

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17056

研究課題名(和文)統合失調症患者末梢血DNAを用いたセロトニントランスポーター遺伝子のメチル化解析

研究課題名(英文)DNA methylation analysis of SLC6A4 using peripheral blood samples of patients with schizophrenia

研究代表者

池亀 天平 (IKEGAME, TEMPEI)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00836736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、本研究課題においてSLC6A4のDNAメチル化部位群(CpG island)近傍領域(CpG island shore)に存在する1カ所のCpG部位(CpG3)が精神状態を反映し脳構造との相関を示すこと、5-HTTLPRのgenotypeと相互作用すること、CpG3を人工的にメチル化させると転写活性を完全に抑制できることを明らかにしており、同部位がSLC6A4のDNAメチル化状態をsurrogateできる機能的マーカーであると考えられる(Ikegame et al., Schizophr Bull 2020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患の発症予測や診断を定義する客観的指標は現在まで開発はされておらず、バイオマーカー研究は依然として生物学的精神医学研究における重要な課題である。本研究は網羅的DNAメチル化解析に基づき見出された、セロトニントランスポーター遺伝子(SLC6A4)の発現制御領域のメチル化状態が精神状態により変化し、更に特定の脳部位体積と相関する事を見出した。SLC6A4のDNAメチル化状態と脳機能の関連を示唆した先行研究は存在するが、本研究のように対象となるCpG部位を特定した研究はなく、その点は本研究の学術的成果といえる。本研究をより発展することにより臨床応用可能なバイオマーカーの開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The applicants clarified the following things in this research project: 1) one CpG site (CpG3) located in the CpG island shore of SLC6A4 reflects the mental state and correlated with the brain structure. 2) DNA methylation level of CpG3 interacts with the genotype of 5-HTTLPR. 3) DNA methylation of CpG3 strongly suppresses the transcriptional activity of SLC6A4. These findings indicate that the CpG3 is a functional marker capable of surrogate the DNA methylation status of SLC6A4 (Ikegame et al., Schizophr Bull 2020).

研究分野：分子精神医学

キーワード：セロトニントランスポーター エピジェネティクス 統合失調症 双極性障害 DNAメチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症や双極性障害は、人口の約1%が罹患し長期間の治療が必要とされる重篤な精神疾患である。過去の疫学研究から、発症には遺伝要因と環境要因の複雑な相互作用が関係していると考えられているが、確実な遺伝要因は同定されていない。近年、「エピジェネティクス」という現象を通して、環境要因により遺伝子の働き（発現）が変化することが注目されている。エピジェネティクスは「遺伝子の塩基配列（設計図）の変化を伴わずに、子孫や娘細胞に伝達される遺伝子発現調節機構」と定義され、DNAメチル化などの化学修飾により遺伝子の発現が制御される。本研究グループは、過去に双極性障害患者でのDNAメチル化解析により、セロトニントランスポーター遺伝子 (*SLC6A4*) 内の2つの特定の部位 (CpG3 および CpG4) (図1A) が高いメチル化状態を示すことを報告した (菅原ら, *Transl Psychiatry* 2011)。

2. 研究の目的

本研究では、過去に同定したこの CpG 部位について大規模な追試実験を行い、また、新たに統合失調症患者での検討も行い、セロトニントランスポーターDNAメチル化が病態に与える影響について、包括的な検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

<DNAメチル化測定>

ヒトおよびコモンマーマーモセットの末梢血試料からゲノムDNAを抽出し *SLC6A4* のプロモーター領域中の CpG3 のメチル化率をパイロシーケンシング法により測定した。

<遺伝子発現解析>

CpG3 の周辺配列 (CpG3 sequence) をレポーターコンストラクトに組み込み、ラット縫線核由来の神経細胞株 (RN46A) にトランスフェクションし転写活性を測定した。

<画像関連解析>

CpG3 のメチル化率と扁桃体体積の相関を性別、年齢、MRI機種を共変量とした重回帰分析により解析した。

4. 研究成果

(1) 双極性障害患者 450 例、統合失調症患者 440 例、健常者 460 例について、血液 (末梢血) から抽出したゲノム DNA を用いて、セロトニントランスポーター遺伝子の DNAメチル化状態を測定した。その結果、双極性障害患者および統合失調症患者のセロトニントランスポーター CpG3 部位について、男性患者において高メチル化状態にあることを確認した (図 1B・C)。なお、小型の霊長類であるマーマーモセットに、抗精神病薬を長期投与し、そのセロトニントランスポーター遺伝子の DNAメチル化状態を測定したところ、メチル化変化は検出されなかったことから、双極性障害患者および統合失調症患者におけるメチル化変化は、投薬の影響を受けたものではないことが推定される。

(2) セロトニントランスポーター遺伝子のプロモーター領域における遺伝子多型 5-HTTLPR の詳細な解析を行ったところ、双極性障害患者および統合失調症患者において 5-HTTLPR が低活性型 である場合、高メチル化を示すことを確認した。なお、多型のタイプが日本人特有の L 型である L16-C である場合、低活性型であることを確認した。

(3) セロトニントランスポーター遺伝子の CpG3 部位を人工的にメチル化し転写活性化能を測定したところ、メチル化したセロトニントランスポーター遺伝子では、転写活性化能が著しく抑制され、セロトニントランスポーター蛋白質の生成が抑制されることを見出した(図 2B)。さらに、年齢・性別を適合させた健常者 41 例、統合失調症患者 57 例について、セロトニントランスポーターの働きが強く、過去に DNA メチル化状態との関連が報告されている扁桃体について MRI 脳画像を用いた解析を行った。その結果、低活性型 5-HTTLPR を持つ男性患者の左扁桃体の体積と、CpG3 の DNA メチル化率が逆相関を示すことを見出した(図 3)。以上のことから、低活性型 5-HTTLPR を持つ男性統合失調症患者 では、セロトニントランスポーターが高メチル化状態にあり、セロトニントランスポーター量の低下を通して扁桃体体積の減少が生じている可能性が示唆された。

<図>

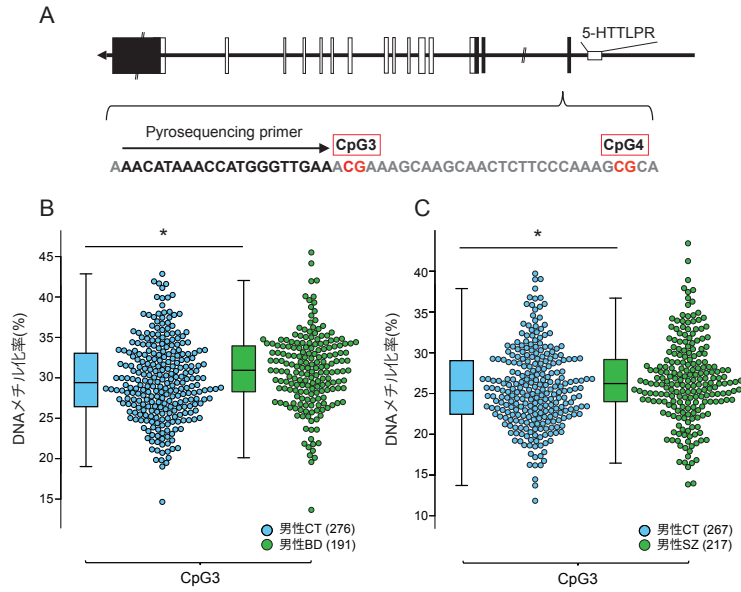


図 1

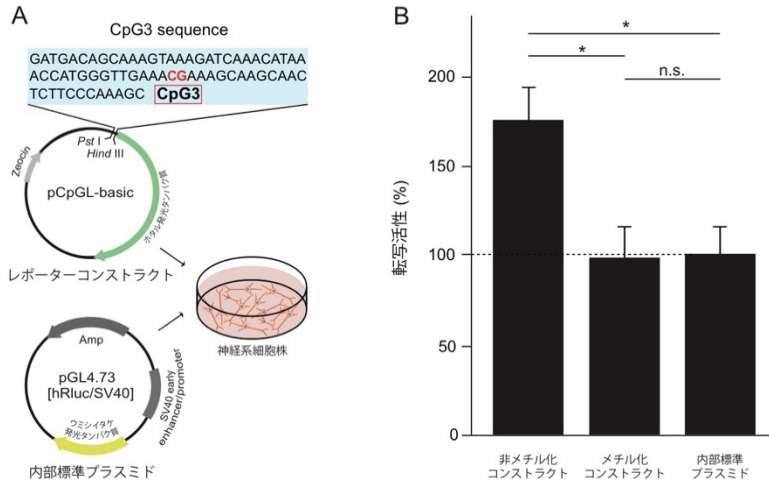


図 2

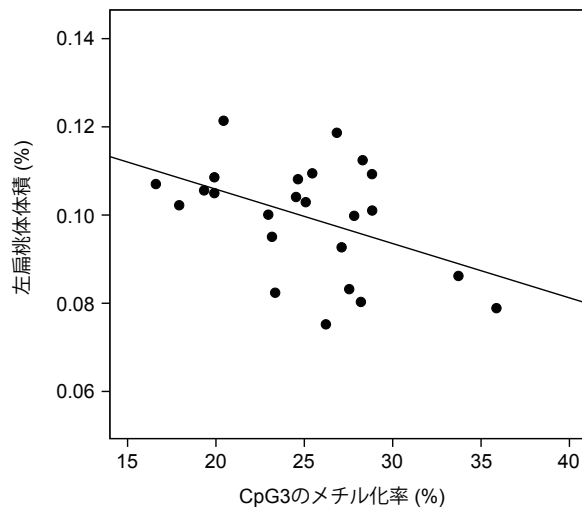


図 3

<説明文>

図1：セロトニントランスポーター遺伝子の DNA メチル化変化

A)セロトニントランスポーター遺伝子の構造とメチル化解析を行った CpG 部位。図中、転写は右から左に行われプロモーター領域に 5-HTTLPR 多型が存在する。ボックスはエクソン領域を示し、黒は蛋白質をコードしていない部分、白は蛋白質をコードしているエクソン領域を示す。B) 男性双極性障害患者(男性 BD)と男性健常者(男性 CT)の CpG3 におけるメチル化比較 C) 男性統合失調症患者(男性 SZ)と男性 CT の CpG3 におけるメチル化比較 * $P < 0.05$ (マン・ホイットニーの U 検定)

図2：レポーターアッセイによる CpG3 メチル化の機能的解析

A)CpG 部位を人工的にメチル化させ蛍光標識した DNA 鎖(レポーターコンストラクト)を神経系細胞株に導入して、発光蛋白質の活性を測定することにより転写活性化能を測定。B)メチル化されると転写活性化能は失われる。

図3：CpG3 の DNA メチル化率と左扁桃体体積の関連

低活性型 5-HTTLPR を持つ統合失調症患者では左扁桃体体積と CpG3 のメチル化率が有意に逆相関する。縦軸:全脳に対する左扁桃体体積の割合(%) 横軸:CpG3 のメチル化率(%)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 岩本和也, 池亀天平, 文東美紀	4. 巻 272
2. 論文標題 精神疾患とエピジェネティクス セロトントランスポーターの大規模DNA メチル化解析からの考察	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1212 - 1215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikegame Tempei et al	4. 巻 46
2. 論文標題 Promoter Activity-Based Case-Control Association Study on SLC6A4 Highlighting Hypermethylation and Altered Amygdala Volume in Male Patients With Schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Schizophrenia Bulletin	6. 最初と最後の頁 1577 ~ 1586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/schbul/sbaa075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikegame Tempei et al	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification and functional characterization of the extremely long allele of the serotonin transporter-linked polymorphic region	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 11(1):119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-021-01242-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池亀天平
2. 発表標題 多数例ゲノムサンプルを用いたSLC6A4における新規5-HTTLPRの同定
3. 学会等名 第41回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ikegame, Y. Hidaka, Y. Nakachi, Y. Murata, R. Watanabe, H. Sugawara, T. Asai, E. Kiyota, T. Saito, M. Ikeda, T. Sasaki, M. Hashimoto, M. Takebayashi, N. Iwata, K. Kasai, M. Bundo, K. Iwamoto
2. 発表標題 Identification of novel serotonin transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR) in SLC6A4 gene using a large-scale genomic sample
3. 学会等名 CINP 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------