

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 23 年度採択研究代表者

H25 年度
実績報告

加藤 忠史

(独) 理化学研究所 脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム
チームリーダー

「精神疾患のエピゲノム病態の解明に向けた新技術創出」

§ 1. 研究実施体制

(1) 加藤グループ (理化学研究所)

- ① 研究代表者: 加藤 忠史 (理化学研究所脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム、チームリーダー)
- ② 研究項目
 - ・精神疾患のエピゲノム解析

(2) 中島グループ (九州大学)

- ① 主たる共同研究者: 中島 欽一 (大学院医学研究院、教授)
- ② 研究項目
 - ・動物モデルを用いたエピゲノム病態の解析

(3) 五十嵐グループ (理化学研究所)

- ① 主たる共同研究者: 五十嵐 勝秀 (理化学研究所脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム、客員研究員)
- ② 研究項目
 - ・動物モデルにおけるエピゲノム病態の解析

§ 2. 研究実施の概要

1) 神経細胞における低メチル化が精神疾患を引き起こすメカニズムの解析

私たちはこれまで、精神疾患患者さんの死後脳から、神経細胞の核を取り出して、その DNA を DNA マイクロアレイを用いて解析し、さまざまな DNA メチル化変化を見出してきました。しかし、DNA メチル化変化が精神症状の原因なのか、結果なのかについては、わかっていません。そこで、DNA メチル化変化と精神症状の因果関係を明らかにするため、神経細胞のみで DNA メチル化酵素 Dnmt1 を失わせた遺伝子改変マウスを作成し、行動解析を行いました。その結果、このマウスがさまざまな行動変化を示すことがわかりました。

そのメカニズムを明らかにするため、培養神経細胞で、Dnmt1 の発現を低下させ、その影響を調べたところ、シナプス関連遺伝子の変化や、神経細胞の活動性の変化が見られました。これらのことから、シナプスの変化に伴って、神経細胞の活動性が変化し、これが行動異常の原因となっている可能性が考えられました。

2) セロトントランスポーター (Slc6a4) メチル化マウス開発に向けた基礎的検討

私たちはこれまで、一人だけが双極性障害(躁うつ病)にかかっている一卵性双生児お二人で、DNA メチル化状態を比較することによって、双極性障害におけるセロトントランスポーター遺伝子(Slc6A4)の DNA メチル化上昇を見いだしました。セロトントランスポーターは、抗うつ薬の標的分子であることから、病気との関連が疑われますが、病気の結果によって変化しているのか、このメチル化変化が病気の原因なのかを明らかにする必要があります。

Slc6A4 がメチル化されていることが精神疾患の原因なのかどうかを、動物モデルを用いて明らかにするためには、神経細胞のゲノムで Slc6A4 がメチル化されたマウスを作る必要がありますが、人為的に特定の遺伝子に DNA メチル化を導入したマウスを作成する技術は、未だ確立していません。

そこで、特定の遺伝子に DNA メチル化を亢進させたモデルマウスを作る技術を開発するため、その方法についての検討を行いました。

まずは、人為的な DNA メチル化を細胞レベルで引き起こせるかどうかを明らかにするため、特定の DNA 配列に結合する蛋白質(TALEドメイン)に、DNA メチル化酵素を連結した蛋白質を設計し、DNA メチル化の変化により遺伝子発現制御が変化することがわかっている遺伝子を使って、確認しました。その結果、この蛋白質を発現させることによって、機能変化を起こさせることが確認できました。

また、これまでヒトで見いだされてきた、Slc6A4 のメチル化変化が見られるゲノム領域は、ヒトとマウスで配列が異なっているため、マウスモデルの作成のためには、同じ働きをしているゲノム領域をマウスで探し出す必要があります。そこで、母子分離モデルにおいて、DNA メチル化が変化する Slc6A4 遺伝子のゲノム領域を探索し、見つけることができました。

3) 死後脳における DNA メチル化解析

オリゴデンドロサイト核単離法の検討

私たちはこれまで、亡くなった患者さんの脳から、神経細胞の細胞核を取り出して、DNA メチル化解析を行ってきました。しかし、神経細胞以外は、「非神経細胞」としてひとまとめにして解析していました。しかし、実際には、非神経細胞の中にも、オリゴデンドロサイト、アストロサイトなど、多くの細胞種が含まれています。これらの細胞も、精神疾患との関連が指摘されていることから、これらについても、各々調べる必要があります。そこで、オリゴデンドロサイトの神経核を選択的に集める方法を検討しました。

オリゴデンドロサイトのみを発現している蛋白質である **Olig2** の抗体を使って、セルソーターで分けるだけでは、十分な選択性が得られなかったため、古典的な研究で用いられてきた密度勾配遠心分離法を併用したところ、選択的にオリゴデンドロサイト核を集めることができることがわかりました。

1 塩基レベルの解像度での DNA メチル化解析

私たちはこれまで、亡くなった精神疾患患者さんの脳の神経細胞の DNA で、DNA メチル化変化を見だしてきました。これらは、DNA 中の CG という配列の部分がメチル化されている場合、その DNA に結合する蛋白質(メチル化 CpG 結合ドメイン)を持つビーズによって、ゲノム内のメチル化 CpG を含む部位を濃縮して、どのようなゲノム領域が増幅されたかをマイクロアレイ法で検出していました。この方法では、CG 配列以外(CC、CA、CT)のシトシンのメチル化については調べることができません。

最近になって、次世代シーケンサーによるエピゲノム解析が行われるようになると、これまで CG という配列の場所のみでシトシンがメチル化すると考えられていたのに、脳では、CG 配列以外の場所でもシトシンのメチル化が起きていることがわかってきました。

こうした CG 配列以外の DNA メチル化の精神疾患における役割を解明するには、DNA マイクロアレイではなく、次世代シーケンサーを用いた一塩基レベルのメチル化状態の解析が必要となります。

そこで、DNA 中でも、プロモーター領域等のみを解析できる、**Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)**法という方法を用いて解析を行いました。

統合失調症、双極性障害、対照群、各 5 名を対象とし、神経細胞核と非神経細胞核をセルソーターで単離した後、解析を行いました。予備的な解析では、タイリングアレイで見いだされたメチル化領域がよくメチル化されていることが、1 塩基レベルの解析でも確認できました。CG サイト以外のメチル化状態についても、現在検討を進めているところです。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

- 1 Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2014) A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia. *Mol Brain*. Jan 21 (epub) (doi: 10.1186/1756-6606-7-5)

- 2 Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K (2014) Increased L1 Retrotransposition in the Neuronal Genome in Schizophrenia. *Neuron*, 81: 306-313. (doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.053)

- 3 Mehta D, Iwamoto K, Ueda J, Bundo M, Adati N, Kojima T, Kato T (2014) Comprehensive survey of CNVs influencing gene expression in the human brain and its implications for pathophysiology. *Neuroscience Research*, 79: 22-33. (doi: 10.1016/j.neures.2013.10.009)