

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09811

研究課題名(和文) 特異な中間表現型を有した統合失調症多発家系から同定した責任遺伝子の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a gene possibly responsible for cases with schizophrenia exhibiting unique intermediate phenotypes in a Japanese family

研究代表者

中村 雅之 (NAKAMURA, Masayuki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：90332832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：家系構成員12名中4名が特異な身体表現型と統合失調症もしくはその類縁疾患に罹患している家系例に対して遺伝子変異解析を行ったところ遺伝子X内に本家系内発症者にのみに共分離するアミノ酸置換を伴うc.2173C>T(p.Arg725Thr)変異を同定した。遺伝子X産物はヒストン修飾機能を有するが、発端者は健常者よりも有意にX遺伝子の発現が低いことを明らかにした。発端者由来のリンパ芽球様細胞を用いた場合にはヒストン修飾活性測定では明らかな差異が見いだせなかったが、本変異により発生におけるいずれかの段階でX遺伝子の発現が低下し、のヒストン修飾異常により他の遺伝子発現に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed genetic analysis for a family with both schizophrenic symptoms and unique dysmorphic features. We identified a c.2173C>T (p.Arg725Thr) mutation in the gene X that co-segregates only within patients. The gene X product has a histone modification activity. In the proband derived-lymphoblastoid cells, the gene X expression was significantly decreased when compared to healthy control-derived cells although there was no significant difference in the histone modification activity. These results suggests that histone modification abnormality caused by reduced expression of gene X at a certain stage of development may affect other gene expressions.

研究分野：分子精神医学

キーワード：統合失調症 中間表現型

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、罹患率の高さから、ありふれた疾患 (common disease) であり、遺伝子のみが原因となって疾患を発症するのではなく、ある同一の環境要因にさらされた場合に発症の引き金となる遺伝子 (疾患感受性遺伝子) が存在するとされ、遺伝的要因と環境要因が複雑に絡みあう多因子性の複雑な疾患 (multifactorial complex disease) と考えられている。このため統合失調症は疾患が不均一な集団となり、多施設間の大規模な遺伝子解析では疾患の異種性が障壁となる。多国間多施設共同で行われた約 3 万 7 千人の統合失調症患者と約 11 万 3 千人の健常者について大規模なゲノムワイド関連解析 (GWAS) が行われた結果、128 個の一塩基多型 (SNPs) の有意な関連に基づき 108 個の統合失調症疾患感受性遺伝子座位が示された (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium *Nature* 24: 421-427, 2014)。この発見は今後の研究に大きな影響を与えるものであるが、同定された一つ一つの疾患感受性遺伝子座位の疾患への影響は小さく、また座位間の相互作用や相乗効果の証明には至っておらず、将来的な全ゲノムシークエンス等の結果と共に包括的な検討が必要とされている。一方で、DISC1 変異などの稀な遺伝子変異を有する症例を用いた解析、家系例を用いた解析もしくは中間表現型などを用いた解析等は疾患の均質化につながり、統合失調症の発症に大きな遺伝子効果を持つことが推定される遺伝子変異の同定に至る可能性が高まる。今回、私達は疾患の均質化に寄与すると考えられる疾患特異的な中間表現型としての身体表現型を有する発端者から日本人統合失調症多発家系を見出した。また、家系の臨床遺伝学的研究を行い、家系構成員 12 名中 4 名が特異な身体表現型とともに統合失調症もしくはその類縁疾患に罹患していることを明らかにした。本家系例に対して DNA アレイによって全ゲノム遺伝子連鎖解析を行い、LOD Score 2.5 の領域を同定し、多型を用いたハプロタイプ解析から 1.7cM まで連鎖領域の絞り込みを行った。その領域についてエキソームシークエンス解析を行ったところ、絞り込んだ連鎖領域内に存在する遺伝子 X 内にアミノ酸置換を伴う c.2173C>T (p.Arg725Thr) 変異を同定した。本変異は polyphen2 における機能予測で probably damaging と判定されており、100 名健常者や本家系以外の統合失調症患者 131 名には存在しない稀な変異であり、本家系内発症者にも連鎖していた。遺伝子 X については先行研究において統合失調症罹患者に両親が持たない遺伝子変異 (de novo 変異) をもつ遺伝子として報告されていた。また、前述の多施設大規模 GWAS においていくつかの同族遺伝子の疾患感受性 SNPs も同定されている。これら先行研究の結果と合わせて

X 遺伝子変異を有する家系例の報告はいまだなく、我々が同定した変異は疾患変異の可能性が高いことが裏付けられている。

2. 研究の目的

今回我々は、他の統合失調症患者において遺伝子 X について CNV を含めた包括的変異解析を行い、遺伝子 X の連鎖の裏付けをとるとともに統合失調症患者に対する遺伝子効果を検討したい。また、X の遺伝子産物は他の遺伝子の発現調整に関わるヒストン修飾に関する機能を有しており、今回同定した変異による遺伝子産物の機能変化を解析する。

3. 研究の方法

統合失調症患者群に対して遺伝子 X の包括的変異解析を行い、遺伝子 X の統合失調症における変異保有頻度を同定する。また、日本人の遺伝子変異のデータベースを用いて変異のアリル頻度を同定する。変異を有する症例の家系に対し臨床遺伝学的研究を行い、臨床表現型と遺伝負因の有無を調査する。発端者と健常者のリンパ球を不死化し、リンパ芽球様細胞を作成する。それらを用いて、遺伝子 X の発現を健常者と患者間で比較する。それぞれ核分画からタンパク質を抽出し、また、X 遺伝子産物が関与するタンパク質のヒストン修飾活性を解析することにより、変異が及ぼすタンパク質機能への影響を調べた。

- (1) 統合失調症 123 名、健常者約 78 名に対して X 遺伝子の上流領域を含めた全エクソンのリシークエンシング解析を行い変異の有無を検討した。また、東北メディカル・メガバンク機構のデータベースを用いて同定した変異のアリル頻度を求めた。
- (2) 統合失調症 57 名、健常者約 52 名に対して Taqman probe を用いた定量的 PCR 法によってエクソンの欠失や重複変異の有無 (CNV) について解析を行った。
- (3) 1) の解析の結果、変異を有した症例に対する表現型解析と家系調査を行った。
- (4) 変異を同定した患者由来のリンパ球の芽球化による不死化を行い、同定した遺伝子変異の有無による X 遺伝子の発現の違いについてリアルタイム PCR 法を用いて確認する。また、遺伝子変異の有無による X 遺伝子産物の機能変化についてヒストン分画から抽出したタンパク質についてヒストン修飾活性を測定した。

尚、研究は鹿児島大学医学部遺伝子研究倫理委員会での審査を経て研究を行う承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) X遺伝子上流領域を含めた全エクソンのリシークエンシングによる遺伝子変異解析

統合失調症 123 名中 1 名にアミノ酸置換を伴う c.3007G>A (p.Gly1003Ser)変異を同定した。本変異は polyphen2 における機能予測では HumDiv で possibly damaging, HumVar では benign の結果であった。東北メディカル・メガバンク機構のデータベース (2.0KJPN)上には c.2173C>T (p.Arg725Thr) 変異も本変異も存在しなかった。

(2) Taqman probe を用いた定量的 PCR 法による CNV 解析

統合失調症 57 名、健常者約 52 名について CNV 解析を行ったところ、遺伝子 X 上には明らかな CNV は存在しなかった。

(3) 変異を有した症例に対する表現型解析と家系調査

c.3007g>a (p.Gly1003Ser)変異を有した患者には c.2173C>T (p.Arg725Thr)変異を持つ患者のような疾患特異的な中間表現型としての身体表現型は認めなかった。また明らかな遺伝負因は認めなかった。

(4) 患者由来のリンパ芽球様細胞の X 遺伝子発現解析

c.2173C>T (p.Arg725Thr)変異を持つ患者由来のリンパ芽球様細胞から抽出した mRNA を用いた発現解析では、健常者由来のものより有意に遺伝子 X の発現が低かった。一方、c.3007G>A (p.Gly1003Ser)変異を持つ患者由来のリンパ芽球様細胞から抽出した mRNA では健常者と比べて遺伝子 X の発現に有意差はなかった図 1。

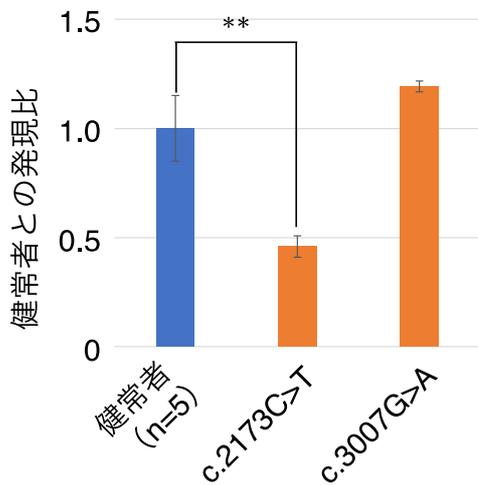


図 1 リンパ芽球様細胞における遺伝子 X の発現

(5) ヒストン修飾活性

患者由来のリンパ芽球様細胞、健常者由来のリンパ芽球様細胞を用いて行ったヒストン修飾活性は患者および健常者間で有意差は得られなかった (図 2)。

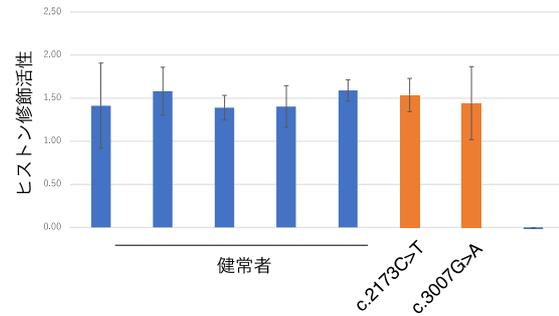


図 2 リンパ芽球様細胞から抽出したヒストン分画におけるヒストン修飾活性

以上の結果から、疾患特異的な中間表現型としての身体表現型を有する日本人統合失調症多発家系における遺伝子 X 上の変異 c.2173C>T (p.Arg725Thr)は非常に稀な変異であり、少なくとも遺伝子 X の発現量が低下する。リンパ芽球様細胞においては明らかな生物活性の違いは認められなかったが、本変異によって遺伝子 X の発現が低下し、発達のいずれかの段階において機能すべきヒストン修飾活性に変化が生じ、他の遺伝子発現に影響を与えている可能性が示唆された。一方、c.3007g>a (p.Gly1003Ser)変異も非常に稀な変異であるが、発現や活性に明らかな変化を認めず、病的意義は不明である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1) Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Fujiyama A, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Suzuki Y, Sugano S, Qu W, Ichikawa K, Yurino H, Higasa K, Shibata S, Mitsue A, Tanaka M, Ichikawa Y, Takahashi Y, Date H, Matsukawa T, Kanda J, Nakamoto FK, Higashihara M, Abe K, Koike R, Sasagawa M, Kuroha Y, Hasegawa N, Kanesawa N, Kondo T, Hitomi T, Tada M, Takano H, Saito Y, Sanpei K, Onodera O, Nishizawa M, Nakamura M, Yasuda T, Sakiyama Y, Otsuka M, Ueki A, Kaida KI, Shimizu J, Hanajima R, Hayashi T,

- Terao Y, Inomata-Terada S, Hamada M, Shirota Y, Kubota A, Ugawa Y, Koh K, Takiyama Y, Ohsawa-Yoshida N, Ishiura S, Yamasaki R, Tamaoka A, Akiyama H, Otsuki T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S: Expansions of intronic TTCA and TTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* 50: 581-590, 2018 査読有
- 2) 石島洋輔、新井 薫、肝付 洋、中村雅之、佐野 輝: 発熱・白血球増多を伴うカタトニアを呈した急速抗体型双極性障害の1例、*精神医学* 59: 943-948、2017 査読有
- 3) 新井 薫、肝付 洋、春日井 基文、中村雅之、佐野 輝: 回避・制限性食物摂取障害に risperidone が有効であった1例、*精神医学* 59: 91-94、2017 査読有
- 4) Yoshimuta H, Nakamura M, Kanda E, Fujita S, Takeuchi K, Fujimoto T, Nakabeppu Y, Akasaki Y, Sano A: The effects of olanzapine treatment on brain regional glucose metabolism in neuroleptic-naive first-episode schizophrenic patients. *Hum. Psychopharmacol.*, 31 :419-426, 2016 査読有
- 5) Wakamatsu M, Nakamura M, Kasugai M, Kimotsuki H, Oki T, Orita Y, Togami S, Kobayashi H, Sano A, Douchi T: Predictive validity of the Japanese version of Postpartum Depression Predictors Inventory-Revised (PDPI-R) during pregnancy and the postpartum period. *Medical Journal of Kagoshima University*, 63: 9-19, 2016 査読有
- 6) Sasaki N, Nakamura M, Kodama A, Urata Y, Shiokawa N, Hayashi T, Sano A: Chorein interacts with α -tubulin and HDAC6, and overexpression preserves cell viability during nutrient deprivation in HEK293 cells. *FASEB J.*, 30: 3726-3732, 2016 査読有
- 7) Sakimoto H, Nakamura M, Nagata O, Yokoyama I, Sano A: Phenotypic abnormalities in a chorea-acanthocytosis mouse model are modulated by strain background. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 472: 118-124, 2016 査読有
- 8) Benninger F, Afawi Z, Korczyn AD, Oliver KL, Pendziwiat M, Nakamura M, Sano A, Helbig I, Berkovic SF, Blatt I: Seizures as presenting and prominent symptom in Chorea-Acanthocytosis with c.2343del VPS13A gene mutation. *Epilepsia*, 57: 549-556, 2016 査読有
- [学会発表](計7件)
- 1) Nakamura M: A mouse model of Chorea-Acanthocytosis, 9th International Meeting on Neuroacanthocytosis Syndromes Dresden, Germany, 2018
- 2) Nakamura M, Sano A: Autoimmune limbic encephalitis like schizophrenia, The 5th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, Bali, Indonesia, 2017
- 3) Tagawa S, Nakamura M, Daimou Y, Takatori Y, Sameshima T, Nakayama R, Sakaguchi N, Sameshima M, Watanabe O, Takashima H, Douchi T, Takahashi Y, Tanaka K, Sano A: Seven cases of autoimmune limbic encephalitis with psychiatric symptoms, The 5th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, Bali, Indonesia, 2017
- 4) Sakimoto H, Nakamura M, Kusumoto A, Kimotsuki H, Sano A: Musical hallucinaon associated with the superior temporal gyrus in non-dominant hemisphere, The 5th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, Bali, Indonesia, 2017
- 5) Nakamura M, Sasaki N, Kodama A, Shiokawa N, Sano A: Chorein /HDAC6 interaction confers resistance to nutrient deprivation in chorein-overexpressing HEK293 cells, 45th annual meeting of the Society for Neuroscience Chicago USA, 2015 Oct 18
- 6) Sakimoto H, Nagata O, Yokotsuka S, Arai K, Nakamura M, Sano A: Effect of genetic background on the phenotype of chorea-acanthocytosis model mouse, 45th annual meeting of the Society for Neuroscience Chicago USA, 2015 Oct 19
- 7) Nagata O, Sakimoto H, Yokotsuka S, Arai K, Nakamura M, Sano A: Behavioral and sperm motility analyses of male

infertility in Chorea-acanthocytosis
model mouse, 45th annual meeting of
the Society for Neuroscience Chicago
USA, 2015 Oct 19

〔図書〕(計2件)

中村雅之、佐野 輝: 精神医学症候群(第2版) III - 物質関連障害および嗜癮性障害群からてんかんまで - XVI 神経認知障害群 認知症(DSM-5)および軽度認知障害(DSM-5)プリオン病による認知症/軽度認知障害群(Major or Mild Neurocognitive Disorder Due to Prion Disease), **別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ**, 39: 195-203, 2017

佐野 輝、中村雅之、新井薫、塩川奈理、石塚貴周、佐々木なつき、林 岳宏、大毛葉子、瀬戸下玄郎、浦田結嘉、笠毛 溪、梅原ひろみ、崎元仁志、永田青海、横塚紗永子、西田佳晃: 神経有棘赤血球症 診療の手引き、平成29年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業「神経変性疾患領域における基盤的調査研究」班 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 雅之(NAKAMURA, Masayuki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号: 90332832

(2) 研究分担者

佐野 輝(SANO, Akira)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号: 30178800

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし