

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) 精神疾患のエピゲノム病態の解明に向けた新技術創出  
(英語) Epigenome analysis of mental disorders using advanced technologies
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所脳科学総合研究センター  
精神疾患動態研究チーム チームリーダー 加藤忠史
- 所属 役職 氏名： (英語) Tadafumi KATO, Team Leader,  
Lab for Molecular Dynamic of Mental Disorders,  
RIKEN Brain Science Institute
- 実施期間： 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

死後脳のエピゲノム解析については、さまざまな DNA メチル化解析手法を用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。貴重な死後脳サンプルにおける多数例の検討には、SureSelect - Human Methyl-Seq-PBAT 法が適していると考えられた。

また、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、所見を確認することができた。

また、タイリングアレイの結果を Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) 法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、比較的よく確認することができた。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。

精神疾患患者で見られた低メチル化の病因的意義を検討するため、DNA メチル化酵素をコードする Dnmt1 をノックダウンした際に、神経細胞にどのような変化が起きるか、およ

び Dnmt1 を神経細胞で失わせたマウスにおいて、どのような行動変化が生じるかについて検討を進めた。

一方、SLC6A4 については、患者で高メチル化を見いだしたゲノム領域に相当する領域をマウスゲノムにおいて同定し、組織特異的にメチル化されている領域を同定した。

その領域が疾患に関わる可能性を探るため、発達期ストレスモデルとして母子分離ストレスを負荷したマウスモデルにおける DNA メチル化変化を調べた。

メチル化導入技術開発については、特異的 DNA 配列認識蛋白である TALE あるいは CRISPR/Cas9 系を用いて、培養細胞を用いてメチル化亢進の程度を検討したところ、TALE を用いた方法によって、目的の DNA 配列に対する高メチル化を確認することができ、DNA 配列特異的メチル化マウス開発の基礎技術を確立することができた。

CRISPR/Cas9 系を用いた方法についても同様の技術確立を進め、DNA 脱メチル化の人為的操作も実施可能となった。

本研究で得られたヒト神経細胞のエピゲノム解析手法および配列特異的 DNA メチル化操作法などの研究技術は、他の疾患の研究にも応用可能である。

To perform epigenome analyses of human postmortem brains, several methods for DNA methylation analysis were compared, and found that the results are correlated with each other. As a result, it was suggested that SureSelect Human Methyl-Seq-PBAT would be appropriate for a large number of samples.

We further investigated the genomic region with DNA methylation obtained by the tiling array analysis of neuronal nuclei of patients with mental disorders. The genomic regions showing hypomethylation in neuronal nuclei of postmortem brains of patients with bipolar disorder could be verified by a quantitative PCR method.

When the results of tiling arrays were compared with the data of Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) method, hypermethylation in neuronal and non-neuronal nuclei was replicated. By a gene ontology analysis of the genes showing hypermethylation in neuronal nuclei of the postmortem brains of patients with bipolar disorder, genes related to neuronal function were enriched.

To further pursuit the etiological significance of hypomethylation in mental disorders, we investigated what changes occur by knock down of Dnmt1 encoding DNA methylase and also examined behavioral changes associated with conditional knock out of Dnmt1 in neurons in mice.

We searched for the mouse genomic region surrounding SLC6A4 corresponding to the genomic region which showed differential methylation between monozygotic twins discordant for bipolar disorder. We identified the region showing tissue specific methylation.

To study whether DNA methylation of this region relates to mental disorders, we investigated the DNA methylation changes of this region in stress exposure during development.

With regard to the technology of site specific induction of DNA methylation, site specific DNA recognition protein TALE or CRISPR/Cas9 were utilized. Methylation changes induced by this technology was verified by using cultured cells and hypermethylation of the target site was verified by the method using TALE. Using these technologies, model mice with site specific DNA methylation would be possible. Site specific DNA demethylation would also be possible using CRISPR/Cas9 system.

The technologies developed in this project would also be useful for the study of other diseases.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 1件）

1. Ueda J, Murata Y, Bundo M, Oh-Nishi A, Kassai H, Ikegame T, Zhao Z, Jinde S, Aiba A, Suhara T, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Use of human methylation arrays for epigenome research in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neurosci Res.* 2017 Feb 17.
2. 加藤忠史(2016) 双極性障害における DNA メチル化の研究 *実験医学* 34: 1632-1637

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Kato T (2016) Neurobiological basis of bipolar disorder: toward novel strategies for drug development. CINP2016 Morning Seminar Seoul, July 4/2016

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 加藤忠史(2016) 脳と心の未来 高麗郡建郡 1300 年記念事業 教育講演会 日高市文化体育館 2016 年 8 月 19 日
2. 加藤忠史(2016) 双極性障害の新しい動物モデルと原因脳部位の探索～診断法・治療法の開発に向けて～ 年輪の会講演会 東京 2016 年 6 月 19 日

#### (4) 特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 精神疾患のエピゲノム病態の解明に向けた新技術創出  
(英語) Epigenome analysis of mental disorders using advanced technologies

研究開発担当者 (日本語) 九州大学大学院医学研究院 教授 中島 欽一  
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Professor,  
Kinichi Nakashima

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：理化学研究所脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム 加藤忠史 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 3件)

1. Noguchi H, Murao N, Kimura A, Matsuda T, Namihira M, Nakashima K. DNA methyltransferase 1 Is Indispensable for Development of the Hippocampal Dentate Gyrus. *J Neurosci*. 2016, 36(22):6050-68.
2. Noguchi H, Kimura A, Murao N, Namihira M, Nakashima K. Prenatal deletion of DNA methyltransferase 1 in neural stem cells impairs neurogenesis and causes anxiety-like behavior in adulthood. *Neurogenesis*. 2016, 3(1):e1232679.

3. Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, Hatada I. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. Nat Biotechnol. 2016, 34(10):1060-1065.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 森田純代, 野口浩史, 堀居拓郎, 中林一彦, 木村美香, 岡村浩司, 坂井 淳彦, 中嶋 秀行, 秦健一郎, 中島欽一, 畑田出穂○ : ゲノム編集を利用したエピゲノムの書き換え、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016 年 11 月 30-12 月 2 日 (2 日) (口頭・シンポジウム)、国内
2. 森田純代, 野口浩史, 堀居拓郎, 中林一彦, 木村美香, 岡村浩司, 坂井 淳彦, 中嶋 秀行, 秦健一郎, 中島欽一, 畑田出穂○ : CRISPR/Cas を用いたエピゲノム編集法、日本核酸医薬学会 第 2 回年会、東京都、東京理科大学葛飾キャンパス、2016 年 11 月 15 日-11 月 17 日 (15 日) (口頭・シンポジウム)、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 精神疾患のエピゲノム病態の解明に向けた新技術創出  
(英語) Epigenome analysis of mental disorders using advanced technologies

研究開発担当者 (日本語) 学校法人 星薬科大学 先端生命科学研究所 先端生命科学研究センター  
副センター長・准教授 五十嵐 勝秀

所属 役職 氏名： (英語) Katsuhide Igarashi, Vice Director (Associate Professor),  
Life Science Tokyo Advanced Research center (L-StaR),  
Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Science

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 理化学研究所脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム 加藤 忠史  
総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. DNMT3L 部分配列を用いた内在性 DNMT3 の二量体化誘導による人為的 DNA メチル化亢進技術の開発, ポスター, 大塚 まき, 山本 直樹, 中島 欽一, 加藤 忠史, 成田 年, 五十嵐 勝秀,

第10回日本エピジェネティクス研究会年会，2016/5/20，国内.

2. エピジェネティック毒性評価の実用化に向けたバイオマーカー探索研究の動向，口頭，五十嵐勝秀，大塚 まき，第43回日本毒性学会学術年会，2016/6/30，国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願