

## 論文の内容の要旨

# 双極性障害患者で同定されたデノボ変異の 病態生理学的意義に関する研究

中村 匠

### 【背景】

双極性障害は、躁およびうつ状態を繰り返す精神疾患である。生涯有病率は1%前後と高く、その症状の特徴から患者本人や周囲の人にも身体的、経済的な損失を与え、社会的にも大きな問題となっている。双生児研究の知見や、複数の稀な遺伝性疾患において双極性障害併発率が高いという知見などから、双極性障害の発症には遺伝要因の関連が強いと考えられているが、決定的な関連遺伝子は同定されておらずモデルマウスも存在していないため、発症機序も不明な点が多い。

そこで、双極性障害発症に寄与する遺伝子を同定するために、健常者群と患者群を比較した大規模ゲノムワイド関連解析などの一塩基多型解析などが網羅的に行われてきた。しかしこれまで、約2万人の患者から30個の関連遺伝子座位が同定されたが、いずれも頻度は高いが効果量の小さいものであると考えられている。

それとは対照的に、健常な両親と患者である子のトリオ家系において子のみがもつ変異、すなわちデノボ変異は、頻度は小さいが効果の大きな変異と考えられており、これまで盛んにその探索が行われており、双極性障害患者のデノボ変異も多数報告されている。

そこで本研究は、生体内でより大きな影響を与えると予測される、機能喪失型の変異を持つ遺伝子に着目し、双極性障害患者で同定されたデノボ変異が生体にもたらす影響を、細胞株および遺伝子改変マウスを用いて、分子・行動レベルで解析することを目的とした。

## 【結果】

### ① 細胞株を用いた UNC13B デノボ変異の解析

これまで、71 個のデノボ遺伝子変異が双極性障害患者で報告されており、うち 9 個が機能喪失型変異であった。その中でも、*UNC13B* 遺伝子で同定された変異は唯一、スプライスドナーサイトに存在する 1 塩基置換変異であったが、実際にその変異がス

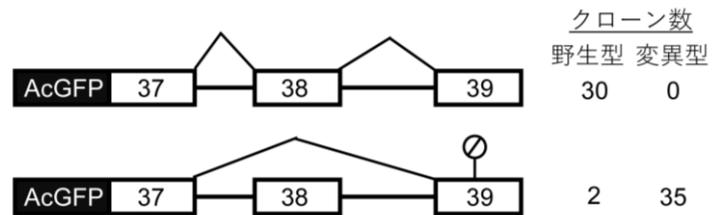


図1 エクソン38スキップバリエーションの数

プライシングに影響を与えるかは不明であった。患者 DNA サンプルから変異部近傍をクローニングし、ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞を用いてスプライシングミニジーンアッセイを行ったところ、患者変異によりドナーサイト部位が喪失し、スプライシング様式が変化することを明らかにした(図1)。さらに、ヒト脳由来 total RNA サンプルを用いて、野生型ミニジーン導入細胞で見られたエクソン38スキップバリエーションが、変異非保有者においてもわずかに存在していることを明らかにした。

### ② 細胞株を用いた EHD1 デノボ変異の解析

機能喪失型変異の中で唯一、最終エクソン上に存在するフレームシフト変異を有していた *EHD1* 遺伝子に着目した。ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構は、最終エクソンに生じる未成熟停止コドンによる異常 mRNA は分解しないため、異常 EHD1 が生体内で生成されることが予測された。ラット副腎髄質由来 PC12 細胞を用いた過剰発現系により、異常 EHD1 の機能を解析したところ、異常 EHD1 が神経突起伸長促進能を喪失していることと、内在性のエンドサイトーシス機能を阻害していることを見いだした(図2, 3)。

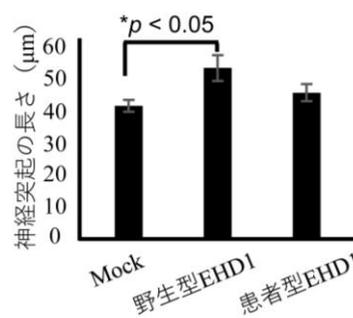


図2 神経突起の長さ

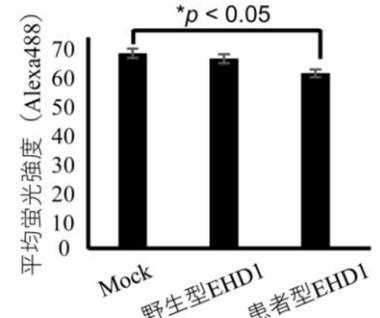


図3 トランスフェリン取込量

### ② 遺伝子改変マウスを用いたデノボ変異の解析

機能喪失型変異をもつ遺伝子の中で、生体内でより重要と予測される遺伝子を絞り込むために、ヒト集団内においての、ある遺伝子における、アミノ酸配列変化変異の生じやすさを示す Residual Variation Intolerance Score (RVIS) と、機能喪失変異の生じやすさを示す probability of Loss-of-function intolerance (pLi) という、疾患遺伝学で多用される遺伝学的指標に着目した。この両指標で顕著な値を示した、*MACF1*、*EHD1*、*KMT2C* の 3 遺伝子では、一般人口において機能喪失変異が起こることが稀であると予測されるため、双極性障害患者で機能喪失変異が生じていることには意味があると考え、これら遺伝子に着目することとした。

そこで、患者で同定された変異を再現した遺伝子改変マウスを、CRISPR/Cas9 系により作製した。

*Macf1* と *Ehd1* については、患者と同様な変異を再現したノックインマウスを、*Kmt2c* については、患者変異近傍の配列が CRISPR/Cas9 による切断に適していなかったため、患者変異が存在するエクソンを切断したノックアウトマウスを作製した。作製した遺伝子改変マウスを用いて、輪回し行動量解析と、マウスの行動を集団飼育下で半自動的に測定することができるインテリケージ解析を行った。

### *Ehd1* について

*Ehd1* 変異マウスの海馬を使用した、抗 EHD1 抗体によるウエスタンブロットにより、異常 EHD1 由来のバンドを確認した。*Ehd1* 遺伝子改変マウスは、輪回し行動解析において、明期の活動量が有意に増加することを見いだした (図4)。輪回し行動量解析は、自発的な行動量を長時間かつ経時的に計測でき、躁およびうつ状態という相反する表現型を自発的に示す、双極性障害に特徴的な症状を解析するのに適している。

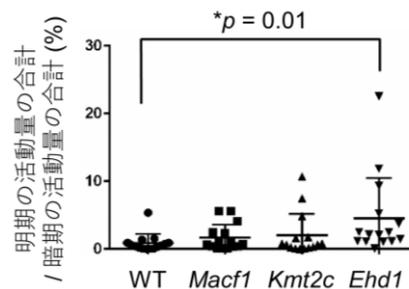


図4 明期の行動量

### *Macf1* について

*Macf1* 変異マウスは、インテリケージ解析内の Attention test と Delay discounting test で、異常行動を示した。インテリケージでは、ゲートにより封鎖されている2つの飲水瓶が存在する解析チャンバーが、各コーナーに存在しており、nosepokeによりゲート

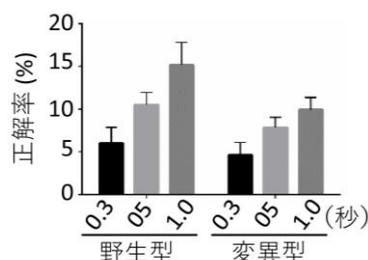


図5 Attention testの正解率

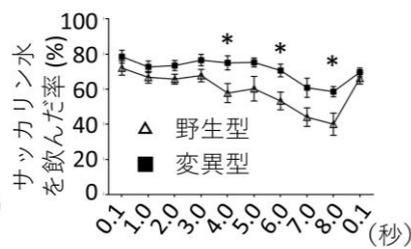


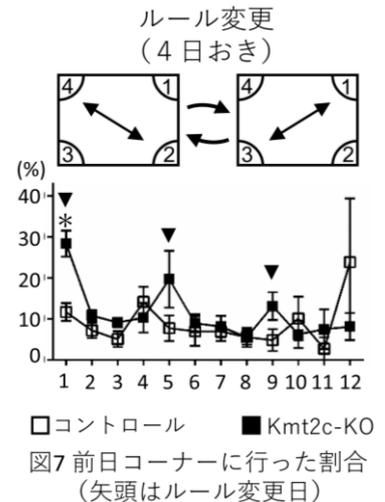
図6 サッカリン水の割合

が開くようになっている。Attention test では、ゲートの上部にある LED ライトがランダムに点灯し、点灯した側のゲートに nosepoke することで飲水することができる。*Macf1* 変異マウスは、成功率が有意に低下したため、注意力が低下していることが示唆された (図5)。また、Delay discounting test は、2つのボトルのうち片方をサッカリン水に変更して行う。学習段階ではマウスが解析チャンバーに入ると、両ゲートが開くため、マウスはサッカリン水を好んで飲むこの遅延時間が日ごとに延びていくため、野生型マウスは、遅延時間が長くなるとサッカリン水ではなく純水を飲むようになる。しかし、*Macf1* 変異マウスは、遅延時間が長くなっても、サッカリン水を飲み続けることを見いだし、報酬にこだわることを示唆する結果を得た (図6)。

### *Kmt2c* について

KMT2C は、H3K4 のヒストンリジンメチル基転移酵素であり、遺伝子発現制御に関わっている。海馬サンプルを使用しマイクロアレイ解析を行ったところ、発現量が変化している遺伝子を多数同定し、神経のミエリン化に関係する遺伝子群の発現が変化していることなどを見いだした。

行動レベルでは、インテリケージ解析の Serial reversal test で顕著な行動変化を見いだした。この試験では、4 コーナーのうち、1 コーナーのみで飲水可能な状態にする。飲水可能コーナーは一日ごとに対角線上に移動する。この移動が2往復すると、別の対角線に飲水可能コーナーが移動し、その対角線上の移動を繰り返す。Kmt2c 変異マウスでは、この試験の成功率が有意に低下した。特に、対角線が変更される日において、前日に飲水できたコーナーに有意に多く訪れることを見いだした (図7)。Kmt2c マウスは、ルール変更に柔軟に対応できなかったことを示唆している。また、体重の有意な低下を示す一方で、脳重の有意な増加を示す、形態的な異常も見いだした。



ルール変更への対応の困難さや脳重増加は、自閉症患者でたびたび見られる特徴である。実際に、自閉症患者でも *KMT2C* デノボ変異は複数報告されている。*KMT2C* 変異が、どのように自閉症と双極性障害の違いを生み出すのかを推測するため、双極性障害患者のデノボ変異を再度検討したところ、双極性障害患者のデノボ変異は全身性の変異ではなく、体細胞モザイク変異であることを見いだした。これは、変異細胞の存在率が、両疾患の発症の違いを生み出していることを示唆している。

### 【考察】

*UNC13B* のデノボ変異は、エクソンスキッピングを引き起こし最終エクソン上に未成熟終止コドンを生成する。短い異常 *UNC13B* タンパク質が生体内で生成されるため、患者において、単純な機能喪失ではなく、ドミナントネガティブ効果を引き起こす可能性がある。また、細胞実験により、患者変異による短い *EHD1* も、ドミナントネガティブ効果を示す可能性を示唆する結果を得た。このような短い異常タンパク質により、通常の機能喪失よりも重篤な効果が患者で引き起こされることで、疾患発症につながる可能性が考えられる。

*Macfl* 変異マウスで見られた注意力の低下は、双極性障害患者でも見られる特徴である。また、*delay discounting test* の異常行動については、複数の双極性障害患者で変異が報告されている *Ant1* 遺伝子の改変マウスでも見られるものであった。*Ehd1* 遺伝子改変マウスの明期行動量増加も、睡眠の異常を示唆する結果であり、双極性障害患者の多くが睡眠障害を併発しているため、そのような表現型を再現している可能性がある。また、*Kmt2c* 変異マウスでは双極性障害様行動は見られなかったが、それは全身性変異を再現したために自閉症様行動を示すマウスとなった可能性が考えられる。

今回作製した各遺伝子改変マウスは、双極性障害の病態を完全に再現したマウスであるとは言えず、睡眠異常や注意力低下といった双極性障害患者で見られる一部の特徴を示す結果となった。近年、双極性障害は、ひとつの遺伝子の異常で生じる疾患ではなく、複数の遺伝子変異や多型によって生じるポリジェニックな疾患であることが示唆されており、本研究もその考え方を示唆する結果となった。ただし、デノボ機能喪失変異に着目することで、一部とはいえ双極性障害の特徴を示したのは明らかであり、デノボ変異解析の有用性を示唆する結果を得たとともに、今後の詳細な研究により、各特徴の機序を明らかにできるモデルマウスを取得することが出来た。