

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10318

研究課題名(和文) アルツハイマー病危険因子と関連するDNAメチル化部位の探索とその神経変性への影響

研究課題名(英文) Significance for DNA methylation in Alzheimer's Disease

研究代表者

小林 伸行 (Kobayashi, Nobuyuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20385321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は認知症性疾患で血液中COASY プロモーター領域のDNAメチル化量を測定し、健常高齢者と比較して、軽度認知障害(MCI)及びアルツハイマー病(AD)で有意に高いことを明らかにした。さらに、脳血管障害(CVD)を合併しないAD群の血液COASY DNAメチル化量は、CVD合併AD群よりも、有意に高かった。

ADモデルであるApp knock-inマウスにおいても、血液のみならず、脳でもCOASY DNAメチル化量の加齢による上昇を認めた。

以上のことから、血液COASY DNAメチル化量はAD脳における変化を反映し、顕在発症前の初期のバイオマーカーとなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症の増加は超高齢社会を迎えた本邦における深刻な社会問題であり、その顕在発症を予防することは健康長寿の実現のための重要な課題のひとつとなる。また、認知症性疾患はアルツハイマー病(AD)のほか、脳血管性認知症(VaD)、レビー小体型認知症(DLB)や前頭側頭型認知症(FTD)等の種類があり、これらの認知症は診断によって治療も異なるため、早期における鑑別診断が重要となる。しかし、認知症疾患を早期かつ簡便に診断する血液バイオマーカーは今のところない。本研究結果は、ADの診断バイオマーカーとしての有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we showed that blood COASY DNA methylation levels were increased in individuals with AD and aMCI. When we compared blood COASY DNA methylation levels in the AD without cerebrovascular disease (CVD) and AD with CVD subgroups, they were significantly higher in AD without CVD than AD with CVD.

Furthermore, experiments on the App knock-in mice revealed increased COASY DNA methylation levels not only in the blood but also in the brain.

Our results suggested that increased COASY DNA methylation levels could be a useful biomarker that reflects neurotoxicity in the early stages of AD.

研究分野：精神医学、ウイルス学に基づき、ウイルスや環境因子による精神疾患、認知症発症に関する研究を行っている。

キーワード：アルツハイマー病 DNAメチル化 エピジェネティクス アミロイド ADモデルマウス 認知症 軽度認知障害

1. 研究開始当初の背景

近年、超高齢社会における、認知症の増加は社会問題となっている。認知症は加齢が最大の危険因子となり、軽度認知障害 (MCI)の前段階を経て、認知機能障害が顕在化して発症する。認知症には、アルツハイマー病 (AD)、脳血管性認知症 (VaD)、レビー小体型認知症 (DLB)や前頭側頭型認知症 (FTD)等の種類があり、AD、DLB と FTD は神経細胞の脱落を特徴とする神経変性疾患である。一方、VaD は脳血管障害 (CVD)による認知機能障害と考えられている。これらの認知症は診断によって治療も異なるため、早期における鑑別診断が重要となる。

AD は神経病理学的な変化として、まず、アミロイド β (A β)の沈着が生じ、その後、リン酸化されたタウの沈着が起きる。これらの変化は認知機能障害が生じる前より起きている。そのため、早期診断にはアミロイド陽電子放出断層撮影 (PET)やタウ PET が有効であるが、これらは高額であり、全例で施行するのは難しい。また、髄液中 A β_{42} の低下やタウの上昇はよいバイオマーカーになると考えられているが、髄液の採取は侵襲性が高い。以上のことから、簡便な血液バイオマーカーが求められているが、未だ臨床応用可能なものはない。

DNA のメチル化は環境因子による影響を受け、遺伝子配列の変化を伴わずに遺伝子発現を変化させる。DNA メチル化は加齢で変化することが知られ、血液 DNA メチル化は認知症の診断バイオマーカーとなる可能性を持っている。我々もまた、COASY 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量の変化が健忘型 MCI (aMCI)、AD の診断バイオマーカーとなり得ると予備的に報告した ①。COASY 遺伝子は補酵素 A (CoA)合成酵素をコードしており、パントテン酸から CoA の生合成に関与する。CoA 合成酵素は神経変性に重要な役割を担うことが示唆された。

2. 研究の目的

(1) AD 以外の認知症性疾患における、CoA 合成酵素の役割は明らかではなく、また、脳における COASY DNA メチル化の変化も明らかではない。そこで本研究では、以前我々が行った研究よりもサンプル数を増やし、AD 及びそのほかの認知症性疾患について、血液中 COASY DNA メチル化の変化を調べることを目的とした。

(2) A β が過剰発現することなく、生理的条件下で沈着する AD モデルマウスである *App*-knock-in (KI)マウスを利用して、加齢による脳及び血液の COASY DNA メチル化変化を検討した。

上記の検討によって、本研究では、COASY DNA メチル化が AD の初期病理変化である A β の沈着と関連して変化し、AD の診断バイオマーカーとして有用性を検討することを目的とした。

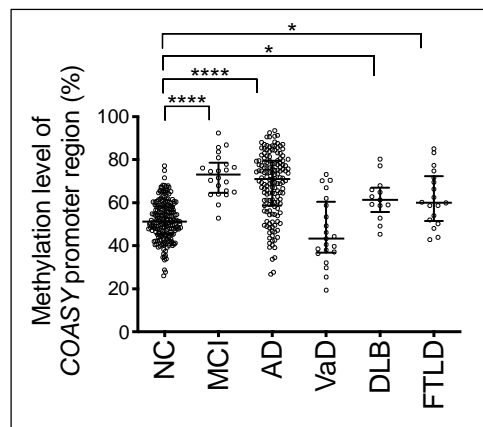


図 1. COASY DNA メチル化量の比

3. 研究の方法

(1) 倫理的配慮

本研究は、東京慈恵会医科大学倫理委員会及び共同研究を行っている慶應義塾大学倫理委員会の承認を得て行った。さらに、被験者に対して研究内容を説明し、署名による同意を得た。認知機能の低下により、同意能力が疑われる被験者に対しては、介護者からも同意を得た。

動物実験の実施に際し、東京慈恵会医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。さらに、関連法案、指針を遵守し、動物の愛護に十分配慮し、実験を行った。

(2) 対象

東京慈恵会医科大学附属病院 (東京都)、同柏病院 (千葉県)へ通院中の外来患者及び、あいらの森ホスピタル (鹿児島県)の入院患者で、aMCI (n=21)、AD (n=151)、VaD

(n=21)、DLB (n=13)、前頭側頭変性症 (FTLD) (n=18)と診断された者を対象とした。FTLD には、行動障害型戦闘側頭型認知症 (bvFTD)、意味性認知症 (svPPA)及び進行性非流暢性失語 (nfvPPA)を含めた。高齢健常者は慶應義塾大学精神・神経科学教室が荒川区で実施している認知症コホート研究のためにリクルートした 1101 名で、認知症と診断されなかった者の中から、

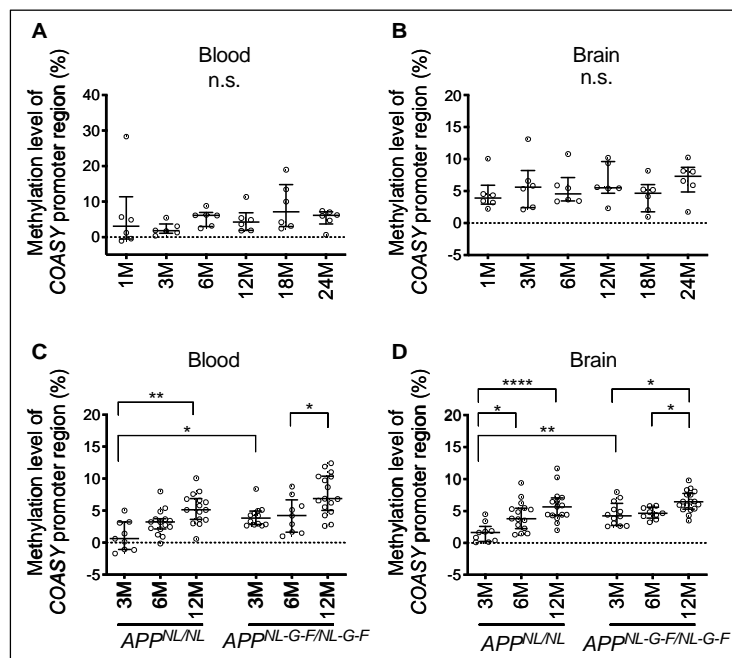


図 2. Wt 及び *App* Ki マウスの COASY DNA メチル化量

ランダムに 200 名を選出し、本研究に用いた。

(3) 動物

1 月齢、3 月齢、6 月齢、12 月齢、18 月齢、24 月齢の C57BL/6NCrSlc 野生型 (Wt) マウスの雌雄 (各 $n=3$) を三協ラボサービスから購入した。さらに、AD モデルマウスとして、マウスの A β 配列をヒト化し、家族性 AD で報告された遺伝子変異を挿入した *App*-KI モデルを利用した。Swedish 変異を挿入したマウス (*App*^{NL/NL}), Swedish 変異、Iberian 変異及び Arctic 変異を挿入したマウス (*App*^{NL-G-F/NL-G-F}) の雌雄ペアを理化学研究所バイオリソース研究センターから提供を受けた。3 月齢、6 月齢、12 月齢まで飼育して、実験に用いた。安楽死させる際に血液と全脳を採取した。全血から QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen) を用いて、DNA を精製し、全脳から、AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて、DNA と RNA を精製した。

(4) DNA メチル化解析

EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit (Qiagen) を用いて、精製 DNA をバイサルファイト処理した。Applied Biosystems QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) 法でヒト及びマウスの *COASY* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量を定量した。

4. 研究成果

(1) 認知症性疾患患者における *COASY* DNA メチル化量

AD 群は、CVD を合併しない 115 名と CVD を合併する 36 名に分類された。また、FTLD 群は、bvFTD 9 名、svPPA 7 名、nfvPPA 2 名であった。年齢は、NC と比較して、AD 群、VaD 群で有意に高く、FTLD 群で有意に低かった ($P<0.0001$, $P<0.0001$, $P=0.002$, Kruskal-Wallis 検定, Dunn-Bonferroni 法)。男女比は、NC と比較した結果、AD 群でのみ有意な差を認めた ($P=0.018$, χ^2 乗検定)。ミニメンタルステート検査 (MMSE) 総得点は、NC と比較した結果、AD 群、VaD 群、DLB 群及び FTLD 群で有意に低かった ($P<0.0001$, $P<0.0001$, $P<0.0001$, $P<0.0001$, Kruskal-Wallis 検定, Dunn-Bonferroni 法)。

COASY DNA メチル化量は、NC 群と比較して、aMCI、AD、DLB、及び FTLD 群で高く、VaD 群では有意な差を認めなかった (図 1、aMCI, $P<0.0001$, AD, $P<0.000$, VaD, $P=1.00$, DLB, $P=0.038$, FTLD, $P=0.015$, Kruskal-Wallis 検定, Dunn-Bonferroni 法)。

年齢及び症状の進行による、*COASY* DNA メチル化量への影響を、年齢、MMSE 総得点との相関関係を Spearman の順位相関係数によって解析することで検討した。その結果、年齢による *COASY* DNA メチル化量への明らかな影響を認めなかった。また、AD 群において、MMSE 総得点と *COASY* メチル化量で有意な正の相関を認めた ($P<0.0001$)。

性差による *COASY* DNA メチル化量への影響を、男女を Mann-Whitney U 検定によって比較することで検討した。その結果、NC と AD 群において、女性で *COASY* DNA メチル化量が有意に高かった (NC: 女性, 53.1 ± 0.9 [53.6], 男性, 49.7 ± 0.9 [48.9], AD: 女性, 71.3 ± 1.2 [74.0], 男性, 60.4 ± 2.6 [60.6], 平均 \pm 標準誤差 [median])。

そのため、男女毎に、各群で DNA メチル化量を比較したところ、aMCI と AD 群の *COASY* DNA メチル化量は、NC 群と比較して、男女ともに有意に高かったが、DLB、FTLD で認めた差は消失した (女性: aMCI, $P<0.0001$, AD, $P<0.0001$, VaD, $P=0.93$, DLB, $P=0.085$, FTLD, $P=0.065$; 男性: aMCI, $P<0.001$, AD, $P=0.001$, VaD, $P=1.00$, DLB, $P=1.00$, FTLD, $P=0.19$)。

さらに、AD 群において、CVD 群を合併する群としない群で比較すると、*COASY* DNA メチル化量は CVD を合併しない群で有意に高かった ($P<0.0001$, Mann-Whitney U 検定)。

以上のことから、血液中 *COASY* DNA メチル化量は AD で有意に上昇し、診断バイオマーカーとして有用となることが示唆された。しかし、血液中 *COASY* DNA メチル化量は MMSE スコアとの正の相関を示すことから、認知機能障害の重症度とは関連がなく、AD の初期に認める何らかの神経病理学的な変化を反映することが考えられた。

(2) AD モデルマウス (*App*-KI マウス) における血液、脳 *COASY* DNA メチル化量

Wt マウスは 24 月齢までの加齢で、血液及び脳ともに *COASY* DNA メチル化量は有意な変化を示さなかった (図 2A,B)。一方、*App*-KI マウスでは、Swedish 変異のみの単独変異 (*App*^{NL/NL}) 及び Swedish、Iberian、Arctic 変異の 3 重変異 (*App*^{NL-G-F/NL-G-F}) 両者ともに、加齢によって、血液のみでなく、脳においても、*COASY* DNA メチル化量の有意な上昇を示した (図 2C,D)。さらに、3 月齢で、*App*^{NL-G-F/NL-G-F} の血液及び脳の *COASY* DNA メチル化量は *App*^{NL/NL} よりも有意に高かった (図 2C,D, 血液, $P=0.015$, 脳, $P=0.001$, Mann-Whitney U 検定)。6 月齢、12 月齢では、*App*^{NL/NL} と *App*^{NL-G-F/NL-G-F} の間で血液及び脳の *COASY* DNA メチル化量は有意な差を認めなかった。A β の脳への沈着を認めない *App*^{NL/NL} においても、*COASY* DNA メチル化量は有意な変化を認め、AD 顕在発症前の初期の変化を反映することが示唆された。

<引用文献>

① Kobayashi N, Shinagawa S, Nagata T, Shimada K, Shibata N, Ohnuma T, Kasanuki K, Arai H, Yamada H, Nakayama K, Kondo K. Usefulness of DNA Methylation Levels in *COASY* and *SPINT1* Gene Promoter Regions as Biomarkers in Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PLoS One* 2016;11(12): e0168816. doi:10.1371/journal.pone.0168816

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Kazuhito, Kobayashi Nobuyuki, Ogasawara Yoji, Shimada Takaki, Yahagi Yuichi, Sugiyama Katsuki, Takahara Shinobu, Saito Takeshi, Minami Jiro, Yokoyama Hiroki, Kamiyama Yutaro, Katsube Atsushi, Kondo Kazuhiro, Yanagisawa Hiroyuki, Aiba Keisuke, Yano Shingo	4. 巻 108
2. 論文標題 Clinical significance of cancer-related fatigue in multiple myeloma patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 580 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2516-1	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 -

1. 著者名 Kobayashi Nobuyuki, Nishiyama Toshiko, Yamauchi Takashi, Shimada Kazuya, Suka Machi, Kondo Kazuhiro, Yanagisawa Hiroyuki	4. 巻 未
2. 論文標題 Attenuation of human herpesvirus 6B reactivation by aging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25434	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 -

1. 著者名 Tamai Masato, Kobayashi Nobuyuki, Shimada Kazuya, Oka Naomi, Takahashi Mayumi, Tanuma Akiko, Tanemoto Tomohiro, Namba Hiroyuki, Saito Yoshihiro, Wada Yasuyuki, Okamoto Aikou, Ida Hiroyuki, Kondo Kazuhiro	4. 巻 486
2. 論文標題 Increased interleukin-1 and basic fibroblast growth factor levels in the cerebrospinal fluid during human herpesvirus-6B (HHV-6B) encephalitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 706-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.03.102	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林伸行、岡直美、高橋麻弓、嶋田和也、近藤一博
2. 発表標題 運動負荷及びうつ病患者における疲労の分子機構eIF2 リン酸化関連シグナルの検討
3. 学会等名 第14回日本疲労学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林伸行
2. 発表標題 シンポジウム精神神経疾患における加齢性変化の生理と病理 アルツハイマー病におけるDNAメチル化変化の意義
3. 学会等名 第114回日本精神神経学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林伸行、品川俊一郎、永田智行、繁田雅弘、近藤一博
2. 発表標題 DNAメチル化量を指標としたアルツハイマー病患者の行動・心理症状出現機序の検討
3. 学会等名 第37回日本認知症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuyuki Kobayashi, Toshiko Nishiyama, Kazuya Shimada, Machi Suka, Hiroyuki Yanagisawa, Kazuhiro Kondo
2. 発表標題 Association between overtime of ordinary workers and human herpesvirus (HHV-) 6 and HHV-7 in saliva
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会 (The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林伸行、岡直美、高橋麻弓、玉井将人、嶋田和也、近藤一博
2. 発表標題 分子機構から明らかにする疲労とストレスとの相違に関する検討
3. 学会等名 第13回日本疲労学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林伸行、岡直美、高橋麻弓、嶋田和也、近藤一博
2. 発表標題 疲労を引き起こす分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第134回成医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林伸行、品川俊一郎、永田智行、嶋田和也、柴田展人、大沼徹、笠貫浩史、新井平伊、繁田雅弘、近藤一博
2. 発表標題 さまざまな変性認知症疾患におけるDNAメチル化変化とその臨床的意義の検討
3. 学会等名 第36回日本認知症学会
4. 発表年 2017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
連携研究者	品川 俊一郎 (Shinagawa Shunichiro) (90459628)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授 (32651)	