

論文の内容の要旨

論文題目 一卵性双生児不一致例を用いた統合失調症の分子遺伝学的解析

氏名 西村 文親

【研究の背景】

統合失調症は、陽性症状、陰性症状、認知機能障害により、社会的機能が低下する精神疾患である。思春期以降に発症することが多く、再発と寛解を繰り返し、慢性の経過を辿る。根治的な治療法が存在せず、当事者のみならず家族も大きな苦悩を抱え、生物学的な病態解明が急務な疾患の一つである。

これまでの研究から遺伝要因の関与が明らかとなり、連鎖解析、候補遺伝子関連研究、全ゲノム関連研究などが行われたが、オッズ比も低く病態を説明し得る状態ではなかった。次世代シーケンサーの登場により、全エクソン解析や全ゲノム解析が行われ、Trio 研究や多発家系研究から稀な変異が報告されるようになったが、見出された稀な変異が、それぞれの患者での原因となっているのかを判断するのは困難で、候補遺伝子/変異は増大の一途を辿っている。このような状況の中で、別手法を用いることにより、疾患に真に関与する遺伝子/変異の絞り込みが必要であり、一卵性双生児統合失調症不一致例を対象とした研究はその一つのアプローチとなる可能性がある。

これまで、一卵性双生児不一致例を対象とした様々な研究が行われてきたが、分子生物学的な差異が存在するかどうかは不明瞭である。もし不一致例に分子生物学的な差異が存在するのであれば、その差異は疾患に由来する可能性があり、候補遺伝子を絞り込むことで、統合失調症病態の解明に資すると考えられる。

【目的】

一卵性双生児統合失調症不一致例に分子生物学的な差異が存在するかを検証し、統合失調症病態に関わりうる遺伝子の同定を試みる。

研究①

既報で一卵性双生児統合失調症不一致例解析から候補遺伝子として示されている 3 遺伝子 (*ADM* (Adrenomedullin), *SEPX1* (Methionine-R-sulfoxide reductase B1), *CD200* (Cluster of

Differentiation 200))について統合失調症患者及び健常対照者の多数例を用いた全コーディング領域の配列解析及び mRNA 発現検討。

研究②

新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例及び健常一致例を対象としたリンパ芽球様細胞の網羅的発現解析。

【方法】

研究①

ADM, *SEPX1*, *CD200* 遺伝子の全コーディング領域配列解析の対象は、統合失調症と診断された 474 名と健常対照者 475 名である。末梢血白血球由来のゲノム DNA を用い、配列解析は次世代シーケンサー で、TruSeq Custom Amplicon (illumina) を用いて行った。

ADM, *SEPX1*, *CD200* の mRNA 発現検討の対象は、研究②で主な解析を行った一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組である。mRNA 発現は TaqMan® probe を用いた定量的リアルタイム PCR 法にて、*GAPDH* あるいは *ACTB* をコントロールとした相対比として測定した。

研究②

網羅的 mRNA 発現解析の対象は、一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組、一卵性双生児健常一致例 3 組である。それぞれの双生児内で、1 組あたり 3 回の独立したリンパ芽球様細胞の培養を行った。培養は各双生児をセットとし、培養開始から total RNA 回収まで、同一手技で行った。

mRNA 発現解析は SurePrint G3 Human Exon マイクロアレイキット 2x400K (Agilent) を用い、同一サンプルに対して、アレイのハイブリダイゼーションエリアを交換して、計 2 回の同じ実験を行った。

microRNA 発現検討の対象は、上記不一致例 3 組であり、リンパ芽球様細胞由来の total RNA に対して、miRCURY LNA™ microRNA Array (Exiqon) を用いて行った。

【結果】

研究①

既報により候補遺伝子として示されている 3 遺伝子について多数例を用いた全コーディング領域の配列解析ではいずれの遺伝子においても統合失調症群と健常対照群との間で変異の数について有意差を認めなかった。

3 遺伝子について新規に見出した 3 組の一卵性双生児統合失調症不一致例における *ADM* と

SEPX1 の mRNA 発現解析では、既報結果は再現されなかった。*CD200* は、2 組の不一致例において罹患双生児での有意な mRNA 発現の低下を認め、1 組では罹患双生児で有意ではないが mRNA 発現の低下傾向がみられた。

研究②

まずリンパ芽球様細胞における網羅的 mRNA 発現解析を行った。一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組と一卵性双生児健常一致例 3 組について、各々の双生児内において有意な発現量の違いがみられる遺伝子の数/プローブの数について、不一致例と健常一致例で比較したところ、不一致例で変動している数が多い傾向にあり ($p=0.09$ (遺伝子), $p=0.08$ (プローブ), t 検定)、さらに、有意に発現量の差が認められたプローブのうち、不一致例の 3 組に共通するものを抽出したところ、罹患双生児側において同方向の発現傾向を示したプローブ数はランダムでなく、有意に多かった ($p=3.0 \times 10^{-5}$, χ^2 二乗検定)。これらの結果は、不一致例に分子生物学的差異の存在を示唆するため、不一致例 3 組から共通する遺伝子およびプローブを確認したところ、*DPYD* (Dihydropyrimidine dehydrogenase) 及び *IGHM* (Immunoglobulin Heavy Constant Mu) が罹患双生児で低下していた。*DPYD* と *IGHM* の罹患双生児における発現低下は定量的リアルタイム PCR 法によりさらに確認された。発現の差異をもたらす原因として、網羅的 microRNA 発現解析を行ったが、不一致例内での差異は見出されなかった。

【考察】

研究①

既報の mRNA 発現量低下から候補遺伝子として示されていた 3 遺伝子の変異探索では、遺伝学的に有意差はみられず、本結果から双生児不一致例の有用性を示唆する所見は得られなかった。一方、今回新規に見出した統合失調症不一致例の mRNA 発現解析では *CD200* の発現低下がみられ、既報の 2 組とあわせ、計 5 組の双生児の罹患双生児で低下していたこととなる。mRNA 発現レベルでは不一致例間に差異が存在する可能性が示唆され、*CD200* の発現低下は病態へ関与している可能性が考えられた。

研究②

新規に見出した統合失調症不一致例及び健常一致例のリンパ芽球様細胞における網羅的 mRNA 発現解析から、①変動している遺伝子数/プローブ数が不一致例では健常一致例に比して多い傾向を示し、なおかつ、②不一致例で共通して変動しているプローブの分布がランダムではなく、罹患と発現の増減が一致しているものが有意に多い、ことから、不一致例において mRNA

発現レベルでは分子生物学的な差異が存在する可能性が示唆された。さらに、統合失調症病態に関わる候補遺伝子として *DPYD* と *IGHM* を見出した。mRNA 発現の違いをもたらす原因として、microRNA を網羅的に探索したが、差異を見出すことはできなかった。今回新規に見出した一卵性双生児不一致例の発現解析を行うにあたっては、培養手技による発現への影響、アレイの位置による結果への影響を低減する目的で、双生児内で培養条件を揃え、さらに、アレイデータを取得する際は同一サンプルに対し、ハイブリダイゼーションエリアを変えて2回のアレイ実験を行っている。解析においてもそれに即した統計解析を行っており、確度の高いデータを取得できたと考えられる。さらに今回不一致例内の罹患双生児において共通して低下していることが見出された *DPYD* は、最近の巨大サンプルによる全ゲノム関連研究及び *de novo* 研究で報告されるなど、疾患との強い関連が示唆されつつあるものである。*DPYD* が候補遺伝子として見出されたこと自身も、さらに不一致例内に分子生物学的差異が存在することを示唆するものと考えられた。*DPYD* は、ピリミジン異化代謝に関与することから、5-FU の副作用研究で主に報告されてきたが、ごく最近、神経堤の発生分化に関与していることが知られている Epithelial-Mesenchymal Transition に必要であることが報告された。神経堤の発生分化は統合失調症を高率で合併する 22q11.2 症候群において示されている。候補遺伝子/変異が増大している中で、本結果は、*DPYD* をより確度の高い有力な病因候補遺伝子として浮上させたものと考えられる。*IGHM* は IgM の定常領域の μ 重鎖をコードする遺伝子であり、未服薬初発統合失調症患者のプロテオミクス解析における *Igu* の低下が報告されており、*Igu* の中枢神経系への関与、ひいては統合失調症病態への関与の可能性が示唆されたと考えられる。

【結語】

本研究では、既報の一卵性双生児統合失調症不一致例から候補遺伝子として報告されていた *CD200* の mRNA 発現低下傾向を確認し、また、新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例に対する mRNA 発現解析から、不一致例内に分子生物学的な差異の存在すること、さらに *DPYD* と *IGHM* が統合失調症の有力な候補遺伝子であることを示した。

近年の研究では、ゲノム解析技術の革新的な進歩に伴い、もたらされる統合失調症候補遺伝子は増加の一途を辿っている。その中で、本研究は一卵性双生児不一致例の解析により、確度の高い候補遺伝子を抽出しうる可能性を示したものである。さらなる一卵性双生児不一致例研究を進め、また *DPYD* 及び *IGHM* の解析から統合失調症の病態解明を進めていきたい。