

長寿医療研究開発費 平成28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

アルツハイマー病(AD)の低侵襲性早期発症診断法の開発を実現するため、本研究ではバイオマーカーとして DNA のメチル化という塩基修飾に着目した。研究主任者は、平成 26 年度および平成 27 年度の研究から、他の研究グループにより AD 発症との遺伝的関連がすでに認められていた 3 つの遺伝子(*CLU*, *PICALM*, *CRI1*)について、それらの 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。最終年度はメチル化の変化がもっとも明瞭であった *CLU* 遺伝子について他のタイプの認知症についても調べたところレビー小体型認知症でもメチル化が健常者と比較して低下していることが判明した。またメチル化レベルの測定法について、従来のキャピラリー型シーケンサーからパイロシーケンス法への転換を図り、労力とコストを大幅に削減することに成功した。

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

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には、その開発と平行し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必要であると考える。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、ローコストのアルツハイマー病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倫理審査を経て提供を受けたアルツハイマー型、レビー小体型、血管性、前頭側頭葉型の 4 タイプの認知症及び健常人由来の血液 DNA、それぞれ 48, 48, 33, 38, 16 検体分をバイサルファイト処理後、アルツハイマー病関連遺伝子 *CLU(clusterin)* 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 Templphi (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。

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。上記と同様、血液ゲノム DNA のバイサルファイト処理を行い、メチル化測定領域を PCR で増幅した。ただしパイロシーケンス法において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。

(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

1. *CLU*メチル化変動の AD 特異性

CLU(clusterin) 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、健常人のグループとの間で Kruskal-Wallis 検定により比較した結果、アルツハイマー病患者のグループおよびレビー小体型認知症群で有意($p<0.05$)に低下していることが判明した(投稿準備中)。なお少なくとも 60 歳台から 80 歳台の間で加齢による *CLU* のメチル化レベルの有意な変動は認められなかった。

次に健常者およびそれぞれのタイプの認知症と *APOE* アレル (*e3/e3*, *e3/e4*, *e4/e4*) との関連を調べた。*APOE* アレルについては AD のみならずレビー小体型認知症においても *e4* が発症危険アレルとして知られている。AD 患者においては *e4* キャリアのオッズ比が 9.54 と高く、レビー小体型認知症においても *APOE e4/e4* のキャリアのオッズ比が 7.77 ($p=0.0199$) と非常に高いことが判明した。

2. パイロシーケンス法によるメチル化レベル測定

これまで DNA メチル化レベル測定には以下の 6 段階のステップが必要であった。すなわち 1) ゲノム DNA のバイサルファイト処理、2) ターゲット領域の増幅、3) PCR 断片の大腸菌でのクローニング、4) プラスミドの抽出、5) キャピラリーシーケンス、6) 専用のソフトウェアによる解析、である。このうち 4) と 5) は手間、費用、時間がかかるため、今回新たに導入したキアゲン社の PyroMark Q48 の立ち上げ、および *CLU* メチル化測定を試みた。この機器は上記 2) の段階までは従来のキャピラリーシーケンス法と同じであるが、PCR 産物のシーケンスをクローニングせずに直接シーケンス反応を行う。キャピラリーシーケンスでも同様のダイレクトシーケンス法があるが、この場合、メチル化シトシンと非メチル化シトシンを異なる波長の蛍光で検出するため、両者の存在比率を正確に求めることが難しい。一方、PyroMark の場合、メチル化シトシンと非メチル化シトシンは同じ波長の蛍光を独立して検出する仕組みなので両者の存在比率を正確に測定できるという強みを持つ。そこでこの機器を用いて *CLU* のメチル化レベルを測定した結果、キャピラリーシーケンスでの結果とよく一致する値が得られ、AD 患者グループでの低メチル化が確かめられた。

D. 考察と結論

昨年度までの解析により、AD との関連の強い上位 6 つのアルツハイマーリスク遺伝子のうち 3 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。これら 3 つの遺伝子のメチル化情報と *APOE* アレル情報を説明変数とし、AD と健常者を判別する二項ロジスティック解析を行った結果、*CLU* メチル化情報と *APOE* アレル情報の組み合わせからもっとも両者をよく分離する式が得られた。この結果は *CLU* 遺伝子の DNA メチル化低下が発症診断のマーカーとして有効であることを示した。

そこで最終年度は *CLU* メチル化が AD の鑑別診断に利用できるか調べる目的で、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 *CLU* のメチル化解析を行った。その結果、*CLU* はレビー小体型認知症においても低メチル化が認められた。レビー小体型認知症はこれに加え、少なくとも二つの点で、AD との類似性が見られる。一つはレビー小体型認知症においても *APOE e4/e4* のキャリアアレ

ルが有意に濃縮されていること、もう一つは、AD の治療薬として知られるドネペジルがレビー小体型認知症においても有効であることが確認されているということである。したがってレビー小体型認知症は AD と発症に至るパスウェイにおいて一部共通した部分があるのではないかと考えられた。

次に、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認められた *CLU* 遺伝子については、加齢に伴うメチル化レベルの変化を解析した。しかしサンプルに利用した年齢層（60~80 歳台）では変化が見られなかった。メチル化の加齢変動は年齢と直線的な相関を示すとは限らないため、今後はより若いサンプルを含めた解析が必要であると考えた。

最後に、メチル化解析の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った。その結果キャピラリーシーケンスではこれまで 96 人分の場合、一領域について数ヶ月必要とされていたが、数日で終了することができ、時間短縮にきわめて有効であった。ただし測定できるメチル化部位は基本的に 1 箇所のみであり、広域の探索には不適である。したがってこの手法は他の広域探索の手法（アレイ、キャプチャーシーケンス）との組み合わせでのみ有効であると考えられた。コストについてはキャピラリーの場合、試薬代が 1 人当たり 5 千円程度であったが、それが 1/10 近くまで抑えられ、大幅なコストダウンができることがわかった。

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

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 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19 日、大阪

2) 坂口和弥, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義

アルツハイマー病の発症を血中 DNA のメチル化から予測する
第 39 回日本基礎老化学会年会、5 月 27 日、神奈川

3) 坂口和弥, 光森理紗, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義

A genome-wide search for diagnostic- and progression-epigenetic markers of AD

第9回 NAGOYA グローバルリトリート、2月10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