

アルツハイマー病早期診断を実現する血中 DNA メチル化マーカーの網羅的探索 (29-20)

主任研究者 下田 修義 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部（室長）

研究要旨

3年間全体について

認知機能正常者とアルツハイマー病(AD)との臨床診断を受けた患者の血液 DNA の DNA メチル化をマイクロアレイに基づく手法、および次世代シーケンスに基づく手法の二つの手法を用いゲノムワイドの比較をして、AD 発症の早期マーカーに利用できるメチル化異常部位の同定を目指した。マイクロアレイを用いた初年度のスクリーニングでは、メチル化レベルが認知機能と逆相関する二つの遺伝子座 *EHD1* (Eps15-homology domain-containing protein1)と *NRM*(nurim)を見出した。これらのメチル化レベルと *APOE*の遺伝子多型を併せると診断指標の AUC=0.83 という良好な値を得ることができた。一方、次年度に行った次世代シーケンスに基づく手法からは 100 のメチル化マーカー候補を得ることができ、最終年度はそのマーカー候補のバリデーションを進めた。またメチル化異常がどのような結果を引き起こすのかについて、ゼブラフィッシュをモデルとして解析を進め、その結果、遺伝子内部の低メチル化が転写産物の量及び integrity の双方に影響することがわかり、AD 発症機序についての示唆を得た。

2019年度について

2018年度に同定した、健常者とAD患者血液でメチル化レベルに差の見られるおよそ100のメチル化差異領域 (Differentially methylated region; DMR)の候補を見出したが、サンプルサイズが小さいためにその中には両グループでメチル化レベルがたまたま偏っていた領域も含まれている可能性があった。そこで、新たに健常者48人、AD患者48人のサンプルを用意してバリデーションするための準備をした。上記100DMRを精査する過程で、メチル化差異領域の一つとして含まれていた *CFAP74*(*cilia and flagella associated protein 74*)という遺伝子内の DMR が実は DNA の構造多型が誤って DMR としてアノテーションされていたこと、さらにその構造多型を持つ領域がハプロタイプを形成しており、そのハプロタイプがアミロイドーシスと関連を示すこと、しかしながらそのハプロタイプは臨床診断ADとは関連がないことを突き止めた。

ゼブラフィッシュの *Dnmt3bb.2* の標的候補遺伝子 *angptl1b* については、*dnmt3bb.2* 変異体胚においてその発現量がステージによっては 100 倍以上亢進すること、また転写開始点が正規の部位ではなく、遺伝子内部からの異常なスタートが起こることを見出した。

2018年度について

二年度目はマイクロアレイに代わり次世代シーケンスを利用することで、網羅性とメチル化レベル測定精度を高めた上で、再度、ゲノムワイドでより優れたメチル化マーカーを探索した。スクリーニングには認知機能正常で PiB-PET が陰性の 12 人と臨床診断 AD で PiB-PET 陽性の 12 人の、計 24 人の血液 DNA を用いた。その結果、100 の遺伝子座において AD 患者における DNA メチル化の変動が認められた。

また DNA のメチル化変動が遺伝子発現にもたらす影響を明らかにするためゼブラフィッシュのメチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb.2* 変異体のオミクス解析（遺伝子発現解析及び全ゲノムメチル化解析）を平行して行った。そしてアンジオポイエチン様 1b 遺伝子(*angptl1b*) を *Dnmt3bb.2* の機能的標的遺伝子の有力候補として同定した。

2017年度について

健常者と AD 患者の血液 DNA におけるメチル化差異領域をゲノムワイドで探索するため、初年度は DNA メチル化解析用マイクロアレイを利用し、*EDH1* と *NRM* という二つの遺伝子においてメチル化レベルの差があることを見出した。これらのマーカーに *APOE* のジェノタイプ情報を加えることで診断指標 AUC において 0.83 という良好な値が得られた。また DNA のメチル化変動が遺伝子発現にもたらす影響及びそのメカニズムを明らかにするため、ゼブラフィッシュをモデル生物としてメチル化酵素遺伝子変異体のオミクス解析の準備を平行して行った。

主任研究者

下田 修義 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部（室長）

分担研究者

なし

研究期間 2017年4月1日～2020年3月31日

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)患者が治療薬を発症早期に服用できるよう、また将来開発が期待されるアルツハイマー病抑制薬を有効に利用するためにも、ADの発症リスクを低侵襲かつ低コストで知り得る体制を整えることが望まれている。これまでに髄液からA β やリン酸化タウを初めとするAD発症マーカーが見出されており、また脳のPET画像解析によるAD診断法も開発されているが、それぞれ侵襲性や診察費用の問題から一般に普及しているとは言いがたい。したがってより手軽かつ安価にAD発症予測のできるマーカーおよび手法が望まれている。研究代表者は、アルツハイマー病最大のリスクファクターが加齢であることから、発症前診断のためのマーカーとして、最近ヒトの加齢マーカーとして注目されているDNAのメチル化に着目し、これまでにAD患者の血中で低メチル化を示す3つのAD関連遺伝子を同定した。このメチル化異常は廉価での検出が可能で、採血の侵襲性は低いことから心理的な負担も軽い。そこで本研究課題ではこれまでの研究成果に基づき、血中DNAのメチル化を利用したローコストのアルツハイマー病低侵襲性早期診断法の開発を目指す。またメチル化異常は遺伝子の発現に影響するとされているが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。そこで基本的にヒトと同じ遺伝子メチル化パターンを持つゼブラフィッシュをモデル生物として、そのメチル化酵素遺伝子をゲノム編集技術でノックダウンすることで、DNAメチル化の変動が遺伝子発現に与える影響を解明する。

B. 研究方法

3年間全体について

血中DNAからADに関連するメチル化マーカーを網羅的に探索するに当たり、2種類の方法を採用した。初めはヒトゲノムのメチル化レベル測定用に開発されたマイクロアレイによるスクリーニング(2017年度)で、次いでこれもヒトゲノムメチル化解析用に開発され

た次世代シーケンスに基づくスクリーニング(2018, 2019年度)である。その理由は、前者のマイクロレイ法には疑陽性が頻出したためである。偽陽性の原因はおそらく DNA 多型を主因とする、アレイプローブのハイブリダイゼーションミスによると考えられた。疑陽性の中から真のメチル化異常を検出するために、神経心理テスト(Mini Mental State Examination; MMSE)のスコアと相関を示すメチル化部位を選んだ。後者は前者の7倍以上のメチル化受容部位についてメチル化レベルを調べることができるため、より網羅性に優れている。さらに直接メチル化レベルを塩基配列から決定できるため、DNA 多型の影響を受けないという長所があるが、高コストのため、サンプルサイズが小さくなった。そのため見出されたメチル化差異部位 (DMR) には偶然の偏りによるものが含まれると見込まれ、こちらも別検体による DMR の確認を行った。

DMR が遺伝子発現に及ぼす影響を解析するために、ゼブラフィッシュのメチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb* をゲノム編集技術で破壊し、メチローム解析及びトランスクリプトーム解析をそれぞれ全ゲノムバイサルファイトシーケンス(whole genome bisulfite sequencing; WGBS)及びマイクロレイ法により行った。続いて、*Dnmt3bb* の標的候補遺伝子 *angpt11b* の発現解析を発現量については定量的 PCR 法、発現開始点については 5'RACE 法により行った。血管形成異常の機序を解明するため、いくつかの血管形成初期マーカーの発現解析を whole mount *in situ* hybridization を行った。

2019年度について

- 1) 認知機能正常者血液 DNA と AD 患者血液 DNA に見られた DNA メチル化差異領域 (differentially methylated region; 以下、DMR と略す)のバリデーション:

2018年度に得られた100箇所の DMR 候補のバリデーションをするため、新たに、臨床診断 AD48人、認知機能正常高齢者48人、合計96人分の血液 DNA をバイオバンクより入手し、バイサルファイト処理後、上記100領域の各領域に対して単独もしくは複数ペアのプライマーを設計した。プライマーデザインには web ツール MethPrimer を利用した。合成した142プライマーペアをそれぞれ96検体に対して PCR 増幅した。すべての PCR 産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、非特異的増幅産物を生じたプライマーについてはプライマーを再設計、また増幅が見られなかった検体については再度バイサルファイト処理を行うなどして、最終的に全検体から特異的増幅産物が得られるようにした。

- 2) DNA メチル化酵素 *dnmt3bb.2* 変異体胚の表現型解析および *Dnmt3bb.2* 標的候補遺伝子 *angpt11b* の解析

ゼブラフィッシュの *dnmt3bb.2* 変異体胚の血管形態異常を、血管内皮細胞で GFP

を発現する *kdr1-GFP* トランスジェニックフィッシュ(Tg)を利用して解析した。具体的にはまず *dnmt3bb.2* ホモ変異体♀と *kdr1-GFP* ♂を掛け合わせ、ダブルヘテロ個体を得、このダブルヘテロ個体♂に *dnmt3bb.2* ホモ変異体♀を掛け合わせ（アウトクロス）、そこから *dnmt3bb.2* ホモ変異体、*kdr1-GFP* ヘテロキャリア♂を同定し、その個体に再度、*dnmt3bb.2* ホモ変異体で維持し続けているラインのメスと掛け合わせた。このようにこれらの一連の交配時の♀には必ず *dnmt3bb.2* ホモ変異で継代している個体のメスを使用したが、これは母性の *Dnmt3bb.2* タンパク質と *dnmt3bb.2* mRNA の次世代への持ち込みを確実に排除するためであった。*dnmt3bb.2* 母性胚性変異体で観察された血管形成異常の機序を知るために、血管形成に関わることがすでに知られている各種遺伝子(*npas4l*, *lmo2*, *etv2*) の DIG 標識アンチセンス RNA プローブによるホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH)を行った。また *Dnmt3bb.2* の標的遺伝子候補として見つかった *angpt11b* のゲノム構造については最新のゼブラフィッシュのゲノム情報(ZRCz11)においても不完全であったため、その正確な構造をロングレンジの PCR を利用することで決定した。さらに *angpt11b* の発現量および転写開始点を野生型胚と *dnmt3bb.2* 母性胚性変異体の間で、それぞれ qPCR 法および 5'RACE 法により比較した。

2018年度について

1) 次世代シーケンスを利用した DNA メチル化差異領域(DMR)の探索 -

PiB-PET 情報付き血液 DNA サンプルを用いて：

健常者とアルツハイマー病患者の血中 DNA メチル化レベルを比較したときに差のある領域、DMR、を同定するために前年度はアレイ解析を行ったが、2018年度は DMR の探索を次世代シーケンスにより行った。具体的にはイルミナ社の

“TruSeq Methyl Capture EPIC Library Prep Kit” を使用して調整したテンプレートイルミナ社の HighSeq 2500 によりシーケンスした。このプラットフォームではヒトゲノムに存在するメチル化の標的部位、2,800 万カ所の CpG ジヌクレオチドのうち、原理的には 334 万カ所、10%強の部位のメチル化レベルを測定できる。また、同キットが解析対象とする CpG ジヌクレオチドは遺伝子領域に対して重点的に配置されているため、ほぼすべてのヒト遺伝子について、特にプロモーター領域についてはそのほぼ全域のメチル化レベルを高精度で知ることができる。さらにメチル化レベルをシーケンスにより測定するため、昨年度(2018年度)使用したハイブリダイゼーションに基づく DNA メチル化解析法よりも、より正確であるという利点がある。欠点としてはコストが高く、従って解析するサンプル数が限られるということである。そこで今回は、従来の臨床診断による健常者と AD 患者という二グループ間の比較ではなくて、PiB-PET 陰性の健常者 12

人と同陽性の AD 患者 12 人の血液 DNA の間で比較した。これはコントロールも AD 患者の双方ともアミロイド形成という項目で層別化することで、できるだけそれぞれのグループを均質化し、それによってより鋭敏な DMR 検出感度を実現し、小サンプルという制限を乗り越えようとしたためである。血液 DNA はバイオバンクから所定の手続きを経て入手し、平均年齢は健常者 73 歳、AD74 歳、男女比はやや差があり、健常者で男 2 名、女 10 名、AD 患者で男 4 名、女 8 名であった。“TruSeq Methyl Capture EPIC Library Prep Kit” の操作の概略は以下の通りである。

- I. 血液 DNA を個別に剪断化し、末端を平衡化した後、個人の特定のためのインデックスの付いたアダプターを連結する
- II. キットに付属のビオチンのついた標的プローブ（解析対象となる配列と相補的）とハイブリダイズする
- III. ストレプトアビジンビーズで標的ゲノム領域を回収
- IV. バイサルファイト処理後、PCR を低サイクルでかけることによりライブラリーを作製
- V. 次世代シーケンス

産生されたシーケンスデータはイルミナ社のクラウドに送り、メチル化解析用アプリケーション “MethylKit” を用いて DMR の検出を行った。

2) ゼブラフィッシュの DNA メチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb.2* 変異体のオミクス解析（トランスクリプトームやメチローム）の準備

DNA メチル化の異常が遺伝子発現や転写産物の構造に与える影響を明らかにするため、本研究課題開始前(2016 年度)に作製に成功したゼブラフィッシュメチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb.2* 変異体のオミクス解析を行った。野生型および母性胚性変異体の二日胚からトータル RNA およびゲノム DNA を精製し、トランスクリプトームのためにアジレント社のマイクロアレイを、一方、メチロームには PBAT 法*に基づく全ゲノムメチル化解析を行った。メチローム解析後は統計的手法を用いて、DMR の探索を行った。

*PBAT 法：九州大学で開発された、全ゲノムメチル化解析のためのライブラリーの作製法の一つ。少量のゲノムで全ゲノムメチル化解析ができるという特徴を持つ。

2017 年度（初年度）について

12人のAD患者及び健常者の血液DNAに対し、イルミナ社のヒトゲノムメチル化解析用アレイ、MethylationEPIC BeadChip（以下、EPICアレイ）を行いDMRの探索を行った。得られた候補DMRについてDMRとしての再現性を別のメチル化レベル測定法であるパイロシーケンス、及びバリデーション用血液サンプルにより確認した。また2016度に作製に成功したゼブラフィッシュのDNAメチル化酵素遺伝子変異体のオミクス解析（トランスクリプトームやメチローム）や変異体の表現型解析を行った。

1. DNAメチル化解析アレイ：イルミナ社のDNAメチル化解析用のマイクロアレイ（450kアレイ及びEPICアレイ）はヒトゲノムに存在する、それぞれおよそ45万および85万カ所のメチル化対象部位（CpGジヌクレオチド）のメチル化レベルを一度に測定できる。これらのプローブはほぼすべてのヒト遺伝子をカバーする。そこで平均年齢及び男女比をほぼそろえた健常者合計43人、及びAD患者合計46人の血液DNAをバイオバンクから入手し、バイサルファイト処理後、どちらかのアレイにハイブリダイズさせ、メチル化レベルに差のあるプローブを探索した。内訳は健常者23人、AD23人をサブグループ1として450kアレイに、残りの健常者20人、AD23人をサブグループ2としてEPICアレイに利用した。最終的なマーカープローブ2つを以下の4つの手順を経て得た。
 - I. サブグループ1のメチル化レベルと神経心理テストのデータ、MMSEスコア、との間のスピアマンの順位相関係数 r_s とその p 値を算出
 - II. p 値をBH法により補正し、 q 値 ≤ 0.05 を満たすプローブの抽出
 - III. ステップ2で抽出されたプローブのなかからサブグループ2において $|r_s| \geq 0.2$ もしくは $|r_s| \geq 0.4$ かつ r_s （グループ1） $\times r_s$ （グループ2） > 0 を示すプローブを選択
 - VI. プローブのマーカーとしての再現性を別のメチル化レベル測定法であるパイロシーケンス、及びバリデーション用血液サンプルにより確認

パイロシーケンス法についてはキアゲン社のPyromark 48を使用した。パイロシーケンス法においては通常のバイサルファイトPCR/クローニング法同様、ターゲット領域をPCRにより増幅するが、パイロシーケンス法ではどちらかのプライマーの5'末端をビオチン化しておき、PCR増幅後PCR産物の片側の鎖を精製した。そのDNA鎖にプライマーをハイブリさせ、一塩基伸長法によりターゲット部位のメチル化レベルを測定した。

2. ゼブラフィッシュのDNAメチル化酵素遺伝子変異体のオミクス解析（トランスクリプトームやメチローム）の準備

DNA メチル化の異常が遺伝子発現に与える影響とその作用機序を明らかにするため、2016 年度（本研究課題開始前）に作製に成功したゼブラフィッシュメチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb.2* 変異体の形態を実体顕微鏡下で観察した。またオミクス解析に必要な高純度の DNA/RNA 抽出を受精後野生型胚および *dnmt3bb.2* 変異体胚から行った。

（倫理面への配慮）

3 年間全体について

本研究にはヒト遺伝子解析研究が含まれる。したがって本研究は国立長寿医療研究センターの倫理・利益相反委員会での承認を得たうえで実施した。組み換え DNA 実験についても同機関の承認を受けた上で実施した。さらにゼブラフィッシュを用いた実験については動物実験倫理委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

3 年間全体について

認知機能正常者とアルツハイマー病(AD)との臨床診断を受けた患者の血液 DNA の DNA メチル化をゲノムワイドで比較して、AD 発症の早期マーカーに利用できるメチル化異常部位の同定を目指した。市販のメチル化解析用マイクロアレイを用いた初年度のスクリーニングではこれまで AD との関連が知られていなかった *EHD1* (Eps15-homology domain-containing protein1) と *NRM* (nurim) という二つの遺伝子のメチル化レベルが認知機能と逆相関することを見出し、これらのメチル化レベルと *APOE* の遺伝子多型を併せると診断指標の AUC=0.83 という良好な値を得ることができた。ただし上記のアレイには問題点があることが浮き彫りになり、次年度は開発されたばかりの、より高い精度のデータが得られると期待される手法を採用して、100 のマーカー候補を得ることができた。最終年度はそのマーカー候補のバリデーションをめざし、その最終ステップの直前まで進めることができた。本研究課題ではこのようにマーカー探索を主題としていたが、それと平行してメチル化異常がどのような結果を引き起こすのかについて、ゼブラフィッシュをモデルとして解析を進め、その結果、遺伝子内部の低メチル化が転写産物の integrity に影響し、結果として遺伝子機能を低下させることを突き止めた。

2019 年度について

1. 認知機能正常者血液 DNA と AD 患者血液 DNA に見られた DNA メチル化差異領域(differentially methylated region; 以下、DMR と略す)のバリデーション：
合計 100 メチル化差異候補領域に対し 142 プライマーペアを設計、バイサルファイト PCR を試みた結果、129 のプライマーペアがバリデーション用 96 検体すべ

てにおいて特異的増幅産物を生成することを確認した（成功率 91%）。これら 129PCR 産物を 96 の検体ごとにプールして次世代シーケンスのためのライブラリー作りを行う段階まで到達した。

2. ゼブラフィッシュの *dnmt3bb.2* 変異体胚（受精後 24 時間前後）では尾部静脈叢 (caudal vein plexus) が一過的であるが異常に膨らむ形態を示す。そこでこの血管形態異常を、血管内皮細胞で GFP を発現する *kdr1-GFP* トランスジェニックフィッシュ (Tg) を *dnmt3bb.2* 変異体に導入することにより解析した。その結果、尾部静脈叢特異的に野生型胚に比べ強い蛍光が認められ、この部位において血管内皮細胞の過増殖が生じていることがわかり、そのことから *angptl1b* タンパク質が血管内皮細胞の分化、あるいは増殖抑制に機能していることが示唆された。*angptl1b* タンパク質が発生のどのステージで機能しているのかを調べるため、*dnmt3bb.2* 変異体胚における血管形成の初期マーカーの発現解析を行った。まず、24 時間胚における血管内皮細胞の分化マーカーである *etv2* の WISH を行ったところ、異所的な発現は見られなかったものの、主要発現部位の一つである尾部静脈叢での発現が上昇していた。そこで血管内皮細胞のもととなる血管芽細胞の分化マーカーである *naps4l*, *lmo2* の二つの遺伝子発現を 6 体節期において WISH したところ、これらの遺伝子発現も上昇していた。

次に低メチル化が *angptl1b* の遺伝子発現に与える影響を調べた。まず *angptl1b* の正常な転写開始点を同定するため、野生型胚から抽出した mRNA を基質として 5'RACE を行った。その結果、受精後 25 時間と 50 時間では転写開始点に違いがあり、異なるアイソフォームが生産されること、その結果、受精後 25 時間の予想 *angptl1b* 産物は 50 時間のそれよりも N 末端が 32 アミノ酸長くなることが判明した。一方、*dnmt3bb.2* 変異体胚由来の 5'RACE 産物がアガロースゲル電気泳動で特定のバンドを与えず、転写開始点が定まっていないことが明らかになった。*dnmt3bb.2* 変異体胚での *angptl1b* 5'RACE 産物をクローニングした結果、*angptl1b* の転写の多くが第二エキソンの、野生型胚ではタンパク質をコードしている領域からスタートしており、正常な *angptl1b* タンパク質を作れないことが明らかになった。

次に *angptl1b* の発現量を定量的 PCR 法により解析した結果、*dnmt3bb.2* 変異体胚では野生型胚と比較して著しく発現量が上昇していることがわかった。とりわけ受精後 23 時間胚では 100 倍以上亢進していた。

2018年度について

1. 次世代シーケンスによる血中 DNA メチル化差異領域(differentially methylated region: DMR)の探索

2018年度は PiB-PET の陰、陽でそれぞれ層別化された健常者 12 人および AD12 人の血液 DNA のグループ間で 3,233,016 カ所の CpG 部位を比較した。使用したキットでは原理的には最高 334 万カ所の CpG 部位がメチル化レベル測定の対象となるので、そのうちの 97%が比較可能であったということになり、上記解析が問題なく進められたものと考えられる。

本研究では健常者と AD を比較して、メチル化平均値に 15%以上($\Delta B \geq 15\%$)と比較的大きな差のある CpG 部位をメチル化差異部位(differentially methylated position; 以下“DMP”と表す)と設定した。そしてこのような DMP を 10,381 カ所同定した。DMP は AD で低メチル化、あるいは逆に高メチル化の 2 パターンがある。染色体ごとの DMP パターンを調べると、染色体による極端な差は見られず、ほとんどの染色体において AD での低メチル化が優勢で、全体では 62%の DMP が AD で低メチル化傾向を示すことが明らかになった。

次に DMP の位置をゲノムの機能部位に分けてその分布を調べた。まず CpG アイランド (遺伝子上流に存在する CpG ジヌクレオチドが多く存在する領域のことで、その多くはプロモーター領域と重なる)、もしくはその周辺(CpG island shore)、あるいはそれ以外、という 3 カテゴリーで分類すると、それぞれに DMP が 14%、8%、78%と存在した。遺伝子の視点では、DMP の位置はイントロン内が最も多く 44%、次いで遺伝子間が 41%、プロモーター領域とエキソンがそれぞれ 7%および 8%であった。

これまでの DNA メチル化の研究から、単独の DMP が生物学的に何らかの意味を持つ例はほとんどなく、DMP が局所的に集積して生じる DMR(differentially methylated region)が重要であると認識されている。そこでこの DMR を AD のマーカーおよび AD 発症関連遺伝子の探索に利用することを考えた。DMR には厳密な定義や同定のための定法はなく、今回私は以下の条件を満たす領域を DMR と見なした。まず、ひとつの $\Delta B \geq 15\%$ DMP を起点としてそこから 1kb の範囲に、同じく $\Delta B \geq 15\%$ の DMP が他に最低でも 2 つ存在すること。次いでその領域からその 1kb の枠 (ウィンドウ) を染色体上でスライドさせていったときに 1kb 以内に別の $\Delta B \geq 15\%$ DMP が存在し、かつ、その新 DMP と先の DMP の一部との合計が 3 つ以上となること。さらにそれが最低もう一度繰り返されることである(結果として $|\Delta B| \geq 15\%$ 以上の CpG サイトを最長 3kb 以内に 5 つ以上含む領域となる)。このようにして最終的に 100 カ所の DMR を同定できた。最後にそれぞれの DMR についてメチル化レベルと染色体位置情報を合わせて可視化できる IGV(integrated genome viewer)というソフトウェアを使い確認した。

これら 100DMR のうちの 16DMR においては $|\Delta B| \geq 25\%$ 以上という大きな差が見られた。また 62DMR は遺伝子領域に存在した。

2. ゼブラフィッシュの DNA メチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb.2* 変異体のオミクス解析 (ト

ランスクリプトームとメチローム)

ゲノム編集技術により作製したゼブラフィッシュの DNA メチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb.2* 変異 (8 bp の欠損変異 ; 48 bp) の *dnmt3bb.2* ホモ変異体 (48 bp/48 bp) は発生段階において顕著な異常は見られず、性成熟し、次世代を得ることができた。ところがその次世代の *dnmt3bb.2* ホモ変異体同士 (♂ 48 bp/48 bp × ♀ 48 bp/48 bp) を掛け合わせたところ、受精後 24 時間くらいに一過的に尾部の主静脈が異常に膨らむという表現型を示し、シビアな表現型を示す胚は致死だった。この結果は、母性の(卵母細胞に蓄えられた) *Dnmt3bb.2* 蛋白質もしくは *dnmt3bb.2* mRNA、あるいはその双方が DNA メチル化を介して血管系の細胞分化・増殖に関与する遺伝子発現に関与していることを示唆した。

この変異体における DNA メチル化異常を検出するために、受精後 48 時間の野生型胚および *dnmt3bb.2* 変異体胚 (48 bp/48 bp × 48 bp/48 bp 由来) からゲノム DNA を抽出し、全ゲノムメチル化解析 (whole genome bisulfite sequence; WGBS) を行った。その結果、およそ 80 カ所の DMR を同定できた。また *dnmt3bb.2* 変異体胚でのメチル化異常の結果として生じる遺伝子発現異常を見いだすため、野生型および母性胚性変異体それぞれの胚発生における 5 つの段階 (1-2 細胞期、シールド期、5 体節期、24 時間胚、48 時間胚) からトータル RNA を抽出、精製し、マイクロアレイによる発現解析を行った。一般に DNA メチル化レベルと遺伝子の発現は負の相関が見られる。そこで上記 80 の DMR と変異体胚で発現が上昇する遺伝子をつきあわせたところ 4 つの遺伝子が *Dnmt3bb.2* タンパク質の標的遺伝子候補として浮かび上がり、そのうちの一つに血管形成に関与する遺伝子、アンジオポイエチン様 1b 遺伝子 (*angpt11b*) が見つかった。

2017年度について

3. AD マーカープローブの抽出

2017 年度使用した 450k アレイと EPIC アレイ (850k) にはそれぞれ、45 万、85 万プローブがヒトゲノムメチル化部位 (CpG ジヌクレオチド) に対して搭載されていたが、それぞれのアレイが独自のプローブを持つわけではなく、後発の EPIC アレイにはすでに 450k アレイに搭載されていたプローブが半分と、新たなプローブが残りの半分で占めている。これらのアレイを用いた解析にはこれまで他の研究者による報告から、バッチエフェクト (おそらく製造されたアレイや使用する試薬のロット、加えて実施する研究者により、アレイ単位で生じる値のブレ) や個々のプローブのデザインに起因するにプローブ単位での結果のばらつきの問題がつきまとうことが知られていた。実際、我々が健常者 12 人、AD 12 人の小規模サンプルを 450k 単独で解析して得られたいくつかのマーカー候補プローブは、その後のバリデーションの結果、健常者/AD 間での差が消失してしまった。

この再現性の問題を克服するため、我々は 450k アレイと EPIC アレイという異なるプラットフォームでかつ異なるオペレーターによる試行でも再現性のとれる、頑強 (robust) なマーカーをスクリーニングすることにした。まず解析対象とするプローブは 450k アレイと EPIC アレイで共通に搭載される 445,454 個のプローブとした。これにより各プラットフォームのデザインや、試薬、実験操作に起因する実験誤差を乗り越えるマーカーが得られることを期待した。再現性の問題を克服するためのもう一つのアイデアはメチル化レベルと認知レベルとの間の相関をスクリーニングの指標に加えたことである。おそらくはプローブ内に存在する DNA の一塩基多型(SNP)に起因すると予想しているが、メチル化レベルの差が有意差であったプローブの中には健常者群あるいは AD 群のどちらかの一部にメチル化レベルが極端に異なる、少数のサンプルが含まれていることがあり、そのような場合は再現性がとれなかった。そこでこのようなプローブを除外するための一つの方策として、メチル化レベルと認知レベルの間に弱くてもよいから有意な相関が見られること、という指標を導入した。これにより、メチル化値にブレが生じやすいマーカーを除外する効果とともに、AD のサロゲートマーカーとして利用できるマーカーを抽出できる可能性を期待した。そこで上記、サブグループ 1 の検体について 450k アレイにかけ、メチル化レベルと MMSE 値に相関を示すマーカーを選抜し、まず 482 プローブがマーカー候補プローブとして得られた。次に、これらのプローブについて、サブグループ 2 の検体を EPIC アレイにかけた結果を抽出し、EPIC アレイでもメチル化レベルと MMSE 値が相関を示したプローブのうち弱い相関を示したもの、あるいは中程度の相関を示すプローブとして、それぞれ 93 個及び 6 個のプローブを得た。そしてこの後者がもっとも有望であると考え、6 個のプローブについてパイロシーケンス法によるバリデーションを行った結果、2 個のプローブについて再現性が得られた。これらのプローブは一つが *nurim* (NRM)、もう一つが *EHD1* という遺伝子に存在していた。*nurim* は核膜に存在し、アポトーシスの抑制に機能するという報告があるが、これまでのところ AD との関連は報告されていない。一方、*EHD1* はエンドサイトーシスのリサイクリングに関わり、A β 蛋白質及び BACE1 と海馬の苔状繊維末端に共局在することから、アルツハイマー病との関連が示唆されている。

nurim と *EHD1* という二つの遺伝子のメチル化レベルが AD の判別マーカーとしてどの程度役に立つのかを以下の三通りの組み合わせによるロジスティック回帰分析で検証した。すなわち 1) 二つのメチル化マーカーの組み合わせのみ、2) *APOE* のジェノタイプのみ、3) 二つのメチル化マーカーと *APOE* のジェノタイプという三つの情報の組み合わせ、である。その結果、1) は AUC=0.697 で、上記の二つのメチル化マーカーだけでは判別率は不十分であることがわかった。むしろ 2) の *APOE* 遺伝子型単独の方が AUC=0.754 と優れていた。一方、1) と 2) のマーカーを合わせた 3) では AUC=0.823 という良好な値が得られた。この 2) と 3) の AUC の差は $p<0.01$

と有意であった。

4. ゼブラフィッシュの DNA メチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb.2* 変異体のオミクス解析 (トランスクリプトームやメチローム) の準備

ゲノム編集技術により作製したゼブラフィッシュの DNA メチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb.2* 変異 (8 bp の欠損変異 ; 48 bp) と野生型(+/+)とのヘテロ接合体(+/48bp) 同士の掛け合わせから産まれた *dnmt3bb.2* ホモ変異体(48 bp/48 bp)は発生段階において異常は見られず、性成熟し、次世代を得ることができた。ところがその次世代の *dnmt3bb.2* ホモ変異体同士(48 bp/48 bp×48 bp/48 bp)を掛け合わせたところ、一部の胚において赤血球の出現が遅れ、尾部の主静脈および心膜が異常に膨らむという表現型を示し、シビアな表現型を示す胚は致死だった。この結果は、母性の(卵母細胞にあらかじめ蓄えられた) Dnmt3bb.2 蛋白質や *dnmt3bb.2* mRNA が造血系の細胞分化・増殖に関与することを示唆した。

この変異体における DNA メチル化異常を全ゲノムメチル化解析(whole genome bisulfite sequence; WGBS)により検出するために、受精後 48 時間の野生型胚および *dnmt3bb.2* 変異体胚(48 bp/48 bp×48 bp/48 bp 由来)からゲノム DNA を抽出した。また *dnmt3bb.2* 変異体胚でのメチル化異常の結果として生じる転写異常を見いだすため、それぞれの胚発生における 5 つの段階(1-2 細胞期、胚盾(shield)期、5 体節期、24 時間胚、48 時間胚)からトータル RNA を抽出、精製し、マイクロアレイによる発現解析の準備を行った。

D. 考察と結論

3年間全体について

本研究課題は血液からの AD 診断マーカーとして DNA メチル化に着目し、ほぼすべての遺伝子のメチル化レベルを次世代シーケンズ法で直接決定するという最新の解析手法を利用して、健常者と AD 患者でメチル化レベルに差のあるゲノム領域を 100 箇所同定することに成功した。これまで多くの研究グループが共通のメチル化解析用アレイを利用して数多くの AD 関連 DNA メチル化異常遺伝子を報告してきたが、今回主任研究者が見出したものとはオーバーラップはなかった。主任研究者も同じく当該アレイを用いたマーカー探しを行ってきたが、疑陽性が多く、そのため本研究課題で採用した新たな手法により得られたマーカーには真の診断マーカーが含まれていると期待している。今後は、近い将来にバリデーションされると期待される DMR について、それらのマーカーのメチル化レベルを非 AD 型認知症 (レビー小体型、血管性、及び前頭側頭葉型認知症) の血液 DNA に対しても測定し、DMR で見られたメチル化レベルの差が AD 特異的であるかを調べたい。さらにオレンジレジストリから得られる縦断研究のサンプルを活用し、プレクリニカル (発症前

段階) 及び MCI 患者に対してもマーカーのメチル化レベルを測定し、早期診断能力を調査したい。

DNA メチル化の異常は診断マーカーとして活用できるばかりでなく、もしその異常が近傍の遺伝子発現に影響を与えるのであれば、それは AD 関連遺伝子の同定につながることであり、それはまた発症機序において重要な示唆を与える。DNA メチル化の異常が遺伝子発現にどのような結果をもたらし得るのかを知るために、本研究課題では特定の遺伝子にメチル化異常を生じるゼブラフィッシュモデルを樹立し、その遺伝子発現に与える影響を解析した。具体的にはゼブラフィッシュの *de novo* DNA メチル化酵素遺伝子(*dnmt3bb.2*)の変異体を作製し、その表現型解析、全ゲノムメチル化解析、遺伝子発現解析を通じ、標的遺伝子 *angpt11b* を同定した。そして、*angpt11b* のジーンボディにおける DNA メチル化が失われると、*angpt11b* 遺伝子発現の亢進が見られること、ただしそのほとんど、もしくはすべてが正常な転写開始点からの発現ではなく、遺伝子内部からの転写開始点を持ち、も他その一部には内部に欠損すら見られたため正常な *angpt11b* 産物は作られないこと、を見出した。つまり遺伝子の転写量と産物量が反比例するように見える状況が生まれたことになる。この結果から示唆されることは、AD において有意に低メチル化していた遺伝子においても発現においては軽微な亢進や、ただしその mRNA の構造保全(structural integrity)は毀損されている可能性があるということである。したがって今後は DNA メチル化異常を持つ遺伝子の同定から診断マーカーへの転換のみならず、DNA メチル化異常遺伝子の発現解析、並びに転写開始点解析が新たな AD 関連遺伝子の発見のための有効な方法の一つとなるのではないかと考えられた。

2019年度について

2018年度に PiB-PET 陽性 AD 患者の血液に特徴的な DNA メチル化 100 領域を同定したが、使用した血液 DNA サンプル数が、健常者 12 人 (コントロール)、AD 患者 12 人と少なかったため、それは偶然の偏りに起因する可能性があった。そこで 2019年度は新たな健常者と認知症患者 (PiBPET 情報は無し) の血液サンプルそれぞれ 48 検体を用いて確認実験の準備を進めた。当該 100 領域に対し、バイサルファイト PCR 用の、一つないし二つの PCR アンプリコン用プライマーペアを設計し、最終的に 129 PCR アンプリコンを得た。今後はこれらアンプリコンから次世代シーケンス用のライブラリーを作製した後、シーケンス配列を得、認知症に特有のメチル化差異領域(differentially methylated region; DMR)を同定する計画である。そしてその中から両集団をよく分離するマーカーを選び出すことで AD の血中 DNA メチル化マーカーとして利用できることを期待している。

DMR はマーカーとしてだけでなく、それが遺伝子近傍や遺伝子内部に存在するとなれば遺伝子発現に影響を与える可能性がある。ただしゲノム全体のメチル化変動や多数の遺伝子のメチル化レベルが変化する場合、メチル化変動の生じた特定の遺伝子の発現に影響が

見られてもそれがメチル化変動による直接の効果なのか、それとも他の遺伝子の変動がもたらす副次的な変動なのか判別が難しい。今回、主任研究者のグループが作成した *dnmt3bb.2* 変異体胚では、全ゲノムメチル化解析の結果、限られた数のメチル化変動しか観察されず、DNA メチル化異常が発現に与える影響を解析するために好適なモデルとなると考えられた。そして 2019 年度において集中的に解析した *angptl1b* 遺伝子は、野生型胚と比較して *dnmt3bb.2* 変異体胚において顕著な DNA メチル化の低下が見られたこと、さらにその産物が血管形成に関与する可能性があり、そうであれば *dnmt3bb.2* 変異体胚の血管形成異常の表現型との関連があり得ることから、*Dnmt3bb.2* の標的遺伝子の第一候補として解析対象に選んだ。

定量的 PCR 法による *angptl1b* 遺伝子の発現量を調べると *dnmt3bb.2* 変異体胚において野生型胚と比べ著しく上昇していたが、5'RACE 法による転写開始点解析の結果、それらは遺伝子の内部からの転写産物であることが判明した。それらは正常な翻訳開始点を持たないため、正常な *angptl1b* 産物へとは翻訳されず、*dnmt3bb.2* 変異体胚においては *angptl1b* 遺伝子の機能は失われていると考えられた。

angptl1b 産物の機能喪失がどのようにして血管形成異常につながるのかの手がかりを得るために *dnmt3bb.2* 変異体胚における血管内皮細胞マーカーの発現解析を行ったところ、その最初期マーカーの一つである *npas4l* の発現が後部側板中胚葉（血管内皮細胞および造血細胞の前駆体）で上昇していた。したがって *angptl1b* 遺伝子産物は大局的には後部側板中胚葉の形成を負に制御する因子であると見なせ、またその予想される抗血管形成抑制作用から考えれば、血管内皮細胞の分化の最初期段階に未知の機構で *npas4l* 等の発現を制御するリガンドであることが示唆された。またこの結果は、*Angptl1b* は抗血管形成機能を有することを示唆し、その機能はマウスオーソログの *Angptl1*（別名アンジオアレクチン）が血管形成に抑制的に働くという報告(Dhanabal *et al.*, *Cancer Res.*, 2002)と一致する。また、*dnmt3bb.2* 変異体胚およびモルフオリノオリゴによる *angptl1b* のノックダウンで見られた初期胚(1 day post fertilization; 1 dpf)の尾部静脈叢(caudal vein plexus)の過増殖とみられる異常な膨らみは、その機能の喪失で説明ができる。我々は今回、*angptl1b* 遺伝子の転写開始点が野生型の 1 dpf 胚と 2 dpf 胚では異なることを見出し、1 dpf 胚での予想 *Angptl1b* 産物は 2 dpf 胚のそれよりも N 末端が 32 アミノ酸長くなると予想したが、*dnmt3bb.2* 変異体胚の尾部静脈叢異常は 1 dpf で一過的に表れ、2 dpf 以降では尾部の血管異常は消失することから、血管異常は 1 dpf で発現する、長い *angptl1b* 遺伝子のアイソフォームの喪失に起因すると考えられた。*angptl1b* 遺伝子と尾部静脈叢異常の関連を直接的に示すため、現在、*angptl1b* 遺伝子の変異体を作製している。

ゼブラフィッシュゲノムには *angptl1b* のホモログ *angptl1a* が存在する。この *angptl1a* に関しては、すでに他のグループの研究者が、体節間血管(intersegmental vessel)の形成や(Kubota *et al.*, *PNAS.*, 2005)、造血幹細胞の形成に必要であることを示している(Lin *et al.*, *eLife*, 2015)。このことからマウス *angptl1* のゼブラフィッシュのオーソログは同じく抗血

管形成作用を示す *angpt11b* であり、*angpt11a* は *angpt11b* と共通の祖先である *angpt11* 遺伝子からの重複後に血液・血管形成に正の機能（オーソログとは異なる機能）を持つようになったパラログであることが示唆された。

Angpt11b は構造的にアンジオポイエチンファミリーに属することから分泌型の糖タンパク質であり、細胞膜上の未知の受容体を介して、血管分化を抑制すると予想される。これまでにヒトの ANGPTL1 の受容体として抑制性免疫受容体の LILRB2 (leukocyte immunoglobulin-like receptor B2) と LAIR1 (leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1) が報告されている(Zheng et al. Nature, 2012)。前者は4つのイムノグロブリンドメインを、後者は単一の細胞外 C2 型イムノグロブリン様ドメインを持つ。これらのイムノグロブリン様ドメインを介して細胞外のリガンドと結合し、そのシグナルを細胞内に伝えると考えられる。ヒトの ANGPTL1 リガンドの場合は上述のように抗血管形成に繋がることが推測されるが、果たしてそのシグナルが LILRB2 や LAIR1 を介しているか否かについては未だ不明である。

最近、LILRB2 や LAIR1 と同じようにイムノグロブリンスーパーファミリーに属する、二つのイムノグロブリン様ドメインを持つゼブラフィッシュの細胞膜貫通タンパク質 Junctional adhesion molecule 3b (*Jam3b*、哺乳動物の *JAM3* のオーソログ)が *npas4l* 等の血管内皮細胞マーカー発現に必要であることが報告された(Kobayashi et al. Development, 2020)。したがってこの *Jam3b* は *Angpt11b* の受容体候補になりえる。*jam3b* 変異体では3体節期(受精後11時間)から6体節期(受精後12時間)の後部側板中胚葉の形成は正常であるものの、10体節期(受精後14時間)になると各種造血・血管系マーカー遺伝子の発現が低下あるいはほぼ消失するとしている。そのため *Jam3b* は後部側板中胚葉の形成ではなくて、その維持に必要であると示唆された。一方、*dnmt3bb.2* 変異体胚では3体節期にすでに *npas4l* の発現がやや上昇しており、6体節期での血管芽細胞マーカー *lmo* の発現上昇は明確であった。このことは *Angpt11b* が後部側板中胚葉の形成に関与することを示唆しており、*Jam3b* と *Angpt11b* の機能ステージにはずれがある、すなわち *Angpt11b* リガンドのシグナルは *Jam3b* を介していない可能性がある。ただ、Kobayashi らの論文では、上述のように、*jam3b* 変異体胚3, 6体節期での血管内皮細胞マーカーの発現が影響を受けていないと記載されているが、実際そこで示された図では血管芽細胞マーカーの発現がむしろやや上昇しているように見えた。もし *Jam3b* が *Angpt11b* の受容体であり、後部側板中胚葉の形成については抑制する機能を果たすのであれば、*jam3b* 変異体胚での後部側板中胚葉の形成時における血管芽マーカーの発現は当該図のように表れる(上昇する)はずである。そこで今後、この可能性を *jam3b* モルフォリノオリゴによる機能抑制や免疫共沈降法(co-IP)などにより解析したいと考えている。

2018年度について

研究代表者はDNAキャプチャー法と次世代シーケンスの組み合わせを利用して、

PiB-PET 陽性 AD 患者の血液と PiB-PET 陰性認知機能正常者の血液を比較することで前者に特徴的なメチル化差異領域(differentially methylated region; DMR)を先入観無し、かつゲノムワイドで探索した。その結果、メチル化レベルの差が 15%以上という厳しい条件の下で、およそ 100 カ所の DMR を同定することができた。本プロジェクトですでに DMR として同定している、*CLU*, *CR1*, *PICALM*, *NRM* と *EHD1* という遺伝子についてはそれらにおける DMR でのメチル化レベルの差が 10%にも満たないことから、今回の 100 DMR には含まれなかった。今回の次世代シーケンスを用いたメチル化レベル測定は、メチル化されたシトシン(CpG サイトの)と、メチル化されていないシトシンを、バイサルファイト処理後の塩基配列を決定することで直接比較しているため、ハイブリダイゼーションによるアレイ解析(2017 年度実施)よりも精度が高いと期待される。したがって上記 100 カ所の DMR は使用したサンプル間では確実に DMR である可能性が高い。一方、今回使用した血液 DNA サンプルは健常者 12 人、AD12 人と、小集団での比較であり、100 カ所の DMR のうちには偶然の偏りにより生じた DMR も含まれている可能性がある。そこでこれら 100 DMR のそれぞれについて、別検体かつ別の手法でも DMR として認められることを最終年度(2019 年度)は確かめる予定とした。

ちなみにこれまで世界中で行われた AD に対する大規模なゲノムワイド関連解析(GWAS)が行われ 30 ほどのアルツハイマー病関連遺伝子が同定されたが、今回の 100 DMR にはそれらのアルツハイマー病関連遺伝子は含まれていなかった。したがって今後の解析から、DNA の配列の多型では見つかり得ないアルツハイマー病関連遺伝子を見いだすことができるのではないかと期待された。

本研究課題は血中 AD メチル化マーカー探索に加え、DNA のメチル化変動が遺伝子にどのような影響をどのように与えるのかを解明することで、AD の発症機序解明ならびに新規のマーカー開発への展開も目指している。そのため私はゼブラフィッシュの DNA メチル化酵素遺伝子 *dnmt3bb.2* の変異体を作製し、その機能的標的遺伝子 (DNA のメチル化が発現に明白な影響を与えるという意味) を同定することを 2018 年度は目指した。2017 年度の解析により、*dnmt3bb.2* の母性胚性変異体 (卵母細胞からの正常な *Dnmt3bb.2* タンパク質と *dnmt3bb.2* mRNA の持ち込みがない) では胚の時期に一過的に血液・血管系での表現型が現れるということが明らかになった。したがってこの表現型が現れる原因の一つとして、母性の *Dnmt3bb.2* タンパク質が初期胚において血球血管芽細胞(ヘマンジオブラスト)、あるいは血球、血管の発生・分化に関わる遺伝子の制御に関わるということが予想された。そして実際に、トランスクリプトームおよび全ゲノムメチル化解析により、*Dnmt3bb.2* タンパク質の有力な機能的標的遺伝子としてアンジオポイエチン様 1b 遺伝子(*angpt1b*)を見いだした。哺乳動物のアンジオポイエチンは分泌性のタンパク質で、細胞膜上の Tie-2 受容体にリガンドとして結合するとそのシグナルが細胞内に伝わり血管形成を促す。アンジオポイエチンファミリーのメンバーは、おそらくオリゴマー化に必要な coiled-coil domain と、おそらくレセプターへの結合部位であるフィブリノゲン様ドメインを持つ。哺乳動物には

アンジオポイエチンと同様、これら二つのドメインをコードするが、Tie1にも Tie2にも結合しないタンパク質が複数存在し、それらはアンジオポイエチン様タンパク質 (angiopoietin-like proteins; angptls)と呼ばれており、未知のリセプターを介して血管形成のみならず他の組織においても機能すると考えられているオーファンリガンドである。ゼブラフィッシュにおいてはアンジオポイエチン様タンパク質をコードする *angptl 1a, 1b, 2a, 2b* という4つの遺伝子が存在し、そのうち *angptl1a* と *angptl2b* のダブルノックダウン胚では血管形成、とりわけ *intersegmental vessel* が形成されないとの報告がされている。そのためそれらのホモログである *angptl1b* も血管形成に関与する可能性があり、*dnmt3bb.2* 変異体胚で見られる血管異常の表現系からすると、*Dnmt3bb.2* の *de novo* メチル化が *angptl1b* の発現制御に関与する可能性が示唆された。したがって *dnmt3bb.2* 変異体胚で *angptl1b* に生じる異常、たとえば発現量、転写産物の構造 (転写開始点、転写終結点、スプライシングへの影響)、プロモーターの選択等を検出することで、AD 患者における DMR 遺伝子に何が起こるかを推測することや、さらにはその異常を突き止めることにより、その異常そのものを新たなマーカーの開発へと展開できるのではないかと期待している。

2017年度について

これまでに研究代表者は標的遺伝子アプローチを取ることで、AD 患者由来の血液に含まれる既知の AD 関連遺伝子、*CLU*, *CRI*, *PICALM* が低メチル傾向にあることを見いだしていた。そこで今回は、AD 患者の血液に特徴的なメチル化異常を先入観無しに、かつゲノムワイドで探索するために DNA メチル化解析用マイクロアレイを利用した。その結果、*NRM* (*nurim*) と *EHD1* という二つの遺伝子に存在するメチル化部位 (CpG サイト) のメチル化レベルが、健常人群と比較して AD 患者群の血液中で高くその差が有意であった。これらのメチル化レベルの情報に *APOE* の遺伝子型を加えたロジスティック回帰分析は $AUC=0.823$ を与えたことから、以前の候補遺伝子での結果と合わせ、DNA メチル化情報は発症診断に有効に利用できると考えられた。

すでに複数の先行研究が AD の血液マーカーを探索するために同じメチル化アレイを用いた解析を行っているものの、これまでのところ *NRM* と *EHD1* については報告がない。また血液 DNA を使用して、メチル化レベルの差が有意であるプローブは数多く報告されているが、それらが判別に有効との言及はない。今回、これらの有望なマーカーが得られた理由として、本研究では異なるアレイタイプの利用に加え、メチル化レベルの情報に MMSE 値を加えたマーカー候補プローブの絞り込みを行うなど、真陽性を失う (感度を下げる) リスクより擬陽性の排除 (特異度を上げる) を優先させたことが考えられる。ただしそれでもなお、独立したサンプルと手法を用いたバリデーションの段階で、6 つのマーカー候補プローブのうち *NRM* と *EHD1* を除く 4 つのマーカープローブが脱落したという事実は、少なくとも AD の血中 DNA メチル化マーカーという目的に限れば、今回用いたアレイによる解析には、

プラットフォーム (S/N 比やゲノムにおけるプローブの設置場所、等) そのものの限界により擬陽性を除ききれないか、あるいはまた *NRM* と *EHD1* のみでの AUC が 0.697 と判別率が高くないように、健常者と AD 患者での血中 DNA メチル化に差のある領域は確かにゲノムに複数存在はするが、その差が今回使用したプラットフォームの検出感度では再現性よくとらえられないくらいに小さい、という理由が考えられた。

したがってこれらの可能性を排除し、小さいメチル化の差を確実にとらえるには、より感度の高い、異なるプラットフォームを使用するしかなく、現時点ではそれはバイサルファイトシーケンスをゲノムワイドか、せめてゲノムの全遺伝子領域をカバーする、領域を絞ったもので行うのが適当と考えられた。

本研究課題は血中 AD メチル化マーカー探索に加え、ゼブラフィッシュの DNA メチル化酵素遺伝子変異体を利用して、DNA のメチル化変動が遺伝子発現にどのような影響をどのように与えるのかを解析することを目指した。2017 年度、*dnmt3bb.2* 変異体胚を調べたところ、メスが *dnmt3bb.2* 変異ホモの時の子孫に血液・血管系での表現型が現れるという母性胚性変異体であることが明らかになった。したがってこの表現型が現れる原因の一つとして考えられるのは、母性の *Dnmt3bb.2* タンパク質が初期胚において血球血管芽細胞 (ヘマンジオブラスト)、あるいは血球数の減少が血管異常よりも顕著であることから、造血幹細胞といった細胞の発生・分化に関わる遺伝子の制御に関わるということである。この可能性については以降のトランスクリプトームおよび全ゲノムメチル化解析により明らかにできると期待した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

2019 年度

- 1) 岩波礼将、横井勇人、秋山真太郎、重水大智、荒木夏生、二宮尚、松田勝、鈴木徹、下田修義

ジーンボディにおける DNA メチル化の機能的役割

第 13 回日本エピジェネティクス研究会年会、横浜市 (2019 年 5 月 28 日)

- 2) 岩波礼将、横井勇人、秋山真太郎、重水大智、荒木夏生、二宮尚、松田勝、鈴木徹、下田修義
De novo methylation of zebrafish *angptl1b* gene body by Dnmt3bb.2 secures the expression level and integrity of the transcript
 第 25 回小型魚類研究会、宇都宮市 (2019 年 9 月 4 日)
- 3) 白井均樹、高橋治子、高山和也、下田修義、菊池裕
 ゼブラフィッシュ Dnmt3aa が標的とするゲノム領域の同定
 第 42 回日本分子生物学会、福岡市 (2019 年 12 月 6 日)
- 4) 岩波礼将、横井勇人、秋山真太郎、重水大智、荒木夏生、二宮尚、松田勝、鈴木徹、下田修義
 ジーンボディにおける DNA メチル化の機能的役割
 第 42 回日本分子生物学会、福岡市 (2019 年 12 月 4 日)

2018 年度

- 1) 坂口和弥、橋本有弘、下田修義
 CyGnusPlotter: A user-friendly and cross-platform tool for plotting CpG distributions
 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会、札幌市 (2018 年 5 月 24 日)
- 2) 下田修義、上住円
 Age-related DNA methylation changes are accelerated in regenerated tissues
 第 41 回日本基礎老化学会大会、東京都 (2018 年 5 月 31 日)
- 3) 岩波礼将、下田修義、Michael Schorpp, Thomas Boehm
 DNA methylation controlling hematopoiesis
 第 24 回小型魚類研究会、名古屋市 (2018 年 8 月 26 日)
- 4) 白井均樹、高山和也、田谷郁実、下田修義、菊池裕
 ゼブラフィッシュ Dnmt3aa の標的とするゲノム領域の同定
 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜市 (2018 年 11 月 30 日)
- 5) 岩波礼将、下田修義、Michael Schorpp, Thomas Boehm
 DNA メチル化を介した造血異常の次世代への継承

第 41 回日本分子生物学会年会、横浜市 (2018 年 11 月 30 日)

2017 年度

1) 坂口和弥, 光森理紗, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義

DNA methylation analyses indicated changes in leukocyte composition in
Alzheimer's disease patients

第 40 回日本基礎老化学会年会, 名古屋 (2017 年 6 月 16 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし