

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390314

研究課題名(和文) 精神障害における神経有棘赤血球症遺伝子群の関わりに関する総合的研究

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the genes responsible for neuroacanthocytosis in psychiatric disorders

研究代表者

佐野 輝 (SANO AKIRA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178800

研究成果の概要(和文)：気分障害や統合失調症患者において神経有棘赤血球症(NA)関連遺伝子(*VPS13A*および*XK*)の包括的変異解析を行った。疾患変異の可能性のある変異をヘテロ接合性を持つ者を認めたことから、NA関連遺伝子はこれら精神疾患の病因に関与している可能性が示唆された。また、マウス脳や赤血球膜分画を用いた*VPS13A*遺伝子産物と相互作用するタンパク質を解析した結果、細胞骨格系のタンパク質の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We performed a comprehensive mutation screen of *VPS13A* and *XK*, the gene responsible for chorea-acanthocytosis and McLeod syndrome, respectively, in mood disorder and schizophrenia subjects. We identified the existence of several patients with mood disorder or schizophrenia who carry heterozygous, potentially pathogenic mutations in neuroacanthocytosis-related genes. This suggests that neuroacanthocytosis-related-genes might be involved in the pathogenesis of these psychiatric disorders. The results of analyses of interacting protein using mouse brain and RBC ghost suggest that cytoskeletal proteins may interact with chorein, the *VPS13A* product.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：精神神経医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：(1)有棘赤血球舞踏病 (2) McLeod 症候群 (3) *VPS13A* (4) *XK*
(5)気分障害 (6)統合失調症 (7) chorein

1. 研究開始当初の背景

統合失調症や感情(気分)障害などの精神障害は、多因子(multifactorial)性の「ありふれた疾患(common diseases)」の代表例と考えられているが、近年、これら「ありふれた疾患」に対する分子遺伝学的発症モデルは、遺伝子

そのものが原因となって疾患を発症するのではなく、ある同じ環境要因にさらされた場合に発症の引き金となる遺伝子(疾患感受性遺伝子)が存在するというものになりつつある。さらに、「ありふれた疾患」の遺伝子レベルでの発症基盤としては"common

variants-common disease" 仮説あるいは "multiple rare variants-common disease" 仮説が考えられているが、どちらにせよその発症の引き金となりうる遺伝子は複数存在すると考えられている。"Common variants-common disease" 仮説では、Alzheimer 型認知症においてアポリポ蛋白質 E のうち E4 を多型として持つと発症リスクが上がるのが民族を越えて証明されている例がある。一方、最近注目されている "multiple rare variants-common disease" 仮説では、孤発性の Parkinson 病において Gaucher 病の疾患原因遺伝子である glucosylceramide β -glucosidase の稀な疾患変異が高率にヘテロ接合性に認められることが明らかにされた。孤発性 Parkinson 病では遺伝負因は少なく見積もられていた中で、稀な疾患である Gaucher 病の原因遺伝子の β -glucosidase の稀少な疾患変異を持つヘテロ接合性キャリアーが高頻度に見つかったことは、"multiple rare variants-common disease" 仮説を実証した例として注目されている。さらに、この発見の発端となった事実が、Gaucher 病患者および患者家族に Parkinson 症状もしくは Parkinson 病が少なからず見つかるという臨床表現型の観察に始まっている。

Multiple rare variants は、ある程度の多型性（対立遺伝子頻度で 1% 以上）を持った SNPs として SNPs ゲノムチップ等では解析できないために、現在よく使用されているタイプの全ゲノムをカバーする SNPs 解析からは浮かび上がってこない。それゆえ、multiple rare variants の検討には、徹底的なリシーケンシング研究に加え、ゲノムレベルでの欠失や挿入の解析、すなわちコピー数変異（copy number variants: CNVs）解析も含めた解析が必要である。前述の、Parkinson 病の例では β -glucosidase 遺伝子を中心にリシーケンシング研究が行われている。

我々は常染色体劣性遺伝性の神経変性疾患である有棘赤血球舞踏病（chorea acanthocytosis: ChAc）患者家系と遭遇し、その病因遺伝子 *VPS13A* の発見に成功した。ChAc には精神症状の強い例も多く、私達も統合失調症や強迫性障害の診断を受けた例を報告した。その家系においては、*VPS13A* 遺伝子の病因変異をヘテロ接合性に持つ家系構成員にもうつ病や認知症症状などの精神症状を示す例を多数認めた。このように、ChAc 患者および疾患対立遺伝子保因者に高率に精神障害を認める事実は、Gaucher 病と Parkinson 病の係に極めて類似したものと考えられる。ChAc は、神経有棘赤血球症（neuroacanthocytosis; NA）、すなわち有棘赤血球症と神経精神症状を呈する疾患群に属するが、他の NA の代表疾患としては McLeod 症候群があげられる。McLeod 症候群では統合失調症や総合失調感情障害、双極性障害、

統合失調型人格障害の併存例が極めて高率に認められるため、ChAc を含めた神経有棘赤血球症と精神障害との遺伝子レベルでの関わりを総合的に検討することは、精神障害の分子遺伝学的解析にとって大きな課題となることが類察される。*VPS13A* 遺伝子は、全長 244kb、exon 総数 73、cDNA でも 10kb を超えるため、リシーケンシング解析や CNV 解析には多大な労力がかかる。研究開始当初から現在でも *VPS13A* 遺伝子のシーケンシング解析や CNV 解析を行っているのは国際的にみても我々の研究グループのみであり、多数の ChAc が疑われる患者の疾患変異を同定している。

遺伝子変異と精神疾患との関連が明らかとなった際には病因解明にはその遺伝子産物の機能を明らかにすることが必要である。しかし、*VPS13A* 遺伝子産物 chorein についてはいまだその機能解明はほとんどなされていない。chorein の機能解明には相互作用するタンパク質の同定が足掛りとなると考えられる。解析には患者由来の検体もしくはモデル動物や培養細胞などを用いた研究が必要である。ヒト ChAc の症例数は少ないため検体を用いた研究には限界があることから、モデル動物などの利用が有用である。このことから我々は *VPS13A* 遺伝子改変モデルマウスの作成に取り組み、成功している。この ChAc モデルマウスは変異のホモ接合体においてヒト疾患における病理と一致した線条体を中心とした神経変性と有棘赤血球症を発症した。マイクロアレイを用いた解析系でモデルマウスの線条体においては GABA-A 受容体遺伝子および Gephyrin 遺伝子の発現が増加していることを明らかにし、マウス *VPS13A* 遺伝子は選択的スプライシングで脳特異的な型を生み出していることを明らかにした。

2. 研究の目的

統合失調症と気分障害患者において、ChAc および McLeod 症候群の原因遺伝子である *VPS13A* および *XK* 遺伝子に関して CNV 解析を含む総合的な変異解析を行い希少な疾患変異の存在の有無を明らかにし、神経有棘赤血球症遺伝子変異と精神疾患との間で "multiple rare variants-common disease" 仮説の可能性を検討する。

また、ChAc モデルマウスや赤血球膜、培養細胞を用いて、chorein と結合もしくは相互作用する可能性があるタンパク質を同定し、chorein の機能解明に近づくことを目的とする。

3. 研究の方法

解析対象者からは文書によるインフォームドコンセントを得た後に採血し、その白血球

から常法により遺伝子抽出を行なった。85名の気分障害患者において、*VPS13A* 及び *MLS* の病因遺伝子である *XK* のリシークエンシングを行った。86名の統合失調症患者においては、*XK* のリシークエンシングを行った。さらに、患者で認められた変異について、その有無を健常者の100対立遺伝子以上において解析した。また、72名の気分障害患者において、TaqMan probe を用いた real-time PCR 法によって *VPS13A* 及び *XK* のコピー数変異解析を行った。86名の統合失調症患者においては、*XK* のコピー数変異解析を行った。(尚、本研究は鹿児島大学医学部遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得ている。)

VPS13A 遺伝子産物 chorein と結合し相互作用するタンパク質を同定するために、抗 chorein 抗体を用いて、赤血球膜分画のタンパク質について免疫沈降法による解析を行った。免疫沈降法によって chorein と共沈させたタンパク質を SDS-PAGE 後、銀染色もしくは CBB 染色し、質量分析を行った。また、健常者と ChAc 患者由来の赤血球膜タンパク質、野生型マウスと ChAc モデルマウスの脳から抽出したタンパク質を二次元電気泳動して、それぞれ濃度差のあるバンドについて質量分析を行った。

4. 研究成果

気分障害患者の *VPS13A* のリシークエンシングでは、10種類の新規の非同義的変異と17種類の新規の同義的変異および新規の GAT triplet repeat の多型を同定した。その中で、健常者には認められなかった非同義的変異は3種類、同義的変異は8種類であり、いずれもヘテロ接合性に認められた。非同義的変異はいずれも哺乳類の種間で保存されているアミノ酸領域に存在するものであった。それらの中でも H196R、R208Q の非同義的変異は、疾患変異予想ソフト Polyphen2 による解析では疾患変異の可能性が強く示唆されるものであった。また、気分障害患者の *VPS13A* の CNV 解析では、1名の気分障害患者に、*VPS13A* の疾患変異である exon 60-61 欠失変異をヘテロ接合性に認めた。*VPS13A* において疾患変異の可能性が高い非同義的変異の H196R、R208Q と疾患変異である exon 60-61 欠失変異は気分障害患者にしか認められなかった。

XK のリシークエンシングでは、気分障害患者では1種類の新規の非同義的変異を、統合失調症患者では1種類の新規のイントロン変異を認めた。

気分障害患者や統合失調症患者において、*VPS13A* や *XK* 遺伝子上に疾患変異や遺伝子産物の機能と関係する可能性がある変異をヘテロ接合性に持つ者を認めたことから、神経有棘赤血球症関連遺伝子は、気分障害及び統合失調症の病因に関与している可能性があることが示唆された。

抗 chorein 抗体を用いた赤血球膜分画のタンパク質について免疫沈降法による解析、健常者と ChAc 患者由来の赤血球膜タンパク質、野生型マウスと ChAc モデルマウスの脳から抽出したタンパク質の二次元電気泳動による比較、および質量分析の結果、chorein 結合候補タンパク質としていくつかの細胞骨格系のタンパク質を共通して認めた。さらに全長 *VPS13A* 遺伝子を過剰発現した HEK293 細胞株を用いて、同様に免疫沈降法と質量分析を行うことにより、chorein 結合候補タンパク質としてやはり同種の細胞骨格系タンパク質を同定した。これらから chorein は細胞骨格系のタンパク質と関連することが推測された。

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7件)

1. Tomiyasu A, Nakamura M, Ichiba M, Ueno S, Saiki S, Morimoto M, Kobal J, Kageyama Y, Inui T, Wakabayashi K, Yamada T, Kanemori Y, Jung HH, Tanaka H, Orimo S, Afawi Z, Blatt I, Aasly J, Ujike H, Babovic-Vuksanovic D, Josephs KA, Tohge R, Rodrigues GR, Dupré N, Yamada H, Yokochi F, Kotschet K, Takei T, Rudzińska M, Szczudlik A, Penco S, Fujiwara M, Tojo K, Sano A: Novel pathogenic mutations and copy number variations in the *VPS13A* Gene in patients with chorea-acanthocytosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 査読有 156; 620-631, 2011
2. Shimo H, Nakamura M, Tomiyasu A, Ichiba M, Ueno S, Sano A: Comprehensive analysis of the genes responsible for neuroacanthocytosis in mood disorder and schizophrenia. *Neurosci Res* 査読有 69; 196-202, 2011
3. Miki Y, Nishie M, Ichiba M, Nakamura M, Mori F, Ogawa M, Kaimori M, Sano A, Wakabayashi K: Chorea-acanthocytosis with upper motor neuron degeneration and 3419_3420 delCA and 3970_3973 delAGTC *VPS13A* mutations. *Acta Neuropathol* 査読有 119: 271-273, 2010
4. 中村雅之、佐野輝: 診断に役立つ遺伝子異常(点突然変異以外); 臨床精神医学 査読無し 第39巻増刊号, 617-621, 2010
5. 中村雅之、佐野輝: モデル動物を用いた神経精神疾患の病態解析. 脳と精神の医学 査読無し 20, 243-248, 2009
6. 佐野輝: 精神神経疾患の遺伝学 -臨床遺

伝から分子遺伝学 - 精神神経学雑誌 査読無し 111, 1537-139, 2009

7. 市場美緒、中村雅之、佐野輝：神経有棘赤血球症 脳と神経 査読無し 60 635-641, 2008

[学会発表] (計2件)

1. Shimo H, Nakamura M, Shiokawa N, Tomiyasu A, Ueno S, Sano A: Resequencing and copy number variations analyses for genes responsible for neuroacanthocytosis in subjects with mood disorders and schizophrenia. **XVII World congress Psychiatric genetics**, 2009年11月5日, サンディエゴ
2. Tomiyasu A, Nakamura M, Shiokawa N, Shimo H, Ichiba M, Ueno S, Sano A: Novel pathogenic mutations and copy number variations of VPS13A in patients with chorea-acanthocytosis. **XVII World congress Psychiatric genetics**, 2009年11月5日, サンディエゴ

[図書] (計3件)

1. 中村雅之、佐野 輝, 症候群ハンドブック, 有棘赤血球を伴う舞踏病; 中山書店, 117-121, 2011
2. Nakamura M, Katoh Y, Kurano Y, Ichiba M, Matsuda M, Katoh M, Ueno S, and Sano A: **Neuroacanthocytosis Syndromes II** (R. Walker eds.), chapter 12, A Mouse Model of Chorea-Acanthocytosis; Springer, Berlin, Germany, 153-159, 2008
3. Sano A: **Neuroacanthocytosis Syndromes II** (R. Walker eds.), chapter 18, Psychiatric morbidity; Springer, Berlin, Germany, 219-223, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 輝 (SANO AKIRA)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30178800

(2) 研究分担者

中村 雅之 (NAKAMURA MASAYUKI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院
研究者番号：90332832