

自閉症脳におけるエピジェネティクス解析

研究代表者：岩田 圭子（子どものこころの発達研究センター・特命助教）

概要	自閉症死後脳におけるメチル化異常の解明
	最新の研究から自閉症の病因には環境要因が深く関与していることが報告され、遺伝的要因と環境要因のインタラクションが病因に寄与していることが示唆されている。また、自閉症の病態にはセロトニン神経系の異常が指摘されている。セロトニン神経の細胞体は raphe に存在し、縫線核は環境因子に対して感受性が高いことが示唆されている。本研究課題では、自閉症死後脳（縫線核）を用い、遺伝的要因-環境要因インタラクションをエピジェネティクス（特に DNA メチル化）の観点から解明することで自閉症の病因・病態メカニズムの解明、更には予防法および治療法の開発に利用する。
関連キーワード	自閉症、エピジェネティクス、DNA メチル化、死後脳、環境因子

研究の背景および目的

自閉症の病因は遺伝的要素が強いと考えられてきた。そのため世界中で原因遺伝子の同定が試みられ、これまでに多数の候補遺伝子が報告されているが、その同定には至っていない (Folstein and Rosen-Sheidley, 2001; Toro et al., 2010)。近年、自閉症の遺伝的要因はこれまで見積もられていたよりも低いこと、さらに環境要因が本疾病に大きな影響を与えていることが報告された (Hallmayer et al., 2011)。一方、環境要因は DNA メチル化やヒストン修飾のようなエピジェネティック過程に影響を与えることが解明されつつあり、エピジェネティック過程は遺伝的要因と環境要因のインターフェースであると考えられている。以前より自閉症スペクトラム障害やその辺縁疾患（アンジェルマン症候群、プラダー・ウィリー症候群、レット症候群、脆弱 X 症候群など）には、DNA メチル化制御を受けるゲノムインプリンティングや X 染色体不活性化の異常が関与していると言われてきた (Reviewed in Dagli et al., 2012; Cassidy et al., 2012; LaSalle et al., 2009; Cedar et al., 2012)。これらのことから、エピジェネティック過程、特に DNA メチル化が自閉症の病因に関与していると考えられる。

一方、自閉症の病態にはセロトニン神経系の異常が強く示唆されている (Schain and Freedman, 1961; Hanley et al., 1977; Cook, 1990; Anderson et al., 1990; McBride et al., 1998; Mulder et al., 2004; Hranilovic et al., 2007)。さらに、我々はセロトニン・トランスポーターをポジトロン断層法により、自閉症者の脳内で広範囲にわたりセロトニン・トランスポーターの機能が低下していることを見出している (Nakamura et al., 2010)。また、セロトニン神経の細胞体は縫線核に存在し、raphe は環境因子に対して感受性が高いことが示唆されている。

そこで本研究では、アメリカ脳バンク (autism tissue program) から提供を受けた自閉症者および定型発達者の死後脳（縫線核）を用いメチル化状態を解析する。メチル化解析にはプロモーター領域だけでなく、intra および intergenic 領域の解析が可能な Infinium HumanMethylation450 BeadsChip アレイを用い、網羅的にメチル化異常サイトを解析・同定し、それを基に自閉症の病因・病態メカニズムの解明、更には予防法および治療法の開発に利用することを目的とする。

研究の内容および成果

研究の内容

アメリカ脳バンク (autism tissue program) から提供を受けた自閉症者および定型発達者死後脳（縫線核）を用い、これらから genomic DNA (gDNA) を抽出した。この gDNA についてメチル化解析用アレイ (Infinium HumanMethylation450 BeadsChip)

を用い、網羅的にメチル化異常サイトを以下のよう
に解析・同定した。1) コントロールのメチル化率の平均と自閉症のメチル化率の平均を比較・検討した。また、自閉症は単一因子による疾患でないことが示唆され、個々に要因が異なる可能性が示唆されている (Baron-Cohen et al., 2011) そ

ここで、2) コントロールの平均に対する個々の自閉症サンプルの値の差も検討した。

成果

自閉症脳において 189 個の differentially methylated regions (DMRs)を見出した (図 1)。また、図 2 に示すように、ほとんどの DMRs がプロモーター領域 (56 CpG sites; 30%), gene body (61 CpG sites; 32%) および intergenic (67 CpG sites, 35%) regions に認められ、少数ではあるが 3' UTR regions にも認められた (5 CpG sites; 3%)。

これらの DMRs が見出された遺伝子の中で、*AFF2*, *DLGAP2*, *NRXN1*, *TH*, *NUFI1*, *RORA*, *POMT2*, *TRAPPC9*, *MOG*, *HDLBP*, *PKDI*, *NXF2B* および *NCOR2* はこれまでに自閉症および関連疾患との関与が示唆されている。

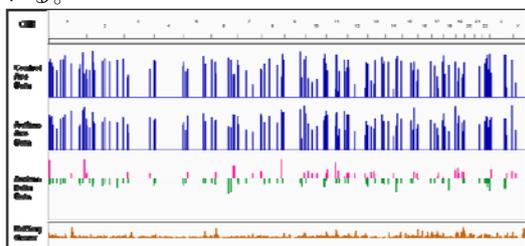


図 1. 定型発達者と自閉症者の平均における differentially methylated regions (DMRs)

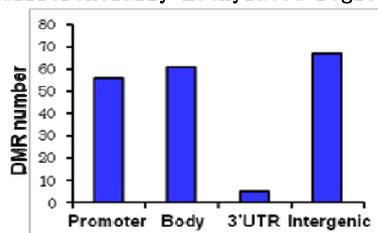


図 2. それぞれの配列における DMRs

続いて個々の自閉症サンプルの値の差 individual-specific differential methylated regions (IS-DMRs)も検討した。その結果、523 個の IS-DMRs を見出した (図 3)。また、DMRs の際と同様に、ほとんどの IS-DMRs がプロモーター領

域 (105 CpG sites; 20%), gene body (220 CpG sites; 42%) および intergenic (170 CpG sites, 33%) regions に認められ、少数ではあるが 3' UTR regions にも認められた 28 CpG sites; 5%) (図 4)。

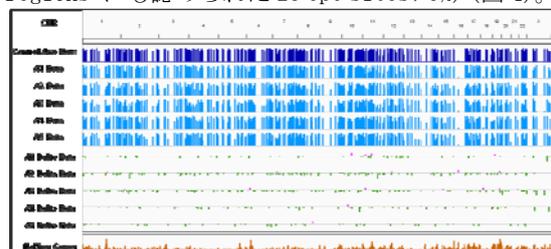


図 3. 自閉症者の individual-specific differentially methylated regions (IS-DMRs)

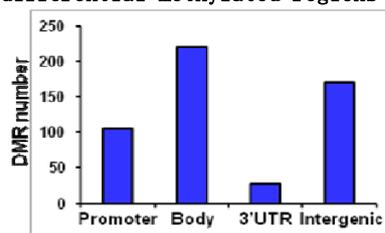


図 4. それぞれの配列における IS-DMRs

これらの IS-DMRs が見出された遺伝子の中で、*HDAC4*, *HDLBP*, *PXDN*, *NAALADL2*, *DST*, *AUTS2*, *VPS13B*, *ERCC6*, *PANX1*, *SHANK2*, *MEG3*, *CHSY1*, *HDC*, *IGF1R*, *TRPM1*, *ANKRD11*, *CDH13*, *ACCN1*, *MBD1*, *SYP* および *EFHC2* はこれまでに自閉症および関連疾患との関与が示唆されている。

本研究で自閉症者死後脳縫線核における DNA メチル化異常が網羅的に同定された。特にプロモーター領域以外の解析については本研究が初めてである。メチル化異常が見出された遺伝子には、自閉症や関連疾患への関与が報告されているものが多数存在した。プロモーター領域以外のメチル化も遺伝子発現に重要であることが示唆されており、本研究で見出されたそれらのメチル化異常も注目すべきと考える。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Matsuzaki, Kazuhiko Nakamura, Yosuke Kamen, Kenichiro Hata, Norio Mori. Genome-wide DNA methylation profiles in post-mortem brains from subjects with autism. 2014, 投稿予定

「特記事項」

なし

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

現在受け入れ中

日本学術振興会・基盤研究 C (一般)・平成 25-27・統合失調症とオリゴデンドロサイト異常—hnRNPC1/2 の役割解明・代表・採択・390 万円
申請予定

日本学術振興会・基盤研究 C (一般)・平成 27-29・自閉症におけるエピジェネティック異常の解明・代表