

機関番号：82609

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791159

研究課題名 (和文) 統合失調症におけるミトコンドリアゲノム変異と病態関連遺伝子の探索

研究課題名 (英文) Genetic analysis of mtDNA in schizophrenia patients.

研究代表者

市川 智恵 (ICHIKAWA TOMOE)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員

研究者番号：60383288

研究成果の概要 (和文)：統合失調症患者剖検脳、患者および健常者末梢血由来の mtDNA における多型および変異の探索を行った。呼吸鎖複合体 IV および V のサブユニット遺伝子を含む mtDNA 領域の塩基配列を決定し、新規 variant および、統合失調症に特徴的なアミノ酸置換を伴う variant を本症のリスク variant として提案した。さらに mtDNA リスク variant の母性遺伝例を見出した。

研究成果の概要 (英文)：We searched mtDNA to detect distinctive variants using schizophrenic postmortem brains and peripheral blood samples. I found novel variants containing 2 heteroplasmic variants and disease specific non-synonymous variations which might contribute to pathophysiology of schizophrenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ミトコンドリア、統合失調症、神経科学、脳・神経、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、妄想や幻聴などを主症状とする代表的な精神疾患である。人口のおよそ 100 人に 1 人が発症することから、現在では糖尿病などと同様にありふれた疾患 (common disease) として注目されている。統合失調症は慢性に経過するため、長期にわたり生活能力に障害を来す社会的リスクの高い疾患であるにもかかわらず、その原因については不明な点が多い。そのため、病原因子の解明と、発症機構に基づいた創薬・治療法開発が求められている。双生児および養子研

究などから、原因に遺伝要因が関与することが強く指摘されているため、原因遺伝子の解明が重要視され、連鎖研究や患者対照研究などゲノム解析が進められているが、報告によって結果の不一致が多く、いまだ確定的な結果は得られていない。

近年では、核ゲノム上の遺伝子だけではなく、mtDNA における遺伝子変異も着目されている。統合失調症の病態にミトコンドリアの異常が関与する可能性を示す根拠として、ミトコンドリア病である MELAS 患者で統合失調症様症状を呈した症例が報告されたこと、

死後脳研究でミトコンドリア機能にかかわる分子の発現異常が報告されたこと、一部の家系で母性遺伝の報告があることなどが挙げられる。さらに近年、数学モデルを用いた統合失調症のゲノム解析により、核遺伝子は modifier gene が多く、mtDNA上に major gene が存在する可能性が示唆されている。

以上から、統合失調症の一部にミトコンドリア遺伝子の異常が関与すると考えられた。核ゲノムと異なり、mtDNA は母性遺伝により子孫へ伝達される。mtDNA 上に統合失調症と関連する比較的大きな効果の遺伝子変異・多型が存在し核ゲノム上の小さい効果の変異・多型が前者の効果修飾すると仮定すると、高い遺伝率にもかかわらずメンデル型の遺伝様式を示さない本症の特徴に合致する。そこで、患者死後脳および末梢血由来の mtDNA の変異・多型や、その蓄積割合を調べることで、先行研究で不明だった mtDNA の統合失調症への関与を明らかにできると考えた。また、mtDNA のリスク variant と、これまでに報告されている核ゲノム上の脆弱性遺伝子の発現量や多型・変異とを複合的に解析することで、統合失調症の病態に関連した遺伝子変異を同定することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、統合失調症の病態形成に

mtDNA の変異・多型が関与する、または、核ゲノム上の脆弱性遺伝子発現量や遺伝子多型等と関連する変異 mtDNA が存在することを作業仮説とする。mtDNA 変異と統合失調症との病態との関連については未だ明らかになっていないことから、統合失調症患者に特徴的な mtDNA 変異・多型の同定、ならびに mtDNA の多型・変異から予測されるミトコンドリア機能異常が統合失調症の病態と関与するかを明らかにするため、統合失調症患者および対照群由来の mtDNA を用いて遺伝子変異・多型の同定を行う。

3. 研究の方法

本研究では、統合失調症患者で活性低下が報告されている呼吸鎖複合体 IV ならびに ATP 合成酵素である複合体 V のサブユニットについて mtDNA の変異・多型の解析を行った。解析対象は統合失調症患者剖検脳 28 例、患者末梢血 114 例、健常者末梢血 117 例を使用した(表 1)。

統合失調症患者剖検脳の解析には、これまでに統合失調症病態への関与が指摘されている前頭葉部位を使用した。剖検脳を固定後凍結切片を作製し、トルイジンブルー 0 で染色した。レーザーマイクロダイセクション法により、神経細胞を多く含む灰白質部分を選択的に回収し、剖検脳サンプルとした。

表 1 解析に使用した統合失調症患者および健常者検体の情報

		剖検脳		末梢血	
		統合失調症		健常者	統合失調症
症例数	総数	28 人		117 人	114 人
性別	男性	20 人		56 人	55 人
	女性	8 人		61 人	59 人
年齢	平均値	63.1±11.7 歳		47.2 ±9.1 歳	48.4 ±12.3 歳
	範囲	39-93 歳		24-65 歳	23-76 歳
発症年齢	平均値	不明		-	25.6 ±8.1 歳
	範囲	不明		-	11-55 歳

切り出したサンプルを proteinase K 処理後、2 段階 PCR により mtDNA の解析範囲を増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。解析範囲は mtDNA の 5721 から 9990 までのおよそ 4.3 kb で、解析した配列は mtDNA の基準配列 (NC_012920) と比較し、塩基置換を同定したのち、主要な MITOMAP (<http://www.mitomap.org/>)、mtDB (<http://www.mtodb.igp.uu.se/>)、mtSNP データベース (<http://mtsnp.tmig.or.jp/mtsnp/index.shtml>) の 3 種のデータベースと照合し、mtDNA の多型・変異を同定した。剖検脳検体は切り出す位置を変えて、1 症例から少なくとも 2 サンプルを調整し、

duplicate で解析を行った。

末梢血 total DNA は男女割合、年齢を揃えた健常者群と患者群から調整した。mtDNA 配列について剖検脳と同様に変異・多型の解析を行った。

Heteroplasmic な variant の解析には、アレル特異的な primer を用いた PCR を行い、野生型あるいは変異型に選択的に PCR 産物が増幅されるように PCR 条件を設定して PCR 産物の有無を検出するとともに、シーケンスのスペクトグラムから、おおよその変異割合を算出した。

4. 研究成果

統合失調症患者剖検脳および末梢血から得られた mtDNA について変異・多型の解析を行い、患者のみから検出された新規の variant を 16 ヶ所同定した。そのうち、11 ヶ所は末梢血から、5 ヶ所は剖検脳から同定

された。剖検脳から得られた新規 variant には、1 症例から 2 ヶ所の heteroplasmic な variant が検出された例も含まれていた(表 2)。

表 2 統合失調症患者のみに同定されたアミノ酸置換をともなう新規 variant

位置	Variant	塩基置換	アミノ酸置換	Sample ID	
				末梢血 統合失調症	剖検脳 統合失調症
NC5	Nv-1	C>A	non-coding	BL-S19	-
C01	Nv-2	C>T	syn	BL-S15	-
C01	Nv-3	C>T	syn	-	BR-S8FC (Heteroplasmic)
C01	Nv-4	A>G	syn	BL-S7	-
C01	Nv-5	C>T	syn	BL-S8	-
C01	Nv-6	C>T	syn	BL-S1	-
C02	Nv-7	G>A	Val > Ile	BL-S22	-
ATP6	Nv-8	C>T	syn	BL-S9	-
ATP6	Nv-9	C>G	Thr > Ser	BL-S11	-
ATP6	Nv-10	C>T	syn	-	BR-S5FC
ATP6	Nv-11	T>C	Ser > Pro	-	BR-S4FC
C03	Nv-12	G>A	syn	BL-S3	-
C03	Nv-13	C>T	syn	-	BR-S8FC (Heteroplasmic)
C03	Nv-14	A>G	syn	BL-S10	-
C03	Nv-15	A>G	Ile > Val	-	BR-S1FC
C03	Nv-16	T>C	syn	BL-S12	-

一方で、アミノ酸置換を伴う多型・変異はミトコンドリア機能を損なう機能変化を伴う可能性が高いことから、患者群でのみ検出された variant のうち、アミノ酸置換を伴うものをリストアップした(表 3)。その結果、21 ヶ所の variant が患者群から同定された。これら variant には複数の患者検体から見出されている variant も含まれていたが、それらはすべて統合失調症以外の日本人からすでに報告のある variant であった。そこで、mtSNP データベースと照合し、これら 21 ヶ所の中から、これまでに本症以外の日本人で報告のない variant のみを選択した結果、11 ヶ所が統合失調症患者のみから報告されたことが示された。

また、これらのアミノ酸置換がタンパク質の構造や機能にダメージを与える可能性について、PolyPhen ツールで予測した結果、V-13 および V-14 の 2 ヶ所がダメージを生じるアミノ酸置換であることが推測された。V-13 はすでに日本人で報告のある variant であったが、V-14 は統合失調症選択的であり、本症のリスク variant となり得ると考えられた。さらに、variant V-7 はデータベースの日本人からは報告されていないが、近年、統合失調症患者で同定された variant であり、本研究からも同じ variant が検出され

たことから、V-7 の塩基置換およびアミノ酸置換が統合失調症の病態にかかわる可能性が示唆された。さらに V-7 を保有する症例 BL-S16 では V-7 と同じ遺伝子内にアミノ酸置換を伴う heteroplasmic な変異がおよそ 50%の割合で存在したことから、これらが相乗的に作用して統合失調症の病態に関与した可能性を考えた。そこで、症例 BL-S16 の子供二人について、V-7 および heteroplasmic variant の存在を解析した結果、母性遺伝による mtDNA の伝播を示した。BL-S16 の子供である BL-S16-B は統合失調症を発症しており、V-7 の homoplasmic な変異とともに、heteroplasmic variant の割合が高いことが示された。一方、もう一人の子供で精神疾患を示さない BL-S16-S においても V-7 変異と 50%弱の heteroplasmic variant が存在した。BL-S16 は発症年齢が特に遅いのが特徴的で、BL-S16-B の発症は母親に比べて早かった。この知見は Heteroplasmic variant の割合と発症年齢に関連がある可能性を示唆する結果であり、母親と同程度の heteroplasmic variant の割合を有する BL-S16-S においてはまだこれから発症する可能性を視野に入れる必要があると考えられた。

表 3 統合失調症患者のみから検出されたアミノ酸置換のある variant

位置	Variant	塩基置換	アミノ酸置換	Sample ID:		mtSNP データベースにおける日本人の報告例
				末梢血統合失調症	剖検脳統合失調症	
C01	V-1	G>A	Asp > Asn	BL-S20	-	0
C01	V-2	G>A	Val > Ile	BL-S5	-	0
C01	V-3	T>C	Val > Ala	-	BR-S2FC (Heteroplasmic), BR-S3FC	6
C01	V-4	T>C	Tyr > His	BL-S10	-	2
C02	V-5	G>A	Ala > Thr	BL-S23, BL-S24	BR-S1FC	1
C02	Nv-7	G>A	Val > Ile	BL-S22	-	Novel variant
C02	V-6	G>A	Asp > Asn	BL-S2	-	2
C02	V-7	G>A	Ala > Thr	BL-S16	-	0
ATP6	V-8	A>G	Ile > Val	BL-S13	-	3
ATP6	V-9	T>C	Leu > Pro	BL-S6	-	0
ATP6	V-10	T>C	Ile > Thr	-	BR-S2FC, BR-S3FC	1
ATP6	Nv-9	C>G	Thr > Ser	BL-S11	-	Novel variant
ATP6	Nv-11	T>C	Ser > Pro	-	BR-S4FC	Novel variant
ATP6	V-11	A>G	Thr > Ala	BL-S18, BL-S21	-	1
ATP6	V-12	C>A	Ile > Met	BL-S23, BL-S24	BR-S1FC	1
ATP6	V-13	T>C	Ile > Thr	BL-S4	-	3
ATP6	V-14	T>C	Ile > Thr	BL-S14	-	0
C03	V-15	C>T	Thr > Met	BL-S17	-	0
C03	Nv-15	A>G	Ile > Val	-	BR-S1FC	Novel variant
C03	V-16	T>C	Phe > Leu	BL-S23, BL-S24	BR-S1FC	2
C03	V-16	G>A	Val > Met	-	BR-S6FC	0

以上、本研究の結果、統合失調症患者のみから同定された variant として、新規の 16ヶ所ならびにアミノ酸置換を伴う 11ヶ所の variant を疾患選択的な variant として提案した。この中にはタンパク質の構造や機能にダメージが予測されるアミノ酸置換や、これまでに統合失調症のリスク variant として報告されている変異箇所も含まれていた。一方で複数の mtDNA variant が関与した複合的な variation が本症の病態に関与する可能性も示し、ミトコンドリア機能異常と本症の病態との関連を強く示唆する結果であった。これらの結果は、統合失調症の異種性の一つとしてミトコンドリアの関与する統合失調症の存在を示唆しており、今後の統合失調症の診断への応用という観点からも有益な情報が得られた。

5. 主な発表論文等 〔学会発表〕(計 2 件)

①市川智恵, 新井誠, 宮下光弘, 野原泉, 小幡菜々子, 新井麻友美, 田中陽子, 大島

健一, 新里和弘, 岡崎祐士, 土井永史, 糸川昌成
統合失調症患者剖検脳および末梢血におけるミトコンドリア DNA の遺伝子解析
第 32 回日本生物学的精神医学会
平成 22 年 10 月 8 日、北九州

②市川智恵, 新井誠, 野原泉, 小幡菜々子, 新井麻友美, 田中陽子, 新里和弘, 岡崎祐士, 土井永史, 糸川昌成
統合失調症患者におけるミトコンドリア DNA の遺伝子解析
第 5 回日本統合失調症学会
平成 22 年 3 月 26 日、福岡

6. 研究組織 2

(1) 研究代表者

市川 智恵 (ICHIKAWA TOMOE)
財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員
研究者番号: 60383288