

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09800

研究課題名(和文) 一卵性双生児統合失調症不一致例及び健常一致例の遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Gene expression analysis in monozygotic twins discordant for schizophrenia and control twins

研究代表者

垣内 千尋 (Kakiuchi, Chihiro)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90342766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症は生物学的な病態の解明が急務である。もし生物学的な違いが統合失調症不一致例双生児間に存在すれば、その差異は疾患に関わる手がかりとなる可能性があると考えられる。本研究では、一卵性双生児統合失調症不一致例のリンパ芽球における網羅的遺伝子発現解析を行い、mRNA発現レベルでは不一致例双生児間に差異が存在する可能性があること、さらにDPYD及びIGHMが統合失調症病態解明のための候補遺伝子であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Schizophrenia is a severe mental disorder of which molecular mechanisms must be clarified. If there were biological differences between the monozygotic twins discordant for the illness, the differences might be the clues. In this study, we showed the possibility that the differences of mRNA expression profiles in lymphoblastoid cells existed between the monozygotic twins discordant for schizophrenia, and further, we suggested DPYD and IGHM as the candidate genes for schizophrenia.

研究分野：精神神経科学

キーワード：統合失調症 一卵性双生児不一致例 mRNA発現 リンパ芽球

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、幻覚・妄想などの陽性症状および感情鈍麻・意欲低下・思考障害・社会的ひきこもりなどの陰性症状により社会的機能が低下する慢性精神疾患である。生涯有病率約1%と推計され、思春期以降若年期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。十分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、病態、特に生物学的な病態の解明が急務である。

臨床疫学的研究からは、統合失調症における遺伝的要因の関与が示されてきた。従来、複数のリスク遺伝子が発病に関与するという common disease, common variant 仮説をもとに、大規模集団を対象とした候補遺伝子関連解析がなされてきた。しかし次々と結果が示されているゲノムワイド関連研究も含め様々な遺伝子の関連が示唆されているが、一定した結果がみられたものは乏しく、またオッズ比も低い、など病態を十分に説明し得る状況にはない。近年では、稀ではあるが浸透率の高い変異を想定した rare variant 仮説も注目され、次世代シーケンサーの登場により、全エクソンあるいは全ゲノムの多数例での解析も可能となってきた。現に稀な変異も想定した大規模なエクソーム研究が行われ、多くの有力な候補遺伝子やその変異、カスケードが示されている (Purcell SM, et al. Nature. 2014 Feb 13; 506(7487): 185-190.)。しかし、やはり多数例対多数例の比較の中では、見出された稀な個々の変異が、果たしてそれぞれの患者での原因ないし浸透率の高いものとなっているのかははっきりせず、候補遺伝子/変異の数はさらに増大の一方をたどっている。

遺伝学的研究により得られるメリットの一つは動物モデルへの適用により、分子機序の解明につながることである。稀ではあっても確実に疾患に結び付くものがあれば、大きな進歩をもたらす可能性がある。近年急速に進展した、全ゲノム関連研究、全エクソン大規模研究は、従来では得られなかった無数の有用な情報を含んでいることは間違いないが、霊長類も含めた動物モデルの可能性がさらに進歩している現在、直接的に応用できるような変異の絞り込みを可能にする、異なるアプローチがさらに必要な状況となっていると考えられる。

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はその絞り込みに対する一つのアプローチとなる可能性があると考えられる。一卵性双生児疾患不一致例においては、疾患以外の個人間差異を可能な限りキャンセルできることが想定され、生物学的な差異があれば、疾患への高い浸透率を有する可能性が示唆される。申請者はかつて統合失調症一卵性双生児不一致例二組のリンパ芽球を用いた DNA マイクロアレイによる網羅的

mRNA 発現解析から、患者において ADM 及び SEPX1 の発現上昇さらに CD200 の発現低下を見出した (Kakiuchi C, et al. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008 Jul 5; 147B(5): 557-564.)。当時の報告では、ADM は統合失調症リンパ芽球研究で唯一発現上昇が報告されていた遺伝子であり、SEPX1 は別の末梢血由来細胞における発現上昇が報告されていたものであった。この結果は双生児不一致例には生物学的差異が存在することを示唆するものと考えられたが、網羅的な解析の中で、また、疾患と関わる無数の候補遺伝子が示されている中で偶然重なっただけの可能性も否定できず、そもそも、不一致例内に本当に疾患に関連する生物学的差異が存在するかも明確ではなかった。

2. 研究の目的

本研究は、新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例3組および健常双生児一致例3組を対象とし、リンパ芽球を用いたエクソンアレイによる発現解析を行い、統合失調症不一致例と健常双生児一致例での mRNA 発現変動の比較から、統合失調症不一致例において、生物学的差異が存在するか、を改めて検討し、差異が存在するならば、その差は何かを検討することにより、候補遺伝子を絞り込むことを目的とした。

3. 研究の方法

統合失調症不一致例3組(42歳女性、42歳女性、25歳女性)および健常双生児一致例3組(いずれも女性)を対象とした。

採血後にリンパ球を分離し、Epstein-Barr ウイルスを用いて芽球化した。以下により細胞培養、mRNA を抽出した上でエクソンアレイにより mRNA 網羅的発現解析を行った。

各双生児内において統計学的に変動している遺伝子を抽出するため、一組あたり3回の独立した培養を行った。それぞれの双生児はセットで培養を行い、培養時期による影響が生じないようにした。

エクソンアレイは SurePrint G3 Human Exon マイクロアレイキット 2x400K を用いて行った。Total RNA 50ng から Cy3 標識されたターゲット RNA を作成、断片化の後、ハイブリダイゼーションを行った。DNA マイクロアレイスキャナ (Agilent DNA Microarray Scanner (G2565CA)) を用いて画像の取得を行い、その画像から、Feature Extraction を用いて、QC Report、データを取得した。出力された結果は agilent 社の GeneSpring を用いて解析した。なお、アレイは一般的に、ロット間、実験間、またアレイ内部の位置でも影響が出ることから、双生児間でそろえて行い、なおかつ、同一サンプルに対しアレイ内部の位置を入れ替えてもデータを取得した。

mRNA 発現について、遺伝子レベルの解析で

は、ノーマライゼーション後のデータにおいて、全サンプルで発現している mRNA を抽出するため、flag filter が detected となっている遺伝子を解析対象とした。

各々の一卵性双生児内において mRNA 発現量の差異がみられるものを統計学的に抽出したが、本研究では、それぞれの一卵性双生児で、3 回の独立した実験とそれぞれの実験での exon array データが 2 回分存在するため、同一個人内の反復測定データを、各個人内にネストしている階層データとみなして、マルチレベルモデル(階層データ)分析の枠組みで t 検定を行った。t 検定を行う際に、個人内の反復測定データの非独立性を表す母数である個人内分散を推定しながら p 値を計算した。Benjamini-Hochberg 法により False Discovery Rate (FDR) を算出したが、その際に有意水準を $\alpha=0.25$ とし、 $m=14390$ 個の遺伝子対の下で上記の解析を行った。なおマルチレベルモデルに基づく解析には統計ソフト R の lme 関数を利用した。

各一卵性双生児内において有意に発現量が異なり、かつ 2 倍以上の発現量の違いがある遺伝子を、各双生児内で発現量が異なっているものとして抽出した。

次に、各一卵性双生児内で抽出された遺伝子は、総数について統合失調症不一致群と健常一致例群との比較を 2 乗検定により行った。

その後、3 組の不一致例で、共通、かつ、疾患と発現量の方向性が一致している遺伝子(いずれの双生児内でも罹患双生児が非罹患双生児より発現量が多い、あるいは、少ない)を病態に関わりうる候補遺伝子として抽出した。

さらに、候補遺伝子として抽出された遺伝子数が疾患の有無に関与しているかの検定は、2 乗検定により行った。

プローブレベル解析では遺伝子レベル解析と同様の解析を行った。ノーマライゼーション後のデータに対して、flag filter として、全 84 サンプルで detected となっているプローブについてのみ解析対象とし、統計処理では $\alpha=0.25$ の設定で、 $m=145919$ 個のプローブ対に対して解析を行った。

なお、本研究は、「精神疾患発症にかかわる関連遺伝子の探索および解析」として、東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認に基づいて行われた(承認番号 639)。

4. 研究成果

各一卵性双生児内での統計学的解析の結果、双生児内で有意に変動していた遺伝子の数は統合失調症不一致例 ペア 1 で 5896 個、ペア 2 で 4734 個、ペア 3 で 3387 個、健常一致例ペア 1 で 759 個、ペア 2 で 4773 個、ペア 3 で 1579 個の遺伝子であった。その中で、

各双生児内で、mRNA 発現量が 2 倍以上異なる遺伝子は統合失調症不一致例 ペア 1 で 129 個、ペア 2 で 44 個、ペア 3 で 107 個、健常一致例ペア 1 で 36 個、ペア 2 で 66 個、ペア 3 で 43 個であった。

変動していた遺伝子数について、統合失調症一卵性双生児不一致例 3 組と健常一致例 3 組と比較したところ、統合失調症不一致例では多い傾向にあった($p=0.09$, t 検定、片側検定)。

3 組の一卵性双生児統合失調症不一致例の共通の遺伝子数は 8 個で、3 組の一卵性双生児健常一致例における共通の遺伝子数は 1 個であった。

アレイに搭載されているプローブ数は、233316 個であり、flag filter により、最終的に解析対象となったプローブ数は、145919 個であった。各一卵性双生児内で有意に発現量の違いがみられたプローブ数は統合失調症不一致例 ペア 1 で 23427 個、ペア 2 で 26809 個、ペア 3 で 25464 個、健常一致例ペア 1 で 2 個、ペア 2 で 27806 個、ペア 3 で 1 個であった。その中で、一卵性双生児内で、2 倍以上異なるプローブは統合失調症不一致例 ペア 1 で 474 個、ペア 2 で 1555 個、ペア 3 で 1138 個、健常一致例ペア 1 で 2 個、ペア 2 で 862 個、ペア 3 で 1 個であった。

変動していたプローブ数について、統合失調症一卵性双生児不一致例 3 組と健常一致例 3 組と比較したところ、統合失調症不一致例では多い傾向にあった($p=0.08$, t 検定、片側検定)。

3 組の一卵性双生児統合失調症不一致例の共通のプローブ数は 63 個で、3 組の一卵性双生児健常一致例における共通のプローブは認められなかった。統合失調症罹患双生児において、発現が同方向に変化しているプローブ数は 40 個であり、同方向を示すプローブ数の期待値 $63 \times 1/2 \times 1/2 = 63/4$ 個と比べ、有意に多かった($p=3.043e-05$, 2 乗検定)。

これらの結果から、mRNA レベルでは生物学的差異が存在し、抽出された遺伝子リストの中に候補遺伝子が含まれている可能性が示唆された。

遺伝子レベルの解析及びプローブレベルの解析をあわせ、統合失調症患者において、発現が同方向に変化している遺伝子は DPYD 及び IGHM の 2 個であり、両遺伝子とも統合失調症罹患双生児において mRNA 発現量が低下していた。

以上から、統合失調症不一致例のリンパ芽球において mRNA 発現レベルでは差異が存在する可能性及び DPYD 及び IGHM の発現低下が統合失調症の病態に関与している可能性を示した。

DPYD は近年の大規模ゲノム研究で関連が相次いで報告され、また、統合失調症と負の相関があることが繰り返し報告されている慢性関節リウマチにおいて有意な関連が報告されている。また、IGHM に関しては統合失

調症の全ゲノム関連研究で報告されている候補遺伝子がB細胞系において有意に発現していることが報告されており、また、未服薬初発統合失調症患者の血漿プロテオミクス解析においてIgμの低下が報告されている。本研究結果とあわせ、いずれの遺伝子も統合失調症病態への関与について、今後のさらなる研究が必要であると考えられた。

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〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

垣内 千尋 (Kakiuchi, Chihiro)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：90342788

(2)研究協力者

西村 文親 (Nishimura, Fumichika)
東京大学