

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06167

研究課題名(和文)統合失調症におけるDPYDとIGHMの関与についての検討

研究課題名(英文)Investigation of involvement of DPYD and IGHM in schizophrenia

研究代表者

西村 文親(NISHIMURA, Fumichika)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20758990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症は社会的機能が低下する精神疾患であり、生物学的な病態解明が急がれる疾患の一つである。申請者は一卵性双生児統合失調症不一致例リンパ芽球様細胞を用いた発現解析から、候補遺伝子としてDPYDとIGHMを見出していた。しかし、その発現の差をもたらす原因については不明であり、その原因探索としてコピー数多型解析を一卵性双生児統合失調症不一致例3組を対象として行った。コピー数多型解析では、一卵性双生児不一致間のDPYDとIGHMには明らかなコピー数多型の差を認められなかった。全エクソン解析、DNAメチル化解析、エクソン欠失解析をDPYDとIGHMに対して今後行っていく必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Schizophrenia is one of mental disorders in which social function declines, and it is one of the debilitating diseases for which elucidation of the biological pathology is urgent. The applicant found DPYD and IGHM as candidate genes from expression analysis using lymphoblastoid cells of monozygotic twins discordant for schizophrenia. However, it is unknown what causes the difference in expression. Copy number variation analysis was performed as a cause investigation for three pairs of monozygotic twins discordant for schizophrenia. In the copy number variation analysis, there was no clear difference between DPYD and IGHM within discordant monozygotic twins. In the future, it seems necessary to conduct whole exon analysis, DNA methylation analysis, exon deletion analysis on DPYD and IGHM.

研究分野：統合失調症

キーワード：統合失調症 一卵性双生児不一致例 遺伝 環境 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、陽性症状、陰性症状、認知機能障害により、社会的機能が低下する精神疾患である。思春期以降に発症することが多く、再発と寛解を繰り返し、慢性の経過をたどる。根治的な治療法が存在せず、当事者のみならず家族も大きな苦悩を抱え、生物学的な病態解明が急務な疾患の一つである。

これまでの研究から遺伝要因の関与が明らかとなり、連鎖解析、候補遺伝子関連研究、全ゲノム関連研究などが行われたが、オッズ比も低く病態を説明し得る状態ではなかった。次世代シーケンサーの登場により、全エクソン解析や全ゲノム解析が行われ、トリオ研究や多発家系研究から稀な変異が報告されるようになったが、見出された稀な変異が、それぞれの患者での原因となっているのかを判定するのは困難で、候補遺伝子/変異は増大の一途をたどっている。このような状況の中で、一卵性双生児統合失調症不一致例を対象とした研究は別手法として、統合失調症の病態に近づくことができると考え、申請者は一卵性双生児統合失調症不一致例3組のリンパ芽球様細胞を用いて mRNA 発現解析を行った。そこからは、一卵性双生児統合失調症不一致例に分子生物学的な差異が存在すること、さらに不一致例内の罹患双生児全員において DPYD と IGHM が発現低下を示し、DPYD と IGHM が統合失調症の有力な候補遺伝子であることを示した。

大変興味深いことに、見出された DPYD は統合失調症との関連においてすでに報告されている遺伝子であった。2011年の全ゲノム関連研究において、統合失調症とゲノムワイドに有意な関連を示す7座位が得られ、このうち最も強い関連は、MIR137 (microRNA 137) の近傍の SNP に認められた。この SNP の LD block 内に DPYD も存在していたが、その後はむしろ MIR137 への注目が集まり、研究がすすめられていた。しかし、2013年に行われた全ゲノム関連研究とそれ以前に報告されていた全ゲノム関連研究の結果のメタ解析、さらに独立した検体での確認実験から、ゲノムワイドに22座位が有意と見出され、この中に、DPYD が含まれていた。さらに、2014年多段階の全ゲノム関連研究が報告され、108座位の128個の SNP がゲノムワイドに有意であったが、2位と107位に有意であった SNP が含まれた LD block 内に DPYD が存在していた。また、両親と孤発例統合失調症発端者のトリオを用いた全エクソン解析を行った研究では、アフリカ系白人における missense de novo 変異とアメリカ系白人における nonsense de novo 変異が DPYD 自身に見出された。以上のように、DPYD は近年の統合失調症の大規模全ゲノム関連研究で相次いでゲノムワイドに有意であることが報告され、トリオ研究からは非同義置換の de novo 変異の報告が異なる集団で報告されるなど、統合失調症との関連が

強く疑われる。一方、統合失調症の罹患と負の相関があることが示されてきた疾患である慢性関節リウマチにおいて、DPYD が関連研究において有意な関連が報告されていることも興味深い。

DPYD は DPYD をコードする遺伝子であり、ピリミジンの異化に関与する律速酵素として同定された。5-FU 体内投与後の分解の主要な経路であることから、DPYD 活性が低下している場合には、5-FU の投与により重大な副作用を起こすため、癌研究の分野での報告が多い。DPYD の塩基配列の変異もしくは、エクソン欠失などにより、5-FU 投与による副作用が報告されている。また、近年の研究で EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) には DPYD が必要であることが示された。EMT は神経堤細胞の発達分化に関与していることが知られているが、興味深いことに神経堤細胞の発達分化と統合失調症を高率で合併する 22q11.2 症候群の関連が報告されている。DPYD の中枢における機能の探索は統合失調症病態解明への端緒になる可能性があると考えられる。

一方で、IGHM は IgM の定常領域の μ 重鎖をコードする遺伝子である。免疫グロブリンは重鎖と軽鎖からなり、ジスルフィド結合で結びついている。免疫グロブリンの重鎖には、抗原結合部位を含む N 端可変領域と、C 端定常領域があり、C 端定常領域が μ 重鎖であるものは IgM のアイソタイプとなる。最新の統合失調症患者の全ゲノム関連研究において報告されている候補遺伝子が、免疫系特に B 細胞系において有意に発現している事が報告されており、B 細胞系である IgM の重鎖の定常領域をコードする遺伝子の発現変化は、B 細胞系の免疫と統合失調症の関連が示唆するものと考えられた。さらに、未服薬初発統合失調症患者の血漿を用いたプロテオミクス解析において $Ig\mu$ の低下が報告されており、統合失調症診断を補助するバイオマーカーとしての役割が期待される。また、統合失調症と同様に中枢神経疾患である考えられているアルツハイマー病と軽度認知障害のプロテオミクス解析において、 $Ig\mu$ の上昇が認められている。以上のように、 $Ig\mu$ の中枢神経系への関与、ひいては統合失調症病態への関与の可能性が示唆されたと考えられる。

2. 研究の目的

申請者が見出した DPYD と IGHM は統合失調症の有力な候補遺伝子である。今回一卵性双生児統合失調症不一致例から見出されたこの2遺伝子の発現変化をもたらす原因として塩基配列、コピー数多型、DNA メチル化等が考えられるが、これについて検討を行う事が必要と考えられる。本研究では、一卵性双生児統合失調症不一致例から候補遺伝子として考えられる DPYD と IGHM について、一卵性双生児統合失調症不一致例を

用いて、発現の差異をもたらした原因の探索を行い、DPYD と IGHM が候補遺伝子であるかの検討を行う。

現在候補遺伝子が増加する中で、一卵性双生児統合失調症不一致例を用いて、見出した2つの候補遺伝子について、発現の差異をもたらす原因探索の検討は、独創性がある研究と考えられる。本研究で、DPYD と IGHM の発現の差異をもたらす原因が発見されれば、より統合失調症の発症に関与している遺伝子である可能性が高く、またその発見自体が統合失調症の病態に緊密に関与している可能性が高く、動物モデルにそれを適用し、病態解明に直結しうると考えられる。以上のように、DPYD と IGHM が統合失調症の病態に関与しているかどうかの検討を行う。

3. 研究の方法

対象サンプルとして、一卵性双生児統合失調症不一致例3組を用いた。いずれの一卵性双生児も日本人である。

一卵性双生児不一致例の概要は以下のとおりである。STR (short tandem repeat) 法を用いて一卵性双生児である事を確認した。15箇所のSTRローカスを検出し、4組の一卵性双生児不一致例いずれにおいても全てのローカスにおけるSTR型は双生児内で一致し、一卵性双生児である確率は99.9999%以上となった。

Twin Pair 1: 精神科家族歴なし

統合失調症罹患双生児: 41歳、女性

23歳で統合失調症を発症した。統合失調症の診断は2名の精神科医がDSM-IVに基づき行った。

非罹患双生児: 41歳、女性

既往歴に乳がんがある。M.I.N.I. を用いて、精神疾患の有無を評価し、現在並びに過去に精神疾患であると診断されなかった。

Twin Pair 2: 精神科家族歴なし

統合失調症罹患双生児: 46歳、女性

41歳で統合失調症を発症した。統合失調症は2名の精神科医がDSM-IVに基づき、診断を行った。

非罹患双生児: 46歳、女性

M.I.N.I. を用いて、精神疾患の有無を評価し、現在並びに過去に精神疾患であると診断されなかった。

Twin Pair 3: 精神科家族歴に父方いどこに精神疾患の可能性があるが、詳細不明

統合失調症罹患双生児: 28歳、女性、統合失調症

25歳で統合失調症を発症した。統合失調症の診断は2名の精神科医がDSM-IVに基づき行った。

非罹患双生児: 28歳、女性

M.I.N.I. を用いて、精神疾患の有無を評

価し、現在並びに過去に精神疾患であると診断されなかった。

DPYD と IGHM の発現差異をもたらす原因探索として、全エクソン解析、コピー数多型解析、DNAメチル化解析を一卵性双生児統合失調症不一致例のゲノムDNAに対して行う。

全エクソン解析

全エクソンシーケンスを行い、双生児間で異なる変異を同定する。

具体的には、ゲノムDNA 3µgをSureSelect v4+UTRもしくはSureSelect v5+UTR (Agilent Technologies) を用いて、濃縮し、作成されたライブラリに対してHiSeq2000 (illumina) を用いて、100塩基のペアエンド法で配列解析を行う。

コピー数多型解析

array CGHを用いて、双生児内の遺伝子コピー数の違いの有無を確認する。

具体的には、ゲノムDNA 1µgを使用し、Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて、Cy3標識およびCy5標識gDNAを合成し、ターゲットを作製する。Cy3標識gDNAおよびCy5標識gDNAをCGH microarrayにハイブリダイゼーションし、レーザースキャナーを用いてCy3およびCy5の画像を取得する。Feature ExtractionでQC Report及び数値化データを算出する。以上の実験を、一卵性双生児の罹患者がCy3標識gDNAで、健常者がCy5標識されたgDNAである場合と、一卵性双生児の罹患者がCy5標識gDNAで、健常者がCy3標識されたgDNAである場合の2通り行い、dye swapを行う。

DNAメチル化解析

DNAメチル化はHuman Methylation450 BeadChip (illumina) を用いて、双生児内のメチル化の差異を解析する。

具体的には1µgのゲノムDNAをbisulfite処理後、whole genome amplificationを行い、Human Methylation450 BeadChipにハイブリダイゼーションを行う。一塩基伸長反応によって、プローブ末端に一塩基の標識ヌクレオチドを取り込ませた後、標識ヌクレオチドに対する蛍光色素標識抗体により染色を行い、iScan (illumina) を用いて蛍光イメージを取得する。出力された結果に対して、GenomeStudio (illumina) により、シグナル値が得られる。

4. 研究成果

原因探索としてコピー数多型解析を一卵性双生児統合失調症不一致例3組を対象として行った。コピー数多型解析では、一卵性双生児不一致間のDPYDとIGHMには明らかなコピー数多型の差を認められなかった。全エク

ソン解析、DNA メチル化解析、エクソン欠失解析を DPYD と IGHM に対して今後行っていく必要があると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 文親 (NISHIMURA, Fumichika)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20758990

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()