

令和元年6月6日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10190

研究課題名(和文)統合失調症原因遺伝子として大きな可能性を持つSBN01遺伝子の分子遺伝学的検証

研究課題名(英文)The molecular analysis of a candidate gene as a cause of schizophrenia

研究代表者

小野 慎治(ONO, Shinji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・客員研究員

研究者番号：70418820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症は慢性に経過する社会的損失の大きな精神神経疾患である。人口の約1%が罹患する極めてありふれた疾患でありながら、その病態生理に関しては不明な点が多い。本研究では統合失調症の原因解明を主に分子遺伝学的手法で探索した。我々は長崎県内で発見した3世代にわたる統合失調症大家系の解析から罹患者に共通するある遺伝子の変異を同定した。その結果をもとに、その遺伝子変異をもつマウスを作成し発現解析、行動解析を行った。それらの結果から、この遺伝子が神経細胞に発現しており、その変異が統合失調症の誘因となっていることの証拠を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで統合失調症をはじめとした精神神経疾患の遺伝的および生物学的要因の関与は明らかであったが、その詳細は不明な点が多かった。今回の研究成果はある一つの遺伝子が新たな統合失調症の原因であることを双方向的に証明したことが最も重要な点である。現段階ではこの遺伝子変異が脳機能に影響を与えるメカニズムの同定にはいたっていないが、今後解析を続けることにより統合失調症の病態解明につながるのみならず、診断の細分化や新たな治療標的の同定につながる可能性がある。このように本研究は医療行政上大変有意義であり、国民の保健・精神医療に多大なる貢献ができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Schizophrenia is a devastating, chronic neurodevelopmental disorder that affects approximately 1%. The pathogenesis is still unclear although it is one of the common diseases. In this study, we explored a new gene for schizophrenia in a three-generation family from Nagasaki prefecture utilizing whole-exome sequencing. As a result, we identified a new candidate gene for schizophrenia. We then generated a mouse model and performed expression and behavioral analysis to confirm the effect of this mutation. Results of these analyses supported that the mutation of this gene we identified could cause schizophrenia, which will lead to elucidation of the pathogenesis of this disease in the future.

研究分野：臨床精神医学

キーワード：臨床精神医学 分子遺伝学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は幻覚・妄想等の陽性症状や無意・自閉等の陰性症状を呈し、慢性に経過する精神疾患である。人口の約1%が罹患すると報告されている common な疾患であるにも拘らず、その病態生理や原因に関しては依然として不明である。近年、複数の双子研究や家族研究から、統合失調症の発症への遺伝的リスクの重要性が示唆されている。統合失調症を含む精神疾患は一般的に多因子疾患と考えられており、Genome-wide-association-study (GWAS)による統合失調症の common risk loci が相次いで報告されている。

一方で、次世代型シーケンサーによる遺伝子解析は疾患の罹患リスクを大幅に上昇させる rare-risk variants の同定の有効な手段となりうるが、統合失調症における rare-risk variants を同定したという報告は少ない。本研究では、統合失調症の多発大家系において次世代型シーケンサーを用いて遺伝学的解析を行い、統合失調症の rare-risk variant を同定することを目指した。

2. 研究の目的

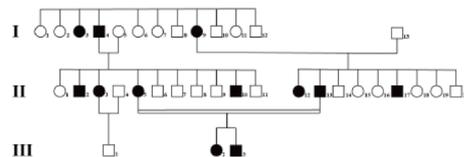
統合失調症多発家系に関して次世代型シーケンサーを用いて遺伝学的解析を行い、統合失調症の病態に寄与する rare-risk variant を同定する。

3. 研究の方法

(検体収集)

統合失調症多発大家系から10名の採血を行なった(Figure 1)。また、統合失調症患者288名、健常者419名から採血を行い、QIAamp DNA Midi kit(QIAGEN, Hilden, Germany)を用いてDNAを抽出した。研究参加者には主治医以外の医師が研究説明を行い、書面にてインフォームドコンセントを得た。検体収集においては長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得た。

Figure 1



(全エクソン解析)

統合失調症多発大家系の10名の全エクソン解析を行った。Agilent SureSelect Exome Target Enrichment System v5を用いてライブラリを作成し、HiSeq 2500 (Illumina)にて解析した。Genome Analysis Toolkit (GATK)を用いてアラインメントを行い、GATK Haplotype Caller を用いてSNV/indelの検出を行った。検出されたSNV/indelに関してANNOVAR softwareを用いてアノテーションを行い、候補変異の選定を行った。

(多検体解析)

多発家系より同定された候補遺伝子に関して、統合失調症:288名、健常者419名の target sequencingを行った。Seq cap EZ Library S Rにてライブラリ作成し、HiSeq 2500 (Illumina)にて解析した。

(Gene-based rare variant association tests)

候補遺伝子における希少変異の関連解析を Efficient and Parallelizable Association Container Toolboxを用いて行った。

(遺伝子改変マウス作成)

CRIPR-Cas9 システムを用いて統合失調症多発家系で同定された変異を C57BLN マウスに導入した。

(行動解析)

作成した遺伝子改変マウスの行動解析を行った。検査項目はオープンフィールド試験、Y字迷路試験、社会探索行動試験、ローターロード試験の4項目を行った。

4. 研究成果

(全エクソン解析)

統合失調症大家系10名の全エクソン解析を行った。患者特異的変異は遺伝子A内ならびにSBN01内変異の2つのみであった。そのため、この2つの変異が本家系の病的候補変異と考えられた。

(多検体解析)

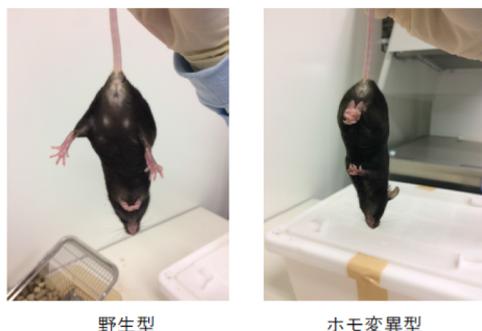
統合失調症患者288名、健常者419名の target sequencingを行い上記変異のアレル頻度を解析した。遺伝子A変異は統合失調症患者・健常者共に見られない novel な変異であった。一方で、SBN01変異は統合失調症患者には認められず健常者群で2名に確認された。この結果からSBN01変異はいわゆる多型であると考えられ、多検体解析の結果と総合すると、本家系のリスク遺伝子は遺伝子Aであると考えられた。

(遺伝子改変マウス作成)

本家系にて同定された遺伝子A変異の機能を解析するため、CRIPR-Cas9 システムを用いて統合

失調症多発家系で同定された変異を C57BLN マウスに導入し、F0 の遺伝子 A 変異型マウスを作成した。F0 マウスを繰り返し交配し、遺伝子 A ホモ変異型マウスを作成した。作成された遺伝子 A ホモ変異型マウスは生後 4 ヶ月頃から中枢神経系の異常兆候である Hind-limb clasping sign を示した (Figure 2)。遺伝子 A の脳における発現を免疫染色にて解析を行ったところ、大脳皮質・海馬・小脳プルキンエ細胞をはじめとした脳神経細胞での発現が確認された。

Figure 2



(行動解析)

作成したモデルマウスの行動解析を行ったところ、オープンフィールドにおける移動活動量の平均値は、野生型マウスが 3596.7 cm であったのに対して遺伝子 A ホモ変異型マウスは 3184.0 cm と短く、新奇場面での活動性が低い傾向がみられた。Y 字迷路では野生型のアームへの侵入回数が 34 回に対して、遺伝子 A ホモ変異型マウスのアームへの侵入回数は 26 回と少なく、活動性が低い傾向がみられた。社会的探索行動テストの結果、刺激マウスへの探索時間には遺伝子型間の差は見られなかった。ロータロッドテストの結果、Trial 1 では野生型マウスの落下までの潜時が 77 sec であったのに対して、遺伝子 A ホモ変異型マウスの潜時は 38 sec と野生型マウスに比べて短かった。Trial 2 になると、野生型が 103 sec、遺伝子 A ホモ変異型マウスが 95 sec と遺伝子型間での差はみられなくなった。以上の結果より、学習や社会性に異常はみられなかったものの、全体として、野生型に比べて遺伝子 A ホモ変異型マウスでは不安が強く、活動性が低いまたは運動機能が減衰している可能性が示された。

(考察)

統合失調症の多発家系の全エクソンシーケンス解析により、病因変異と考えられる変異を同定した。現段階では遺伝子 A の変異が脳機能に影響を与えるメカニズムの同定にはいたっていないが、今後解析を続けることにより統合失調症の病態解明につながるのみならず、新たな治療標的の同定につながる可能性はあると考える。このように本研究は医療行政上大変有意義であり、国民の保健・精神医療に多大なる貢献ができると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Yoshiro Morimoto, Shintaro Yoshida, Akira Kinoshita, Chisei Satoh, Hiroyuki Mishima, Naohiro Yamaguchi, Katsuya Matsuda, Miako Sakaguchi, Takeshi Tanaka, Yoshihiro Komohara, Akira Imamura, Hiroki Ozawa, Masahiro Nakashima, Naohiro Kurotaki, Tatsuya Kishino, Koh-ichiro Yoshiura and Shinji Ono. Nonsense mutation in CFAP43 causes normal-pressure hydrocephalus with ciliary abnormalities. *Neurology*. 2019 May 14;92(20):e2364-e2374. (査読あり)
2. Morimoto Y, Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Yoshida S, Kinoshita A, Mishima H, Yamaguchi N, Mori T, Imamura A, Ozawa H, Kurotaki N, Ziegler C, Domschke K, Deckert J, Umekage T, Tochigi M, Kaiya H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T, Yoshiura KI, Ono S. Whole-exome sequencing and gene-based rare variant association tests suggest that PLA2G4E might be a risk gene for panic disorder. *Transl Psychiatry*. 2018 Feb 2;8(1):41. doi: 10.1038/s41398-017-0088-0. (査読あり)
3. Morimoto Y, Ono S, Imamura A, Okazaki Y, Kinoshita A, Mishima H, Nakane H, Ozawa H, Yoshiura

KI, Kurotaki N. Deep sequencing reveals variations in somatic cell mosaic mutations between monozygotic twins with discordant psychiatric disease. *Hum Genome Var.* 2017 Jul 27;4:17032. doi: 10.1038/hgv.2017.32. eCollection 2017. (査読あり)

4. Akira Nishi, Shusuke Numata, Atsushi Tajima, Xiaolei Zhu, Koki Ito, Atsushi Saito, Yusuke Kato, Makoto Kinoshita, Shinji Shimodera, Shinji Ono, Shinichiro Ochi, Akira Imamura, Naohiro Kurotaki, Shu-ichi Ueno, Nakao Iwata, Kiyoshi Fukui, Issei Imoto, Atsushi Kamiya, and Tetsuro Ohmori. De novo non-synonymous TBL1XR1 mutation alters Wnt signaling activity. *Sci Reports* 2017. Jun 6;7(1):2887. doi: 10.1038/s41598-017-02792-z. (査読あり)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。