

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700385

研究課題名(和文) 統合失調症患者特異的抗原から探る異常スプライシング

研究課題名(英文) Search for an aberrant splicing associated with schizophrenia specific antigen

研究代表者

眞部 孝幸 (MANABE TAKAYUKI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師

研究者番号：90382283

研究成果の概要(和文)：

本研究課題は、統合失調症患者由来リンパ芽球様細胞株を用いて、正常人サンプルとの抗体作成様式の違いを比較検討することを目的としている。その方法として、抗体産生細胞Bリンパ球のイムノグロブリン軽鎖遺伝子のゲノムの組み換え様式を比較することを提案した。本研究課題により、統合失調症ではB細胞の割合が正常人に比べ少ないこと、J1-3, J7の選択率が正常人サンプルと異なることなどが解った。

研究成果の概要(英文)：

This research topic has aimed the comparative study of the difference of the production style of antibodies between the normal and the schizophrenia patients using the lymphoblastoid cell lines obtained from both groups. By this research topic, it has been demonstrated that the selectivity of J1-3 and J7 are different from the normal control in schizophrenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学

キーワード：統合失調症；リンパ芽球；スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年の脳研究がめざましい進歩を遂げているにも関わらず、統合失調症研究は未だ萌芽状態にあると言わざるを得ない。1%という高い有病率や、10%にもおよぶ自殺率等、多岐に渡る精神症状が社会に及ぼす深刻な影響に鑑みれば当疾患発症機構の解

明と有効な根本的治療法開発は焦眉の急といえる。

一方、ヒトの遺伝子は高々2万2千個であるが、発達段階・組織特異的に選択的スプライシングを行うことにより10万種類以上の分子が機能している。この選択的スプライシングの破綻は、発達段階はもちろんの

こと多くの疾患病態に関与していることが想定され、実際多くの脳疾患患者において、種々の遺伝子のスプライシング異常が報告されている。例えば本研究代表者は、孤発性アルツハイマー病においてその原因遺伝子プレセニリン2の異常スプライシングを発見し、そのメカニズム解明を世界に先立って報告してきた。また近年、この因子のスプライシング異常が、統合失調症患者前頭前野において報告されたことは非常に興味深い。

統合失調症の発症メカニズムは、その症状の多様性から、多くの可能性が示唆されているにも関わらず、未だ明瞭な答えは見出されていない。そんな中でも当疾患の主要な研究として、遺伝研究は勿論のこと、神経伝達物質、シナプス、オリゴデンドロサイト、環境要因、疫学的調査などが挙げられる。一方当疾患における異常スプライシングが比較的報告されつつあるにも関わらず、スプライシング異常に積極的に焦点を当てた研究はほとんどされておらず、ある特定の遺伝子のみを選択的スプライシング研究はなされているものの、グローバルな異常スプライシング解析に関してはほとんど研究されていない。

一方近年、統合失調症において、多くの蛋白質や血小板などに対して、自己免疫、自己抗体の関与が示唆されている。これらは、統合失調症患者末梢血中の免疫系に何らかの変化を来している可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究課題では、統合失調症患者のリンパ芽球細胞株を用いて、軽鎖可変部位の再構築パターンの違いをグローバルに解析する。統合失調症群特異的な軽鎖可変領域をもつク

ローンを用いて、抗体作成および抗原の特定を目指す。また異常因子群を特定し、それら因子群のスプライシング異常をスクリーニングし、さらにはそのメカニズム解明を大きな目的とする。

3. 研究の方法

統合失調症患者の末梢血液から樹立したリンパ芽球様細胞株Bリンパ球を単離培養し、各クローンの軽鎖可変部位のシーケンスを、PCRにより一斉に解析し、コントロールと比較する。これは、一個のBリンパ球は一個の抗原という原則に基づいている。軽鎖可変領域を用いるのは、重鎖が少なくとも9千通り以上のバリエーションをもち、その解析は到底不可能であるのに対して、軽鎖のそれは百数十種類と比較的少なく、実現可能であることによる。

4. 研究成果

まず初めに、我々の用いた患者リンパ芽球様細胞株の特徴を詳細に解析した。その結果、末梢リンパ血中の成分比率とは異なり、目的のBリンパ球様細胞の割合が非常に少なく、10%を割っていることが明らかとなった。従って、患者リンパ芽球様細胞株そのままをクローン化したのでは、非常に効率の悪い結果を招く恐れがあったため、Bリンパ球に対する特異的抗体である抗CD20抗体を吸着させたマグネティックビーズを用いて粗精製を行いその吸着画分中の細胞について、それぞれクローン化を行った。各クローンからゲノムDNAおよび、蛋白質抽出液を調整した。蛋白質抽出液について、B細胞マーカーCD20でウェスタンブロットを行うと、精製前に比べて効率よくB細胞クローンが得られた。

次に軽鎖ラムダ鎖のJ1, J2, J3, J7について、ゲノムの組み換えが起った時のみそれぞ

れを特異的にアンプリファイできるプライマーを設定し、それぞれのクローンのゲノムDNAをテンプレートに、PCRを行い、アガロースゲル電気泳動を行った。この時、各サンプルはJ1-3, 7のいずれかのプライマーでのみ増幅され、バンドが検出されないものは他のリンパ球成分（あるいは一部は血球成分）、二個以上のプライマーで増幅されるものはコンタミネーションであることを想定している。スクリーニングの結果、まず、統合失調症ではB細胞の割合が正常人に比べ少ない可能性が示唆された。次にJ1-3, 7のそれぞれが組み換えに選択される割合を検討した結果、正常人では若干のばらつきはあるもののほぼ均等に選択されていたのに対して、統合失調症患者では、J1, 2が正常人よりも少なくJ3, 7が多いことが明らかとなった。これらの結果は、B細胞数の違いを換算しても同様であった。

統合失調症患者において、B細胞自体の減少や、J領域の割合の変化は当疾患と免疫系の異常の関連を示唆するものである。現在は、変化のあったクローンを培養し、形質細胞への分化を促し、抗体を産生させることによって、統合失調症特異的な抗原の特定を試みている。また、疾患コントロールとの比較も検討しており、末梢リンパ血を用いた新しい当疾患のバイオマーカーとしての応用も目指している。

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 Iwata K., Matsuzaki H., Manabe T. and Mori N. (2011). Altering the expression balance of hnRNP C1 and C2 changes the expression of myelination-related genes.

Psychiat. Res., 査読有. *in press*.

② Morikawa T. and Manabe T. (2010). Aberrant regulation of alternative splicing in Schizophrenia. *Neurochem. Int.*, 査読有. 57, 691-704.

③ Iwata K., Matsuzaki H., Takei N., Manabe T. and Mori N. (2010). Animal models of autism: an epigenetic and environmental viewpoint. *Journal of Central Nervous System Disease*, 査読有. 2, 37-44.

④ Morikawa T., Manabe T., Ito Y., Yamada S., Yoshimi A., Nagai T., Ozaki N. and Mayeda A. (2010). The expression of HMGAla is increased in lymphoblastoid cell lines from Schizophrenia patients. *Neurochem. Int.*, 査読有. 56, 736-739.

⑤ Manabe T. and Wanaka A. (2010). Regulation and/or Repression of Cholinergic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells using RNAi Against Transcription Factor L3/Lhx8. *Methods Mol. Biol.* 査読無. 650, 101-109.

⑥ Tatsumi K., Okuda H., Makinodan M., Yamauchi T., Makinodan E., Matsuyoshi H., Manabe T. and Wanaka A. (2010). Transient activation of Notch signaling in the injured adult brain. *J. Chem. Neuroanat.*, 査読有. 39, 15-19.

⑦ Manabe T., Katayama T., Tohyama M. (2009). The HMGAla recognition candidate DNA sequences in human. *PLoS One*, 査読有. 4, e8004.

⑧ Mayeda A., Manabe T. and Ohe K. (2009). Oncogenic HMGAla protein causes Sporadic Alzheimer's disease-associated aberrant splicing: The molecular mechanism reveals a link with U1 snRNP-mediated gene repression system. *Protein, Nucleic Acid, Enzyme.*, 査読無. 54, 2245-50.

[学会発表] (計5件)

① 眞部孝幸、森川智美、山下祐子、前田明. 統合失調症患者で転写・スプライシング調節因子であるHMG A 1 aが上昇している意義. 第33回日本分子生物学会. 2010年12月8日. 神戸

②眞部孝幸、前田明. 統合失調症患者における hnRNP A1 による異常スプライシング. 第 32 回分子生物学会. 2009 年 12 月 10 日. 横浜.

③ 眞部孝幸、前田明. 統合失調症と異常スプライシング. 第 69 回日本解剖学会中部支部大会. 2009 年 10 月 10 日. 浜松.

④榎本秀樹、西山千尋、眞部孝幸、Heather Young、Don Newgreen. 腸管神経堤細胞の移動様式. 第 32 回日本神経科学大会. 2009 年 9 月 18 日. 名古屋.

⑤眞部孝幸、前田明. 統合失調症の異常スプライシングにグローバルなスプライシング抑制因子である hnRNP A1 が関与している可能性を探る. 第 11 回日本 RNA 学会. 2009 年 7 月 28 日. 新潟.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞部 孝幸 (MANABE TAKAYUKI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師
研究者番号：90382283