

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791216

研究課題名(和文) 治療前後の統合失調症の血液を用いた網羅的DNAメチル化修飾解析研究

研究課題名(英文) DNA methylation signatures of peripheral leukocytes in schizophrenia

研究代表者

沼田 周助 (NUMATA, Shusuke)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：10403726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：抗精神病薬を内服していない統合失調症患者と健常者のセットならびに一方のみが統合失調症を発症した一卵性双生児ペアのセットを用いて、ゲノム網羅的にDNAメチル化修飾解析を行った(485,764CpGサイト)。ファーストセットでは10,747CpGサイトで、セカンドセットでは15,872CpGサイトで、2群間のDNAメチル化修飾の差異を認め、共通するDNAメチル化修飾の変化を234CpGサイトで認めた。これらのサイトは、CpGアイランドだけでなく近傍のCpGアイランドショーやシェルフにも位置し、遺伝子のプロモータ領域だけでなくGene bodyや3'-非翻訳領域など遺伝子の広範囲に位置していた。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide DNA methylation profiling (485,764 CpG sites) of peripheral leukocytes was conducted in the first set of samples (24 medication-free patients with SCZ and 23 non-psychiatric controls) using Infinium HumanMethylation450 Beadchips. Second, a monozygotic twin study was performed using three pairs of monozygotic twins that were discordant for SCZ. Finally, the data from these two independent cohorts were compared. A total of 234 differentially methylated CpG sites that were common between these two cohorts were identified. Of the 234 CpG sites, 153 sites (65.4%) were located in the CGIs and in the regions flanking CGIs (CGI: 40.6%; CGI shore: 13.2%; CGI shelf: 11.5%). Of the 95 differentially methylated CpG sites in CGIs, most of them were located in the promoter regions (promoter: 75.8%; gene body: 14.7%; 3'UTR: 2.1%). Aberrant DNA methylation in SCZ was identified at numerous loci across the whole genome in peripheral leukocytes.

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：schizophrenia, DNA methylation epigenetic microarray monozygotic twins

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は罹患率1%と頻度が高く、WHOによれば長期的な障害をきたす疾患のうちでトップ10に入る主要疾患であり、思春期から成人早期に発症し、慢性・再発性の経過をたどる疾患である。統合失調症は多因子疾患であり、遺伝因子と環境因子が相互に作用して発症すると考えられている。統合失調症には、メンデルリアンの遺伝形式で説明できない、塩基配列が極めて類似した一卵性双生児でも発病一致率が約50%程度である、家族歴のない孤発症例が多い、性差がある、等の遺伝要因だけでは説明できない側面が存在する。エピジェネティクスは塩基配列によらない遺伝情報の発現制御機構であり、胎内や胎外での生育環境、栄養、薬剤、感染などの環境因子がエピジェネティクスに作用し、遺伝子発現に変化を来すことが知られている。DNAメチル化修飾はエピジェネティクス機構の1つであり、シトシン塩基(C)とグアニン塩基(G)が連続している配列の部分(CpG)でシトシンがメチル化されることをいい、プロモータ領域に存在するCGが豊富なCpGアイランドと呼ばれる領域のDNA低メチル化が遺伝子発現の活性化に、DNA高メチル化が遺伝子発現の抑制に働くとされており、近年、統合失調症においても注目を集めている。しかし、これまでの既報論文では解析対象領域が遺伝子のプロモータ領域のCpGアイランド内に限局されており、また抗精神病薬を内服していない患者サンプルを用いた報告はなかった。

2. 研究の目的

私は、統合失調症のDNAメチル化修飾に注目し、統合失調症の病態に関与する新しい遺伝子の同定、末梢血バイオマーカーの同定、向精神薬のメチル化修飾を介した新たな治療機序の解明、を目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 抗精神病薬を内服していない統合失調症患者と健常者のセットならびに一方のみ

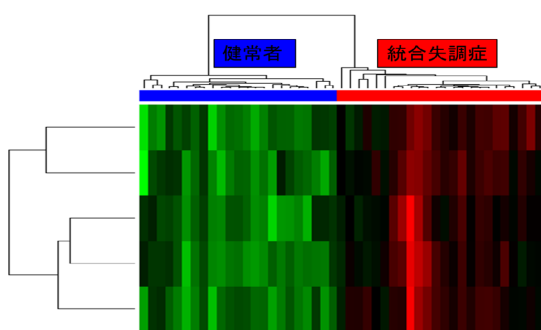
が統合失調症を発症した一卵性双生児ペアのセットを用いて、ゲノム網羅的にDNAメチル化修飾解析を行った。対象としたのは、24名の薬を内服していない統合失調症患者と23名の性・年齢の一致した健常ボランティアであり、文書に基づいて説明し、研究への参加の文書同意を得たのち末梢白血球を採取した(ファーストセット)。さらに、一方のみが統合失調症を発症した一卵性双生児不一致例3組から得た試料を長崎大学医学部精神神経科学教室から供与を受けた(セカンドセット)。解析は、バイサルファイト処理を行った後、Infinium® HumanMethylation450 Beadchips (Illumina社)を用いて485,764CpGサイトのDNAメチル化修飾レベルを調べた。ファーストセットの解析では surrogate variable analysis を、セカンドセットの解析では paired *t* 検定を行い、統合失調症サンプルと健常者サンプルのDNAメチル化修飾の違いを解析した。

(2) 抗精神病薬を内服している統合失調症患者42名と性年齢の一致した健常者42名の血漿ホモシチン濃度をHPLC法で測定し、比較した。次に、統合失調症患者42名の末梢血から抽出したDNAとInfinium® HumanMethylation450 Beadchips (Illumina社)を用いてゲノムワイドメチル化解析を行った。最後に、統合失調症患者における血漿ホモシチン濃度とメチル化レベルの関連を調べた。

4. 研究成果

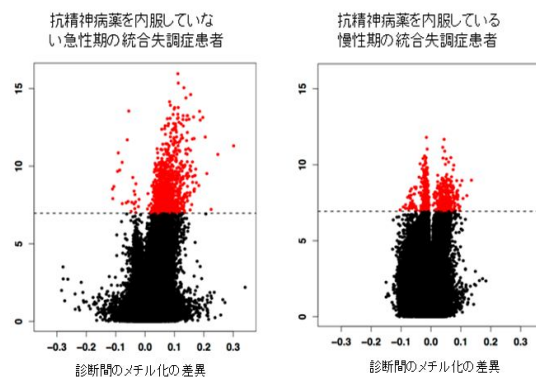
(1) ファーストセットでは10,747CpGサイトで、セカンドセットでは15,872CpGサイトで、疾患群と健常者群の2群間のDNAメチル化修飾の差異を認めた。2つのセット間で共通するDNAメチル化修飾の変化を234CpGサイトで認めた。これらのサイトは、CpGアイランドだけでなく近傍のCpGアイランドショーやシェルフにも位置し、遺伝子のプロモ-

タ領域だけでなく Gene body や 3' -非翻訳領域など遺伝子の広範囲に位置していた。以上の結果より、抗精神病薬を内服していない統合失調症患者に認められ、かつ一方のみが統合失調症を発症した一卵性双生児例にも共通する DNA メチル化修飾の異常は、遺伝子の広範囲に渡っていることが示唆された。このような知見は統合失調症においてこれまでに報告はなく、統合失調症の病態解明の一助となると思われた。さらに、我々は統合失調症の診断マーカーとしての可能性を検討し、本研究で同定した統合失調症で DNA メチル化修飾が変化していた CpG サイトを用いてクラスター解析したところ、健常者群と統合失調症群の 2 群に分けることができた。この結果により DNA メチル化修飾を利用した診断マーカー作成の可能性が示唆された。統合失調症の診断は臨床症状に基づいて行われ、未だ診断補助に役立つ生物学的バイオマーカーは確立されていないことから、我々が同定したメチル化診断マーカーが臨床応用できれば、診断・治療向上につながる可能性がある。今後、独立した大規模サンプルでの再現性検証実験や気分障害などの他の精神疾患との違いを検討する研究を計画している。



(2) 統合失調症患者の平均血漿ホモシステイン濃度は 19.5 ± 7.2 nmol/mL、健常者の平均ホモシステイン濃度は 12.4 ± 2.9 nmol/mL で、患者群で有意に高ホモシステイン血症を認めた。統合失調症患者でホモシステイン濃度と DNA メチル化レベルとの関連を調べたところ、解析対象とした 164,657CpG サイトの

内 1,338 サイトで有意な関連を認めた ($p < 0.01$)。1,338 サイトの内、580 サイト (43.3%) で、ホモシステイン濃度とメチル化レベルに正の相関を認めた。特に、CpG アイランド内のサイトは正の相関を示す傾向を認めた (71.7%)。本研究は、血漿ホモシステイン濃度と DNA メチル化修飾レベルとの関連をゲノムワイドに調べた初めての研究であり、特定の遺伝子のメチル化レベルが血漿ホモシステイン濃度に関係することを明らかにした。この結果は、統合失調症の独立したリスクであると報告されてきた高ホモシステイン血症の統合失調症における新たな分子メカニズム解析に寄与すると思われる。さらには、抗精神病薬で治療を受けている統合失調症患者のメチル化異常のパターンが (疾患群で高メチル化が 50%程度) 抗精神病薬で治療を受けていない統合失調症患者のパターンと異なることも明らかにした (疾患群で高メチル化がほとんど)。



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 10 件)

Watanabe S, Iga J, Nishi A, Numata S, Kinoshita M, Kikuchi K, Nakataki M, Ohmori T. Microarray analysis of global gene expression in leukocytes following lithium treatment. Hum Psychopharmacol. 査読有, 29(2), 2014, 190-198. doi: 10.1002/hup.2381.

Liu J, [Numata S](#), Ikeda M, Watanabe Y, Zheng XB, Luo X, Kinoshita M, Nunokawa A, Someya T, Ohmori T, Bei JX, Chong SA, Lee J, Li Z, Liu J, Iwata N, Shi Y, Li M, Su B. An evaluation of association between a novel hippocampal biology related SNP (rs7294919) and schizophrenia. *PLoS One*. 査読有, 8(11), 2013, e80696. doi: 10.1371/journal.pone.0080696. eCollection 2013.

Kinoshita M, [Numata S](#), Tajima A, Shimodera S, Imoto I, Ohmori T. Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia. *Epigenetics*. 査読有, 8(6), 2013, 584-590. doi: 10.4161/epi.24621.

Kinoshita M, [Numata S](#), Tajima A, Shimodera S, Ono S, Imamura A, Iga J, Watanabe S, Kikuchi K, Kubo H, Nakataki M, Sumitani S, Imoto I, Okazaki Y, Ohmori T. DNA methylation signatures of peripheral leukocytes in schizophrenia. *Neuromolecular Med*. 査読有, 15(1), 2013, 95-101. doi: 10.1007/s12017-012-8198-6.

Ikeda M, Aleksic B, Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Matsuo K, [Numata S](#), Watanabe Y, Ohnuma T, Kaneko T, Fukuo Y, Okochi T, Toyota T, Hattori E, Shimodera S, Itakura M, Nunokawa A, Shibata N, Tanaka H, Yoneda H, Arai H, Someya T, Ohmori T, Yoshikawa T, Ozaki N, Iwata N. Genetic evidence for association between NOTCH4 and schizophrenia supported by a GWAS follow-up study in a Japanese population. *Mol Psychiatry*. 査読有,

18(6), 2013, 636-638. doi:

10.1038/mp.2012.74.

Watanabe SY, Iga J, [Numata S](#), Nakataki M, Tanahashi T, Itakura M, Ohmori T. Association Study of Fat-mass and Obesity-associated Gene and Body Mass Index in Japanese Patients with Schizophrenia and Healthy Subjects.

Clin Psychopharmacol Neurosci. 査読有, 10(3), 2012, 185-9. doi:

10.9758/cpn.2012.10.3.185.

Tanaka T, Tomotake M, Ueoka Y, Kaneda Y, Taniguchi K, Nakataki M, [Numata S](#), Tayoshi S, Yamauchi K, Sumitani S, Ohmori T, Ueno S, Ohmori T. Clinical correlates associated with cognitive dysfunction in people with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. 査読有, 66(6), 2012,

491-8. doi:

10.1111/j.1440-1819.2012.02390.x.

Kinoshita M, [Numata S](#), Tajima A, Ohi K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Itakura M, Takeda M, Ohmori T. Meta-analysis of association studies between DISC1 missense variants and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res*. 査読有,

141(2-3), 2012, 271-3. doi: 10.1016/j.schres.2012.07.020.

[Numata S](#). A commentary on the gender-specific association of TSNAX/DISC1 locus for schizophrenia and bipolar affective disorder in South Indian population. *J Hum Genet*. 査読有, 57(8), 2012, 475-476. doi:

10.1038/jhg.2012.82.

Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Umeda-Yano S, Okada T, Kamino K, Morihara T, Iwase M, Kazui H,

18(6), 2013, 636-638. doi:

10.1038/mp.2012.74.

Numata S, Ikeda M, Ohnuma T, Iwata N, Ueno S, Ozaki N, Ohmori T, Arai H, Takeda M. Functional genetic variation at the NRG1 gene and schizophrenia: evidence from a gene-based case-control study and gene expression analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 査読有,159B(4), 2012, 405-13. doi: 10.1002/ajmg.b.32043.

[学会発表](計 17 件)

木下誠、沼田周助、土屋篤司、村木翔、西晃、田嶋敦、井本逸勢、大森哲郎、血漿ホモシステイン濃度に影響を与える機能性多型の統合失調症遺伝子関連研究、第9回日本統合失調症学会、2014年3月14日、京都テレサ、京都府

沼田周助、統合失調症における血漿ホモシステイン濃度とDNAメチル化修飾～ビタミン投与による治療の可能性を探る～、ビタミンB研究委員会、2014年1月31日、大阪大学中之島センター、大阪府

Akira Nishi, Shusuke Numata, Atsushi Tajima, Kumiko Kikuchi, Makoto Kinoshita, Shinji Shimodera, Masahito Tomotake, Issei Imoto, and Tetsuro Ohmori. Total plasma homocysteine and schizophrenia: gender and *MTHFR* C677T genotypes. *Neuroscience 2013*, 2013年11月9日, San Diego Convention Center, USA

Makoto Kinoshita, Shusuke Numata, Atsushi Tajima, Kazutaka Ohi, Ryota Hashimoto, Shinji Shimodera, Issei Imoto, Masatoshi Takeda and Tetsuro Ohmori. The effect of *MTHFR* C677T on DNA methylation of peripheral leukocytes in schizophrenia. *Neuroscience 2013*, 2013年11月9日,

San Diego Convention Center, USA

沼田周助、木下誠、田嶋敦、下寺信次、橋本亮太、井本逸勢、武田雅俊、大森哲郎。治療抵抗性統合失調症のバイオマーカー、第23回日本臨床精神神経薬理学会、2013年10月24日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県

沼田周助、木下誠、大森哲郎、ゲノム・ワイドメチル化解析からみた統合失調症の病態、第23回日本臨床精神神経薬理学会、2013年10月24日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県

Masahito Nakataki, Satsuki Sumitani, Hiroko Kubo, Shusuke Numata, Jun-Ichi Iga, Shin-Ya Watanabe, Makoto Kinoshita, Masafumi Harada, Tetsuro Ohmori. Structural brain asymmetry in obsessive-compulsive disorder. 11th world congress of biological psychiatry, 2013年6月23日, Kyoto International Conference Center、京都府

Shu-Suke Numata, Kumiko Kikuchi, Atsushi Tajima, Makoto Kinoshita, Shinji Shimodera, Masahito Tomotake, Issei Imoto, Tetsuro Ohmori. Plasma homocysteine and schizophrenia: A gender-specific meta-analysis. 11th world congress of biological psychiatry, 2013年6月23日, Kyoto International Conference Center、京都府

Makoto Kinoshita, Shusuke Numata, Atsushi Tajimia, Shinji Shimodera, Issei Imoto, Tetsuro Ohmori. Genome-wide association study of plasma homocysteine and DNA methylation in patients with schizophrenia. 11th world congress of biological psychiatry, 2013年6月23

日, Kyoto International Conference Center、京都府

Shu-Suke Numata, Makoto Kinoshita, Atsushi Tajima, Shinji Shimodera, Jun-ichi Iga, Shinya Watanabe, Issei Imoto, Tetsuro Ohmori. Genome-wide methylation status of human leukocytes in mood disorders. 11th world congress of biological psychiatry, 2013年6月23日, Kyoto International Conference Center、京都府

Shinya Watanabe, Jun-Ichi Iga, Shusuke Numata, Makoto Kinoshita, Tetsuro Ohmori. Biological diagnostic test for major depressive disorder based on the leukocytes gene expression: Preliminary study. 11th world congress of biological psychiatry, 2013年6月23日, Kyoto International Conference Center、京都府

Shusuke Numata. DNA Methylation Signatures of Prefrontal Cortex and Peripheral Leukocytes in Schizophrenia. Society of Biological Psychiatry 68th Annual Meeting. 2013年5月16日, Hilton Hotel, USA.

沼田周助、木下誠、田嶋敦、下寺信次、橋本亮太、武田雅俊、井本逸勢、大森哲郎、統合失調症における末梢血 DNA メチル化修飾解析研究、第8回日本統合失調症学会、2013年4月19日、浦河町総合文化会館、北海道

伊賀淳一、渡部真也、西晃、沼田周助、木下誠、中瀧理仁、大森哲郎、白血球遺伝子発現を指標としたリチウムの精神薬理学的研究、第22回日本臨床精神神経薬理学会、2012年10月18日、栃木県総合文化センター、栃木県

Shusuke Numata, Makoto Kinoshita, Atsushi Tajima, Shinji

Shimodera, Jun-ichi Iga, Shinya Watanabe, Issei Imoto, Tetsuro Ohmori. Blood-based DNA methylation biomarkers for schizophrenia. Neuroscience 2012, 2012年10月13日, Ernest N Morial Convention Center, USA
沼田周助、木下誠、田嶋敦、大井一高、橋本亮太、下寺信次、井本逸勢、武田雅俊、大森哲郎、メタアナリシス解析を用いた DISC1 機能多型と統合失調症の遺伝子関連研究、第34回日本生物学的精神医学会、2012年9月28日、神戸国際会議場、兵庫県
Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Watanabe S, Iga J, et al. Genome-wide DNA methylation analysis using peripheral blood samples derived from unmedicated patients with schizophrenia. 28th CINP Congress, 2012年6月3日, Stockholmssmassan, Sweden.

〔図書〕(計 2 件)

沼田周助、大森哲郎、ライフサイエンス、開発中の薬剤の動向、2013、270(67-74)
沼田周助、大森哲郎、日経メディカル開発、ガイドライン外来診察 2013(統合失調症)、2013、658(546-552)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼田周助 (NUMATA, Shusuke)
徳島大学・大学病院・講師
研究者番号: 10403726

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし