

令和元年6月14日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19765

研究課題名(和文) 男性統合失調症におけるX染色体上CpGアイランドの異常高メチル化の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of aberrant methylation on CpG island of X chromosome in male schizophrenia

研究代表者

大塚 郁夫(Otsuka, Ikuo)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40722880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：replicationセットの男性統合失調症/健常対照男性 各40名のDNAについて、MassARRAYを用いて対象となるCpGアイランドA内のCpGサイトのメチル化頻度を測定し、予備的研究のメチル化異常(統合失調症男性の一部において同領域が異常に高メチル化している現象)の追試に成功した。また各末梢血試料について関連遺伝子TAF1のmRNA発現量を測定し、対照群との比較やメチル化頻度との関連解析を行った。ヒト男性由来神経幹細胞やiPS細胞由来神経細胞の培養系を確立し、CRISPR/Cas9法にて異常高メチル化領域のDNA配列の機能欠失 細胞表現型にどのような影響があるかについても検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症の有病率や重症度に性差があることはよく知られているが、その生物学的機序は不明であり、統合失調症とX染色体領域のメチル化異常に着目した研究はほとんどない。本解析を遂行できれば、世界に先駆けて統合失調症の病態や性差に関する生物学的異常の一部をDNAメチル化という可塑性(治療可能性)のある現象を通して解明することにつながり、統合失調症領域における今後の診断・治療の発展に大きな貢献ができると考える。

研究成果の概要(英文)：Each CpG methylation status of CpG island A in 40 male schizophrenia (SCZ) patients and 40 healthy males (as "replication cohort") were analysed by MassARRAY; I revealed that approximately 30% of male SCZ have aberrant higher methylation of CpG island A. In addition, I investigated the association between TAF1 gene expression and methylation status of CpG island A using data from replication cohort. As in vitro study, I have been trying CRISPR-Cas experiments using male-derived neural stem cells and iPSC-derived neural cells in order to further clarify the biological importance of aberrant methylation of CpG island A.

研究分野：統合失調症

キーワード：統合失調症 X染色体 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は幻覚妄想、認知障害、自閉などの症状を来し、その急性期は「身体疾患を含むすべての疾患の中でも、生活上の負担や影響が最も大きい」とされる重篤な精神疾患である (Salomon et al, *Lancet* 2012)。統合失調症は世界的に有病率およそ 1%のありふれた疾患であるものの、その生物学的基盤の多くは未だ解明されていない。また統合失調症の病態には性差があり、男性のほうが発症率や重症度が高く、平均発症年齢が若いことが知られている (Turkheimer et al, *Neuroscientist* 2014)。一般人口における統合失調症の有病率が 1%なのに比して、一卵性双生児の発症一致率が 48%であることから、統合失調症の病態には生来のゲノムの影響が強いとされる一方、DNA 配列が全く同じ一卵性双生児においても片方は約 50%の確率で発病を免れることから、その発症にはエピジェネティクスも深く関連していると考えられており、特に DNA メチル化との関連が注目されている (Föcking et al, *Mol Neuropsychiatry* 2019)。

我々は Infinium HumanMethylation450 BeadChip による DNA メチル化頻度の網羅的解析およびメチル化特異的定量 PCR 法という 2 種類の測定法により、統合失調症男性の一部において、X 染色体のある CpG アイランド (仮称:A とする) 内の約 300 塩基に渡る領域が異常に高メチル化している (通常の 10%前後に比して 90%前後) 現象を認めた (図 1)。同領域と重なる TAF1 遺伝子は X 染色体性知的障害やジストニアとの関連は示唆されているが、統合失調症との関連はこれまでに報告がなかった。

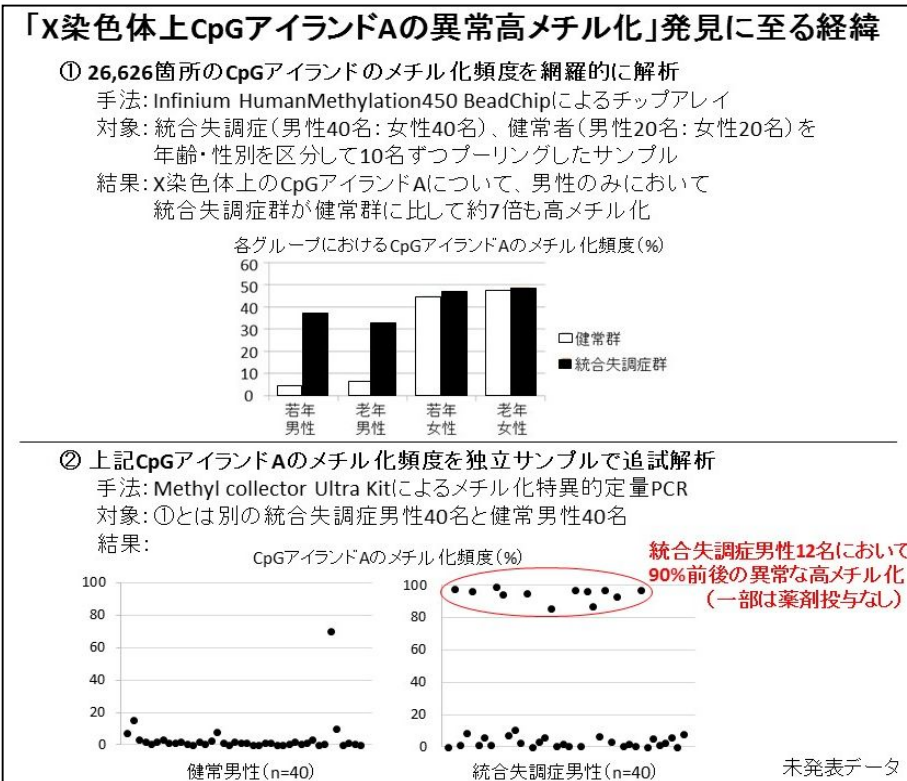


図 1

2. 研究の目的

我々はまったく新奇の知見である上記の予備的データをさらに追試するとともに、ヒト神経幹細胞や iPS 細胞を用いた細胞表現型及び網羅的遺伝子発現解析を行い、その生物学的意義、細胞、生体への影響にまでアプローチしたいと考え、本研究計画を立案した。本研究を遂行できれば、統合失調症の病態や性差に関する生物学的機序の一部を解明できる可能性がある。

3. 研究の方法

予備的研究では、プーリングサンプルについてのみ網羅的アレイを施行し、replication セットの individual のサンプルについては約 300 塩基の領域全体の大まかなメチル化頻度を測定する定量 PCR 法を施行するとどまっていた、そこで、まずは replication セットの individual サンプルに対し、定量 PCR 法での大まかな測定ではなく、一箇所ずつの CpG サイトのメチル化頻度を精細に測定し、同様の結果が得られるかを検討することが重要であった。我々は MassARRAY を用いて replication セットの男性統合失調症 40 名と男性健常対照者 40 名の DNA を対象に、CpG アイランド A 内の個々の CpG サイトのメチル化状態を測定した。

統合失調症・健常対照者それぞれの末梢血・死後脳（前頭前皮質）サンプルについて qRT-PCR にて TAF1 の mRNA 発現量を測定し、CpG アイランド A のメチル化状態との相関を解析した。

男性ドナー由来のヒト神経系細胞 ANGM-CSS の培養を行い、CRISPR direct (<http://crispr.dbcls.jp/>)などを用いて CpG アイランド A 内の目的領域に特異性の高いガイド RNA を複数設計し、CRISPR-Cas 法を用いた CpG アイランド A 領域の欠失実験を計画した。また統合失調症患者および健常ボランティアの末梢血から単核球を分離・培養し、センダイウイルスベクターを用いて人工多能性幹細胞誘導遺伝子(山中因子:Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)を導入することにより iPS 細胞を樹立し、さらに iPS 細胞を神経細胞へ分化させた。

4. 研究成果

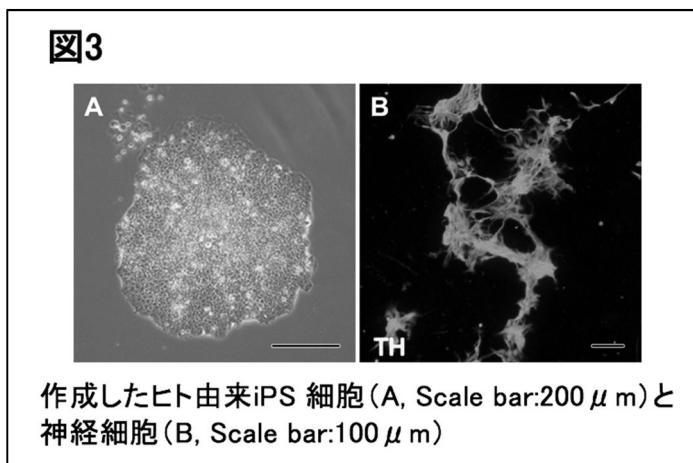
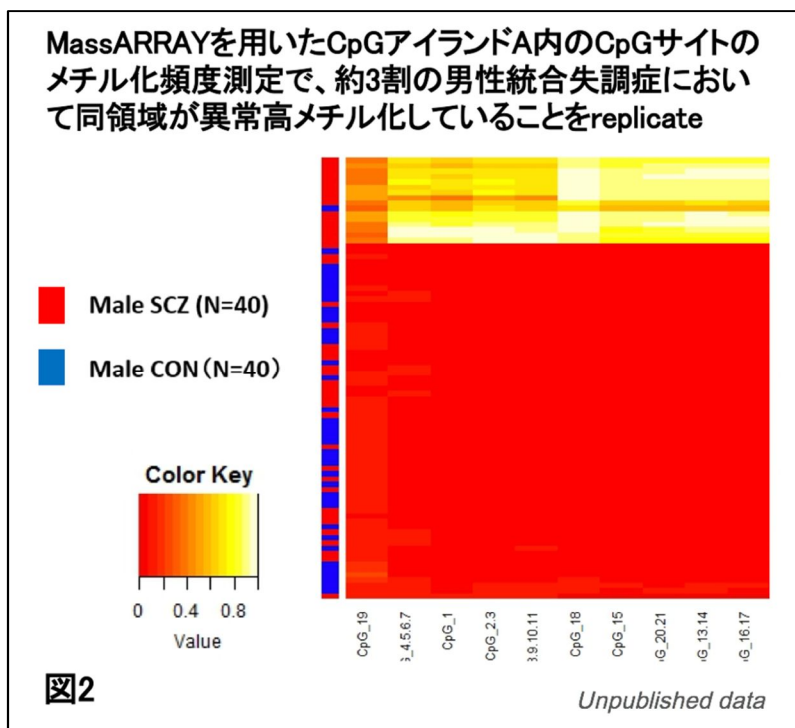
予備的研究と同様、約 3 割の男性統合失調症患者において、CpG アイランド A 内の CpG サイトが異常に高メチル化（通常の 10%前後に比して 90%前後）していた（図 2）。

現時点で各群約 30 名ずつの TAF1 mRNA 発現量を測定し、CpG アイランド A のメチル化状態との相関を解析したが、現時点では有意な相関は認めなかった。引き続きサンプル数を各群 50 ずつ程度まで増やして

さらなる解析を進める予定である。

ANGM-CSS における CRISPR-Cas 法を用いた同領域の DNA 配列の機能欠失を行い、細胞表現型にどのような影響があるかも検討中である。また今後のヒト由来 iPS 細胞を用いた機能解析に向けて、iPS 細胞 神経細胞へ分化させる培養系を確立し（図 3）これらについても CRISPR-Cas 法を用いた同領域の DNA 配列の機能欠失実験を進める予定である。

その他、本研究と関連して得られた統合失調症患者・健常者試料について、染色体末端テロメア構造や Y 染色体モザイク欠失についての解析を行った結果(Zhang et al, *J Psychiatr Res* 2018; Kimura et al, *PLoS One* 2018)や、Infinium HumanMethylation450 BeadChip による網羅的メチル化頻度データを用いて統合失調症患者と健常者のエピジェネティック老化指標を測定・比較した研究(Okazaki et al, *NPJ Schizophr* 2019)について、それぞれ期間内に英文雑誌において、本研究費の謝辞を記載した上で報告し、統合失調症の分子遺伝学的研究領域に新たな知見を加えることができた。



（Okazaki et al, *NPJ Schizophr* 2019)について、それぞれ期間内に英文雑誌において、本研究費の謝辞を記載した上で報告し、統合失調症の分子遺伝学的研究領域に新たな知見を加えることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Zhang Y, Hishimoto A, Otsuka I, Watanabe Y, Numata S, Yamamori H, Boku S, Horai T, Someya T, Ohmori T, Hashimoto R, Sora I. Longer telomeres in elderly schizophrenia are associated with long-term hospitalization in the Japanese population. *Journal of Psychiatric Research*. 2018;103:161-166. doi: 10.1016/j.jpsychires.2018.05.014.
2. Hirata T, Hishimoto A, Otsuka I, Okazaki S, Boku S, Kimura A, Horai T, Sora I. Investigation of chromosome Y loss in men with schizophrenia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2018;14:2115-2122. doi: 10.2147/NDT.S172886.
3. Okazaki S, Otsuka I, Numata S, Horai T, Mouri K, Boku S, Ohmori T, Sora I, Hishimoto A. Epigenetic clock analysis of blood samples from Japanese schizophrenia patients. *NPJ Schizophrenia*. 2019;5:4. doi: 10.1038/s41537-019-0072-1.

〔学会発表〕(計1件)

1. Takashi Hirata, Satoshi Okazaki, Ikuo Otsuka, Shuken Boku, Shinsuke Aoyama, Noriomi Eguhi, Atsushi Kimura, Tadasu Horai, Ichiro Sora, Akitoyo Hishimoto. Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood and its risk variants in men with schizophrenia. *WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry 2018 KOBE*

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

本研究に関連して得られた日本人統合失調症患者のテロメア動態の特徴を報告した研究が、海外の研究紹介サイト(下記)に取り上げられた。

<https://sciencetrends.com/telomere-length-and-hospital-stay-in-patients-with-schizophrenia/>

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。