

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26461759
 研究課題名(和文) 近交系マウスエクソーム解析によるプレパルス抑制遺伝子同定と統合失調症での評価

 研究課題名(英文) Quantitative trait loci analysis of prepulse inhibition using exome data from inbred mouse strains and its application to the identification of schizophrenia susceptibility genes

 研究代表者
 豊田 倫子 (TOYOTA, TOMOKO)

 国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・客員研究員

 研究者番号：20392045
 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)：統合失調症の中間表現型と考えられているプレパルス抑制の量的遺伝子座解析(QTL解析)を、C57BL/6NとC3H/HeN系統のマウスで行った。両系統のゲノム配列については、パブリックデータベースに公開されていないため、我々自身で全エクソン配列解析を行った。エクソン多型を用いた高精度のQTL解析から、アミノ酸置換を伴うCdh23 753A/Gを責任多型として同定した。さらにこの遺伝子を統合失調症サンプルでエクソンシーケンシングすることによって、統合失調症特異的な稀な変異を複数同定した。よってCDH23遺伝子が統合失調症の発症脆弱性に関与している可能性を得た。

研究成果の概要(英文)：Fine mapping of pre-pulse inhibition - quantitative trait loci (PPI-QTL) by using exonic variants in C57BL/6N and C3H/HeN mouse strains has revealed the Cdh23 (Cadherin-Related 23) as a putative candidate gene and a splice site mutation is suggested to be causal for PPI modulation. We have validated the role of Cdh23 in C3H/He mouse strain with poor PPI, by 'knocking in' the non-causal variant to rescue the lowered PPI by using CRISPR/Cas9 system. We further clarified the expression pattern of Cdh23 in mice and the neurodevelopment-dependent expression profile of CDH23 in human iPS-derived cells. We have also identified multiple rare variants in schizophrenia samples. These results should provide novel insight into the complex genetic network pertaining to sensorimotor gating function and underlying neural mechanism of schizophrenia.

研究分野：精神医学、精神科遺伝学

キーワード：統合失調症 中間表現型 感覚情報フィルター マウス近交系 量的遺伝子座解析 CDH23遺伝子 ゲノム編集 エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

最近の統合失調症の GWAS では、2 万人を超える統合失調症と約 4 万人のコントロールを解析して、22 のリスク SNP (一塩基多型) を報告したが、同じ論文で統合失調症のリスク SNP は 8,300 ありその殆どが共通なものであると試算している (Ripke et al., Nature Genetics, 2013)。しかし 8,000 以上のリスク SNP をゲノムワイドの有意水準で示すには、非現実的なサンプル数が要求される。このような状況下では、GWAS でゲノムワイドの有意水準以下の遺伝子のうち、「False negative (type II error)」になっているものを、他の生物学的検証系を用いてエビデンスの確度を上げていくのが有効で、かつ必要な作業であると考えた。我々は以前、精神疾患関連生物学的パラメータ = エンドフェノタイプ、かつ実験動物でも観察可能というパラダイムに基づいて、マウスでプレパルス抑制 (PPI) を制御している遺伝子座を「量的表現型の遺伝子座 (QTL)」解析という手法を持って解析し報告した (図 1)。精神疾患、特に統合失調症の一群およびその血縁者では PPI が減弱していることが報告されている。そして図 1 のマウス染色体 10 番からは *FABP7* を、11 番からは *SHMT1* 遺伝子を候補として取り出し、ヒト統合失調症でも関連が認められることを報告した (*PLoS Biology*, 2007; *J Neurochemistry*, 2010)。ただ、QTL 解析の欠点は、責任遺伝子を同定する作業が 1 つの遺伝子毎に非常に困難なことにある。この作業を工夫して効率よくスクリーニングする方法を確立し、その後科学的合理性を持った候補リストを作製することができれば、ヒト遺伝学に橋渡しすることが可能となる。遺伝子関連解析技術の飛躍的な進歩で、多数の遺伝子をヒトサンプルで「Genotyping」することは、困難ではなくなった。我々は本研究において、QTL 候補遺伝子を絞り、ヒト統合失調症サンプルで遺伝子解析を行い、統合失調症の遺伝的基盤の landscape 解明に向けた貢献をしたいと考えた。

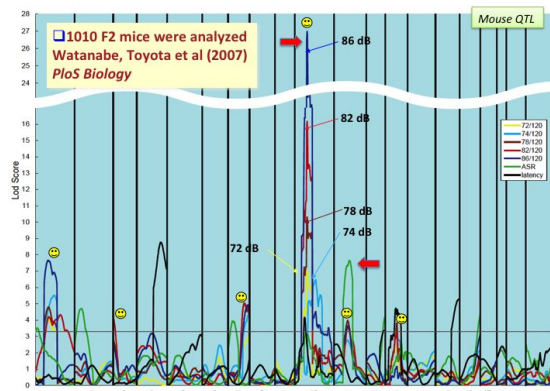


図 1: 我々が以前行ったマウス PPI の QTL 解析

2. 研究の目的

(1) いろいろなマウス近交系の全ゲノム配列は Jackson Laboratory から公開されているが、我々が QTL 解析に用いた C57BL/6N (NIH strain) と C3H/HeN (NIH strain) については、全ゲノムシーケンスは行われていない。そこで、我々は両系統の全エクソン配列解析をすでに行い、そのデータを持ち合わせている。

(2) 図 2 で主なピークは 6 箇所ある。各ピークにおいて、どちらの系統由来の遺伝子が PPI を上げるかあるいは下げるかはすでに報告済みである。また、各 QTL ピークについて、原因遺伝子は 1 つとは限らないことを念頭においている。

(3) 全エクソームデータを元に、どちらか一系統でナンセンス変異、フレームシフト変異がみられるもの、およびミスセンス変異のうち、高度の機能障害がアルゴリズムで予測されるものを選別する。

(4) 上記で選別された SNV (single nucleotide variant) を用いて、6 箇所の QTL 領域を再マッピングする。

(5) 再検出されたピークから 1 lod score 下がった範囲 (1-lod interval) (95% の確率で責任遺伝子が存在する) に位置する SNV を持った遺伝子をリストアップする。

(6) 上記の workflow で絞り込んだ遺伝子につき、対応するヒトホモログ遺伝子から tag SNP を拾い、約 2,000 人の統合失調症サンプル、年齢・性別をマッチさせたほぼ同数のコントロールサンプルを用いて、関連を調べる。

上記、(1)-(6) の作業工程で研究を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) いろいろなマウス近交系の全ゲノム配列は Jackson Laboratory から公開されているが、我々が PPI の QTL 解析に用いた C57BL/6N (NIH strain) と C3H/HeN (NIH strain) については、全ゲノムシーケンスは行われていない。そこで、我々は両系統の全エクソン配列解析をすでに行い、取得済みのデータの中からタイピングに用いるエクソン変異を以下の手順で選別する：

GATK (The Genome Analysis Toolkit) Unified Genotyper (McKenna et al., 2010) を用いて、SNV (single nucleotide variant) と indel 変異を同定する。この際、phred-scaled confidence threshold の最小値を 50 に設定する。これは、「base calling」のエラー率が 0.001% 以下に相当し、図 4 に示すように次世代シーケンサーから SNP (single nucleotide polymorphisms) を読み取る際の、一般的なプロトコールに基づいている。

上記基準を用いて、以前検出した 6 箇所の QTL ピークをファインマッピングするために、ピークの ± 20 Mbp 周辺から追加でエクソン

SNV を選択する。

さらに以下の基準を適用する：

- 1 Mbp あたり 1 つの SNV という密度
- PPI の不良な C3H/HeN でダメージな SNV
- 両方の染色体に載っている (inbred mouse なので homozygous でないと、SNV が artifact の可能性がある)
- PASS のフラグがついている変異に絞る (エクソームシーケンスの QualityControl の一種)

これらの作業の後、アミノ酸変異 SNV については、GERP score > 5

(<http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/index.html>), Provean score < -2.5 (<http://provean.jcvi.org/index.php>) の基準を用いてさらに絞り込む。

(2) (1) で選択した SNV を 1,010 匹の F2 世代マウスの DNA を用いてタイピングする。プラットフォームは、Illumina BeadXpress, MassARRAY Analyzer 4 (Sequenom, Inc.), TaqMan システムを組み合わせで行う。

(3) QTL の計算の仕方には、大まかには 3 つの方法があるが、まず Composite Interval Mapping (CIM) 法を用い、その後さらに遺伝子間相互作用や性別の影響を調べるために、Bayesian method を適用する。CIM に関しては、R/qtl (<http://www.rqtl.org/>) ソフトウェアパッケージを、Bayesian method に関しては、Multimapper (<http://www.mi.helsinki.fi/~mjs/>) ソフトウェアパッケージに組み込まれているものを用いる。

機能的 SNV でマップされた QTL 結果を元に、各ピークから 1 lod score 下がった範囲 (1-lod interval) (95% の確率で責任遺伝子が存在する) に位置する SNV を持った遺伝子をリストアップする。

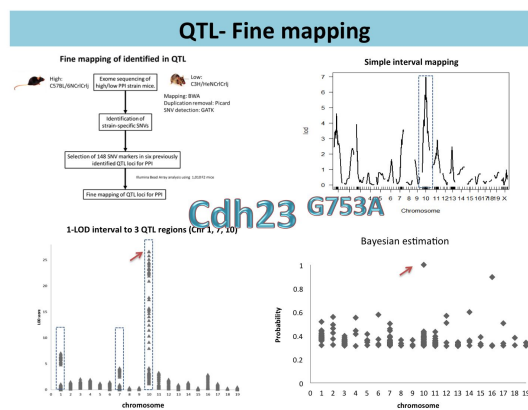
(4) 以上のマウスの解析により候補になった遺伝子につき、集団遺伝学的方法を用いて標的遺伝子の tag SNP (近隣のゲノム多型を代表する一塩基置換) を選択する。この際、HapMap の日本人データベースを参照する。選択した tag SNP は Illumina BeadXpress, MassARRAY Analyzer 4 (Sequenom, Inc.), TaqMan システム (ABI700 使用) を組み合わせてタイピングを行う。なお、tag SNP は minor allele frequency が 0.05 以上のものを採用する。

4. 研究成果

(1) PPI ゲノムマッピング

我々がプレパルス抑制 (PPI) の QTL 解析に用いた C57BL/6N と C3H/HeN のゲノム配列については、パブリックデータベースに公開されていないため、両系統の全エクソン配列解析を行い、検出された SNV (single

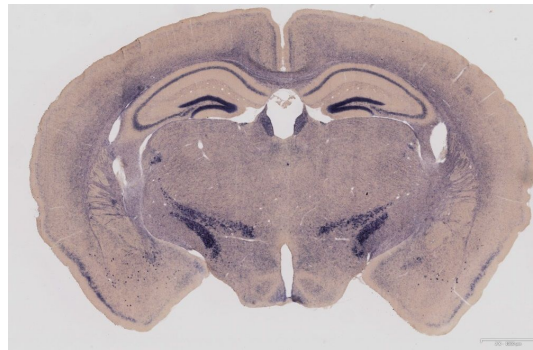
nucleotide variant) の中から、「マウス染色体 10 番にある QTL のタイピング」に用いるエクソン内多型を、上記に記した方法で選択した。次にそれぞれの SNV につき、PPI-QTL のロッドスコアを interval mapping 法と Bayesian evaluation 法の 2 つの統計解析方法を用いて計算した。その結果、アミノ酸置換を伴う *Cdh23* 753A/G が最も可能性が高いことが判明した (図 : 2)。



2 : PPI-QTL の高精度マッピング結果

(2) *Cdh23* 遺伝子の生物学的検討

本遺伝子はカドヘリンスーパーファミリーに属する一員で、カルシウム依存的細胞間接着を媒介するグリコプロテインをコードしている。エクソンは合計 69 個あり、いろいろなスプライスバリエーションの存在が報告されている。*Cdh23* 753A/G もエクソンスキッピングに関係することが知られている。これまで *Cdh23* は内耳に発現されていることは報告されていたが、前脳部位での発現は殆ど報告がなかった。そこで我々は in situ hybridization 法で、P0, P6, P21 (図 3) の C57BL/6N マウス (雄雌両方) と C3H/HeN マウス (雄雌両方) 脳での発現を調べた。その結果、*Cdh23* 遺伝子は扁桃核、海馬、視交叉上核等で発現しており、発現量のピークは P6 にあることが判明した。なお、発現パターンについては、マウス系統差、性別による違い



は見られなかった。

図 3 : C57BL/6N P21 の *Cdhd23* in situ hybridization

(3) ゲノム編集による *Cdh23* 遺伝子の操作

以上のマウス遺伝学的解析から、C57BL/6N (B6), C3H/HeN (C3H) 系統間の PPI の違いは *Cdh23* 753A/G (B6 が 753A/A ; C3H が 753G/G) による可能性が高まった。そこで、B6 バックグラウンドのマウスが *Cdh23* 753G/G (C3H 型遺伝子型) となるように CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いてノックインマウスを作成した。結果は予期したとおり、PPI の低下を惹起した (図 4)。

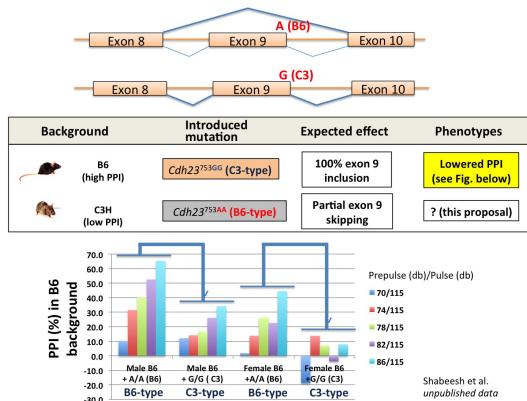


図 4 : B6 バックグラウンドで、*Cdh23* 遺伝子を C3 型に置き換えたときの PPI

逆方向の操作、すなわち C3 バックグラウンドのマウスが *Cdh23* 753A/A (B6 型遺伝子型) となるような実験も試みたが、C3 の受精卵では CRISPR/Cas9 がうまく働かないことが判明し、断念せざるを得なかった。*Cdh23* 753A/A、*Cdh23* 753G/G の両遺伝子型について、PPI を測定する 12 週齢前後のマウスで驚愕音刺激反応、聴性脳幹反応、走査型電子顕微鏡による内耳の微細構造 (図 5) 等を精査したが、聴覚機能に差があるという所見は得られなかった。

SEM: B6 (AA) to C3 (GG)

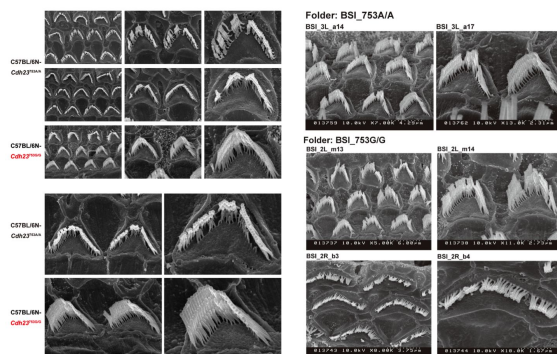


図 5 : B6 バックグラウンドで、*Cdh23* 遺伝子を C3 型に置き換えたマウスと C3 マウスの内耳の走査型顕微鏡解析

このことは、*Cdh23* 753G/G (C3H 型遺伝子型) が聴覚機能に関係なく PPI の低下に寄与していると考えられる。ただ、PPI が良好である 753A/A 型は、部分的なエキソン 9 のスキッピングを引き起こし (-エキソン 9-エキソン 10-) (脳の領域によってもスキッピングの程度は異なる) (図 5) またイントロン 9 がスプライスアウトされずエキソン 9 から引き続き転写が伸張しイントロン 9 の内部の途中で転写が中止するトランスクリプト産物も一部生成されることを確かめた。これらのゲノム事象と PPI という表現型の因果関係はなお不明である。

(4) iPS 細胞を用いた解析

CDH23 遺伝子の発現がヒトの神経系細胞で発達依存的に制御されているかどうか調べるために、iPS 細胞、そこから分化させた neurosphere (神経幹細胞塊)、さらに分化させた neuron を用意し、real-time PCR 法で *CDH23* mRNA の発現を測定した。発現量は、iPS 細胞 < neurosphere < neuron となっており、発達依存的発現制御が確認された (図 6)。

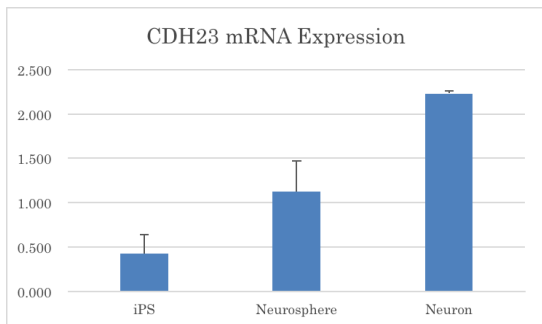


図 6 : iPS 細胞系譜での *CDH23* mRNA の絶対発現量解析

(5) *CDH23* 遺伝子のヒト遺伝学的解析

ヒトでの *CDH23* 遺伝子のスクリーニングは次のように行った :

統合失調症サンプル 1,200 例を用いて、MIP (Molecular Inversion Probe) 法により *CDH23* 遺伝子の全エクソンをスクリーニング。MIP 法は、原理的には multiplex PCR と次世代シーケンサー解析を組み合わせたものである。*CDH23* 遺伝子の全エクソンをカバーするために、152 個の MIP プローブを設計した (図 7)。

コントロールとしては、約 2,000 人分の日本人ゲノムデータベースである ToMMo を参照した (図 7)。

結果は、でのスクリーニングから計 71 個のミスセンス多型が検出され、との対比から、日本人統合失調症特異的多型は 23 個となった。23 個の多型について、いろいろなアルゴリズムを用いて機能帰結を予想した。これまでの結果を総合すると、マウスでのプレパルス抑制遺伝子の quantitative trait loci (QTL) 解析-全ゲノム配列解析との対照から、*Cdh23* 遺伝子が検出され、さらにこの

遺伝子を統合失調症サンプルで exon sequencing することによって、統合失調症特異的な rare variant が複数検出された。よって、*CDH23* 遺伝子が統合失調症の発症脆弱性に関与している可能性を得た。これらの結果を現在論文にまとめているところである。

Molecular Inversion Probes (MIP)法を用いたエクソンシーケンス

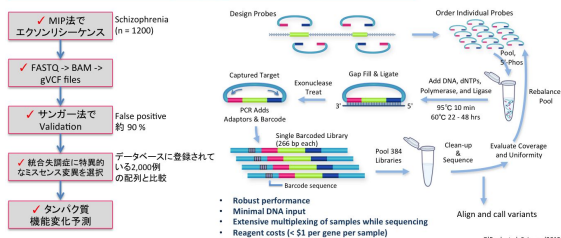


図 7 : MIP 法の作業工程

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

豊田 倫子 (TOYOTA, Tomoko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・客員研究員
研究者番号 : 20392045

(2)研究分担者

吉川 武男 (YOSHIKAWA, Takeo)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・チームリーダー
研究者番号 : 30249958

SHABEESH BALAN

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・訪問研究員
研究者番号 : 70721588

(3)連携研究者

下郡 智美 (shimogori, Tomomi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・チームリーダー
研究者番号 : 30391981