

令和元年5月13日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16372

研究課題名(和文) 精神疾患死後脳における分子発現変化の脳内分布解明のための内部標準遺伝子同定

研究課題名(英文) RNA integrity and expression of house-keeping genes in multiple cortical regions in control and schizophrenia subjects

研究代表者

川端 梨加 (KAWABATA, RIKA)

金沢大学・医学系・研究員

研究者番号：70726207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患の分子基盤の理解には、患者および健常者から得られた死後脳の複数の領域における遺伝子発現評価が必要である。本研究では、死後脳における遺伝子発現の正確な定量に必要な1)RNAの保存状態の評価および2)発現の安定した内部標準遺伝子の同定を患者と健常者の大脳皮質4領域より抽出したRNAを用いて行った。RNAの保存状態は、患者では脳の前方で高く後方で低い傾向を認めたが、対照者ではこのような領域間の差を認めなかった。さらに、一般的に使用されている8種類の内部標準遺伝子から疾患の有無および領域の違いにより影響を受けにくいものとしてPPIA, GAPDH, PSMB2を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患では有効な治療法が確立されていない難治性の症状が多く存在し、それに対する治療法の開発には、分子レベルでの病態解明が重要である。そこで、ヒト死後脳を用いた遺伝子発現の解析がRNAレベルで多く行われている。本研究から、1)対象となる領域ごとにRNAの保存状態を把握する必要があること、2)疾患の存在による影響を受けにくい内部標準として3つの転写産物が有用であることが反映した。これらの情報は、ヒト死後脳組織における遺伝子発現の解析を正確に行う上で役立つ。

研究成果の概要(英文)：Understanding molecular bases of neural network dysfunction in psychiatric disorders depends on the analysis of gene expression across multiple cortical regions in postmortem brains. The accuracy of such evaluation depends on RNA integrity and the stability of expression of internal control transcripts (normalizers) across diagnostic statuses as well as across different cortical regions. In this study, we measured the RNA integrity in multiple cortical regions and assessed the expression stability of eight potential normalizers, using cortical RNA samples obtained from control and schizophrenia subjects. RIN was comparable across the different regions in control subjects, whereas it was higher in anterior association cortices than in posterior visual cortices in schizophrenia subjects. Among the eight normalizers, cyclophilin, glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase, proteasome subunit beta-2 exhibited the most stable expression across diagnostic statuses.

研究分野：分子精神病学

キーワード：内部標準遺伝子 死後脳 real-time PCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

精神疾患の病態研究では、患者を用いた画像研究や生理学的研究により、脳内の様々な領域に構造や活動に変化が見出され、複数の領域から成る神経ネットワークの機能異常が症状の発現に関与していることが指摘されてきた。そして、神経ネットワーク異常により生じる症状に対する治療法の開発には、ネットワークを構成する領域における細胞および分子レベルの病態メカニズムの解明が重要である。そこで必要となるのが罹患者から得られた死後脳を用いた分子病理学的解析である。現在、世界各国で活発に死後脳研究が行われ、細胞および分子レベルの変化が相次いで報告されている。このような分子発現変化は、難治性の症状に対する治療法の開発において、標的とする分子メカニズムの同定に役立つ可能性がある。ところで、このような分子発現変化に基づいた治療法の開発では、単独の脳領域における所見のみならず、症状に関わる神経ネットワークに含まれる複数の領域や別の症状に係る諸領域において同様の分子発現変化が存在するの否かを明らかにすることが、治療法の標的となる領域や症状の同定に必要となる。ヒト死後脳における分子発現は、死後変化による分解のスピードが比較的遅く保存状態を RNA integrity number (RIN) として客観的に評価できる mRNA の発現レベルとして評価されてきた。そして、特定の分子をコードする mRNA の発現レベルは疾患などの条件による影響を受けにくい内部標準遺伝子の mRNA に対する比として定量される。そこで、mRNA の定量を複数の領域で行い、疾患における変化やその領域間での違いを正確に評価するためには、RNA の保存状態(RIN)をすべての領域で把握し、mRNA の発現量が疾患の存在や領域の違いによって変動しない複数の House Keeping 遺伝子による標準化が必要となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、精神疾患の死後脳における mRNA 発現解析を複数の脳内領域で行うための基礎データを、次の - の研究により得る。

脳内の多数の領域における RNA の状態の評価

精神疾患の有無や脳内領域の違いに関わらず mRNA 発現量が安定している内部標準遺伝子の同定

内部標準遺伝子 mRNA 発現の安定性の確認

### 3. 研究の方法

1) ヒト死後脳 性別が同じで、年齢と死後経過時間が近く、背外側前頭前野の RNA の保存状態が良好な(RIN > 7.0)統合失調症例と健常対照例のペア 20 対からの脳組織を用いた(表 1)。

	統合失調症例	健常対照例
数	20	20
性	男 16, 女 4	男 16, 女 4
年齢	45.6 (9.5)	47.7 (9.6)
死後経過時間	14.4 (6.2)	15.5 (5.8)
RIN*	8.2 (0.5)	8.3 (0.5)

表 1 平均(標準偏差), \*背外側前頭前野における RIN

2) RNA 抽出と RIN 計測 連合野に属する背外側前頭前野(46 野)と後部頭頂皮質(7 野)、知覚系の 2 次視覚野(18 野)1 次視覚野(17 野)の灰白質を各症例より切り出し、Trizol 溶液に攪拌し、RNeasy Kit (Qiagen)により total RNA を精製した。合計で 240 (40 例×6 領域)の RNA サンプルで、RNA 濃度と純度を計測し、Bioanalyzer (Agilent)による RIN の計測を 2 回繰り返し、2 回の測定結果の相関を確認し、2 つの RIN の平均値を RNA の保存状態の指標とした。

3) 内部標準候補遺伝子 mRNA の発現定量に内部標準遺伝子として頻繁に使用されている House Keeping 遺伝子の中から、beta-ACTIN (ACTB), Glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH), Cyclophilin (CYC), Beta-2-microglobulin (B2M), Gs protein alpha subunit (GNAS), Proteasome subunit beat-2 (PSMB2), Glucuronidase beta (GUSB), Hypoxanthine-Guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), TATA-box binding protein (ABP), Transferrin receptor (TFRC), Ubiquitin C (UBC), Ribosomal Protein L13a (RPL13A), Ribosomal Protein L37a (RPL37A)を選択し、統合失調症及び健常例の前頭前野組織における RNA シークエンスを用いたデータベース(CommonMind Consortium)と前頭前野の 3 層および 5 層の錐体ニューロン、3 層のパルプアルブミン陽性ニューロンのマイクロアレイ解析データ(Arion et al. 2015, Enwright et al. 2018)から、統合失調症の前頭前野で有意な変化を示さないものとして、GAPDH, GNAS, PSMB2, GUSB, UBC, RPL13A を選択した。

4) 内部標準候補遺伝子の real-time PCR による増幅のための条件設定 上記の 6 遺伝子

の各 mRNA に対して複数のプライマーセットを設計した。これらプライマーセットと健常対照者数名の大脳皮質 RNA サンプルを用いて real-time PCR を行い、標的の DNA 断片のみを 95%以上の効率で増幅する特異的プライマーセットを選択した。

5) 発現が安定している内部標準遺伝子の同定 上記の 6 遺伝子に我々がこれまで内部標準遺伝子と多く用いてきた ACTB と CYC を加えた 8 遺伝子の発現を、上記 20 ペアから 10 ペアを選択し、各症例から背外側前頭前野および一次視覚から抽出した RNA を用いて real-time PCR により定量した。そして、各遺伝子の発現を他のそれぞれの遺伝子で標準化した値について症例間の標準偏差を求め、その標準偏差の平均値 M を算出し、各遺伝子の発現の不安定性の指標とした。8 候補遺伝子の全てに対して M を求め、M が最高値の最も不安定な遺伝子を除いて同じ計算を行った。これを 3 遺伝子が残るまで繰り返し、統合失調症の有無や領域の違いに関わらず発現が最も安定している内部標準遺伝子とした。

6) 同定された内部標準遺伝子の発現の安定性の確認 発現が最も安定している 3 遺伝子から 2 遺伝子を選択し、その発現量の比について疾患の影響や領域の違いの影響を評価した。統計解析には、統合失調症の診断の有無を個体間因子、背外側前頭前野と一次視覚の違いを個体内因子とする混合モデル分散分析を用いた。

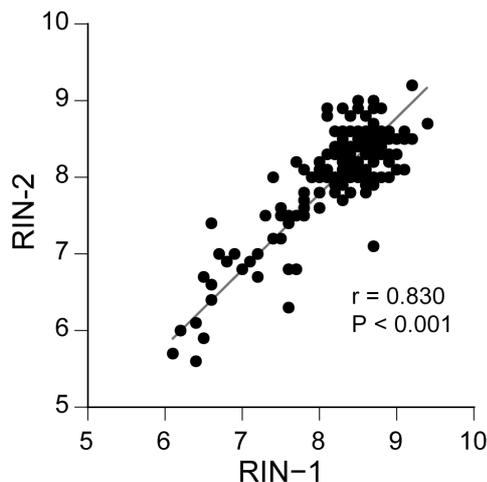


図 1: 40 名の 4 領域からの 160RNA サンプルの RIN 計測、RIN-1: 1 回目の計測、RIN-2: 2 回目の計測

#### 4. 研究成果

脳内の多数の領域における RNA の状態の評価

まず、20 組の健常対照例と統合失調症例のペアを構成する 40 名の大脳皮質の背外側前頭前野 (46 野)、後部頭頂野 (7 野)、2 次視覚野 (18 野)、1 次視覚野 (17 野) の 4 領域のそれぞれから抽出した 160 の RNA サンプルにおける RNA の保存状態を、RNA integrity number (RIN) として 2 回繰り返し測定した結果、1 回目と 2 回目の測定結果には、きわめて高い相関 ( $r = 0.830$ ,  $P < 0.001$ ) が検出された (図 1)。これにより RIN の計測の再現性が確認された。そこで、1 回目と 2 回目の計測の平均値を各 RNA サンプルの RIN 値として採用した。

健常例では RIN 値 $\pm$ SD は背外側前頭前野  $8.52 \pm 0.36$ 、頭頂葉後部  $8.60 \pm 0.24$ 、2 次視覚野  $8.40 \pm 0.39$ 、1 次視覚野  $8.41 \pm 0.52$  であり、反復測定分散分析では、個体内因子である領域には有意な効果は認められなかった ( $F_{3,57} = 2.55$ ,  $P = 0.065$ ) (図 2)。一方、統合失調症例の RIN 値 $\pm$ SD は、背外側前頭前野  $8.37 \pm 0.55$ 、頭頂葉後部  $8.09 \pm 0.65$ 、2 次視覚野  $7.65 \pm 0.86$ 、1 次視覚野  $7.32 \pm 0.87$  で、領域に有意な効果を検出し ( $F_{3,57} = 28.1$ ,  $P < 0.001$ )、前頭前野から 1 次視覚野に向けて RIN が低下する傾向が認められた (図 3)。領域間の post-hoc 比較では、背外側前頭前野と 2 次視覚野の間 ( $P < 0.01$ ) および背外側前頭前野と 1 次視覚野の間 ( $P < 0.01$ ) に有意差をみとめ、2 次視覚野と 1 次視覚野の間にも有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めた。

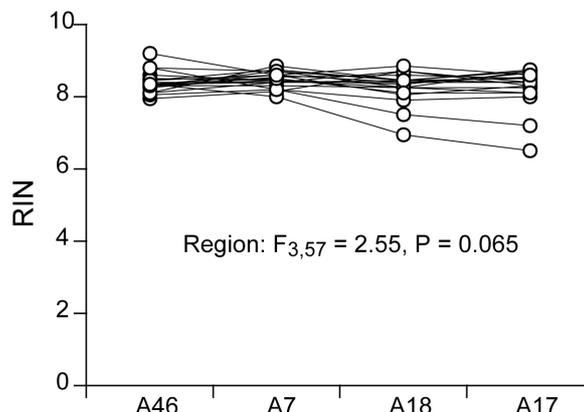


図 2: 健常例 20 名の 4 領域 RIN 値、各症例の RIN 値は線で結ばれている。

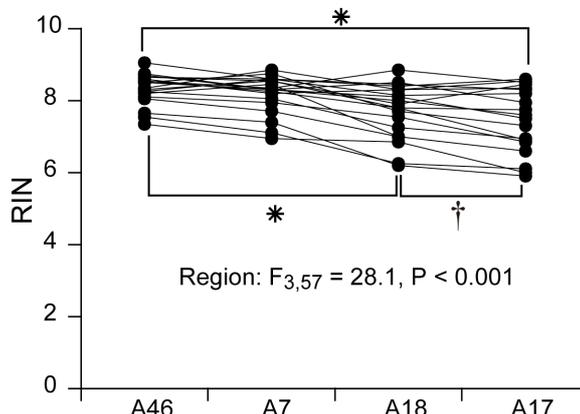


図 3: 統合失調症例 20 名の 4 領域 RIN 値、各症例の RIN 値は線で結ばれている。  
\*:  $P < 0.01$ , †:  $P < 0.05$

最終的に健常例および統合失調症例の全てのデータを、統合失調症の診断の有無を個体間因子、背外側前頭前野と一次視覚の違いを個体内因子とする混合モデル分散分析を用いて解析した結果、診断の有無( $F_{1,38}=7.76, P=0.008$ )、領域の違い( $F_{3,114}=25.1, P<0.001$ )、診断と領域の相互作用( $F_{3,114}=10.1, P<0.001$ )の全てに有意な効果を検出した。

以上の結果は、統合失調症で健常例に比べ RNA の保存状態の指標が 2 次視覚野および 1 次視覚野で低いことを示す。

精神疾患の有無や脳内領域の違いに関わらず mRNA 発現量が安定している内部標準遺伝子の同定

10 組の健常対照例と統合失調症例のペアを構成する 20 名の大脳皮質の背外側前頭前野 (46 野) と 1 次視覚野 (17 野) の 4 領域のそれぞれから抽出した 40 の RNA サンプルを用い、GAPDH, GNAS, PSMB2, GUSB, UBC, RPL13A, ACTB, CYC の 8 遺伝子を real-time PCR で増幅した。各遺伝子について、他のすべての遺伝子との発現の比を算出し、それを基に発現の不安定性の指標 M 値を各遺伝子について求めた。遺伝子を M 値の大きい (発現が不安定な) 順に並べ、最も大きな M 値を示す遺伝子を除き、同様の計算を行い、各遺伝子の M 値を求め、これを 3 遺伝子が残るまで行った (図 4)。その結果、最終的に、GAPDH, PSMB2, CYC が残り、診断の有無および領域の違いを問わず最も安定している遺伝子であることが判明した。

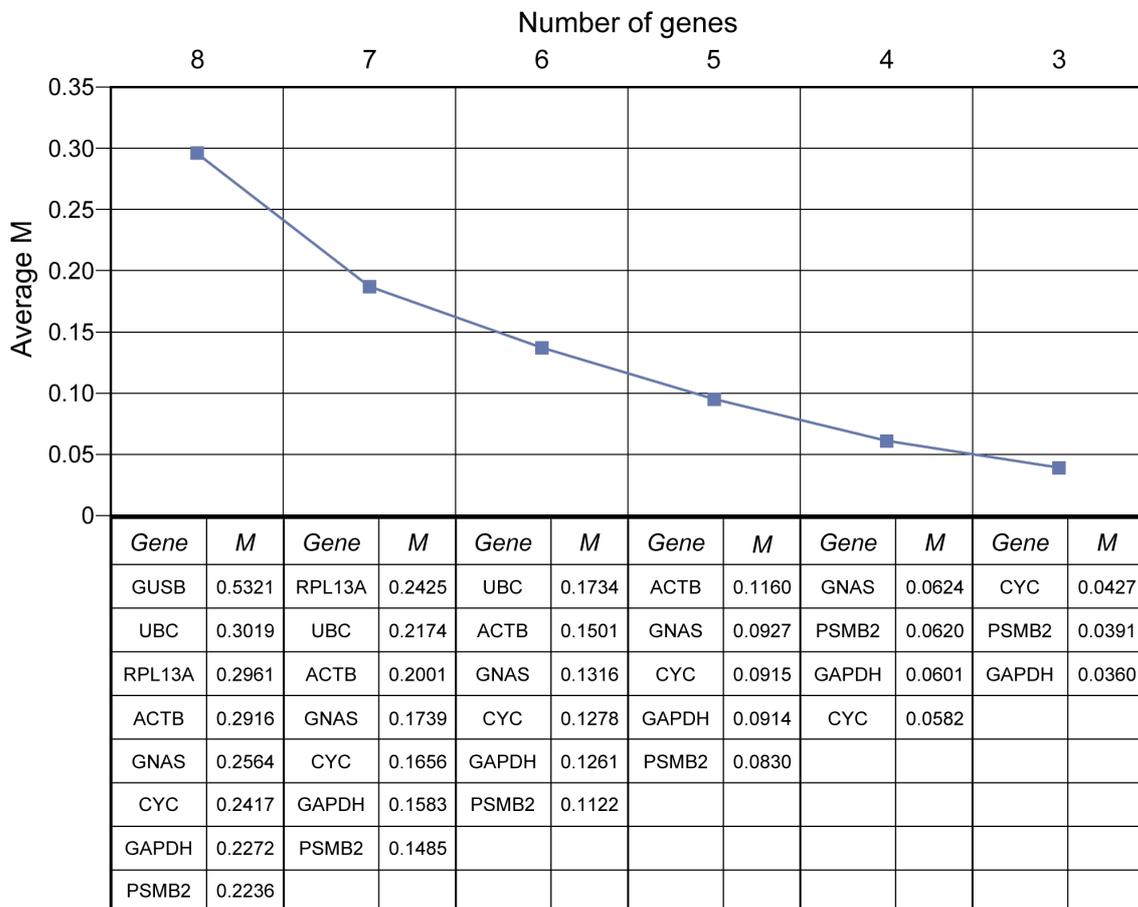


図 4: 内部標準候補遺伝子の発現の安定性の評価。各遺伝子について他の全ての遺伝子との発現の比を、全ての症例の前頭前野と 1 次視覚野を通した標準偏差の平均値 M を求めた。そして M 値が最も高い遺伝子を除き M 値の再計算を繰り返し 3 つの遺伝子に到達した。

#### 内部標準遺伝子 mRNA 発現の安定性の確認

発現が最も安定していることが判明した GAPDH, PSMB2, CYC の発現への、統合失調症の診断の影響を評価するために、これら 3 遺伝子の発現比を、上記 10 組の健常対照例と統合失調症例のペアで背外側前頭前野(46 野)および 1 次視覚野において算出比較した。

前頭前野では (図 5)、GAPDH/CYC 比 $\pm$ SD は統合失調症で  $0.79\pm 0.05$ 、健常例で  $0.78\pm 0.07$  であり、t 検定では両者に有意な差は認められなかった( $t_9=0.26, P=0.80$ )。PSMB2/GAPDH 比 $\pm$ SD は、統合失調症で  $24.7\pm 1.8$  であり、健常例で  $24.7\pm 1.8$  であり両者に有意な差は認められなかった( $t_9=0.08, P=0.93$ )。CYC/PSMB2 比 $\pm$ SD も、統合失調症で  $0.052\pm 0.005$  で、健常例で  $0.052\pm 0.006$  であり両者に有意な差は認められなかった( $t_9=0.24, P=0.81$ )。

## A46

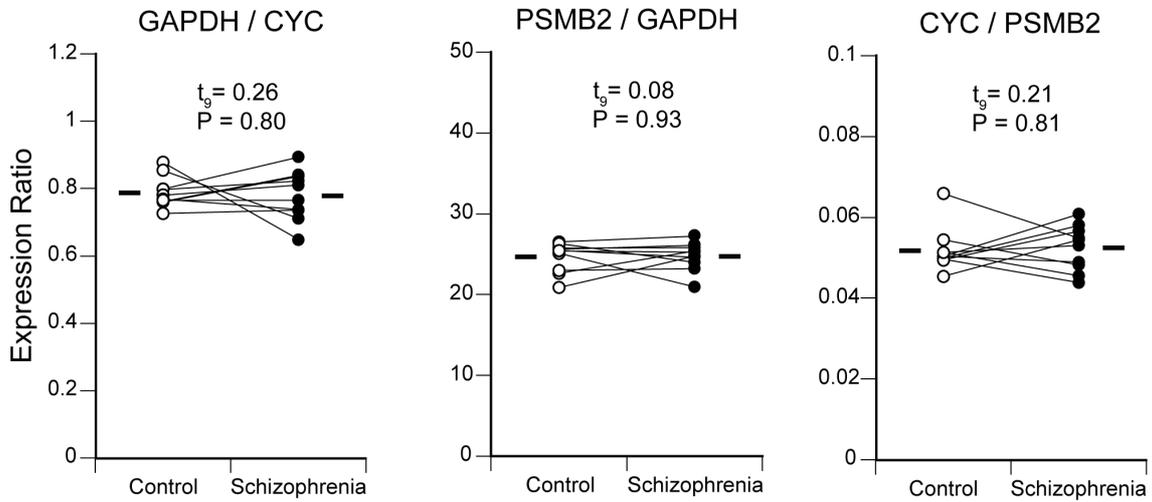


図 5: 背外側前頭前野(A46)における 3 つの内部標準遺伝子の発現比(Expression Ratio)の健常例(Control)と統合失調症例(Schizophrenia)の間の比較

## A17

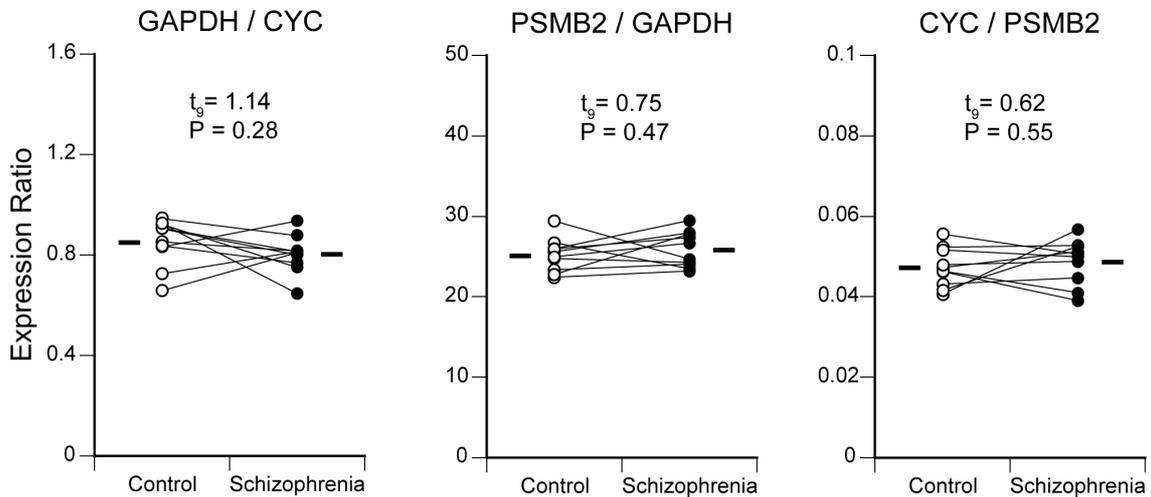


図 6: 1 次視覚野(A17)における 3 つの内部標準遺伝子の発現比(Expression Ratio)の健常例(Control)と統合失調症例(Schizophrenia)の間の比較

1 次視覚野では (図 6)、GAPDH/CYC 比±SD は統合失調症で  $0.85 \pm 0.09$  であり、健常例で  $0.81 \pm 0.08$  であり両者に有意な差は認められなかった ( $t_9=1.14$ ,  $P=0.28$ )。PSMB2/GAPDH 比±SD は、統合失調症で  $25.2 \pm 2.1$  であり、健常例で  $25.9 \pm 2.2$  であり両者に有意な差は認められなかった ( $t_9=0.75$ ,  $P=0.47$ )。CYC/PSMB2 比±SD は、統合失調症で  $0.047 \pm 0.005$  であり、健常例で  $0.049 \pm 0.006$  であり両者に有意な差は認められなかった ( $t_9=0.62$ ,  $P=0.55$ )。

最後に、これらの遺伝子の発現の安定性を評価する他の方法として、統合失調症の診断の有無を個体間因子、背外側前頭前野と一次視覚の違いを個体内因子とする混合モデル分散分析を行った。GAPDH/CYC 比に対して、診断の有無 ( $F_{1,18}=1.25$ ,  $P=0.274$ )、領域の違い ( $F_{1,18}=3.69$ ,  $P=0.071$ )、診断と領域の相互作用 ( $F_{1,18}=0.77$ ,  $P=0.391$ ) に有意な効果は認められなかった。PSMB2/GAPDH 比についても、診断の有無、領域の違い、診断と領域の相互作用に有意な効果は認められず、CYC/PSMB2 比では、診断の有無 ( $F_{1,18}=0.23$ ,  $P=0.639$ ) と診断と領域の相互作用 ( $F_{1,18}=0.15$ ,  $P=0.704$ ) には有意な効果を認めなかったが、領域の違いが有意な影響を有した ( $F_{1,18}=14.5$ ,  $P=0.001$ )。

以上を総合すると、ACTB, GAPDH, PSMB2 の発現は、統合失調症の有無による影響は受けないが、大脳皮質領域の違いによる影響を受ける可能性が考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔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：  
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)研究代表者

研究代表者氏名：川端梨加

ローマ字氏名：KAWABATA, Rika

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：研究員

研究者番号(8桁)：70726207

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：ルイス, デーヴィッド

ローマ字氏名：LEWIS, David

研究協力者氏名：坪本真

ローマ字氏名：TSUBOMOTO, Makoto

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。