

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860108

研究課題名(和文) エピジェネティクスに着目した統合失調症の病因解明の追及

研究課題名(英文) Investigation of the epigenetics at schizophrenia pathology

研究代表者

宇野 恭介 (Uno, Kyosuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：30608774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患関連遺伝子として見出したSHATIの末梢血中DNAのメチル化率の測定が、精神疾患のマーカーとなる可能性を探ることを目的として行った。

メタンフェタミン連投により作成した統合失調症様モデルマウスにおいて脳内および血中Shati遺伝子のメチル化率に有意な減少が確認された。さらに、統合失調症、双極性障害、気分障害の末梢血からDNAを抽出した後、メチル化率を測定したところ、健常者に比べて各精神疾患患者の間では、特定部位のメチル化率の低下が観察された。これらのことより末梢血から採取したDNA中のSHATI遺伝子のメチル化率の解析が精神疾患の診断マーカーとしての有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We have identified Shati and the regulation system of Shati is expected as therapeutic or diagnostic tools. In this study, we focused DNA methylation. To analyze the DNA methylation, mice were treated with METH or saline. Mice genomic DNA was extracted from NAC tissue and peripheral blood followed by bisulfite treatment. In METH treated mice, the methylation level of Shati promoter specific region prepared from NAC was lower than that of saline treated mice. Moreover, same domain from peripheral blood in METH treated mice was less methylated compared with saline treated mice. Furthermore, the methylation level of the specific region of SHATI obtained from peripheral blood of schizophrenia subjects were significantly lower than that of healthy subjects. These results indicate that expression of Shati might be regulated by DNA methylation, and to analyze the blood level of methylation at Shati specific genomic region could help a diagnosis of psychiatric disorders in clinical field.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：統合失調症 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の 1%が思春期に発症する疾病である。また一旦発症すると完治は難しく、薬物治療を受けながら、一生病気と関わっていかねばならない。病気の診断についても、熟練した臨床医の技術が必要で、画期的な治療薬の開発も難航しているのが現状である。さらには病状を反映した動物モデルの作成が困難であることも治療薬開発の遅延につながっている。

統合失調症の発症には特定の遺伝子の修飾すなわちエピジェネティックな要因が重要な役割を果たしていることが報告されつつある。例えば、統合失調症患者死後脳において、SOX10のDNAのメチル化が誘発されているといった報告や (Iwamoto et al., J Neurosci. 25, 5376-81 (2005))、A型(MAOA)およびB型モノアミン酸化酵素(MAOB) 遺伝子のメチル化が誘発されていることが報告もされており (Abdolmaleky et al., Methods Mol Biol., 448, 187-212 (2008))、その他多数の精神疾患患者において多数のDNAのメチル化の報告がなされている。このように、統合失調症において、死後脳の遺伝子発現変化を調べることにより、鍵となる遺伝子のDNAメチル化変化によって統合失調症の発病やその原因が説明できる可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

統合失調症は人口の 1%が罹患する患者数の多い疾患である。しかし、原因が明確になっておらず、切り札となる治療法も存在しない。現在までに、定型および非定型の治療薬が開発されてきているが、いずれの治療薬が患者にとって奏効があるかどうかは服用してみないとわからないというのが現状である。我が国でも最近、難治性統合失調症患者に対するクロザピンでの治療が開始されたが、患者個々が難治性か否かを見極めるには、1年以上の歳月をかけて複数の薬を試さざるをえず、その期間の患者や家族の苦悩は非常に大きい。申請者はこれまでの研究において、メタンフェタミン連続投与により統合失調症モデルマウスを作成し、cDNA サブトラクション法により関連する3つの遺伝子を見出している。そこで本研究では、精神疾患関連遺伝子として見出したこれら3つの新規分子の発現変動がDNAメチル化に起因すると仮定し、その検証と臨床応用への可能性について検証し、病因の解明を目指す。

3. 研究の方法

メタンフェタミンを連続投与することで作成した統合失調症モデルマウスおよびコントロールマウス脳内における3つの遺伝子の発現について、in situ ハイブリダイゼーションや免疫染色により部位ごとに検証する。さらに脳部位ごとのゲノムDNAを抽出し、各遺伝子におけるメチル化の状態についてエピジェネティックな解析を試みる。さらにメタンフェタミンを連続投与したマウスより

血液を回収した後、上記3遺伝子の血中タンパク質濃度について測定するとともに、ゲノムDNAを抽出後、血中におけるメチル化の状態についても検討し、脳内と血液中のゲノムDNAのメチル化との関係、および脳内発現や血中の解析との関連について検討を行う。さらに、それらの結果を元に、富山大学附属病院の精神科と共同で臨床研究を行い、統合失調症患者の血液を採取し上記遺伝子のタンパク質濃度および、DNAメチル化を測定し、各患者の臨床症状や病状と血中DNAメチル化との関係について明らかにする。

(1) 統合失調症モデルマウス脳内および血中における Shati、Piccolo、Tmem168 のエピジェネティック解析

統合失調症モデルマウスを用いて各種遺伝子の発現パターンについて解析を行う。現在のところこれら遺伝子は側坐核で発現上昇することしか解っていない。これら遺伝子脳内での重要性を確認するために、脳部位における発現パターンを解析することが必須となる。

【 : モデル動物の作成および評価】メタンフェタミンを繰り返し投与するにより、統合失調症モデル動物の作成を行う。さらに、上記遺伝子群の改変マウスを用いて解析を行う。遺伝子改変動物は、本年度中に実験に使用できる予定である。作成したモデル動物で、ロコモーターアクティビティや恐怖条件付け試験、高架式十字迷路試験、プレパレスインヒビション (PPI)、強制水泳試験等の行動実験により統合失調症モデルとしての評価を行う (図 1)。

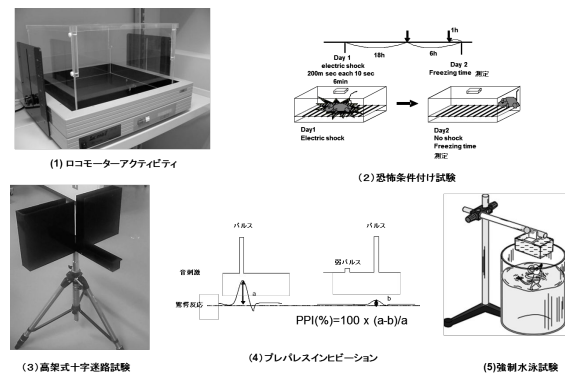


図1 行動実験

【 : 脳部位ごとの各種遺伝子の発現】上記により作成したモデル動物の各脳部位における遺伝子発現を視覚的に明らかにする目的で、in situ ハイブリダイゼーションおよび免疫染色を行う。

【 : 脳部位ごとの各種ゲノムDNAのメチル化解析】上記により作成したモデル動物の各脳部位を回収後、ゲノムDNAを抽出し、パイサルファイトシーケンスを行う。パイサルファイト処理を行なうとメチル化シトシンは変換されず、非メチル化シトシンのみがウラシルに変換される。シーケンス反応としてウラシルはチミンとして表現されるので、バ

イサルファイト処理前後で生じるシトシンとウラシルの差異を配列データとして得ることができる。これら解析において、疾病の原因遺伝子の解析を含めた一次構造解析では分からない調節機構の解明につながる。

【：各遺伝子のプロモーター解析】メチル化部位の特定ができた後、どの転写因子により発現が促進あるいは抑制されているのかを解析するため、deletion mutant および、メチル化されたプロモーターをレポーターベクターに組み込み、ルシフェラーゼアッセイにより解析を行う。さらにメチル化が確認された部位に対してメチル化シトシン結合タンパクである MeCP2 の抗体を用いて、クロマチン免疫沈降法を行いメチル化による遺伝子の制御を確かめる。

(2) 病態モデルマウス血中における Shati、Piccolo、Tmem168 の解析

主に病態モデルマウスを用いて血中における各種遺伝子の発現パターンについて解析を行う。本研究課題においては、各遺伝子の病態の診断・早期治療へ応用展開する予定であるため、病態時における血中での発現パターンを解析することが必須となる。

【：血中での各種ゲノム DNA のメチル化解析】血中よりゲノム DNA を回収し、メチル化解析を行う。これらることより統合失調症患者の血液を用いた病態との関連解析や診断等への応用を目指す。

(3) 統合失調症患者血中における Shati、の DNA メチル化解析

統合失調症患者血中における上記遺伝子の DNA メチル化および、各種遺伝子の発現パターンについて解析を行う。本研究課題においては最終目標として、臨床における病態の診断・早期治療へ発展させる予定であるため、病態時における血中での発現パターンを解析することが必須となる。血液サンプルは、本学 IRB や倫理委員会の承認を得た上で、患者に研究目的や方法などを十分に説明し、文書による同意を得た上で協力をお願いする。なお本研究に関連した研究は「富山大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の審査」において承認を獲得済みである。(遺 24-3 課題名：統合失調症、双極性障害およびうつ病患者における精神疾患関連遺伝子の修飾に関する研究)

【：ヒト血中での各種ゲノム DNA のメチル化解析】血中でのゲノム DNA でのメチル化解析を行い臨床における早期診断になり得るか評価する。

4. 研究成果

メタンフェタミン (MAP) を連続投与したマウスおよびコントロールとして生理食塩水 (saline) を投与したマウスを用いて行動解析を行ったところ、MAP 連続投与群において、統合失調症様の症状である行動量の上昇ならびに PPI の抑制が確認された。これらのマウスより脳部位および末梢血よりゲノム

DNA を抽出し、メチル化率をパイサルファイトシークエンス法により確認したところ SHATI 遺伝子プロモーター上の特定の CpG ユニットにおいてメチル化率の低下が確認された。一方 TMEM168、Piccolo については著明な変化が観察されなかった。Shati 遺伝子のメチル化の減少は同マウスにおける血中においても同位置の CpG ユニットの減少が確認された。このことより血中のメチル化の測定が脳内のメチル化を反映する可能性が示唆された (図 2)。さらに、Shati プロモータ

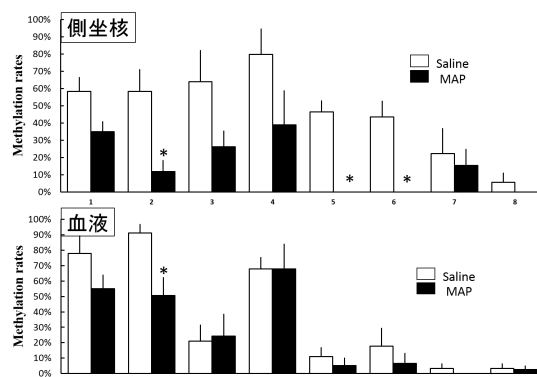


図2 マウス側坐核および血中におけるShati遺伝子のメチル化解析

ーの deletion construct を作成し、ルシフェラーゼベクターに組み込みレポーターアッセイを行ったところ、上記でメチル化の変化が観察された部位を欠損したベクターにおいて、転写活性の有意な減少が確認された。

次いで、本学精神科に通院中の統合失調症患者と健常者について末梢血 DNA 中のメチル化率について検討したところ、統合失調症患者において著明な減少が確認された (図 3)。これらることより、末梢血から採取した DNA 中の SHATI 遺伝子のメチル化率を解析することは、精神疾患の診断マーカーとして有用である可能性が示された。現在これらの結果を元に、他大学精神科とも共同してさらに多くの臨床サンプルを収集中である。

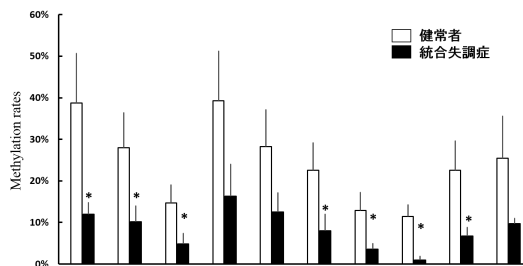


図3 ヒト血中におけるShati遺伝子のメチル化率

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)

全て査読あり

1. Kyosuke Uno, Daisuke Nishizawa, Seunghee Seo, et., al (2015) The piccolo intronic single nucleotide polymorphism

- rphism rs13438494 regulates dopamine and serotonin uptake and shows associations with dependence-like behavior in genomic association study. *Cur. Mol. Med.*;15(3):265-74.
2. Yoshiaki Miyamoto, Yudai Ishikawa, Noriyuki Iegaki, Kazuyuki Sumi, Kequan Fu, Keiji Sato, Yoko Furukawa-Hibi, Shin-ichi Muramatsu, Toshitaka Nabeshima, Kyosuke Uno and Atsumi Nitta. (2014) Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 17(8):1283-94. doi: 10.1017/S146114571400011X.
 3. Ariane R. Pessentheiner, Helmut J. Pelzmann, Evelyn Walenta, Martina Schweiger, Lukas N. Groschner, Wolfgang F. Graier, Dagmar Kolb, Kyosuke Uno, Toh Miyazaki, Atsumi Nitta, Dietmar Rieder, Andreas Prokesch, and Juliane G. Bogner-Strauss. (2013) N-acetyltransferase 8-like accelerates lipid turnover and increases energy expenditure in brown adipocytes. *J Biol Chem.* 288(50):36040-51.
- [学会発表](計 28 件)
1. Uno K, Miyamoto Y, Nitta A.: Shati/Nat8l regulates dopamine release-induced by nicotine in nucleus accumbensSY33-3, 16th International Society of Addiction Medicine Annual Meeting; 2014 Oct 2-6; Yokohama. (シンポジウム 招待講演)
 2. Sumi K, Uno K, Iwamoto R, Nabeshima T, Furukawa-Hibi Y, Miyamoto Y, Nitta A.: The relationship between Shati/Nat8l and NAA in various age stage in mice brain. *Neuroscience* 2013; 2013 Nov 9-13; San Diego.
 3. Kyosuke Uno, Kanako Takayama, Seunghee Seo, Kazutaka Ohi, Ryota Hashimoto, Daisuke Nishizawa, Kazutaka Ikeda, Norio Sakai, Toshitaka Nabeshima, Yoshiaki Miyamoto, Atsumi Nitta.: PCLO SNP regulates DA and 5-HT uptake in their transporter over expressed PC12 or HEK293 cells. The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Symposium Joint International Symposium with Innovative Area (Microendophenotype of psychiatric disorders) and RIKEN BSI-FIRST Program as Neuro2013 Satellite symposium (Kyoto. 2013. 6. 19)
 4. Kazuyuki Sumi, Kyosuke Uno, Ryo Iwamoto, Toshitaka Nabeshima, Yoko Furukawa-Hibi, Yoshiaki Miyamoto, Atsumi Nitta.: Shati/nat8l and NAA increases with the development in mice. The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Symposium Joint International Symposium with Innovative Area (Microendophenotype of psychiatric disorders) and RIKEN BSI-FIRST Program as Neuro2013 Satellite symposium (Kyoto. 2013. 6. 19)
 5. 宇野恭介, 高岡和也, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス側坐核での Shati/Nat8l の過剰発現はニコチン誘発性ドパミン遊離量を変化させる. 日本薬学会第 134 回年会; 2014 Mar 28-30; 熊本
 6. 宮崎杜夫, 宇野恭介, 菊池佑, 日比陽子, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウスにおける Shati/Nat8l 転写開始点上流のメチル化の減少はメタンフェタミンの連続投与によって誘導される. 第 87 回日本薬理学会年会 ; 2014 Mar 19-21; 仙台
 7. 宇野恭介, 西澤大輔, 徐承姫, 高山佳奈子, 松村祥平, 酒井規雄, 大井一高, 鍋島俊隆, 橋本亮太, 尾崎紀夫, 池田和隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: Piccolo の SNP である rs13438494 は遺伝子関連解析において依存性関連疾患と関連がありドパミンおよびセロトニンの取り込みを制御する. 第 87 回日本薬学会年会 ; 2014 Mar 19-21; 仙台
 8. 宇野恭介, 高岡和也, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: ニコチンによって誘発される側坐核ドパミン遊離量に対する Shati/Nat8l の影響. 第 23 回神経行動薬理若手研究者の集い; 2013 Mar 18; 仙台
 9. 宇野恭介, 徐承姫, 松村祥平, 大井一高, 橋本亮太, 西澤大輔, 池田和隆, 酒井規雄, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: 精神疾患に関連する PCLO SNP rs13438494 の分子生物学的検討. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会; 2013 Oct 24-26; 沖縄.
 10. 鷲見和之, 宇野恭介, 宮本嘉明, 岩本諒, 鍋島俊隆, 古川-日比陽子, 新田淳美.: マウス前頭前皮質における Shati/Nat8l の神経機能解析 日本薬理学会北部会 (旭川, 2013.9.13)
 11. 高岡和也, 宇野恭介, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス線条体での Shati/Nat8l 過剰発現は妊娠期ストレスへの感受性および産褥期におけるうつ様行動を誘導する. 第 21 回クリニカルファーマシーシンポジウム

ム・医療薬学フォーラム 2013 (金沢, 2013. 7. 20-21)

12. 宇野恭介, 高山佳奈子, 徐承姫, 大井一高, 橋本亮太, 西澤大輔, 池田和隆, 酒井規雄, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美. : セロトニンおよびドパミントランスポーターを過剰発現させた PC12 および HEK293 細胞において, PCL0 の SNP はモノアミン取り込みを制御する Neuro 2013 (京都, 2013. 6. 20-23)
13. 鷺見和之, 宇野恭介, 岩本諒, 鍋島俊隆, 日比陽子, 宮本嘉明, 新田淳美 : マウス発達過程における神経特異的分子 shati/nat8l の発現変化. Neuro 2013 (京都, 2013. 6. 20-23)

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

名称 : 精神障害の検査方法および検査キット

発明者 : 新田淳美 宇野恭介

権利者 : 国立大学法人富山大学

種類 : 特許

番号 : PCT-TU21-85 51400342321

出願年月日 : 2014 年 2 月 18 日

国内外の別 : 国際出願

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 恭介 (UNO KYOSUKE)

富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号 : 30608774