

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008 年度
 課題番号：18790849
 研究課題名 (和文) 統合失調症におけるレトロポゾン Alu の病因的役割
 研究課題名 (英文) The role of retroposon Alu in the etiology of schizophrenia.

研究代表者
 赤羽 晃寿 (AKAHANE AKIHISA)
 帝京大学・医学部・助教
 研究者番号：30349253

研究成果の概要：

統合失調症の病因にレトロポゾン Alu が深く関与しているとの仮説に基づき、統合失調症トリオを対象に、Alu をタグとした新規変異スクリーニングを実施した結果、患者特異的な変異遺伝子が複数同定され、Alu をタグとした変異解析の有用性が示唆された。また、これらの患者特異的な遺伝子変異がトリオ共通でみられたことから、本遺伝子領域における Alu の動態は統合失調症の直接的な病因となっている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症、レトロポゾン Alu、トリオ解析、新規挿入、ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

精神疾患の分子遺伝学的研究は、メチル化などゲノムのエピジェネティックな変化（後成的変化）ないしゲノム不安定性に注目が集まるようになってきた。これまでに、統合失調症患者ゲノムにおいて、染色体脆弱性、ゲノム不安定性、メチル化認識部位におけるゲノム不一致例、レトロウィルス様反復配列の単離、さらにメチル化異常などが報告されている。

これらの多様な現象に深く関与しているものとして、本研究でとりあげるレトロポゾ

ン Alu があげられる。Alu は代表的なヒトレトロポゾンの一つであり、メチル化レベルの変動に伴ってゲノム各所への挿入を繰り返し、さらに欠失や組換えなどの二次的変異により、遺伝子の構造や発現に影響を及ぼし、数々のヒト疾患の直接的な病因となっている。よって、われわれは統合失調症の病因にレトロポゾン Alu が深く関与しているとの仮説を提唱し、本研究を立案した。

2. 研究の目的

統合失調症患者ゲノムにおいて、Alu 挿入

領域の網羅的スクリーニングを試み、患者特異的変異すなわち疾患関連変異領域の同定を行うとともに、患者ゲノムにおける Alu の病因的役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Alu 挿入近傍領域の増幅

統合失調症トリオゲノム DNA (患者とその両親) 8 組を対象に、Alu 配列の外側向きに作製した inverse-PCR 用プライマーを用いて、Alu 挿入近傍領域の PCR 増幅を行った。

(2) サザンハイブリダイゼーション法による Alu 新規変異スクリーニング

胎児脳 cDNA をテンプレートとし、統合失調症候補遺伝子の PCR 増幅を行った。得られた増幅産物をラベリングし、プローブとした。

(1) で得られた Alu 挿入近傍領域の増幅産物の電気泳動を行い、ナイロンメンブランへプロットし、各種遺伝子プローブとのサザンハイブリダイゼーションを行い、患者特異的バンドの検出を試みた。

(3) マイクロアレイ法による Alu 新規変異スクリーニング

(1) で得られた Alu 挿入近傍領域の増幅産物をプローブとし、マイクロアレイ法による変異スクリーニングを行った。トリオ 2 組について、2 色 1 比較法で 2 パターン (父親 vs 患者、母親 vs 患者) のアレイ解析を行い、患者特異的変動シグナルの検出を試みた。

(4) TaqMan 法による Alu 新規変異スクリーニング

(3) で患者特異的変動シグナルが検出された遺伝子について、その TaqMan プローブを設計し、TaqMan 法による変異スクリーニングを試みた。(1) で得られた 8 組の統合失調症トリオ由来の増幅産物をテンプレートとして、リアルタイム PCR を行い、比較 Ct 法による解析を行った。

(5) 患者特異的変異領域の構造解析

各スクリーニングで同定された変異遺伝子について、詳細な構造解析を行った。解析には、DNA Walking 法または Nested PCR 法を用い、Alu によって引き起こされる複雑な二次的変異の検出も試みた。

4. 研究成果

本研究では、レトロポゾン Alu をタグとした独創性の高い 3 種類のスクリーニング法により、患者特異的変異を同定した。Alu と統合失調症との病因的関連についての研究は未だなく、様々な新知見を得るに至った。

(1) サザンハイブリダイゼーション法によ

る患者特異的変異の同定

Alu PCR-サザンハイブリダイゼーション法による新規変異スクリーニングを実施した結果、微弱なシグナルとして患者特異的バンドが得られ、患者ゲノム内において、Alu 挿入による変異が近傍で起きていると思われる遺伝子 A を選抜した。選抜された遺伝子 A の配列を元に、プライマーを作成し、DNA Walking PCR 法を行い、新規変異であることの確認を行った。

本結果は、遺伝子領域に分布する傾向にある Alu の特性を裏付けるものであり、遺伝子変異スクリーニングのツールとしての Alu の有用性が示唆された。

(2) マイクロアレイ法による患者特異的変異の同定

Alu 新規変異の網羅的スクリーニング法を目指し、Alu PCR-マイクロアレイ法による解析を、2 組の統合失調症トリオについて実施した。その結果、両親の 2 倍以上のシグナル強度を示した患者特異的な変動が、トリオ A では 28 遺伝子、トリオ B では 16 遺伝子で確認された。さらに、トリオ間で比較したところ、11 のトリオ共通な患者特異的変動遺伝子が確認され、うち 2 遺伝子は神経変性に深く関与する小胞体ストレス関連遺伝子であった。これらの変動遺伝子について、DNA Walking PCR 法による変異解析を行い、新規変異であることが確認された。

新規変異遺伝子がトリオ共通で確認されたことから、これらの遺伝子は患者ゲノムにおける変異のホットスポットであり、本遺伝子領域における Alu の動態が、統合失調症の直接的な病因となっている可能性が示唆された。

(3) TaqMan 法による患者特異的変異の同定

(2) で新規変異が確認された小胞体ストレス関連遺伝子の TaqMan プローブを設計し、Alu PCR-TaqMan 法による変異解析を、8 組の統合失調症トリオについて実施した。その結果、小胞体ストレス関連遺伝子について、患者特異的な変動が 5 組のトリオで確認された。

以上のことから、小胞体ストレス関連遺伝子における患者特異的 Alu の動態と、統合失調症との関連が推察された。

(4) Alu 変異解析の課題点と今後の展望

本研究で実施したスクリーニング法によって、患者特異的な変異遺伝子が同定され、Alu をタグとした変異解析が、統合失調症研究において有用であることが示唆された。

また、本研究では各新規変異の再確認と詳細な構造解析法として DNA Walking 法および Nested PCR 法を用いたが、これらの解析方法

では増幅領域内に Alu が高頻度で含まれるため、Alu を介した PCR artifact も出現し、解析効率を著しく低下させた。

今後、分子細胞遺伝学的手法などによる、PCR に頼らない構造解析法の開発が期待される。

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 2 件)

上野美華子, 赤羽晃寿, 田中裕志, 関裕子, 南光進一郎. 領域特異的 Alu 多型と統合失調症との関連研究. 精神薬療研究年報, 無, 38 号, pp109-114, 2006.

上野美華子, 赤羽晃寿, 秦孝憲, 斎藤裕子, 南光進一郎. 領域特異的 Alu 挿入におけるメチル化と統合失調症との関連研究. 無, 精神薬療研究年報, 39 号, pp72-76, 2007 年

[学会発表] (計 16 件)

Nanko S., Ueno M., Akahane A. Genetic association analyses of region-specific AluYa5 and AluYb8 polymorphisms in schizophrenia. World Psychiatric Association International Congress, 2006. 7, Istanbul, Turkey.

Ueno M., Akahane A., Hata T., Matsumura K., Seki H., Nanko S. Screenings of patient-specific Alu insertion sites of genes associated with schizophrenia. World Congress on Psychiatric Genetics XIV, 2006. 4, Cagliari, Italy.

上野美華子, 赤羽晃寿, 秦孝憲, 関裕子, 南光進一郎. 双極性障害におけるレトロポゾン Alu 挿入のメチル化状態について. 第 28 回日本生物学的精神医学会, 2006. 9, 名古屋.

南光進一郎, 赤羽晃寿, 秦孝憲, 関裕子, 上野美華子. レトロポゾンを用いた統合失調症原因遺伝子の同定. 第 28 回日本生物学的精神医学会, 2006. 9, 名古屋.

上野美華子, 赤羽晃寿, 秦孝憲, 関裕子, 南光進一郎. 統合失調症および双極性障害におけるレトロポゾン Alu の挿入多型とメチル化状態について. 第 51 回日本人類遺伝学会, 2006. 10, 米子.

南光進一郎, 赤羽晃寿, 秦孝憲, 関裕子, 上野美華子. 転移因子を用いた統合失調症原因遺伝子の同定. 第 52

回日本人類遺伝学会, 2006. 10, 米子.

上野美華子, 赤羽晃寿, 秦孝憲, 斎藤裕子, 南光進一郎. 一卵性双生児統合失調症不一致例におけるレトロポゾン Alu の患者特異的挿入について. 第 14 回日本精神・行動遺伝学会, 2006. 11, つくば.

Nanko S., Akahane A., Hata T., Saito H., Ueno M. The patient-specific mutations on the gene or flanking gene in monozygotic twins discordant for schizophrenia induced by retroposon Alu. 2nd International Congress of Biological Psychiatry, 2007. 4, Santiago de Chile.

Ueno M., Akahane A., Hata T., Nanko S. Identification of mutated genes induced by retroposon Alu in schizophrenia trios using microarray. XVth World Congress of Psychiatric Genetics, 2007. 10, New York.

上野美華子, 赤羽晃寿, 秦孝憲, 南光進一郎. マイクロアレイ法を用いた統合失調症トリオにおけるレトロポゾン Alu 新規挿入による変異遺伝子の同定. 第 29 回日本生物学的精神遺伝学会, 2007. 7, 札幌.

上野美華子, 赤羽晃寿, 秦孝憲, 南光進一郎. 統合失調症トリオにおけるマイクロアレイ法を用いた患者特異的変異遺伝子の同定. 第 15 回日本精神・行動遺伝学会, 2007. 11, 東京.

Nanko S., Akahane A., Hata T., Ueno M. De novo mutation of tumor suppressor gene in a patient with schizophrenia. The XXVI CINP (Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum), 2008. 7, Munich.

Nanko S., Akahane A., Hata T., Ueno M. Identification of spermatogenesis-related genes in a patient with schizophrenia. The XIV World Congress of Psychiatry, 2008. 9, Prague.

上野美華子, 赤羽晃寿, 秦孝憲, 南光進一郎. マイクロアレイ法により同定された統合失調症における TRIM 遺伝子の新規変異. 日本人類遺伝学会第 53 回大会, 2008. 9, 横浜.

Ueno M., Akahane A., Hata T., Nanko S. De novo mutations of endoplasmic reticulum stress-related genes in schizophrenia. The XVIth World Congress for Psychiatric

Genetics, 2008.10, 大阪.

Ueno M., Akahane A., Hata T., Nanko S. De novo mutations of transposable element derived gene in schizophrenia. The XVIth World Congress for Psychiatric Genetics, 2008.10, 大阪.

〔図書〕(計1件)

上野美華子, 赤羽晃寿, 南光進一郎. 精神科領域の用語解説レトロポゾン. 分子精神医学, 6巻2号, pp57-59, 最新医学社, 2006.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤羽 晃寿 (AKAHANE AKIHISA)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：30349253

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：