

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告

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

末梢血を利用したアルツハイマー病(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、これまでの研究から、AD 発症との遺伝的関連が認められている 6 つの遺伝子の DNA メチル化を詳細に解析した結果、3 つの遺伝子(*CLU*, *PICALM*, *CRI1*)における DNA メチル化レベルが、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。これらのメチル化レベルと APOE ジェノタイプを組み合わせると ROC 値がおよそ 0.8 という良好な判別率が得られたため DNA メチル化を AD の診断に利用できる可能性が示された。そこで本研究課題ではマイクロアレイや次世代シーケンスを利用することによりゲノムワイドでより優れたメチル化マーカーを探索する。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を平行して行う。

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(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Aβ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影響を与えるメカニズムを解明する。

B. 研究方法

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合計健常者43人、及びAD患者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、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 $r_s(\text{グループ1}) \times r_s(\text{グループ2}) > 0$ を示すプローブを選択
- IV. 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パサルファイトPCR/クローニング法同様、ターゲット領域をPCR二より増幅するが、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、H28 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 DNA/RNA 抽出を野生型胚および変異体胚から行った。

(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. AD マーカープローブの抽出

今回使用した 450k アレイと EPIC アレイにはそれぞれ 45 万、85 万プローブが搭載されているが、それぞれ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 450k アレイに搭載されているプローブが半分で残りの半分が新たなプローブとして搭載されている。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、AD12 人の少スケールサンプルを 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、ラバスタなプローブ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プローブ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。原因は不明であるが、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。

これら二つのマーカー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でロジスティック回帰分析を行った。すなわち1) 二つのメチル化マーカーの組み合わせ、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。

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

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(8bpの欠損変異;48bp)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(48bp/48bp)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(48bp/48bp \times 48bp/48bp)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、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の準備を行った。

D. 考察と結論

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、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 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 AD 患者群の血液中で比較したときに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 と判別率が低いように、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、その差がプラットフォームの検出感度では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はカバーする領域を絞ったものとする。

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ている。今年度、*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今後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ている。

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, 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合同大会、6 月 16 日、名古屋

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