

# 論文の内容の要旨

論文題目

アルツハイマー病における神経細胞特異的 DNA メチル化解析による新規病態基盤の探索

氏名

間野 達雄

## 背景

アルツハイマー病(AD)は高齢者認知症のなかで最大の認知症疾患であり、高齢化する社会において重要な課題であることは論を待たない。アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ )の沈着、リン酸化タウ沈着(神経原線維変化)、といった病理学的変化は捉えられているが、このような病理学的変化が神経細胞機能障害に至る分子メカニズムは十分に解明されておらず、根本的な治療法はまだ存在しない。

ほとんどが孤発性である AD は、原因遺伝子から演繹的に病態解明をすることのできる遺伝性疾患とは異なり、細胞内のタンパク発現変化の全体像を把握することが病態解明で必須である。遺伝的背景では *APOE*  $\epsilon 4$  が大きな要素であり、その役割はかなりの程度まで明らかになってはいるが、 $\epsilon 4$  陰性 AD 患者も 4 割程度は存在する。また、これまでの GWAS(Genome Wide Association Study) 解析を通して、一貫性があり生物学的な意義付けから治療法開発につながった遺伝子は見つかっていない。mRNA を対象としたトランスクリプトーム解析も行われてきているものの、病態解明において一貫した結果には至っていない。

本研究ではタンパク質の発現を制御しているエピゲノムから細胞内の分子病態にアプローチした。エピゲノム変化をターゲットとするメリットとしては、①細胞特異性が高い、②死後脳においても安定である、③解析可能な細胞数が多い、という点が挙げられる。逆に遺伝子の発現変化については間接的な情報となる点は問題だが、死後脳を解析する様々な方法の中でバランス良い方法と考えた。AD とコントロールの剖検脳から神経細胞核を分取し、エピゲノムワイドに DNA メチル化解析を行うことで新規病態を探索し、細胞・マウスモデルでの検証を行った。

## 研究の概要

### 対象としたヒト検体のプロフィール

検体として使用した剖検脳は、AD 患者 30 人(男性 15 人、女性 15 人)、正常コントロール 30 人(男性 15 人、女性 15 人)に由来する検体を用いた。平均年齢は AD 群  $79.4 \pm 7.4$  歳、正常コントロール群(以下 NC 群)  $76.7 \pm 7.4$  歳(平均  $\pm$  SD)で群間の有意差はなく、AD の危険因子である *APOE*  $\epsilon 4$  アレルの保有率は、AD 群 67%、NC 群 27%と妥当な範囲であった。

### 神経細胞特異的な DNA メチル化変化の検出

神経細胞に特異的な DNA メチル化を検出するため、Iwamoto ら(2011)の方法に則り剖検脳の下

側頭回皮質から細胞核を精製し、FACS(fluorescence activated cell sorting)を用いて神経細胞核・非神経細胞核を分取した。DNAを抽出し、Bisulfite変換を行った後、Illumina社製 Infinium HumanMethylation450 Beadchip (Infinium 450k)で解析を行った。

得られたデータはRを使って解析を行った。idat形式ファイルの読み込み、Quality control、正規化(BMIQ: Beta Mixture Quantile dilation(Teschendorff, 2013))はBioconductorのChAMPを用いて実施した。チップごとのbatch effectの補正を行うことでより正確なデータ比較を実現した。

解析の結果278個所のメチル化変化(Differentially methylated probe: DMP)を認めた。DNAメチル化による遺伝子の発現制御が領域単位で行われることをふまえて、3連続以上のDMPを認めた領域を抽出し、8領域のメチル化変化領域(Differentially methylated region: DMR)を検出できた。3遺伝子についてはプロモーター領域のCpGアイランドにDMRが含まれており、特に重要であると考えさらに解析を行った。

### **Pyrosequence 法による DNA メチル化変化解析**

Infinium 450kにより見出したDMRのvalidationと、これらの変化の疾患特異性および組織特異性を評価するため、pyrosequence法によるDNAメチル化解析を行った。

全てのDMRについて、Infinium 450kでみられたDNAメチル化変化をPyrosequence法でも確認することができた。同変化はレビー小体型認知症では認めず、AD特異的な変化であることが推定された。

中枢神経系では、下側頭回 NeuN 陰性核由来のDNA、小脳 NeuN 陽性核由来のDNAにおいても、これらのDMRにおいて一部分布は異なるながらDNAメチル化変化を認めた。一方で、別の被験者セットからのゲノムDNAの解析ではあったが、末梢血由来DNAではこのようなメチル化変化は認めなかった。このことは今回見出したDMRが中枢神経系に特異的であることを示していると考えられた。

### **脳検体による RT-qPCR**

DNAメチル化解析とは異なる剖検脳の下側頭回からRNAを抽出し、RIN(RNA integrity number)が7以上の検体を選択し、AD群9検体、NC群9検体をえて、RT-qPCRで発現解析した。検討した3遺伝子のうち2遺伝子に関して、DNAメチル化解析から予想された発現変化をmRNAレベルにおいても確認することができた。

### **疾患脳切片の免疫染色**

mRNAレベルの発現が有意に増加していた2遺伝子について、その遺伝子産物に関する免疫染色を、剖検脳パラフィン切片を用いて行った。一方の遺伝子はDNA修復に関連したものであり、AD群において、海馬CA1、嗅内皮質の神経細胞に細胞質で強い染色性を認め、また間質内の神経突起と考えられる構造がThread様に染色された。同変化は前帯状回、頭頂葉にも認められたが、後頭葉には認められなかった。AD病理の分布と有無・強弱は基本的に一致しており、ADの病理学的変化の進行と並行してこのような細胞質における染色性が増加していくことが予想された。Braak stage 3レベルの初期AD変化が見られる剖検脳においては、このような細胞質における染色性は海馬CA1

でみられたものの、嗅内皮質では認めなかった。この病期では嗅内皮質にリン酸化タウの沈着・神経原線維変化はすでに起きており、従って同変化は神経原線維変化の後に生じるものであると考えられた。本来、DNA 修復に関連した核に局在する本遺伝子産物が、このように細胞質において増加することは、発現増加とともに何らかの質的变化を起こしている可能性が考えられたため、以下では、本遺伝子産物に関する生物学的意義の解析を行った。

もう一方の遺伝子産物についても AD の海馬 CA1、嗅内皮質で神経細胞の細胞質にわずかながら発現増加を認めたものの、前記の遺伝子産物と比較してその染色性の変化は軽微なものであったため、以下に行った生物学的意義に関する解析では除外した。

### **疾患脳検体の発現解析**

解析対象とした遺伝子産物のタンパク質レベルでの発現変化、およびその可溶性を評価するため、脳組織の可溶性分画をおこない Western blot で解析した。本遺伝子産物は AD 群でのみ Sarkosyl 可溶性分画、不溶性分画に抽出された。この結果から、AD 群において本遺伝子の発現が増加しているもの、不溶化して機能喪失した分子が蓄積していることが示された。

### **メチル化解析において見出した遺伝子産物の細胞および動物モデルを用いた解析**

$A\beta$  の本遺伝子発現への影響を評価するため、N2a および APPswe ( $A\beta$  1-42 の産生量が増加する家族性 AD の変異)を発現した N2a 安定細胞株(N2a swe.10)を使用した。N2a swe.10 では、蛍光免疫染色で  $\gamma$ -H2AX の focus 形成をみとめ、DNA damage および修復が生じていることが示された。本遺伝子の発現は N2a に比較して N2a swe.10 において増加しており、Compound E によって  $A\beta$  産生を阻害すると本遺伝子の発現は減少した。このことから  $A\beta$  によって DNA damage が誘導されるが、DNA 修復において重要な本遺伝子の発現が増加するによって修復が誘導され、DNA の断片化には至らなかったと考えられた。このような現象は、APP/PS1 マウスにおいても確認することができた。

本遺伝子産物の不溶化に対するリン酸化タウの関与を仮定して、3xTg AD マウスの検討を行った。まず病理学的変化の確認として、 $A\beta$  病理およびタウ病理を免疫染色で確認した。本遺伝子産物は海馬 CA1 神経細胞の細胞質において月齢に従い増加・明瞭化した。また同時に DNA damage・断片化が増加しており、12ヶ月齢海馬ではリン酸化タウ不溶化とともに本遺伝子産物も不溶化していた。

## **今回の研究から得られた知見**

剖検脳の神経細胞特異的 DNA メチル化解析の結果から、複数の遺伝子に関連した DNA メチル化変化、mRNA レベル・タンパク質レベルの発現変化を新たに見いだすことができた。特に生物学的意義について検討した遺伝子産物については、発現量のみならず、不溶化して機能喪失したタンパク質の沈着という、AD の神経変性過程を考える上で重要な現象を見いだすことに成功した。モデル系の検討から  $A\beta$  による DNA damage が生じるものの、通常であればメチル化解析から見出した DNA 修復タンパク質の発現誘導による修復が起きているが、さらに不溶化したリン酸化タウが存在するとこのタンパク質の不溶化が生じ、DNA 修復機構の破綻に至ることが示された。