

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07017

研究課題名(和文) 脳の高次機能発現と精神疾患関連転写調節複合体の機能

研究課題名(英文) Involvement of the transcription complex in higher brain function

研究代表者

大西 哲生 (Ohnishi, Tetsuo)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：80373281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症や双極性障害に代表される精神疾患は根本的な原因は不明で、治療法、予防法も開発されていない。ごく一部の患者には転座、大きな欠失等が染色体に認められるものがある。本研究では均衡型転座を持つ統合失調症患者と転座点に存在するLDB2遺伝子に着目した。この遺伝子は脳の局所で高い発現を示すこと、この遺伝子を破壊したマウスは統合失調症や躁状態を思わせる行動変化が見られること、これらの変化には扁桃体や海馬といった脳領域の機能異常が関わっていること、LDB2は染色体上の多くの領域に結合することにより転写制御を行うことなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、4番染色体と13番染色体の間の均衡型転座を持つ稀な統合失調症症例に着目し、遺伝子ノックアウト動物の解析等からその原因遺伝子がLDB2である可能性、転写調節因子と考えられるLDB2が制御する遺伝子発現ネットワークを明らかにすることができた。その遺伝子発現ネットワークの異常を介して、統合失調症や双極性障害における一部集団の病態生理を分子レベルで理解することができる可能性を秘めるものであり、極めて貴重な研究成果となった。また本研究の成果は、精神疾患のバイオマーカー研究にも貴重な情報を提供した。

研究成果の概要(英文)：We have reported a schizophrenia patient with a balanced translocation between chromosomes 4 and 13, and found that the breakpoint within chromosome 4 locates proximately to the promoter region of the LDB2. In the present study, we revealed that Ldb2 knockout mice displayed various behavioral and functional deficits relevant across mental disorders. We showed potential involvement of dysregulated synaptic plasticity controlled by the immediate early gene product Arc in the abnormal phenotypes. Ldb2 KO mice exhibited dysregulated gene expression patterns, and we showed that LDB2 binds to >10,000 genomic sites. Consensus binding sequences of the EGR transcription factors, another immediate early gene product, were enriched in the center of concentrated sequences. Collectively, the current study suggests that dysregulation in the Arc-related biological processes and gene expression control by LDB2 and EGR underlie the pathogenic mechanism in a subset of mental disorders.

研究分野：分子神経科学

キーワード：均衡型転座 統合失調症 双極性障害 ChIP seq マイクロアレイ ノックアウトマウス 転写因子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症や双極性障害に代表される精神疾患に関して、長らく行われてきた治療法である薬物療法（主作用はドーパミン D2 受容体の抑制作用によると思われる）の効果も多くの場合限定的であり、予防法も開発されていない。その原因として、これらの疾患の根本的な原因を分子レベルで説明できていないという問題点が挙げられる。一方でこれらの疾患には遺伝的要因が発症に大きく関与していると考えられることから、多数のサンプルを用いた全ゲノム関連解析等の遺伝解析が行われており、その過程で様々な遺伝子がリスク遺伝子と報告されてきた。しかしながら、その多型の生物学的効果は多くの場合不明であり、遺伝学的 effect size も極めて小さい事が判明し、精神疾患の遺伝学的アプローチは暗礁に乗り上げていた。Itokawa らはごく少数の遺伝子の機能異常が発症に影響を与えたと考えられる症例に着目、すでに 4 番-13 番染色体の間で均衡型染色体転座を持つ統合失調症症例を発表している (Itokawa M et al., *Psychiatry Clin. Neurosci* 58: 333-337, 2004)。この男性患者は、「政府が自分の脳にマイクロチップを埋め込んで自分をコントロールしようとしている」「会ったこともない人に、自分がどのような人であるか知られてしまっている」というような強固な妄想に支配されていた。すでに我々は、Itokawa らのグループと共同して FISH 実験、次世代シーケンサ解析を行うことにより、その転座点をピンポイントで明らかにしていた。本研究では上述の均衡型転座を持つ統合失調症患者とその 4 番染色体側にある転座点の近傍に存在する *LDB2* (Lim Domain Binding 2) 遺伝子に着目した。糸川らのグループは *LDB2* 遺伝子の SNP が統合失調症に遺伝統計学的な関連を示すこと、双極性障害患者には 2 つの稀なミスセンス変異があることも明らかにしていた (Horiuchi et al., in preparation) こと、さらに *LDB2* の結合タンパク質として報告されたものの中には双極性障害において稀なミスセンス変異が報告されていることなどから、*LDB2* は診断名を超えて精神疾患に関わる可能性がある遺伝子であるとの仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究開始までに *Ldb2* KO マウスには、統合失調症や躁状態を思わせる様々な異常な行動変化が見られる（例えば、過活動性、恐怖条件付け不能、注意欠陥、衝動性の亢進など）こと、マイクロアレイ実験により *LDB2* が様々な遺伝子の発現を調節することを見出していた。これらのことは *LDB2* の機能異常が精神疾患に繋がりうることを明確に示すものである。ただ、マイクロアレイ実験だけでは、DNA 結合ドメインをもたない転写調節因子である *LDB2* がどのようにして精神疾患の発症に関わるのかという大きな問題は解決されておらず、本研究ではこの点に焦点を当てた。

### 3. 研究の方法

本研究では、ChIP-seq 実験により、発端者における発症メカニズムを分子レベルで理解すること、*LDB2* により直接制御される遺伝子群を明らかにすることで一般の精神疾患患者における病態生理解につなげることを目指した。ChIP-seq 実験に用いる抗体の選択は実験の成否を決定づける重要な要因である。我々が独自に作成した *LDB2/Ldb2* ウサギポリクローナル抗体（マウス *Ldb2* の N 末端側ペプチドを抗原としたもの）による免疫沈降効率が比較的良いことを見出した。また ChIP 実験に用いる培養細胞として、神経幹細胞に富むことが知られる neurosphere をヒト健常対照者から樹立した iPS 細胞から誘導しても用いることにした（下図 A 参照）。この細胞群では *LDB2* 細胞を豊富に発現することを予め確かめた。ChIP 後の塩基配列決定は Illumina 社の HiSeq 2500 プラットフォームを用い、いくつかのツールを *in silico* 解析に用いた。

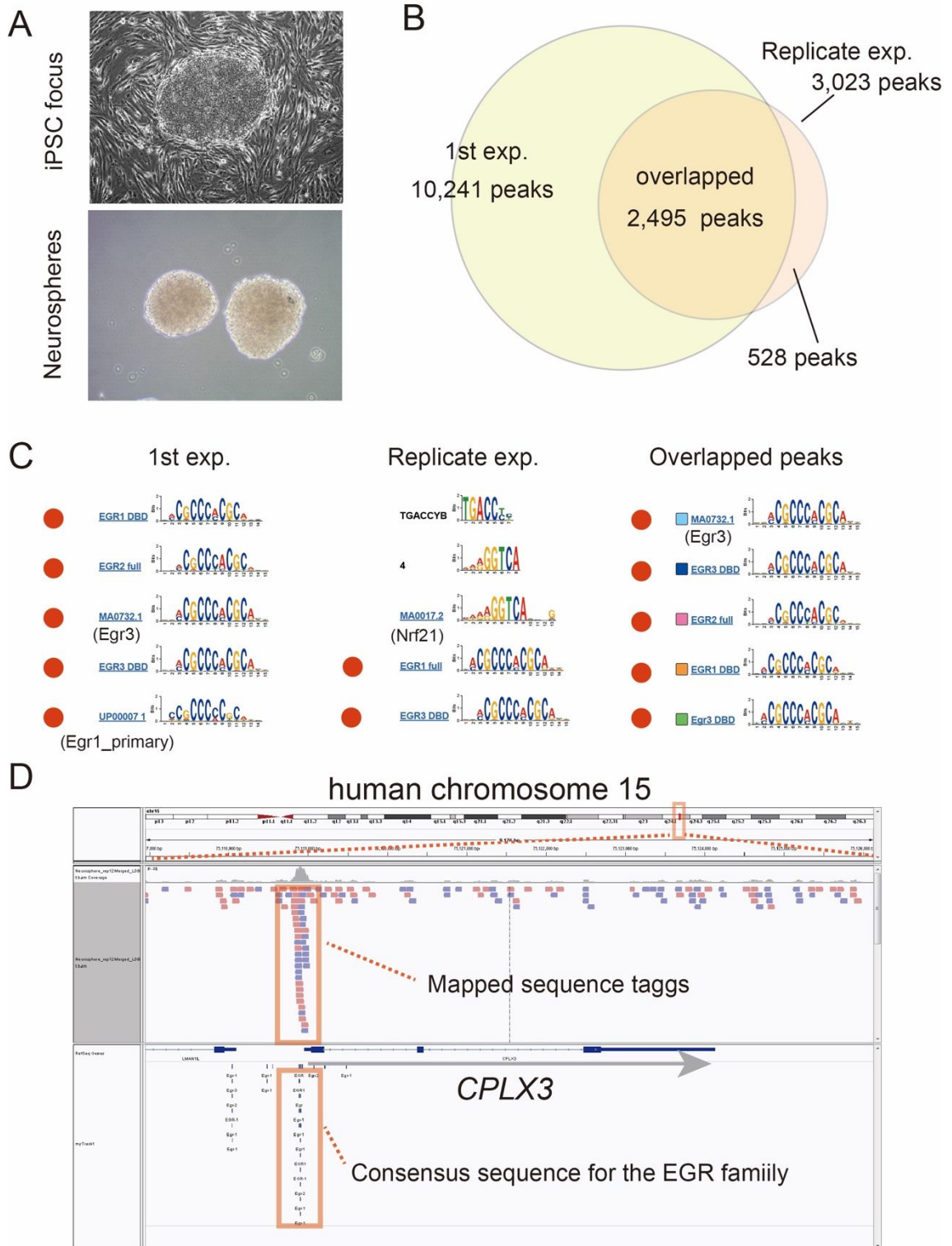
### 4. 研究成果

10,241 個の ChIP-seq ピークを得た。同様の実験を再度行うと約 80% のピークが一度目のものとオーバーラップしていたことから極めて再現性が良い実験系であると判断された（下図 B 参照）。再現実験でピーク数自体は減少したが、複合体の免疫沈降効率が不安定なためと考えられる。遺伝子ベースで見ると、マウス脳のマイクロアレイ実験で発現変動が認められた遺伝子と多くのものが共通していたことから、これらの遺伝子は生物種を超えて *LDB2/Ldb2* によって発現制御される遺伝子の候補であると考えられた。例えば *CPLX3* (complexin3 をコードする) や *SEMA3* (semapholin 3E をコードする) が挙げられる。Complexin3 はシナプス小胞内の分子の開口放出に関わる分子であり、また、*SEMA3* は Plexin のリガンドとして働く神経ガイダンス分子である。

*LDB2* は既知の DNA 結合ドメインを持たないことから、別の転写因子を介して DNA に結合し転写制御を行うのではないかと予想した。CentriMo (<http://meme-suite.org/doc/centrimo.html>) というツールを用いて得られたピークの中心部にどのような転写因子が結合しているかを予測できる。この解析の結果、最初期遺伝子(immediate early gene)の一つである *EGR* (early growth response) ファミリー転写因子のコンセンサス配列が濃縮されることが判明した(下図 C 参照)。重要なことに、我々はすでに統合失調症患者死後脳では、*EGR* ファミリー遺伝子の発現が低下していること、*EGR3* の SNP が統合失調症に遺伝統計学的な関連を示すことを証明し発表していた (Yamada et al. PNAS 104, 2815-, 2007)。

マウスマイクロアレイ実験で検出した *CPLX3* の例で示すと、そのプロモーター領域に多くの ChIP リードの集積が見られ、その位置に完全に一致して *EGR* ファミリー転写因子のコンセンサス領域が存在することがわかる(下図 D 参照)。

これらのサイトに実際に EGR ファミリー転写因子が結合していることは、EGR ファミリーの ChIP-seq の結果も閲覧できるデータベース (ChIP Atlas: <https://chip-atlas.org>) の検索により判明した。その結果と照合すると LDB2 の ChIP-seq で得られた EGR consensus 配列のゲノム上の位置と EGR の ChIP で得られたゲノム上の位置とはかなりの (CPLX3 も含まれる)ピークでオーバーラップしていることがわかった。



これらの結果から、LDB2 は EGR ファミリーと何らかの形で相互作用することで、その機能を発揮することが証明された。これらの結果を統合して、我々は、精神疾患の一部に、「LDB2-EGR 軸」の機能異常による転写調節異常がその発症の生物学的基盤になる群が存在することを提唱した。

今研究により、LDB2-EGR 軸により直接制御される遺伝子ネットワークの全貌が明らかになったので、このネットワークが全体として、一般の統合失調症、双極性障害等の精神疾患の発症原因や病態生理とどのような関わりを持ちえるかを詳しく検討することが今後の課題となるであろうし、そこから新たな治療標的が明らかとなってくることが期待される。

これらの研究成果はすでに論文にまとめており、2019 年度前半には本投稿を勧める雑誌への投稿を終え、その研究としての価値に関して研究者コミュニティの判断を仰ぐこととしている。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Investigation of betaine as a novel psychotherapeutic for schizophrenia. **Ohnishi T**, Balan S, Toyoshima M, Maekawa M, Ohba H, Watanabe A, Iwayama Y, Fujita Y, Tan Y, Hisano Y, Shimamoto-Mitsuyama C, Nozaki Y, Esaki K, Nagaoka A, Matsumoto J, Hino M, Mataga N, Hayashi-Takagi A, Hashimoto K, Kunii Y, Kakita A, Yabe H, Yoshikawa T. EBioMedicine, 2019, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.062, in press. 査読あり
2. Evaluation of the role of fatty acid-binding protein 7 in controlling schizophrenia-relevant phenotypes using newly established knockout mice. Shimamoto-Mitsuyama C, **Ohnishi T**, Balan S, Ohba H, Watanabe A, Maekawa M, Hisano Y, Iwayama Y, Owada Y, Yoshikawa T. Schizophr Res. 2019 Feb 11. pii: S0920-9964(19)30052-0. doi: 10.1016/j.schres.2019.02.002. [Epub ahead of print] 査読あり
3. Quantitative evaluation of incomplete preweaning lethality in mice by using the CRISPR/Cas9 system. Nakamura T, Nakajima K, **Ohnishi T**, Yoshikawa T, Nakanishi M, Takumi T, Tsuboi T, Kato T. Sci Rep. 2018 Oct 30;8(1):16025. 査読あり
4. Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, **Ohnishi T**, Balan S, Hisano Y, Iwayama Y, Toyota T, Matsumoto T, Itasaka N, Sugiyama S, Tanaka M, Yano M, Dean B, Okano H, Yoshikawa T. Transl Psychiatry. 2016 Nov 1;6(11):e934. 査読あり

### 〔学会発表〕(計 件)

### 〔図書〕(計 件)

### 〔産業財産権〕

#### ○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

#### ○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。