

研究報告書

「気分障害患者脳試料におけるシトシン修飾状態の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 岩本 和也

1. 研究のねらい

気分障害である双極性障害(躁うつ病)や統合失調症は、民族集団、地域、時代を問わずそれぞれ約 100 人に 1 人が罹患する重篤な精神疾患です。双極性障害では躁状態と鬱状態を繰り返し、統合失調症では幻覚・妄想を主体とする陽性症状、感情鈍麻などを呈する陰性症状並びに認知・思考障害を主症状とします。両疾患とも思春期前後に好発期があり、遺伝と環境の複雑な相互作用によって発症に至ると考えられています。現在までに多くの遺伝学研究が行われてきましたが、確実な原因遺伝子の同定には至っていません。また、近年行われている大規模なゲノムワイド関連研究では、オッズ比が 1.2 程度の遺伝因子が多数同定されているものの、疾患に確実に関与する因子の同定には成功していません。

エピジェネティクスとは、塩基配列の変化を伴わずゲノムにコードされている情報に変質する現象を指します。DNA やヒストン蛋白質の修飾状態の変動などが含まれますが、多くの場合、細胞や組織における長期的な遺伝子発現の変動を伴います。双極性障害や統合失調症では、一卵性双生児の発症一致率が 60%程度であり非常に高いレベルにあるものの完全に一致しないことが知られています。これは環境要因の作用結果だと考えられていますが、分子レベルではエピジェネティクスの概念で説明できると考えられます。本研究課題では双極性障害の死後脳や末梢組織を用いたエピゲノム解析を行い、病因・病態を明らかにすることを目的とします。

2. 研究成果

(1)概要

死後脳を用いた解析では、米国スタンレー財団より提供された前頭葉凍結試料を用いて解析を行っています。脳試料はニューロンやグリア細胞など多様な細胞群で構成されています。異なる種類の細胞は異なるエピゲノム状態を示すことが知られており、脳全体を用いてエピゲノム解析を行うと、得られたエピゲノム情報の変動が細胞種の構成比の状態を反映してしまう可能性があります。そこで我々は、神経細胞核でのみ発現する蛋白を指標にセルソーターを用い、脳試料を神経細胞核と非神経細胞核に分画する実験系を確立しました。それぞれの分画から抽出した DNA を用いて網羅的 DNA メチル化解析を行い、ゲノム上のメチル化変異領域の同定を行っています。末梢血を用いた解析では、網羅的メチル化解析に加え BDNF、セロトニントランスポーター遺伝子といった神経機能に重要な遺伝子に着目した候補遺伝子解析を行っています。脳組織における解析ではゲノム全体としては低メチル化になる変化を、末梢血における解析では解析した候補遺伝子で高メチル化を示すことを見出しています。また、薬剤投与の効果を検討するため、主に培養細胞を用いた検討を行いました。

以上のようなゲノムの修飾状態を調べる研究に加えて、統合失調症患者神経細胞でトランスポゾンLINE-1の過挿入がおきていることを見出し、精神疾患患者では脳神経系ゲノムの配列自体に変化が生じていることを明らかにしました。トランスポゾンはゲノムの中を飛び回ることができる可動性因子であり、ヒトゲノムの約半分はトランスポゾン関連の配列で構成されることが知られています。トランスポゾンの中でもLINE-1と呼ばれるトランスポゾンは現在の人間でも転移活性を保っていることが知られています。LINE-1配列の過挿入は神経機能に重要な遺伝子に起きており、統合失調症の病態と密接に関係していることが示唆されました。また、細胞・動物モデルを用いた研究により、過挿入は遺伝要因と環境要因どちらの要因によっても生じることを明らかにしました。環境要因の検討には、妊娠マウスにウイルス感染を模した2本鎖RNAアナログであるpoly(I:C)を投与するモデルを用いました。この動物モデルでは、産まれてきた仔マウスは生後統合失調症様の症状を呈することが知られています。仔マウスにおいてもLINE1の過挿入が認められたことから、妊娠期の母体環境が仔の脳神経系細胞のゲノム構成に影響を持つことが示唆されました。

(2) 詳細

1) 双極性障害患者死後脳 DNA メチル化状態の解析

本研究開始前に神経細胞核マーカーNeuNを用いたセルソーティングにより神経細胞、非神経細胞を分離し、プロモータータイリングアレイによる解析を行っている。詳細なデータ解析を行い、双極性障害患者神経細胞・非神経細胞におけるメチル化変異部位を同定した。また、双極性障害患者神経細胞において顕著な低メチル化傾向を認めており、同様に既已取得済みの遺伝子発現データとの参照により、これらの領域での遺伝子発現量増加を認めた。

2) 1塩基レベルでのDNAメチル化状態の解析

健常者神経細胞、非神経細胞における全ゲノムバイサルファイト解析を行い、得られたデータの解析を行った。細胞種特異的なDNAメチル化状態について明らかにすると共に、神経細胞における非CpG部位のメチル化状態についての解析を行った。また、双極性障害(N=5)および健常者死後脳(N=5)についてreduced representation bisulfite sequencing法による解析を行い、DNAメチル化状態に差異のある領域の同定を行った。これらのメチル化データはマイクログラムオーダーのDNAを用いた検討を行っており、微量DNAでのデータ取得の際のreferenceデータとして活用する。微量DNAでの検討は当初、市販キットを用いて行っていたが、九州大学伊藤隆司先生との共同研究によるPBAT法での解析に切り替えており、多数検体でのデータ取得中である。

3) ハイドロキシメチル化状態の解析

健常者神経細胞、非神経細胞において、グルコシル化によりハイドロキシメチルシトシン(hmc)の修飾を行い、Chip-Seqに類する手法によりhmcを含むDNA断片を濃縮、次世代シーケンサーを用いた解析を行った。GeneOntology解析などによりhmcが濃縮されている遺伝子領域の同定を行った。また、最近開発された酸化バイサルファイト法により1塩基レベルでのhmc解析を行い、オリゴデンドロサイト転写因子SOX10について詳細なhmc解析を行った。現行では微量DNAでの検討が困難であることから、代表的なサンプル群について酸化バ

イサルファイト法を用いて解析を行っていく予定である。

4) 投薬効果の検証

解析に用いた患者群が実際に服薬していた気分安定薬(リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン)について、DNA メチル化に与える影響を検討するため、ヒト神経系細胞株 SK-N-SH を気分安定薬存在下で培養し、DNA メチル化に与える影響を検討した。Illumina HumanMethylation platform を用いた網羅的解析からはリチウムによるメチル化変化量が最も大きく、リチウムによって誘導されたメチル化変化の中に、他の2剤による変化の大部分が含まれていた。また、プロモータータイリングアレイによる検討を行ったところ、死後脳で認められたメチル化変動の約 20%程度が気分安定薬投与によって変動しうることを明らかにした。

5) 抹消血試料での検討

先行研究により気分障害患者死後脳・培養リンパ芽球においてセロトニントランスポーター SLC6A4 のメチル化変化を同定している。疾患特異性を検討するため、統合失調症患者末梢血での検討を行ったところ、気分障害患者と同様のメチル化変化が認められた。また、多施設大規模研究により、気分障害患者末梢血を用いた検討を行ったところ、先行研究の追試ができた。これらの結果により、精神疾患に共通するメチル化変化が末梢血試料で検出できることが示唆された。

6) トランスポゾン LINE-1 配列のコピー数の検討

精神疾患患者死後脳前頭葉および肝臓から抽出したゲノム DNA 中の LINE-1 量を qPCR により定量比較したところ、患者群で有意な上昇が認められた。特に顕著な上昇が認められた統合失調症群について、独立した死後脳セットを用い、神経細胞と非神経細胞に分離した後、神経細胞のゲノムコピー数定量を行ったところ有意な上昇が再現された。

コピー数増大の背景を探るために、polyI:C 投与動物モデルから産まれた仔マウス、およびマカク新生児に対して EGF を連続投与したモデルについて、LINE-1 コピー数を検討したところ、これらの動物モデルでもコピー数の増加が認められた。また、染色体 22q11 領域を欠失し、統合失調症を併発している患者から樹立した iPS 細胞を神経細胞に誘導後、コピー数の測定を行ったところやはり有意な増大が認められた。

LINE-1 の新規挿入部位を探索するため、健常者・患者各 3 名の前頭葉および肝臓ゲノム DNA について全ゲノム解析を行った。脳特異的挿入箇所を同定後、GeneOntology 解析を行うと、患者側ではシナプス関連遺伝子や統合失調症に以前から関連が疑われている遺伝子群に新規挿入が認められた。これらの結果により、妊娠期の母体環境などの環境要因や 22q11 欠失のような強い遺伝的負因を持つ場合に LINE-1 のコピー数が増大し、神経機能に重要な遺伝子に影響を与えることが示唆された。

3. 今後の展開

本研究課題によって、環境要因によって生じる脳神経系のエピゲノムやゲノム構成が変化し、各人個別の遺伝的背景と合わせて、双極性障害や統合失調症発症の閾値や病態に影響を与えていると考えられました。今後は脳神経系ゲノムにおけるエピジェネティクス制御機構やゲノムの動的な側面について、さらに詳細に検討を行って行きたいと考えています。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

脳神経系でのシトシン修飾状態が予想をはるかに超えて複雑であり、未だ全体像が明らかにされていないこと、また、DNA 修飾状態の解析手法が日進月歩で進んでいることなどから、今後も新しい現象を最新の技術で再解析していく必要があると考えています。そのような中で、本研究課題では、脳神経系ゲノムのエピゲノムおよびゲノム配列自体が、環境要因によって変動を受け、疾患と関連していることを明らかにしてきました。これまで疫学研究で確立されてきた環境要因について、トランスポゾン動態やメチル化状態を指標として、環境要因の作用機構を分子レベルで検証できることを示せたことから、研究開始時の課題設定を大きく超えた研究成果を得ることができたと考えています。本研究課題で得られたデータにより、病因の根本理解と新たな創薬戦略につながる研究が今後展開できると考えています。また、将来的には末梢血由来試料を用いた診断マーカーの開発を進めていきたいと考えていきます。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

気分障害患者から神経細胞核を分離し DNA メチル化解析を行った結果、脳組織における解析ではゲノム全体として低メチル化になる変化を見出している。抹消血解析では候補遺伝子のプロモーター領域での高メチル化を見出している。また、統合失調症患者の神経細胞で、レトロトランスポゾンである LINE-1 の過挿入が起きていることを見出した。LINE-1 の挿入は神経機能に重要な遺伝子に起きており、統合失調症と密接に関係していることが示唆された。細胞・動物モデルを用いた研究により、過挿入は遺伝要因と環境要因によって起ることを明らかにした。統合失調症によるL1コピー数の増加は興味深い発見であるが、疑問もたくさん残っており、今後多角的にモデルを検証するなど慎重で着実な展開を期待したい。なお、当初計画の気分障害患者のゲノムワイドなメチローム解析は腰を据えてしっかり進めて欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H,

Yoshikawa T, Kato T, <u>Iwamoto K</u> . Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. <i>Neuron</i> 2014,81:306–313.
2. Hayashi-Takagi A, Vawter MP, <u>Iwamoto K</u> . Peripheral biomarkers revisited: integrative profiling of peripheral samples for psychiatric research. <i>Biological Psychiatry</i> 2014,75:920–928.
3. Asai T, Bundo M, Sugawara H, Sunaga F, Ueda J, Tanaka G, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, <u>Iwamoto K</u> . Effect of mood stabilizers on DNA methylation in human neuroblastoma cells. <i>International Journal of Neuropsychopharmacology</i> 2013,16:2285–2294.
4. Nishioka M, Bundo M, Kasai K, <u>Iwamoto K</u> . DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. <i>Genome Medicine</i> 2012,4:96.
5. Bundo M, Sunaga F, Ueda J, Kasai K, Kato T, <u>Iwamoto K</u> . A systematic evaluation of whole genome amplification of bisulfite-modified DNA. <i>Clinical Epigenetics</i> 2012,4:22.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

プレスリリース

- ・ 2014年1月3日 Bundo M et al., *Neuron* 2014,81:306–313. 「統合失調症患者の神経細胞でレトロトランスポゾン配列が増大」
http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press_archives/20140102.html

(掲載誌)

Nature, Science, Nature Medicine, Scientific American, Schizophrenia Research Forum, The Scientist, SfN Neuroscience news, Faculty of 1000, マイナビニュース, 日経プレスリリース, QLifePro 医療ニュース, The Brain & Behavior Research Foundation Discoveries, RIKEN Research Highlights, 日経産業新聞, ルモンド(仏), 共同通信社による配信(埼玉新聞、神戸新聞、山梨日日新聞、福井新聞、信濃毎日新聞、熊本日日新聞、岐阜新聞、中国新聞、山形新聞、千葉日報、福島民報など)