾患であるレット症候群がエピジェネティックな遺伝子発現調節でカギとなる転写調節因子である MECP2 遺伝子の変異で発症することが報告された (Nat genet, 1999)。また自閉症、ADHD や統合失調症の一卵性双生児患者における臨床症状の差異がエピゲノム (DNA メチル化) の差異であったことが報告 (FASEB J, 2010、Epigenetics, 2010、Human Mol Genet, 2011) されていることから、同一のゲノムでもエピゲノムのパターンにより病気の症状や進行度に大きく影響することが示唆される。

エピジェネティクス機構は可逆的な変化であることから、治療標的として有効であると考えられ (Nat neurosci, 2006)、近年、DNA のメチル化酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤ががんや糖尿病、アルツハイマー病などの神経変性疾患の治療に有効であることがわかってきた。しかしながら、発達障害や精神疾患におけるエピジェネティクス治療薬はまだ開発されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の2点を明らかにすることを目的とした。

(1) 代表的な自閉症疾患であるレット症候群患者の iPS 細胞由来の神経細胞を対象に、エピジェネティクス関連分子を標的とした発達障害治療法及びハイスループットな薬剤スクリーニング系を構築し、効果的な発達障害治療薬開発のための基盤となる知見の獲得

(2) 精神疾患に使用されている既存の治療薬を用いたエピジェネティクス変化を介した神経細胞機能への影響の解明

## 3. 研究の方法

(1) *in vitro* におけるヒストン脱アセチル化阻害酵素 1 (HDAC1) 阻害候補物質のスクリーニング

化合物設計・合成評価用ソフトウェア

(myPresto)」で評価を得て合成した HDAC1 阻害候補物質 48 種類について蛍光検出法で HDAC の阻害活性を測定した。

(2) 細胞内における HDAC1 阻害効果の検討  
神経系培養細胞株である SH-SY5Y 細胞を用いて、HDAC 阻害効果、標的遺伝子の発現を検討した。

(3) 種々の抗精神病薬を用いた遺伝子発現解析

胎生 15.5 日のマウス大脳から初代培養神経細胞を調整し、各種抗精神病薬 (Imipramine(5 $\mu$ M), Citalopram(10 $\mu$ M), Duloxetine(0.1 $\mu$ M), Amitriptyline(5 $\mu$ M), Mirtazapine(50 $\mu$ M)) で 48 時間処理し、RNA を回収した。網羅的遺伝子発現解析を行うため、Affymetrix 社のプロトコールに従いサンプル調整し、Mouse Gene 2.0 ST chips を用いて比較解析を行った。ANOVA ( $p < 0.05$ ), Bonferroni による多重比較検定によりコントロールと比較して有意に変化する遺伝子を同定した。特定の遺伝子に対して再現性を検討するため、リアルタイム qPCR により確認し、タンパクレベルでの変化をウエスタンブロットティング法により検討した。

(4) ヒストン修飾解析

標的遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾が変化しているか検討するため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) -qPCR を行った。ヒストン修飾抗体は、H3K9ac, H3K27ac, H3K4me3 を用いた。

(5) 神経細胞死抑制効果解析

Amitriptyline による神経細胞死抑制効果を検討するために、48 時間 Amitriptyline 処理後、Amyloid beta 1-42 (A $\beta$ 1-42) および MPP<sup>+</sup> で処理し、MTT, LDH アッセイ、caspase3 発現解析を行った。さらに ERK, CREB の活性化をウエスタンブロットティング法により検討した。

## 4. 研究成果

(1) 新規 HDAC1 阻害候補化合物における *in vitro* 活性スクリーニング

HDAC1 阻害候補物質 48 種類について蛍光ペプチドを使用し、HDAC 阻害活性を測定し、既存の HDAC 阻害剤と候補物質のうち HDAC1 阻害活性の高かった上位 3 つを図 1 に示した。特に化合物 No.4 がほかのものと比較して IC<sub>50</sub> が低かった。さらにこれらの化合物がほかの HDAC の活性を阻害するかどうかを検討した結果を表 1 に示した。その結果、HDAC1 だけでなく、同じクラス 1 のほかの HDAC も同程度の用量で阻害してしまうことが分かった。また SH-SY5Y 細胞における化合物 No.4 の HDAC 阻害活性を測定した結果、120 $\mu$ M でコントロールと比較して有意に HDAC 阻害効果が確認された。しかしながら既存の HDAC 阻害剤で

あるVPAは低用量でHDAC1の阻害にすること、MS-275は低濃度でHDAC1,2にのみ作用することを考えると今回の候補物質は有効な化合物といえず、この先の検討は断念した。本研究結果から、同じクラスのHDACは構造が類似していることから特異的に阻害する化合物を設計することは現時点で難しいと考えられる。そこでここからは既存の治療薬におけるエピジェネティクスを変化させ、神経細胞機能を改善する薬の探索を行った

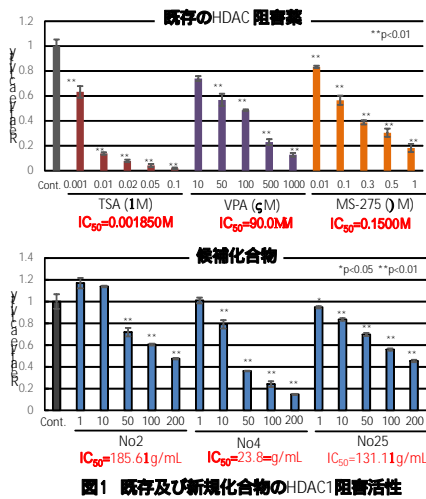


図1 既存及び新規化合物のHDAC1阻害活性

表1. 既存及び新規HDAC阻害化合物のIC<sub>50</sub>

	TSA	VPA	MS275	No.2	No.4	No.25
Class1	HDAC1	0.00185	90	0.149697	185.6268	23.80494
	HDAC2	0.006851	973.6927	0.710139	N.D.	103.2458
	HDAC3	0.005328	>1000	>1	N.D.	57.8133
	HDAC8	0.361526	838.8843		7.616642	21.365
Class2a	HDAC4	>10	>1000	>1	N.D.	N.D.
	HDAC5	6.405962	>1000	>1	N.D.	N.D.
	HDAC7	2.57363	>1000	>1	131.9508	N.D.
	HDAC9	8.636161	>1000	>1	N.D.	N.D.
Class2b	HDAC6	0.007385	>1000	>1	25.9703	27.74912

(2) 初代培養神経細胞における抗精神病薬処理による遺伝子発現への影響  
各種抗精神病薬における網羅的遺伝子発現解析を行った結果、Duloxetine 以外の4種類の抗精神病薬で共通して1.5倍以上遺伝子発現変化した遺伝子数は増加遺伝子で25(図2A)、減少遺伝子は21(図2B)であった。

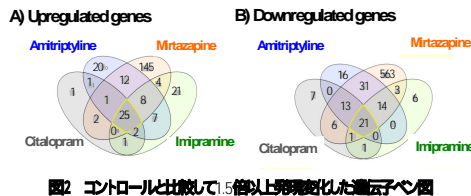


図2 コントロール出親で1.5倍以上発現した遺伝子への関

これらの遺伝子のうち神経細胞の保護に関与する遺伝子である *Atf3*, *Hmx1*, *Gdf15* に注目して解析を行った。qRT-PCRでの確認およびタンパク質の発現解析から、Amitriptyline と Mirtazapine で有意に発現が増加していることがわかった(図3)。*Gdf15* はqRT-PCRで再現性が取れなかったことから

以下の解析から除外した。  
(3) *Atf3*, *Hmx1* プロモーター領域における

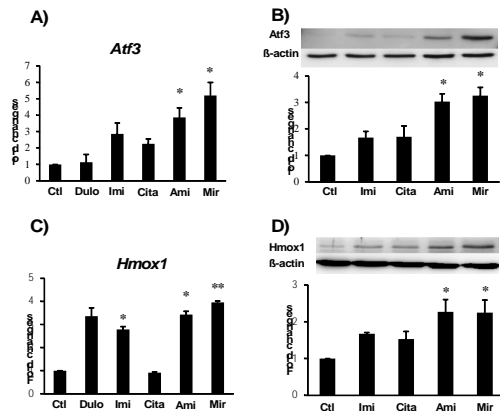


図3 (A,C) qRT-PCR, (B,D) ウェスタンブロットによる発現解析

ヒストン修飾変化  
それぞれの遺伝子の転写開始点付近にプライマーを設計(図4A,5A)し、3種類のヒストン修飾抗体を用いてChIP-qPCR解析を行った。その結果、Amitriptyline 処理において *Atf3*, *Hmx1* の転写開始点上流領域において有意にヒストン H3K4 トリメチル化が増加していることが分かった(図4B,5B)。しかしながら Mirtazapine 処理では増加傾向はあるものの有意差は確認できなかった(図4C,5C)。

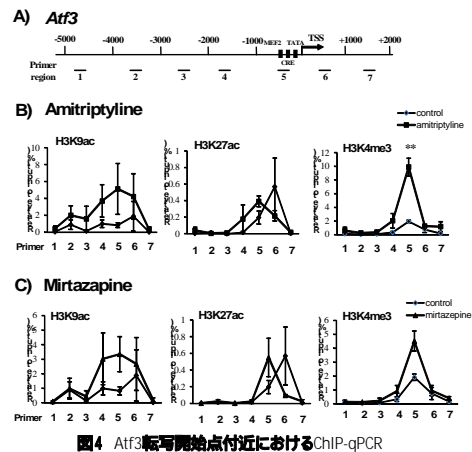


図4 *Atf3* 転写開始点付近におけるChIP-qPCR

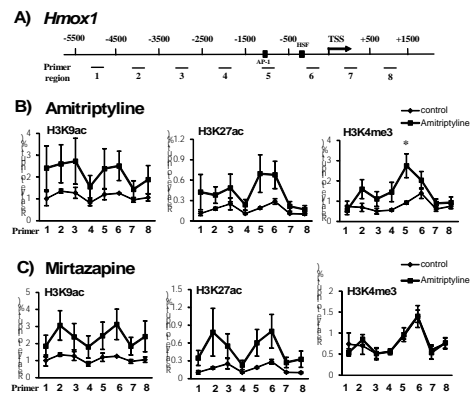


図5 *Hmx1* 転写開始点付近におけるChIP-qPCR

(4) Amitriptyline 前処理による神経細胞死

## 抑制効果

Amitriptyline 前処理後、MPP<sup>+</sup> (図 5A-C) および Aβ1-42 (図 5D-F) で細胞死誘導した結果、細胞生存率が增加 (図 5A,D)、死細胞の減少 (図 5B,E) 及びカスパーゼ 3 の活性化 (図 5C,F) が有意に減少していた。

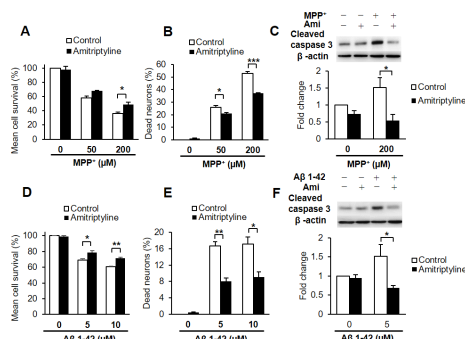


図6 Amitriptyline前処理によるMPP<sup>+</sup>およびAβ1-42誘導細胞死抑制効果

さらにどのような細胞内シグナルが活性化しているか明らかにするために ERK, CREB 経路を調べた。その結果、MPP<sup>+</sup> (図 6A-C) では有意に ERK のリン酸化の亢進が抑制されていた。Aβ1-42 (図 6D-F) では有意ではないものの MPP<sup>+</sup> 同様の傾向であった。CREB の活性化はどちらも変化はなかった。これらの結果から、Amitriptyline 前処理により ERK 活性化を抑制し、細胞死が抑制されていることが考えられる。

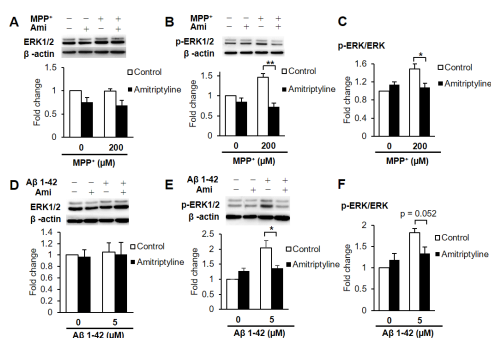


図7 Amitriptyline前処理によるMPP<sup>+</sup>およびAβ1-42誘導細胞死におけるERK経路の活性化

(5) 本研究では当初、新規 HDAC1 阻害化合物による発達障害患者由来 iPS 細胞を用いたエピジェネティクス治療薬の探索を目標にしてきたが、うまく開発できなかった。しかしながら既存の治療薬、本研究では抗精神病薬の中にエピジェネティクスを変化させる作用のあるものがあり、神経細胞死抑制に作用することが示唆された。これらの結果は、既存の抗精神病薬の中には別の疾患治療へ有効である可能性が示唆される。さらに既存薬の化学構造をもとにして、より副作用の少なく、効果的なエピジェネティクス治療薬の開発につながることを期待される。

## 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 16 件)

Miura R, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, Wang SL, Chen CH, Miyake K, Ishizuka M, Iwasaki Y, Ito YM, Kubota T, Kishi R. An epigenome-wide study of cord blood DN A methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: The Hokkaido study. *Environ Int.* 2018, 115:21-28. doi: 10.1016/j.envint.2018.03.004. (査読有)

Huang M, Inukai T, Miyake K, Tanaka Y, Kagami K, Abe M, Goto H, Minegishi M, Iwamoto S, Sugihara E, Watanabe A, Somazu S, Shinohara T, Oshiro H, Akahane K, Goi K, Sugita K. Cl ofarabine exerts antileukemic activity against cytarabine-resistant B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with low deoxycytidine kinase expression. *Cancer Med.* 2018, 7(4):1297-1316. doi: 10.1002/cam4.1323. (査読有)

Huang M, Miyake K, Kagami K, Abe M, Shinohara T, Watanabe A, Somazu S, Oshiro H, Goi K, Goto H, Minegishi M, Iwamoto S, Kiyokawa N, Sugita K, Inukai T. Lack of association between deletion polymorphism of BIM gene and in vitro drug sensitivity in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2017, 60:24-30. doi: 10.1016/j.leukres.2017.06.003. (査読有)

Tran NQV, Miyake K. Neurodevelopmental Disorders and Environmental Toxicants: Epigenetics as an Underlying Mechanism. *Int J Genomics.* 2017;2017:7526592. doi: 10.1155/2017/7526592. (査読有)

Tran NQV, Nguyen AN, Takabe K, Yamagata Z, Miyake K. Pre-treatment with amitriptyline causes epigenetic up-regulation of neuroprotection-associated genes and has anti-apoptotic effects in mouse neuronal cells. *Neurotoxicol Teratol.* 2017, 62:1-12. doi: 10.1016/j.ntt.2017.05.002. (査読有)

Furuse T, Miyake K, Kohda T, Kaneda H, Hirasawa T, Yamada I, Kushida T, Kashimura M, Kobayashi K, Ishino F, Kubota T, Wakana S. Protein-restricted diet during pregnancy after insemination alters behavioral phenotypes of the progeny. *Genes Nutr.* 2017, 12:1. doi: 10.1186/s12263-016-0

550-2. (査読有)  
Andoh-Noda T, Akamatsu W, Miyake K, Kobayashi T, Ohyama M, Kurosawa H, Kubota T, Okano H. Differential X Chromosome Inactivation Patterns during the Propagation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Keio J Med*. 2017, 66(1):1-8. doi: 10.2302/kjm.2016-0015-0A. (査読有)  
Andoh-Noda T, Inouye MO, Miyake K, Kubota T, Okano H, Akamatsu W. Modeling Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2016;15(5):544-50. (査読なし)  
Kubota T, Miyake K, Hariya N, Tran Nguyen Quoc V, Mochizuki K. Prader-Willi Syndrome: The Disease that Opened up Epigenomic-Based Preemptive Medicine. *Diseases*. 2016, 4(1). pii: E15. doi: 10.3390/diseases4010015. (査読なし)  
Kubota T, Miyake K, Hariya N, Mochizuki K. Epigenomic-basis of Preemptive Medicine for Neurodevelopmental Disorders. *Curr Genomics*. 2015, 16(3):175-82. doi: 10.2174/138920291666150216221312 (査読なし)  
Andoh-Noda T, Akamatsu W, Miyake K, Matsumoto T, Yamaguchi R, Sanosaka T, Okada Y, Kobayashi T, Ohyama M, Nakashima K, Kurosawa H, Kubota T, Okano H. Differentiation of multipotent neural stem cells derived from Rett syndrome patients is biased toward the astrocytic lineage. *Mol Brain*. 2015, 8:31. doi: 10.1186/s13041-015-0121-2. (査読有)  
Hariya N, Miyake K, Kubota T, Goda T, Mochizuki K. Putative PPAR target genes express highly in skeletal muscle of insulin-resistant MetS model SHR/NDmc-cp rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015;61(1):28-36. (査読有)  
Miyake K, Kubota T. Molecular mechanism in Rett syndrome. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2015, 145(4):178-82. doi: 10.1254/fpj.145.178. (査読なし)  
三宅邦夫, 久保田健夫. シンポジウム「エピジェネティクス研究が拓くストレス科学の世界」. *発達障害とエピジェネティクス*. *ストレス科学* 2015, 30(1): 27-36. (査読なし)  
三宅邦夫, 久保田健夫: 特集1 エピジェネティクス機構から精神神経疾患の病態を探る「発達障害のエピジェネティクス病態の最新理解」. *日本生物学的精神医学会誌* 2015, 26:21-25. (査読なし)  
Yang X, Hoshino A, Taga T, Kunitzu

T, Ikeda Y, Yasumi T, Yoshida K, Wada T, Miyake K, Kubota T, Okuno Y, Muramatsu H, Adachi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. A female patient with incomplete hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by a heterozygous XIAP mutation associated with non-random X-chromosome inactivation skewed towards the wild-type XIAP allele. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014, 14(6):685-97. doi: 10.1586/14737159.2014.925805. (査読有)

[学会発表](計16件)

三宅 邦夫, Vuong Tran, Nghia Nguyen, 高部 京子, 山縣 然太郎. 抗精神病薬アミトリプチリンはエピジェネティクス機構を介して神経細胞死を抑制する. *ConBio2017*, (神戸), 2017.12.06-9.  
三宅邦夫, 三浦りゅう, 小林祥子, 小林澄貴, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 山縣然太郎, 岸玲子. 妊娠中の喫煙曝露における臍帯血を用いたDNAメチル化変化領域の同定. 第46回日本環境変異原学会(東京) 2017.11.6-7.  
Vuong Nguyen Quoc Tran, Nghia An Nguyen, Kyoko Takabe, Zentaro Yamagata, Kunio Miyake. Amitriptyline causes epigenetic up-regulation of neuroprotection-associated genes and has anti-apoptotic effects in mouse neuronal cells. 第40回日本神経科学大会(千葉) 2017.7.20-23.  
大坪公士郎, 山下要, 三宅邦夫, 矢野聖二. 胆汁を用いた膵胆道疾患における癌抑制型miRNAのメチル化異常に関する検討. 第48回日本膵臓学会大会(京都) 2017.07.14-15.  
Meixian Huang, Takeshi Inukai, Kunio Miyake, Keiko Kagami, Masako Abe, Tamao Shinohara, Atsushi Watanabe, Shinpei Somazu, Hiroko Oshiro, Kumiko Goi, Kanji Sugita. Association of BIM gene silencing by hypermethylation with chemoresistance in BCP-ALL. 第78回日本血液学会(横浜), 2016.10.14  
古瀬 民生, 幸田 尚, 三宅 邦夫, 串田知子, 山田 郁子, 柏村 実生, 三浦 郁生, 金田 秀貴, 小林 喜美男, 石野 史敏, 若菜 茂晴. One carbon metabolism 関連遺伝子欠損マウスを親に持つ野生型マウスの行動表現型解析 第39回日本神経科学大会(横浜) 2016.7.20-23.  
渡邊 敦, 犬飼 岳史, 篠原 珠緒, 杉津 晋平, 大城 浩子, 廣瀬 衣子, 合井 久美子, 三宅 邦夫, 久保田 健夫, 杉田 完爾. 次世代シーケンサーによるALL細胞のL-Asp感受性におけるASNS遺伝

子のメチル化解析. 第119回日本小児科学会学術集会(札幌) 2016.5.13-15  
三宅邦夫、久保田健夫. ワークショップ 22 健康度を最適化する成育環境と個体の干渉原理 脳発達過程におけるメチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2 による遺伝子発現調節機構 第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会合同大会(神戸) 2015.12.01-04.  
古瀬民生、幸田尚、三宅邦夫、平澤孝枝、串田知子、山田郁子、柏村実生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、久保田健夫、若菜茂晴. (P-37) 新規母体低栄養モデルマウス作出の試み. DOHaD 研究会第4回学術集会(東京) 2015.8.2(8.1-8.2).

小林祥子、三浦りゅう、川口章夫、宮下ちひろ、三宅邦夫、松村徹、山本潤、石塚真由美、荒木敦子、久保田健夫、岸玲子. (P-27) 胎児期ビスフェノール A 曝露影響に関する臍帯血 DNA 網羅的メチル化解析-北海道スタディ. DOHaD 研究会第4回学術集会(東京) 2015.8.2(8.1-8.2).

Nguyen NA, Miyake K, Kubota T. The antidepressant drug amitriptyline up-regulates the neuroprotective Atf3 and Cox2 genes by changing histone modifications in mouse primary cultured neuronal cells. 第38回日本神経科学会(神戸) 2015.7.28-31.

三宅邦夫、武居美沙、太平博暁、山田有理子、砂村栄一郎、與谷卓也、久保田健夫. アニオン交換 HPLC カラムを用いた新規 DNA メチル化解析法の検討 第9回日本エピジェネティクス研究会(東京) 2015.5.25-26.

針谷夏代、井上拓哉、三宅邦夫、久保田健夫、望月和樹. DPP-4 阻害薬アナグリプチンによる胆汁酸の生成・分泌促進作用とインスリン抵抗性の改善. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会(下関) 2015.5.23(21-24).

Hariya N, Miyake K, Kubota T, Goda T, Mochizuki K. Putative PPAR target genes express highly in skeletal muscle of insulin-resistant MetS model SHR/NDmc-cp rats. 12th Asian Congress of Nutrition. 第69回日本栄養・食糧学会大会(横浜) 2015.5.14-18.

〔図書〕(計3件)

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenome-wide association studies in neurodevelopmental disorders. In "Genome-wide association studies: from polymorphism to personalized medicine" edited by Krishnarao Appasani, Cambridge University Press. 2016  
久保田健夫、三宅邦夫、針谷夏代、望月

和樹. 第1章 先制医療を支えるライフサイエンス. 発症前に診断し、介入する先制医療～実現のための医学研究～「4.先制医療の生物学的基盤としてのエピジェネティクス」. 実験医学(増刊) 33:1043-1048, 2015.

三宅邦夫、久保田健夫. 別冊「医学のあゆみ」クリニカルエピゲノミクス Rett 症候群などの精神発達疾患 医学のあゆみ Vol255 No6 667-672 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: インプリンティング疾患の診断に有効な染色体機能異常の判定方法

発明者: 久保田健夫、三宅邦夫

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 再公表特許(A1)

番号: 特願 2016-542613(P2016-542613)

出願年月日: 平成27年8月14日

国内外の別: 国外

名称: 幹細胞の品質管理方法

発明者: 與谷卓也、太平博暁、根本有理子、砂村栄一郎、久保田健夫、三宅邦夫、武居美沙

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 再公表特許(A1)

番号: 特願 2016-554145(P2016-554145)

出願年月日: 平成27年10月16日

国内外の別: 国外

〔その他〕

<https://www.med.yamanashi.ac.jp/social/heal0sci/>

(研究代表者所属機関の社会医学講座ホームページ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三宅 邦夫(MIYAKE, Kunio)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号: 60550712