

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390272

研究課題名(和文) エピゲノム修復に基づく発達障害疾患の新規治療戦略

研究課題名(英文) Development epigenomic restoration therapy for autistic disorders

研究代表者

久保田 健夫 (KUBOTA, Takeo)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：70293511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：エピゲノムには、ゲノムにはない可逆性が存在する。そこで、エピゲノム異常に起因する発達障害疾患(Rett症候群)を対象にエピゲノム修復治療の可能性を検証した。当初、個々の遺伝子に作用する化合物の作製を予定したが、修復対象遺伝子が多数想定されたことから、グローバルな作用を有する化合物の探索を行った。その結果、本症に使用されている抗てんかん薬に多数の遺伝子を対象にしたエピゲノム修復を介した発現回復作用があることが神経培養細胞で判明した。さらにこの薬剤以上の作用を有する新規化合物を2種見いだした。この効果が新規に本症患者から作製したiPS細胞で確認できれば、本症の新たな治療薬候補になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Epigenetics is a reversible mechanism. Thus, we investigated epigenomic restoration for a representative autistic disorder, Rett syndrome. We initially planned to develop a chemical to restore epigenomic status in a gene-specific manner. However, we realized that genes that require epigenomic restoration were relatively many. Therefore, we searched chemicals with a global effect. As a result, we demonstrated that a drug for epilepsy of Rett syndrome had a global effect with up-regulation of many genes. Furthermore, we identified more effective new chemicals, suggesting that these will be new drug candidates for Rett syndrome when we confirm the effect in our newly established patients-derived iPS cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：エピジェネティクス エピゲノム レット症候群 MeCP2 遺伝子発現 修復治療 化合物 パルプロ酸 ナトリウム

1. 研究開始当初の背景

ヒトの遺伝子を構成する DNA の配列の異常 (遺伝子変異) が疾患の原因になることが良く知られている。一方、DNA や DNA が取り巻くヒストンタンパク質は精緻な化学修飾が施されており、修飾パターンに変化や異常が生ずると遺伝子の機能に障害が生ずることも分かって来た。

このようなゲノム DNA 上の化学修飾をエピゲノムとよんでいる。エピゲノムは、DNA 配列と異なり、可変性を有し、組織発生や細胞分化の過程で、必要な遺伝子を機能させるためにめまぐるしく変化することが知られている。

細胞分化が終了すると安定になるが、最近環境要因がこれを変化させることがわかってきた。

したがって、変化した異常なエピゲノム修飾の可変性 (可逆性) を利用して元に戻せれば、疾患治療法になりうる。

そこでわれわれは、エピゲノム調節タンパク質 (MeCP2) の異常により被調節遺伝子の発現の乱れが想定されている代表的な発達障害疾患 (Rett 症候群) を対象に、修復治療について検証した。

2. 研究の目的

エピゲノムの実態は DNA のメチル化やヒストンタンパク質のアセチル化などの化学修飾である。そこで、修復のコンセプトとして、人為的に DNA のメチル化やヒストンのアセチル化を促すような化合物を作製・同定することであった。

そのために、以下の課題を検証した。

(1) 修復対象遺伝子の把握

本研究の先行研究で、MeCP2 タンパク質によって本来適正に調節されるが、Rett 症候群患者では MeCP2 の異常により調節が破綻しエピゲノム修復が必要とされる遺伝子を少数同定していた (*PCDH1* や *PCDH7* な

ど)。これに加え、さらにどの程度、修復対象遺伝子が存在するかを調べた。具体的には重症度の差異が著しい本症の一卵性双生児間でエピゲノム差異が著しい遺伝子 (すなわち症状の重症化に関与し修復が必要となる遺伝子) を調べた。

(2) 既存化合物 (薬) のエピゲノム修復効果の検証

バルプロ酸ナトリウムは、てんかんや精神疾患治療薬として頻用されている薬剤であり、Rett 症候群のてんかん症状にも使用されている。この薬剤にヒストンアセチル化阻害作用があることが判明した。これを受けて、ヒト神経培養細胞内で、どの程度の遺伝子の発現を変化させるかを調べた。

(3) エピゲノム修復効果を有する新規化合物の同定

本研究では、当初、修復対象遺伝子の 1 つ 1 つに対し、その発現を変化させる手法を導入することにしていった。具体的には、塩基配列に従ってピロールとイミダゾールを並べた化合物をデザインし、これによる発現制御を試みる予定であった。しかしながら、上述の一卵性双生児比較解析や他の研究グループから発表された論文より、Rett 症候群に関係する (修復対象とする) 遺伝子が多数想定されることが判明したことを受け、複数 (多数) の遺伝子の修復が期待できる化合物の探索を行った。

(4) 新手法による患者 iPS 細胞の樹立

本研究に先立ち、既に Rett 症候群患者由来の iPS 細胞は樹立してあった。しかしこれはオリジナルの方法により、初期化 (山中) 4 遺伝子をゲノム DNA 内に挿入する方法で、これにより挿入先の遺伝子の発現が乱れたり、挿入遺伝子の不活化不全により、適正な分化誘導が行えない等の問題点があった。そこで、これらの問題点を克服した、ごく最近開発された 4 遺伝子がゲノム内に挿入されない方法による iPS 細胞の樹立を行った。

3. 研究の方法

(1) 修復対象遺伝子の把握

網羅的 DNA メチル化比較は、レット症候群の一卵性双生児の血液 DNA を材料に、ヒトゲノム上の全遺伝子のプロモーター領域近傍の 45 万 CpG 箇所（メチル化部位）を搭載したアレイ（HumanMethylation 450K Beadchip、イルミナ社）を用いた。またメチル化の確認には Bisulfite sequencing 法を、発現の確認には定量 RT-PCR 法を用いた。

(2) 既存化合物（薬）のエピゲノム修復効果の検証

網羅的発現比較には Affimetrix 社の発現アレイを用いた。

(3) エピゲノム修復効果を有する新規化合物の同定

MeCP2 タンパク質複合体構成タンパク質への化合物の結合には NMR 法を、細胞死誘導濃度のチェックには MTT アッセイを、発現変化の確認には定量 RT-PCR 法を用いた。

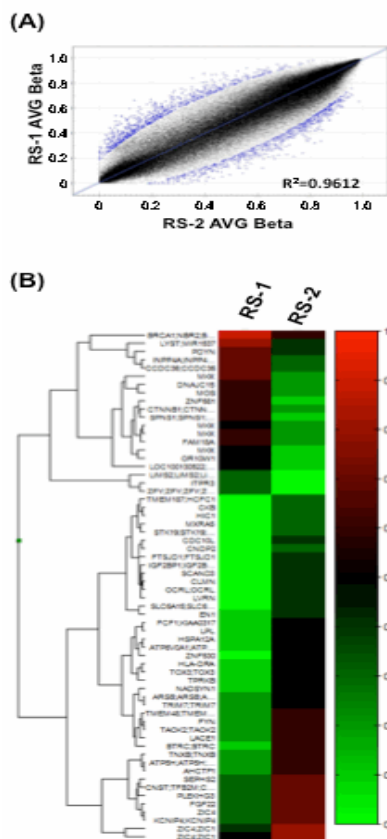
(4) 新手法による患者 iPS 細胞の樹立

ゲノム DNA に導入遺伝子がインテグレートされない iPS 細胞作製方法として、プラスミドとして導入する方法（Episomal iPSC Reprogramming Kit、Life Technology 社）を用いた。

4. 研究成果

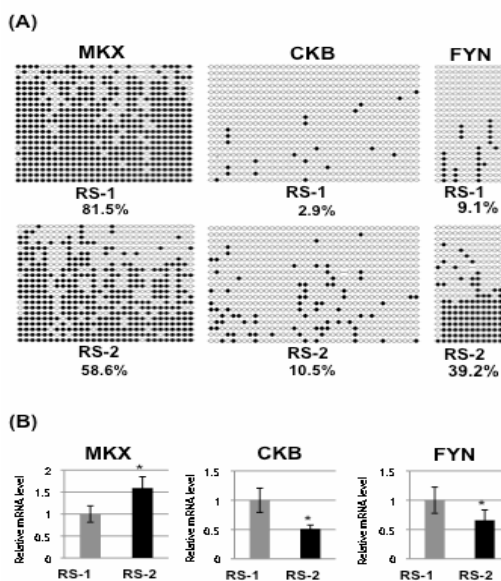
(1) 修復対象遺伝子の把握

修復対象遺伝子の把握一卵性双生児間（RS-1, RS-2）で血液ゲノム上の 45 万 CpG 箇所の DNA メチル化パターンはほぼ相関していた（図 1 A）。しかしながら、その中で双子間で顕著なメチル化差異を呈した CpG は 252 箇所にも上ることが判明した。（図 1 B）。



(図 1)

同定された 252 カ所の CpG 部位のうち、骨格形成に関わる *MKX* 遺伝子、神経機能に関わる *CKB*、*FYN* の両遺伝子においては、bisulfite sequencing 法でメチル化差異が確認され（図 2 A）、合わせて遺伝子発現の差異も確認された（図 2 B）。

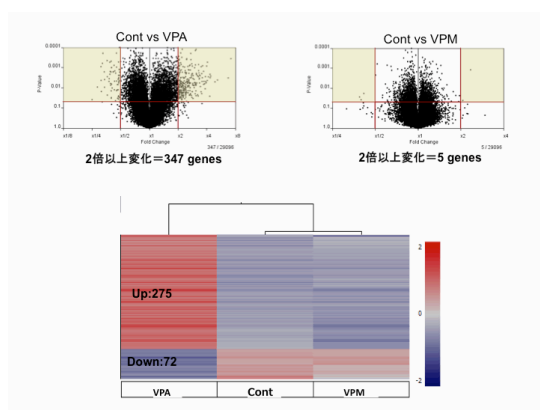


(図 2)

以上より、DNAメチル化の状態が Rett 症候群の症状の重症度に関係する遺伝子領域、すなわち修復が必要とされる遺伝子領域は多数存在すると考えられた。

(2) 既存化合物（薬）のエピゲノム修復効果の検証

DNAメチル化とともに、遺伝子の発現調節を担うメカニズムとしてヒストン蛋白質のアセチル化修飾がある。バルプロ酸ナトリウムはヒストンのアセチル化修飾を抑制しているタンパク質（ヒストン脱アセチル化酵素）の機能を阻害して、遺伝子領域のアセチル化を誘導し、発現を高める効果が知られるようになった。これを受けて、バルプロ酸ナトリウム投与時の神経培養細胞における遺伝子発現変化を調べた結果、ヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を有しない同様な構造を有する化合物に比べて多数の遺伝子への作用（およそ2万のヒト遺伝子のうち347遺伝子を変化させ、そのうち275遺伝子の発現を上昇・回復させる作用）があることが分かった（図3）。また Rett 症候群モデルマウス脳で発現低下が知られている脳栄養因子遺伝子（*BDNF*）の発現の回復作用も判明した。

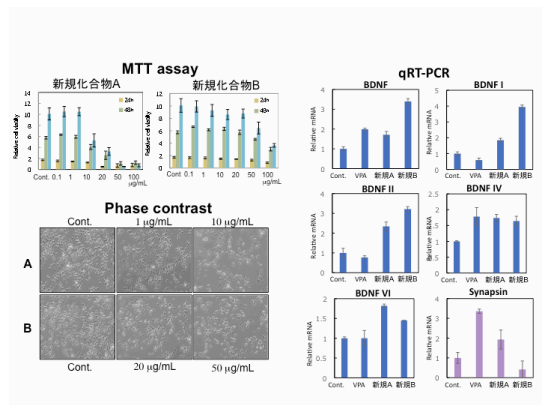


(図3)

(3) エピゲノム修復効果を有する新規化合物の同定

MeCP2は数種のタンパク質とともにタンパク質複合体を形成し、遺伝子の発現抑制機能を維持している。したがって、この複合体を標的とする化合物により複合体形成を阻

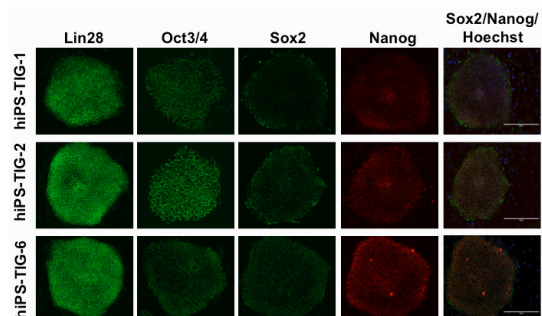
害することで遺伝子の発現を回復することが可能である。このコンセプトにより、複合体タンパク質に結合し、複合体機能を阻害する化合物の発現回復機能を検証した。その結果、神経細胞死を誘導しない適正な投与濃度において、Rett 症候群モデルマウス脳で発現低下が知られている脳栄養因子遺伝子（*BDNF*）の発現の回復作用は、バルプロ酸ナトリウムより高い傾向を示した（図4）。



(図4)

(4) 新手法による iPS 細胞の樹立

市販の皮膚線維芽細胞を材料に、初期化4因子をプラスミドの形で導入する新手法により iPS 細胞作製を試みた。その結果、内在性の初期化因子がきちんと発現する iPS 細胞の要件を満たす細胞株が作製できることを確認した（図4）。



(図4)

以上の研究成果より、新手法で Rett 症候群患者由来の iPS 細胞を作製し、これより誘導した神経細胞において新規化合物のエピゲノム修復に基づく遺伝子機能回復効果が確認されれば、これらの化合物は、レット症

候群で不足している遺伝子タンパク質の回復効果を有する新薬の候補になりうると考えられた。

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 11 件)

- (1) Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto Y, Andoh T, Kurosawa H, Akamatsu W, Oyama M, Okano H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for Rett syndrome. *PLoS ONE* 8:e66729, 2013 (査読あり) .
- (2) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. The role of epigenetics in Rett syndrome. *Epigenomics* 5: 583-592, 2013 (査読あり) .
- (3) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenetics in neurodevelopmental and mental disorders. *Med Epigenet* 1: 52-59, 2013 (査読あり) .
- (4) Kubota T, Hata K. Epigenomics comes of age with expanding roles in biological understanding and clinical application. *J Hum Genet* 58:395, 2013 (査読あり) .
- (5) Nitta H, Unoki M, Ichiyanagi K, Kosho T, Shigemura T, Takahashi H, Velasco G, Franscastel C, Picard C, Kubota T, Sasaki H. Three novel ZBTB24 mutations identified in Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients. *J Hum Genet* 58:455-460, 2013 (査読あり) .
- (6) Li Y, Miyanari Y, Shirane K, Nitta H, Kubota T, Ohashi H, Okamoto A, Sasaki H. Sequence-specific microscopic visualization of DNA methylation status at satellite repeats in individual cell nuclei and chromosomes. *Nucleic Acids Res* 41:e186, 2013 (査読あり) .
- (7) Miyake K, Hirasawa T, Koide T, Kubota T. Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases. *Adv Exp Med Biol* 724:91-98, 2012 (査読あり) .
- (8) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenetic understanding of gene-environment interactions in psychiatric disorders: a new concept of clinical genetics. *Clin Epigenetics* 4:e1, 2012 (査読あり) .
- (9) Kubota T, Hirasawa T, Miyake K.

Epigenetic Mechanisms and Therapeutic Perspectives for Neurodevelopmental Disorders. *Pharmaceuticals* 5: 369-383, 2012 (査読あり) .

- (10) Sakazume S, Ohashi H, Sasaki Y, Harada N, Nakanishi K, Sato H, Emi M, Endoh K, Sohma R, Kido Y, Nagai T, Kubota T. Spread of X-chromosome inactivation into chromosome 15 is associated with Prader-Willi syndrome phenotype in a boy with a t(X;15)(p21.1;q11.2) translocation. *Hum Genet* 131:121-130, 2012.
- (11) Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Takahashi K, Kudo S, Nakawaga T, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T. The protocadherins, *PCDHBI* and *PCDH7*, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. *BMC Neurosci* 12:81, 2011.

[学会発表] (計 13 件)

- (1) 久保田健夫. 発達障害とエピジェネティクス. 発達障害医学セミナー (京都)、2014. 3. 16.
- (2) 久保田健夫、三宅邦夫、水口洋平、伊藤雅之、後藤雄一、豊田敦. 重症度の差異を認めたレット症候群の一卵性双生児のゲノム・エピゲノム比較解析. 日本人類遺伝学会第 58 回大会 (仙台)、2013. 11. 21.
- (3) Kubota T. Environment, Epigenetics and Neurodevelopment. Pre-Congress Workshop 2: Epigenetic Analysis/ EWAS. 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease (Singapore), 2013. 11. 16.
- (4) Ando T, Akamatsu W, Matusmoto, Mikake K, Yamaguchi R, Okada Y, Imaizumi Y, Ohyama M, Kurosawa H, Amagai M, Kubota T, Okano H. Astrocytes are increased in neural cells derived from Rett syndrome iPS cells. 第 35 回日本神経科学大会 (名古屋)、2013. 7. 21.
- (5) Miyake K, Kubota T. Epigenomic difference associated with neurodevelopmental discordance of the monozygotic twins with Rett syndrome. 第 35 回日本神経科学大会 (名古屋)、2013. 7. 21.
- (6) Kubota T. Epigenetics in Neurodevelopmental Disorders. Epigenomics & Metabolomics Symposia-2013 (Harvard Medical School, Boston, USA), 2013. 7. 10.
- (7) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenetic dysfunctions in children manifesting with autistic features. Symposium: What are the effects of

environment and epigenetics in cognitive development of children? 11th World Congress of Biological Psychiatry (Kyoto), 2013. 6. 25.

- (8) 久保田健夫. エピゲノム: Rett 症候群から判ったこと. シンポジウム S(4)-12「孤発性疾患における遺伝子異常の探索法」. 第 54 回日本神経学会学術大会 (東京)、2013. 6. 1(5. 29-6. 1).
- (9) 久保田健夫. 自閉症のエピジェネティックな理解. シンポジウム 1「自閉症の神経科学的研究」. 第 55 回日本小児神経学会総会 (大分)、2013. 5. 30(5. 30-6. 1).
- (10) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T, Minakuchi Y, Toyoda A. No evidence of genetic difference for clinical severity between monozygotic twins with Rett syndrome. The American society of Human Genetics 62nd Annual Meeting (San Francisco), 2012. 11. 9.
- (11) Kubota T, Sato H, Sakazume S, Nagai T, M. Kamiyama M, Ichikawa K, S. Saito S. Validation studies of a disease-oriented whole-genome scanning as a diagnostic test for genetic and structural variations. 12th International Congress of Human Genetics and the American society of Human Genetics 61th Annual Meeting (Montreal), 2011. 10. 12.
- (12) 久保田健夫、安藤友子、黒澤尋、岡野栄之. 小児自閉症疾患患者に由来する iPS 細胞の樹立とその遺伝学的・神経学的解析. 平成 23 年度 やまなし産学官連携研究交流事業 (甲府)、2011. 9. 9.
- (13) 久保田健夫、三宅邦夫、平澤孝枝. レット症候群の治療にむけた研究展開. シンポジウム 3「Rett 症候群の治療に向けた研究展開」. 第 53 回日本小児神経学会総会 (横浜)、2011. 5. 26(26-28).

〔図書〕 (計 5 件)

- (1) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Section 4: Chromatin and Epigenetic Influences on DNA Replication, Chapter: Current Understanding of Epigenomics and Epigenetics in Neurodevelopmental Disorders. In Epigenomics and Epigenetics. Intech (Open Access Publisher), 2014, ISBN 978-953-51-1363-8 (電子版のみのため頁数指定なし) (査読あり).
- (2) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T, Onaka T, Yamasue H. Chapter: Epigenetic Modulation of Human Neurobiological Disorders. In “Epigenetics in human disease”. Elsevier, 2012, pp 193-203.
- (3) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Section 4: Chromatin and Epigenetic Influences

on DNA Replication, Chapter 13: The Mechanism of Epigenetic Modifications during DNA Replication. In “The Mechanisms of DNA Replication”. Intech (Open Access Publisher), 2012 (ISBN 978-953-51-0991-4), pp 333-350 (査読あり)

- (4) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Chapter: Epigenetic modifications: genetic basis of environmental stress response. In “DNA Replication / Book 1”. Intech (Open Access Publisher), 2011 (ISBN 978-953-51-0991-4) (電子版のみのため頁数指定なし) (査読あり).
- (5) Miyake K, Hirasawa T, Koide T, Kubota T. Chapter 7: Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases. In “Neurodegenerative Diseases” (Madae Curie Bioscience Databases). Landes Bioscience, 2011 (ISBN 978-1-4614-0614-0652-5).

〔その他〕

ホームページ

<http://www.epigenetmed.com/>

(研究代表者の所属機関の環境遺伝医学講座ホームページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 健夫 (KUBOTA, Takeo)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号: 7 0 2 9 3 5 1 1

(2) 研究分担者

黒澤 尋 (KUROSAWA, Hiroshi)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号: 1 0 2 2 5 2 9 5

(3) 連携研究者

岡野 栄之 (OKANO, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 6 0 1 6 0 6 9 4

永瀬 浩喜 (NAGASE, Hiroki)

千葉県がんセンター (研究所)・研究所長

研究者番号: 9 0 3 2 2 0 7 3