

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07553

研究課題名（和文）アルツハイマー病におけるエピゲノム異常の原因とその神経変性への影響の解明

研究課題名（英文）Causes of epigenomic abnormalities in Alzheimer's disease and their implications for neurodegeneration

研究代表者

小林 伸行（Kobayashi, Nobuyuki）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20385321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）ではDNAメチル化量の変化が異常タンパクの蓄積や神経変性に影響すると考えられた。申請者は、AD患者で血液COASY DNAメチル化量が増加していることを発見した。本研究では、AD患者と非認知症高齢者との間でDNAメチル化量の差がある部位を132箇所同定した。さらに、単純ヘルペスウイルス1型感染がCOASYのDNAメチル化に影響を与えることを明らかにした。特に、カプシドタンパクであるVP26はDNAメチル化酵素DNMT3Aと結合することで、宿主のDNAメチル化量の変化に影響することが示唆された。これらの結果はADの新たな診断法や治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COASYはCoA合成酵素をコードし、神経変性疾患とも関連があるにも関わらず、基礎研究は少なく、詳細な機能は未解明である。また、COASYはがんとの関連も知られるが、がん細胞でCOASYをノックダウンしても細胞の増殖性に影響はなく、CoA濃度を保つ未知のメカニズムがあると報告される。そのため、COASYが関わる代謝異常を明らかにすることは学術的にも有意義で、他分野への波及効果も大きい。また、本研究で、COASYやその他のDNAメチル化の意義が明らかとなれば、それ自体でADの発症を予測するバイオマーカーとなる。これはADの予防にも活かすことが可能となる。

研究成果の概要（英文）：In Alzheimer's disease (AD), changes in DNA methylation levels are thought to influence the accumulation of abnormal proteins and neurodegeneration. The applicants discovered that blood COASY DNA methylation levels change in AD patients. In this study, they identified 132 sites with differences in DNA methylation levels between AD patients and non-demented elderly individuals. Furthermore, they revealed that infection with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) affects the DNA methylation of COASY. Specifically, the capsid protein VP26 was suggested to impact host DNA methylation changes by binding to the DNA methylation enzyme DNMT3A. These results are expected to lead to the development of new diagnostic methods and treatments for AD.

研究分野：精神医学

キーワード：アルツハイマー病 DNAメチル化 認知症 軽度認知障害 エピジェネティクス COASY 単純ヘルペスウイルス1型

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

#### (1) 認知症のエピジェネティクス

少子高齢化の進行は重要な社会課題である。そのため、健康寿命を延伸させるには、認知症の発症を防ぐ方法が求められている。認知症は多くの疾患を含む病態の総称で、最も多いのはアルツハイマー病 (AD) である。AD 脳ではアミロイドβ 蛋白 (Aβ) やリン酸化タウ (p-tau) といった異常蛋白の蓄積を認め、それらが神経変性を引き起こす。しかし、神経変性や認知機能の低下にはさらに多くの機序の関与があることも示唆されている。

エピジェネティクスとは遺伝子配列によらない遺伝子発現調節機構をいい、がんや AD を含めた加齢性疾患の発症に大きく関わる。エピジェネティクス機構の一つである DNA メチル化は加齢や感染といった環境因子によって変化する。申請者らは AD で、健常高齢者と比較して、様々な遺伝子領域で DNA メチル化異常を認めたことを報告した (Kobayashi N, et al. PLoS One 2016;11(1))。なかでも、エネルギー代謝に重要である補酵素 A (CoA) の合成酵素をコードする *COASY* 遺伝子の DNA メチル化異常は、脂肪酸やグルコースの代謝経路に影響を与え、神経変性の原因になり得る (Kobayashi N, et al. PLoS One 2016;11(12), Kobayashi N, et al. Sci Rep 2020;10(1))。しかし、その機序や根拠は示されていない。さらに、DNA メチル化異常が神経変性へ直接影響する可能性も考えられる。加えて、DNA メチル化を誘導する直接的な要因も明らかではない。

#### (2) AD とヘルペスウイルス感染

ヘルペスウイルスは幼少時に初感染し、その後生涯に渡り潜伏感染し、ストレス刺激によって再活性化する。AD の脳から単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) が検出されるという報告から、両者との関連が注目されている。申請者らは AD 及びその前段階である軽度認知障害 (MCI) で、健常高齢者よりも HSV-1 に対する抗体価が高く、再活性化が生じていることを報告した (Kobayashi N, et al. BBRC 2013;430(3))。さらに、HSV-1 のみならず、ヒトヘルペスウイルス (HHV-)6A、HHV-7 もまた、AD との関連が指摘された。ヘルペスウイルスは神経向性があり、脳炎を引き起こすことがあるが、AD では脳炎像はなく、増殖感染による細胞死は生じていない。そこで、AD 発症に関与する神経変性を引き起こす理由として、増殖していない、潜伏感染しているウイルスが何らかの刺激によりウイルス蛋白を産生し、ウイルス蛋白に対する免疫反応、ミクログリアの活性化や微小な炎症が宿主の *COASY* や代謝関連遺伝子のエピゲノム異常を引き起こし、Aβ クリアランス機構を障害することで Aβ 蓄積に働くという仮説を考えた。この機構の分子は AD に対する新たな予防や治療の標的にもなり得る。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の3つを検討することを目的とする。

- (1) *COASY* を含めた代謝関連遺伝子のエピゲノム異常が神経変性に関わること
- (2) ヘルペスウイルスの潜伏感染によって、エピゲノム変化が生じること

### 3. 研究の方法

#### (1) 代謝関連遺伝子の DNA メチル化部位の探索

AD 11 名、健忘型軽度認知障害 (aMCI) 4 名及び非認知症高齢者 (NC) 4 名の血液 DNA を用いて、網羅的に DNA メチル化量を測定した。

#### (1) *COASY* 遺伝子の DNA メチル化部位の特定

AD 151 名、aMCI 22 名及び NC 200 名を対象に、パイロシーケンス法にて、*COASY* 遺伝子の DNA メチル化量を測定した。

#### (2) HSV-1 感染による *COASY* 遺伝子の DNA メチル化変化

抗ヘルペス薬であるアシクロビル投与の有無で神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に HSV-1 を感染させた。さらに、late タンパクであるカプシドタンパク VP26 に核内移行シグナルを付加し、核内で VP26 を発現させた。これらの環境下で *COASY* 遺伝子の DNA メチル化量を測定した。

### 4. 研究成果

- (1) 代謝関連遺伝子を含む AD 群、aMCI 群と NC 群とで有意な差があるメチル化部位を 132 箇所同定した。この成果は AD の診断に有用となる可能性があり、特許を出願した<sup>1)</sup>。

(1) パイロシーケンス法による DNA メチル化が変化した領域 (DMR)の決定

パイロシーケンス法で解析した配列には CpG サイトが 14 箇所含まれていた。各値は Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM)法と有意な相関を示した。しかし、そのうち 2 箇所における DNA メチル化量は、AD/aMCI 群と NC 群で有意な差を認めなかった。また、なかでも AD/aMCI 群と NC 群の分離に最も有用な CpG サイトを決定した (図 1)。

これらの結果は AD の診断に有用となる可能性があり、特許を出願した<sup>2)</sup>。さらに、結果をまとめて、今後論文にて発表する予定である。

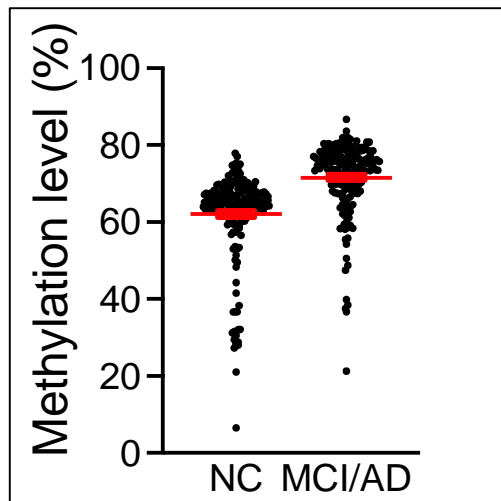


図 1 パイロシーケンス法による COASYDNA メチル化量の測定

(2) HSV-1 感染による COASY 遺伝子の DNA メチル化量の変化

COASYDNA メチル化量は非感染細胞と比較して、HSV-1 感染細胞で低下した (図 2A)。しかし、反対に、アシクロビル存在下では COASYDNA メチル化量は非感染細胞と比較して上昇した (図 2B)。VP26 を細胞核の内外で発現させたところ、VP26 を核内で発現させた場合には、COASYDNA メチル化量は上昇した。VP26 は DNA メチル化酵素である DNMT3A と結合することが知られ、DNMT3A の transcriptional な変化ではなく、translational な制御によって、DNA メチル化が起こることが示唆された。

これらの結果は論文にて発表した<sup>3)</sup>。

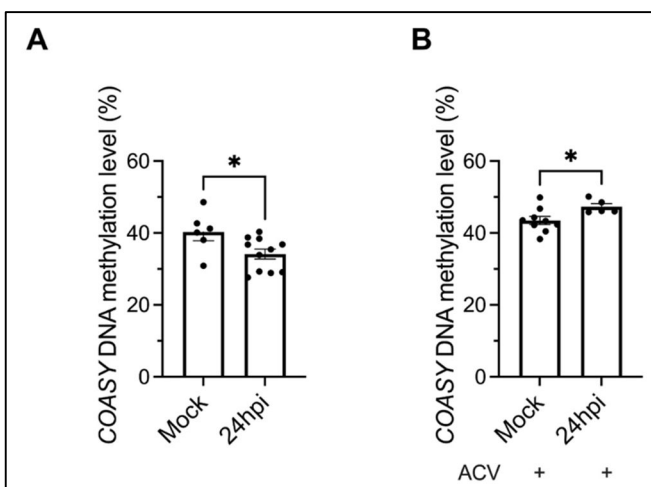


図 2 HSV-1 感染後の COASY DNA メチル化量

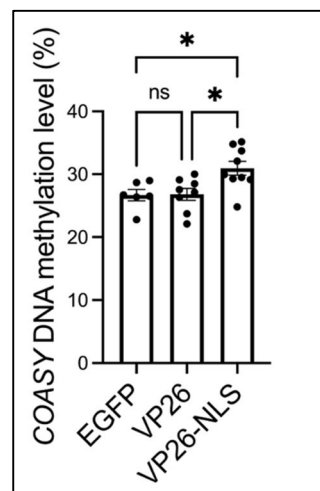


図 3 HSV-1 VP26 発現後の COASYDNA メチル化量

<引用文献>

- 1) アルツハイマー病を発症する可能性を判定するためのデータ収集方法及びキット. 特願 2021-205192. 発明者 小林伸行. 出願人 学校法人慈恵大学.
- 2) アルツハイマー病を発症する可能性を判定するためのデータ収集方法及びキット. 特願 2022-161607. 発明者 小林伸行. 出願人 学校法人慈恵大学.
- 3) Osaka R, Kobayashi N, Shimada K, Ishii A, Oka N, Kondo K. VP26, a herpes simplex virus type 1 capsid protein, increases DNA methylation in COASY promoter region. Brain Behav Immun Health 2022;26: 100545.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Osaka Rui, Kobayashi Nobuyuki, Shimada Kazuya, Ishii Azusa, Oka Naomi, Kondo Kazuhiro	4. 巻 26
2. 論文標題 VP26, a herpes simplex virus type 1 capsid protein, increases DNA methylation in COASY promoter region	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, & Immunity - Health	6. 最初と最後の頁 100545 ~ 100545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbih.2022.100545	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 -
1. 著者名 Kobayashi Nobuyuki, Shinagawa Shunichiro, Nagata Tomoyuki, Shigeta Masahiro, Kondo Kazuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Suppressors of Cytokine Signaling Are Decreased in Major Depressive Disorder Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 1040 ~ 1040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm12071040	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 -
1. 著者名 小林 伸行、近藤 一博	4. 巻 94
2. 論文標題 特集 ウイルス感染症に強くなる!-予防・診断・治療のポイント 《総論》 ウイルスの基礎知識-形態, 感染様式などについて	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 606 ~ 610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1411203083	査読の有無 無
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, Shinagawa Shunichiro, Nagata Tomoyuki, Tagai Kenji, Shimada Kazuya, Ishii Azusa, Oka Naomi, Shigeta Masahiro, Kondo Kazuhiro	4. 巻 81
2. 論文標題 Blood DNA Methylation Levels in the WNT5A Gene Promoter Region: A Potential Biomarker for Agitation in Subjects with Dementia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-210078	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 -

1. 著者名 Nagata Tomoyuki, Shinagawa Shunichiro, Kobayashi Nobuyuki, Kondo Kazuhiro, Shigeta Masahiro	4. 巻 16
2. 論文標題 A case of V180I genetic mutation Creutzfeldt Jakob disease (CJD) with delusional misidentification as an initial symptom	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prion	6. 最初と最後の頁 7~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336896.2021.2017701	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 -

1. 著者名 Sone Daichi, Beheshti Iman, Shinagawa Shunichiro, Niimura Hidehito, Kobayashi Nobuyuki, Kida Hisashi, Shikimoto Ryo, Noda Yoshihiro, Nakajima Shinichiro, Bun Shogyoku, Mimura Masaru, Shigeta Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Neuroimaging-derived brain age is associated with life satisfaction in cognitively unimpaired elderly: A community-based study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-022-01793-5	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 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林 伸行、小坂 瑠依、嶋田 和也、石井 梓、岡 直美、近藤 一博
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルス1型カプシドタンパクVP26によるCOASY プロモーター領域のDNAメチル化亢進
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林伸行, 岡直美, 近藤一博
2. 発表標題 客観的疲労評価法としての唾液中ヘルペスウイルスの測定
3. 学会等名 第17回日本疲労学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林伸行, 小坂瑠依, 嶋田和也, 近藤一博
2. 発表標題 単純ヘルペスウイルス1型感染によって引き起こされる宿主細胞のDNAメチル化変化の検討
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林伸行
2. 発表標題 血液バイオマーカーによる認知症診断の実現に向けて
3. 学会等名 第2回日本認知症予防学会東京都支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 アルツハイマー病を発症する可能性を判定するためのデータ収集方法及びキット	発明者 小林伸行	権利者 学校法人 慈恵大 学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/036475	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 アルツハイマー病を発症する可能性を判定するためのデータ収集方法及びキット	発明者 小林伸行	権利者 学校法人慈恵大 学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-161607	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アルツハイマー病を発症する可能性を判定するためのデータ収集方法及びキット	発明者 小林伸行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/045985	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 アルツハイマー病を発症する可能性を判定するためのデータ収集方法及びキット	発明者 小林伸行	権利者 学校法人慈恵大 学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-205192	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	品川 俊一郎  (Shinagawa Shunichiro)  (90459628)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授     (32651)	

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