

博士論文（要約）

孤発性筋萎縮性側索硬化症患者剖検脳における
神経細胞核特異的 DNA メチル化の検討に基づく
新規分子病態の探索

濱田 健介

背景

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS）は脳および脊髄に存在する上位および下位運動ニューロンが選択的かつ進行性に変性・脱落する難治性の神経変性疾患である。現時点で有効な治療法は確立されておらず、根本的な治療法の確立にむけて ALS の病態生理の解明が急務となっている。

ALS 研究の歴史を振り返ると、1869 年にフランスで最初に報告されて以降、現在までに臨床研究から病理学的研究、そして分子生物学・分子遺伝学的研究と種々のアプローチが用いられてきた。特に 1990 年代以降の分子遺伝学の進歩に伴い、現在までに多数の関連遺伝子が報告されている。RNA 代謝異常、グルタミン酸濃度上昇、酸化ストレスをはじめとして様々な運動ニューロン変性を引き起こす仮説が提案されているが、病態の根本はなお不明な部分が多く、ALS の病態生理の大部分は現時点では未解明であると言わざるを得ない。特に ALS の大多数を占める孤発性 ALS の病態解明には高い壁が立ちはだかっているのが現状である。

そこで、本研究では遺伝子の塩基配列異常に依らない発現調節のメカニズムとして DNA メチル化に着目した。DNA メチル化は哺乳類のゲノムではシトシン残基とグアニン残基の連続した配列（CpG 配列）のシトシン残基中のピリミジン環 5 位の炭素がメチル化されることで起こる。CpG 配列の豊富な部位を CpG アイランドと呼び、特に遺伝子のプロモータ領域に存在する CpG アイランドの近接した複数の CpG 配列がメチル化されると遺伝子発現が強く抑制される。DNA メチル化は様々な外的要因により影響を受けることが知られており、反応は速やかで分から時間単位でメチル化変化が起こる。このことから、様々な外的要因に対応して塩基配列を変更することなく柔軟に遺伝子発現を制御するシステムを形作っていると考えられる。

神経変性疾患における DNA メチル化異常を探索する試みは ALS においても行われており、2000 年代に入ると次々と報告されている。ALS を対象としたゲノム網羅的 DNA メチル化解析は 2009 年に前頭葉（背外側前頭前野）皮質をサンプルとした報告が最初である。2012 年には脊髄をサンプルとした報告があり、いずれも複数の遺伝子でメチル化変化を認めている。近年、片方が ALS を発症した一卵性双生児および三つ子のペアの末梢血を対象とした DNA メチル化解析が報告され、同一の DNA 配列をもつペアの比較により新たに 2 遺伝子でメチル化変化を認めたと報告されている。

これらの研究の問題点としては、同一個体であってもメチル化変化は組織ごとに異なるため、末梢血では神経細胞に起こったメチル化変化が捉えきれないという点がまず挙げられる。また、神経組織を用いても神経細胞と非神経細胞では複数の遺伝子でメチル化が異なるため、神経細胞と非神経細胞をまとめて扱くと、神経細胞に特異的に起こっているメチル化変化を捉えきれない可能性がある。さらに、大脳皮質をサンプルとした場合に ALS では変性を起こす領域の選択性が強いいため、解析に用いた部位によっては ALS による変化を十分に捉えられない可能性があるという問題点もある。

これらの問題点を解決すべく、本研究では中心前回の脳皮質をサンプルとして、さらに運動ニューロンに特異的な変化を検出するために flow cytometry を用いて神経細胞核を分離する手法を用い、分離した神経細胞核から DNA を抽出することで得た神経細胞核特異的 DNA に対してマイクロアレイを用いたゲノム網羅的メチル化解析を行うこととした。そして、塩基配列異常によらない遺伝子発現異常を運動ニューロンに限定して検出し、ALS の新規の分子病態を解明することを目的とした。

方法

本研究では東京大学医学部神経内科学教室において凍結保存されている剖検半脳から孤発性筋萎縮性側索硬化症患者 12 人（男性 7 人、女性 5 人）、正常コントロール 12 人（男性 8 人、女性 4 人）に由来する検体を用いた。

運動ニューロンが選択的に障害されるという ALS の特性から、一次運動ニューロンの細胞体が存在する中心前回を用いて解析する必要があるため、凍結脳から肉眼的に中心前回は同定し切り出した。組織学的な裏付けを行うため、切り出したうちの一部分をさらに切り出し、リン酸化 TDP-43 および SMI32 による免疫染色を行った。

そして、凍結脳の一部を細切したのちに懸濁し、死細胞の DNA 鎖と特異的に結合する 7-Amino-Actinomycin D および NeuN をマーカーとして、セルソーターを用いて神経細胞核を分離した。分離した神経細胞核からフェノール・クロロホルム法を用いて DNA を抽出した。十分量の DNA が得られたことを確認し、得られた DNA に bisulfite 処理を行った後に反応液を調製しマイクロアレイ (Infinium® HumanMethylation450 BeadChip) と反応させた。その後スキャナで読み取り数値データに変換した。

得られた数値データは統計解析環境 R を用いて読み込み、メチル化の指標となる β 値を求めることで、各プローブにおける DNA メチル化を数値化した。その後データの quality check を行い、 β 値の分布を確認した。

次に、データの正規化を行った。その際に、解析に用いた R のパッケージに実装された 4 種類の正規化ルーチンの各々で正規化を行った。その後、サンプルを 2 枚のチップに分けてスキャンしたことによる batch effect の補正をそれぞれ行い、正規化ルーチンの比較を行った。

この得られた β 値をもとにして有意な DNA メチル化変化プローブ (Differentially Methylated Probes: DMP) および DNA メチル化変化領域 (Differentially Methylated Regions: DMR) の検出を試みた。

また、ゲノム全体での平均 β 値の差および p 値の分布を確認するため、全プローブの ALS 群と NC 群の平均 β 値の差および p 値による Manhattan plot を作成した。さらに、有意な DMR を含む遺伝子における領域内の各プローブにおける β 値の相関を確認するため各プローブと β 値の correlation plot を作成した。

そして、DMR のデータから得られた領域群をもとにして Gene ontology 解析および

Pathway 解析を行った。

最後に、臨床情報に基づき ALS 群を bulbar 群と limb 群に細分化し、それぞれ NC 群と比較して DMP および DMR 検出を試みた。

結果

データの quality check を行ったところ、ALS 群 1 例と NC 群 1 例は Intensity 分布が他サンプルと比較して特に異常であったため、以降の解析から除外し ALS および NC 群各 11 例で検討を行うこととした。

batch effect 補正後にプローブ単位で各正規化ルーチン間の相関を確認したところ、いずれも強い正の相関を示した。このため、どの正規化ルーチンも本質的には大きな差がないと考え、以後の解析には過去に多くの研究で用いられている Beta mixture quantile dilation により補正した β 値を用いることとした。

リン酸化 TDP-43 免疫染色の結果、ALS 群において神経細胞において細胞質や突起に染色性が認められ、核内に封入体様の構造物が見られたのに対して、NC 群では同様の構造物は認められなかった。また、SMI32 免疫染色では ALS 群および NC 群いずれのサンプルで陽性に染色される神経細胞が認められ、ALS 群と NC 群で明らかな分布の差は認めなかった。

ゲノム網羅的 DNA メチル化解析の結果、有意な DMP は検出されなかったが、有意な DMR は 22 領域で検出された。このうち、11 箇所の有意な DMR は遺伝子のプロモータ領域に存在する CpG アイランドに存在していた。いずれの DMR も過去に ALS との関連を報告された遺伝子上には存在しなかった。

ゲノム全体を通して、明らかな染色体ごとのメチル化の偏りは見られず比較的一様な分布を示した。また、いずれの DMR においても各プローブでよい相関が見られた。

Gene ontology 解析では、biological process (BP) で有意な term は認めなかったが、cellular component (CC) では 2 個の term、molecular function (MF) では 4 個の term が有意となった。CC では trans-golgi network に関連したものであり、MF では 1 個がメバロン酸経路に、2 個がミトコンドリアにおける脂肪酸代謝に関連していた。Pathway 解析では、PANTHER、BioCyC、MBioDB の 3 個のデータベースを用いて検索したところ、BioCyC のみで 3 個の pathway が有意となった。これらの pathway はミトコンドリアにおける脂肪酸・アミノ酸代謝に関連していた。

臨床情報に基づく細分化では、いずれも有意な DMP は検出されず、bulbar 群で 19 箇所、limb 群で 17 箇所に有意な DMR を検出した。このうち、bulbar 群のみで検出された DMR は 9 箇所あった一方で limb 群のみは 4 箇所であった。

考察

免疫組織化学による検討の結果、ALS 群の神経細胞の核や細胞質に異常なリン酸化 TDP-43 の分布が認められ、ALS 群と NC 群の病理学的裏付けが得られたとともに、SMI32

陽性細胞の存在から切片中の運動ニューロンの存在が組織学的に裏付けられた。

今回の解析では有意な DMP が検出できなかったが、分裂しない神経細胞では癌細胞などとは異なり ALS 群と NC 群との差が小さく、今回のサンプル数では十分な検出力が得られなかった可能性が考えられる。有意な DMR は過去に ALS との関連を報告されていない遺伝子上に検出された。したがって、今回検出された変化は従来知られていなかった孤発性 ALS の新たな病態を示唆している可能性が考えられる。臨床情報による細分化では bulbar 群で DMR に limb 群とは異なった傾向が見られたが、これは臨床像を反映している可能性が考えられる。

ゲノム全体ではメチル化の偏りは見られず、メチル化変化がゲノム全体で同時多発的に種々の外的刺激に反応して起こっていたと考えられる。また、DMR 内の各プローブのメチル化はよい相関を示し、領域単位でのメチル化変化が示唆された。

Gene ontology 解析および Pathway 解析の結果からは有意なメチル化変化が見られた遺伝子群とメバロン酸経路異常、ミトコンドリアにおける脂肪酸代謝やアミノ酸代謝異常との関連および細胞内のタンパク質輸送異常の可能性が示唆され、これらは過去に ALS との関連が報告されているものであった。

一次性か二次性かは判別できないが、様々な要因で DNA メチル化変化が起こり、その結果として発現異常を介して運動ニューロン変性につながっている可能性が考えられた。

本研究で検出された有意なメチル化変化領域からは上位運動ニューロンにおける DNA メチル化異常を介した新たな分子病態が示唆された。特に、メバロン酸経路、ミトコンドリアにおける脂肪酸およびアミノ酸代謝異常、細胞内におけるタンパク質輸送障害が DNA メチル化異常による発現調節異常を原因として起こり、孤発性 ALS の病態に強く関わっている可能性が考えられた。