

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究班

研究代表者 小久保 康昌

三重大学大学院地域イノベーション学研究所

研究要旨

牟婁病の分子病態を明らかにするためには脳内、それも神経細胞内でどのような遺伝子発現変化が生じているかを検討する必要がある。このためには神経細胞特異的な遺伝子発現変化を捉える技術が必要となるが、トランスクリプトーム解析では剖検脳で生じている死後変化による影響が避けられない。我々はそれを解析するためにより安定なエピゲノム変化を検討することとした。これにはまず特定遺伝子の CpG メチル化を解析し、MAPT 遺伝子について正常コントロールとの差異を見いだした。一方で、神経細胞核を特異的に分離する事で特異的なエピゲノム変化を捉える方法を採用し、特にゲノムメチル化に注目して検討を行った。これにより 471 と非常に多数の遺伝子のメチル化が正常対照と比べて変化していることを明らかにした。また、ALS, PDC の病型間で比較したところ、3 つの遺伝子のメチル化が有意に変化している事が明らかとなった。

研究分担者氏名：岩田 淳

所属機関名：東京大学大学院医学系研究科
分子脳病態科学

A.研究目的

三重県南部に多発する家族性認知症・パーキンソン症候群(牟婁病:ALS/PDC)の病態解明を目的とし、エピゲノム解析からのアプローチにより表現形の違いとエピゲノム情報との関連の有無について検討する。ゲノム DNA の CpG メチル化は当該遺伝子の発現に影響を及ぼす事が知られている。本疾患は家系内においてパーキンソニズム(PDC)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)といった表現形が異なる事が知られている。特に、時代の変遷によって ALS の表現形が減少し、PDC の表現形が増加しており、その原因としてエピゲノム情報の変化を想定した。本研究は、1. エピゲノムのうちゲノム CpG メチル化の変化を測定する事で牟婁病特異的な変化を同定すること、及び 2.臨床病型の違いが

DNA のメチル化変化によって切り分けることができるかを明らかにすることにより、これら病態の分子基盤を解明することを目的とする。このために、病理学的に重要と考えられる特定の遺伝子のエピゲノム変化を検討する方法論、及び神経細胞特異的なエピゲノム変化を網羅的に検討する方法論の二方向から検討を行った。

B.研究方法

まずは、ゲノム DNA の CpG アイランドのメチル化について特定の遺伝子について検討した。対象は 16 例でそのうち PDC は 8 例、ALS は 8 例。脳の部位としては側頭葉 14、頭頂葉 3、小脳 1 であった。我々が所有する側頭葉 88、頭頂葉 90、小脳 78 例を正常対照として使用した。選定した遺伝子としては MAPT, GSK3B, APP, SNCA であり、三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群と病理学的に類似性のある神経変性疾患の関連遺伝子とした。それぞれの遺伝子で解析する CpG アイランドについてはアルツハイマー病、パーキンソン病などで我々が異常を同定した

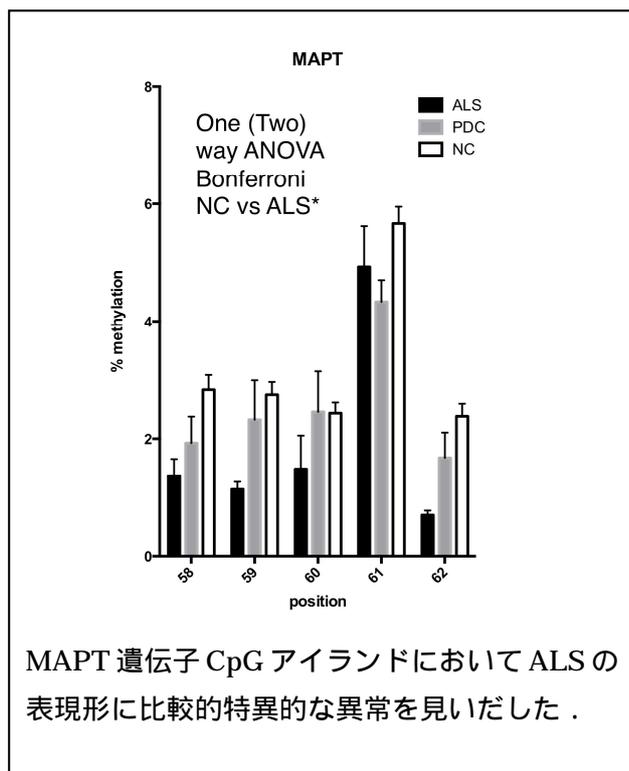
部位に設定した。メチル化率は bisulfite 変換後の PCR を使用した pyrosequencing 法によって測定した。一方で、年齢を適合させた牟婁病患者 10 名、健常者コントロール群 10 名の剖検脳を用いた。側頭葉から抗 NeuN 抗体を用いたフローサイトメトリーを行い、神経細胞核のみを選択的に抽出、そこから DNA 抽出を行った。抽出した DNA は Bisulfite 変換を行い、Illumina 社製 HumanMethylation450 BeadChip を用いてゲノム上の各 CpG についてメチル化の定量を行った。

(倫理面への配慮)

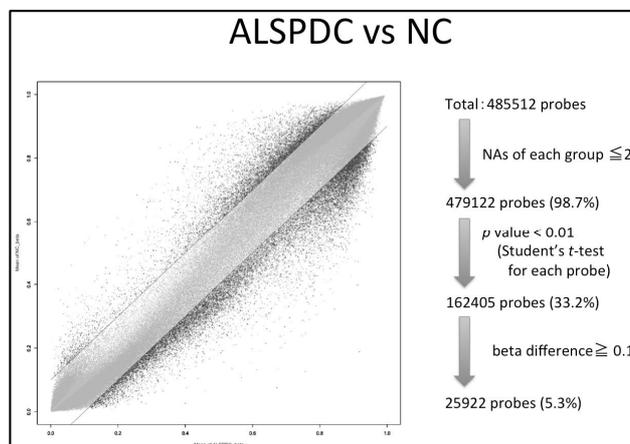
検体はすべて文書による同意取得済みであり、匿名化されている。当該課題は東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて審査の上承認されている(2186-(7))。

C.研究結果 (図表を 1 ~ 2 点添付)

1. *MAPT*, *GSK* 遺伝子においてそれぞれ 1 箇所ずつ正常対照と比べて ALS もしくは PDC の表現形間で有意差の見られる CpG を同定した。特に *MAPT* 遺伝子での異常は連続する CpG にお



いて共通しており、遺伝子発現変化に与える影響



が強いことが想定される。別途行っている解析では、同部位の CpG メチル化低下は下流遺伝子の発現を増加させる可能性が示唆されており、ALS の表現形において *MAPT* の発現亢進が想定される。

2. 牟婁病患者10名の平均年齢は70.9歳であった。臨床病型としては、ALS型5名、PDC型5名であり各平均年齢は68.6歳(63-73歳), 73.2歳(70-79歳)であった。健常者コントロール群について平均年齢は71.5歳であった。Student t検定 p 値<0.01, β 値の牟婁病と正常コントロール群間差0.1以上をカットオフとし、25922プローブが検出された。個々のデータのばらつきが大きいこと考慮するとともに、メチル化による遺伝子発現制御のためには連続した一定領域のメチル化変化が起きているということ仮定して、抽出したプローブ群のなかで3カ所以上連続しているプローブを選択し、1380プローブまでの絞り込みを行った。これらのプローブのうち、遺伝子に関連したプローブは909カ所で471遺伝子と関連しており、特に発現調整にもっとも重要と考えられるTSS200またはTSS1500に含まれたプローブは254カ所、これらは123遺伝子に関連しているものであった。これらの遺伝子群の機能的内訳としては、シナプス伝達、細胞骨格、転写抑制などに関与するもの多く見られ、牟婁病の特異的病態を表しているものと考えられた。

一方で、臨床病型によって分け、同様の基準(p値<0.01, ALS/PDC群間差0.10, 連続3プローブ以上)でプローブを選定したところ, 29プローブが選定され, ZIC1, ZIC4, LOC145845の3遺伝子が残った。ZIC1,4は双方とも3q24に存在し, Dandy Walker syndrome(先天性小脳形成異常)の原因遺伝子の一つである。

D. 考察

牟婁病では特定遺伝子のメチル化に異常を来している事が判明した。異常は病理学的に類似するアルツハイマー病と同様の変化に加えて, 牟婁病に特異的なものも観察された。さらに, ALS/PDCの表現型間でメチル化の異なる遺伝子も同定され, それぞれの病型の違いを説明しうる可能性が示唆された。

E. 結論

牟婁病におけるエピゲノム異常を複数同定した。分子病態の一層の理解に貢献する結果と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし