

# 博士論文

論文題目 統合失調症初回エピソードにおけるマイクロ RNA の関与

氏名 趙 治磊

## 目次

0. 要旨 .....	5
1. 序文 .....	6
1.1. 統合失調症の病態と疫学 .....	6
1.2. 初回エピソード統合失調症 .....	7
1.3. microRNA(miRNA) .....	8
1.3.1. miRNA の発見 .....	8
1.3.2. miRNA の生合成 .....	9
1.3.3. 分泌型 miRNA .....	10
1.3.4. 統合失調症と miRNA .....	11
2. 初回統合失調症エピソード患者血漿における miRNA .....	17
2.1. 目的 .....	17
2.2. 対象と方法 .....	18
2.2.1. 対象 .....	18
2.2.2. 臨床指標の測定 .....	19
2.2.3. 血漿分離 .....	20

2.2.4. 血漿中 miRNA の抽出 .....	21
2.2.5. 網羅的 miRNA 発現解析 .....	23
2.2.6. 定量的 real-time PCR .....	26
2.2.7. 統計学的解析 .....	27
2.3. 結果 .....	30
2.3.1. 臨床指標 .....	30
2.3.2. 網羅的 miRNA 発現解析 .....	30
2.3.3. 定量的 real-time PCR 法による確認 .....	33
2.3.4. 網羅的解析結果と定量的 real-time PCR 結果の相関 .....	37
2.3.5. miR-223 と臨床指標との相関 .....	39
2.3.6. 発症後 5 年以上経過している統合失調症患者における血漿中 miR-223 変化 .....	44
2.4. 考察 .....	46
3. SK-N-SH 細胞を用いた miR-223 の標的遺伝子解析 .....	51
3.1. 目的 .....	51
3.2. 材料と方法 .....	52

3.2.1. 細胞培養.....	52
3.2.2. 遺伝子導入、安定発現細胞株の作成、成熟ニューロンへの分化誘導 .....	52
3.2.3. 細胞中 miRNA と全 RNA 抽出.....	53
3.2.4. miRNA の定量的 real-time PCR.....	54
3.2.5. タンパク質の抽出とウェスタンブロットによる検出.....	55
3.2.6. 細胞中遺伝子発現のプロファイリング解析.....	57
3.2.7. in silico miRNA ターゲット予測.....	58
3.2.8. 候補標的遺伝子の遺伝子発現解析.....	59
3.2.9. 統計学的解析.....	61
3.3. 結果.....	62
3.3.1. miR-223 安定発現細胞株の作成と成熟ニューロンへの分化.....	62
3.3.2. miR-223 安定発現細胞株における遺伝子発現のプロファイリング解 析.....	63
3.3.3. miR-223 の in silico ターゲット mRNA 予測.....	63
3.3.4. 定量 real-time PCR による発現量変化の検証.....	64

3.4. 考察 .....	72
4. 結語 .....	77
5. 参考文献 .....	78
6. 謝辞 .....	100

## 0. 要旨

統合失調症の発症には遺伝的要因や環境要因が関与していることが知られているが、確実な病因遺伝子や要因は同定されておらず、発症の分子メカニズムは不明である。本研究は病態への microRNA (miRNA) の関与の可能性について検討した。初回エピソード統合失調症患者及び健常対照者を対象とし、血漿中 miRNA の網羅的発現解析を行ったところ、hsa-miR-223-3p (miR-223) の上昇が認められた。miR-223 は、統合失調症死後脳における上昇が示されていたこと、また最近 NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2B サブユニットの発現量を制御する可能性が報告されたことから、病態に関与している可能性が考えられたため、ヒト神経芽細胞腫由来の培養細胞による強制発現細胞株において標的因子の探索を行った。INPP5B、RHOB、SKIL、SYNE1 を候補として見出したが、既報では SYNE1 の疾患への遺伝学的関与が示唆されているなど、miR-223 を介したカスケードが統合失調症病態に関与している可能性が考えられた。

## 1. 序文

### 1.1. 統合失調症の病態と疫学

統合失調症は、主に幻覚、妄想といった陽性症状、意欲低下、感情鈍麻などの陰性症状、及び認知障害を特徴とする内因性精神疾患の一つで (van Os and Kapur, 2009)、アメリカ精神医学会の「精神障害の診断と統計の手引き第 5 版」(DSM-5)、あるいは、世界保健機構 (WHO) の「国際疾病分類第 10 版 (ICD-10)」を用いて診断される。

一般人口における統合失調症の罹患率は約 0.5~1%であり、(McGrath et al., 2004)、世界中ではほぼ一定であることが報告され (Saha et al., 2005)、人種や社会背景の影響は低いと考えられている。発症年齢としては、男性は 20-28 歳に対して、女性は 26-32 歳であるが (Castle et al., 1991)、男女間の有病率については明らかではない (McGrath et al., 2004)。

統合失調症の治療は、薬物療法を中心に精神療法やリハビリテーションなどを組み合わせて行われるが、いまだ完治のための治療法が確立されておらず、社会復帰のみならず、時には寛解も困難である。これまでの報告から、3 分の 1 の患者は社会機能の回復が得られるが、3 分の 1 の患者は症状の改善が得られるものの社会機能は不十分であり、3 分の 1 の患者は改善が得られず、回復するこ

とが困難である (Harding et al., 1987)。人生早期に発症し、本人の苦悩のみならず家族の苦しみも甚大であり、その疾患によって早く終える生涯や、健康を失った年数の指標として世界保健機構が制定した障害調整生命年においては、非感染性疾患の 16 位にランクされるなど (Ustun et al., 1999, Okkels et al., 2013)、医療経済的な損失を含めた社会的損失も非常に大きい。統合失調症の病態解明は急務である。

これまで解明のために、様々な手法により、数多くの研究がなされてきた。現在では遺伝要因と環境要因による相互作用によって発症に至ると考えられているが、いまだ病態は明らかではない。

## 1.2. 初回エピソード統合失調症

統合失調症は、生涯にわたる慢性の経過をたどるが、経過としては、大きく以下の四段階に分けられる。

- ①病前期（精神症状が出る前の時期）
- ②前駆期（聴覚過敏、引きこもりなどの非顕性症状が出現する時期）
- ③進行期（幻聴、妄想などの陽性症状が出現する時期）
- ④安定・再発（残遺）期（意欲の低下などの陰性症状が出現する時期）

最近の MRI を用いた脳画像研究では、統合失調症の初回エピソードにおいて



既に前頭葉や側頭葉領域での灰白質体積の減少といった形態変化が観察されており (Kasai et al., 2003a, Kasai et al., 2003b)、さらに疾患の進行とともに形態変化は進行することが明らかになった (Radua et al., 2012, Cahn et al., 2006)。これらの所見と治療転帰との関連から (Hulshoff Pol and Kahn, 2008, Birchwood et al., 1998)、発症期の早期治療の必要性の高さが認識されるようになった。また、統合失調症は経過とともに病像が変化・進行するため、経過の長い症例では発症にかかわる因子に加え、経過の中で生じる2次的な変化、服薬の影響なども生体に加わりうる。そのため、発症要因を明らかにすることを目的とした研究においては、発病後間もない初回エピソード統合失調症患者を対象とした研究が重要であると考えられている (Ota et al., 2014, Di Nicola et al., 2013, Guidotti et al., 2014)。

### 1.3. microRNA(miRNA)

近年、ノンコーディング RNA である miRNA の統合失調症病態への関与の可能性が注目されており、以下に概説する。

#### 1.3.1. miRNA の発見

1993 年、線虫のヘテロクロニック変異体から lin-4 というタンパク質をコー

ドしない small RNA が RNA-RNA アンチセンスペアリングの作用によって lin-14 タンパク質の発現を低下させることが報告された (Lee et al., 1993)。当初、ヒトなどの高等な種においては lin-4 のホモログが見つからなかったことから、この現象は線虫特有のものと考えられていた。やがて、線虫において mRNA の塩基配列の一部に結合するように設計した小さな二本鎖 RNA (siRNA) を導入すると同じ遺伝子の翻訳阻害が生じることが発見され (Fire et al., 1998)、その 2 年後、哺乳類を含めたほかの生物種にもこの現象が存在することが明らかになった (Pasquinelli et al., 2000)。今日では、細胞増殖、分化、アポトーシス等の多くの基本的細胞内プロセスにおいて、miRNA が重要な役割を果たしていることが明らかになっている (Ambros, 2004)。

### 1.3.2. miRNA の生合成

現在データベースに登録されたヒト miRNA は約 2600 弱であり、そのターゲットになる mRNA は全 mRNA の 1/3 以上を占めていると推測されている (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014, Kozomara et al., 2014)。

miRNA の生合成経路について、まずは、DNA より RNA 合成酵素によってモノシストロニック或いはポリシストロニック miRNA を含む長さ数千塩基長の primary miRNA (pri-miRNA) が転写される。核内において、pri-miRNA は RNA 合

成酵素 III (Drosha) と dsRNA を結合するタンパク質 DGCR8 のタンパク質複合体によって切断され、約 70 塩基のヘアピン状の miRNA 前駆体 pre-miRNA になり、核膜輸送タンパク質 Exportin-5 によって細胞質に輸送される。そこで、主に同じ RNA 合成酵素 III である Dicer と補因子 TRBP によってループが除去され、約 22 塩基の二本鎖 miRNA となる。二本鎖 miRNA は乖離して、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、RNA-タンパク質複合体を形成し、これが機能を発揮する (Khvorova et al., 2003, Schwarz et al., 2003)。

活性型 RISC 複合体は miRNA と Argonaute タンパク質で形成され、ターゲット mRNA の 3' UTR 領域に結合し、翻訳の開始や進行の阻害や、ポリアデニル化やキャッピングの除去により翻訳を阻害する (Pillai et al., 2007, Meister et al., 2004)。ターゲット mRNA の結合配列との相補性が高い場合には mRNA の切断を引き起こすことも報告されている (Guo et al., 2010)。

### 1.3.3. 分泌型 miRNA

核酸断片が細胞死等を介して老廃物質として血中に放出されることは古くから推測されていたが、近年、miRNA や mRNA がエクソソームに内包され、細胞の能動的分泌によって血液中に放出されることが明らかになった (Valadi et al.,

2007)。そして、Argonaute2、High Density Lipoprotein (HDL)などが血清中の miRNA を運搬する複合体を形成することも報告された (Vickers et al., 2011, Pegtel et al., 2010)。また、エクソソームや HDL に内包された miRNA は他の細胞に取り込まれ、細胞内で機能することも明らかになり、ある細胞から分泌された miRNA が血中を移動して他の細胞に作用するメカニズムが解明されつつある (Lotvall and Valadi, 2007, Iguchi et al., 2010, Kosaka et al., 2010)。なお、血漿中に分泌された miRNA は、温度変化、酸、凍結融解などの条件によっても安定性を保つことが報告されている (Ge et al., 2014, Mitchell et al., 2008)。

#### 1.3.4. 統合失調症と miRNA

現在、中枢神経系における miRNA の役割が非常に注目されている。脳に発現する miRNA の数は miRNA 全体の約 50%であり、神経発達、ニューロン新生、分化、シナプス可塑性など中枢神経系において重要な役割を果たすことが示されており、統合失調症との関連が示されつつある (Ziats and Rennert, 2014, Cohen et al., 2011, Smalheiser and Lugli, 2009, Siegel et al., 2011, Olde Loohuis et al., 2012)。

死後脳における網羅的発現解析では、前頭前野 (BA9、BA10、BA46)、頭頂葉

(BA7)、側頭皮質 (BA22) で、報告によって結果は様々であるが、多数の miRNA の発現変動が報告されている (表 1) (Perkins et al., 2007, Beveridge et al., 2008, Beveridge et al., 2010, Mellios et al., 2009, Zhu et al., 2009, Kim et al., 2010, Mellios et al., 2012, Moreau et al., 2011, Santarelli et al., 2011)。

遺伝学的研究では、いくつかの miRNA 遺伝子において関連が示されている (表 2) (Hansen et al., 2007, Feng et al., 2009, Xu et al., 2010, Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study, 2011)。中でも、国際的なコンソーシアムによる大規模な統合失調症のゲノムワイド関連解析で、最も強い関連は miR137 のイントロン内に位置する SNPs (rs1625579) であった (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study, 2011)。

血液由来の miRNA においても統合失調症との関連を示す報告がなされている。

末梢血単核細胞では、Dlk1-Dio3 ドメインにコードされた複数の miRNA の発現低下が示されている (Gardiner et al., 2012)。また、末梢血単核細胞内の miR449a 発現と前頭葉機能検査法であるウィスコンシンカード分類課題の不正解率が有意に相関をすることから、脳機能との関連が示唆されている (Lai et al., 2011)。

このように、急速に miRNA の統合失調症病態への関与の可能性についての知

見が集積しつつあるが、結果は様々で、今後さらなる解明をすすめていくことが必要な状況にある。

上記背景をふまえ、本研究は、初回エピソード統合失調症の血漿における miRNA に注目し、病態への関与について検討を行った。第 2 章では、初回エピソード統合失調症患者及び健常対照者の血漿における miRNA 発現量のマイクロアレイを用いた網羅的検討を行い、第 3 章では、候補と考えられた miR-223 について、神経系細胞における標的遺伝子の探索を行った。

表 1. 統合失調症死後脳研究で同定された miRNAs (Beveridge and Cairns, 2012)

Study	Type	Brain region	Species	Schizophrenia-associated miRNA
Perkins et al. (2007)	Postmortem brain	DLPFC (BA9)	Human	[Upregulated] miR-106b, miR-7
				[Downregulated] miR-26b, miR-30b, miR-29b, miR-195, miR-92, miR-30a, miR-30d, miR-20b, miR-29c, miR-29a, miR-212, miR-24, miR-30e, miR-9*
Beveridge et al. (2008)	Postmortem brain	STG (BA22)	Human	miR-181b
Beveridge et al. (2010)	Postmortem brain	STG (BA22)	Human	[Upregulated] let-7e, miR-107, miR-125b, miR-128a, miR-128b, miR-129, miR-130a, miR-133b, miR-138, miR-146b, miR-148a, miR-150, miR-152, miR-155, miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-17-3p, miR-17-5p, miR-181b, miR-195, miR-197, miR-199a*, miR-19a, miR-20a, miR-222, miR-23a, miR-24, miR-26b, miR-26b, miR-27b, miR-28, miR-296, miR-328, miR-330, miR-335, miR-338, miR-339, miR-340, miR-373*, miR-381, miR-409-5p, miR-432*, miR-452*, miR-455, miR-484, miR-485-5p, miR-486, miR-487a, miR-489, miR-494, miR-499, miR-502, miR-517a, miR-517c, miR-518b, miR-519d, miR-520a*, miR-520 g, miR-9*, miR-99a
Beveridge et al. (2010)	Postmortem brain	DLPFC (BA9)	Human	[Upregulated] let-7d, miR-101, miR-105, miR-107, miR-126*, miR-128a, miR-153, miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-16, miR-181a, miR-181b, miR-181b, miR-181d, miR-184, miR-195, miR-199a, miR-20a, miR-219, miR-223, miR-26b, miR-27a, miR-29c, miR-302a*, miR-302b*, miR-31, miR-33, miR-338, miR-409-3p, miR-512-3p, miR-519b, miR-7
Mellios et al. (2009)	Postmortem brain	Frontal cortex (BA10)	Human	[Downregulated] miR-30e, miR-195
Zhu et al. (2009)	Postmortem brain	DLPFC (BA46)	Human	miR-346

Kim et al. (2010)	Postmortem brain	DLPFC (BA46)	Human	[Upregulated] miR-132, miR-132*, miR-154*, miR-212, miR-34a, miR-544, miR-7
Mellios et al. (2010)	Postmortem brain	Frontal cortex (BA10)	Human	[Downregulated] miR-30b
Moreau et al. (2011)	Postmortem brain	DLPFC (BA9)	Human	[Upregulated] miR-148b, miR-151 miR-27b, miR-301, miR-545, miR-639 [downregulated] miR-106b, miR-138, miR-193b, miR-210, miR-22, miR-324-3p, miR-338, miR-339, miR-425
Santarelli et al. (2011)	Postmortem brain	DLPFC (BA46)	Human	[Upregulated] miR-105, miR-134, miR-148b, miR-150, miR-152, miR-154, miR-17-5p, miR-187, miR-193a, miR-199a*, miR-199b, miR-222, miR-25, miR-328, miR-382, miR-409-3p, miR-423, miR-425-5p, miR-433, miR-452*, miR-487a, miR-495, miR-502, miR-512-3p, miR-519c, miR-532, miR-542-3p, miR-548b, miR-590, miR-592, miR-652, miR-767-5p, miR-92b,



表 2 統合失調症と miRNA の遺伝学的関連 (Beveridge and Cairns, 2012)

Study	Type	Species	Schizophrenia-associated miRNA
Hansen et al. (2007)	miR-SNP	Human	miR-198, miR-206
Feng et al. (2009)	miR-SNP	Human	let-7f-2, miR-188-3p, pre-miR-18b, miR-325-3p, pre-miR-502, pre-miR-505, miR-509-3p, miR-510-3p, miR-660
Xu et al. (2010)	miR-SNP	Human	miR-24, pre-miR-30e, miR-30e
Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study, (2011)	GWAS	Human	miR137

## 2. 初回統合失調症エピソード患者血漿における miRNA

### 2.1. 目的

前章で述べたように、近年、統合失調症病態における miRNA の関与の可能性が注目されている。一方、長期の服薬や急性期・安定期といった病相の違いなどから、病態への関与を明らかにするためには、初回エピソード統合失調症患者を対象とした研究が望ましいと考えられつつある。

そこで本章では、初回エピソード統合失調症患者及び健常対照者の血漿中 miRNA の発現をアレイを用いて網羅的に比較し、候補 miRNA の同定を試みた。

## 2.2. 対象と方法

### 2.2.1. 対象

東京大学医学部附属病院精神神経科で収集された初回エピソード統合失調症患者 17 名（男性 8 名、女性 9 名、24.90 歳 $\pm$ 1.19、発症後年数 2.61 年 $\pm$ 0.50）及び年齢・性別をマッチさせた健常対照者 17 名（男性 8 名、女性 9 名、23.56 $\pm$ 1.63）を対象とした。

初回エピソード統合失調症患者の定義は、

- ①15 歳から 40 歳
  - ②発症後 5 年以内
  - ③統合失調症に対する抗精神病薬治療が 16 週未満
  - ④精神疾患の診断統計マニュアル第 4 版（DSM-IV）で統合失調症と診断された患者、
- である（Koike et al., 2014）。

健常対照者は、精神疾患簡易構造化面接法（The Mini-International Neuropsychiatric Interview：M.I.N.I）を用いて、現在及び過去の精神疾患が除外されたものを対象とした。

病状が進行した統合失調症患者血漿中 miR-223 を測定するために、合計 38 名の被験者を対象とした。内訳は、発症後 5 年以上経過している統合失調症患者

19 名と年齢・性別を統制した 19 名の健常対照者を対象とした（表 4）。診断は、精神疾患の診断統計マニュアル第 4 版（DSM-IV）に基づいて行って、統合失調症と診断された患者を対象とした。なお、加齢や長期間の服薬の影響をできるだけ避けるために、発症から平均 10 年強程度の 30 代患者を中心とした。健常対照者について、精神疾患簡易構造化面接法（M. I. N. I）を用いて、精神疾患の有無を評価し、現在及び以前に精神疾患であると診断されなかったものを対象とした。

なお、本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会及び医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認に基づき行われた。すべての被験者に事前にヘルシンキ宣言に基づいた趣旨説明を行い、書面による同意を得ている（承認番号：東京大学 2094-(6)、639-(30)）。

2094-(6)：血液・唾液中のタンパク・アミノ酸解析による精神神経疾患の成因に関する基礎的研究

639-30：精神疾患発症にかかわる関連遺伝子の探索および解析

## 2.2.2. 臨床指標の測定

初回エピソード統合失調症患者について、精神科医の面接により、下記の通

り陽性・陰性症状評価尺度を用いた統合失調症の精神症状評価や、機能の全体的評価尺度を用いた機能評価を行った。

陽性・陰性症状評価尺度（(Positive and Negative Symptom Scale : PANSS) は、統合失調症の症状を総合的に把握するための評価尺度である(Kay et al., 1987)。「妄想」、「幻覚による行動」といった陽性尺度 7 項目、「情動の平板化」、「情動的ひきこもり」等の陰性尺度 7 項目、「心気症」、「不安」、「緊張」等の総合精神病理尺度 16 項目の合計 30 項目について、各項目を 7 段階（「1. なし」「2. ごく軽度」「3. 軽度」「4. 中等度」「5. やや重度」「6. 重度」「7. 最重度」）に分けて患者の精神症状を評価した（表 5）。

心理的、社会的、職業的機能については、機能の全体的評価尺度（Global Assessment of Functioning Scale : GAF Scale）を用いて、11 段階・100 点満点で評価した(American Psychiatric Association., 2000)。一般的には 50 点台で医療機関への受診につながることが多く、30 点以下は重度と考えられることが多い。

### 2.2.3. 血漿分離

書面及び口頭にて本人の同意を得て末梢静脈から抗凝固剤 EDTA を含むスピッツで採血を行い、検体採取後 30 分以内に 1200xg、10 分間室温での遠心分離に

より血漿を取得し、使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

なお、初回エピソード統合失調症患者群及び健常者群の採血については、最終食事後 3 時間以上、水分以外の飲食を禁止し、午後の 1 時から 3 時までの採血に統制した。病状が進行した統合失調症患者群では採血前日の午後 9 時以降飲食を禁止し、朝食及び服薬前の、当日午前 7 時に採血した。

#### 2.2.4. 血漿中 miRNA の抽出

網羅的 miRNA 発現解析（後述）に供するための miRNA 抽出は、3D-Gene<sup>TM</sup> RNA extraction reagent from liquid sample（東レ）を用いて以下の手順で行った。

なお以下の buffer はキットに含まれているものを用いた。

①血漿  $300\mu\text{l}$  と RNA extraction reagent  $900\mu\text{l}$  を 1 分間ボルテックスミキサーにより混合

②常温で 3 分間、更に on ice で 3 分間静置

③ $12000\times g$ 、10 分間  $4^{\circ}\text{C}$ での遠心分離により約  $300\mu\text{l}$  の上清を採取

④1.5 倍量のエタノールを混合

⑤miRNeasy Mini Kit のスピncラムにアプライし、室温で  $8000\times g$ 、15 秒遠心分離し、ろ液を廃棄

⑥洗浄液 Buffer RWT  $700\mu\text{l}$  をスピncラムに添加した後に、室温で、 $8000\times g$ 、

15 秒遠心分離し、ろ液を廃棄

⑦洗浄液 Buffer RPE 500  $\mu$ l によるスピンカラムの洗浄を二回(室温、16000xg、1 分間)

⑧14000xg、2 分間遠心分離を行い、残存洗浄液を完全に溶出させスピンカラムを乾かせた後、新しい 1.5 ml のコレクションチューブにセットし、30 $\mu$ l の RNase フリー水で miRNA の溶出

定量的 RT-PCR 法 (後述) に供するための miRNA は、miRCURY™ RNA Isolation Kit - Biofluids (Exiqon) を用いて以下の手順で抽出した。なお、以下の buffer はキットに含まれているものを用いた。

①血漿 200  $\mu$ l と Lysis solution Buffer 60  $\mu$ l を 5 秒間でボルテックスミキサーにより混和

②常温で 3 分間静置

③20  $\mu$ l Protein Precipitation Solution Buffer を加え、5 秒間でボルテックスミキサーで混和

④常温 1 分間静置

⑤11000xg、3 分間で遠心分離を行い、上清を新しいチューブに移す

⑥270  $\mu$ l のイソプロピルアルコールを加え、5 秒間ボルテックスミキサーで混

和した後に、スピнкаラムにアプライ

⑦室温で、11000xg、30 秒遠心分離し、ろ液を廃棄

⑧Wash Solution 1 Buffer 100  $\mu$ L をスピнкаラムに添加

⑨室温で、11000xg、30 秒遠心分離し、ろ液を廃棄

⑩Wash Solution 2 Buffer 700  $\mu$ l によるスピнкаラムの洗浄

⑪Wash Solution 2 Buffer 250 $\mu$ l をスピнкаラムにアプライし、16000xg で 2 分間遠心分離、残存洗浄液を完全に溶出させスピнкаラムを乾かせた

⑫スピнкаラムを新しい 1.5 ml のコレクションチューブにセットし、50 $\mu$ l の RNase フリー水で miRNA の溶出

なお、抽出したすべての miRNA サンプルは実験時まで-80℃で保管した。

#### 2.2.5. 網羅的 miRNA 発現解析

血漿中 miRNA 網羅的発現解析は、3D-Gene Human miRNA Oligo chips (miRbase v. 19) (東レ)を用いて行った。なお、RNA の品質検定以降、スキャナによるマイクロアレイデータ取得まで東レ社への受託解析で行った。

2.2.3 により 3D-Gene™ RNA extraction reagent from liquid sample を用いて抽出した miRNA は、Agilent 2100 Bioanalyzer と RNA LabChip により品質検



定を行い、20～30 ヌクレオチドのサイズにピークが現れることを確認した。

東レ社のプロトコールに従い、3D-Gene miRNA labeling kit（東レ）による RNA の蛍光標識（Cy5）を以下の手順で行った。

①血漿由来の miRNA を 4  $\mu$ l まで濃縮し、2 $\mu$ l をアプライし、本数分のマスターミックスを用意し、一本あたり 0.4 $\mu$ l AP buffer、0.4 $\mu$ l AP、1.0 $\mu$ l Spike control、0.2 $\mu$ l RNase フリー水の配合となるように混合

②37℃で 30 分間、100℃で 5 分間変性、その後、氷上で 2 分間静置

③1.2 $\mu$ l LE buffer、3 $\mu$ l 3D-Gene® Fluorescent label、3 $\mu$ l RNase フリー水、1.0 $\mu$ l Labeling enzyme をアプライし、16℃で 1 時間インキュベートの後、65℃で 15 分間で反応を中止

④標識反応物に 0.6 $\mu$ l Hybridization buffer A、0.8 $\mu$ l RNase フリー水、および 52.5 $\mu$ l miRNA Hybridization buffer V3 を加えて、65℃、3 分間加熱した後 16000xg で 1 分間遠心分離

⑤50 $\mu$ l の上清を 3D-Gene Human miRNA Oligo chips (miRbase v.19)（東レ）へアプライし、32℃、16 時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、洗浄を行った。3D-Gene Human miRNA Oligo Chips を Staining Rack にセットし、持ち手を掴んで、1 次洗浄は 30℃、5 分間で、0.5X SSC と 0.1%SDS の洗浄液中に、垂直方向 5 回、左右方向 3 回の振とうを 1 分毎

に 5 分間い、2 次洗浄として 30℃、10 分間で、0.2X SSC と 0.1%SDS の洗浄液中に、垂直方向 5 回、左右方向 3 回の振とうを 1 分毎に 5 分間行った。3 次洗浄は 30℃、10 分間で、0.05X SSC の洗浄液中に、垂直方向 5 回、左右方向 3 回の振とうを 1 分毎に 5 分間行った。スピンドライヤーでチップを遠心乾燥させ、スキャンまで遮光してケースに保存した。

蛍光強度は 3D-Gene Scanner（東レ）により測定した。固体レーザー光源により励起波長 635nm、蛍光波長 650nm にて得られた画像データを 3D-Gene Scanner に搭載した解析ソフトウェアによって数値化した。

取得したマイクロアレイデータは、GeneSpringGX ver 12.5 (Aglient) を用いて解析した。アレイ間のデータのばらつきを補正するため、他の miRNA アレイ実験やバイオマーカー同定の研究等で一般的に施行されている通り、アレイごとにそのアレイの全発現量の 75 percentile の値を用い、発現量からその値を引き算する補正を行った (Fu et al., 2014, Sukata et al., 2011)。なお、マイクロアレイデータの特性として、信頼性の低い低発現量のプローブが多数存在する現象が知られている。75 percentile の値はそれらのプローブの影響を排し、信頼性の高いプローブ間における実質 50 percentile (中央値) 程度の値とみなせ、精度の高い補正が可能になることが先行研究により明らかにされている (Lockhart et al., 1996)。

#### 2.2.6. 定量的 real-time PCR

網羅的 miRNA 発現解析の結果は、miScript Primer Assays (Qiagen)を用いた定量的 real-time PCR 法により確認した。

2.2.3 により抽出した miRNA から、まずは miScript II RT Kit (Qiagen) による逆転写を行い以下の手順で cDNA を作成した。具体的には、 $1\mu\text{l}$  の miRNA、 $2\mu\text{l}$  の 5x miScript HiSpec Buffer、 $1\mu\text{l}$  の 10x miScript Nucleics Mix (Oligo-dT primer を含む)、 $1\mu\text{l}$  の miScript Reverse Transcriptase Mix、 $1.1\mu\text{l}$  の 外因性コントロール cel-miR-39 ( $1 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{l}$ )と  $3.9\mu\text{l}$  RNase フリー水を混合し、 $37^\circ\text{C}$ で 60 分間インキュベートした後に、 $95^\circ\text{C}$ 、5 分間で miScript Reverse Transcriptase Mix を不活化させ、cDNA を得た。

定量的 real-time PCR は、Applied Biosystems 7900 Realtime PCR system を用いて行った。なお、本実験系では内因性コントロールが知られておらず、同一の総 miRNA 量に対して、外因性コントロール (Syn-cel-miR-39-3p miScript miRNA Mimic (MSY0000010)、Qiagen) を等量(1 反応系あたり  $1 \times 10^8$  copies) 添加することで代替した(Kroh et al., 2010)。

384 well プレートを用い、1 well につき、反応液  $8\mu\text{l}$  (2x QuantiTect® SYBR GreenPCR Master Mix  $5\mu\text{l}$ 、10x miScript Universal Primer  $1\mu\text{l}$ 、10x miScript Primer Assay  $1\mu\text{l}$ 、RNase フリー水  $1\mu\text{l}$ ) に cDNA を  $2\mu\text{l}$  加え、混合した。

PCR 反応は、

変性 95°C, 15 分

変性 94°C, 15 秒、アニーリング 55°C, 30 秒、伸長 70°C, 30 秒 x 40 サイクル  
により行った。

それぞれの miRNA 相対量は、cel-miR-39 をコントロールとして、各 CT 値及び  
コントロールの CT 値から  $\Delta CT$  を算出し、 $2^{-\Delta CT}$  にて数値化した (Schmittgen and  
Livak, 2008)。なお、各実験は、全てのサンプルを triplicate で行い、CT 値は  
それぞれの平均値を用いている。

miRNA アッセイ用プローブ (Qiagen) リストを以下に示す。

Hs\_miR-223\_1 miScript Primer Assay (MS00003871)

Hs\_miR-6131\_1 miScript Primer Assay (MS00045458)

Hs\_miR-16\_2 miScript Primer Assay (MS00031493)

Ce\_miR-39\_1 miScript Primer Assay (MS00019789)

## 2.2.7. 統計学的解析

各群間の統計学的有意性の解析法として、2 群間の差の検定には student-t 検  
定を、また、2 変数間の相関係数の検定にはピアソンの相関係数を用いた。アレ  
イの結果について、Benjamini-Hochberg FDR (False Discovery Rate) による多

重比較の補正を行った。なお、得られた  $p$  値が 0.05 未満の時に統計的に有意と判断した。

表 3 初回エピソード統合失調症患者群と健常者群における臨床指標

	健常者対照群	初回エピソード統合失調症患者群
参加者数（男：女）	17（8：9）	17（8：9）
年齢（年）	24.90±1.19	23.56±1.63
発症年数（年）		2.61±0.50
陽性症状尺度		15.06±1.16
陰性症状尺度		18.59±2.15
総合精神病理尺度		34.35±2.52
機能の全体的評定尺度		37.53±2.49
精神病未治療期間（日）		221.59±88.52
統合失調症に対する薬物療法治療期間（日）		57.76±9.48

表 4 慢性期統合失調症患者群と健常者群

	健常者対照群	統合失調症患者群
参加者数（男：女）	19（11：8）	19（11：8）
年齢（年）	33.63±0.87	31.68±1.19
発症年数（年）		12.42±1.00

## 2.3. 結果

### 2.3.1. 臨床指標

各群における採血時点での臨床指標等を表3にまとめた。

17人の初回エピソード統合失調症患者の内訳は男女比8:9、平均年齢は $23.3 \pm 1.3$ : $24.0 \pm 1.8$ に対して、17人の健常対照者は男女比8:9、平均年齢は $26.4 \pm 1.9$ : $23.0 \pm 2.7$ 、年齢において、二群間での差がなかった ( $p=0.70$  と  $0.31$ )。

発症年数については、発症から平均して約2年半弱 ( $2.61 \pm 0.50$  年) 経過していったことがわかった。

PANSS のスコアによると、統合失調症の精神症状を評価する陽性症状尺度は平均15点、陰性症状尺度は平均18点、総合精神病理尺度は平均34点だったことから、統合失調症の陽性・陰性症状としては重度ではないものの、精神機能の全体的評定尺度の点数は平均37点(100点満点)であったことから、社会生活や日常生活には深刻な支障をきたしつつあったと思われる。精神病未治療期間は平均半年強 ( $221.59 \pm 88.52$  日)、統合失調症に対する薬物療法治療期間は平均2ヶ月弱程度であった。

### 2.3.2. 網羅的 miRNA 発現解析

17名の初回エピソード統合失調症患者と年齢性別を対応させた17名の健常対

照者の血漿から 3D-Gene™ RNA extraction reagent from liquid sample を用いて抽出した miRNA について、3D-Gene Human miRNA Oligo chips を用いた網羅的発現解析を行った。

アレイで検出可能な 2019 個 miRNA に対し、患者群では  $785.8 \pm 27.85$  個（平均±標準誤差）、健常者群では  $719 \pm 22.7$  個が検出され、群間差は認められなかった（ $p=0.0725$ ）（図 1）。

全プローブの 75 percentile median でノーマライゼーション後、全サンプルで検出しえた miRNA について、相対発現量を unpaired t-test により比較したところ、 $p < 0.05$  のものは、106 個であった。Benjamini-Hochberg FDR 補正では、hsa-miR-16-5p（miR-16）、hsa-miR-223-3p（miR-223）、hsa-miR-6131（miR-6131）の 3 つの miRNA の相対発現量が患者と健常対照者間で有意に異なっていた。



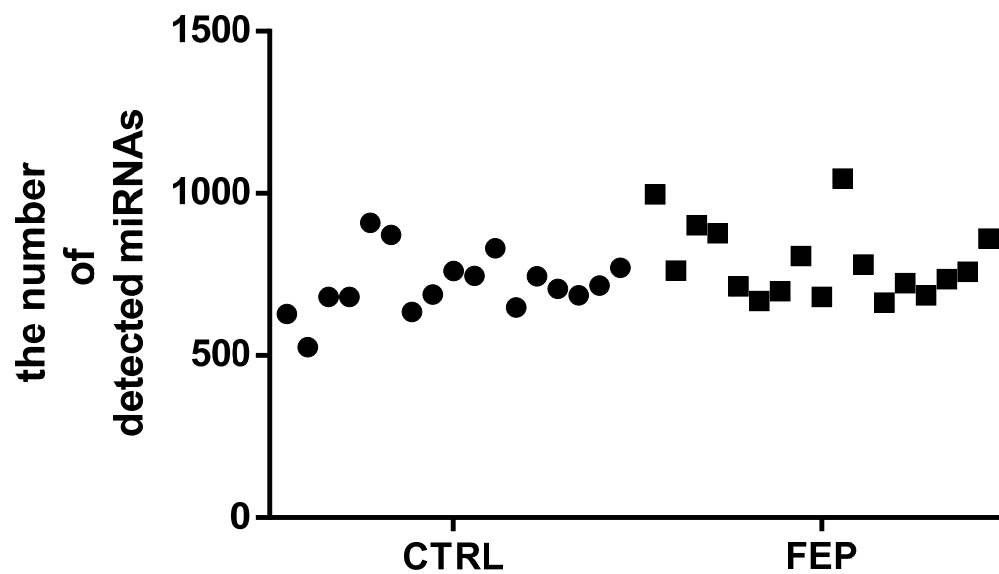


図1 初回エピソード統合失調症患者群と健常者群におけるmiRNA検出数の比較  
 健常者 (CTRL●) または統合失調症患者 (FEP■) の血漿からmiRNAを抽出し、3D-Gene Human miRNA Oligo chipsを用いて、検出されたmiRNAのプローブ数を示す。

### 2.3.3. 定量的 real-time PCR 法による確認

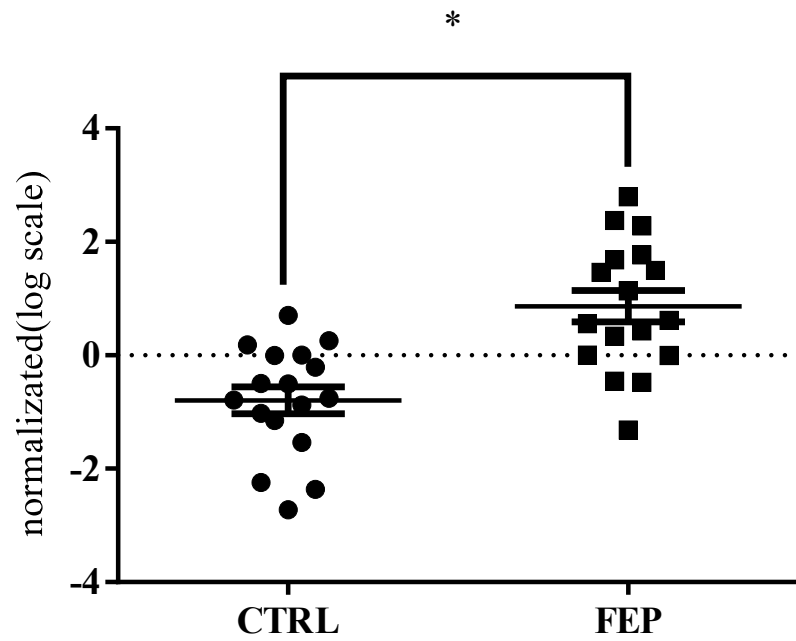
網羅的 miRNA 発現解析により候補として得られた miRNA (miR-223、miR-16、miR-6131)の発現量は、定量的 real-time PCR により確認した。

網羅的 miRNA 発現解析に用いた同一血漿より miRCURY™ RNA Isolation Kit - Biofluids を用いて miRNA を抽出した。血漿における明確な内因性コントロールとなる miRNA は知られていないため、外因性の線虫由来 cel-miR-39(miR-39)をサンプル内に添加することにより、コントロールとして使用した。

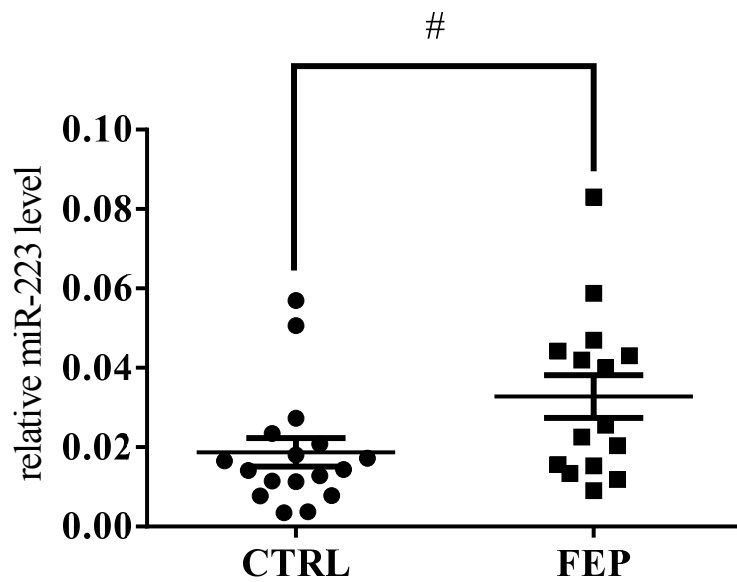
それぞれの結果について、図 2 に示す。

miR-223 の定量的 real-time PCR の結果では、患者群 ( $2^{-\text{dCT} = -(\text{CTmiR-223} - \text{CTmiR-39})}$   $0.033 \pm 0.005$ )、健常者群 ( $2^{-\text{dCT} = -(\text{CTmiR-223} - \text{CTmiR-39})}$   $0.019 \pm 0.0036$ ) で、有意に患者において発現量が高く ( $p=0.033$ , unpaired t-test)、網羅的発現解析結果と同方向であった (図 2A, B)。一方、miR-16 (患者群 ( $2^{-\text{dCT} = -(\text{CTmiR16} - \text{CTmiR-39})}$ ,  $0.035 \pm 0.0036$ )、健常者群 ( $2^{-\text{dCT} = -(\text{CTmiR16} - \text{CTmiR-39})}$ ,  $0.031 \pm 0.0048$ )、 $p=0.52$ ) 及び miR-6131 (患者群 ( $2^{-\text{dCT} = -(\text{CTmiR6131} - \text{CTmiR-39})}$ ,  $0.000064 \pm 0.000077$ )、健常者群 ( $2^{-\text{dCT} = -(\text{CTmiR6131} - \text{CTmiR-39})}$ ,  $0.000047 \pm 0.000067$ )、 $p=0.10$ )) では、網羅的発現解析結果は再現されなかった (図 2C 及び図 2D)。

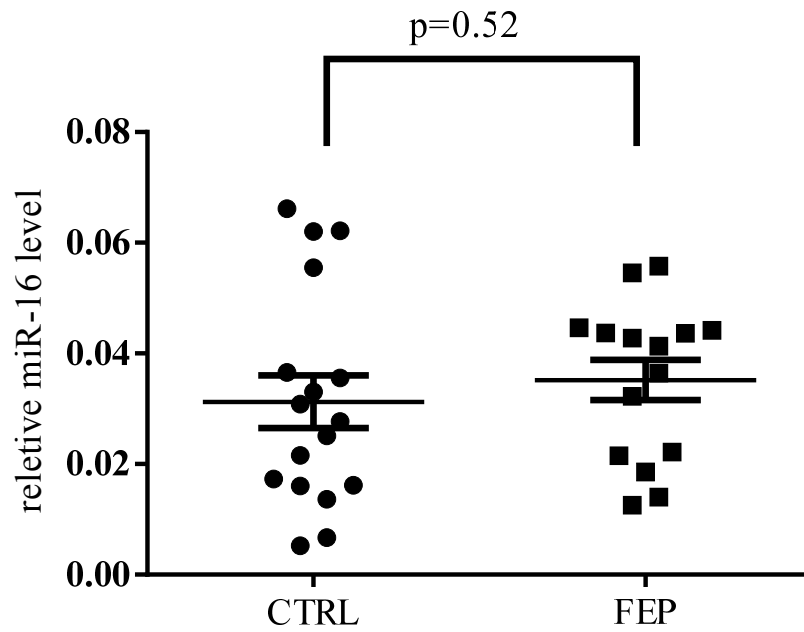
A) miR-223 array data



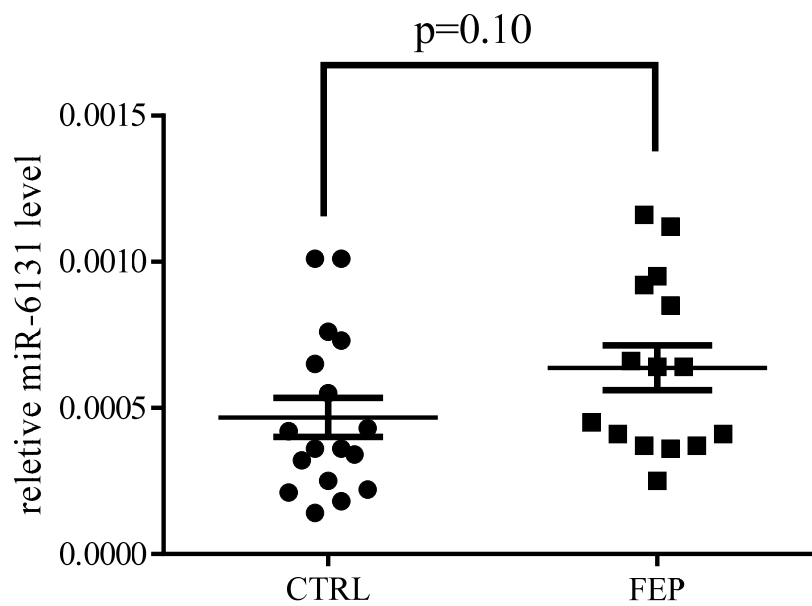
B) miR-223 validation



C) miR-16 validation



D) miR-6131 validation



## 図2 血漿中 miRNA の発現

A) 初回エピソード統合失調症患者群と健常者群の miR-223 (網羅的 miRNA 解析)

●: 健常者 (n=17)、■: 患者 (n=17)、平均値±標準誤差。\* $p < 0.05$ 、unpaired t-test、Benjamini-Hochberg FDR 補正。

B): 初回エピソード統合失調症患者群と健常者群の miR-223 (定量的 real-time PCR)。縦軸: 外因性 miR-39 に対する相対量。●: 健常者 (n=17)、

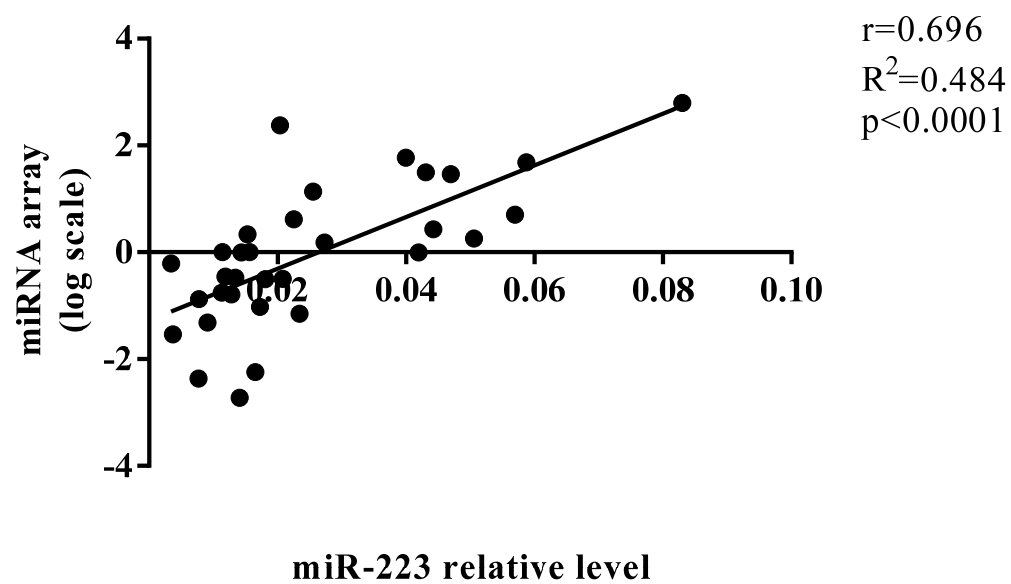
■: 患者 (n=15)、平均値±標準誤差。\* $p < 0.05$ 、unpaired t-test。

C): 初回エピソード統合失調症患者群と健常者群の miR-16 (定量的 real-time PCR)。縦軸: 外因性 miR-39 に対する相対量。●: 健常者 (n=17)、■: 患者 (n=15)、平均値±標準誤差。\* $p < 0.05$ 、unpaired t-test。

D): 初回エピソード統合失調症患者群と健常者群の miR-6131 (定量的 real-time PCR)。縦軸: 外因性 miR-39 に対する相対量。●: 健常者 (n=17)、■: 患者 (n=15)、平均値±標準誤差。\* $p < 0.05$ 、unpaired t-test。

#### 2.3.4. 網羅的解析結果と定量的 real-time PCR 結果の相関

miR-223 について、網羅的解析結果と定量的 real-time PCR 結果についてピアソンの相関係数を調べたところ、有意な相関がみられた (Pearson' s  $r=0.696$ ,  $R^2=0.48$ ,  $p<0.0001$ 、図 3)。



### 2.3.5. miR-223 と臨床指標との相関

miR-223 の発現量と初回エピソード統合失調症の臨床指標との関係を調べるために、miR-223 の相対量と陽性・陰性症状評価尺度及び機能の全体的評価尺度との相関を分析した。Person の相関係数をもとに検討したところ、miR-223 の発現量 ( $2^{-\Delta CT} = -(CT_{miR-223} - CT_{miR-39})$ ) と統合失調症の症状を評価する陽性症状評価尺度、陰性症状評価尺度及び総合精神病理尺度との間に有意な相関はなかった (図 4-6)。また機能の全体的評価尺度についても miR-223 の発現量との相関を認めなかった (図 7)。

初回エピソード統合失調症患者群において、精神病未治療期間 (Duration of Untreated Psychosis: DUP) と miR-223 の発現変化 ( $2^{-\Delta CT} = -(CT_{miR-223} - CT_{miR-39})$ ) に負の相関傾向が見られた (Pearson' s  $r = -0.48$ ,  $R^2 = 0.23$ ,  $p = 0.07$ 、図 9)。また精神病に対する薬物療法治療期間との有意な相関は認めなかった (図 8)。

本研究で使用したサンプルを男女二群に分けて解析したところ、男女ともににおいて、miR-223 の有意な上昇を認め (男性  $0.019 \pm 0.005$  vs  $0.030 \pm 0.008$ 、女性  $0.018 \pm 0.005$  vs  $0.034 \pm 0.007$ 、 $p = 0.048$ )、性差は認めなかった ( $p(\text{性別} \times \text{病気}) = 0.702$ 、図 10)。



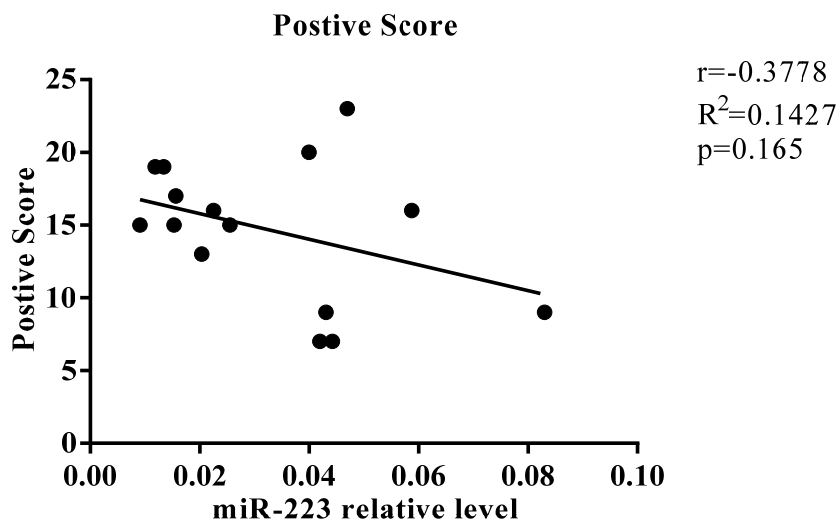


図 4 初回エピソード統合失調症患者群における、陽性症状尺度 (Positive Score) と miR-223 の発現変化の相関関係図

miR-223 の相対発現量 ( $2^{-\text{dCT}} = -(CT_{\text{miR-223}} - CT_{\text{miR-39}})$ ) と陽性症状尺度 (Positive Score) について有意な相関は認めなかった ( $p=0.165$ )。

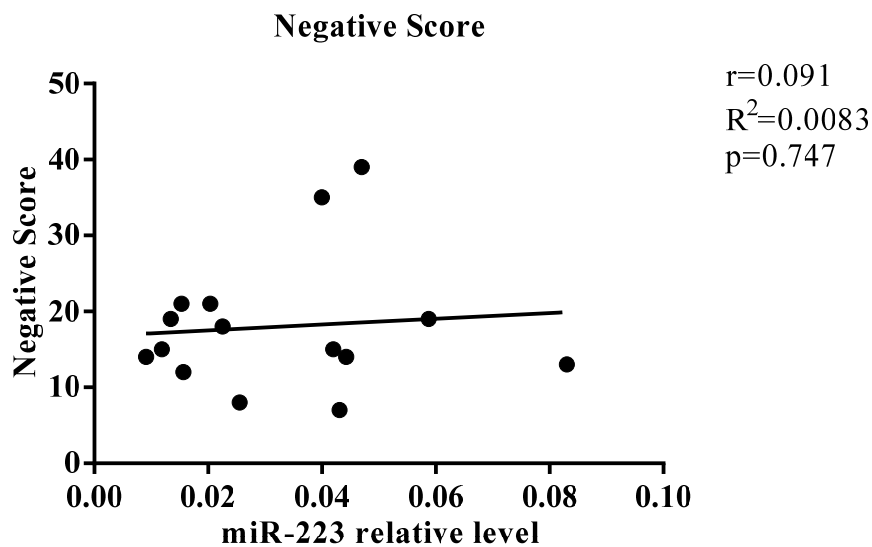


図 5 初回エピソード統合失調症患者群における、陰性症状尺度 (Negative Score) と miR-223 の発現変化の相関関係図

miR-223 の相対発現量 ( $2^{-\text{dCT}} = -(CT_{\text{miR-223}} - CT_{\text{miR-39}})$ ) と陰性症状尺度 (Negative Score) について有意な相関は認めなかった ( $p=0.747$ )。

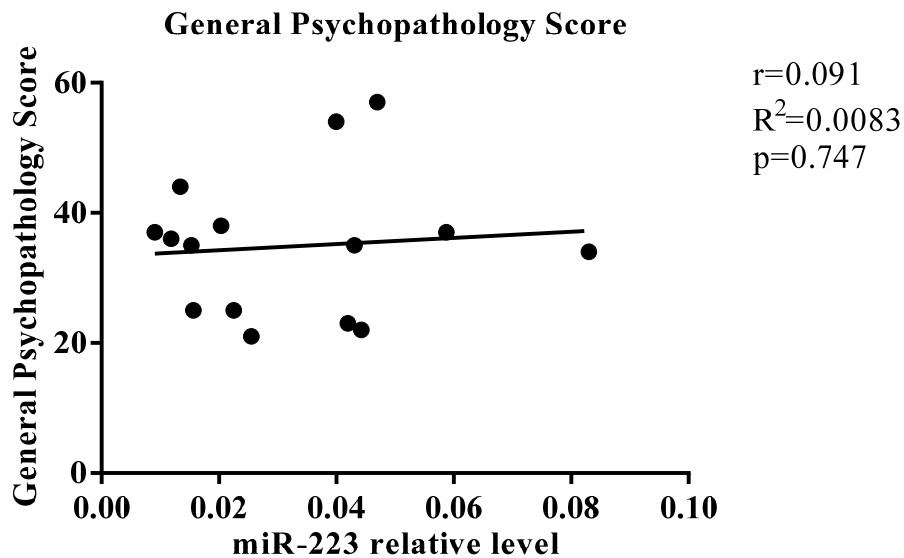


図 6 初回エピソード統合失調症患者群における、総合精神病理尺度 (General Psychopathology Score) と miR-223 の発現変化の相関関係図

miR-223 の相対発現量 ( $2^{-\Delta CT} = -(CT_{miR-223} - CT_{miR-39})$ ) と総合精神病理尺度 (General Psychopathology Score) について有意な相関は認めなかった ( $p=0.747$ )。

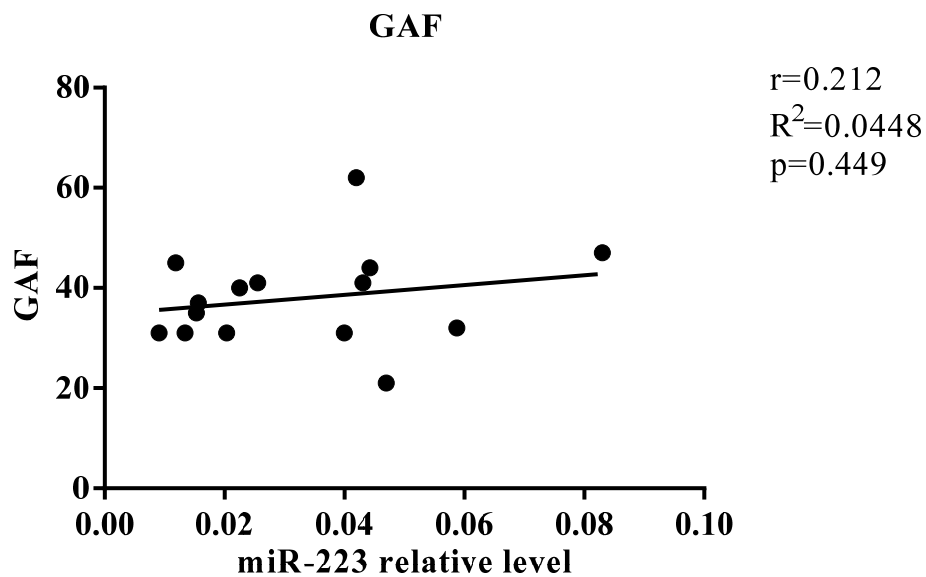


図 7 初回エピソード統合失調症患者群における、機能の全体的評定尺度 (GAF) と miR-223 の発現変化の相関関係図

miR-223 の相対発現量 ( $2^{-\Delta CT} = -(CT_{miR-223} - CT_{miR-39})$ ) と機能の全体的評定尺度 (GAF) について有意な相関は認めなかった ( $p=0.449$ )。

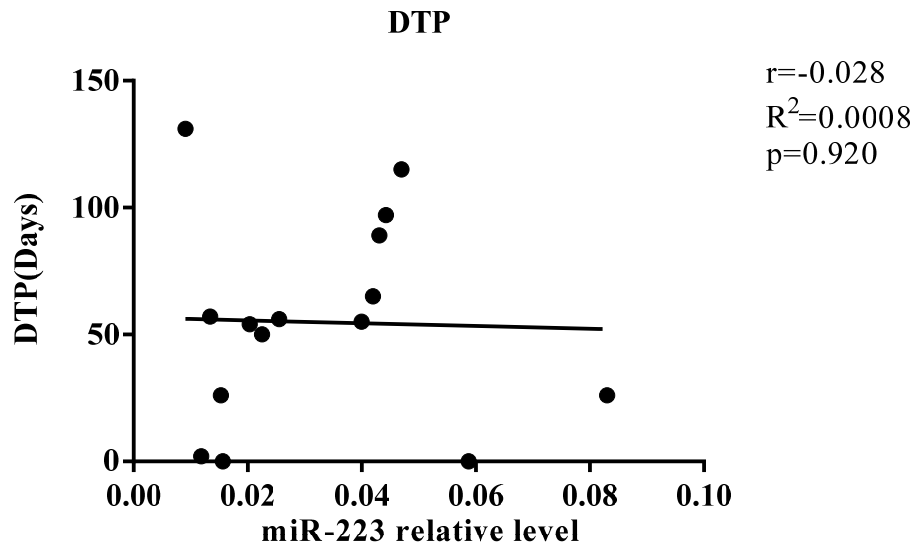


図 8 初回エピソード統合失調症患者群における、統合失調症に対する薬物療法治療期間(DTP)と miR-223 の発現変化の相関関係図

miR-223 の相対発現量 ( $2^{-\text{dCT} = -(\text{CTmiR-223} - \text{CTmiR-39})}$ ) と統合失調症に対する薬物療法治療期間(DTP)について有意な相関は認めなかった ( $p=0.920$ )。

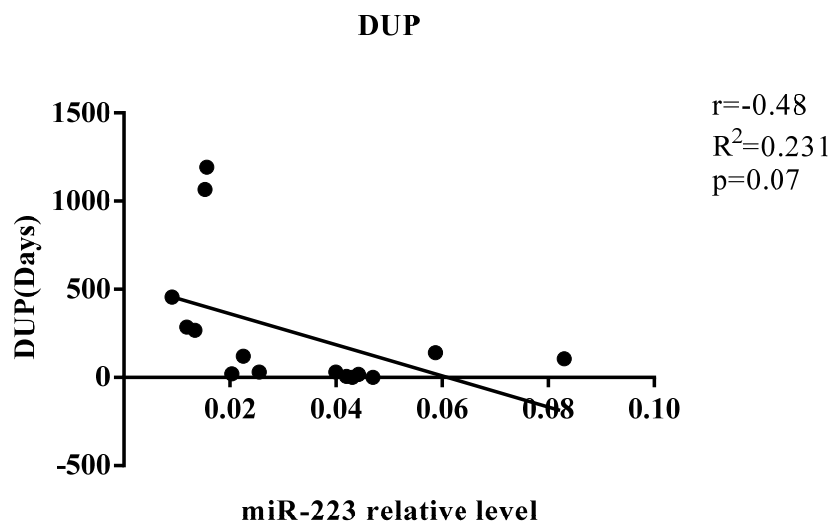


図 9 初回エピソード統合失調症患者群における、精神病未治療期間(DUP)と miR-223 の発現変化の相関関係図

miR-223 の相対発現量 ( $2^{-\text{dCT} = -(\text{CTmiR-223} - \text{CTmiR-39})}$ ) と精神病未治療期間(DUP)について相関する傾向があった ( $p=0.07$ )。

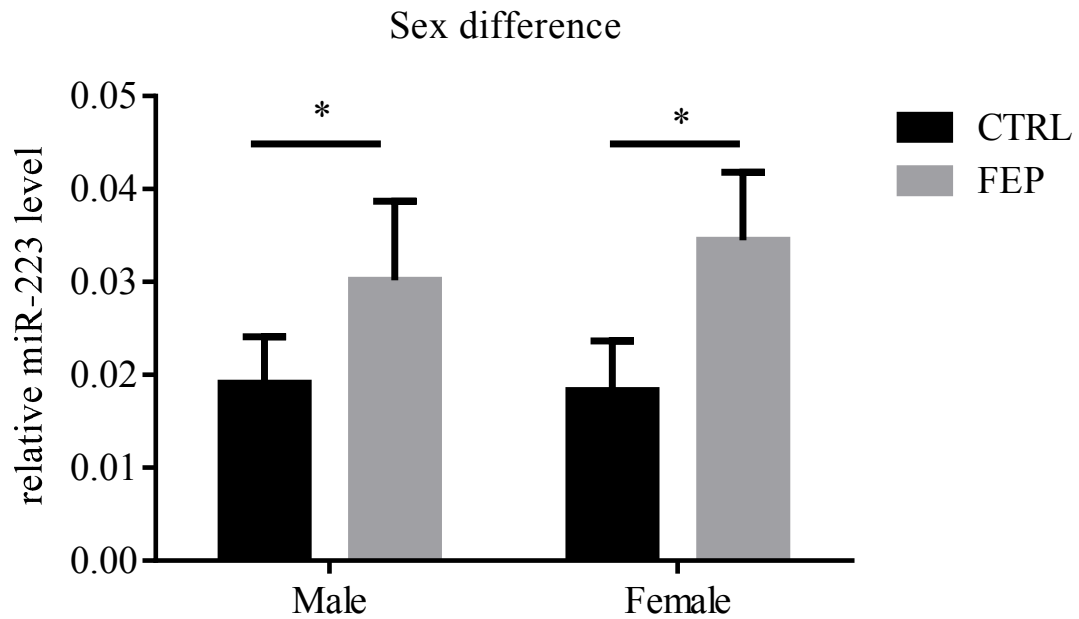


図 10 初回エピソード統合失調症患者群と健常者群の男女間における miR-223 定量 realtime PCR の結果

miR-223 の発現量は外因性 miR-39 によって補正され、健常者(CTRL 黒色、男性 8 名、女性 9 名) および初回エピソード統合失調症患者(FEP 灰色、男性 6 名、女性 9 名) の平均値 (±標準誤差) をグラフ化した。\*は  $p < 0.05$ 、two-way anova を行ったところ性差は認めなかった ( $p(\text{性別} \times \text{病気}) = 0.703$ )。

#### 2.3.6. 発症後5年以上経過している統合失調症患者における血漿中 miR-223 変化

これまで述べてきた発症期患者の結果と比較するため、年齢と性別をマッチングさせて、血漿中の miR-223 の発現量に関するケースコントロール研究を行った。まず、発症後5年以上経過している統合失調症患者19人（男女比11:8、平均年齢  $31.68 \pm 1.19$  歳、平均発症年数  $12.42 \pm 1.00$  年）と19人健常対照者（男女比11:8、平均年齢  $33.63 \pm 0.87$  歳、）とで性別構成と年齢をマッチングさせ（性別、 $P=1.0$ 、年齢、 $P=0.194$ ）、ケースコントロール研究を行った（表4）。血漿から miRNA を抽出し、miR-223 を定量 realtime PCR で解析し、外因性の miR-39 を用いてノーマライズしたところ、健常者群において miR-223 の相対量は  $0.069 \pm 0.018$  と、初回エピソード統合失調症患者群は  $0.101 \pm 0.024$  との間に、有意な差異は認めなかった（ $p=0.29$ 、図11）。

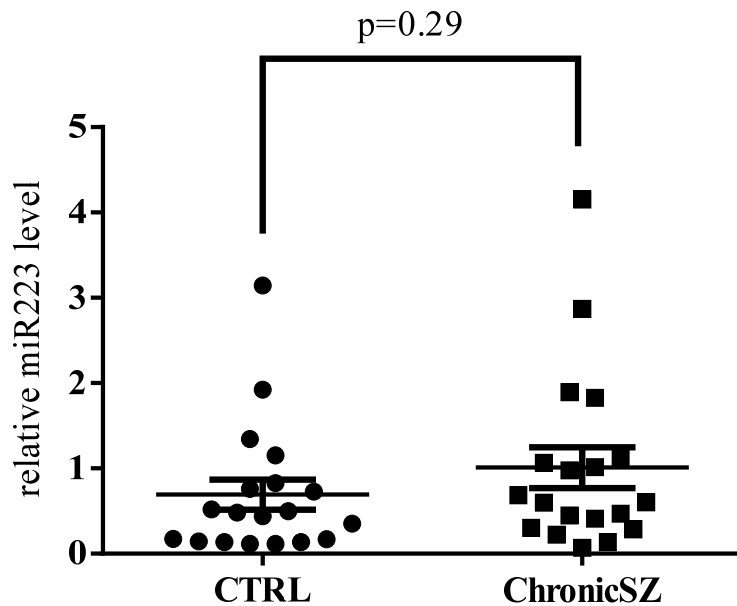


図11 発症後5年以上経過している統合失調症患者群と健常者群の miR-223 定量 realtime PCR を miR-39 でノーマライズした結果

発症後5年以上経過している統合失調症患者 (Chronic SZ■、19人) または年齢とマッチした健常者 (CTRL●、19人) の血漿から miRNA 抽出し、miR-223 の定量 realtime PCR を行い、miR-223 の発現量は外因性 miR-39 によって補正され、平均値 (±標準誤差) をグラフ化した。慢性期患者における miR-223 の有意な上昇を認めなかった ( $p=0.29$ )。

## 2.4. 考察

本章では、初回エピソード統合失調症患者及び健常対照者の血漿中 miRNA のマイクロアレイによる網羅的発現解析及び結果の定量的 real-time PCR 法による確認から、miR-223 の患者における上昇を見出した。

今回の研究では、患者・対照群の血漿を用いた。理由としては、血漿であれば侵襲度の低い方法で患者・対照群からの採取が可能であると考えられること、また血漿を用いた研究であれば、仮に重要な因子が明らかになった場合には、将来の臨床応用につながりやすいことも考えられたからである。

miR-223 は破骨細胞分化に関与することや、血幹細胞、前駆細胞の動態変化に影響すると報告されているものの、中枢神経系への関与はまだ報告が少なく、機能は十分に明らかにされていない (Fazi et al., 2005, Johnnidis et al., 2008)。最近の miR-223 ノックアウトマウスを用いた研究から、NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2B サブユニット及び AMPA 型受容体 GluR2 サブユニット 4 の発現量ならびに機能を制御しうることが報告され、miR-223 と中枢神経系との関連の一端が明らかになり、また miR-223 が神経保護的に働くことが示唆された (Harraz et al., 2012)。miR-223 は統合失調症死後脳で上昇しているという報告があり (Beveridge et al. (2010))、本研究結果とあわせ、病態に何らかの関与をしている可能性が考えられた。

一方、本研究においては方法論的制約について慎重に検討する必要がある。

本研究では miRNA のマイクロアレイ解析の結果をリアルタイム RT-PCR 法により検証した。マイクロアレイ解析は、プローブとの特異的なハイブリダイゼーションを基本とした検出原理をとり、多くの遺伝子について一度の実験で情報が得られるものの、厳密な定量性に欠ける欠点があり、データの解釈は探索的なものと留めるべきである。特に miRNA は 22nt 程度の短い配列 1 種のプローブあるいは前駆型に設計された少数のプローブで識別されるため、遺伝子発現解析マイクロアレイのように多数のプローブのハイブリダイゼーションシグナルの組み合わせによる解析ができない。そのため、さらに特異性や定量性に欠けることが知られている。

一方、定量的 RT-PCR による解析は、RNA を cDNA に逆転写し、目的領域を PCR 法にて 増幅するもので、マイクロアレイ解析と比べて高感度で高い定量性、再現性があることが知られているが、多種の分子種の測定には不向きである。

発現変動が再現ができなかった miRNA や miR-223 における低い相関係数は、前述した miRNA のマイクロアレイ技術の原理的欠陥に由来することに加え、調べた miRNA が細胞内でもともと低発現を示していることに起因すると考えられる。細胞内で高発現を示すような miRNA については、アレイと定量 PCR の相関については、本研究と同様に相関係数が  $r = 0.7$  程度であるが (Morey et al., 2006,



Chen et al., 2009)、低発現量の miRNA の相関係数は両者間で 0.1~0.4 と極めて低くなっている (Chen et al., 2009, Git et al., 2010)。

他のより少ない可能性として、2 つの手法についてそれぞれに異なる RNA 抽出方法を選んだため、抽出方法の変更に伴う誤差も原因の一つとなっている可能性が考えられる。実際、抽出方法によって、miRNA の結果が変動する報告もある (Monleau et al., 2014)。

本研究では、miRNA のマイクロアレイ解析の結果を探索的な候補遺伝子の同定と位置付け、定量的 RT-PCR 法による発現変動が再現できた miR-223 についてのみ着目した。しかし、独立したサンプル集団でさらに確認する必要があり、また、本研究で対象としたサンプル数が少ないことから、今後本研究の妥当性をさらに検証するためには、症例を集積していく必要がある。今後は初回エピソード患者が来院しやすいことを考え、地域医療機関との連携体制を強化することにより、症例の集積を進めていく方針である。

また患者においては、完全な未服薬状態ではないため、今回の結果について服薬の影響が排除できない。向精神病薬の投与によって、中枢神経系における miRNA のプロファイリングが変動するという報告はあるが (Santarelli et al., 2013)、血中も含め miR-223 についての報告はない。本研究で患者群における薬物の治療期間と miR-223 の発現量は相関関係がなかった (図 8) ことから、血

漿中 miR-223 への抗精神病薬による影響が少ない可能性を示唆するが、今後は服薬の前後における miR-223 の発現変化といった検討が必要である。

また、発症後 5 年以上経過している統合失調症患者のサンプル数の少なさも本研究の制約である。統計的パワーを考慮すると今回の発症後 5 年以上経過している統合失調症患者数が少ないと言わざるを得ない。慢性期に血漿中の miR-223 が変動しないと結論づけるには、数百人単位でのバリデーションを要すると考えられ、今後の課題である。

統合失調症の臨床症状評価として、陽性症状尺度、陰性症状尺度、総合精神病理尺度、機能の全体的評定尺度とは相関がなかった(図 6-9)。しかし、本結果は独立サンプルによる再現性が確認されておらず、現時点では慎重に解釈されるべきである。

そして、血漿を用いた miRNA 研究による結果と脳組織での挙動との相関はこれまでの研究でも十分には明らかにされておらず、今回の結果がいかに統合失調症と関連するかについては不明な部分が多い。また、本研究では miR-223 以外の死後脳研究で報告された miRNA について再現が得られなかった。この原因として、発症期と死後脳の中心と思われる老齢期とでは疾患の状態自体が異なることが考えられるが、文献的にはさらに以下の理由が挙げられる。

①死後脳研究においては、薬の影響で脳内の miRNA の発現プロファイルが

変わることがある (Santarelli et al., 2013)。

②発症間もない状態と発症 10 年経過した状態で必ず一致しないことである  
(van Haren et al., 2008)。

### 3. SK-N-SH 細胞を用いた miR-223 の標的遺伝子解析

#### 3.1. 目的

第 2 章において、初回エピソード統合失調症患者における、血漿中 miR-223 の上昇が見出され、疾患病態に関与している可能性が考えられた。

血中に分泌された miRNA は、血液脳関門を通過することから中枢神経系を含めた体内の各組織に対して作用するが、特に神経の発生過程において、同じ miRNA が異なるターゲットを制御することから、中枢神経系での複雑な情報伝達に積極的に関わっていることが示唆されている (Shenoy and Blelloch, 2014, Hua et al., 2009, Sood et al., 2006)。miR-223 における中枢神経系での機能的なターゲット因子は直接的には解明されておらず、その同定は、病態の解明に寄与する可能性がある。

そこで、本章では成熟ニューロンにおける miR-223 のターゲット因子の同定を目的とし、miR-223 の安定発現株を作成したうえで、レチノイン酸により分化した成熟ニューロンを用いて、網羅的遺伝子発現解析及び *in silico* ターゲット予測によって、標的候補遺伝子の同定を試みた。

### 3.2. 材料と方法

#### 3.2.1. 細胞培養

ヒト神経芽細胞腫由来細胞株である SK-N-SH 細胞 (American Type Culture Collection, NO. HTB-11) を、10% Fetal bovine serum (FBS) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Wako Chem) で培養した。培養は 10cm ディッシュを用い 3 日おきに培地交換を行った。細胞がほぼコンフルエント状態に達した際、TrypLE (Life Technologies) を用いて継代を行った (Split Ratio=1:5)。

#### 3.2.2. 遺伝子導入、安定発現細胞株の作成、成熟ニューロンへの分化誘導

miR-223 前駆体を CMV プロモーターにより発現するプラスミド (MI0000300) と、対照として miRNA 配列を持たないブランクプラスミド (pCMV-MIR) (いずれも Origene 社) を用いた。Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いた標準的な方法により、SK-N-SH 細胞に miR-223 の前駆体を発現するプラスミドと pCMV-MIR のそれぞれについて遺伝子導入を行った。遺伝子導入の 24 時間後、800  $\mu$ g/ml の G418 (Geneticin, Wako Chem) を含む培地に交換し、以後 2 日おきに培地交換を行い、計 2 週間の生存クローンの選択を行った。選別したクローン

維持の際には、200  $\mu$ g/ml の G418 を含む培地を使用した。

成熟ニューロンへの分化誘導は先行研究に従った(Pizzi et al., 2002)。

樹立した安定発現細胞を、10  $\mu$ M レチノイン酸と 200  $\mu$ g/ml の G418 を含む培地に、 $5 \times 10^5$  細胞/dish の密度で 10cm ディッシュに播種した。以後 2 日おきに培地交換を行い、計 10 日間培養を行った。

### 3.2.3. 細胞中 miRNA と全 RNA 抽出

miRCURY™ RNA Isolation Kit - cell&plant (Exiqon) を用いて、miRNA を含む全 RNA の抽出を以下の手順で行った。なお以下の buffer とスピнкаラムはキットに含まれているものを用いた。

①細胞培養液を完全に吸引後、PBS で細胞洗浄

② $10^6$  個細胞に対して、350  $\mu$ l の Lysis Solution を細胞に加え、5 分間静置

③新しいチューブに移した後に、200  $\mu$ l エタノールを加え、10 秒間ボルテックスミキサーで混和

④スピнкаラムにアプライし、室温で 3500xg、1 分間遠心し、ろ液を廃棄

⑤400  $\mu$ L の Wash Solution をスピнкаラムに添加した後に、室温で 14000xg、1 分間遠心し、ろ液を廃棄

⑥同じ洗浄を合計 3 回

⑦14000xg、2 分間遠心を行い、残存洗浄液を完全に溶出させスピンカラムを乾かせた

⑧スピンカラムを新しい 1.5 ml のコレクションチューブにセットし、50 $\mu$ l の RNase フリー水で miRNA の溶出

RNA 濃度は Nanodrop (N-1000, Thermo Sci) 或いは Dropsense 96 (Trinean) にて測定した。すべての mRNA サンプルは実験時まで-80℃で保管した。

#### 3.2.4. miRNA の定量的 real-time PCR

miRNA の定量的 real-time PCR については、miScript Primer Assays (Qiagen) を用いた。3.2.3 により抽出した total RNA 500ng から、miScript II RT Kit (Qiagen) を用いて逆転写により cDNA を合成した。具体的には、500ng の total RNA、2 $\mu$ l の 5x miScript HiSpec Buffer、1 $\mu$ l の 10x miScript Nucleics Mix (Oligo-dT primer を含む)、1 $\mu$ l の miScript Reverse Transcriptase Mix、と RNase フリー水（トータル容量が 10 $\mu$ l になるように加える）を混合し、37℃ で 60 分間インキュベートした後に、95℃、5 分間で miScript Reverse Transcriptase Mix を不活化させ、cDNA を得た。

定量的 real-time PCR は、Applied Biosystems 7900 Realtime PCR system を

用いて行った。384 well プレートを用い、1 well につき、反応液 8  $\mu$ l (2x QuantiTect® SYBR GreenPCR Master Mix 5  $\mu$ l、10x miScript Universal Primer 1  $\mu$ l、10x miScript Primer Assay 1  $\mu$ l、RNase フリー水 1  $\mu$ l) に cDNA を 2  $\mu$ l 加え、混合した。PCR 反応は、

変性 95°C, 15 分

変性 94°C, 15 秒、アニーリング 55°C, 30 秒、伸長 70°C, 30 秒 x 40 サイクル  
により行った。

それぞれの miRNA 相対量は、RNU6B をコントロールとして、各 CT 値及びコントロールの CT 値から  $\Delta$ CT を算出し、 $2^{-\Delta CT}$  にて数値化した (Mi et al., 2007)。  
なお、各実験は、全てのサンプルを triplicate で行い、CT 値はそれぞれの平均値を用いている。

miRNA アッセイ用プローブリスト (QIAGEN) を以下に示す。

Hs\_miR-223\_1 miScript Primer Assay (MS00003871)

Hs\_RNU6-2\_11 miScript Primer Assay (MS00033740)

### 3.2.5. タンパク質の抽出とウェスタンブロットによる検出

細胞培養液を完全に吸引後廃棄し、PBS で洗浄を行ったあと、proteinase inhibitor (Protease Inhibitor Cocktails, Sigma) を含む細胞溶解用バッフ



ァー（哺乳動物細胞用 Cell Lysis Buffer, Wako Chem）を用いて、タンパク質の抽出を行った。

タンパク質の濃度定量は、Qubit Protein Assay Kit (Life technologies) を用いて行った。定量後、細胞溶解用バッファーでサンプル間の濃度を揃えた後、4X Laemmli サンプルバッファー（ $\beta$ メルカプトエタノール添加済み）(Wako Chem) を添加し、95℃5 分間で熱変性させた。サンプルは実験に供するまで-20℃で保存した。

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は、4－15%の TGX ゲル (Bio-rad) を用いて、150 v 定電圧にて 30 分間 Tris-Glycine-SDS バッファー (Takara) で泳動した。Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon-P, Millipore) への転写は Trans Blot Cell (Bio-Rad) を用いて、100v 定電圧で 60 分、Tris-Glycine バッファー (Takara) で行った。転写後、メンブレンは 5% スキムミルクを添加した 0.1% tween-20 含有 Tris-buffered saline (TBS) によって室温で 1 時間のブロッキング反応を行った。メンブレンは、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (Toyobo) で希釈した 1 次抗体液と 4℃で一晩反応させた。その後、horseradish peroxidase (HRP) を結合した抗 IgG 抗体 (1 : 5000) と室温で 1 時間反応させ、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用いて LAS4000 (GE

healthcare)で測定した。

使用した1次抗体のリストと希釈率を以下に示す。

抗 GAPDH 抗体：Anti-GAPDH mAb-HRP-DirecT (MBL) (1 : 1000)

抗 NES 抗体：Anti-Neuron-specific enolase (NSE) pAb (MBL) (1 : 1000)

抗 GFAP 抗体：Anti-GFAP antibody (Sigma) (1 : 1000)

### 3.2.6. 細胞中遺伝子発現のプロファイリング解析

抽出した total RNA は、NanoDrop (Thermo Sci) 及び Agilent 2100 Bioanalyzer を用いた品質検定を行い、SurePrint G3 Human GE 8x60K v2 Microarray を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。なお、RNA の品質検定以降、スキャナによるマイクロアレイデータ取得までタカラバイオ社への受託解析で行った。概略すると、Agilent 社のプロトコールに従い Low Input Quick Amp Labeling Kit (One-Color) (Agilent) を用いて、マイクロアレイ解析用のプローブ調整を行った。100ng の total RNA を使用し、キットに添付されたオリゴ dT に T7 プロモーターを付加したプライマーを用いた逆転写反応を行い cDNA 合成をおこなった。その後、T7 RNA ポリメラーゼによる in vitro transcription 反応で Cy3 で標識された cRNA を作製した。次に Gene Expression Hybridization Kit 及び Gene Expression Wash Buffers Pack (Agilent) を使い、SurePrint G3 Human GE 8x60K

v2 Microarray にて cRNA のハイブリダイゼーション反応及び洗浄を行った。その後、DNA マイクロアレイスキャナ (Agilent DNA Microarray Scanner (G2565CA)) を用い画像を取得した。

取得したマイクロアレイデータは、GeneSpringGX ver 12.5 (Agilent) を用いて解析した。アレイ間のデータのばらつきを補正するため、前章同様にアレイごとにそのアレイの全発現量の 75 percentile の値を用い、発現量からその値を引き算する補正を行った。

### 3.2.7. in silico miRNA ターゲット予測

miRNA の ター ゲ ッ ト mRNA 予 測 プ ロ グ ラ ム miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) (Dweep et al., 2011) を利用し、ターゲット mRNA 候補の同定を行った。予測アルゴリズムとして、Diana-microT (ver. 3.0) (Maragkakis et al., 2009)、miRanda (August 2010) (Betel et al., 2008)、miRDB (April 2009) (Wang, 2008)、PICTAR (March 2007) (Krek et al., 2005)、PITA (August 2008) (Kertesz et al., 2007)、RNA22 (May 2008) (Loher and Rigoutsos, 2012)、RNAhybrid (ver. 2.1) (Rehmsmeier et al., 2004)、Targetscan (ver. 5.1) (Lewis et al., 2005) を利用し、全遺伝子の 3' UTR を対象とした検索を行った。括弧内の記載は各アルゴリズムについて解析に使

用したバージョンを示す。どれか 1 つの予測アルゴリズムでも有意な検出ができた mRNA を、候補標的遺伝子とした。

### 3.2.8. 候補標的遺伝子の遺伝子発現解析

候補標的遺伝子の発現解析の結果は、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (NIPPON GENETICS)を用いて定量 real-time PCR 法により確認した。

3.2.3 により抽出した total RNA 500ng から、miScript II RT Kit (Qiagen) による逆転写を以下の手順で cDNA を合成した。具体的には、500ng の total RNA、 $2\mu\text{l}$  の 5x miScript HiFlex Buffer、 $1\mu\text{l}$  の 10x miScript Nucleics Mix (Oligo-dT primer を含む)、 $1\mu\text{l}$  の miScript Reverse Transcriptase Mix、と RNase フリー水（トータル容量が  $10\mu\text{l}$  になるように加える）を混合し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 60 分間インキュベートした後に、 $95^{\circ}\text{C}$ 、5 分間で miScript Reverse Transcriptase Mix を不活化させ、cDNA を得た。

定量的 real-time PCR は Applied Biosystems 7900 Realtime PCR system を用いて行った。 $384\text{ well}$  プレートを用い、 $1\text{ well}$  につき、反応液  $8\mu\text{l}$  (KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X)  $5\mu\text{l}$ 、sense Primer ( $5\mu\text{M}$ )  $0.4\mu\text{l}$ 、antisense Primer ( $5\mu\text{M}$ )  $0.4\mu\text{l}$ 、RNase フリー水  $3.2\mu\text{l}$ ) に cDNA を  $1\mu\text{l}$  加え、混合した。PCR 反応は、

変性 95℃, 3 分

変性 94℃, 3 秒、アニーリングと伸長 60℃, 30 秒、x 40 サイクル

により行った。

得られた結果は GAPDH の発現量を内因性コントロールとして用い、 $2^{-\Delta CT}$  法で比較定量した (Barber et al., 2005)。全てのサンプルを triplicate で測定を行った。実験に供したプライマーのリストを表 5 に示す。

表 5 定量 real-time PCR に用いたプライマー

Gene		primer sequence
GAPDH	sense	AAAGGGTCATCATCTCTG
	antisense	GCTGTTGTCATACTTCTC
INPP5B	sense	AATGTCTTCCACTACTTG
	antisense	CTTCTTCTTCTCTGTCATA
RHOB	sense	TAGCATTCTGACCACACT
	antisense	GCCACATTCTTCAAGGAA
SKIL	sense	CCTCAATATAGATACCTCACTT
	antisense	AAGACTACTATGTTGGCTTAA
SYNE1	sense	GTCTACGATTCCTGTAACTC
	antisense	TGTGCTTCTCTATGTCTCT

### 3.2.9. 統計学的解析

2 群間の差の検定には Student t 検定を用い、得られた P 値が 0.05 未満の時に統計的に有意と判断した。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. miR-223 安定発現細胞株の作成と成熟ニューロンへの分化

miR-223 前駆体を CMV プロモーターにより発現するプラスミドと対照ブランクプラスミドをヒト神経芽細胞腫由来の細胞株 SK-N-SH に導入し、G418 添加培地を用い 14 日間選抜を行った。miR-223 安定発現細胞株と対照細胞株からランダムに各 4 クローン選抜し、良好な増殖が認められた各 3 クローンをその後の実験に供した。

10  $\mu$  M レチノイン酸と低 FBS 培地によってニューロンへの分化誘導を行った結果、樹状突起の進展など神経細胞特有の形態学的変化が確認された。代表例を図 12 に示す。その後、細胞株のタンパク質を抽出し、2 つのマーカートンパク質についてウェスタンブロッティングを行った。その結果、成熟ニューロンのマーカーである神経特異エノラーゼ (NSE) 発現が誘導されたのに対し、グリア細胞のマーカーであるグリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP) は変化しなかったことが確認された。代表例を図 13 に示す。すなわち、レチノイン酸により SK-N-SH 細胞が成熟ニューロンへの分化が示されたと考えられた。

分化誘導後の miR-223 の発現量を定量 realtime PCR 法により測定すると、安定発現群の miR-223 の発現量は、コントロール群と比較し約 4000 倍強に上ったことを確認した ( $1.186 \times 10^{-5} \pm 2.6 \times 10^{-6}$  vs  $0.051 \pm 0.016$ ,  $p=0.03$ , 図 14)。

### 3.3.2. miR-223 安定発現細胞株における遺伝子発現のプロファイリング解析

細胞内 miRNA の過剰発現によってターゲット mRNA の分解が促進すると想定されることから、mRNA 発現量を網羅的に解析することで、ターゲット mRNA を予想しうると考えられる。そこで、レチノイン酸で分化誘導した miR-223 の安定発現細胞株 3 つとコントロール細胞株 3 つについて、Agilent 社の SurePrint G3 Human GE 8x60K v2 Microarray を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

今回は miRNA のターゲット mRNA 探索を目的としたので、miR-223 の過剰発現により発現低下したものを中心的に解析を行った。まず、二群ともに検出されたプローブ (23401 個) に限定し、Unpaired t-test 検定を行い、 $p < 0.05$  のプローブ (減少した 724 個、増加した 316 個) を抽出し、更に発現量の fold change が 1.5 倍以上減少した 114 個プローブを後述の検討に用いた。

### 3.3.3. miR-223 の in silico ターゲット mRNA 予測

miRNA ターゲット mRNA の予測プログラムである miRWalk を利用し、全遺伝子の 3' UTR を対象とした検索を行い、miR-223 の予測結合サイト 994 個を抽出した。その結果、表 6 に示したように、inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase (INPP5B)、ras homolog family member B (RHOB)、SKI-like proto-oncogene (SKIL)、spectrin repeat containing, nuclear envelope 1



(SYNE1)について miR-223 の結合サイトが in silico で予測され、遺伝子発現解析においても有意な減少を示した。また、RHOB については、文献上にも miR-223 との関連が示唆された (Sun et al., 2010)。

#### 3.3.4. 定量 real-time PCR による発現量変化の検証

miR-223 の候補ターゲット mRNA の中から、INPP5B、SKIL、SYNE1、RHOB の 4 遺伝子を選択し、定量 real-time PCR による発現解析を行った。改めて miR-223 の安定発現細胞株とコントロール細胞株をレチノイン酸で分化誘導し、total RNA を抽出し実験に供した。結果は図 15 に示したように、miR-223 の安定発現細胞株ではコントロール細胞株と比較して、表 6 の通り SYNE1、SKIL、INPP5B、RHOB の発現量はそれぞれ mRNA レベルで Fold change -1.37、-1.64、-1.39、-1.45 倍に有意な発現減少を示した。

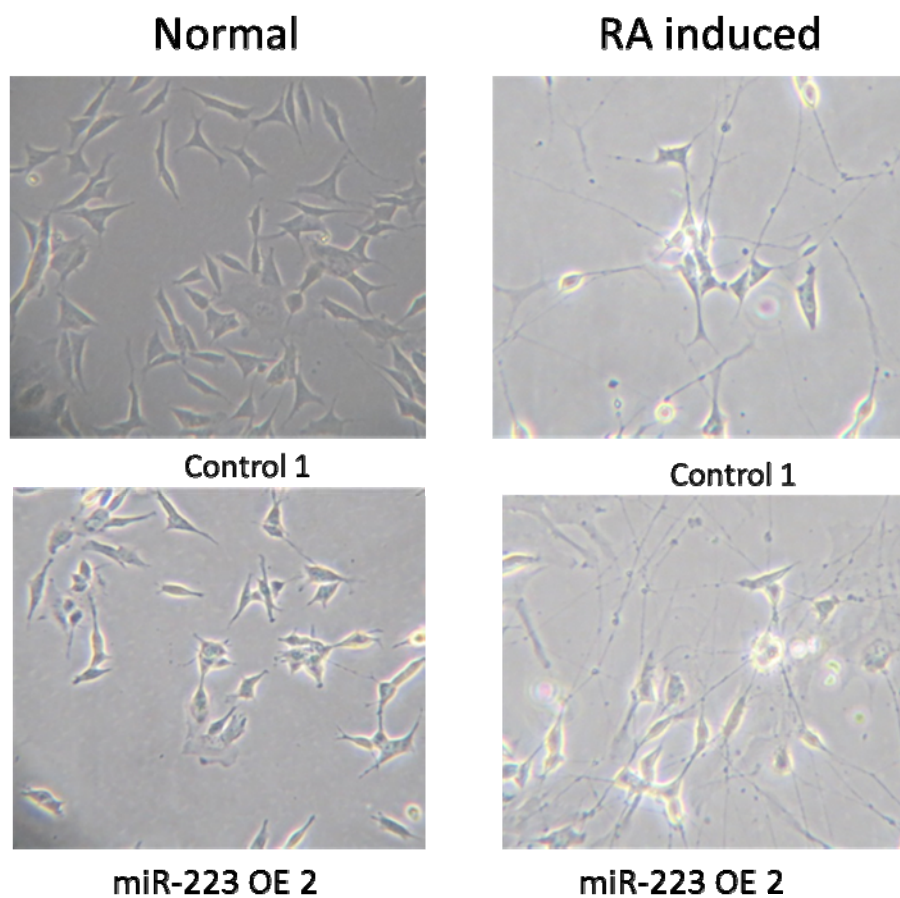


図 12 レチノイン酸処理前後の細胞形態変化

miR-223 安定発現細胞株(miR-223 OE)と対照細胞株(control)を 10 日間正常培地(Normal)あるいは分化誘導培地(RA induced : 10  $\mu$  M レチノイン酸(RA)を含む 3%FBS、DMEM/F12 培地で 10 日間培養)で培養した結果。実験は樹立した 3 クローンずつそれぞれについて行い、位相差顕微鏡での観察を行った。典型的な実験例を示す。

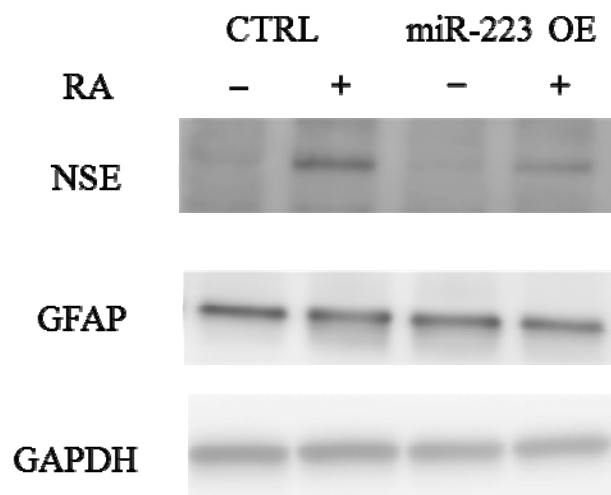


図 13 ニューロン分化における、マーカータンパク質のイムノブロッティングの結果

miR-223 安定発現細胞株(miR-223 OE)と対照細胞株(CTRL)を  $10\mu\text{M}$  レチノイン酸(RA)含有培地によってニューロンへの分化誘導後、全タンパク質を抽出し、ウェスタンブロットにて検出した。実験は樹立した 3 クローンずつそれぞれについて行い、典型的な実験例を示した。成熟ニューロンのマーカーである神経特異エノラーゼ (NSE) が大量に誘導されたのに対し、グリア細胞のマーカーであるグリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP) が変化しなかったことが確認された。

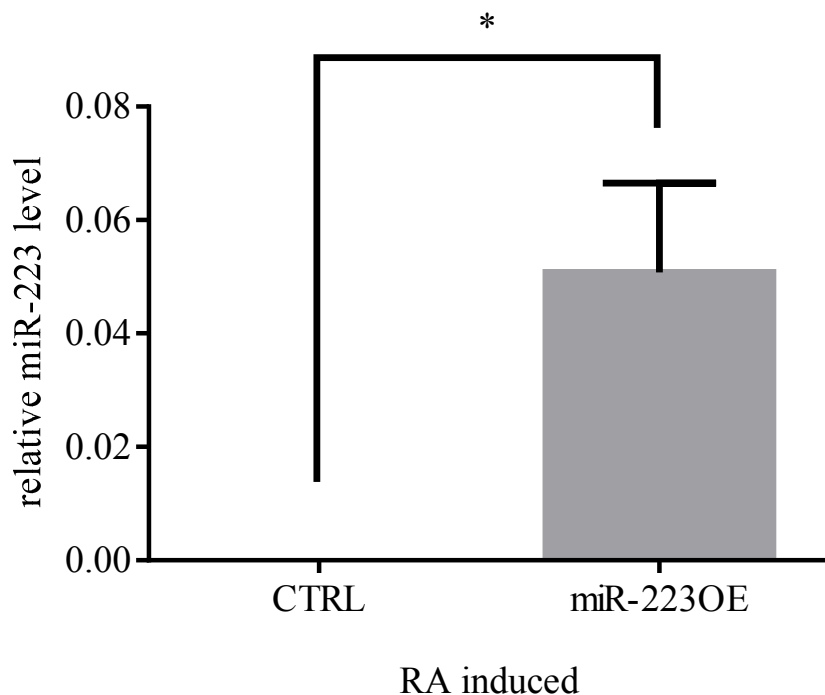


図 14 レチノイン酸によって分化誘導後の SK-N-SH 細胞の miR-223 の定量 realtime PCR 結果

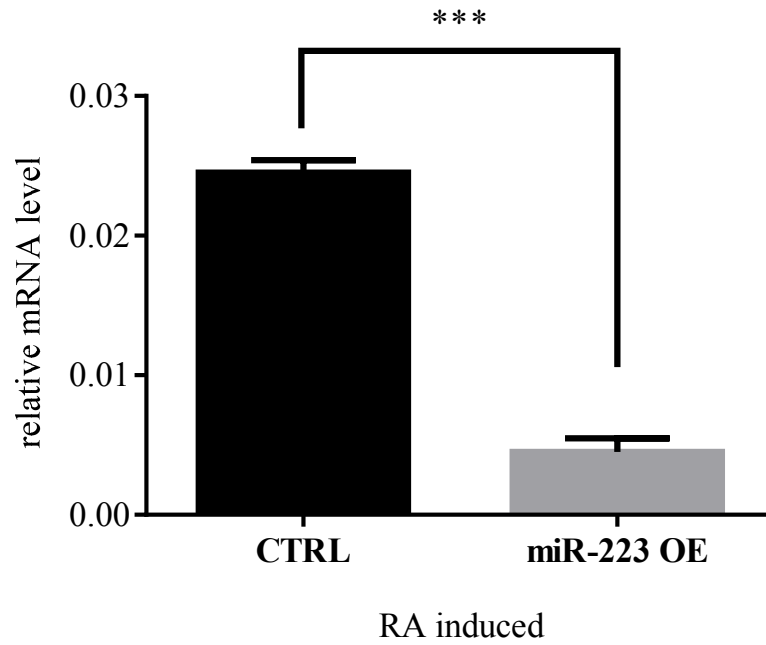
miR-223 安定発現細胞株(miR-223 OE)と対照細胞株(CTRL)を  $10 \mu\text{M}$  レチノイン酸 (RA) 含有培地によってニューロンへの分化誘導後、total RNA を抽出し、miR-223 の定量 realtime PCR を行った。miR-223 の発現量は内因性 miRNA である RU6B によって補正を行った。実験は樹立した 3 クローンについて行い、平均値 (±標準誤差) をグラフ化した。分化誘導後 miR-223 安定発現細胞株における miR-223 の有意な上昇を認めた (\* $p < 0.05$ ,  $n=3$ )。

表 6 miR-223 の標的候補遺伝子

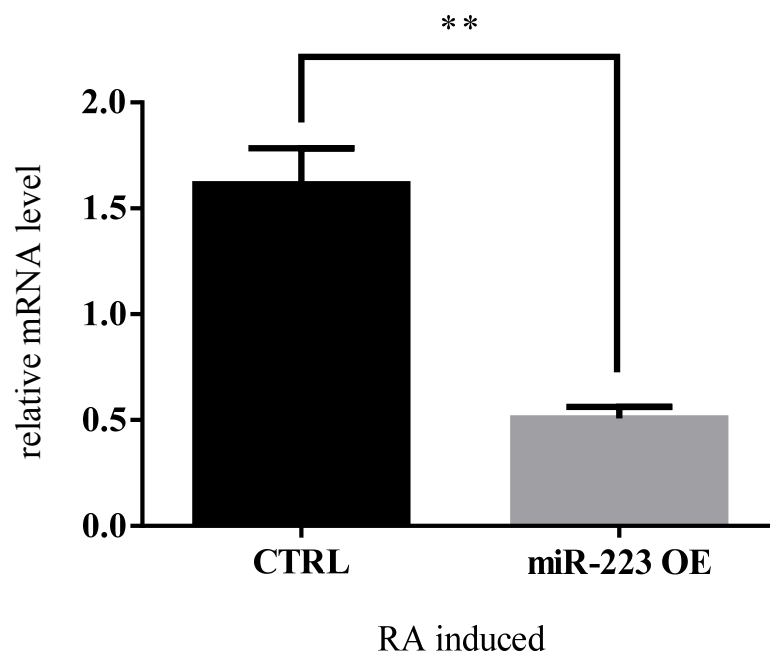
Probe Name	Fold change (microarray)	Fold change (qPCR)	Gene Symbol
A_33_P3335910	-1.91	-1.37	SYNE1
A_23_P351215	-1.78	-1.64	SKIL
A_23_P85640	-1.60	-1.39	INPP5B
A_33_P3398862	-1.55	-1.45	RHOB

in silico での miR-223 のターゲット mRNA 予測結果と miR-223 安定発現株における遺伝子発現解析を照合した結果を示した。Fold change は、コントロール細胞株と比較した際の、miR-223 安定発現株における遺伝子発現量の変化を示す。

### A) INPP5B



### B) RHOB



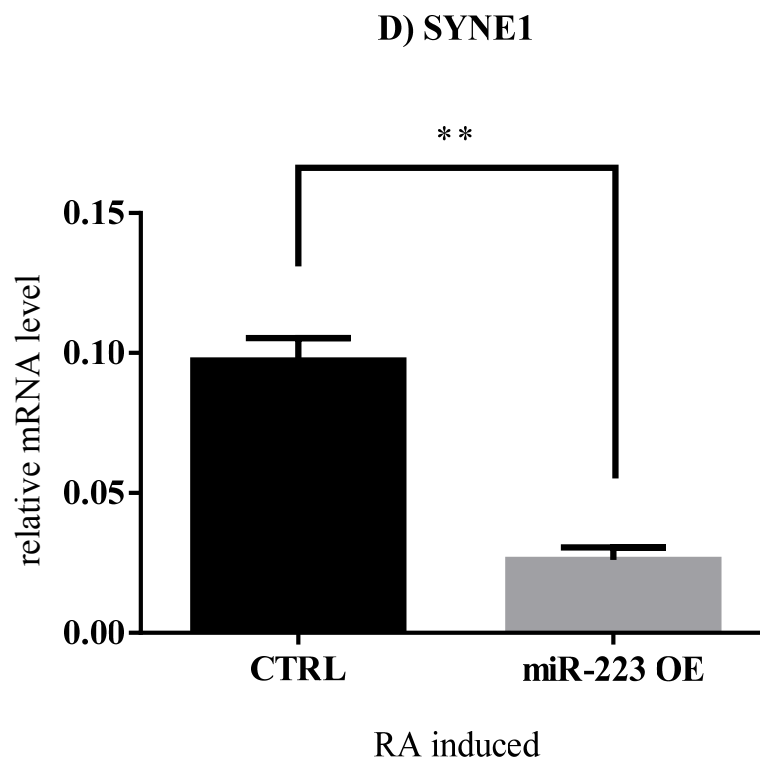
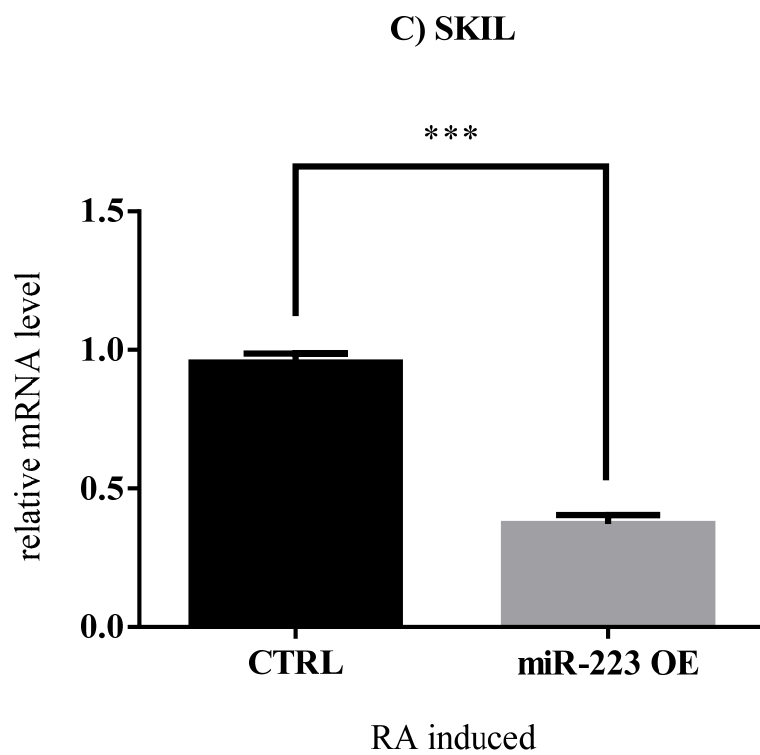


図 15 定量 real-time PCR による miR-223 安定発現細胞株における標的候補遺伝子の発現量測定

miR-223 の安定発現細胞株(miR-223 OE)と対照細胞株(CTRL)をレチノイン酸(RA)で分化誘導を行い、INPP5B (A)、RHOB(B)、SKIL(C)、SYNE1(D)の遺伝子発現量を定量 real-time PCR により測定した。本実験はマイクロアレイ実験とは独立して行った。各遺伝子の発現量は、GAPDH 発現量により補正を行い、樹立した 3 クローンずつについて測定したデータを平均値(±標準誤差)でグラフ化した(\*\*,  $p < 0.005$ 、\*\*\*,  $p < 0.001$ 、 $n=3$ )。



### 3.4. 考察

miR-223 は統合失調症患者死後脳前頭葉での発現上昇が既に報告されており (Beveridge et al., 2010)、統合失調症との病因・病態との関わりが注目されるものの、中枢神経系における生理的機能については不明である。本章では、miRNA の遺伝子発現制御機能に着目し、miR-223 のターゲット mRNA の同定を試みた。

miR-223 の安定発現神経系細胞株とコントロール株の網羅的遺伝子発現解析の結果、多数の遺伝子発現変動が確認された。この発現変動が miR-223 の過剰発現による直接的な作用か、間接的な効果なのかは不明である。また、過剰発現量が約 4000 倍と非生理条件下にあるため、多くの間接的・人為的な発現変動を含んでいると考えられる。しかしながら、発現量が低下した遺伝子群の一部については、miR-223 による直接作用の結果によるものが含まれると推定される。過剰発現系を利用することにより、生理的条件下では同定困難な現象について効果的に検出できることも一方で期待できるであろう。網羅的遺伝子発現解析により、本研究では、724 個の発現が減少した遺伝子を同定した。これらの候補遺伝子と、in silico で予測された miR-223 標的遺伝子との照合を行った結果、4 つの分子 (INPP5B、RHOB、SKIL、SYNE1) が確度の高い候補標的遺伝子として予測された。INPP5B、RHOB、SKIL、SYNE1 については、定量 real-time PCR 法に

よる独立した実験によっても、安定発現細胞株での低発現が確認された。

これら 4 つの分子はいずれも神経系と強く関与することが知られている。

INPP5B はタイプ II イノシトールポリリン酸 5-ホスファターゼと分類され、LOWE 症候群の原因遺伝子 OCRL と約 44%の配列と一致し、細胞内輸送機構に関する機能も部分的に重なることが報告されている (Tresaugues et al., 2014, Williams et al., 2007, Bohdanowicz et al., 2012)。

RHOB はエンドソームに局在する低分子グアノシン三リン酸 (GTP) 結合タンパク質である。神経系においては、発生段階で神経堤の遊走に関与することや、神経の形態異常及びシナプス可塑性に関与することが報告されている (McNair et al., 2010, Liu and Jessell, 1998)。重要なことに、RHOB の 3' UTR に miR-223 の結合サイトが 2 つあることが既に報告されており (Sun et al., 2010)、本研究の細胞実験および in silico 解析による標的遺伝子同定アプローチの妥当性を支持するものと考えられる。

SKIL は、TGF- $\beta$  シグナルを転写の段階で負に調節しているコ・リプレッサーとして知られている (Deheuninck and Luo, 2009)。SKIL を介して軸索伸長を特異的に阻害することで、顆粒細胞の軸索の伸長、分岐及びニューロンの配置に関わることが報告されている (Stegmuller et al., 2006, Ikeuchi et al., 2009, Stegmuller et al., 2008)。

SYNE1 は、細胞遊走に必要なアクチンフィラメントに結合し、Linker of Nucleus and Cytoskeleton (LINC) 複合体を介して細胞核の形態維持に関与すると報告されている(Mellad et al., 2011)。SYNE1 は RNAhybrid によって、miR-223 との結合サイトの存在が予測され(Rehmsmeier et al., 2004) (図 8A)、結合エネルギーは PITA による計算にて安定的結合すると予測されている(Kertesz et al., 2007) (図 8B)。更に、miR-223 KO マウスの好中球において、SYNE1 の mRNA 及びタンパク質ともに上昇を認めたことから、SYNE1 は miR-223 の直接のターゲットであることが示唆されている(Baek et al., 2008)。

最近の大規模エクソーム解析によって、統合失調症患者における SYNE1 のミスセンス突然変異が見つかり、また躁うつ病や大うつと SYNE1 の関連も多数報告されている(Fromer et al., 2014, Green et al., 2013, Xu et al., 2014, Costas et al., 2013, Psychiatric, 2011, Guipponi et al., 2014)。統合失調症では以前から錐体細胞の配列不整など、神経細胞の遊走異常が示唆されている(Jakob and Beckmann, 1986, Kovelman and Scheibel, 1984)。最近でも統合失調症の候補原因遺伝子である Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) は細胞の微小管細胞骨格の形成を障害することで、神経細胞の遊走を阻害し、神経発達異常に至ることが知られているなど(Kamiya et al., 2005, Steinecke et al., 2012, Ishizuka et al., 2011)、統合失調症の発症機序には細胞遊走が関

与する可能性が指摘されている。本研究からは統合失調症の発症期に miR-223 の上昇によって SYNE1 が減少し、細胞遊走に何らかの欠陥が生じる可能性が考えられる。但し、現時点では、発症期の miR-223 の上昇が病態に関わる変化か、あるいは何らかの発症機序に対する代償的な変化かは十分に明らかにされておらず、SYNE1 と統合失調症発症の関連については新たなアプローチを加えた更なる検討が必要である。

細胞実験の制約として、今回の研究では機能解析の一環として miR-223 が結合する mRNA を検索するため、発現倍率の高い過剰発現細胞を用いたが、精神疾患の病態については血漿中の miR-223 の生理的な濃度に還元した *in vivo* レベルの検証が必要になり、動物モデルを用いた検証等も含めて今後の大きな課題である。

A)

hsa-miR-223-3p: 3' CCCCAUAAACUGUUUGACUGU 5'

|||| | ||||| |||

SYNE1: 5' GGGGGA----ACAAACAGACA 3'

B)

Gene	microRNA	Seed	dGduplex	dGopen	ddG
SYNE1	hsa-miR-223-3p	8:1:0	-17.4	-5.34	-12.05

図 16 SYNE1 の mRNA における miR-223 の結合部位

A) RNAhybrid によって、SYNE1 の 3' UTR に miR-223 の不完全相補的な結合部位が予測された。

B) 結合エネルギーは PITA による計算にて安定的結合すると予測された。

#### 4. 結語

本研究は病態への miRNA の関与の可能性について検討したものである。初回エピソード統合失調症患者及び健常対照者を対象とした、血漿中 miRNA の網羅的発現解析から、miR-223 の患者における発現上昇を見出した。miR-223 のヒト神経芽細胞腫由来の培養細胞による強制発現細胞株において標的因子の探索から、神経細胞におけるターゲットとして INPP5B、RHOB、SKIL、SYNE1 を候補として見出した。本結果は miR-223 を介したカスケードが統合失調症病態に関与している可能性を示唆するものである。

本研究では独立サンプルによる再現性が確認できておらず、いずれの結果の解釈も慎重に行うべきであると考えられるが、今後さらなる検証を続けていくことにより統合失調症の発症機序が明らかにされることが期待される。

## 5. 参考文献

- AMBROS, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, 350-5.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. 2000. Electronic DSM-IV-TR plus. 1.0. ed. Washington, D.C.: American Psychiatric Association,.
- BAEK, D., VILLEN, J., SHIN, C., CAMARGO, F. D., GYGI, S. P. & BARTEL, D. P. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455, 64-71.
- BARBER, R. D., HARMER, D. W., COLEMAN, R. A. & CLARK, B. J. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21, 389-95.
- BETEL, D., WILSON, M., GABOW, A., MARKS, D. S. & SANDER, C. 2008. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*, 36, D149-53.
- BEVERIDGE, N. J. & CAIRNS, M. J. 2012. MicroRNA dysregulation in schizophrenia. *Neurobiol Dis*, 46, 263-71.
- BEVERIDGE, N. J., GARDINER, E., CARROLL, A. P., TOONEY, P. A. & CAIRNS, M. J. 2010. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol Psychiatry*, 15, 1176-89.

- BEVERIDGE, N. J., TOONEY, P. A., CARROLL, A. P., GARDINER, E., BOWDEN, N., SCOTT, R. J., TRAN, N., DEDOVA, I. & CAIRNS, M. J. 2008. Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 17, 1156-68.
- BIRCHWOOD, M., TODD, P. & JACKSON, C. 1998. Early intervention in psychosis. The critical period hypothesis. *Br J Psychiatry Suppl*, 172, 53-9.
- BOHDANOWICZ, M., BALKIN, D. M., DE CAMILLI, P. & GRINSTEIN, S. 2012. Recruitment of OCRL and Inpp5B to phagosomes by Rab5 and APPL1 depletes phosphoinositides and attenuates Akt signaling. *Mol Biol Cell*, 23, 176-87.
- CAHN, W., VAN HAREN, N. E., HULSHOFF POL, H. E., SCHNACK, H. G., CASPERS, E., LAPONDER, D. A. & KAHN, R. S. 2006. Brain volume changes in the first year of illness and 5-year outcome of schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 189, 381-2.
- CASTLE, D., WESSELY, S., DER, G. & MURRAY, R. M. 1991. The incidence of operationally defined schizophrenia in Camberwell, 1965-84. *Br J Psychiatry*, 159, 790-4.
- CHEN, Y., GELFOND, J. A., MCMANUS, L. M. & SHIREMAN, P. K. 2009. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling



- and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics*, 10, 407.
- COHEN, J. E., LEE, P. R., CHEN, S., LI, W. & FIELDS, R. D. 2011. MicroRNA regulation of homeostatic synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 11650-5.
- COSTAS, J., SUAREZ-RAMA, J. J., CARRERA, N., PAZ, E., PARAMO, M., AGRA, S., BRENLLA, J., RAMOS-RIOS, R. & ARROJO, M. 2013. Role of DISC1 interacting proteins in schizophrenia risk from genome-wide analysis of missense SNPs. *Ann Hum Genet*, 77, 504-12.
- DEHEUNINCK, J. & LUO, K. 2009. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. *Cell Res*, 19, 47-57.
- DI NICOLA, M., CATTANEO, A., HEPGUL, N., DI FORTI, M., AITCHISON, K. J., JANIRI, L., MURRAY, R. M., DAZZAN, P., PARIANTE, C. M. & MONDELLI, V. 2013. Serum and gene expression profile of cytokines in first-episode psychosis. *Brain Behav Immun*, 31, 90-5.
- DWEEP, H., STICHT, C., PANDEY, P. & GRETZ, N. 2011. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform*, 44, 839-47.
- FAZI, F., ROSA, A., FATICA, A., GELMETTI, V., DE MARCHIS, M. L., NERVI, C.

- & BOZZONI, I. 2005. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*, 123, 819-31.
- FENG, J., SUN, G., YAN, J., NOLTNER, K., LI, W., BUZIN, C. H., LONGMATE, J., HESTON, L. L., ROSSI, J. & SOMMER, S. S. 2009. Evidence for X-chromosomal schizophrenia associated with microRNA alterations. *PLoS One*, 4, e6121.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- FROMER, M., POCKLINGTON, A. J., KAVANAGH, D. H., WILLIAMS, H. J., DWYER, S., GORMLEY, P., GEORGIEVA, L., REES, E., PALTA, P., RUDERFER, D. M., CARRERA, N., HUMPHREYS, I., JOHNSON, J. S., ROUSSOS, P., BARKER, D. D., BANKS, E., MILANOVA, V., GRANT, S. G., HANNON, E., ROSE, S. A., CHAMBERT, K., MAHAJAN, M., SCOLNICK, E. M., MORAN, J. L., KIROV, G., PALOTIE, A., MCCARROLL, S. A., HOLMANS, P., SKLAR, P., OWEN, M. J., PURCELL, S. M. & O'DONOVAN, M. C. 2014. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks.

*Nature*, 506, 179-84.

FU, J., ALLEN, W., XIA, A., MA, Z. & QI, X. 2014. Identification of Biomarkers in Breast Cancer by Gene Expression Profiling Using Human Tissues. *Genom Data*, 2, 299-301.

GARDINER, E., BEVERIDGE, N. J., WU, J. Q., CARR, V., SCOTT, R. J., TOONEY, P. A. & CAIRNS, M. J. 2012. Imprinted DLK1-DIO3 region of 14q32 defines a schizophrenia-associated miRNA signature in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Psychiatry*, 17, 827-40.

GE, Q., ZHOU, Y., LU, J., BAI, Y., XIE, X. & LU, Z. 2014. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules*, 19, 1568-75.

GIT, A., DVINGE, H., SALMON-DIVON, M., OSBORNE, M., KUTTER, C., HADFIELD, J., BERTONE, P. & CALDAS, C. 2010. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA*, 16, 991-1006.

GREEN, E. K., GROZEVA, D., FORTY, L., GORDON-SMITH, K., RUSSELL, E., FARMER, A., HAMSHERE, M., JONES, I. R., JONES, L., MCGUFFIN, P., MORAN, J. L., PURCELL, S., SKLAR, P., OWEN, M. J., O'DONOVAN, M. C.

- & CRADDOCK, N. 2013. Association at SYNE1 in both bipolar disorder and recurrent major depression. *Mol Psychiatry*, 18, 614-7.
- GUIDOTTI, A., AUTA, J., DAVIS, J. M., DONG, E., GAVIN, D. P., GRAYSON, D. R., SHARMA, R. P., SMITH, R. C., TUETING, P. & ZHUBI, A. 2014. Toward the identification of peripheral epigenetic biomarkers of schizophrenia. *J Neurogenet*, 28, 41-52.
- GUIPPONI, M., SANTONI, F. A., SETOLA, V., GEHRIG, C., ROTHARMEL, M., CUENCA, M., GUILLIN, O., DIKEOS, D., GEORGANTOPOULOS, G., PAPADIMITRIOU, G., CURTIS, L., MEARY, A., SCHURHOFF, F., JAMAIN, S., AVRAMOPOULOS, D., LEBOYER, M., RUJESCU, D., PULVER, A., CAMPION, D., SIDEROVSKI, D. P. & ANTONARAKIS, S. E. 2014. Exome sequencing in 53 sporadic cases of schizophrenia identifies 18 putative candidate genes. *PLoS One*, 9, e112745.
- GUO, H., INGOLIA, N. T., WEISSMAN, J. S. & BARTEL, D. P. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466, 835-40.
- HANSEN, T., OLSEN, L., LINDOW, M., JAKOBSEN, K. D., ULLUM, H., JONSSON, E., ANDREASSEN, O. A., DJUROVIC, S., MELLE, I., AGARTZ, I., HALL, H.,

- TIMM, S., WANG, A. G. & WERGE, T. 2007. Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology. *PLoS One*, 2, e873.
- HARDING, C. M., BROOKS, G. W., ASHIKAGA, T., STRAUSS, J. S. & BREIER, A. 1987. The Vermont longitudinal study of persons with severe mental illness, II: Long-term outcome of subjects who retrospectively met DSM-III criteria for schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 144, 727-35.
- HARRAZ, M. M., EACKER, S. M., WANG, X., DAWSON, T. M. & DAWSON, V. L. 2012. MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 18962-7.
- HUA, Y. J., TANG, Z. Y., TU, K., ZHU, L., LI, Y. X., XIE, L. & XIAO, H. S. 2009. Identification and target prediction of miRNAs specifically expressed in rat neural tissue. *BMC Genomics*, 10, 214.
- HULSHOFF POL, H. E. & KAHN, R. S. 2008. What happens after the first episode? A review of progressive brain changes in chronically ill patients with schizophrenia. *Schizophr Bull*, 34, 354-66.
- IGUCHI, H., KOSAKA, N. & OCHIYA, T. 2010. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol*, 3, 478-81.
- IKEUCHI, Y., STEGMULLER, J., NETHERTON, S., HUYNH, M. A., MASU, M.,

- FRANK, D., BONNI, S. & BONNI, A. 2009. A SnoN-Ccd1 pathway promotes axonal morphogenesis in the mammalian brain. *J Neurosci*, 29, 4312-21.
- ISHIZUKA, K., KAMIYA, A., OH, E. C., KANKI, H., SESHADRI, S., ROBINSON, J. F., MURDOCH, H., DUNLOP, A. J., KUBO, K., FURUKORI, K., HUANG, B., ZELEDON, M., HAYASHI-TAKAGI, A., OKANO, H., NAKAJIMA, K., HOUSLAY, M. D., KATSANIS, N. & SAWA, A. 2011. DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature*, 473, 92-6.
- JAKOB, H. & BECKMANN, H. 1986. Prenatal developmental disturbances in the limbic allocortex in schizophrenics. *J Neural Transm*, 65, 303-26.
- JOHNNIDIS, J. B., HARRIS, M. H., WHEELER, R. T., STEHLING-SUN, S., LAM, M. H., KIRAK, O., BRUMMELKAMP, T. R., FLEMING, M. D. & CAMARGO, F. D. 2008. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, 451, 1125-9.
- KAMIYA, A., KUBO, K., TOMODA, T., TAKAKI, M., YOUN, R., OZEKI, Y., SAWAMURA, N., PARK, U., KUDO, C., OKAWA, M., ROSS, C. A., HATTEN, M. E., NAKAJIMA, K. & SAWA, A. 2005. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol*, 7, 1167-78.

- KASAI, K., SHENTON, M. E., SALISBURY, D. F., HIRAYASU, Y., LEE, C. U., CISZEWSKI, A. A., YURGELUN-TODD, D., KIKINIS, R., JOLESZ, F. A. & MCCARLEY, R. W. 2003a. Progressive decrease of left superior temporal gyrus gray matter volume in patients with first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 160, 156-64.
- KASAI, K., SHENTON, M. E., SALISBURY, D. F., HIRAYASU, Y., ONITSUKA, T., SPENCER, M. H., YURGELUN-TODD, D. A., KIKINIS, R., JOLESZ, F. A. & MCCARLEY, R. W. 2003b. Progressive decrease of left Heschl gyrus and planum temporale gray matter volume in first-episode schizophrenia: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*, 60, 766-75.
- KAY, S. R., FISZBEIN, A. & OPLER, L. A. 1987. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull*, 13, 261-76.
- KERTESZ, M., IOVINO, N., UNNERSTALL, U., GAUL, U. & SEGAL, E. 2007. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*, 39, 1278-84.
- KHVOROVA, A., REYNOLDS, A. & JAYASENA, S. D. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115, 209-16.

- KIM, A. H., REIMERS, M., MAHER, B., WILLIAMSON, V., MCMICHAEL, O., MCCLAY, J. L., VAN DEN OORD, E. J., RILEY, B. P., KENDLER, K. S. & VLADIMIROV, V. I. 2010. MicroRNA expression profiling in the prefrontal cortex of individuals affected with schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophr Res*, 124, 183-91.
- KOIKE, S., BUNDO, M., IWAMOTO, K., SUGA, M., KUWABARA, H., OHASHI, Y., SHINODA, K., TAKANO, Y., IWASHIRO, N., SATOMURA, Y., NAGAI, T., NATSUBORI, T., TADA, M., YAMASUE, H. & KASAI, K. 2014. A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. *Transl Psychiatry*, 4, e379.
- KOSAKA, N., IGUCHI, H., YOSHIOKA, Y., TAKESHITA, F., MATSUKI, Y. & OCHIYA, T. 2010. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, 285, 17442-52.
- KOVELMAN, J. A. & SCHEIBEL, A. B. 1984. A neurohistological correlate of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 19, 1601-21.
- KOZOMARA, A. & GRIFFITHS-JONES, S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 42, D68-73.



- KOZOMARA, A., HUNT, S., NINOVA, M., GRIFFITHS-JONES, S. & RONSHAUGEN, M. 2014. Target repression induced by endogenous microRNAs: large differences, small effects. *PLoS One*, 9, e104286.
- KREK, A., GRUN, D., POY, M. N., WOLF, R., ROSENBERG, L., EPSTEIN, E. J., MACMENAMIN, P., DA PIEDADE, I., GUNSALUS, K. C., STOFFEL, M. & RAJEWSKY, N. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 37, 495-500.
- KROH, E. M., PARKIN, R. K., MITCHELL, P. S. & TEWARI, M. 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50, 298-301.
- LAI, C. Y., YU, S. L., HSIEH, M. H., CHEN, C. H., CHEN, H. Y., WEN, C. C., HUANG, Y. H., HSIAO, P. C., HSIAO, C. K., LIU, C. M., YANG, P. C., HWU, H. G. & CHEN, W. J. 2011. MicroRNA expression aberration as potential peripheral blood biomarkers for schizophrenia. *PLoS One*, 6, e21635.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.
- LEWIS, B. P., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often

flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.

LIU, J. P. & JESSELL, T. M. 1998. A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development*, 125, 5055-67.

LOCKHART, D. J., DONG, H., BYRNE, M. C., FOLLETTIE, M. T., GALLO, M. V., CHEE, M. S., MITTMANN, M., WANG, C., KOBAYASHI, M., HORTON, H. & BROWN, E. L. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 14, 1675-80.

LOHER, P. & RIGOUTSOS, I. 2012. Interactive exploration of RNA22 microRNA target predictions. *Bioinformatics*, 28, 3322-3.

LOTVALL, J. & VALADI, H. 2007. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr*, 1, 156-8.

MARAGKAKIS, M., RECZKO, M., SIMOSSIS, V. A., ALEXIOU, P., PAPADOPOULOS, G. L., DALAMAGAS, T., GIANNOPOULOS, G., GOUMAS, G., KOUKIS, E., KOURTIS, K., VERGOULIS, T., KOZIRIS, N., SELLIS, T., TSANAKAS, P. & HATZIGEORGIOU, A. G. 2009. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res*, 37, W273-6.

- MCGRATH, J., SAHA, S., WELHAM, J., EL SAADI, O., MACCAULEY, C. & CHANT, D. 2004. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med*, 2, 13.
- MCNAIR, K., SPIKE, R., GUILDING, C., PRENDERGAST, G. C., STONE, T. W., COBB, S. R. & MORRIS, B. J. 2010. A role for RhoB in synaptic plasticity and the regulation of neuronal morphology. *J Neurosci*, 30, 3508-17.
- MEISTER, G., LANDTHALER, M., PATKANIOWSKA, A., DORSETT, Y., TENG, G. & TUSCHL, T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15, 185-97.
- MELLAD, J. A., WARREN, D. T. & SHANAHAN, C. M. 2011. Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 47-54.
- MELLIOS, N., GALDZICKA, M., GINNS, E., BAKER, S. P., ROGAEV, E., XU, J. & AKBARIAN, S. 2012. Gender-specific reduction of estrogen-sensitive small RNA, miR-30b, in subjects with schizophrenia. *Schizophr Bull*, 38, 433-43.
- MELLIOS, N., HUANG, H. S., BAKER, S. P., GALDZICKA, M., GINNS, E. & AKBARIAN, S. 2009. Molecular determinants of dysregulated GABAergic gene expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Biol*

*Psychiatry*, 65, 1006-14.

MI, S., LU, J., SUN, M., LI, Z., ZHANG, H., NEILLY, M. B., WANG, Y., QIAN, Z., JIN, J., ZHANG, Y., BOHLANDER, S. K., LE BEAU, M. M., LARSON, R. A., GOLUB, T. R., ROWLEY, J. D. & CHEN, J. 2007. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19971-6.

MITCHELL, P. S., PARKIN, R. K., KROH, E. M., FRITZ, B. R., WYMAN, S. K., POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L., PETERSON, A., NOTEBOOM, J., O'BRIANT, K. C., ALLEN, A., LIN, D. W., URBAN, N., DRESCHER, C. W., KNUDSEN, B. S., STIREWALT, D. L., GENTLEMAN, R., VESSELLA, R. L., NELSON, P. S., MARTIN, D. B. & TEWARI, M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10513-8.

MONLEAU, M., BONNEL, S., GOSTAN, T., BLANCHARD, D., COURGNAUD, V. & LECELLIER, C. H. 2014. Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics*, 15, 395.

MOREAU, M. P., BRUSE, S. E., DAVID-RUS, R., BUYSKE, S. & BRZUSTOWICZ,

- L. M. 2011. Altered microRNA expression profiles in postmortem brain samples from individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Biol Psychiatry*, 69, 188-93.
- MOREY, J. S., RYAN, J. C. & VAN DOLAH, F. M. 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*, 8, 175-93.
- OKKELS, N., VERNAL, D. L., JENSEN, S. O., MCGRATH, J. J. & NIELSEN, R. E. 2013. Changes in the diagnosed incidence of early onset schizophrenia over four decades. *Acta Psychiatr Scand*, 127, 62-8.
- OLDE LOOHUIS, N. F., KOS, A., MARTENS, G. J., VAN BOKHOVEN, H., NADIF KASRI, N. & ASCHRAFI, A. 2012. MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell Mol Life Sci*, 69, 89-102.
- OTA, V. K., NOTO, C., GADELHA, A., SANTORO, M. L., ORTIZ, B. B., ANDRADE, E. H., TASSO, B. C., SPINDOLA, L. M., SILVA, P. N., ABILIO, V. C., SMITH MDE, A., SATO, J. R., BRIETZKE, E., CORDEIRO, Q., BRESSAN, R. A. & BELANGERO, S. I. 2014. Evaluation of neurotransmitter receptor gene expression identifies GABA receptor changes: a follow-up study in antipsychotic-naive patients with first-episode psychosis. *J Psychiatr Res*, 56,

130-6.

PASQUINELLI, A. E., REINHART, B. J., SLACK, F., MARTINDALE, M. Q., KURODA, M. I., MALLER, B., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., DEGNAN, B., MULLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E. & RUVKUN, G.

2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-9.

PEGTEL, D. M., COSMOPOULOS, K., THORLEY-LAWSON, D. A., VAN EIJNDHOVEN, M. A., HOPMANS, E. S., LINDENBERG, J. L., DE GRUIJL, T. D., WURDINGER, T. & MIDDELDORP, J. M. 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 6328-33.

PERKINS, D. O., JEFFRIES, C. D., JARSKOG, L. F., THOMSON, J. M., WOODS, K., NEWMAN, M. A., PARKER, J. S., JIN, J. & HAMMOND, S. M. 2007. microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol*, 8, R27.

PILLAI, R. S., BHATTACHARYYA, S. N. & FILIPOWICZ, W. 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol*, 17, 118-26.

- PIZZI, M., BORONI, F., BIANCHETTI, A., MORAITIS, C., SARNICO, I., BENARESE, M., GOFFI, F., VALERIO, A. & SPANO, P. 2002. Expression of functional NR1/NR2B-type NMDA receptors in neuronally differentiated SK-N-SH human cell line. *Eur J Neurosci*, 16, 2342-50.
- PSYCHIATRIC, G. C. B. D. W. G. 2011. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nat Genet*, 43, 977-83.
- RADUA, J., BORGWARDT, S., CRESCINI, A., MATAIX-COLS, D., MEYER-LINDENBERG, A., MCGUIRE, P. K. & FUSAR-POLI, P. 2012. Multimodal meta-analysis of structural and functional brain changes in first episode psychosis and the effects of antipsychotic medication. *Neurosci Biobehav Rev*, 36, 2325-33.
- REHMSMEIER, M., STEFFEN, P., HOCHSMANN, M. & GIEGERICH, R. 2004. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10, 1507-17.
- SAHA, S., CHANT, D., WELHAM, J. & MCGRATH, J. 2005. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*, 2, e141.
- SANTARELLI, D. M., BEVERIDGE, N. J., TOONEY, P. A. & CAIRNS, M. J. 2011. Upregulation of dicer and microRNA expression in the dorsolateral prefrontal

- cortex Brodmann area 46 in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 69, 180-7.
- SANTARELLI, D. M., LIU, B., DUNCAN, C. E., BEVERIDGE, N. J., TOONEY, P. A., SCHOFIELD, P. R. & CAIRNS, M. J. 2013. Gene-microRNA interactions associated with antipsychotic mechanisms and the metabolic side effects of olanzapine. *Psychopharmacology (Berl)*, 227, 67-78.
- SCHIZOPHRENIA PSYCHIATRIC GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY, C. 2011. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet*, 43, 969-76.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- SCHWARZ, D. S., HUTVAGNER, G., DU, T., XU, Z., ARONIN, N. & ZAMORE, P. D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115, 199-208.
- SHENOY, A. & BLELLOCH, R. H. 2014. Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 565-76.
- SIEGEL, G., SABA, R. & SCHRATT, G. 2011. microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. *Curr Opin Genet Dev*, 21, 491-7.
- SMALHEISER, N. R. & LUGLI, G. 2009. microRNA regulation of synaptic plasticity.



*Neuromolecular Med*, 11, 133-40.

SOOD, P., KREK, A., ZAVOLAN, M., MACINO, G. & RAJEWSKY, N. 2006.

Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc*

*Natl Acad Sci U S A*, 103, 2746-51.

STEGMULLER, J., HUYNH, M. A., YUAN, Z., KONISHI, Y. & BONNI, A. 2008.

TGFbeta-Smad2 signaling regulates the Cdh1-APC/SnoN pathway of axonal

morphogenesis. *J Neurosci*, 28, 1961-9.

STEGMULLER, J., KONISHI, Y., HUYNH, M. A., YUAN, Z., DIBACCO, S. &

BONNI, A. 2006. Cell-intrinsic regulation of axonal morphogenesis by the

Cdh1-APC target SnoN. *Neuron*, 50, 389-400.

STEINECKE, A., GAMPE, C., VALKOVA, C., KAETHER, C. & BOLZ, J. 2012.

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of

cortical interneurons. *J Neurosci*, 32, 738-45.

SUKATA, T., SUMIDA, K., KUSHIDA, M., OGATA, K., MIYATA, K., YABUSHITA,

S. & UWAGAWA, S. 2011. Circulating microRNAs, possible indicators of

progress of rat hepatocarcinogenesis from early stages. *Toxicol Lett*, 200, 46-52.

SUN, G., LI, H. & ROSSI, J. J. 2010. Sequence context outside the target region

influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic*

*Acids Res*, 38, 239-52.

TRESAUGUES, L., SILVANDER, C., FLODIN, S., WELIN, M., NYMAN, T.,  
GRASLUND, S., HAMMARSTROM, M., BERGLUND, H. & NORDLUND, P.  
2014. Structural basis for phosphoinositide substrate recognition, catalysis, and  
membrane interactions in human inositol polyphosphate 5-phosphatases.  
*Structure*, 22, 744-55.

USTUN, T. B., REHM, J., CHATTERJI, S., SAXENA, S., TROTTER, R., ROOM, R.  
& BICKENBACH, J. 1999. Multiple-informant ranking of the disabling effects  
of different health conditions in 14 countries. WHO/NIH Joint Project CAR  
Study Group. *Lancet*, 354, 111-5.

VALADI, H., EKSTROM, K., BOSSIOS, A., SJOSTRAND, M., LEE, J. J. &  
LOTVALL, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs  
is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9.

VAN HAREN, N. E., CAHN, W., HULSHOFF POL, H. E. & KAHN, R. S. 2008.  
Schizophrenia as a progressive brain disease. *Eur Psychiatry*, 23, 245-54.

VAN OS, J. & KAPUR, S. 2009. Schizophrenia. *Lancet*, 374, 635-45.

VICKERS, K. C., PALMISANO, B. T., SHOUCRI, B. M., SHAMBUREK, R. D. &  
REMALEY, A. T. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to

- recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 13, 423-33.
- WANG, X. 2008. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*, 14, 1012-7.
- WILLIAMS, C., CHOUDHURY, R., MCKENZIE, E. & LOWE, M. 2007. Targeting of the type II inositol polyphosphate 5-phosphatase INPP5B to the early secretory pathway. *J Cell Sci*, 120, 3941-51.
- XU, W., COHEN-WOODS, S., CHEN, Q., NOOR, A., KNIGHT, J., HOSANG, G., PARIKH, S. V., DE LUCA, V., TOZZI, F., MUGLIA, P., FORTE, J., MCQUILLIN, A., HU, P., GURLING, H. M., KENNEDY, J. L., MCGUFFIN, P., FARMER, A., STRAUSS, J. & VINCENT, J. B. 2014. Genome-wide association study of bipolar disorder in Canadian and UK populations corroborates disease loci including SYNE1 and CSMD1. *BMC Med Genet*, 15, 2.
- XU, Y., LI, F., ZHANG, B., ZHANG, K., ZHANG, F., HUANG, X., SUN, N., REN, Y., SUI, M. & LIU, P. 2010. MicroRNAs and target site screening reveals a pre-microRNA-30e variant associated with schizophrenia. *Schizophr Res*, 119, 219-27.
- ZHU, Y., KALBFLEISCH, T., BRENNAN, M. D. & LI, Y. 2009. A MicroRNA gene is

hosted in an intron of a schizophrenia-susceptibility gene. *Schizophr Res*, 109, 86-9.

ZIATS, M. N. & RENNERT, O. M. 2014. Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Mol Psychiatry*, 19, 848-52.

## 6. 謝辞

本研究を進めるにあたって、研究室入室以来、熱心なご指導ご鞭撻を賜わりました東京大学精神医学教室神出誠一郎先生、笠井清登先生に深く感謝いたします。

SK-N-SH 細胞を御恵与下さいました分子精神医学講座岩本和也特任准教授、初回実験の血漿サンプルを御恵与下さいました東京大学精神神経教室 IN-STEP 研究チームの先生方や、進行期実験のコントロール血漿サンプルを御恵与下さいました東京大学精神神経教室川上班の先生方や、進行期実験の患者血漿サンプルを御恵与下さいました東京大学精神神経教室吉川茜先生に深く感謝いたします。

最後に、陰ながら研究生活を支えてくれた両親や妻の呉鳶に心より御礼申し上げます。また、論文を書き上げる中で大きな心の支えとなった娘の淑間にも感謝の意を表したいと思います。