

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32414

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07240

研究課題名（和文）有機ヒ素化合物による脳の神経変性機序の解析 DNAメチル化に着目して

研究課題名（英文）Analyses of the mechanism of neurodegeneration in the brain by organic arsenic compounds-focusing on DNA methylation

研究代表者

増田 知之（MASUDA, Tomoyuki）

目白大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70372828

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自然界に存在しない人工有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸（DPAA）による健康被害が茨城県神栖市で生じた。本研究は、非ヒト霊長類の脳を用いることで、DPAAのもたらす脳の神経変性機序を分子レベルで明らかにすることを目指した。その結果、ヒトゲノム用DNAメチル化アレイのプロープで、カニクイザル（*Macaca fascicularis*）ゲノムに適用可能なプロープを確定するとともに、小脳および側頭葉外側部におけるDNAメチル化変動が、他の脳領域と比較してそれぞれ大きく異なるプロファイルを有することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確定したヒトゲノム用DNAメチル化アレイのカニクイザル（*Macaca fascicularis*）ゲノムへの適用可能なプロープの情報は、非ヒト霊長類を実験動物として用いる様々な解析に役立つため、今後広く使用されることが期待できる。また、非ヒト霊長類の脳を十分な例数確保し、長期に亘ってDNAメチル化の推移を調べた研究は世界で類をみないものであり、人工有機ヒ素化合物DPAAのもたらす遺伝子発現のオン・オフについて、多くの示唆を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Artificial organic arsenic compounds diphenylarsinic acid (DPAA) have caused health problems in Kamisu City, Ibaraki Prefecture. By using non-human primate brains, this study aimed to elucidate the mechanism of DPAA-induced neurodegeneration in the brain at the molecular level. As a result, we established the applicability of DNA methylation array probes for the human genome to the crab-eating macaque (*Macaca fascicularis*) genome and revealed that alterations of DNA methylation in the cerebellum and lateral temporal lobes have different profiles compared to those in other brain regions, respectively.

研究分野：神経科学

キーワード：神経変性疾患 DNAメチル化 有機ヒ素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工の有機ヒ素化合物であるジフェニルアルシン酸(DPAA)による中毒が、茨城県東南部(神栖市)で発生した。DPAAで汚染した井戸水の飲用者に、視覚異常、記憶力障害、睡眠障害といった側頭葉もしくは後頭葉に起因する神経症状がみられた。そこで、研究代表者らは非ヒト霊長類であるカニクイザル(*Macaca fascicularis*)にDPAA投与実験を行い、その体内残留性を調べた。すると、霊長類の中樞神経系には、げっ歯類よりもはるかに長期に亘りDPAAが蓄積することが判明した(Masuda et al., 2017, 2018)。この結果から鑑みると、げっ歯類を用いた実験のみではヒトの脳へのDPAAの影響を正確に予測することが困難であると考えられた。そこで研究代表者らはその後も主として霊長類を用い、ヒトの中樞神経系に対するDPAAの影響の検討を進めた。

曝露者の脳をMRIと脳血流シンチグラフィ(SPECT)で解析したところ、MRI解析では脳の萎縮がみられ、SPECT解析でも後頭葉を中心に血流の低下がみられた(Ishi et al., 2019)。この傾向はDPAAを投与したカニクイザルの脳でも同様であった(未発表データ、表1参照)。すなわち、DPAAへの曝露によって、霊長類の脳では加齢性変化に類似した神経変性が促進していることが明らかとなった。DPAAも含めた有機ヒ素化合物は、無機ヒ素化合物と比較して一般的に毒性が低いとされており、DPAAがどのような分子機序で脳の変性を引き起こすのか不明である。

近年、エピジェネティクス制御が精神神経疾患に関わる可能性が判明し、DNAメチル化は神経内科学・精神神経科学の研究領域で関心が高まっている。エピジェネティクス制御とは、DNAの塩基配列を変化させずに、遺伝子発現を「外から」制御するシステムを指し、脳においてはDNAのメチル化状態が「環境」に応じて変化し、その活動に大きな影響を及ぼすことが知られている。すなわち、脳はDNAメチル化の主要ターゲットであり、DNAのメチル化は精神神経疾患の病態と密接な関連がある。DPAAに曝露されたカニクイザルの脳でのDNAメチル化情報は、遺伝子発現のオン・オフに関するものであるため、治療標的となる分子候補を提供し得る貴重なソースである。現在、メチル化を含めたエピジェネティクス制御の分子技術が確立しつつあり、エピジェネティクス薬は世界で続々と承認されている。本研究から得られるデータは、DPAAによる神経症状を治療・緩和する創薬につながり得るため、臨床面での貢献も期待できる。

表1. DPAA曝露者、認知症患者、DPAA曝露サルにおける脳血流の比較

脳部位	DPAA曝露者の血流	認知症患者の血流	DPAAに曝露させたサルの血流	
			直後(5日後)	6ヶ月後(170日後)
後頭葉	直後～3年まで顕著な低下	DLBで顕著な低下 ADでは軽微	軽微な低下	顕著な低下(増悪)
小脳	直後～3年まで顕著な低下	ADでは保たれる	顕著な低下	やや回復
側頭葉	直後～3年まで顕著な低下	ADで顕著な低下 FTDで顕著な低下	顕著な低下	やや回復

AD: アルツハイマー型認知症, DLB: レビー小体型認知症, FTD: 前頭側頭型認知症

2. 研究の目的

本研究は、自然界に存在しない有機ヒ素化合物 DPAA による脳の神経変性機序を分子レベルで明らかにすることを目的とした。そのために、DPAA 投与後のカニクイザルの脳を経時的に(投与5、29、170、339日後)サンプリングし、DPAAによる脳内DNAメチル化の変動および推移を調べる。

3. 研究の方法

(1) カニクイザルのゲノムDNAを用いた正確なメチル化解析指標の確立

イルミナ社のDNAメチル化アレイ(MethylationEPIC BeadChip)には、2種類のアレイプローブが含まれている。タイプIプローブは、1つのCpGサイトのメチル化および非メチル化状況を調べるために設計された2つのプローブで構成され、タイプIIプローブは、1つのCpGサイトのメチル化レベルを調べるためのプローブ1つで構成されている。タイプIとタイプIIのプローブを、カニクイザルのゲノムデータ(*Macaca fascicularis*_5.0、以降 macFas5 と略)にマッピングし、以下の基準でプローブを選択した。I. 挿入および欠失がない、II. 最適なヒットは1つのみであり、それ以外のヒットがない、III. 標的サイトから5bp以内のミスマッチがない、IV. マッピングされたゲノムの中に曖昧な塩基がない。以上のプロセスで、このアレイの全プローブから、カニクイザルゲノムにハイブリダイズできるプローブを選択した。

続いて、上記のデータを検証するために、DPAA を投与していないカニクイザル（雄 2 頭、雌 3 頭、3~4 歳）の後頭葉から抽出したゲノム DNA を用い、このアレイによる DNA メチル化解析を行い、選択したプローブの性能を検証した。

(2) DPAA に曝露させたカニクイザルの脳での DNA メチル化パターン変動サイトの同定

使用したカニクイザル脳の内訳は、DPAA を投与していない対照群（5 例）、DPAA（1 mg/kg/day）を 28 日間投与後、5 日経過してから脳を抽出した群（5 例）、投与後 29 日経過してから脳を抽出した群（5 例）、投与後 170 日経過してから脳を抽出した群（5 例）、投与後 339 日経過してから脳を抽出した群（5 例）である。

研究代表者らは、DPAA 曝露者、アルツハイマー型認知症（AD）患者、DPAA に曝露させたカニクイザルの三者に共通して血流低下がみられる後頭葉および側頭葉と、DPAA 曝露者ならびに DPAA に曝露させたカニクイザルの両者に共通して血流低下がみられる小脳に着目した（表 1）。

各脳から後頭葉、側頭葉外側部、側頭葉内側部、小脳を切り出し、ゲノム DNA を抽出した。続いて、イルミナ社の DNA メチル化アレイを用いて、ゲノム DNA 内の DNA メチル化サイトを網羅的に検出した。さらに、神栖住民の臨床データとの照合作業に向けて、得られた全ての DNA メチル化サイト変動データ（投与後 5~339 日経過群のデータ全て）の大規模な比較検討作業を行った。

4. 研究成果

(1) カニクイザルのゲノム DNA を用いた正確なメチル化解析指標の確立

MethylationEPIC BeadChip 上の 865,918 個のプローブの中から、カニクイザルのゲノム（macFas5）とハイブリダイズできるプローブを選択した。その結果、タイプ I（37,214 個）とタイプ II（146,295 個）の両方のプローブについて、カニクイザルのゲノム全体にマッピングされる形で、合計 183,509 個の使用可能なプローブが得られた（図 1；プローブ全体の 21.2% を占めた）。マーモセットとチンパンジーで同様の解析を行うと、それぞれ約 9% と 44% の使用可能なプローブが得られており（未発表データ）、進化との関係性を考えると、本研究で得られたプローブ率は妥当なものであると考えられる。

次に、選び出したプローブの性能を検証するために、上記アレイを用いて、カニクイザル脳の DNA メチル化パターンを調べた。続いて、得られた DNA メチル化データとカニクイザル脳でのメチル化サイトを報告した先行研究データを比較した結果、両者は高い整合性を示した（図 2A および B、帯状回では $R = 0.743$ 、下側頭回では $R = 0.738$ ）。同様に、タイプ I とタイプ II のプローブも、それぞれ平均 $R = 0.788$ 、 0.691 と高い整合性を示した。以上の結果を受けて、研究代表者らは本アレイを用いた解析全てを 183,509 個のプローブにしぼって行うことにした。

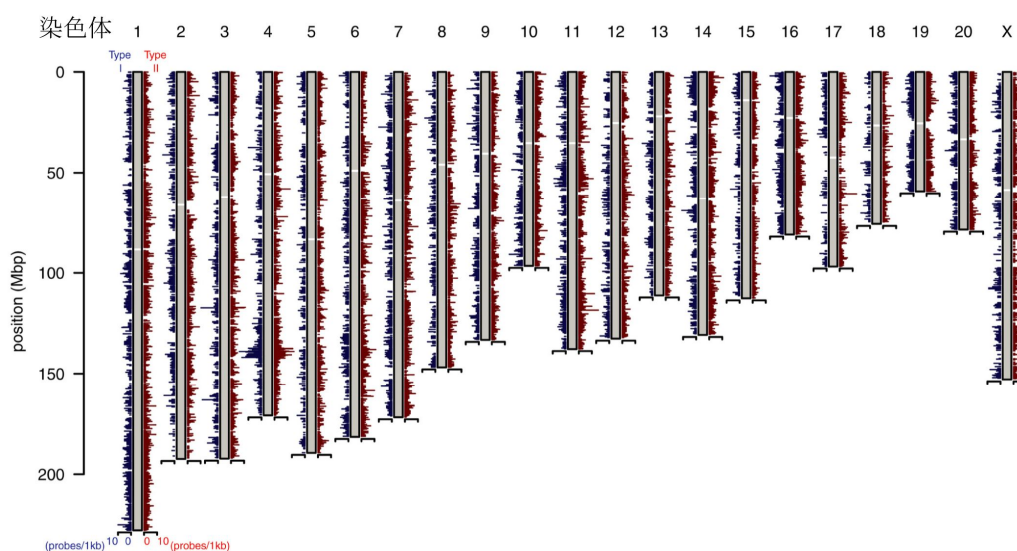


図 1 カニクイザルゲノムに適用可能な MethylationEPIC アレイプローブの染色体上での分布 (Nakachi et al., 2020 より一部改変)

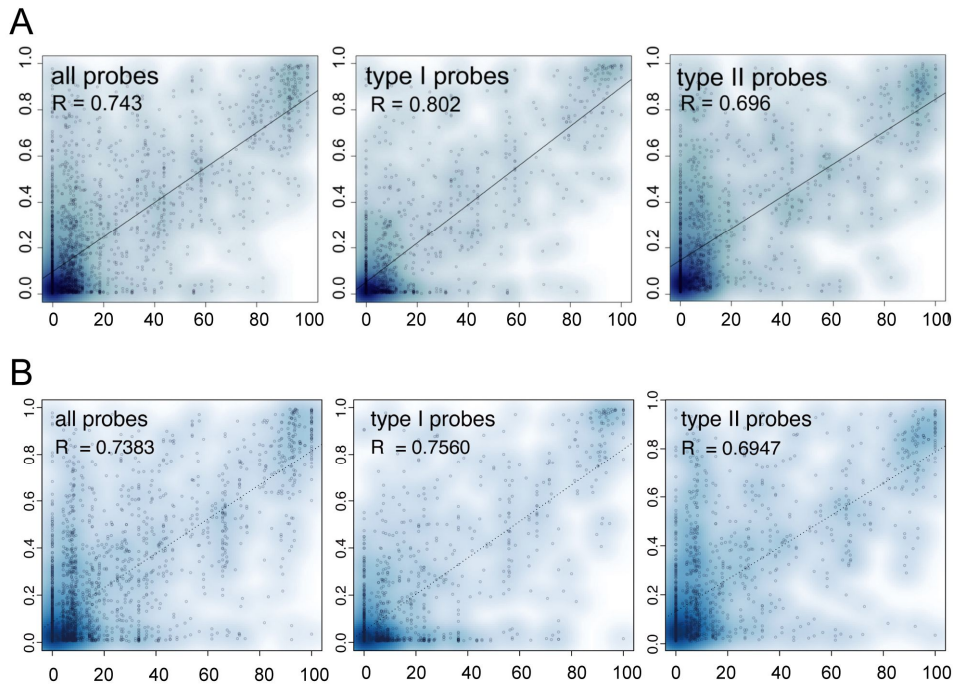


図2 カニクイザルゲノムに適用可能な MethylationEPIC アレイプローブについて
 本研究で得られたデータと先行研究のデータとの比較
 A. 帯状回におけるデータとの比較 (Nakachi et al., 2020 より一部改変)
 B. 下側頭回におけるデータとの比較 (未発表データ)

(2) DPAA に曝露されたカニクイザルの脳での DNA メチル化変動サイトの同定と解析

全検体で DNA メチル化情報を検出できた約 39 万カ所のメチル化情報を用いて、データの偏りや外れ値などを確認するために主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA) を行った。その結果、小脳サンプルのみ、他の脳領域とは明らかに異なる分布を示すことが明らかとなった (図 3A、投稿準備中)。すなわち、対照群および投与群のいずれにおいても小脳の DNA メチル化状態は他の 3 領域とは明らかに異なることが示唆された。

次に、小脳を除いた 3 領域 (後頭葉、側頭葉内側部、側頭葉外側部) における PCA を行った。その結果、側頭葉外側部では、対照群と投与群の間で明らかに異なる DNA メチル化プロファイルを示すことが示された (図 3B、投稿準備中)。一方で、側頭葉内側部および後頭葉においては、対照群と投与群に大きな違いは認められなかった。

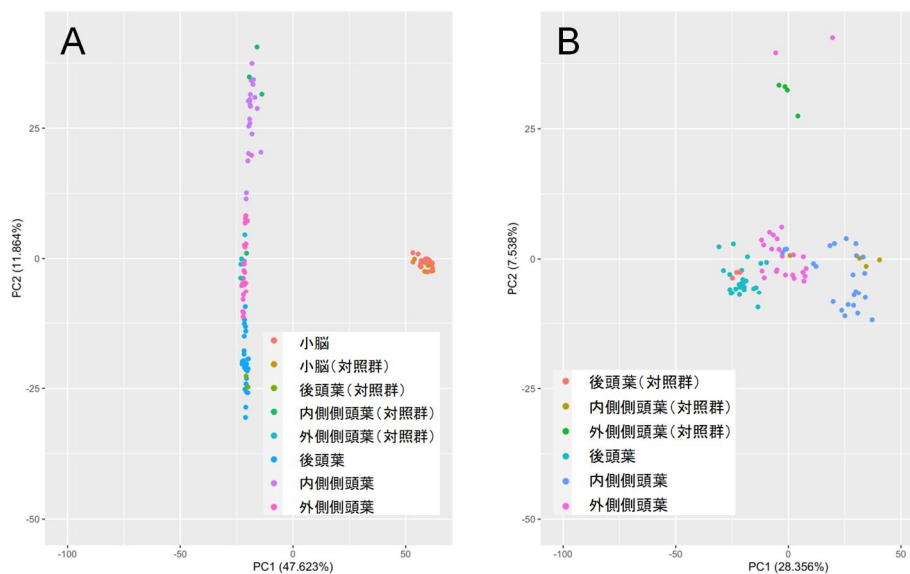


図3 DNA メチル化データの主成分分析 (PCA)
 A. DNA メチル化の全データを用いた PCA
 B. 小脳を除いたデータを用いた PCA

続いて、全 DNA メチル化データを元にして、各脳領域における DNA メチル化サイトを検討した。各脳領域における低メチル化サイトと高メチル化サイトの内訳を図 4 と図 5 で示す。

高メチル化サイトに関しては、側頭葉外側部で CpG アイランドにおけるメチル化の割合が非常に低いことが明らかとなった（図 4、投稿準備中）。低メチル化サイトに関しては、側頭葉外側部でのメチル化サイトの内訳が他と比較して際立って異なっていることが判明した（図 5、投稿準備中）。

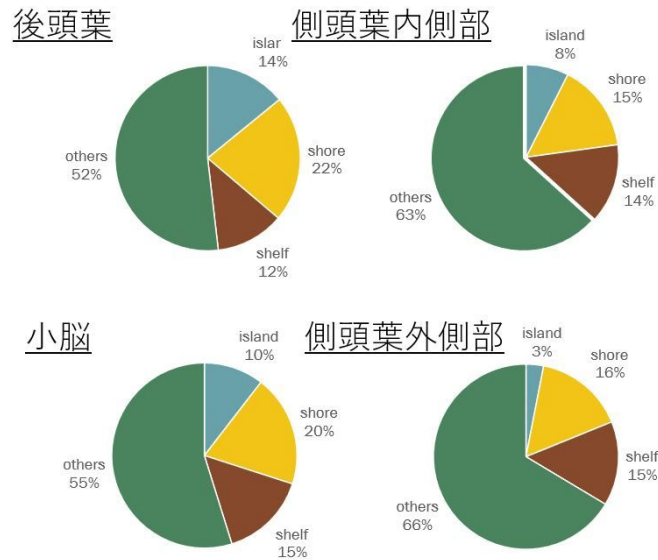


図 4 各脳領域における DNA 高メチル化サイトの内訳

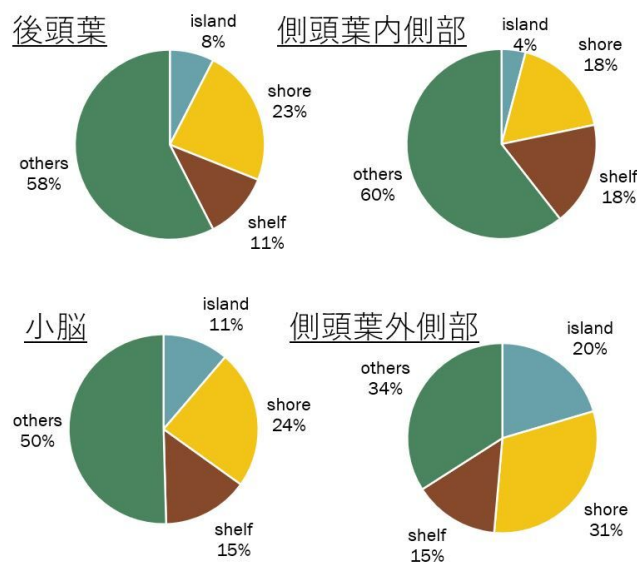


図 5 各脳領域における DNA 低メチル化サイトの内訳

個々の脳領域に着目すると、側頭葉では外側、内側を問わず、DPAA への曝露によって、全期間を通じてゲノム DNA のメチル化状態に大きな変化が絶えず生じていることが明らかとなった。さらに、側頭葉内外側部で DNA のメチル化に上昇のみられた上位 10 遺伝子と低下のみられた上位 10 遺伝子に関して、全ゲノム解析データベース (GWAS) による検索を行った結果、DPAA 投与後 29 日経過群における遺伝子 28 個中 19 個 (67.9%)、170 日経過群における遺伝子 32 個中 19 個 (59.4%) が、4 つの神経変性疾患 (AD、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症) いずれかに強い関連性をもつ遺伝子であることが判明した。

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 1件）

1. 著者名 Yutaka Nakachi, Kazuhiro Ishii, Miki Bundo, Tomoyuki Masuda, Kazuya Iwamoto	4. 巻 40
2. 論文標題 Use of the Illumina EPIC methylation array for epigenomic research in the crab-eating macaque (<i>Macaca fascicularis</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 423-426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr.12145	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増田 知之、伊関 美緒子、伊藤 順子、小谷 素子、仲地 ゆたか、文東 美紀、岩本 和也、石井 一弘
2. 発表標題 株化細胞へのDPAA投与によるDNAメチル化パターン変動部位の同定
3. 学会等名 第127回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田 知之、大桃 秀樹、文東 美紀、仲地 ゆたか、岩本 和也
2. 発表標題 霊長類の脳が有機ヒ素によって変性する際の分子機序の解明
3. 学会等名 第64回日本組織細胞化学会学術集会 ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増田 知之、石井 一弘
2. 発表標題 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸への曝露による神経変性の促進
3. 学会等名 第64回日本組織細胞化学会学術集会
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	文東 美紀 (BUNDO Miki) (00597221)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	

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
---------	---------