

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24116009

研究課題名（和文）精神疾患患者死後脳における神経細胞ゲノム動態の解析

研究課題名（英文）Genomic and epigenomic analyses of neuronal cells of psychiatric disorders

研究代表者

岩本 和也（Iwamoto, Kazuya）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授

研究者番号：40342753

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 60,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経細胞核内のゲノム動態をゲノム修飾と配列多様性の二つの側面から検討を行ってきた。ゲノム修飾については様々なシトシン修飾状態について微量脳組織を用いた解析技術の確立と共にその基本特性を明らかにしつつ、精神疾患患者死後脳に特徴的なパターンの抽出に成功した。また、配列多様性については、トランスポゾンLINE-1の新規転移が、統合失調症患者死後脳神経細胞で増大していることを明らかにした。また、ヒト死後脳試料に対し超高深度ゲノム解析を行い体細胞変異を同定すると共に、一卵性双生児統合失調症関連障害不一致例において体細胞変異の同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we performed genomic and epigenomic analyses of neuronal cells derived from patients with psychiatric disorders. We revealed cytosine modification status from a small amount of brain neuronal DNA, and identified genomic region showing altered cytosine modification status in patients. We also found the increased LINE-1 copy number in neurons of patients with schizophrenia. We performed ultra-deep sequencing in brain genomic DNA and developed efficient method for detecting somatic mutations. Finally, by applying the developed method, we successfully identified the somatic mutations in monozygotic twins discordant for schizophrenia-related disorder.

研究分野：分子精神医学

キーワード：死後脳 精神疾患 体細胞変異 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

脳神経系の細胞は、様々な神経細胞やグリア系細胞から構成されており、細胞種ごとにエピジェネティックな修飾状態が異なっていると考えられている。また、染色体の異数性やトランスポゾン転移など様々な体細胞変異が生じていることも知られている。しかし、これらエピゲノムの状態や体細胞変異が、どのように精神疾患と関係しているかは明らかではなかった。申請者は、ヒト死後脳から神経細胞を単離する技術を有しており、本技術を使ったゲノム・エピゲノム解析により、精神疾患の病因・病態解析を着想するに至った。

2. 研究の目的

神経細胞の核内ゲノム動態として、エピゲノム状態およびゲノム配列の状態を検討し、新学術領域研究「マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出」の達成目標である、精神疾患のマイクロエンドフェノタイプとしての確立が可能であるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

健常者および精神疾患患者死後脳前頭葉神経細胞核を神経細胞マーカー NeuN を用いたセルソーティング法により単離した。単離神経細胞核および非神経細胞核からゲノム DNA を抽出し、エピゲノム解析およびゲノム解析に用いた。

エピゲノム解析として、全ゲノムバイサルファイトシークエンシング解析 (WGBS) および Reduced Representation バイサルファイトシークエンシング解析 (RRBS) を行い、シトシンメチル化状態の解析を行った。また、ヒドロキシメチル化状態をグルコース付加法による濃縮法 (hmC-Seq) を用いて解析した。

ゲノム解析として、トランスポゾン LINE-1 のコピー数測定を行い、関連する iPS 細胞 y や精神疾患動物モデルを用いた解析を行った。また、脳試料および肝臓試料を用いた全ゲノム解析によりトランスポゾン挿入部位の解析を行った。

さらに、一塩基変異を中心とする体細胞変異解析のために、健常者死後脳試料や肝臓試料由来ゲノム DNA を用いて高深度の全ゲノム解析を行った。既に報告されている体細胞変異検出アルゴリズムを使い、独自の評価法を付加することにより最適な体細胞変異検出法の確立を行った。この過程で、小型次世代シークエンサーによる独立したアンプリコンシークエンシングやパイロシークエンシング法による検証実験を行った。確立した体細胞変異検出および検証実験法を、健常者脳試料に適用すると共に、一卵性双生児統合失調症関連疾患不一致例のエクソームデータにも適用し、双生児間で生じている体細胞変異の検出を行った。

4. 研究成果

健常者前頭葉由来神経細胞と非神経細胞の WGBS 解析の結果、非 CpG 部位の神経細胞での高メチル化や、神経細胞・非神経細胞特異的な DNA メチル化状態を明らかにした。また、WGBS 解析を行った検体を用いた hmC-Seq 解析の結果、神経細胞での hmC レベルの濃縮が確認され、細胞種特異的の遺伝子発現パターンとの一致が認められた。また、トランスポゾン LINE-1 配列に着目したエピゲノム状態を調べたところ、進化的に新しい LINE-1 サブファミリーである L1PA や L1HS において低メチル化が認められると共に高いヒドロキシメチル化率の集積が認められた。これらは神経細胞特異的に生じており、公共データベースから利用した肝臓データの解析では認められなかった。

患者群の解析においては、統合失調症および双極性障害患者神経細胞においてはプロモーター領域の全体的な低メチル化傾向が認められた。また、神経機能に重要な遺伝子における DNA メチル化変化が同定された。疾患に依存して変動している DNA メチル化状態については、RRBS 法により確認できることを明らかにした。

ゲノム解析として、トランスポゾン LINE-1 のゲノムコピー数を患者試料の前頭葉と肝臓で RT-PCR 法を用いて測定し、肝臓で補正した値を算出したところ、精神疾患患者群 (統合失調症、双極性障害、大うつ病) で有意なコピー数上昇を認めた。特に統合失調症患者群で顕著なコピー数上昇を認めたため、統合失調症患者前頭葉の独立した脳サンプルセットを用い追試を行ったところ、神経細胞で有意なコピー数増大を確認することができた。

本所見に基づき、LINE-1 コピー数上昇について、動物実験による確認実験を行った。Poly(I:C) 化合物が投与された妊娠マウスから生まれた仔マウスについて、前頭葉部位の LINE-1 コピー数を測定したところ有意な上昇を再現できた。また、EGF を投与したマカクモデルにおいても有意な上昇を観察することができた。

次に 22q11 欠失を有し、統合失調症を発症した患者から樹立した iPS 細胞を用いた実験を行った。iPS 細胞を神経細胞に誘導し、神経細胞核を単離した後に LINE-1 コピー数を測定したところ、健常者から同様の実験を行った場合と比べて有意なコピー数の上昇を認めた。

また、健常者 3 名、統合失調症患者 3 名について前頭葉と肝臓試料について全ゲノム解析を行い、LINE-1 の脳での新規挿入部位の同定と比較を行った。新規挿入部位については、ゲノムの場所および遺伝子の位置との対応関係について群間で有意差は認められなかった。しかし、新規挿入が生じた遺伝子を比較したところ、患者群では統合失調症に関連していると考えられている遺伝子群や神

経機能に重要な遺伝子群への挿入が認められた。

一塩基変異の体細胞変異の解析のために、健常者の大脳皮質、小脳、大脳皮質由来神経細胞、非神経細胞、肝臓など多様なソースのゲノム DNA を用いて、イルミナ社次世代シーケンサーによる高深度の全ゲノム解析を行った。シーケンスリードについて厳密な QC を行い、ヒトゲノム参照配列にマッピングしたところ、それぞれのサンプルにおいておおむね X100 の深度が得られた。

既に癌研究などで体細胞変異検出の実績が報告されている Mutect および Strelka を用い、体細胞変異の候補を抽出した。候補抽出時に、体細胞変異が検出されたシーケンスリードの品質評価を個別に行った。得られた候補について独立したシーケンスライブラリー調整によるアンプリコンシーケンシングを、小型次世代シーケンサー MiSeq を用いて行った。約 2 万リードの深度で体細胞変異候補の頻度計算を行い、全ゲノム解析から得られたデータの追試を行った。追試の成否をフィードバックしながら、体細胞変異候補の抽出法の改善を行い、最終的に、体細胞変異検出パイプラインの確立に成功した。

確立したパイプラインを用い脳試料のデータに適用したところ、合計 31 ケ所の体細胞変異の同定に成功した。これらは全てアンプリコンシーケンシングにて追試が可能であった。脳試料における体細胞変異は、アミノ酸置換を伴わないものが多く、生理学的条件下では、細胞機能に大きな影響を与えるものは少ないと考えられた。一方で、神経細胞で発現している遺伝子群において集中して生じており、精神神経疾患との深い関連性を有することも示唆された。

また、確立したパイプラインを一卵性双生児統合失調症関連疾患不一致例に適用した。検討には 4 組の不一致例の血液試料におけるエクソーム解析データを使用した。結果、1 組（妄想性障害不一致例）において、合計 6 ケ所の体細胞変異の同定に成功した。これらはアンプリコンシーケンシングにより確認された。また、アレル頻度が 3%以上と高いものに関しては、パイロシーケンシング法による確認にも成功した。体細胞変異のうち 1 ケ所は罹患者側においてアミノ酸置換を伴う変異であった。今回同定された変異は血液試料におけるものであるが、アレル頻度の高い変異に関しては、発生初期に生じ、脳を含む様々な臓器で共有されていると推定できることから、双生児における表現型差異との関連が示唆された。

本研究全体を通して、精神疾患患者の神経細胞核内ゲノムは、エピゲノム変異と共に LINE-1 コピー数上昇など体細胞変異の蓄積が生じていることを明らかにした。このことから神経細胞核内ゲノム動態は精神疾患のマイクロエンドフェノタイプとして捉える

ことができ、今後の病因・病態解析に有用であると考えられた。

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 42 件)

Bundo M, Kato T, Iwamoto K. (book chapter) Cell type-specific DNA methylation analysis in neurons and glia. Epigenetic Methods in Neuroscience Research Springer, Berlin 2015, 115-123. (査読無)
DOI:10.1007/978-1-4939-2754-8_7

Kato T, Iwamoto K. Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders. Neuropharmacology 2014,80C:133-139. (査読有)
DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.019

Hayashi-Takagi A, Vawter MP, Iwamoto K. Peripheral biomarkers revisited: integrative profiling of peripheral samples for psychiatric research. Biological Psychiatry 2014,75:920-928. (査読有)
DOI: 10.1016/j.biopsych.2013.09.035

Sugawara H, Bundo M, Asai T, Sunaga F, Ueda J, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Effects of quetiapine on DNA methylation in neuroblastoma cells. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2014,56C:117-121. (査読有)
DOI: 10.1016/j.pnpbp.2014.08.010

Koike S, Bundo M, Iwamoto K, Suga M, Kuwabara H, Ohashi Y, Shinoda K, Takano Y, Iwashiro N, Satomura Y, Nagai T, Natsubori T, Tada M, Yamasue H, Kasai K. A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: A capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. Translational Psychiatry 2014,4:e379. (査読有)
DOI: 10.1038/tp.2014.19

Murata Y, Nishioka M, Bundo M, Sunaga F, Kasai K, Iwamoto K. Comprehensive DNA methylation analysis of human neuroblastoma cells treated with

blonanserin. *Neuroscience Letters* 2014, 563:123-128. (査読有)

DOI: 10.1016/j.neulet.2014.01.038

Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Bundo M, Kato T. A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia. *Molecular Brain* 2014,7:5. (査読有)

DOI: 10.1186/1756-6606-7-5

Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K. Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron* 2014,81:306-313. (査読有)

DOI: 10.1016/j.neuron.2013.10.053

Mehta D, Iwamoto K, Ueda J, Bundo M, Adati N, Kojima T, Kato T. Comprehensive survey of CNVs influencing gene expression in the human brain and its implications for pathophysiology. *Neuroscience Research* 2014,79:22-33. (査読有)

DOI: 10.1016/j.neures.2013.10.009

Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Bundo M, Kato T. A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia. *Molecular Brain* 2014,7:5. (査読有)

DOI: 10.1186/1756-6606-7-5

Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, Takuma H, Bundo M, Iwamoto K, Tamaoka K, Murayama S, Saïdo T, Tsuji S. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Human Molecular Genetics* 2014,23:648-656. (査読有)

DOI: 10.1093/hmg/ddt451

Ikegame T, Bundo M, Sunaga F, Asai T, Nishimura F, Yoshikawa A, Kawamura Y, Hibino H, Tochigi M, Kakiuchi C, Sasaki T, Kato T, Kasai K, Iwamoto K. DNA methylation analysis of BDNF gene promoters in peripheral blood cells of schizophrenia patients. *Neuroscience Research* 2013,77:208-214. (査読有)

DOI: 10.1016/j.neures.2013.08.004

Ikegame T, Bundo M, Murata Y, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. DNA methylation of

the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *Journal of Human Genetics* 2013,58:434-438. (査読有)

doi: 10.1038/jhg.2013.65

Sugawara H, Bundo M, Ishigooka J, Iwamoto K, Kato T. Epigenetic regulation of serotonin transporter in psychiatric disorders. *Journal of Genetics and Genomics* 2013,40:325-329. (査読有)

doi: 10.1016/j.jgg.2012.10.002.

Asai T, Bundo M, Sugawara H, Sunaga F, Ueda J, Tanaka G, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Effect of mood stabilizers on DNA methylation in human neuroblastoma cells. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2013,16:2285-2294. (査読有)

doi: 10.1017/S1461145713000710

Nishioka M, Shimada T, Bundo M, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Kano Y, Sasaki T, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Neuronal cell-type specific DNA methylation patterns of the *Cacna1c* gene. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2013,31:89-95. (査読有)

DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2012.11.007

Nishioka M, Bundo M, Koike S, Takizawa R, Kakiuchi C, Araki T, Kasai K, Iwamoto K. Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. *Journal of Human Genetics* 2013,58:91-97. (査読有)

DOI: 10.1038/jhg.2012.140

Bundo M, Sunaga F, Ueda J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. A systematic evaluation of whole genome amplification of bisulfite-modified DNA. *Clinical Epigenetics* 2012,4:22. (査読有)

DOI: 10.1186/1868-7083-4-22

Nishioka M, Bundo M, Kasai K, Iwamoto K. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. *Genome Medicine* 2012,4:96. (査読有)

DOI: 10.1186/gm397

Yu CC, Furukawa M, Kobayashi K,

Shikishima C, Cha PC, Sese J, Sugawara H, Iwamoto K, Kato T, Ando J, Toda T. Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses of monozygotic twins discordant for intelligence levels. PLoS One 2012,7:e47081. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0047081

〔学会発表〕(計 55 件)

Iwamoto K. Increased L1 copy number in neuronal genome of schizophrenia and implications for its pathophysiology. 第 93 回日本生理学会 (2016 年 3 月 22-23、札幌コンベンションセンター、北海道)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.molbrain.com/>

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 和也 (IWAMOTO, Kazuya)
熊本大学・大学院生命科学研究部・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

文東 美紀 (BUNDO, Miki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：00597221

(4) 研究協力者

村田 唯 (MURATA, Yui)
西岡 将基 (NISHIOKA, Masaki)
池亀 天平 (IKEGAME, Tempei)
清田 恵美 (KIYOTA, Emi)
上田 順子 (UEDA, Junko)
才田 晴美 (SAIDA, Harumi)
宮内 妙子 (MIYAUCHI, Taeko)
渡邊 理紗 (WATANABE, Risa)