

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659214

研究課題名（和文） 精神疾患患者死後脳におけるレトロトランスポゾン転移活性の検討

研究課題名（英文） Analysis of L1 retrotransposition activity in the brains of patients with psychiatric disorders.

研究代表者

岩本 和也 (IWAMOTO KAZUYA)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：40342753

研究成果の概要（和文）：

ヒトゲノム中に存在するレトロトランスポゾンは、脳神経系の発達過程において活性化され、特に神経前駆細胞で転移を起こすことが示されている。転移活性の変動は、脳神経系の機能に重大な影響を与えると考えられるが、精神疾患患者試料での検討はなされていない。本研究では、統合失調症前頭葉でのトランスポゾンコピー数上昇を明らかにし、患者における神経前駆細胞の機能障害が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We measured LINE-1 copy number in brains of patients with psychiatric disorders by Taqman-based PCR. We identified significant increase of LINE-1 copy number in brains of patients with schizophrenia in two different cohorts. This finding is well concordant with neurodevelopmental model of schizophrenia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：精神神経科学・精神神経科学

キーワード：死後脳、神経細胞、トランスポゾン、統合失調症、精神疾患

1. 研究開始当初の背景

転移因子トランスポゾンと関連する配列は、ヒトゲノムの約 50% 近くを占めている。多くは既に転移活性を失っているが、レトロトランスポゾンと呼ばれる RNA タイプのトランスポゾンの特定の一群が転移活性を保持していることが知られている。現在も約 100 人に 1 回程度の頻度で新しい転移がヒトゲノムに生じていると推測されている。通常、トランスポゾンは発生段階の限られた時期と組

織でしか発現せず、その活性は厳密に抑制されていると考えられていた。しかし、近年 LINE-1 を始めとするレトロトランスポゾンは、脳神経系の発達過程において活性化されることが明らかにされた。また、多様な脳神経系細胞の中でも特に神経細胞で転移を起こすことが示されている。転移の頻度変化や転移位置による影響など、転移活性の変動は、脳神経系の高次機能に重大な影響を与えると考えられるが、その詳細は不明である。

統合失調症を始めとする主要な精神疾患では、ゲノムワイド関連研究や連鎖解析、変異探索など、これまで多くのゲノム研究が行われてきたが、これらの研究は血液や唾液など末梢試料から抽出したゲノム DNA が用いられてきた。しかし、トランスポゾンの転移活性の変動は患者由来の脳組織から抽出したゲノム DNA でなければ評価することができないと考えられる。そこで本研究計画では、脳組織から抽出したゲノム DNA を用い、転移因子の活性を評価する研究を探索的に行った。

2. 研究の目的

本研究では、レトロトランスポゾンの中でも LINE-1 に焦点をあて、患者死後脳における転移活性をゲノム中のコピー数定量を行うことにより評価する。

3. 研究の方法

アメリカスタンレー財団より提供された精神疾患患者死後脳および肝臓試料から抽出したゲノム DNA を用いたリアルタイム PCR 法により、LINE-1 コピー数の推定・比較を行う。

本研究は主にヒト検体を用いた研究であり、提供者及びその関係者の人権及び利益の保護について十分配慮する必要がある。また脳サンプルはアメリカ合衆国スタンレー財団脳バンクより入手したものを用いるが、提供者及びその関係者の人権や利益の保護について十分配慮されたものである。また、文部科学省、経済産業省合同により告示された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し倫理委員会の承認を得て実験を行っている。

4. 研究成果

最初の予備的検討として、統合失調症、気分障害（双極性障害患者、大うつ病患者）及び健常者凍結死後脳組織（前頭葉部位各 15 例）から抽出したゲノム DNA を用いて、LINE-1 配列のゲノムコピー数定量を、Taqman によるリアルタイム PCR 法により行った。Taqman probe の設計は既報(Coufal et al, Nature 2009)に従った。脳組織と肝臓組織とコピー数を比較したところ、統合失調症患者において脳組織での有意な LINE-1 ゲノムコピー数の上昇を認めた。気分障害では、大うつ病患者で増加の傾向が認められ、双極性障害では有意差は認められなかった。また、疾患群の中でも、特に高いレベルでゲノムコピー数の増大を検出している患者（統合失調症患者 2 名および大うつ病患者 1 名）を同定した。

次に、統合失調症での LINE-1 コピー数上

昇を検証するため、合計 70 例の患者・健常者死後脳試料を入手しコピー数の検討を行った。他のグループの既報から神経細胞での転移上昇が特に想定されるため、神経細胞核マーカー NeuN を用いたセルソーティング法により、凍結死後脳組織から神経細胞核と非神経細胞核の単離を行い、神経細胞における LINE-1 ゲノムコピー数の検討を行った。非神経細胞でのコピー数との割合で比較すると、統合失調症患者死後脳神経細胞でのコピー数上昇が確認された。

また、コピー数上昇の所見をさらに詳細に明らかにするため、LINE-1 上の複数の異なる遺伝子領域で設計した Taqman probe や異なる internal control を用いた定量法による検討を行い、やはり統合失調症患者でのコピー数上昇を確認した。

次に患者群における投薬効果を検討するため、ヒト神経系細胞株 SK-N-SH に抗精神病薬を添加し 1 週間の培養を行い LINE-1 コピー数の検討を行った。代表的な抗精神病薬であるハロペリドールやリスペリドン投与ではそれぞれ低用量と高用量の濃度 2 点での実験を行ったが、LINE-1 コピー数の変動は認められなかった。

本研究により統合失調症患者死後脳における LINE-1 コピー数の増大が確認された。神経前駆細胞において LINE-1 の転移活性が認められることから、統合失調症における神経発達障害仮説とよく合致する所見であると考えられる。これまでの研究結果をとりまとめた論文を投稿中である。

今後、ゲノム上の LINE-1 挿入位置に着目した研究が必要となると考えられる。本研究課題の範囲ではないが、脳神経系ゲノム上の挿入位置決定の予備的検討として、肝臓ゲノムと脳から抽出したゲノム DNA の全ゲノム配列解析を行い、トランスポゾンの検出と挿入パターンの比較を行った。現在のところ統合失調症患者群での特徴的な LINE-1 の挿入が検出できており、今後詳細な解析を加えて行く予定である。

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 5 件）

- ① Ikegame Tempei, Bundo Miki, Murata Yui, Kasai Kiyoto, Kato Tadafumi, Iwamoto Kazuya. DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *Journal of Human Genetics*, 査読有、印刷中
doi: 10.1038/jhg.2013.65.

- ② Nishioka Masaki, Shimada Takafumi, Bundo Miki, Ukai Wataru, Hashimoto Eri, Saito Toshikazu, Kano Yukiko, Sasaki Tsukasa, Kasai Kiyoto, Kato Tadafumi, Iwamoto Kazuya. Neuronal cell-type specific DNA methylation patterns of the Cacnalc gene. International Journal of Developmental Neuroscience, 査読有, 31, 2013, 89-95. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2012.11.007.
- ③ Nishioka Masaki, Bundo Miki, Kasai Kiyoto, Iwamoto Kazuya. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. Genome Medicine, 査読有, 4, 2012, 96. DOI: doi:10.1186/gm397
- ④ Nishioka Masaki, Bundo Miki, Koike Shinsuke, Takizawa Ryuichi, Kakiuchi Chihiro, Araki Toshiyuki, Kasai Kiyoto, Iwamoto Kazuya. Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. Journal of Human Genetics, 査読有, 58, 2013, 91-97. DOI: doi:10.1038/jhg.2012.140
- ⑤ Bundo Miki, Sunaga Fumiko, Ueda Junko, Kasai Kiyoto, Kato Tadafumi, Iwamoto Kazuya. A systematic evaluation of whole genome amplification of bisulfite-modified DNA. Clinical Epigenetics, 査読有, 4 2012, 22. DOI: doi:10.1186/1868-7083-4-22
- [学会発表] (計 10 件)
- ① 岩本和也、精神疾患患者末梢試料を用いたエピゲノム解析の可能性、第 34 回日本生物学的精神医学会(招待講演)、2012 年 9 月 28 日、神戸ポートアイランド、兵庫
- ② Iwamoto Kazuya(代表), Bundo Miki, Kasai Kiyoto, Kato Tadafumi. Neuronal epigenomics in schizophrenia. 第 35 回日本神経科学会(招待講演)、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋国際会議場、愛知
- ③ Iwamoto Kazuya(代表), Bundo Miki, Kasai Kiyoto, Kato Tadafumi. DNA methylation analysis of neuronal nuclei derived from bipolar disorder.
- 第 34 回日本神経科学会(招待講演)、2011 年 9 月 14-17 日、パシフィコ横浜、神奈川県
- ④ Iwamoto Kazuya(代表). Kato Tadafumi. Epigenome analysis of brains of patients with bipolar disorder. 2nd Meeting of East Asian Bipolar Forum (招待講演)、2012 年 9 月 7-8 日, Kyusyu, Japan
- ⑤ 岩本和也(代表)、文東美紀、上田順子、須永史子、根本妙子、笠井清登、加藤忠史、双極性障害および統合失調症患者神経細胞核におけるエピゲノム解析、第 6 回エビジェネティクス研究会年会、2012 年 5 月 14-15 日、東京一ツ橋学術総合センター、東京
- ⑥ Iwamoto Kazuya(代表), Kato Tadafumi. Epigenomics of brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics and Diseases/7th Annual Conference of Asian Epigenome Alliance/Genome Medicine Workshop on Epigenetic(-omic)s in Diseases(招待講演)、2012 年 4 月 19-22 日, Shanghai, China
- ⑦ 岩本和也、精神疾患患者試料を用いた epigenome 解析、大阪大学蛋白質研究所セミナー(招待講演)、2011 年 11 月 17-18 日、大阪大学、大阪
- ⑧ 岩本和也(代表)、文東美紀、笠井清登、加藤忠史、脳ゲノムの多様性と精神疾患、第 33 回日本生物学的精神医学会、2011 年 5 月 21-22 日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA、東京
- ⑨ Iwamoto Kazuya(代表), Kato Tadafumi. Epigenetics of bipolar disorder. Epigenetics in clinical Medicine(招待講演)、2011 年 4 月 4-6 日, Stockholm, Sweden
- ⑩ 岩本和也、精神疾患患者死後脳におけるエピゲノム解析、第 20 回日本臨床精神薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会(招待講演)、2010 年 9 月 15-17 日、仙台国際センター、宮城
- [その他]
ホームページ等
研究室 web site

<http://www.molpsy.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 和也 (IWAMOTO KAZUYA)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：40342753

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：