

長寿医療研究開発費 平成30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

本研究ではアルツハイマー病(AD)の低侵襲性早期発症診断法の開発を実現するため、バイオマーカーとして血液 DNA の塩基のメチル化修飾に着目した。DNA メチル化は非常に安定な修飾のため扱いやすくその測定も安価なため、よい診断マーカーが得られれば広く普及が期待できる。研究主任者は、AD 発症との遺伝的関連が報告されていた 20 余の遺伝子の中から、特に関連の強い上位 6 つの遺伝子を試験的に選び、それらの DNA メチル化を詳細に解析した。その結果、3 つの遺伝子(*CLU*, *PICALM*, *CR1*)における DNA メチル化レベルが、患者グループの血液でわずかではあるが有意に低下していることを見出した。*CLU* のメチル化レベルと *APO ϵ* ジェノタイプを組み合わせると ROC 値がおよそ 0.8 という良好な診断精度が得られたため DNA メチル化を AD の診断に利用できることが示唆された。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、先入観なしに、かつ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が明らかになれば、それをさらにマーカーとして利用できる可能性もある。そこで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

将来開発が期待されるアルツハイマー病の予防薬や進行抑制薬の開発のために、そしてアルツハイマー病(AD)の発症リスクの高い人々がそのような薬剤を早期に服用で

きるようにするためには、ADの発症リスクを低侵襲かつ低コストで知り得るバイオマーカーを同定する必要がある。これまでに髄液のA β やリン酸化タウ濃度がAD発症マーカーとして利用できる可能性が示されているが侵襲性が高いという問題がある。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、PETが設置されている医療機関の数は少なく、高額の診察費用から、その診断法が一般に普及しているとは言いがたい。したがって低侵襲性でかつ安価にAD発症予測のできるマーカーが望まれている。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*CLU*, *PICALM*, *CRI*を同定した。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、それは発現量なのか、転写産物の構造(転写開始点やスプライシングへの影響)なのか、あるいはプロモーターの選択なのか、など、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および転写産物に影響を与えるメカニズムを解明する。

B. 研究方法

- 1) 次世代シーケンスを利用した DNA メチル化差異領域(differentially methylated region; 以下、DMR と略す)の探索 - PiB-PET 情報付きサンプルを用いて：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、今年度は 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を用いてイルミナ社の 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詳細に知ることができる。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、できるだけこ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. 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、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。

（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. 次世代シーケンスによる DMR の探索

今回 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。

統計的にメチル化に差のあるポジション(differentially methylated position; DMP)の 20%は 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)に存在した。ゲノムにおける DMP の位置はイントロン内が最も多く 46%、次いで遺伝子間が 42%、プロモーター領域とエキソンがそれぞれ 6%であった。健常者グループ内での平均メチル化レベルと AD グループ内での平均メチル化レベルの差 (ΔB) が 15%以上と比較的大きな差のある DMP を 10,381 カ所同定した。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 が重要であると認識されている。DMR の定義の仕方や同定の仕方には定法はなく、今回私は以下の条件を満たす領域を DMR と見なした。すなわち、DMP とされた CpG 部位同士は必ずしも隣り合わなくてもよいが、最低でも 3 つの DMP が 1kb の範囲に存在したときにその領域を DMR 構成領域候補とする。ここで、ある候補領域とはオーバーラップしつつも一つでも異なる DMP を持つ領域は独立した DMR 候補領域と見なす。そしてそのような候補領域が最低でも 3 つオーバーラップしたときに、その領域を「DMR の候補」と定めた ($|\Delta B| \geq 15\%$ 以上の CpG サイトを 3kb 以内に 5 つ以上含む領域)。最後にその領域を可視化できる IGV というソフトウェアを使い DMR の位置情報などを確認した。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、全体でも 85%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。また DMP の存在部位の内訳は、イントロン 33%、エキソン 13%、遺伝子の上流域 4%、下流域が 2%であった。最終的に 100 カ所のメチル化差異領域(DMR)を同定できた。

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 が同定できた。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。

ゼブラフィッシュを用いた今年度の研究の目的はまず DNA メチル化により制御される遺伝子を同定することであった。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(*angptl1b*)が見つかった。

D. 考察と結論

今年度、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 25%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は確かめる予定である。

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にく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している。

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を同定することを今年度目指した。昨年度の解析により、*dnmt3bb.2* の母性胚性変異体（卵母細胞からの *Dnmt3bb.2* タンパク質の持ち込みがない）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標的遺伝子としてアンジオポイエチン様 1b 遺伝子を見いだした。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、*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、未知のレ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 *angptl 1a, 1b, 2a, 2b* をコードする遺伝子が存在し、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ある。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* の発現調節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。

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) 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, 2018 年 11 月 30 日, 横浜市
- 2) 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, 2018 年 11 月 30 日, 横浜市
- 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, 2018 年 8 月 26 日, 名古屋市
- 4) 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 2018 年 5 月 31 日, 東京
- 5) 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, 2018 年 5 月 24 日, 札幌市

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