

機関番号：32643

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790859

研究課題名 (和文) 統合失調症の病因としてのゲノム不安定性とインプリンティングの解明

研究課題名 (英文) A study of genome instability and imprinting in schizophrenia.

研究代表者

上野 美華子 (UENO MIKAKO)

帝京大学・医学部・研究員

研究者番号：00398736

研究成果の概要 (和文)：われわれは、転移因子によるゲノム不安定性が統合失調症の病因であるとの仮説を提唱した。転移因子の動態は完全に固定されたものではなく、インプリンティング過程あるいは発症後にも進行している可能性がある。そこでわれわれは、統合失調症トリオサンプルおよび患者と対照者の経時的サンプルを用い、統合失調症患者における LINE-1 および Alu を介した de novo 変異についてスクリーニングを試みた。その結果、患者特異的な de novo 変異を同定することができた。本研究により、転移因子の動態が統合失調症のリスク因子の一つであることが推察された。今後、転移因子を介したさまざまな de novo 変異を調査していくことで、統合失調症の病因がより明確になってゆくものと期待された。

研究成果の概要 (英文)：We hypothesize that the genetic basis for schizophrenia is mutational events mediated by the mobile elements causing genome instability under the abnormal methylation. These dynamics of mobile elements is not fully fixed, and might be progressively in terms of imprinting or after event onset. Herein, we have attempted the screening of de novo mutations mediated by LINE-1 and Alu in patients from the schizophrenia trios and the sequential samples from patient and control subject. Consequently, we have identified the de novo mutation mediated by LINE-1 and Alu which were specific to patient. Our results suggested that the dynamics of mobile elements might be one of the risk factors for schizophrenia. Further research using screenings of de novo mutations mediated by mobile elements from various samples is needed to clarify the etiology in schizophrenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症、転移因子、LINE-1、Alu、de novo 変異、ゲノム不安定性、インプリンティング、経時的変異

1. 研究開始当初の背景

統合失調症患者ゲノムの特徴として、染色体脆弱性、リピート多型、そしてコピー数多型などが報告されている。これらのゲノム不安

定性を引き起こす要因として転移因子の活性化が考えられることから、われわれは、転移因子によるゲノム不安定性が統合失調症の病因であるとの仮説を提唱した。この仮説

に基づき、統合失調症ゲノムにおける転移因子の動態について調査を進めてきた。

2. 研究の目的

転移因子は、ゲノム不安定性を引き起こす内在性変異源である。転移因子は、宿主ゲノムの染色体上を挿入・欠失することにより、遺伝子の構造と機能にさまざまな影響を及ぼす。さらに、転移因子配列の反復性は、非対立相同組み換え（NAHR；nonallelic homologous recombination）の原因となり、周辺領域の重複・欠失・逆位・転座やコピー数多型（CNVs；copy-number variants）などの二次的変異を引き起こし、ゲノムの再配列や分化に寄与してきた。

統合失調症ゲノムでは、転移因子様配列が患者特異的配列として同定された（Kim et al. 1999）。さらに、一卵性双生児統合失調症一例では、患者特異的なレトロウイルス様配列（Deb-Rinker et al., 1999 and 2002）、ゲノム間差異（Tsuji et al. 1998, Nguyen et al. 2003）、そして転移因子抑制機構であるエピジェネティクスにおける異常（Singh et al. 2009）がそれぞれ同定された。さらに近年、microarray comparative genomic hybridization（アレイ CGH）法によって、統合失調症患者ゲノム内における copy number variations（CNV）が多数報告されている（Singh et al. 2009）。このように、これらの報告は、患者特異的な転移因子の動態を強く示唆するものである。

よって、われわれは「統合失調症の遺伝的基盤は、メチル化の緩みによって、転移因子が遺伝子の構造および機能変化を引き起こしたことにある」とのエピジェネティクスとゲノム不安定性を融合した仮説を提唱した。これまでに、転移因子の患者特異的な変異を探索し、統合失調症特異的な挿入変異領域を同定してきた。本研究では、異なる親由来にメチル化抑制を受ける転移因子のゲノムインプリンティングの性質を利用し、その性質ごとに、統合失調症トリオにおける de novo 変異の同定を試み、生殖細胞での転移因子の動態について検討した。本研究では、卵細胞ゲノム内で低メチル化となる LINE-1 と、精子ゲノム内で低メチル化となる Alu を対象に、変異解析を試みた。いずれもヒトゲノム内において転移活性を持ち、さまざまな疾患の病因となる遺伝子変異を引き起こすことで知られている（Batzer and Deininger 2002, Chen et al. 2005, Belancio et al. 2009）。さらに LINE-1 は、その動態が成人脳における神経可塑性に寄与していることが報告され（Muotri et al. 2009）、注目されている。

また、発生過程や環境の変化に伴って、メチル化レベルは大きく変動することが報告さ

れている。よって、統合失調症で報告されているゲノム不安定性とメチル化異常は、必ずしも固定された変異ではなく、患者の経過や環境などによって、経時的な変異を起こしている可能性が考えられる。そこで、経時的な変異スクリーニングについても試み、体細胞および生殖細胞での転移因子の動態について比較し、統合失調症におけるゲノム不安定性の全体像を多角的に解明することを目的とした。

一方、転移因子研究では、分子遺伝学的手法を用いた解析を複雑化させる場合が多く、さらに分子細胞遺伝学に至ってはゲノムペインティングやブロッキングなどに利用され、その de novo 変異は見落とされてしまいがちである。これらの解析技術の盲点に入り込んでしまっている転移因子研究に光を当てるのが、分子コーミング法である。

分子コーミング法は、DNA を伸展させ、1 分子単位で解析できる画期的な解析技術である。本手法は、伸展したコーミング DNA を FISH 法のテンプレートとして用いることにより、DNA1 分子を 1 ヌクレオチドから Mb 単位まで構造解析できる。すなわち、コーミング FISH 法は、PCR、シーケンス解析、サザンハイブリダイゼーションさらに染色体解析など、分子遺伝学的手法から細胞遺伝学的手法までをカバーする幅広い解析能をもつ。これまでに、本手法は、DNA 複製フォークの解析や遺伝子や染色体領域の構造変異解析などに利用されてきた。本研究では、分子コーミング法の簡易化についても試み、その新しい可能性についても検討した。

3. 研究の方法

DNA サンプル

生殖細胞由来の de novo 変異解析には、3 組の統合失調症トリオおよび 1 組の対照トリオのゲノム DNA を対象とした。体細胞における de novo 変異解析には、統合失調症患者 1 名の経時的サンプル（5 年ごと採血、3 回分）と健常対照者 1 名の経時的サンプル（5 年ごと採血、2 回分）を対象とした。分子コーミング法の簡易化および FISH プロブの増幅には、ヒトゲノム DNA（ロッシュ社）を用いた。本研究は、帝京大学医学部遺伝子研究倫理委員会の承認を得て行われた。

転移因子特異的 PCR-マイクロアレイ法

各ゲノム DNA をそれぞれテンプレートに用いて、LINE-1 または Alu 特異的インバース PCR をおこなった。PCR 条件は、10 分間の 94 ° C 変性ステップのあと、94 ° C 1 分、アニーリング 60 ° C 1 分、伸長 72 ° C 3 分を 35 サイクル、そして 10 分間の 72 ° C 最

終の伸長ステップとした。得られた PCR 産物は、QIAquick PCR purification kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。PCR 産物は Cy5 または Cy3 でそれぞれ蛍光標識し、二色一比較法による解析をおこなった。テンプレートとして、OpArray™ Human v4.0 マイクロアレイ (Operon Biotechnologies 社) を用い、Filgen 社受託解析サービスにて解析をおこなった。

CGH マイクロアレイ法

各ゲノム DNA をそのままプローブ DNA とした。それ以下の手続きは転移因子特異的 PCR-マイクロアレイ法と同じである。

データ解析

得られたマイクロアレイデータは、Normalization 後の Net intensity (mean) {sum} が、Negative Control の Net intensity (mean) {sum} の 2 倍より低いものを信頼性が低い値とし、カットオフした。シグナル強度が 1.5 倍 (LINE-1) または 2 倍 (Alu) 以上、0.5 倍以下を示したものを変動遺伝子として選抜した。選抜された変動遺伝子は、LINE-1 または Alu PCR-マイクロアレイ法の変動遺伝子から CGH マイクロアレイ法の変動遺伝子を除外したものを、LINE-1 または Alu 変異が発生した遺伝子領域とした。

コーミング法

各 DNA サンプルは、TE buffer (pH8.0) にて希釈し、10ng/μl の濃度に調整した。DNA 溶液は、APS コートスライドガラス (松波硝子) 上に、溶液 1μl ずつ滴下した。その後、ただちにカルノア溶液 (酢酸:エタノール=1:3) を滴下し、DNA 溶液を押し流した。風乾後、エタノールで脱水し、65°C で 3 時間処理した。

FISH 用プローブの作成

LINE-1、Alu、KCNH7 遺伝子特異的プライマーを用いて、配列の増幅をおこなった。ヒトゲノム DNA から増幅した DNA はクロニング後、配列を確認した。プローブのラベリングは、ULYSIS® 核酸標識キット (インビトロジェン社) にておこなった。

FISH 用 BAC プローブ

市販の BAC プローブである RFP2 (TRIM13) を含む ON DLEU (13q14) / 13qter (Kreatech 社) を用いた。その他の BAC については、GSP 研究所のカスタムプローブ受託サービスにてプローブの作成をおこなった。標識は FITC にておこなった。BAC プローブは反復配列フリーであり、分裂期中期染色体の FISH 法でシグナルが確認済

みである。

FISH 法

各コーミング DNA をテンプレートとし、プローブとのハイブリダイズをそれぞれおこなった。プローブ溶液は、各プローブ DNA が最終濃度 20ng/μl、ブロック DNA (サケ精子 DNA) が 1μg/μl となるように、GSP ハイブリダイゼーション Buffer にて調整した。コーミング DNA が貼り付いたスライドガラスは、アルカリ変性後、アルコールシリーズで脱水した。90°C、5min で熱変性したプローブ溶液をスライドガラスに 10μl 滴下し、37°C で一晩ハイブリダイゼーションをおこなった。洗浄は、室温の 2×SSC 内で 5min、50°C の 3% Tween20 in 2×SSC で 2min、さらに室温の 2×SSC 内で 5min おこなった。その後、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI で封入した。撮影および画像解析は、Leica 蛍光顕微鏡 DM2500 および Leica Application Suite LAS にておこなった。

4. 研究成果

マイクロアレイ法を用いた変異スクリーニング

統合失調症患者特異的な転移因子を介した de novo 変異領域の網羅的スクリーニング法として、マイクロアレイ法を利用した。転移因子特異的 PCR と CGH マイクロアレイ法を組み合わせ、コピー数多型の影響を受けない転移因子変異スクリーニング法を確立した。

統合失調症トリオサンプルを用いた LINE-1 PCR-マイクロアレイ法による解析では、患者由来 PCR 産物が両親由来 PCR 産物の 1.5 倍以上のシグナル強度を示したものが、6 遺伝子領域で同定された。一方、Alu PCR-マイクロアレイ法による解析では、患者が両親の 2 倍以上のシグナル強度を示したものが 32 遺伝子領域で同定された。よって、トリオサンプルでの de novo 変異の特徴は、転移因子の増加型であることが明らかとなった。また、これらの変異領域を比較したところ、LINE-1 および Alu に共通した変異のホットスポットは確認されず、それぞれ異なる領域で活性化していることが明らかとなった。よって、由来する親によって変異領域が異なる可能性が示唆された。これまでに、Alu は Gene-rich 領域に局在しているのに対し、LINE-1 は遺伝子の少ないゲノム領域に局在していると考えられてきた。本研究においても、LINE-1 の変異領域が極端に少なかったのは、LINE-1 の活性が必ずしも低いのではなく、その分布領域が非遺伝子領域に局在していることを示しているものと推察さ

れた。本解析で使用したマイクロアレイは、エクソン領域のみを搭載したものであった。よって、LINE-1 の動態の網羅的スクリーニングには、非遺伝子領域をより多く含むマイクロアレイが適している可能性が考えられた。

また、Alu 変異については、ホットスポットが確認された。トリオサンプル4組において、7つの遺伝子で子特異的シグナルが確認され、統合失調症患者特異的シグナルが2遺伝子領域で確認された。これらの患者特異的な Alu 変異領域のうち、TRIM13 (RFP2) 遺伝子の1 Mb 下流には、対照トリオにおいても *de novo* 変異が確認されたことから、本遺伝子周辺領域 もまた生殖細胞における Alu 変異のホットスポットである可能性が示唆された。

一方、体細胞における Alu の動態については、患者ゲノムで10年間にわたり発生し続けている Alu の経時的変異が、26遺伝子領域で同定された。対照者ゲノムと共通の変異領域は検出されなかったことから、これらの遺伝子領域は患者の臨床症状や経過に関与している可能性が考えられるとともに、患者を取りまく環境変化の痕跡である可能性が推察された。また、患者ゲノムにおける経時的変異の特徴は、欠失型であることが明らかとなり、Alu 欠失の進行が統合失調症の病因に関与している可能性が考えられた。また、生殖細胞と体細胞における *de novo* 変異をそれぞれ比較したところ、共通の変異領域は確認されなかった。

分子コーミング法の簡易化と FISH 法による変異解析

DNA Walking 法など PCR ターゲット領域内に転移因子配列が含まれる場合、*de novo* 変異の解析領域は限定されたものとなるため、変異の全体像が不明瞭であった。よって、コーミング DNA を用いた FISH 法による解析をおこない、LINE-1 および Alu PCR-マイクロアレイ法で同定された *de novo* 変異領域の構造解析を試みた。

本研究では、分子コーミング法の簡易化をおこなった。分子遺伝学用に抽出したゲノム DNA サンプルを用い、市販のコーティング済みスライドガラスを用いて、コーミング DNA 標本を容易に作成することに成功した。本研究により、染色体研究において汎用されているカルノア液は、DNA の伸展にも有効であることが確認された。カルノア液で押し出された DNA は、一定方向に櫛状に並列して伸展し、伸展するに従って DNA の重なりが解消され、固定されていた。さらに、得られたコーミング DNA は、FISH 法の処理過程においても十分な耐性を持っていた。汎用

されている材料や溶液を使用した簡易化は、本手法をより利用しやすいものとし、ゲノムの構造解析におけるさまざまな問題点を解決することが期待された。

Alexa 488 にて標識した LINE-1 および Alexa 594 にて標識した Alu は、コーミング DNA 上でドット状のシグナル群として確認でき、明瞭に分染することができた (Fig.1)。これまでの研究で、LINE-1 および Alu は散在型反復配列であるため、その解析法は限定されたものであった。特に、その *de novo* 変異の解析はさまざまな問題を伴った。染色体を対象とした FISH 法では、染色体全域で検出されるため、マイナー変異を検出するプローブとしては不相当であり、PCR 解析では、Alu を介して artifact を増幅してしまう危険性があった。ところが、コーミング FISH 法においてこれらの解析上の問題点はむしろ利点となった。散在型であるため、コーミング DNA 上では適度な間隔をもってドット状のシグナルとして容易に検出できた。さらに、コーミング FISH 法は、artifact を回避するだけでなく、1分子の DNA を対象とするため、マイナー変異の検出に適していた。既知の BAC プローブのシグナル領域の長さから推定して、LINE-1 および Alu ともに、kb 単位で検出できることが明らかとなった。

さらに、トリオサンプルの FISH 解析では、Alexa 488 にて標識した LINE-1 プローブおよび Alexa 594 にて標識した KCNH7 プローブを用い、KCNH7 遺伝子領域における患者特異的な LINE-1 の局在を同定することができた。さらに、Alexa 488 にて標識した Alu プローブおよび TexRed にて標識した ON DLEU (13q14) / 13qter プローブを用い、TRIM13 遺伝子領域における患者特異的な Alu の局在を確認することができた (Fig.2)。経時的サンプルでは、Alexa 594 にて標識した Alu プローブ および GSP1038D01 プローブを用いて、TPM4 領域における患者特異的な Alu の減少を確認することができた (Fig.3)。以上のことから、コーミング FISH 法による解析結果は、マイクロアレイ法によるスクリーニング結果と一致し、変異を裏付けることができた。

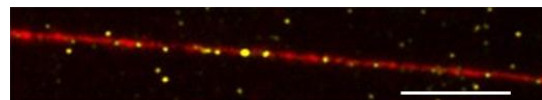


Figure1. FISH on combed DNA using LINE-1 labeled by Alexa488 and AluYa5 labeled by Alexa594 as probe. Scale bar is 10 μ m.

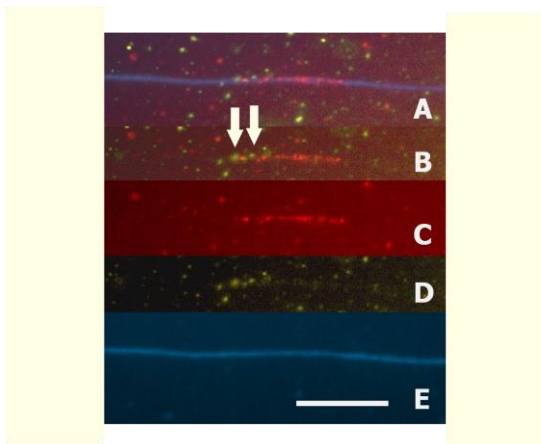


Figure2. Multicolor FISH on combed DNA using Repeat-Free™ Poseidon™ FISH Probes ON DLEU (13q14) / 13qter (C) and AluYa5 labeled by Alexa488 (D) as probes. The slides were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, E). (A) Merge of all signals (B) Merge of C and D. Scale bar is 10µm.

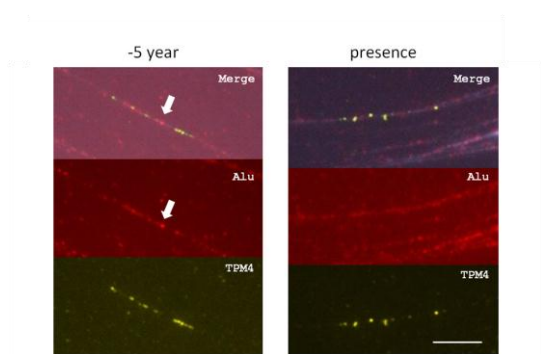


Figure3. Multicolor FISH on combed DNA from the patient using GSP1038D01 and AluYa5 as probes. Scale bar is 10µm.

統合失調症におけるゲノム不安定性

本研究では、トリオサンプルおよび経時的サンプルにおいて、転移因子の患者特異的な *de novo* 変異が確認され、転移因子の動態が疾患へ寄与していることが推察された。さらに、トリオサンプルにおいて LINE-1 と Alu とで異なる動態を示したことから、由来する親によって変異領域が異なる、すなわちインプリンティングによる差異の可能性も示唆された。しかしながら、トリオサンプルで得られた *de novo* 変異はすべて増加型であったのに対し、経時的サンプルにおける *de novo* 変異は主に欠失型であったため、トリオサンプルで検出された変異は、体細胞由来、すなわち親子の年齢差が反映している可能性も

否定できない。よって、トリオサンプルにおける *de novo* 変異については、今後さらなる解析が必要である。

LINE-1 および Alu は、自身の挿入だけでなく、周辺領域の NAHR や CNV などの二次的変異を引き起こす。近年の統合失調症の CNV 解析において、さまざまな遺伝子領域における欠失や微小欠失が報告されているが、それらの要因として LINE-1 および Alu の関与が考えられる。さらに、ゲノムの過剰増幅産物の排出機構 DM (Double Minutes) 内における LINE-1 および Alu の局在が報告され、生体における機能や動態がますます注目されている。本研究では、統合失調症特異的な *de novo* 変異が末梢血由来のゲノム DNA サンプルにおいて確認されたが、同様に神経細胞においても発生している可能性は高い。今後、LINE-1 および Alu を介したさまざまな *de novo* 変異を調査していくことで、統合失調症におけるゲノム不安定性とその病因がより明確になってゆくものと期待される。

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)

[学会発表] (計 10 件)

① 上野 美華子、赤羽 晃寿、秦 孝憲、南光 進一郎. 統合失調症における TRIM13 遺伝子領域の Fluorescent in situ hybridization (FISH) 解析. 日本人類遺伝学会第 55 回大会. 2010 年 10 月 27-30 日, さいたま市

② 上野美華子、赤羽 晃寿、秦 孝憲、南光 進一郎. 統合失調症における Alu 変異の経時的スクリーニング. 第 32 回日本生物学的精神医学会, 2010 年 10 月 7-9 日, 北九州市

③ Ueno M., Akahane A., Hata T., Nanko S. Screenings of *de novo* L1-mediated mutations in schizophrenia. The XVIIIth World Congress on Psychiatric Genetics, 2010 年 10 月 3-7 日, アテネ

④ 上野 美華子、赤羽 晃寿、秦 孝憲、南光 進一郎. 一卵性双生児統合失調症不一致例における RASEF 遺伝子変異. 第 5 回日本統合失調症学会, 2010 年 3 月 26-27 日, 福岡

⑤ Ueno M., Akahane A., Hata T., Nanko S. *De novo* Alu-mediated mutations of endoplasmic reticulum stress-related genes in schizophrenia. 9th World Congress of Biological Psychiatry, 2009 年 6 月 28-7 月 2 日, パリ

⑥ Ueno M., Akahane A., Hata T., Nanko S. *De novo* mutations of transposable element derived gene in schizophrenia. The XVIth World Congress for Psychiatric Genetics,

2008年10月11-15日, 大阪

⑦Ueno M., Akahane A., Hata T., Nanko S.
De novo mutations of endoplasmic reticulum
stress-related genes in schizophrenia.
The XVth World Congress for Psychiatric
Genetics, 2008年10月11-15日, 大阪

⑧上野 美華子、赤羽 晃寿、秦 孝憲、南光 進
一郎. マイクロアレイ法により同定され
た統合失調症における TRIM 遺伝子の新規変
異. 日本人類遺伝学会第53回大会, 2008年
9月27-30日, 横浜市

⑨Nanko S, Akahane A., Hata T., Ueno M.
Identification of spermatogenesis-related
genes in a patient with schizophrenia. The
XIV World Congress of Psychiatry., 2008年
9月20-25日, プラハ

⑩Nanko S, Akahane A., Hata T., Ueno M.
De novo mutation of tumor suppressor gene
in a patient with schizophrenia. The XXVI
CINP (Collegium Internationale
Neuro-Psychopharmacologicum), 2008年7月
13-17日, ミュンヘン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 美華子 (UENO MIKAKO)

帝京大学・医学部・研究員

研究者番号: 00398736