

令和元年9月25日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07210

研究課題名（和文）統合失調症における環境要因のエピゲノム解析と分子病態の解明

研究課題名（英文）Epigenetic mechanisms in schizophrenia by immune activation during pregnancy

研究代表者

俞志前（YU, ZHIQIAN）

東北大学・災害科学国際研究所・助教

研究者番号：60451639

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：胎生期の母体感染が胎児の脳発達に影響を及ぼし、成長後の統合失調症の発症率を高めることが知られている。母体感染による統合失調症の発症機構を解明するために、統合失調症モデルマウスを用い、脳内の遺伝子発現およびDNAメチル化の変化を全ゲノム規模で検討した。その結果、統合失調症の発症に関わる遺伝子を特定し、雌マウスにおいて顕著な発現変動が見られた。また、統合失調症の女性罹患者の死後脳においても、雌マウスと同様の変化が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、脳発達や中枢神経系恒常性を維持するDNAメチル化機能、および環境要因によるメチル化の再編を明らかにし、統合失調症の発症メカニズムの解明に寄与する。また、マウスの雌雄差を解析することで、ヒトの男女間における脳の発達、特にDNAメチル化制御の違いを解明するための新しい戦略につながり、これらの知見により統合失調症を始めとする種々の精神疾患の発症機序の解明、および有効な治療薬の開発が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Gender differences in susceptibility to schizophrenia have been a hotly debated research issue for decades. Epidemiological evidence has shown that female offspring exposed to maternal infection during pregnancy are significantly more susceptible to developing schizophrenia. From an analysis of the offspring of poly I:C-treated pregnant mice we show that only female offspring of poly I:C-treated dams express schizophrenia-linked behavioral changes, profound genome-wide DNA hypermethylation profiles in the prefrontal cortices and postmortem prefrontal cortices of female patients with schizophrenia.

研究分野：災害精神医学

キーワード：統合失調症 遺伝子発現 メチル化 環境要因

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の死後脳において DNA メチル化増加および遺伝子発現減少が報告され、統合失調症の病態に關与するエピジェネティックな調節機構の異常が指摘されているが、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。一方、胎生期の脳発達には母体のウイルス感染などの環境要因に影響を受け、成長後の統合失調症の発症率を高めることが報告されている。本研究は胎生期母体ウイルス感染のモデルマウスを用い、胎生期免疫ストレスが生後マウスの脳内 DNA メチル化状態および遺伝子発現に及ぼす影響を全ゲノム規模で検討する。更に、特定した遺伝子の DNA メチル化および発現が統合失調症の死後脳を用いて検討する。統合失調症の発症脆弱性遺伝子の同定を進める本研究は、統合失調症発症の分子病態の解明とその知見に基づいた発症予測・診断方法の確立が期待される。

2. 研究の目的

胎生期ウイルス感染モデルマウスおよび統合失調症罹患者の死後脳検体を用いて、胎生期環境要因が統合失調症罹患感受性を引き上げる脳内エピゲノムの変化を特定する。

3. 研究の方法

妊娠期マウスをコントロール群および模擬ウイルス・リボ核酸 (Poly I:C) 暴露モデル群に分けて正常条件で飼育する。模擬 Poly I:C モデル群は妊娠期の母体に Poly I:C (5.0 mg/kg; CALBIOCHEM, San Diego, California) を毎日一回、トータル 5 回に腹腔内注射する。コントロール群には同様の条件で PBS を注射する。すべての妊娠期マウスから仔マウスの体重を計測する。仔マウスを 3 週間後に離乳して 8 週齢までに飼育し、行動実験を行う。行動実験では、接触走性 (Thigmotaxis test) およびプレパルスインヒビション (PPI; 驚愕刺激の直前に微弱な刺激が先行することにより驚愕反応が大幅に抑制される現象) を用いて仔マウスの壁に沿った活動量、活動時間および驚愕反応に対する抑制を測定する。観察が終了した時点で脳前頭前野を摘出する。前頭前野の遺伝子発現およびメチル化状態をマイクロアレイおよび MBD-seq で解析する。さらに、仔マウスで確認された遺伝子を対象に、既存のヒト健常者および統合失調症の死後脳組織を用いて遺伝子発現およびメチル化の変化を検証する。

4. 研究成果

Poly I:C 投与群はコントロール群と比べ、仔マウスの出生数および出生時の体重において有意差は認められなかった。Thigmotaxis test を Any-maze ソフトを用いて解析した結果、Poly I:C 群はセンターゾーンへ入る回数、センターゾーン滞在時間およびセンターゾーン走行時間において、コントロール群と比べて有意に増加した。さらに、雌雄別で解析した結果、センターゾーン滞在時間およびセンターゾーン走行時間において、雌仔マウスが雄仔マウスより著しい増加が見られた。これらの結果から Poly I:C 雌仔マウスはより激しい多動および不安傾向が示された。さらに、雌 Poly I:C 群は PPI 抑制 (71 または 77 dB) において、コントロールと比べて有意に低下していることが観察されたが、雄仔マウスでの群間有意差は認められなかった。以上のことから、妊娠後期のウイルス感染に対する応答のモデルにおける Poly I:C 投与による雌仔マウスにおける統合失調症様行動異常が見られた。

これらのマウスの前頭前野組織を摘出して、抽出した総 RNA を対象としたマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行って、胎生期免疫ストレス負荷により成長後も発現に影響を受ける統合失調症に關連する遺伝子群を特定した。これらの遺伝子の中で、雌仔マウスにおける遺伝子の変動 (1.5 倍以上かつ $P < 0.05$) が著しく、上昇 (125 個) または減少 (80 個) した遺伝子に対して、雄仔マウスでは減少した遺伝子が 4 個しか観察されていなかった。また、雌仔マウスの変動した遺伝子は "dendrite"、"neuronal cell body"、"postsynaptic membrane" and "synapse" などのカテゴリーに属され、統合失調症に關連する 24 個の遺伝子はすでに報告されているものである。

DNA メチル化解析の結果から、雌仔マウスの高メチル化プロファイルが観察され、遺伝子発現解析の結果と併せ、胎生期の環境負荷が成長後の行動への影響となる分子も特定した。その中で、Acsbg1 の DNA の高メチル化および mRNA の発現減少が雌仔マウスのみで確認された。さらに、この高メチル化状態および遺伝子の低発現が女性の統合失調症の死後脳検体においても確認された。ヒト ACSBG1 のタンパク質構造や機能、5 つの転写バリエーションおよびその発現プロファイルが存在し、その詳細はほとんど研究が行われていないが、メチル化プロファイルに差が認められる領域に比較的近くに位置するエクソン 8 のスプライス変異が生じるバリエーション (4 アミノ酸の欠失が起きる) における発現の有意な減少を見出した。この遺伝子から翻訳されるタンパク質は細胞質内に多く存在し脂質代謝に關与する水溶性のタンパク質であると考えられる。アミノ酸配列からのタンパク質の構造やドメイン機能を予測するソフトウェアを用いて解析した結果、この欠失は Alpha helix 構造の C 末端とそこから Random coil に移行する Extended strand の N 末端側に相当する部分で起き、予測ソフトウェアでは立体構造は大きく変わらないものの、等電点等には影響する可能性が示唆され、母親の妊娠中の免疫ストレス暴露によりミトコンドリアの機能異常が考えられる。これらの情報は、統合失調症発症の分子病

態の解明とその知見に基づいた発症予測・診断方法の確立が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. H Takeuchi, H Tomita, Y Taki, Y Kikuchi, C Ono, **Z Yu**, A Sekiguchi, R Nouchi, Y Kotozaki, S Nakagawa, CM Miyauchi, K Iizuka, R Yokoyama, T Shinada, Y Yamamoto, S Hanawa, T Araki, H Hashizume, K Kunitoki, Y Sassa, R Kawashima. Effect of the interaction between BDNF Val66Met polymorphisms and daily physical activity on mean diffusivity. *Brain Imaging Behav.* 2019 Jan 7. 査読有. doi: 10.1007/s11682-018-0025-8.
2. H Takeuchi, H Tomita, Y Taki, Y Kikuchi, C Ono, **Z Yu**, A Sekiguchi, R Nouchi, Y Kotozaki, S Nakagawa, CM Miyauchi, K Iizuka, R Yokoyama, T Shinada, Y Yamamoto, S Hanawa, T Araki, H Hashizume, K Kunitoki, Y Sassa, R Kawashima. A common CACNA1C gene risk variant has sex-dependent effects on behavioral traits and brain functional activity. *Cereb Cortex.* 2018 Aug 15. 査読有. doi: 10.1093/cercor/bhy189.
3. M Sakai, H Takeuchi, **Z Yu**, Y Kikuchi, C Ono, Y Takahashi, Polymorphisms in the microglial marker molecule CX3CR1 affect the blood volume of the human brain. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2018 Jun;72(6):409-422. 査読有. doi: 10.1111/pcn.12649.
4. N Nakaya, H Nemoto, C Yi, A Ssto, K Shingu, T Shoji, S Ssto, N Tsuchiya, T Nakamura, A Narita, M Kogure, Y Sugawara, **Z Yu**, N Gunawansa, S K Mura, T Sato, F Imamura, I Tsuji, A Hozawa, H Tomita. Effect of tsunami drill experience on evacuation behavior after the onset of the Great East Japan Earthquake. *Int J Disaster Risk Reduct.* 2018 Jun; 28: 206-213. 査読有.
5. H Takeuchi, H Tomita, Y Taki, Y Kikuchi, C Ono, **Z Yu**, A Sekiguchi, R Nouchi, Y Kotozaki, S Nakagawa, CM Miyauchi, K Iizuka, R Yokoyama, T Shinada, Y Yamamoto, S Hanawa, T Araki, H Hashizume, K Kunitoki, Y Sassa, R Kawashima. The Vegf gene polymorphism impacts brain volume and arterial blood volume. *Hum Brain Mapp.* 2017 Apr 12. 査読有. doi: 10.1002/hbm.23606.
6. **Z Yu**, H Saito, H Otsuka, Y Shikama, H Funayama, M Sakai, S Murai, Nakamura M, Yokochi T, Takada H, Sugawara S, Endo Y. Pulmonary platelet accumulation induced by catecholamines: Its involvement in lipopolysaccharide-induced anaphylaxis-like shock. *Int Immunopharmacol.* 2017 Feb;43:40-52. 査読有. doi: 10.1016/j.intimp.2016.11.034.
7. **Z Yu**, H Fukushima, C Ono, M Sakai, Y Kasahara, Y Kikuchi, Gunawansa N, Takahashi Y, Matsuoka H, Kida S, Tomita H. Microglial production of TNF-alpha is a key element of sustained fear memory. *Brain Behav Immun.* 2017 Jan;59:313-321. 査読有. doi: 10.1016/j.bbi.2016.08.011.
8. Y Takahashi, **Z Yu**, M Sakai, H Tomita. Linking activation of microglia and peripheral monocytic cells to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci.* 2016 Jun 3;10:144. 査読有. doi: 10.3389/fncel.2016.00144.
9. M Sakai, Y Takahashi, **Z Yu**, H Tomita. Microglial gene expression alterations in the brains of patients with psychiatric disorders. *Advances in Neuroimmune Biology.* 2016. 6 (2), 83-93. 査読無.

〔学会発表〕(計 33 件)

1. **Yu Z**, Ueno K, Funayama R, Sakai M, Ono C, Nakayama K, Nakasaki S, Tomita H. Maternal infection alters methylome of schizophrenia loci in female brain. Society for Neuroscience 48th Annual Meeting. 2018.11.
2. Sakai M, **Yu Z**, Ono C, Tomita H. Gender-specific gene expression profiling of the prefrontal cortices of social defeat stress model mice. Society for Neuroscience 48th Annual Meeting. 2018.11.
3. **愈志前**. 脳内炎症の PTSD とうつ病病態への関与. 医療心理懇話会第3回集会. 2018.10
4. **愈志前**, 小野 千晶, 富田 博秋. 胎生期免疫ストレスがエピペノムを介して精神行動に及ぼす影響の特定. 第63回日本人類遺伝子学会. 2018.10
5. **愈志前**, 坂井 舞, 小野 千晶, 富田 博秋. 反復社会挫折ストレスにおける前頭前皮質遺伝子発現の検討. 第40回日本生物学的精神医学会. 2018.9
6. **Yu Z**, Ueno K, Funayama R, Sakai M, Ono C, Nakayama K, Nakasaki S, Tomita H. Molecular profile of female brain relevant to susceptibility to schizophrenia due to maternal infection. 第41回日本神経科学大会. 2018.7
7. **愈志前**, 坂井 舞, 富田 博秋. 慢性拘束ストレスによるミクログリア由来サイトカインの発現. 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会. 2017.9
8. **Yu Z**, Funayama R, Sakai M, Kikuchi Y, Hashimoto K, Nagasaki M, Nakayama K, Tomita

- H. Immune activation during pregnancy in mice leads different DNA methylation and gene expression between male and female offspring. 第40回日本神経科学大会. 2017.7
9. Sakai M, Yu Z, Kikuchi Y, Takahashi Y, Tomita H. Effects of prolonged restraint stress on microglial gene expression. 第40回日本神経科学大会. 2017.7
 10. Yu Z, Fukushima H, Ono C, Sakai M, Kasahara Y, Kikuchi Y, Gunawansa N, Takahashi Y, Matsuoka H, Kida S, Tomita H. Microglial TNF alpha production is a key component in sustaining fear-memory. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium. 2017.2
 11. Sakai M, Takeuchi H, Yu Z, Kikuchi Y, Ono C, Takahashi Y, Ito F, Matsuoka H, Tanabe O, Yasuda J, Taki Y, Kawashima R, Tomita H. Effect of CX3CR1 polymorphisms on the structure and blood volume of the human. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium. 2017.2
 12. Kasahara Y, Suzuki S, Onouchi Y, Yoshida A, Ono C, Kikuchi Y, Yu Z, Tomita H. Oxytocin exposure in pregnant mice influences future emotional and social. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium. 2017.2
 13. Ono C, Yu Z, Kikuchi Y, Kasahara Y, Kunii Y, Kakita A, Niwa S, Tomita H. Tissue pH evaluation of human postmortem brain tissue and identification of pH. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium. 2017.2
 14. Kubo Y, Takeuchi H, Kikuchi Y, Ono C, Kasahara Y, Yu Z, Boku S, Hishimoto A, Sora I, Taki Y, Kawashima R, Tomita H. The μ -opioid receptor gene polymorphism c.118A>G may influence negative. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium. 2017.2
 15. Takahashi Y, Hikaru Takeuchi H, Mai Sakai M, Yu Z, Yasuyuki Taki Y, Ryuta Kawashima R, Hiroaki Tomita H. Impact of the GFAP gene variant rs2070935 on the structure and function of the human brain. Society for Neuroscience 46th Annual Meeting. 2016.11
 16. Yu Z, Fukushima H, Ono C, Sakai M, Kasahara Y, Kikuchi Y, Takahashi Y, Matsuoka H, Kida S, Tomita H. Gene expression changes in the microglia during fear memory processing. Society for Neuroscience 46th Annual Meeting. 2016.11
 17. Sakai M, Takeuchi H, Kikuchi Y, Yu Z, Ono C, Taki Y, Kawashima R, Tomita H. Association study of CX3CR1 polymorphisms V249I and T280M and imaging of human brain function. Society for Neuroscience 46th Annual Meeting. 2016.11
 18. 愈志前, 福島 穂高, 小野 千晶, 坂井 舞, 笠原 好之, 高橋 雄太, 松岡 洋夫, 喜田 聡, 富田 博秋. 恐怖記憶の持続におけるミクログリア由来 TNF- α の発現. 第38回日本生物学的精神医学会. 2016.9.
 19. 高橋 雄太, 竹内 光, 坂井 舞, 愈志前, 瀧 靖之, 川島 隆太, 富田 博秋. 健常成人 1212 人における GFAP 多型と脳機能画像との関連の検討. 第38回日本生物学的精神医学会. 2016.9.
 20. 坂井 舞, 竹内 光, 菊地 淑恵, 愈志前, 小野 千晶, 瀧 靖之, 川島 隆太, 富田 博秋. 精神疾患のリスク遺伝子 CX3CR1 多型と脳画像との関連解析. 第38回日本生物学的精神医学会. 2016.9.
 21. 高橋 雄太, 愈志前, 坂井 舞, 富田 博秋. リチウム投与によるミクログリアと単球の遺伝子発現プロファイル変化の検討. 第13回日本うつ病学会総会. 2016.8.
 22. Sakai M, Takeuchi H, Kikuchi Y, Ono C, Yu Z, Taki Y, Kawashima R, Tomita H. Association of V249I and T280M polymorphisms in the chemokine receptor CX3CR1 and brain function. 第39回日本神経科学大会. 2016.7.
 23. 高橋 雄太, 愈志前, 坂井 舞, 富田 博秋. リチウム投与によるミクログリアと単球の遺伝子発現プロファイル変化の検討. 第46回日本神経精神薬理学会年会. 2016.7
 24. 久保 有美子, 竹内 光, 菊地 淑恵, 笠原 好之, 愈志前, 瀧 靖之, 川島 隆太, 富田 博秋. 日本人における μ オピオイド受容体遺伝子多型 118 A>G が脳構造や性格に及ぼす影響. 第46回日本神経精神薬理学会年会. 2016.7.
 25. 鈴木 祥恵, 尾之内 勇治, 笠原 好之, 小野 千晶, 菊地 淑恵, 愈志前, 富田 博秋. 胎児期オキシトシン投与時の胎児脳および成体脳における遺伝子発現変化の解析. 第46回日本神経精神薬理学会年会. 2016.7
 26. 尾之内 勇治, 鈴木 祥恵, 笠原 好之, 小野 千晶, 菊地 淑恵, 愈志前, 富田 博秋. 胎児期のオキシトシン曝露による成育後の不安行動、社会行動への影響. 第46回日本神経精神薬理学会年会. 2016.7
 27. 愈志前. 恐怖記憶におけるミクログリア由来 TNF- α の発現. 第46回日本神経精神薬理学会年会. 2016.7
 28. 高橋 雄太, 愈志前, 坂井 舞, 小松 浩, 伊藤 文晃, 松岡 洋夫, 富田 博秋. リチウム投与下でのミクログリアと単球の遺伝子発現プロファイルの検討. 第112回日本精神神経学会学術総会. 2016.6
 29. Kasahara Y, Suzuki S, Onouchi Y, Yoshida A, Ono C, Kikuchi Y, Yu Z, Tomita H. Oxytocin exposure in pregnant mice influences future emotional and social behaviors of the offspring. The International College of Neuropsychopharmacology 30th. 2016.7

30. Takahashi Y, Takeuchi H, Sakai M, Yu Z, Taki Y, Kawashima R, Tomita H. Effect of GFAP polymorphisms on the structure and function of the human brain. The International College of Neuropsychopharmacology 30th. 2016.7
31. Kubo Y, Takeuchi H, Kikuchi Y, Kasahara Y, Yu Z, Taki Y, Kawashima R, Tomita H. Association between μ -opioid receptor gene variant 118 A>G and personality traits among Japanese population. The International College of Neuropsychopharmacology 30th. 2016.7.
32. Takahashi Y, Yu Z, Sakai M, Komatsu H, Ito F, Matsuoka H, Tomita H. Transcriptome responses to lithium in microglia and peripheral blood monocyte. International congress of human genetics 13th. 2016.4
33. Sakai M, Takeuchi H, Kikuchi Y, Ono C, Yu Z, Taki S, Kawashima R, Tomita H. Effect of CX3CR1 polymorphisms on the structure and function in the human brain. International congress of human genetics 13th. 2016.4

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：富田 博秋

ローマ字氏名：TOMITA HIROAKI

研究協力者氏名：長崎 正朗

ローマ字氏名：NAGASAKI MASAO

研究協力者氏名：中山 啓子

ローマ字氏名：NAKAYAMA KEIKO

研究協力者氏名：橋本 謙一

ローマ字氏名：HASHIMOTO KENJI

研究協力者氏名：岩本 和也

ローマ字氏名：IWAMOTO KAZUYA

研究協力者氏名：木下 賢吾

ローマ字氏名：KINOSHITA KENGO

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。