

## 論文の内容の要旨

論文題目 レビー小体病の DNA メチローム解析による新規病態の探索

氏名 土田剛行

パーキンソン病は、神経変性疾患ではアルツハイマー病について高い有病率を有する疾患である。また、レビー小体病はアルツハイマー病に次ぐ変性性の認知症の背景疾患である。パーキンソン病、認知症を伴うパーキンソン病、及びレビー小体病は疾患像は異なる面もあるが、病理学的にはいずれも  $\alpha$ -シヌクレインを主成分とするレビー小体を起点に同一スペクトラム上で捉えられる疾患であり、これらを総称してレビー小体病としている。本症の発症機序に関しては、従来より病理学的・生化学的等各種手法で検討されてきたが、特に分子病態に関してはパーキンソン病症例の 5-10%とみられる家族例の遺伝子解析を中心に進んできた。そのなかで *SNCA*、*LRRK2*、*DJ-1* などといった疾患関連遺伝子が発見され、病態の解明に寄与してきた。一方、症例の大半を占める孤発例においては、世界レベルでのゲノムワイド関連解析 (Genome-wide association study; GWAS) まで行われているが、これまでの研究の成果でもその病態を十分に説明しきれぬものではなかった。

孤発性疾患に対し、ゲノム解析と異なるアプローチとしてエピゲノム解析が挙げられる。近年はエピゲノム解析による知見が蓄積され始めているが、ことさら網羅的な DNA メチローム解析の報告は、疾患関連遺伝子として挙げられた遺伝子群はいずれも重複なく、こちらも依然として病態の十分な解明にはいたっていない。このうち、剖検脳検体を用いたエピゲノム解析に関しては、多くの先行研究では細胞種の分離が行われていないため、神経細胞のエピゲノム変化が非神経細胞の情報に隠されてしまい、十分に検出できていない可能性があると考えられる。この解決のためには、

fluorescence activated cell sorting(FACS)を用いることにより神経細胞核のみを分離し、そのうえで神経細胞特異的な DNA メチローム解析を行うという手法が考案されている。実際に、アルツハイマー病剖検脳を、この手法を用いて神経細胞特異的な DNA メチローム解析を行ったところ、疾患群で *BRCA1* のプロモーター領域の DNA 脱メチル化が認められ、また *BRCA1* の発現が上昇していることが明らかにされた。

このため、今回、レビー小体病症例について、神経細胞特異的な DNA メチローム解析を行うことを試みた。

我々は、凍結剖検脳を健康長寿医療センターブレインバンクから主に提供を受け、レビー小体病と診断された 31 例の凍結剖検脳及び 31 例の正常コントロール群から、神経細胞マーカーである抗 NeuN 抗体を用いて神経細胞核のみを分離し、Illumina 社の Infinium HumanMethylation450K BeadChip による DNA メチローム解析を行った。これを R の Bioconductor パッケージの一つである ChAMP を利用することにより、differentially methylated probes(DMPs)を抽出した。さらに、遺伝子発現を変化させる DNA メチル化変化は領域単位で制御されていると考えられていることから、4 プローブ以上連続して DNA メチル化変化が認められる部位を検索し、これを differentially methylated region(DMR)と定義した。さらに、この DMR 中の遺伝子との位置関係を検索し、遺伝子の発現に強く影響を及ぼしうる部位に DMR が存在する遺伝子群を絞り込んだ。その結果、発現が変化している可能性があった 7 遺伝子を特定した。その中で、今回 *FGFR3*(fibroblast growth factor receptor 3)に着目して以降の解析を行った。今回注目した *FGFR3* のメチル化上昇は gene body 内において生じており、これは当該遺伝子の発現上昇をきたすことを示唆している。

*FGFR3* の DMR の部位について、pyrosequencing 法で DNA メチル化の再現性を検証した。その結果、NeuN 陽性群については DNA メチローム解析と同様の傾向を示していた一方、NeuN 陰性群については疾患群と正常コントロール群で有意差は認めなかった。この結果は、*FGFR3* の DNA メチル化変化が神経細胞を中心に生じていることを示している。

次いで、東京都健康長寿医療センターブレインバンクから提供されたホルマリン固定パラフィン包埋切片の免疫学的染色を行い、免疫組織学的検討を行った。この結果、特に疾患群の前帯状回において、抗 *FGFR3* 抗体で濃染される神経細胞を多数認めた。切片が疾患群・正常コントロール群いずれに属するか知らされていない第三者によるカウントを行ったところ、前帯状回切片において有意に濃染神経細胞が多く認められた。ここまでの結果から、レビー小体病症例では、神経細胞で *FGFR3* の発現

が亢進していることが示唆された。同時に、*FGFR3* の DNA メチル化は神経細胞のみ変化していたため、bulk の脳を使用した検討ではその差を見いだしがたいことが予想された。

*FGFR3* について、凍結脳の mRNA レベルでの発現解析を行った結果、疾患群と正常コントロール群で発現量に有意差は認めなかった。また凍結剖検脳からタンパクを抽出し、Western blotting を行ったところ、*FGFR3* は両群で発現量に有意差は認めなかった。

現時点で検索可能な範囲で、*FGFR3* とレビー小体病との直接的な関係は知られておらず、神経細胞特異的な DNA メチローム解析により新たな知見を得られたものとする。