

95. DNA メチル化量による認知症スクリーニング法の開発

小林 伸行

東京慈恵会医科大学 医学部 ウイルス学講座

Key words : 認知症, DNA メチル化, アルツハイマー病, 軽度認知機能障害, 診断バイオマーカー

緒言

認知症の増加は大きな社会問題となっており、早期診断と早期介入を行うことで、患者・介護者の QOL を向上させ、予後を改善させることが求められている。しかし、症状が軽微な段階では、専門医療機関の受診に至ることが少なく、また認知症の前駆状態である軽度認知機能障害 (MCI) ではさらに早期診断が困難となる。

我々はアルツハイマー病 (AD) の前駆段階である健忘型 MCI (aMCI) と AD の患者で、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の再活性化が起きており、抗体価測定が早期診断のバイオマーカーとして有用であることを報告した¹⁾。その後も HSV-1 を始めとしたウイルス感染と AD との関連が報告され、ウイルス感染は認知機能に影響を与えることが示唆される。ウイルス感染は DNA メチル化に影響を与えることが知られており、我々は認知症疾患における、血液中の DNA メチル化量の変化に着目した。AD では、脳内の DNA メチル化量が変化していることが報告されている。しかし、臨床現場で使用可能となる血液中の DNA メチル化量を診断バイオマーカーとして、利用する方法は依然として確立されていない。

そこで、本研究では、AD の他、aMCI、前頭側頭型認知症 (FTD) やレビー小体型認知症 (DLB) を対象として、DNA メチル化量の変化を網羅的に測定し、これらが診断バイオマーカーとして認知症疾患のスクリーニングに有用となるか検討することを目的とする。併せて、これらの神経変性に対する影響を検討する。

方法および結果

1. 対象

東京慈恵会医科大学附属病院並びに同柏病院に通院中の AD 30 名、aMCI 28 名、FTD 4 名、DLB 4 名ならびに順天堂大学医学部附属順天堂医院にてリクルートした健常人 (NC) 30 名を対象とした。また、本研究は東京慈恵会医科大学ならびに順天堂大学倫理委員会の承認を得て行った。

2. 網羅的 DNA メチル化解析

まず、NC、aMCI および AD 各群 4 例の少数で、Illumina Infinium HD Methylation Assay (Illumina, Inc.) により、血液中全ゲノムに対して、網羅的に DNA メチル化量を定量した。その結果、NC、aMCI、AD の順に有意に DNA メチル化量が増加する CpG 部位が 156 箇所あった。このうち、University of California Santa Cruz (UCSC) ゲノムブラウザ・データベースに登録されている遺伝子に存在するのは 129 箇所であった。さらに、プロモーター領域で、CpG 部位の出現頻度が高い領域 (CpG アイランド) に存在するのは、11 箇所であった (表 1)。このうち、認知症の診断に用いられるミニメンタルステート検査 (MMSE) スコアと相関する CpG 部位は 4 箇所であり、これらは、*NCAPH2* (*LMF2*)、*COASY*、*SPINT1*、*RERG* 遺伝子領域に存在した²⁾。

表1. 網羅的 DNA メチル化解析により得られた候補遺伝子部位

| Target ID | UCSC REFGENE NAME |
|------------|-------------------|
| cg01756799 | COASY |
| cg06695761 | SGCE; PEG10 |
| cg08727202 | MPST; TST |
| cg09898695 | SPINT1 |
| cg13523072 | COASY |
| cg13947830 | MIB2 |
| cg19205533 | RERG |
| cg23779106 | DUSP12 |
| cg25152348 | NCAPH2; LMF2 |
| cg26812418 | CPE |
| cg27173717 | MFSD2A |

Illumina Infinium HD Methylation Assay の target ID とそれに対応する遺伝子を示した。

3. *NCAPH2* (*LMF2*) 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化解析

上記により得られた *NCAPH2* (*LMF2*) 遺伝子プロモーター領域に存在する CpG 部位を含む領域について、AD 30 名、aMCI 28 名、NC 30 名を対象に、パイロシーケンスにより DNA メチル化量を測定した。この領域には CpG 部位を 4 つ含むが、全ての CpG 部位で aMCI と AD は NC と比較し、有意な変化を認めた (図 1A-D) [2\)](#)。さらに、*NCAPH2* (*LMF2*) のプロモーター領域の DNA メチル化量は一つを除いて、海馬傍回の萎縮と正の相関を認めた ($\rho = 0.44$, $P = 0.003$; $\rho = 0.42$, $P = 0.005$; $\rho = 0.24$, $P = 0.11$; $\rho = 0.34$, $P = 0.024$; $n = 44$, Spearman's rank correlation coefficient; 図 1E) [3\)](#)。

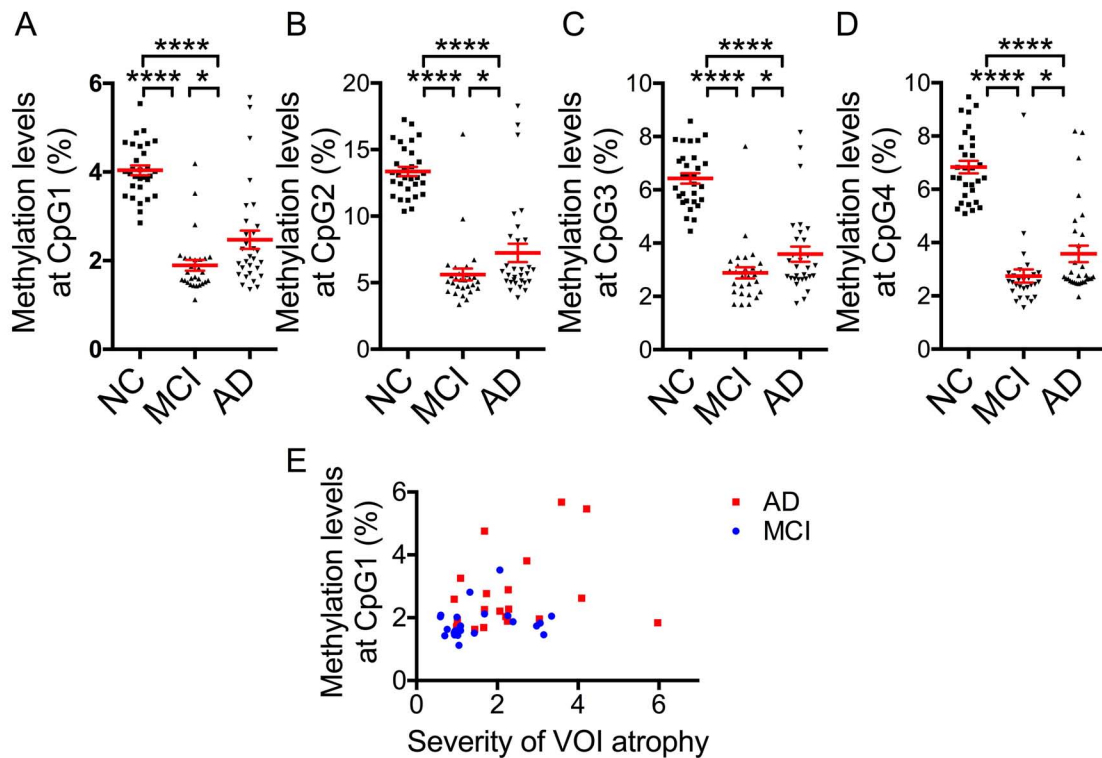


図1. *NCAPH2* (*LMF2*) 遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化量および海馬傍回の萎縮との相関

(A-D) NC、aMCI、AD3群での各CpGメチル化量の比較。赤線の値は平均をエラーバーはS.E.Mを示した。

* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 、年齢を共変数とした共分散分析。(E) CpGメチル化量とVSRADによる海馬傍回の萎縮との相関。青点はaMCI、赤点はADを示した。

4. *COASY*、*SPINT1* 遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化解析

COASY、*SPINT1* 遺伝子プロモーター領域に存在するCpG部位を含む領域について、methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) 法により、DNAメチル化量を定量した。その結果、aMCI及びADで、NCと比較し、有意にDNAメチル化量が高かった(図2A、B) [4](#))。さらに、ADにおいて、*COASY* 遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化量と認知症の重症度を示すClinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes (CDR-SB) は正の相関を示した。また、抗HSV-1抗体陽性者で*SPINT1* 遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化量が高かった(表2)。

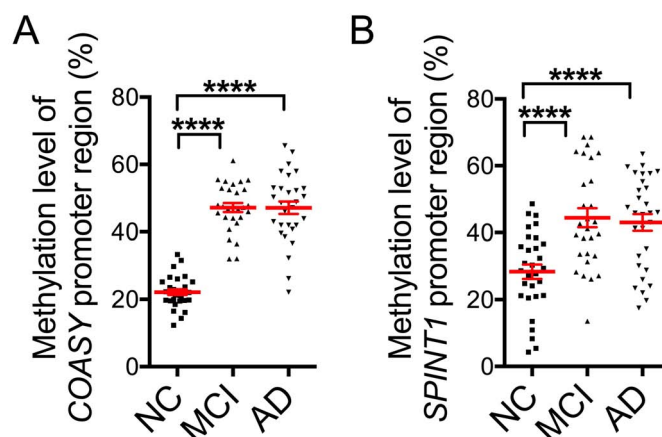


図2. *COASY*、*SPINT1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量

(A, B) NC、aMCI、AD3 群での DNA メチル化量の比較。赤線の値は平均をエラーバーは S.E.M を示した。**** $P < 0.0001$ 、一元配置分散分析と Scheffe の方法。

表2. *COASY*、*SPINT1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量と認知症の重症度及び HSV-1 感染との関連

| | NC (n = 30) | MCI (n = 28) | AD (n = 30) | All subjects (n = 88) |
|---|-------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| <i>COASY</i> methylation level vs CDR-SB | - | n.s. | $\rho = 0.529, P = 0.003^{**}$ | n.s. |
| HSV-1 carrier | - | n.s. ^a | n.s. ^b | n.s. ^c |
| <i>SPINT1</i> methylation level vs CDR-SB | - | $\rho = -0.414, P = 0.029^{*}$ | n.s. | n.s. |
| HSV-1 carrier | - | n.s. ^a | $P = 0.022^{*b}$ | $P = 0.033^{*c}$ |

DNA メチル化量と CDR-SB との相関を Spearman's rank correlation coefficients で調べた。

また、抗 HSV-1 抗体の有無による DNA メチル化量の差を Welch's t-test により比較した。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ^a $n = 27$, ^b $n = 28$, ^c $n = 55$.

5. aMCI、AD、FTD、DLB、及び NC との比較

FTD、DLB の各群 4 名を対象として、Illumina Infinium HD Methylation Assay を用いて、同様に網羅的な DNA メチル化解析を行った。少数での予備的検討であるが、FTD、DLB においても、*COASY* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量は aMCI、AD と同様に NC と比較して、上昇していた。*NCAPH2* (*LMF2*) 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量は、FTD では、aMCI、AD と同様に NC と比較して、上昇していたが、DLB では、有意な変化を認めなかった。*SPINT1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量は、DLB、FTD では、NC と比較し、有意な変化を認めなかった。

考 察

本研究の結果、aMCI、AD を始めとする認知症疾患では、血液中で様々な遺伝子領域の DNA メチル化量に変化していることが明らかとなった。とくに、*NCAPH2* (*LMF2*)、*COASY*、*SPINT1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量は大きく変化しており、認知症疾患の早期診断バイオマーカーとして役立つことが期待された。さらに、認知症疾患の鑑別にも有用となることが示唆された。

しかし、DNA メチル化量の変化が認知症疾患で認める神経変性の原因となるか、その結果として生じているものかは不明である。また、認知症疾患と関連のある DNA メチル化変化を引き起こす原因についても不明である。今後、これらを明らかにしていく必要がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学 医学部 精神医学講座の品川俊一郎である。
最後に、本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kobayashi N, Nagata T, Shinagawa S, Oka N, Shimada K, Shimizu A, et al. Increase in the IgG avidity index due to herpes simplex virus type 1 reactivation and its relationship with cognitive function in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;430(3):907-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.054. PubMed PMID: 23261465.
- 2) Kobayashi N, Shinagawa S, Nagata T, Shimada K, Shibata N, Ohnuma T, et al. Development of Biomarkers Based on DNA Methylation in the NCAPH2/LMF2 Promoter Region for Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PloS one*. 2016;11(1):e0146449. doi: 10.1371/journal.pone.0146449. PubMed PMID: 26742120.
- 3) Shinagawa S, Kobayashi N, Nagata T, Kusaka A, Yamada H, Kondo K, et al. DNA methylation in the NCAPH2/LMF2 promoter region is associated with hippocampal atrophy in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment patients. *Neurosci Lett*. 2016;629:33-7. doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.055. PubMed PMID: 27356276.
- 4) Kobayashi N, Shinagawa S, Nagata T, Shimada K, Shibata N, Ohnuma T, et al. Usefulness of DNA Methylation Levels in COASY and SPINT1 Gene Promoter Regions as Biomarkers in Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PloS one*. 2016;11(12):e0168816. doi: 10.1371/journal.pone.0168816. PubMed PMID: 27992572; PubMed Central PMCID: PMC5167410.