

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16666

研究課題名（和文）一卵性双生児統合失調症不一致例から発見されたDPYD活性の検討

研究課題名（英文）DPYD activity found in monozygotic twins discordant for schizophrenia

研究代表者

西村 文親（NISHIMURA, FUMICHIKA）

東京大学・相談支援研究開発センター・講師

研究者番号：20758990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：一卵性双生児統合失調症不一致例リンパ芽球様細胞の発現解析からDPYDが統合失調症候補遺伝子であることを見出していた。末梢血からリンパ芽球様細胞を作製し、DPYDの発現解析を統合失調症群と健常対象群に対して行った。発現解析の結果では、DPYD発現量に有意差を認めなかった。男女別に解析を行うと、女性群において、GAPDH補正において有意となったが、不一例のmRNA発現解析の結果とは逆方向である統合失調症女性患者群において発現量が高いという結果となった。また、不一例においてエクソン解析を行い、DPYD活性に影響を与えるようなDPYDエクソン領域の塩基配列の差異は双生児内で明らかとならなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症の候補遺伝子が増大し続ける中で、一卵性双生児統合失調症不一致例という別手法を用いて、見出した候補遺伝子であるDPYDについて、近年のゲノム研究で候補遺伝子として、度々報告されている。一卵性双生児統合失調症不一致例の結果について、統合失調症の他のサンプルについて検討を行い、DPYDが候補遺伝子であるという結果を追試することはできなかった。ただし、一卵性双生児不一致例から分子生物学的差異の存在が明らかになっており、DPYDが有力な候補遺伝子であることに変わりはなく、今後も検討を行い、精神疾患の病態解明の試みを行っていく必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The applicant identified DPYD as a candidate gene through comprehensive expression analysis of lymphoblastoid cells from known discordant monozygotic twins. In this study, we conducted an expression analysis of DPYD using lymphoblastoid cell lines generated from peripheral blood samples obtained from patients with schizophrenia and healthy subjects. The expression analysis results did not show any significant differences in DPYD expression levels. However, when analyzing the data separately by gender, significant differences were observed in the female group when GAPDH normalization was applied. Interestingly, the direction of the findings contradicted the results of the mRNA expression analysis, indicating higher DPYD expression levels in schizophrenia female patients. Furthermore, exon analysis was performed on known discordant cases, but no differences in the nucleotide sequences of DPYD exonic regions within twins impacting DPYD activity were identified.

研究分野：精神医学

キーワード：遺伝 統合失調症 一卵性双生児不一致例 発現解析 エクソン解析

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、陽性症状、陰性症状、認知機能障害により、社会的機能が低下する精神疾患の一つである。思春期以降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、当事者のみならずそれを支える家族も大きな苦悩を抱え、生物学的な病態解明が急がれる疾患の一つである。

これまでの統合失調症研究から遺伝要因の関与が明らかとなり、連鎖解析、候補遺伝子関連研究、全ゲノム関連研究などが行われたが、病態を説明し得る状態ではなかった。次世代シーケンサーの登場により、全エクソン解析や全ゲノム解析が行われ、トリオ研究や多発家系研究から稀な変異が報告されるようになった。しかし、見出された稀な変異が、統合失調症患者での原因となっているのかを判断するのは困難であり、候補遺伝子もしくは候補変異は増大するばかりである。

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を対象とした研究は、統合失調症の病態解明の別手法になりうると考えた。申請者は一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組のリンパ芽球様細胞を用いて mRNA 発現解析を行った。そこからは、一卵性双生児統合失調症不一致例に分子生物学的な差異が存在すること、さらに不一致例内の統合失調症罹患双生児全員において DPYD と IGHM が発現低下を示し、DPYD と IGHM が統合失調症の有力な候補遺伝子であることを示した。

見出された DPYD は統合失調症との関連においてすでに報告されている遺伝子であった。最初の報告は 2011 年の全ゲノム関連研究においてなされている。第 1 段階で 21856 人、第 2 段階で 29839 人を用い、その統合解析から、統合失調症とゲノムワイドに有意な関連を示す 7 座位が得られ、このうち最も強い関連は、MIR137 (microRNA 137) の近傍の rs1625579 に認められた。この SNP の LD block 内に DPYD も存在していたが、その後はむしろ MIR137 への注目が集まり、研究がすすめられていた。しかし、2013 年に行われた全ゲノム関連研究 (5001 人の統合失調症群と 6243 人の健常対照群) とそれに以前に報告されていた全ゲノム関連研究 (8832 人の統合失調症群と 12067 人の健常対照群) の結果のメタ解析、さらに独立した検体 (7413 人の統合失調症群と 19762 人の健常対照群、及び 581 組のトリオ) における 168 個の SNP での確認実験から、ゲノムワイドに 22 座位が有意と見出され、この中に、DPYD が含まれていた。さらに、2014 年に統合失調症患者群 36989 人と健常対照群 113075 人について、多段階の全ゲノム関連研究が報告され、108 座位の 128 個の SNP がゲノムワイドに有意であったが、この中で、2 位(rs1702294)と 107 位(rs76869799)に有意であった SNP が含まれた LD block 内に DPYD が存在している。また、両親と孤発例統合失調症発端者の 231 トリオと非罹患の両親と子の 34 トリオについて全エクソン解析を行った研究では、アフリカ系白人における missense de novo 変異とアメリカ系白人における nonsense de novo 変異が DPYD に見出されている。以上のように、DPYD は近年の統合失調症の大規模全ゲノム関連研究で相次いで報告され、トリオ研究からは非同義置換の de novo 変異の報告が異なる集団で報告されるなど、統合失調症との関連が強く疑われた。一方、統合失調症の罹患と負の相関があることが繰り返し示されてきた疾患である慢性関節リウマチにおいて、DPYD が関連研究において有意な関連が報告されていることも興味深いものであった。

DPYD はピリミジンの異化に関与する律速酵素 DPD をコードする遺伝子として同定された。ウラシルやチミンをディハイドロウラシルやディハイドロチミンに変換する。体内分布としては、あらゆる組織に存在するが、肝臓が全体の約 80% を占めている。悪性腫瘍の治療薬として用いられる 5-FU 体内投与後の分解の主要経路であることから、DPD 活性が低下している場合には、5-FU の投与により重大な副作用を起こすため、癌研究の分野での報告が多い。DPYD の塩基配列変異もしくは、エクソン欠失などにより、5-FU 投与による副作用が報告されている。また、近年の研究で EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) には DPYD が関与していることが示されている。EMT は神経堤細胞の発達分化に関与していることが知られているが、興味深いことに神経堤細胞の発達分化と統合失調症を高率で合併する 22q11.2 症候群の関係が報告されている。DPYD の中枢における機能の探索は統合失調症病態解明への端緒になる可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、一卵性双生児統合失調症不一致例から候補遺伝子として考えられる DPYD について、統合失調症のリンパ芽球様細胞を用いて、既知の一卵性双生児不一致例の mRNA 発現解析の結果が再度確認されるかどうかの検討を行う。また、DPYD がコードする DPD についての活性の検討を行う。具体的には、DPYD の mRNA 発現低下を認めた一卵性双生児統合失調症不一致例内において DPYD エクソン領域内の塩基配列に差異が存在するかどうかの検討をまず行う。その上で、DPD 活性に影響を与える遺伝子多型の差異が、一卵性双生児不一致例内罹患双生児と非罹患双生児に存在するならば、DPD 活性測定の見直しを行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 統合失調症サンプルにおける DPYD の mRNA 発現量の検討

統合失調症患者 19 名 (男性 6 名、女性 13 名) と健常対象者 18 名 (男性 6 名、女性 12 名) の末梢血からリンパ芽球様細胞を作製し、DPYD の mRNA 発現解析を行った。

#### (2) DPD 活性の検討

DPYD の発現低下を認めた既知の一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組の末梢血白血球由来のゲノム DNA において、SureSelect (Agilent Technologies) を用いて濃縮し、作成されたライブラリに対して HiSeq2000 (illumina) を用いて、100 塩基のペアエンド法で配列解析を行った。出力された結果から一卵性双生児不一致例内罹患双生児と非罹患双生児におけるエクソン領域に塩基配列の差異が存在するかどうかの検討を行った。一卵性双生児内に塩基配列の差異が存在するならば、DPD 活性に影響を与える遺伝子多型であるかどうかを確認する。(1) で統合失調症群リンパ芽球様サンプルでの DPYD 発現量低下の確認、並びに(2)の一卵性双生児統合失調症不一致例内の罹患双生児と非罹患双生児で DPD 活性に影響を与える遺伝子多型の差異の存在が確認できれば、DPD 活性の測定を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 統合失調症サンプルにおける DPYD の mRNA 発現量の検討

発現解析の結果では、DPYD 発現量に有意差を認めなかった (GAPDH 補正  $p=0.19$ , ACTH 補正  $p=0.76$ )。男女別に解析を行うと、女性群 DPYD の発現量において、ACTH 補正では有意ではなかった ( $p=0.44$ ) が、GAPDH 補正において有意となった ( $p=0.017$ )。しかし、一卵性双生児不一致例の mRNA 発現解析の結果とは逆方向の結果である統合失調症女性患者群において DPYD 発現量が高いという結果となった。

#### (2) DPD 活性の検討

DPD 活性の検討としては、まずは DPYD の発現量低下を認めた一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組のサンプルにおいて、全エクソン解析を行った。エクソン領域について、GATK から出力された変異の中で、一卵性双生児内罹患双生児と非罹患双生児で異なるコールがなされているもの、Depth $\geq 20$  のもの、信頼指標が pass となっているものについて解析を行った。アレル頻度をそれぞれの一卵性双生児内で比較し、差が大きいもの程信頼性が高いと考えられたため、上位 3 変異についてサンガー法で確認したが、いずれも再現されず、全エクソン解析において一卵性双生児不一致例内に塩基配列の明らかな差異は見出されず、DPYD エクソン領域内の塩基配列に明らかな差異を認めなかった。DPYD 遺伝子多型が DPD 活性に与える影響について知られているが、一卵性双生児統合失調症不一致例内の DPYD エクソン領域には本研究の全エクソン解析では明らかな差異を認めず、DPD 活性に影響を与える原因を特定することはできなかった。

#### (3) 今後の展望

今回(1)で DPYD の統合失調症患者群における mRNA 発現量について検討を行ったが、既知の一卵性双生児統合失調症不一致例の研究で得られた結果は、本研究では示唆されなかった。また、(2)で一卵性双生児統合失調症不一致例内の DPYD エクソン領域において明らかな塩基配列の差異は明らかとならなかった。全エクソン解析は、技術的にカバーされていない領域がまだまだ多く存在すること、ならびに、実験の精度の問題があると考えられ、今後も一卵性双生児内の差異のさらなる詳細な検討が必要であると考えられた。

一卵性双生児統合失調症不一致例において分子生物学的な差異が存在することは明らかとなっており、その中で、DPYD が発見された事、さらに、DPYD が統合失調症との関連においてすでに報告されている遺伝子であることを考えると、今後も DPYD が有力な遺伝子であることに変わりはない。引き続き一卵性双生児統合失調症不一致例において DPYD の mRNA 発現量低下の原因の探索が必要であると考えられた。

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〕

〔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
---------	---------