

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461718

研究課題名(和文)自殺感受性遺伝子の中樞神経系における機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of suicide-related genes in brain

研究代表者

菱本 明豊 (Hishimoto, Akiyo)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50529526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は過去最大規模の500名の自殺既遂者DNAを用いたGWASを施行し、PTCHD3とRAB18という自殺感受性遺伝子候補を見出した。これらの遺伝子の中樞神経系での機能を調べるため、動物モデルとマウス神経幹細胞を用いた実験を行った。慢性ストレスモデルラットの前頭前皮質や海馬ではPTCHD3の発現が上昇し、同ラットの扁桃体ではRAB18発現が低下していた。RAB18発現を抑制した神経幹細胞では、細胞の増殖・生存が上昇していた。ストレス下におけるこれら遺伝子の発現異常が中樞神経系機能に影響を及ぼすことが示唆されたものの、今後は追加試料でのGWASやさらなる機能解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：The genetic research of complete suicide is behind other mental problems because it is extremely difficult to obtain tissue samples of completed suicide. Under the difficult situation, we performed a GWAS using 500 samples of suicide completers, and found two candidates of suicide-related gene; PTCHD3 and RAB18.

Here, we investigated the function of these candidate genes in chronic stressed rats and mouse neural stem cells. Stressed rats showed higher PTCHD3 expression in prefrontal cortex and hippocampus, and lower RAB18 expression in amygdala. In mouse neural stem cells with RAB18 knockdown, cell proliferation and survival were significantly increased compared to controls. Our results suggest aberrant expression of these suicide-related genes may be associated with brain abnormalities in stress conditions. Replication GWAS of suicide completers and further in vivo and in vitro analyses are needed in future studies.

研究分野：分子精神医学

キーワード：自殺 GWAS 動物モデル 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

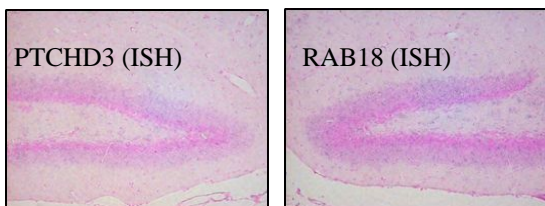
日本は諸外国の中でも非常に自殺者数が多く、長年の深刻な社会問題となっている。一卵性双生児は二卵性に比して自殺の双方完遂率が10倍以上も高いという報告があり (Bondy et al, Mol Psychiatry 2006) 自殺には生来の遺伝負因が深く関わっているとされる。しかしながら自殺既遂者試料の入手が困難なこともあり、他の精神科領域に比して、自殺の遺伝学的研究は大きく遅れている。そんな中、当研究グループは遺族の深いご理解の下、現在までに900例を超える自殺既遂者血液DNAを保有している。この我々は本研究の予備的研究として、自殺者については過去最大規模となる自殺既遂者500例と健常人8000例 (理研のオープンデータ) のゲノムワイド関連解析 (GWAS) を施行し、PTCHD3 遺伝子およびRAB18 遺伝子関連の SNP が $p \text{ value} = 1 \times 10^{-7 \sim 5}$ のクラスターを形成することを見出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が GWAS を用いて同定した自殺感受性遺伝子候補について、自殺者死後脳やストレスモデルラットの脳組織、マウス神経幹細胞を用いた *in vivo*、*in vitro* の解析を行うことにより、自殺の生物学的機序にアプローチすることである。

3. 研究の方法

当科が保有する自殺者死後脳における PTCHD3 遺伝子の蛋白発現変化をウェスタンブロッティング法により行ったが、抗体特異性の観点から有意なシグナルが得られなかった。ISH 法により、2週齢の C57BL/6 マウスの脳組織における PTCHD3 と RAB18 の発現分布を測定し、両遺伝子が脳内に発現していることを確認した。



慢性ストレスモデルラット (生後7週齢の Male Wister/ST ラットに拘束ストレスを3時間/日×7日間与え、2週間後に sacrifice) の脳各組織 (前頭前皮質・海馬・扁桃体) における PTCHD3・RAB18 それぞれの遺伝子発現を測定した。

新生仔マウス海馬由来神経幹細胞 (mNSC) の初代培養系を確立し (図4) mNSC において PTCHD3 遺伝子と RAB18 遺伝子がそれぞれ発現しているかをリアルタイム PCR、ウェスタンブロットで確認した。また Stealth RNAiTM siRNA (Invitrogen®) を用いた RNAi 法で、mNSC における RAB18 遺伝子発現抑制を試みた。さらには RAB18 遺伝子発現抑制が mNSC の細胞表現型に及ぼす影響の解析を行った。

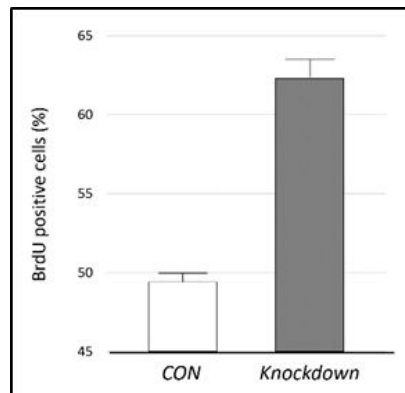
4. 研究成果

慢性ストレスモデルラットの前頭前皮質や海馬では PTCHD3 の発現が有意に上昇し、同ラットの扁桃体では RAB18 発現が有意に低下していた (各群 N=9)。

mNSC において PTCHD3 遺伝子と RAB18 遺伝子がそれぞれ発現しているかをリアルタイム PCR、ウェスタンブロットで確認したところ、PTCHD3 は非常に弱い発現しか認めなかった一方で、RAB18 は mRNA レベル、蛋白レベルともに十分な発現を認めた。よって、我々は RAB18 遺伝子にターゲットを絞り、その後の解析を進めることとした。RNAi 法により mNSC における RAB18 遺伝子発現抑制を試みたところ、Stealth RNAiTM siRNA (Invitrogen®) にて顕著な遺伝子発現抑制効果を確認した。そこで、RAB18 遺伝子発現抑制が mNSC の細胞表現型に及ぼす影響の解析を下記の通り行った。

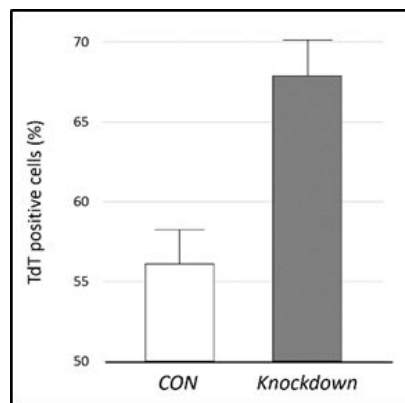
a. 増殖 (Proliferation)

mNPSC の増殖能について、FACS を用いた BrdU アッセイで評価を行った。RAB18 遺伝子発現を抑制した mNSC 群において、顕著な増殖能増加を確認した (各群 N=9, 下図)。



b. 生存 (抗 Apoptosis)

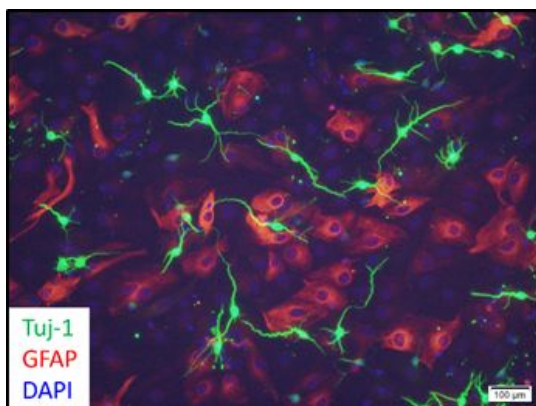
mNPSC の生存率について、FACS を用いた TUNEL 法で評価を行った。RAB18 遺伝子発現を抑制した mNSC 群において、顕著な生存率増加を確認した (各群 N=7, 下図)。



c. 分化 (Differentiation)

mNPSC の Neuron への分化能について、各細胞腫特異的なマーカーを用いた免疫染色にて評価を行った。RAB18 遺伝子発現を抑制した mNSC 群と Control 群において、分化の程

度に顕著な差は認めなかった(下図)



自殺とも関連が強いとされる慢性ストレスモデル動物の中樞神経系において PTCHD3 や RAB18 の遺伝子発現が変化することが示唆された。また神経幹細胞において、特に RAB18 遺伝子発現を抑制することが細胞表現型に影響を及ぼすことが確認された。GWAS により同定した自殺感受性遺伝子候補がストレス下の中樞神経系異常に関わる可能性が示唆される結果となった。今後は、より多くの自殺既遂者 DNA を用いた replication GWAS や、in vivo/in vitro のさらなる解析が必要であると考えられる。

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)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Otsuka I, Izumi T, Boku S, Kimura A, Zhang Y, Mouri K, Okazaki S, Shiroywa K, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I, Hishimoto A. Aberrant telomere length and mitochondrial DNA copy number in suicide completers. *Scientific Reports* (in press).
2. Shimmyo N, Hishimoto A, Otsuka I, Okazaki S, Boku S, Mouri K, Horai T, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I. Association study of MIF promoter polymorphisms with suicide completers in the Japanese population. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2017;13:899-908.
3. Hoya S, Watanabe Y, Hishimoto A, Nunokawa A, Inoue E, Igeta H, Otsuka I, Shibuya M, Egawa J, Sora I, Someya T. Rare FBX018 variations and risk of schizophrenia: whole-exome sequencing in two parent-affected offspring trios followed by resequencing and case-control studies. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2017. [Epub ahead of print]
4. Yamaki N, Hishimoto A, Otsuka I, Sasada T, Boku S, Saito T, Yasuda Y, Yamamori H, Ikeda M, Ikeda M, Sora I, Iwata N, Hashimoto R. Optimizing Outcomes in Clozapine Rechallenge Following Neutropenia Using Human Leukocyte Antigen Typing: A Case Report. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2017. [Epub ahead of print]
5. 自殺既遂の生物学的研究. 大塚郁夫、曾良一郎、菱本明豊. 日本神経精神薬理学雑誌;36:55-62, 2016.
6. Okazaki S, Boku S, Otsuka I, Mouri K, Aoyama S, Shiroywa K, Sora I, Fujita A, Shirai Y, Shirakawa O, Kokai M, Hishimoto A. The cell cycle-related genes as biomarkers for schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2016;70:85-91.
7. Eguchi N, Hishimoto A, Sora I, Mori M. Slow synaptic transmission mediated by TRPV1 channels in CA3 interneurons of the hippocampus. *Neuroscience Letter* 2016;616:170-176.
8. Watanabe Y, Nunokawa A, Shibuya M, Ikeda M, Hishimoto A, Kondo K, Egawa J, Kaneko N, Muratake T, Saito T, Okazaki S, Shimasaki A, Igeta H, Inoue E, Hoya S, Sugai T, Sora I, Iwata N, Someya T. Rare truncating variations and risk of schizophrenia: Whole-exome sequencing in three families with affected siblings and a three-stage follow-up study in a Japanese population. *Psychiatry Research* 2016;235:13-18.
9. Hishimoto A, Nomaru H, Ye K, Nishi A, Lim J, Aguilan JT, Nieves E, Kang G, Angeletti RH, Hiroi N. Molecular Histochemistry Identifies Peptidomic Organization and Reorganization Along Striatal Projection Units. *Biological Psychiatry* 2016;79(5):415-420.
10. Ratta-Apha W, Mouri K, Boku S, Ishiguro H, Okazaki S, Otsuka I, Sora I, Arinami T, Shirakawa O, Hishimoto A. A decrease in protein level and a missense polymorphism of KIF17 are associated with schizophrenia. *Psychiatry Research* 2015;230:424-429.
11. Ratta-Apha W, Boku S, Mouri K, Okazaki S, Otsuka I, Watanabe Y, Nunokawa A, Someya T, Shirakawa O, Sora I, Hishimoto A. Association analysis of the HLA-DRB1*01 and HLA-DRB1*04 with schizophrenia by tag SNP genotyping in the Japanese population. *Psychiatry Research* 2015;229:627-628.

12. Otsuka I, Watanabe Y, Hishimoto A, Boku S, Mouri K, Shiroya K, Okazaki S, Nunokawa A, Shirakawa O, Someya T, Sora I. Association analysis of Cadherin 13 gene with schizophrenia in the Japanese population. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2015;11:1381-1393.

〔学会発表〕(計4件)

1. 大塚郁夫、泉剛、木村敦、張園、岡崎賢志、新名尚史、山木愛久、朴秀賢、菱本明豊。自殺者におけるテロメア・ミトコンドリア異常 第35回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 2016.11月
2. Akitoyo Hishimoto, Hiroko Nomaru, Kenny Kenny, Akira Nishi, Jihyeon Lim, Jennifer T Aguilan, Edward Nieves, Gina Kang, Ruth H Angeletti, Noboru Hiroi. Molecular histochemistry identifies peptidomic organization and reorganization along striatal projection units. 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学大会 合同年会 2016.9月
3. Akitoyo Hishimoto, Shuken Boku, Hiroki Ishiguro, Kentaro Mori, Woraphat Ratta-apha, Ichiro Sora. A decrease in protein level and a missense polymorphism of KIF17 are associated with schizophrenia 30th CINP WORLD CONGRESS OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 2016.7月
4. 菱本明豊、朴秀賢、泉剛、曾良一郎、白川治。自殺感受性遺伝子の中樞神経における機能解析 第34回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 2015.9月

〔図書〕(計1件)

1. Depression Frontier 2: うつ病臨床のこんな疑問に答える - 脳科学からのアプローチ -, 医薬ジャーナル社, 2017. (分担執筆: 自殺の遺伝子研究, p 49 - 60)

〔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

菱本 明豊 (Hishimoto, Akitoyo)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 50529526

(2)研究分担者

曾良 一郎 (Sora, Ichiro)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 40322713

泉 剛 (Izumi, Takeshi)
北海道大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 60312360

(3)連携研究者

渡邊 雅彦 (Watanabe, Masahiko)
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号: 70210945

久住 一郎 (Kusumi, Ichiro)
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30250426