

特集 1 精神疾患の網羅的ゲノム解析～課題と展望

1. 精神疾患のエピジェネティクス研究
～双極性障害死後脳の DNA メチル化解析から岩本 和也¹⁾, 文東 美紀¹⁾, 加藤 忠史²⁾

抄録: 筆者らは、双極性障害患者前頭葉試料について、MBD2B を利用した DNA メチル化解析により、神経細胞および非神経細胞におけるメチル化差異を示すゲノム領域を同定した。両細胞種ともプロモーター領域は全体的な低メチル化を示し、神経細胞では遺伝子特異的な高メチル化が認められた。遺伝子特異的な高メチル化の背景には DNMT3B の発現が背景にあると考えられた。また気分安定薬は死後脳と逆方向へメチル化変化を示すこと、双極性障害の GWAS 領域に有意に集積していることを示した。

日本生物学的精神医学会誌 32 (2) : 64-67, 2021

Key words : DNA methylation, bipolar disorder, epigenetics, GWAS

疫学研究の結果などから、双極性障害や統合失調症など主要な精神疾患は、遺伝的要因と環境的要因の複雑な相互作用が発症に関与していると考えられている。遺伝的要因については、近年の大規模なゲノムワイド関連解析により、odds ratio が 1.1 ~ 1.3 程度の小さな要因が複数関与している polygenic な疾患であることが示されている¹⁹⁾。またコピー数多型 (copy number variation : CNV) 解析やレアバリエーション解析により odds ratio が大きな遺伝的要因は患者集団での頻度が非常にまれであることが示されている。主要な精神疾患の genetic landscape はこのように徐々に明らかにされつつあるものの、疫学研究で示されているような高い遺伝率については現在のゲノム研究だけでは説明は困難であることも予想されている。筆者らは、個々の遺伝的背景に加え、受精後に生じる体細胞変異やエピゲノム修飾が累積し病因に関与していると考えている^{16, 17)}。これらは環境要因によって影響を受けることが知られており、遺伝・環境相互作用の分子メカニズムとしても捉えることができるであろう。本稿では、エピゲノム修

飾について、筆者らの双極性障害患者死後脳での研究成果⁴⁾をもとに紹介する。

エピジェネティクスとは、DNA の配列変化によらない遺伝子発現を制御・伝達するシステムおよびその学術分野のことであり、主なメカニズムとして DNA メチル化やヒストン修飾がある。双極性障害患者死後脳では、BDNF, COMT や SLC6A4 といった候補遺伝子についての解析がなされてきた⁷⁾。網羅的解析では、小脳を用いて遺伝子発現と関連した DNA メチル化変化の同定⁵⁾、海馬における epigenetic age の加速⁶⁾、TGFB2 の高メチル化に関連した laterality の喪失¹⁾、前頭葉と側頭葉での DNA メチル化バランスの異常⁸⁾などが報告されている。脳組織は多種多様な細胞種で構成されており細胞種特異的な解析の重要性が、筆者らの成果を含めて明らかにされている¹⁰⁾。これまで、TH レベルに関連した IGF2 エンハンサーの脱メチル化¹⁸⁾が神経細胞核で報告されている。

筆者らは、米国スタンレー財団から提供された死後脳前頭葉試料を用いたオミックス解析を行ってき

Epigenetic studies in psychiatric disorders — lessons from DNA methylation analysis of postmortem brains of patients with bipolar disorder

1) 熊本大学大学院生命科学研究部 分子脳科学講座 (〒 860-8556 熊本市中央区本荘 1-1-1) Kazuya Iwamoto, Miki Bundo : Department of Molecular Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University. 1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan

2) 順天堂大学大学院医学研究科精神・行動科学 (〒 113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1) Tadafumi Kato : Department of Psychiatry & Behavioral Science, Juntendo University. 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

【岩本 和也 E-mail : iwamotok@kumamoto-u.ac.jp】

た。今回、神経細胞マーカー NeuN に対する蛍光標識抗体を用いた神経細胞核の単離を行い³⁾、神経細胞核および非神経細胞核において網羅的 DNA メチル化解析を実施した。DNA メチル化解析は、MBD2B により高度にメチル化された DNA 断片を濃縮する手法を用いた。本手法は Chip-seq に類似した手法であり、ゴールドスタンダードであるバイサルファイト (bisulfite modification : BS) 変換を介する解析手法と比較し、解像度および定量性において劣っている。しかし、メチル化シトシンに特異的に結合し、他のシトシン修飾産物であるヒドロキシメチルシトシン (hydroxymethylcytosine : hmC) には結合しない¹¹⁾ ことから、メチルシトシン特異的なプロファイルを得ることができる²⁾。BS 変換ではメチルシトシンと hmC の区別ができないこと、神経細胞では特に hmC が濃縮されることから¹²⁾、本手法は神経細胞でのメチル化状態を明らかにするのに特に効果を発揮すると期待される。

解析の結果、高度にメチル化されたプロモーターの総数が患者神経細胞・非神経細胞ともに健常者と比較して減少しており、全体的な低メチル化状態 (global hypomethylation) にあることを見いだした。メチル化変化が生じているゲノム領域 (differentially methylated region : DMR) を同定したところ、DMR はゲノム中に偏りなく散在しており、神経細胞と非神経細胞での共通点は 23 ~ 44% 程度であり、多くは細胞種特異的な DMR であった。DMR 近傍の遺伝子について Gene Ontology 解析を行ったところ、神経細胞では KIF 遺伝子群を中心とする分子モーターの低メチル化、非神経細胞ではイオンチャネルや神経伝達物質受容体、トランスポーター遺伝子群の低メチル下が認められた。しかし、特に神経細胞では、growth cone や synapse 関連遺伝子群など神経機能に重要な遺伝子の高メチル化が認められ、BDNF 受容体である NTRK2 (TrkB) や NMDA 受容体サブユニット (GRIN1) などが含まれていた。

以上より、双極性障害患者前頭葉では、プロモーター領域における全体的な低メチル化と神経細胞での遺伝子特異的な高メチル化が、DNA メチル化変化の実体を構成していると考えられた。全体的な低メチル化は、血液試料において主要な精神疾患でしばしば報告されている。筆者らも双極性障害および統合失調症末梢血における低メチル化を同定し、メチル基ドナーとして働くベタイン量の低下と関連していることを報告した¹⁵⁾。同様の現象が死後脳での低メチル化の背景にあるかは興味深いところである。一方、神経細胞での遺伝子特異的な高メチル化

を達成する分子メカニズムについては不明であるが、約 10 種類の DNA メチル化関連遺伝子の発現量を測定したところ、患者死後脳では DNMT3B の発現上昇を認めた。DNMT3B はストレスにより神経細胞で発現が誘導されることが報告されており¹³⁾、遺伝子特異的な高メチル化に関与しているものと考えられた。

気分安定薬や抗精神病薬は、DNA メチル化状態に影響を与えることが知られている。そこで気分安定薬であるリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピンについて血中有効濃度の下限と上限値の両方の濃度で神経系細胞株を培養し、DNA メチル化状態を調べた。その結果、死後脳で同定した DMR の約 30% が投薬による DMR とオーバーラップすることを認めた。オーバーラップした DMR について DNA メチル化変化の方向を調べてみると、患者試料と細胞株では有意に逆方向に変化していることを見いだした。質の異なる実験系であるため、単純な解釈には注意が必要であるが、気分安定薬にはエピジェネティックな状態を正常化するような作用があることが示唆された。

また、筆者らが同定した神経細胞での DMR、非神経細胞での DMR と、これまで報告された精神疾患のゲノムワイド関連解析 (genom wide association : GWAS) との比較を行ったところ、神経細胞 DMR が双極性障害の GWAS で報告されたゲノム領域¹⁴⁾ に有意に集積していることを認めた。集積はうつ病の GWAS 領域⁹⁾ では認められず、統合失調症 GWAS 領域¹⁹⁾ では、むしろ減少している傾向を認めた。これらの結果より、GWAS で同定された双極性障害の遺伝的リスクは、双極性障害患者の神経細胞において、エピジェネティックな変化が生じている遺伝子に多いことが示唆された。また、統合失調症 GWAS 領域での減少については、統合失調症の遺伝的リスクは、初期神経発生に必要な遺伝子群に多く存在する、といったことが解釈として考えられた。

以上のような知見は、神経細胞でのメチル化シトシンに特化した解析を行った結果、はじめて得ることができたものである。今後は、緻密な記述的解析とともに、DNA メチル化状態の操作などにより因果関係を積極的に検証するような研究が必要であると考えられる。

本論文に記載した筆者らの研究に関してすべて倫理的配慮を行っている。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Abdolmaleky HM, Gower AC, Wong CK, et al (2019) Aberrant transcriptomes and DNA methylomes define pathways that drive pathogenesis and loss of brain laterality/asymmetry in schizophrenia and bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 180 (2) : 138-149.
- 2) Aberg KA, Chan RF and van den Oord E JCG (2020) MBD-seq-realities of a misunderstood method for high-quality methylome-wide association studies. *Epigenetics*, 15 (4) : 431-438.
- 3) Bundo M, Kato T and Iwamoto K (2016) Cell Type-Specific DNA Methylation Analysis in Neurons and Glia. In : *Epigenetic Methods in Neuroscience Research* (ed Karpova N). Human press, NY, pp 115-123.
- 4) Bundo M, Ueda J, Nakachi Y, et al (in press) Decreased DNA methylation at promoters and gene-specific neuronal hypermethylation in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. doi : 10.1038/s41380-021-01079-0.
- 5) Chen C, Zhang C, Cheng L, et al (2014) Correlation between DNA methylation and gene expression in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disord*, 16 (8) : 790-799.
- 6) Fries GR, Bauer IE, Scaini G, et al (2020) Accelerated hippocampal biological aging in bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 22 (5) : 498-507.
- 7) Fries GR, Li Q, McAlpin B, et al (2016) The role of DNA methylation in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev*, 68 : 474-488.
- 8) Ho AM, Winham SJ, Armasu SM, et al (2019) Genome-wide DNA methylomic differences between dorsolateral prefrontal and temporal pole cortices of bipolar disorder. *J Psychiatr Res*, 117 : 45-54.
- 9) Howard DM, Adams MJ, Clarke TK, et al (2019) Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. *Nat neurosci*, 22 (3) : 343-352.
- 10) Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, et al (2011) Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Res*, 21 (5) : 688-696.
- 11) Jin SG, Kadam S and Pfeifer GP (2010) Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res*, 38 (11) : e125.
- 12) Lister R, Mukamel EA, Nery JR, et al (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*, 341 (6146) : 1237905.
- 13) de Sousa Maciel I, Sales AJ, Casarotto PC, et al (2020) Nitric Oxide Synthase inhibition counteracts the stress-induced DNA methyltransferase 3b expression in the hippocampus of rats. *Eur J Neurosci*, online ahead of print. <https://doi.org/10.1111/ejn.15042>.
- 14) Mullins N, Forstner AJ, O'Connell KS, et al (2020) Genome-wide association study of over 40,000 bipolar disorder cases provides novel biological insights. medRxiv. doi : <http://doi.org/10.1101./2020.09.17.20187054>.
- 15) Murata Y, Ikegame T, Koike S, et al (2020) Global DNA hypomethylation and its correlation to the betaine level in peripheral blood of patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 99 : 109855.
- 16) Nishioka M, Bundo M, Iwamoto K, et al (2019) Somatic mutations in the human brain : implications for psychiatric research. *Mol Psychiatry*, 24 (6) : 839-856.
- 17) Nishioka M, Bundo M, Kasai K, et al (2012) DNA methylation in schizophrenia : progress and challenges of epigenetic studies. *Genome Med*, 4 (12) : 96.
- 18) Pai S, Li P, Killinger B, et al (2019) Differential methylation of enhancer at IGF2 is associated with abnormal dopamine synthesis in major psychosis. *Nat Commun*, 10 (1) : 2046.
- 19) Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511 (7510) : 421-427.

■ ABSTRACT

Epigenetic studies in psychiatric disorders — lessons from DNA methylation analysis of postmortem brains of patients with bipolar disorderKazuya Iwamoto¹⁾, Miki Bundo¹⁾, Tadafumi Kato²⁾*1) Department of Molecular Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University**2) Department of Psychiatry and Behavioral Science, Graduate School of Medicine, Juntendo University*

The authors identified DMRs (differentially methylated regions) in neurons and non-neurons by DNA methylation analysis using MBD2B in frontal lobe samples of patients with bipolar disorder. In both cell types, the promoter region showed global hypomethylation, and gene-specific hypermethylation was observed in neurons. The background of gene-specific hypermethylation was considered to be the increased expression of DNMT3B. We also showed that mood stabilizers showed methylation changes in the opposite direction to the postmortem brain, and that DMRs were significantly accumulated in the GWAS region of bipolar disorder.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 32 (2) : 64–67, 2021)
