

## 長寿医療研究開発費 平成27年度 総括研究報告

血中 DNA のメチル化を指標としたアルツハイマー病早期診断法の開発 (26-16)

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

超高齢者社会を迎えつつある日本ではアルツハイマー病が大きな社会問題となっており、発症機序解明と低侵襲性の早期発症診断法の開発が急務となっている。研究主任者は、本研究課題を申請した時点において、アルツハイマー病リスク遺伝子として知られる *APOE* DNA の CpG アイランドショア領域における DNA メチル化レベルが、健常人のグループと比較して、患者グループの血液で有意に低下していることを見出していた。この結果は、リスク遺伝子のメチル化レベルが診断マーカーになり得ること、及び、発症にリスク遺伝子のメチル化変化が関与する可能性を示唆していた。そこで本研究課題では *APOE* 以外のリスク遺伝子について同様に DNA メチル化を解析し、アルツハイマー病患者を早期に診断できるマーカー遺伝子を選抜することを目指した。

### 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

### A. 研究目的

アルツハイマー病患者とその家族の負担を軽減するには治療薬の早期服用が大切であり、希望に応じてアルツハイマー病の発症リスクを知り得る体制を整えることが望ましい。アルツハイマー病の最大のリスクファクターが加齢であることから、研究代表者は、発症前診断のためのマーカーとして、ヒトの加齢マーカーである DNA のメチル化に着目した。一方、検査のためのサンプルとしては、サンプリングの侵襲性が低い血液を採用した。本研究目的は、それらを組み合わせ、血中 DNA のメチル化を利用したアルツハイマー病の低侵襲性早期診断法を将来的に開発することにある。

## B. 研究方法

国立長寿医療研究センターのバイオバンクから提供を受けたアルツハイマー病患者、及び健常人由来の血液 DNA、それぞれ 48 サンプルをバイサルファイト処理後、*APOE*、*CLU* (*clusterin*)、*BIN1*、*PICALM*、*CR1*、*ABCA7* という 6 つのアルツハイマー病関連遺伝子の CpG アイランドショア領域に対し PCR を行い、その産物を大腸菌にクローニングした。それぞれのコロニーからプラスミド DNA を Templiphi (GE) を用いて直接増幅し、その DNA を最低 24 クローンについてキャピラリーシーケンサーにより解読し、メチル化レベルをウェブツール QUMA により解析した。最後に、アルツハイマー病患者のグループと、健常人のグループの間のメチル化レベルに有意差があるか否かを *t* 検定により求めた。

(倫理面への配慮)

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。

## C. 研究結果

*APOE*、*CLU* (*clusterin*)、*BIN1*、*PICALM*、*ABCA7*、*CR1* という 6 つのアルツハイマー病関連遺伝子の CpG アイランドショア領域におけるメチル化レベルを、アルツハイマー病患者のグループと健常人のグループの間で比較した結果、*APOE*、*CLU* (*clusterin*)、*PICALM*、*CR1* の 4 つの遺伝子においてアルツハイマー病患者のグループで有意に低下していることが判明した (投稿準備中)。

また *APOE* のメチル化レベルについて、*APOE* アレル (*e3/e3*, *e3/e4*, *e4/e4*) との関連を健常者群及びアルツハイマー群、それぞれにおいて調べたところ、発症危険アレルである *e4* のホモキャリアグループにおいて、*APOE* メチル化が有意に高いことが判明した (投稿準備中)。

なお患者における進行度の指標、MMSE の値と、メチル化レベルの間に相関は見られなかった。

## D. 考察と結論

解析した 6 つのアルツハイマーリスク遺伝子のうち 4 つの遺伝子において、メチル化レベルがアルツハイマー病患者のグループで有意に低いことが判明した。この結果は DNA メチル化が発症診断のマーカーとして期待できることを示すとともに、このアプローチが

メチル化マーカー同定に有効であることも示した。しかし上図に示すように個々の遺伝子メチル化は単独で2群を分離することはできず、重なりが生じる。従って、診断に利用するならば、複数のマーカーを組み合わせた、二項ロジスティック回帰分析が有効であると考えられた。

最終年度は以下の三項目について取り組む予定である。1) メチル化レベルが健常人とアルツハイマー病患者で差のある遺伝子について、加齢に伴うメチル化レベルの変化を解析する、2) レビー小体型、血管性、前頭側頭葉型の各非アルツハイマー型認知症についてもメチル化解析を行い、見出したメチル化マーカーのアルツハイマー型認知症の鑑別能力を調べる、3) スループットを高め、コストを下げるため、キャピラリーシーケンスに基づくメチル化解析から、パイロシーケンス法による手法への転換を図る。

#### 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

###### 1) 坂口和弥, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義

血中 DNA のメチル化を指標としたアルツハイマー病早期診断法の開発

第 38 回日本分子生物学会年会、12 月 2 日、兵庫

###### 2) 坂口和弥, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義

Diagnosis of Alzheimer's disease based on genetic and peripheral epigenetic biomarkers

第 11 回 NAGOYA グローバルリトリート、6 月 26 日、愛知

#### 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