

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893251

研究課題名(和文)アルツハイマー病候補遺伝子プロモーター領域エピジェネティクス変化の検討

研究課題名(英文)Epigenetic alteration of Alzheimer disease candidate gene promoter region

## 研究代表者

永田 智行(Nagata, Tomoyuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00408428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)患者において脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor: BDNF)遺伝子プロモーター領域DNA(抹消血)メチル化率の亢進がみられた。さらにそのメチル化率はAD患者の記憶や遂行機能などの神経心理検査スコアと負の相関性がみられた。以上からAD患者におけるBDNF遺伝子メチル化率は、神経認知機能を反映したもので今後の予後や臨床症状を予想する上で有用な代用マーカーになることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The methylation levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene promoter region was significantly higher in the Alzheimer disease (AD) patients than in the Normal Controls (NCs). Moreover, the methylation level was significantly and negatively correlated with some neuropsychological test subscores (registration, recall, and prehension behaviors scores). Therefore, such result implies that BDNF gene methylation levels reflecting neurocognitive function in AD patients may be useful as a surrogate marker to predict the clinical presentations or prognosis.

研究分野：精神神経科

キーワード：アルツハイマー病 エピジェネティクス 脳由来神経栄養因子 DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) はじめに

アルツハイマー病(AD)発症リスクのなかで、APOE、BIN1、CLU など候補遺伝子多型が関与していることは、メタ解析やゲノムワイド関連解析などの結果で分かってきた。しかし、それら候補遺伝子による原因蛋白：アミロイド-β (A-β)、タウ (τ)蛋白の凝集や蓄積への作用機序いまだ不明である。最近、孤発性ADの神経細胞内でアミロイド前駆蛋白質(APP)、微小管関連蛋白タウ(MAPT)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β(GSK3β)遺伝子のエピジェネティック変化が報告され、原因蛋白発現の制御機構とAD発症メカニズムへの関与が示唆された。

### 2) 脳由来神経栄養因子 (BDNF)遺伝子とAD

BDNFは神経細胞表面のTrkB受容体に結合し、神経の成長や発達に關する液性蛋白で、A-β、τ蛋白の神経毒性に対しては神経保護的作用を示す。

### 3)BDNF 遺伝子メチル化とAD

精神疾患患者において、BDNF 遺伝子メチル化亢進が疾患発症と關与することが分かってきた。また、AD死後脳全体でメチル化亢進とされたことが報告され、脳局在のmRNA発現や蛋白量減少の減少に繋がることが予想された。しかし、それらBDNF 遺伝子のメチル化がどのような臨床症状に影響するかを調査した研究はいまだない。

## 2. 研究の目的

本研究では抹消血リンパ球から抽出したDNAを用い、BDNF 遺伝子プロモーター領域メチル化率を解析し、健常者と比較することで、それらが疾患特異的な指標になりうるかを検証する。さらに、それらメチル化率と各ADの臨床症状との相関性を調査し、どのような表現型に影響するかを検証する。

## 3. 研究の方法

### 1) 本研究への参加者

40人の末梢血サンプルを次の3施設から採取

した。慈恵医大附属柏病院、慈恵医大附属病院精神神経科の外来患者でのなかでAD患者20人(男女：8/12、年齢：66.5±5.07)、順天堂大学医学部附属病院で健常者20人(男女：8/12、年齢：66.5±5.12)(精神疾患でない者)から検体提供を受けた。キアゲンキットを用いて単核球からDNAを抽出した。ADの診断にNINDS/ADRDAを用いた。また神経精神症状の評価にBehave-ADを用い、介護者からその内容を聴取した。神経心理検査は臨床心理士が前頭葉機能検査(FAB)とMini-Mental State Examination (MMSE)テストを施行し評価した。また健常者は既往歴で精神疾患によって投与歴があるものは除外した。本研究は慈恵医大、順天堂大学倫理委員会の承認を得ており、患者と介護者から同意を得ている。

### 2)BDNF プロモーター領域 DNA メチル化率の解析

DNAサンプル1μgを、MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Takara Bio Inc.)を用いて、添付されたプロトコールに従い、パイサルファイト処理した。パイサルファイト処理されたDNAを鋳型に、TaKaRa EpiTaq HS (Takara Bio Inc.)を用いて、BDNFのプロモーター領域をnested PCR(polymerase chain reaction)で増幅した。1回目のPCR産物をQIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)にて精製した。2回目のPCR産物には制限酵素サイトPst IとBgl IIを付加した。標準的な方法で、Pst IとBgl IIで消化し、増幅したPCR産物をLitmus 28i vector (New England Biolabs)に挿入した。プラスミドをSTBL3コンピテント細胞(Invitrogen)に形質転換し、コロニーを得た。KOD FX Neo(Toyobo)を用いて、コロニーPCRを行い、陽性クローンを約40個取得した。その後、EXOSAP-IT (Affymetrix, Inc)を用いてプライマーを処理されたPCR産物をBigDye version 3.1 sequencing kit (Applied Biosystems)を用いて、以下のプライマーを用いて配列解析した。

M13 Primer P7 :

5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'

M13 Primer M3 :

5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

M13 Primer P8 :

5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC-3'

M13 Primer RV2 :

5'-CAGCTATGACCATGATTACG-3'

## 2) 統計的手法

シャピロ-ウィルクテストを用いて正規性の検定した所、年齢以外での正規性が否定された。そのため年齢以外はノンパラメトリックな統計処理を用いた。Mann-Whitney (M-W) : マンホイットニー検定を用いて AD と健常者のメチル化率 (%) を比較した。男女差は  $\chi^2$  検定で、年齢は  $t$  検定を用いて比較した。さらに、比較の結果検出された有意差あるメチル化サイトのメチル化率と各臨床症状を評した尺度スケールのスピアマン順位相関係数を算出し、5%未満を有意差があるとした。

## 4 . 研究成果

### 1) 患者属性

研究に参加した 40 人の参加者で 12 人 AD、6 人健常者の BDNF DNA メチル化解析を行った。年齢、性差に有意差は見られなかった(表 1)。検体採取の際、AD12 人がアセチルコリエステラーゼ阻害薬 (AchEI) を 6 か月以上服用しており、パロキセチンを 2 名が、フルボキサミンを 1 名が、バルプロ酸ナトリウムを 1 名が服用していた。

表 1. 参加者属性

GROUP	NC (n=6)	AD (n=12)	t-score or $\chi^2$ score	P value
	(mean±SD)	(mean±SD)		
性差 (男/女)	4 / 2	4 / 8	1.8 <sup>a)</sup>	0.18
年齢	64.33±6.53	65.67±5.18	0.473 <sup>b)</sup>	0.642

<sup>a)</sup>性差は  $\chi^2$  検定を使用し、<sup>b)</sup>年齢は  $t$  検定を用いた。  
NC (健常者), AD (Alzheimer disease)

### 2) プロモーター領域メチル化率の比較

フォワード (Fw) プライマーとリバース (Rv)

プライマーで解読が可能であったプロモーター領域 (exon ) の CpG (20 サイト) を AD と健常者で比較した。20 サイトは Fw プライマー配列から 120bp 程度の配列に含まれた (図 1)。全体のメチル化率を AD (5.08 ± 5.52)、健常者 (2.09 ± 0.81) で比較したところ、AD で有意に上昇していた (P=0.041) (表 2)。さらに 20 の CpG サイトのうち 4 番目の CpG サイトで AD のメチル化率が有意に上昇していた (P=0.014)。(表 2)

図 1. メチル化解析で調査された BDNF プロモーター領域配列

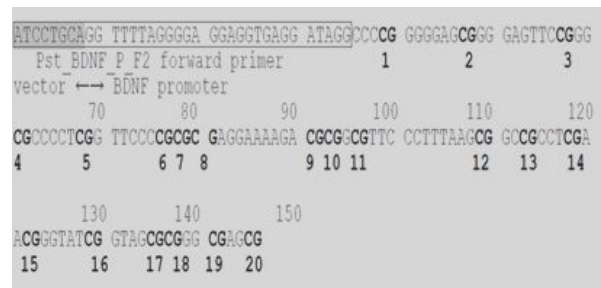


表 2. CpG メチル化率 (%) の比較

GROUP	NC (n=6)	AD (n=12)	M-W Z score	P value
	mean ± SD	mean ± SD		
全メチル化率 (%)	2.09 ± 0.81	5.08 ± 5.52	14	0.041*
CpG 4 (%)	0.00 ± 0.00	4.85 ± 6.91	12	0.014*

CpG メチル化率比較には Mann-Whitney (M-W) 検定が用いられた。\* P < 0.05.

### 3) AD 患者属性と CpG4 メチル化率の相関性

スピアマン相関係数で CpG4 メチル化率と罹患期間 (月数) との有意な正相関を認め (p = 0.588; P = 0.044)。そのほかの年齢、MMSE スコア、FAB スコア、Behave-AD スコア、CDRSB スコア (認知症重症度スケール) との CpG4 メチル化率の相関性は認めなかった。(引用文献 1 参照)

### 4) AD 患者の FAB および MMSE 下位項目と

### CpG4 メチル化率の相関性

AD 患者の FAB 下位 6 項目のなかで把握反射 ( $\rho = -0.642$ ;  $P = 0.024$ )、MMSE 下位 11 項目のなかで記銘力 ( $\rho = -0.651$ ;  $P = 0.022$ )、遅延再生 ( $\rho = -0.663$ ;  $P = 0.019$ ) と CpG4 メチル化率の有意な負相関性は認められた。(表 3)

表 3. CpG 4 メチル化率と MMSE、FAB 下位スコアの相関性: AD 患者 (n=12)

		記銘力 (MMSE)	遅延再生 (MMSE)	把握反射 (FAB)
相関係数	CpG4	$\rho = -0.651$ ( $P = 0.022^*$ )	$\rho = -0.663$ ( $P = 0.019^*$ )	$\rho = -0.642$ ( $P = 0.024^*$ )

$\rho$ : スペアマン相関係数. \*  $P < 0.05$

FAB: 前頭葉機能検査

MMSE: Mini-Mental State Examination

### 5) AD 患者の Behave-AD 下位項目と CpG4 メチル化率の相関性

AD 患者の Behave-AD 下位 7 項目と CpG4 メチル化率の有意な相関関係は認められなかった。(データ未掲載; 引用文献 1 参照)

#### 【考察】

これらの結果は、AD 患者でメチル化率が亢進され、続いて起こる BDNF 発現や局所的な蛋白質量の低下に影響する結果ことを支持するものとなった。いくつかのメチル化を調査した先行研究で、うつ病や双極性障害などの気分障害圏で exon プロモーター領域のメチル化亢進が見られ、AD でも同様の報告されている。本研究でも有意差を認める exon CpG サイトは 1 つであったが、その他のほとんど CpG サイトで C メチル化率が亢進しており将来の研究でさらにサンプルを増やし検討する必要がある。(データ未掲載; 引用文献 1 参照)

AD の神経認知機能で記憶機能や環境刺激に対する脱抑制化など比較的単純な課題へ

の BDNF メチル化の影響を認めた。また、AD の罹患期間と BDNF メチル化率との有意な正の相関性をみとめた。BDNF メチル化は心理的、生活習慣、神経炎症などのストレス反応の結果である。そのため、これは AD 発症後さまざまな BDNF メチル化のリスクが亢進した結果、神経保護作用の低下させた結果かもしれない。AD モデル動物で BDNF は海馬の BDNF を介して記憶機能に影響することがわかっており、今回も何らかの記憶機能に影響することが示唆された。また、死後脳において前頭葉皮質での BDNF メチル化が低下しており、比較的単純な前頭葉機能へ影響したのかもしれない。今回罹患期間と「把握反射」が有意な負相関性 ( $\rho = -0.654$ ;  $P = 0.021$ ) を認め、MMSE 下位スコア「記銘力」 ( $\rho = -0.538$ ;  $P = 0.071$ ) や「遅延再生」 ( $\rho = -0.346$ ;  $P = 0.270$ ) とは有意な相関は認めなかった。そのため、把握反射の低下は CpG4 の罹患期間を反映したメチル化亢進との影響もありうるかもしれない。今後将来の研究で複雑な前頭葉機能との関連を調べる必要がある。

本研究においていくつかの限界点が存在する。AChEI や抗うつ薬などの向精神薬を使用した結果、修正されたのかもしれない。研究参加者が比較的少ないため、第 2 種過誤が生じたかもしれない。しかしながら、本研究の結果でみられた、P 値や効果量は先行研究と同等であった。また、40 例のサンプルのなかから完全に解析が完了したものは 18 例であった。今後の研究手法のなかで、実験結果を安定化させていくことが必要となる。

いくつかの限界点はあるものの、AD の末梢血 DNA で BDNF メチル化亢進がみられ、神経認知機能や経過時間との有意な相関関係がみられた。詳細な臨床症状とメチル化率の関連性はいまだ先行研究で報告されていない。今回の研究結果は AD の進行性の過程で、BDNF 遺伝子の臨床的な関与や神経保護

作用の機序を解明するにあたり一助となる  
かもしれない。そのため、将来の研究でさら  
にサンプルを追加して再度評価すべきであ  
ると申請者等は考える。

#### 引用文献

1. Nagata T, Kobayashi N, Ishii J, Shinagawa S, Nakayama R, Shibata N, Kuerban B, Ohnuma T, Kondo K, Arai H, Yamada H, Nakayama K. Association between DNA Methylation of the BDNF Promoter Region and Clinical Presentation in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2015 Mar 4;5(1):64-73. doi: 10.1159/000375367. eCollection 2015 Jan-Apr.

#### 5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 7 件)

\_\_\_\_ Nagata T, Kobayashi N, Shinagawa S, Yamada H, Kondo K, Nakayama K. Plasma BDNF levels are correlated with aggressiveness in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *J Neural Transm*. 査読有 2014; 121(4): 433-441. doi: 10.1007/s00702-013-1121-y.

Tagai K, Nagata T, Shinagawa S, Nemoto K, Inamura K, Tsuno N, Nakayama K. Correlation between both morphologic and functional changes and anxiety in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 査読有 2014; 38(3-4): 153-60. doi: 10.1159/000358822.

Inamura K, Tsuno N, Shinagawa S, Nagata T, Tagai K, Nakayama K. Correlation between cognition and symptomatic severity in patients with late-life somatoform disorders. *Aging Ment Health*. 査読有 2015; 19(2): 169-74. doi: 10.1080/13607863.2014.920297.

Inamura K, Shinagawa S, Nagata T, Tagai K, Nukariya K, Nakayama K. Cognitive Dysfunction in Patients With Late-Life Somatic Symptom Disorder: A Comparison According to Disease Severity. *Psychosomatics*. 査読有 2014 Oct 8. pii:S0033-3182(14)00164-9.doi:10.1016/j.psym.2014.10.004.

Nagata T, Kobayashi N, Ishii J, Shinagawa S, Nakayama R, Shibata N, Kuerban B, Ohnuma T, Kondo K, Arai H, Yamada H, Nakayama K. Association between DNA Methylation of the BDNF Promoter Region and Clinical Presentation in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 査読有 2015 Mar 4;5(1):64-73. doi: 10.1159/000375367. eCollection 2015 Jan-Apr.

Kawai E, Shibata N, Nagata T, Shinagawa S, Tgai K, Ohnuma T, Shimazaki H, Toda A, Kasanuki K, Takayama T, Suzuki A, Nakayama K, Yamada H, Arai H. Genetic Association Between KIBRA Polymorphism and Alzheimer's Disease with in a Japanese Population. *Neuromolecular Med*. 査

読有 2015 Jun;17(2):170-7. doi: 10.1007/s12017-015-8348-8. Epub 2015 Mar 24.

Shibata N, Nagata T, Tagai K, Shinagawa S, Ohnuma T, Kawai E, Kasanuki K, Shimazaki H, Toda A, Tagata Y, Nakada T, Nakayama K, Yamada H, Arai H. Association between the catechol-O-methyltransferase polymorphism Val158Met and Alzheimer's disease in a Japanese population. *Int J Geriatr Psychiatry*. 査読有 2014 Dec 9. doi: 10.1002/gps.4237.

#### 〔学会発表〕(計 1 件)

永田智行、品川俊一郎、Bolati Kuerban, 柴田展人, 大沼 徹, 新井平伊、中山和彦、山田尚、「アルツハイマー病における APOE ε4 保有と認知機能の関連性；年齢依存的な認知機能への影響」, 第 29 回日本老年精神医学会、平成 26 年 6 月 12 日、東京

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

永田智行 (NAGATA, Tomoyuki)  
東京慈恵会医科大学 精神医学講座 助教  
研究者番号：00408428

##### (2)研究協力者

品川俊一郎 (SHINAGAWA Shunichiro)  
東京慈恵会医科大学精神医学講座 助教  
研究者番号：90459628

小林伸行 (KOBAYASHI Nobuyuki)  
東京慈恵会医科大学ウイルス学講座 助教  
研究者番号：20385321

山田尚 (YAMADA Hisashi)  
東京慈恵会医科大学総合医科学研究所 教授  
研究者番号：20130213

中山和彦 (NAKAYAMA Kazuhiko)  
東京慈恵会医科大学精神医学講座 教授  
研究者番号：70155878