

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670520

研究課題名(和文)毛根サンプルを用いた統合失調症のバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of biomarkers for schizophrenia using scalp hairs

研究代表者

吉川 武男 (Yoshikawa, Takeo)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：30249958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒトの頭皮から採取した毛根の細胞に、ヒトの脳の細胞と共通する遺伝子が発現していることを発見し、これらの遺伝子の発現量の変化が、統合失調症や自閉症などの精神疾患の早期診断を補助するバイオマーカーとなる可能性を追究した。具体的には、統合失調症患者や自閉症の方から約10本の毛髪を採取して、既に精神疾患の死後脳で発現変化が確認されている遺伝子の毛根細胞での発現量を測定した。その結果、統合失調症患者の毛根細胞では、脂肪酸結合タンパク質(FABP)の1つであるFABP4をつくるFABP4遺伝子の発現量が対照群(健常者)に比べ約40%低下していることをつきとめた。

研究成果の概要(英文)：Hair follicles may seem an odd place to look when trying to predict mental illness. But in fact, it's not so odd. Brain cells and hair follicles 'the organs that grow hair in humans and other mammals' are derived developmentally from a layer of the embryo called the ectoderm, which also produces the outer skin layer and teeth enamel, for example. We were looking for a way to examine genes that have been found to be different in the brain cells of schizophrenic patients and controls, with the goal to identify biomarkers that could be used to fine whether a person might be susceptible to the disease. We found a gene called FABP4 being down-regulated in hair follicles. This means that we could look at the expression of FABP4 in hair follicles and recognize a susceptibility if it was reduced. These finding could allow us to better understand the onset of the disease and, eventually, look for treatments that can delay or even prevent the onset of the disease.

研究分野：精神医学、分子遺伝学

キーワード：毛根 遺伝子発現 バイオマーカー FABP4

1. 研究開始当初の背景

精神疾患を生物学的な根拠を持った客観的なパラメータで評価することは、病態生理、早期診断、予防法の確立等にとって非常に重要なことで、これまでも多くの研究がなされてきた。しかし、特異性や感度の問題があり、かつ介入(既存の治療法開始)新規治療法の開発、予防法の確立などに結びつく有用な生物学的情報を提供できるかなどを勘案した場合、満足できるものは報告されていなかった。死後脳での遺伝子発現研究では、例えば統合失調症においては、GABA系関連遺伝子の網羅的発現低下、オリゴデンドロサイト系遺伝子の網羅的発現低下などが大まかな合意に達して、病態生理を解く手掛かりになり得るが、生前の検査には決してなり得ない。我々は、脳で発現し末梢血で発現していない遺伝子の中に、同じ外胚葉由来である毛髪の本毛根サンプルで発現するものがあるという知見を得た。このことは、非侵襲的な方法で死後脳での発現変化が報告されている遺伝子の発現レベルを毛根で調べることが、精神疾患のバイオマーカーになり得ることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、「生きている脳」の代わりに毛髪の本毛根サンプルを用いることによって、脳だけで発現していると思われていた遺伝子がすべてではないにしろかなりのものが末梢の組織でも発現しており測定出来るという我々の偶然の発見に基づいており、これまで死後脳で報告されていた遺伝子群を、同じ外胚葉由来である毛根サンプルで統合失調症群と対照群で調べることに、疾患に関連した「バイオマーカー」を抽出することを目的とする。

これまでの統合失調症死後脳研究は、病態生理について新しい生物学的パラダイムを提供したが、死後採取したサンプルであるがために、様々な交絡因子を除いたり調整することが非常に困難であるという根源的な限界を抱えていた。毛根サンプルの採取は、簡便で被験者にとって安全かつ痛みが殆どなく非侵襲的である。

3. 研究の方法

(1) "Discovery sample set" を用いた mRNA の発現解析

"Discovery sample set" としては、中部地方で統合失調症約 50 人、年齢・性別・地域をマッチさせた対照群約 50 人の同意を得て収集した毛根サンプルを用いる。RNA を抽出後、TaqMan による定量的 RT-PCR 法で遺伝子の発現量を測定する。なお、毛髪は 1 人あたり 10 本採取する。GeneChip を用いた mRNA の網羅的発現解析では、これらの検体からは RNA の量が不十分であるので、標的遺伝子を決めて調べる。

GABA 系関連遺伝子: *GAD1*, *GABRD*, *GABRA1*,

SLC6A1 (GABA transporter gene 1), *GAD2*, *SST*, *PVALB*, *CALB2*

オリゴデンドロサイト系関連遺伝子: *MAG*, *CNP*, *SOX10*, *CLDN11*, *PMP22*, *CSPG4* (NG2), *OLIG2*

脂質関連および他の遺伝子: *FAAH*, *APC*, *BDNF*, *NES*, *SLC16A1*

(2) "Discovery sample set" を用いた miRNA 発現解析

"Discovery sample set" は、miRNA も測定できるように RNA を抽出する。網羅的発現解析のために、Agilent 社の SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイというプラットフォームを用いる。このアレイには、Human mature miRNA が 1,919 種類調べられるプローブが載っている。

(3) "Replication sample set" を用いた mRNA, miRNA 発現量変化の再現実験

上述の(1)、(2)で有意な変化が認められたトランスクリプトについて、TaqMan 法を用いて quantitative RT-PCR 定量法で確認実験を行う。

(4) 死後脳、血清、iPS 細胞、Neurosphere での発現解析

(5) 遺伝子発現解析結果、臨床情報、交絡因子の情報の統合的解析

発現変動結果が再現された遺伝子について、臨床情報や各種交絡因子(初発年齢、身体合併症の有無、検体採取時年齢、性別、服薬量、喫煙歴等)との因子分析を行う。また、疾患に対する特異性、感度、陽性的中率、陰性的中率を検討する。

(6) 発現量変化が見られた遺伝子について、毛根のどのような細胞集団で発現しているかの組織化学的検討。

4. 研究成果

(1) mRNA 発現解析の結果

表 1 に示すように、"Discovery sample set" では 7 個の遺伝子が統合失調症と対照群で有意な発現量の変化を示した。これらのうち、*FABP4* だけが "Replication sample set" でも有意差を示した。

表 1: 毛根における mRNA 発現解析結果

Gene Category	Gene Symbol	Assay ID ^a	First Sample Set			Second Sample Set		
			Mean ± AD of Corresponding Gene / GAPDH		p Value ^b	Mean ± AD of Corresponding Gene / GAPDH		p Value ^b
			Control (n = 62)	Schizophrenia (n = 49)		Control (n = 62)	Schizophrenia (n = 49)	
GABAergic System	<i>GAD1</i>	Hs01066953_m1	891 ± 298	1,119 ± 377	.118			
	<i>GAD2</i>	Hs00909634_m1		Not detectable				
	<i>GABRA1</i>	Hs01066953_m1	2,347 ± 2,761	832 ± 364	.378			
	<i>GABRD</i>	Hs00181309_m1	1,055 ± 758	945 ± 818	.668			
	<i>SLC6A1</i>	Hs01104475_m1	1,047 ± 830	885 ± 555	.682			
	<i>PVALB</i>	Hs00181045_m1	1,057 ± 559	1,074 ± 699	.87			
	<i>CALB2</i>	Hs00418993_m1	1,024 ± 355	1,163 ± 303	.037	.715 ± .373	.857 ± .300	.095 ^c
	<i>SST</i>	Hs00356144_m1	529 ± 549	1,052 ± 323	.028	.910 ± .688	1,812 ± 1,802	.151 ^c
	Myelin Relevance	<i>APC</i>	Hs01568289_m1	1,001 ± 243	939 ± 233	.131		
		<i>CLDN11</i>	Hs00194440_m1	860 ± 605	984 ± 854	.862		
<i>CNP</i>		Hs00909634_m1	1,148 ± 336	985 ± 198	.002	.928 ± .415	1,052 ± .210	.456
<i>CSPG4</i>		Hs00381541_g1	.978 ± .536	1,050 ± .364	.252			
<i>MAG</i>		Hs01143287_m1		Not detectable				
<i>NES</i>		Hs00707120_s1	1,018 ± 466	1,013 ± 403	.98			
<i>OLIG2</i>		Hs00300164_s1		Not detectable				
<i>PMP22</i>		Hs00166556_m1	1,006 ± 370	804 ± 261	.003	.807 ± .410	.844 ± 400	.987
<i>SOX10</i>		Hs00306918_m1	1,072 ± 748	984 ± 508	.99			
Lipid Relevance		<i>FABP5</i>	Hs00907830_m1	763 ± 486	807 ± 372	.262		
	<i>FABP4</i>	Hs01086177_m1	1,050 ± 470	603 ± 251	<.0001	1,138 ± .708	.650 ± .232	<.001
	<i>FABP5</i>	Hs02339439_g1	1,118 ± 215	1,084 ± 179	.312			
	<i>FAH</i>	Hs00381426_m1	582 ± 332	1,018 ± 144	.003	.518 ± .372	.530 ± .355	.754
	<i>FAAH</i>	Hs01038680_m1	1,008 ± 344	857 ± 221	.013	.836 ± .303	.753 ± .281	.180 ^c
	Control	<i>GAPDH</i>	Hs02758891_g1					

(2) miRNA の解析

First sample set で miRNA array を用いて 1,919 個の miRNA の発現を調べた。Absolute fold change (FC) (schizophrenia

group/control group) 2 and $P < 0.05$ (by Mann-Whitney U test, two-tailed) という基準で選別した結果、*hsa-miR-4449*, *hsa-miR-1237*, *hsa-miR-4769-3p* の3個が両群間で差があった。これら3個のmiRNAにつき、"Discovery sample set" を用い U6 small nuclear RNA を内部標準にして qRT-PCR 解析を行ったところ、*hsa-miR-4449* が最小の P 値を持って統合失調症群で発現レベルが増加していたが、有意ではなかった ($FC = 1.25$, $P = 0.063$)。

(3) 死後脳、血清、iPS 細胞、Neurosphere での発現解析

FABP4 の毛根での mRNA レベル、血清中のタンパクレベル、それと毛根での mRNA レベルとの相関、死後脳前頭葉 (BA46) での mRNA レベル、海馬での mRNA レベルの結果を図 1 に示す。

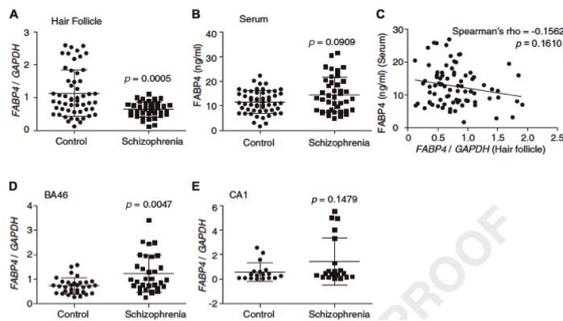


図 1 : *FABP4*/GAPDH の各検体での発現レベル

血清中のタンパクレベルは疾患群で増加傾向 ($P = 0.091$)、血清中タンパクレベルと毛根での mRNA レベルは相関なし、死後脳 BA46 では疾患群で mRNA が有意に増加 ($P = 0.005$)、海馬 CA1 では有意差なし、という結果であった。統合失調症由来の iPS 細胞では *FABP4* 遺伝子の発現は検出できなかった。iPS 細胞から分化誘導した Neurosphere (神経前駆細胞塊) では発現は認められたが、疾患群と対照群の間で発現量に有意な差はなかった。

hsa-miR-4449 については図 2 に示すように、毛根の "Replication sample set" で増加傾向 ($P = 0.063$)、死後脳前頭葉 (BA46) で有意な増加 ($P = 0.0007$)、

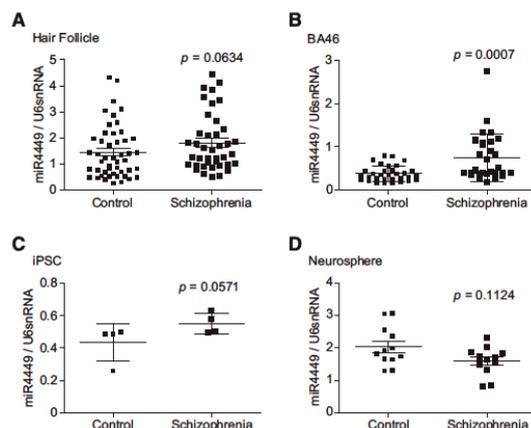


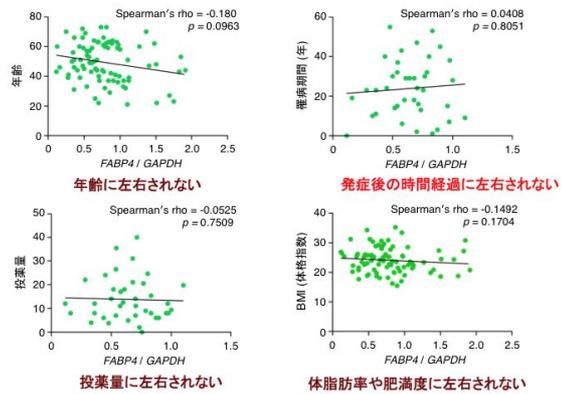
図 2 : *hsa-miR-4449* の発現解析結果

統合失調症由来 iPS 細胞で増加傾向 ($P = 0.057$)、Neurosphere では変化なし増加 ($P = 0.112$) という結果であった。

(4) 毛根における *FABP4* 発現に対する交絡因子の影響

図 3 に示すように、交絡因子として年齢、罹病期間、検体採取時の投薬量 (ハロペリドール換算) BMI (Body Mass Index) は、*FABP4* 遺伝子の発現量に有意な影響を及ぼさなかった。BMI を検討したのは、*FABP4* はこれまでメタボリックシンドロームとの関連で研究されてきたからである。

図 3 : 毛根における *FABP4* 発現に対する交絡因子の影響

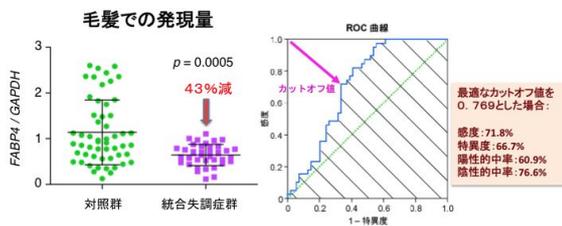


この他、喫煙の影響、性別の影響も調べたが、有意な効果は認められなかった。

(5) 毛根における *FABP4* 発現量のバイオマーカーとしての有効性

Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線解析において、カットオフ値を 0.769 に設定した場合、
 感度 : 71.8 %
 特異度 : 66.7%
 陽性的中率 : 60.9%
 陰性的中率 : 76.6%
 という値が得られた (図 4)。

図 4 : *FABP4* のバイオマーカーとしての解析



感度: 特定の病気に罹患している集団に対して検査を行ったとき、集団の中の罹患者を検出できる割合。100%であれば全ての罹患者を検出でき、80%であれば8割の罹患者を検出できる。

特異度: 特定の病気に罹患していない集団に対して検査を行ったとき、集団の中の罹患していない人を検出できる割合。理想の検査は、感度、特異度共に100%である検査である。

陽性的中率: 検査で陽性と出た人のうち実際に病気に罹っている人の割合。

陰性的中率: 陰性と出た人のうち実際に病気に罹っていない人の割合。

(6) FABP4 は毛根のどの細胞に発現しているか

上記のことを調べるために、毛髪の縦断面の切片を作成し、各種ケラチンマーカールと FABP4 の共染色を行った。その結果、FABP4 は、毛根細胞の内毛根鞘 (Inner Root Sheath: IRS) と呼ばれる毛髪のやや内側に位置する場所や、Hair forming compartment と呼ばれる毛髪の中央部に発現していた (図 5)。

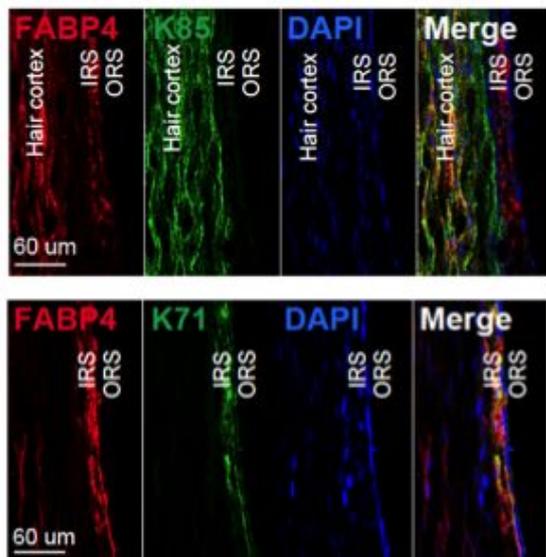


図 5 : FABP4 タンパクの毛根での発現

(7) まとめ

以上の結果をまとめると以下のようになる :

神経系に発現している GABA 関連系遺伝子群 8 個のうち、7 個が毛根細胞でも発現していた。

神経系に発現しているオリゴデンドロサイト系遺伝子群 9 個のうち、7 個が毛根細胞でも発現していた。

合計 22 個の遺伝子を解析したところ、「探索サンプルセット」では FABP4 を含む 7 個の遺伝子の発現量が、対照群と統合失調症群で有意な差が検出された。

上記のうち、「再現サンプルセット」で結果が再現されたのは FABP4 遺伝子のみ。FABP4 は、毛根細胞の内毛根鞘 (inner root sheath: IRS) と呼ばれる毛髪のやや内側に位置する場所や、Hair forming compartment と呼ばれる毛髪の中央部に発現していた。これらの部位は、毛髪を引き抜いた際にはがれ落ちずに残る部位であるため、毛髪を引き抜き方が遺伝子発現解析に影響を与える可能性は少ないと考えられ、「再現」された理由の 1 つの可能性はある。

「バイオマーカー」は、精神疾患の診断の客観的補助材料になり得るが、特に早期診断に役立つことが望まれる。本研究では、早期診断が重要な意味を持つ統合失調症、自閉症を対象に、「毛根細

胞における遺伝子発現量」という新規パラダイムを検討した。

統合失調症では、脂肪酸結合タンパクをコードする FABP4 遺伝子の発現量が増加しており、この所見は諸種の因子によって影響されず、また感受性、特異性が高いことから、優れたバイオマーカーになり得ると考えられた。

また、FABP4 レベルは発病後の時間経過に影響されないため、今後は、未発症であるが「発症の危険性がある」ヒトの識別に役に立つかどうかの検討が必要であり、もし識別に有用であれば、予防医療の開発に貢献する可能性がある。

死後脳や iPS 細胞を用いた解析から、FABP4 は単なるマーカを超えて、統合失調症のメカニズムに関連している可能性がある。

今後、「脳疾患」のバイオマーカーを探索する際、毛根細胞は材料として有用であると考えられる (非侵襲性、簡便性、脳と同じ外胚様由来)。

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 4 件)

1. Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M, Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T: Utility of scalp hair follicles as a novel source of biomarker genes for psychiatric illnesses. *Biological Psychiatry*, in press.2015 査読有
DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.07.025.
2. 前川素子、島本知英、「注目の遺伝子 FABP4」、*分子精神医学*、2015 年 4 月号、Vol.15 No.2、P60-62、査読無し
3. 前川素子、「第 10 回日本統合失調症学会『頭皮の毛根細胞が統合失調症診断に有効な可能性』」、*Medical Tribune*、2015 年 Vol.48, No.17,18 P.7、査読無し
4. 前川素子、「自閉症バイオマーカーの探索」、*児童青年精神医学とその近接領域*、in press、2015 年、査読無し

[学会発表] (計 1 件)

1. 前川素子、山田和男、豊島学、大西哲生、岩山佳美、島本知英、豊田倫子、岡田洋平、赤松和土、糸川昌成、岡野栄之、吉川武男「頭皮の毛根細胞を用いた統合失調症診断補助バイオマーカーの開発」第 10 回日本統合失調症学会、2015/3/28、都市センターホテル (東京都千代田区)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

http://www.riken.jp/en/research/labs/bsi/mol_psych/

<http://www.brain.riken.jp/en/faculty/details/54>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 武男 (Takeo Yoshikawa)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究
センター・チームリーダー

研究者番号：30249958