

## 論文の内容の要旨

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

統合失調症は人口の約 1%が発症することで知られ、幻覚妄想といった陽性症状に加え、感情鈍麻・無為自閉等の陰性症状と認知機能障害を特徴とする精神疾患であり、患者の多くは思春期に発症した後に社会機能の低下を来すため、社会的損失も甚大である。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。

近年、マイクロ RNA (miRNA) と呼ばれる約 22 塩基長の小さな RNA 分子は、相補的な多種類のメッセンジャー RNA (mRNA) に結合し、結合した mRNA の分解促進や翻訳阻害を行うことで、遺伝子発現を抑制することが知られており、神経細胞の発生・維持に深く関与することから急速に注目を集めている。また、統合失調症患者死後脳組織において発現変動が認められるマイクロ RNA の報告もなされており、患者死後脳組織でのトランスクリプトーム変動に大きな影響を与えている可能性が指摘されている。

以上から本研究では、病態への microRNA (miRNA) の関与の可能性について検討するため、統合失調症の発症期にある (初回エピソード) 比較的若年の患者のみを対象として、血漿中の miRNA 発現を網羅的に解析した。

まず、17人初回エピソード統合失調症患者と年齢性別マッチした17人健常対照者の血漿から miRNA を抽出し、3D-Gene Human miRNA Oligo chips を用いて、miRNA 網羅的解析を行った。全 miRNA (2019 個) を対象とした unpaired t-test 解析によって、106 個 miRNA の有意な変動が見つかった。さらに、Benjamini-Hochberg FDR 補正を行い、三つの miRNA 候補を同定した。更に、同じサンプルセットでの定量 realtime PCR を行い、外因性の cel-miR-39 をコントロールとしてノーマライズした結果、hsa-miR-223-3p(miR-223)は miRNA アレイと同様に有意な発現増加が確認された。

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。

まず、miR-223 の前駆体を 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 SK-N-SH に導入し、miR-223 安定発現細胞株と対照細胞株を作成した。これらはニューロンへの分化誘導を行った上で、形態学的変化及びニューロン成熟マーカーである神経特異エノラーゼ (NSE) のウェスタンブロットにより、成熟ニューロンへの分化を確認した。

細胞内遺伝子発現のプロファイリング解析について、SurePrint G3 Human GE 8x60K v2 Microarray (Agilent) を用いて、上記により分化した miR-223 の安定発現細胞株 3 つと対

照安定発現細胞株 3 つについて遺伝子発現解析を行った。本研究では miRNA のターゲット分子探索を目的とし、miR-223 の過剰発現により発現低下した mRNA を中心に解析を行った。更に、miRNA ターゲット予測の総合サイト miRWalk を利用し、全遺伝子の 3' UTR を対象とした miR-223 の予測ターゲットを抽出し、前述の細胞内遺伝子発現のプロファイリング解析で減少した遺伝子リストと照合した。

その結果、4 つ遺伝子が miR-223 の結合サイトが *in silico* で予測され、遺伝子解析においても有意な減少を示した。独立サンプルセットでの定量 real-time PCR による発現解析を行った結果、その 4 つの発現量が有意に減少したことが確認された。

本研究では、初回エピソード統合失調症患者及び健常者対照者について、血漿中の miRNA を網羅的に解析し、miR-223 の特異的な上昇を発見した。miR-223 のターゲット因子を調べるために、安定発現細胞株から成熟ニューロンへ分化誘導し、遺伝子発現レベルでの制御を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、miR-223 のターゲットになりうる因子が検出され、独立サンプルセットで、4 つの遺伝子の発現量減少が確認された。以上の結果からは 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が考えられ、今後はこれらの因子について、初回エピソードにおける生理的意義に関連したさらなる検討が必要と考えられる。また、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極めて慎重に行うべきであると考えられる。