

学位論文抄録

Decreased DNA methylation at promoters and gene-specific neuronal
hypermethylation in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder
(双極性障害患者前頭前野におけるプロモーター領域低メチル化と神経細胞での遺
伝子特異的高メチル化)

林 順子

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子脳科学講座

指導教員

岩本 和也 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子脳科学講座

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: Bipolar disorder (BD) is a severe and common mental disorder characterized by mood swings with recurrent depressive and manic states. A complex interaction of genetic and environmental factors plays important roles in the pathogenesis of BD, but the detailed mechanisms are unknown. We isolated neuronal and nonneuronal nuclei from postmortem frontal lobe of patients with BD and controls, and performed the promoter-wide DNA methylation analysis. We tried to identify the BD-specific DMRs (Differentially Methylation Regions) and examine the role of DNA methylation in the pathogenesis of BD.

Methods: Nuclei of neurons and non-neuronal cells were separated by cell sorting technique with antibodies against the neuronal marker NeuN. Methylated DNA was enriched from the isolated nuclei using the MBD2B/MBD3L1 complex, which has a high binding affinity for methylated DNA. The enriched DNA was used for human promoter DNA methylation tiling array analysis to detect DMRs. The effects of three mood stabilizers on methylation were also examined using the same tiling arrays. Furthermore, the expression levels of 10 genes associated with DNA methylation changes were measured using qPCR.

Results: We found decreased DNA methylation at promoters in both cell types in the patients with BD. Gene Ontology analysis of DMR-associated genes revealed that growth cone- and dendrite-related genes, including NTRK2 and GRIN1, were hypermethylated in neurons of patients. About 30 % of DMR in BD overlapped with mood stabilizer-induced DMRs in neuroblastoma cell line. Mood stabilizer-induced DMRs showed the opposite direction of changes in DMRs, suggesting the therapeutic effects of mood stabilizers. Among the DMRs, 12 overlapped with loci identified in a genome-wide association study (GWAS) of BD. We also found significant enrichment of neuronal DMRs in the loci reported in another GWAS of BD. Finally, we performed qPCR of DNA methylation-related genes and found that DNMT3B was overexpressed in BD.

Conclusions: DMRs identified in this study contribute to the further understanding the pathogenesis of BD.

学位論文抄録

[目的]

双極性障害 (bipolar disorder, BD) は、うつ状態と躁状態の繰り返しを特徴とする、重篤な精神疾患である。発症には遺伝因子と環境因子の複雑な相互作用が関与していることが示唆されているが、その詳細な機序ははまだ不明である。本研究では、双極性障害患者死後脳前頭葉試料を用い、神経細胞核単離技術を用いて神経細胞と非神経細胞を分画し、網羅的な DNA メチル化解析を行い、BD に特異的な DNA メチル化差異のある領域 (differentially methylation region, DMR) を同定し、その特性を検討することとした。

[方法]

BD 患者 (N=34) と健常者 (N=35) の死後脳前頭葉試料を用い、神経細胞核マーカー NeuN 抗体によるセルソーティングにより、神経細胞と非神経細胞核を分離した。次に、メチル化 DNA と高い結合親和性を持つ MBD2B/MBD3L1 複合体を使用しメチル化 DNA を濃縮し、プロモータータイリングアレイによりメチル化された領域を検出した。患者群と健常者群の比較により、神経細胞・非神経細胞における DMR を同定した。一部の DMR は qPCR および Reduced representation bisulfite sequencing により検証した。また、リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピンの 3 種の気分安定薬存在下で神経膠芽腫細胞株 (SK-N-SH) を培養し、DNA メチル化への影響を同様に検出した。また、DNA メチル化に関与する 10 種の遺伝子の発現量を、qPCR を用い測定した。

[結果]

BD では、神経・非神経細胞ともに、プロモーター領域が低メチル化状態であり、神経細胞では、NTRK2 や GRIN1 などの成長円錐や樹状突起に関連する遺伝子が高メチル化状態であることを認めた。神経膠芽腫細胞株での検討から、気分安定薬によって誘導された DMR は、BD の DMR の約 30% と重なり、BD の DMR と逆方向への変化をすることを認めた。また、BD の神経細胞 DMR は、BD のゲノムワイド関連解析 (genome-wide association, GWAS) で報告されたゲノム領域に有意集積し、うつ病や統合失調症の GWAS 領域には集積は認められなかった。また、BD 死後脳では DNMT3B の過剰発現を認めた。

[考察]

BD の前頭葉神経細胞では、精神機能や薬理作用に直結する重要な遺伝子での高メチル化や、GWAS で報告されている領域でのメチル化変化が検出されたことから、神経細胞特異的なエピゲノム変化が病態と深く関連していることが考えられた。また、DNMT3B の発現レベルの上昇が、神経細胞特異的 DNA メチル化変化と関連している可能性が考えられた。気分安定薬によって誘導される DMR は、BD の DMR 変化とは逆の向きを示すことから、気分安定薬の作用機序として、DNA メチル化状態の正常化が関連していることが考えられた。

[結論]

BD の前頭葉では、神経細胞特異的な DNA メチル化変化が起こっており、BD の病態に関与している可能性がある。また、DNA メチル化や DNMT3B を標的とした治療薬の開発が期待された。