

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：ユニットタイプ「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」研究領域
2. 研究開発課題名：精神疾患のエピゲノム病態の解明に向けた新技術創出
3. 研究開発代表者： 加藤忠史（国立研究開発法人理化学研究所）
4. 研究開発の成果

死後脳のエピゲノム解析については、全ゲノムバイサルファイト法、Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)法、SureSelect・Human Methyl-Seq-PBAT 法について比較検討を行い、これらの中で一定程度の相関を認めた。多数例の検討には、SureSelect・Human Methyl-Seq-PBAT 法が適していると考えられた。また、ヒドロキシメチルシトシンの解析法を確立した。また、精神疾患患者の神経細胞で、タイリングアレイにより得られた、DNA メチル化領域の検討を行った。双極性障害患者で低メチル化を示す領域について、定量的 PCR 法による確認を行ったところ、特に神経細胞核において、確認することができた。また、タイリングアレイの結果を RRBS による結果と比較したところ、神経細胞核および非神経細胞核における高メチル化領域では、比較的よく確認された。

双極性障害患者死後脳の神経細胞核における高メチル化領域に含まれる遺伝子の遺伝子オントロジー解析では、神経細胞に関わる遺伝子がエンリッチしていることがわかった。

DNA メチル化酵素の活性部位の変異体をレンチウイルスを用いて導入した神経細胞の形態解析を行ったところ、突起の形態が変化していた。このことから、DNA メチル化酵素を介した神経突起の形態制御はメチル化酵素活性非依存的に引き起こされていることが明らかとなった。さらに、この変異マウスから採取した海馬歯状回神経細胞の全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析を行った結果、統合失調症患者死後脳と共通して発現が変化している遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態の変化はみられないことが明らかとなった。

メチル化導入技術開発については、特異的 DNA 配列認識蛋白としてこれまでに検討してきた TALE について、培養細胞を用いて実際のメチル化亢進程度を検討した結果、目的の DNA 配列に対する高メチル化が確認出来た。一方で、培養細胞とマウス個体の違いを踏まえると、DNA メチル化をマウス個体内で有効に変化させるためには認識配列を実験的に最適化する必要があることが予想され、認識配列を比較的容易に変更できるよう手法の改良を進めておくことが望ましいと考えた。

そこで、TALE に比べ、認識配列変更が容易な CRISPR/Cas9 系を用いた検討を行ったが、効果は小さかった。その理由として、標的配列近傍への DNA メチル基転移酵素活性の集積が弱い可能性が考えられた。当面、TALE を用いた手法を活用し、DNA 配列特異的メチル化マウス開発を進めることとした。