

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15722

研究課題名（和文）気分障害におけるミトコンドリアDNA体細胞変異の一分子単位解析

研究課題名（英文）Single-molecule analysis of somatic mitochondrial DNA mutations in mood disorder

研究代表者

西岡 将基（Nishioka, Masaki）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00780503

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）：双極性障害54名・コントロール54名の死後脳mtDNA解析を行った。アレリ割合1%以上のヘテロプラスミー変異と、一分子ごとのミトコンドリアDNA変異率を、ケース・コントロールで比較した。アレリ割合1%以上のヘテロプラスミー変異は、コントロールよりケースにより多く、特にrRNAレアヘテロプラスミーに差が顕著であり、ケース6個・コントロール0個と著名な差を認めた。ミトコンドリア病MELASの原因バリエーションm.3243A>Gバリエーションが、双極性障害2名から検出され、コントロールでは検出されなかった。一方、ミトコンドリアDNA一分子変異率はケース・コントロールで差がなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

m.3243A>Gバリエーションは、Nishioka et al. Molecular Psychiatry 2023において双極性障害2名からの検出を報告し、死後脳試料における新たな解析でも、支持的な結果を得た。双極性障害の一部が、ミトコンドリアDNAの希なヘテロプラスミー変異で説明できる可能性を示唆する。双極性障害におけるヘテロプラスミー変異の濃縮は、ミトコンドリアDNA全体の変異率上昇でなく、効果の高いバリエーションがドリフトし、確率的に割合が多くなった結果と考えられ、双極性障害の病態理解に貢献した。ミトコンドリアDNAバリエーションによる双極性障害の層別化を示し、今後の薬剤開発の基礎を示した。

研究成果の概要（英文）：I performed postmortem brain mtDNA analysis on 54 patients with bipolar disorder and 54 controls. Cases and controls were compared for heteroplasmy mutations with an allele fraction of 1% or more and mitochondrial DNA mutation rates per base. Cases were more likely to have heteroplasmy mutations with an allele ratio of 1% or more than controls, with a particularly notable difference in rRNA rare heteroplasmy, with 6 cases and 0 controls. The m.3243A>G variant, which is the causative variant of mitochondrial disease MELAS, was detected in two patients with bipolar disorder but none in the controls. Meanwhile, there was no difference in mitochondrial DNA single molecule mutation rates between cases and controls.

研究分野：精神医学

キーワード：ミトコンドリアDNA 一分子解析 双極性障害 ヘテロプラスミー 死後脳 m.3243A&gt;G ミトコンドリア病 MELAS

## 1. 研究開始当初の背景

双極性障害をはじめとする気分障害は生涯罹患率が高く、患者自身の苦痛や社会的負担から世界全体で大きな課題である (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, Lancet 2017)。症状緩和に有効な薬剤があるものの、有効な患者の割合が少ない・有効判定が難しい・服薬が長期に渡るなどの問題がある。問題の背景のひとつとして、気分障害に対する診断治療が症候学的分類に基づいており、生物学的背景と必ずしも一致しないであろうことが考えられる。気分障害と呼ばれる現象の生物学的背景を明らかにし、生物学的背景に対応した診断治療を考えることが、現代の精神医学研究に課せられた急務の一つである。

気分障害は精神障害の中でも大きな位置を占めるが、その一部を説明する背景として、本計画ではミトコンドリアに注目する。ミトコンドリア DNA 変異に由来するミトコンドリア病において気分障害の症状が多く見られることが知られている (Inczyedy-Farkas et al. Behavioral and Brain Functions 2012)。ミトコンドリアは ATP 産生に加え、カルシウムイオン貯蔵・調節という神経系の働きに重要な役割を担っていることから、ミトコンドリア機能異常が脳神経系の機能異常をもたらすという可能性は機序的にも想定される (Manji et al. Nature Review Neuroscience 2012)。ミトコンドリア DNA 複製酵素 Polg の脳組織特異的変異マウスでは、ミトコンドリア DNA 変異が一部脳部位に目立って蓄積し、反復する抑うつ状態のエピソードが確認された (Kasahara et al. Molecular Psychiatry 2016)。同種のミトコンドリア DNA 変異蓄積を特徴とするミトコンドリア病の一部に重篤な抑うつ状態が認められたという臨床的報告もある (Suomalainen et al. Journal of Clinical Investigation 1992)。以上の知見から、ミトコンドリア DNA 変異が精神症状に寄与する様態として、以下の 2 種類のモデルをたてる。

モデル A. 発生初期において重篤なミトコンドリア DNA 変異 (例えばミトコンドリア病原因変異) が生じ、当該変異の有無という質的な差により脳神経系組織の一部機能が障害され、精神症状をもたらす。

モデル B. 発生・発達・加齢の過程で徐々に蓄積するミトコンドリア DNA 変異が全体としてミトコンドリア機能低下をもたらす、量的な差により一部の脳神経系機能が低下し、精神症状をもたらす。

申請者の検討により、双極性障害患者末梢試料から複数のミトコンドリア病の原因変異が検出され、MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) の原因変異である m.3243A>G が独立した 2 名から検出された。変異アレル割合は 5~10%程度であり、ミトコンドリア病の報告よりも低い。ミトコンドリア病原因変異がより少ないアレル割合で双極性障害患者に存在しており、ミトコンドリア病からのスペクトラムの一端として気分障害の一部を解釈できる可能性を示唆している。アレル割合から脳神経系にも存在していると推測されるが、変異の検出は末梢試料からのため、脳神経組織における存在を確認する必要がある。また末梢では検出できない変異が、脳組織特異的に生じている可能性も考えられ、脳組織での探索を必要とする。モデル B については神経変性疾患に対する予備的な適用例があるものの (Hoekstra et al. Annals of Neurology 2016)、気分障害における一分子レベルの報告はなく、独自に検証を行う必要がある。以上から、双極性障害をはじめとする気分障害をもつ患者を対象として、上記 2 モデルに対応した 2 つの仮説を設定した。

(1) 患者脳神経組織では、一部に病的意義の大きなミトコンドリア DNA 変異が存在し、変異を持つヒトの割合が非罹患者と比べて多い。

(2) 患者脳神経組織では、ミトコンドリア DNA 一分子あたりの変異の総数が、非罹患者と比べて多い。

## 2. 研究の目的

本研究は「脳におけるミトコンドリア DNA の体細胞変異が、気分障害特に双極性障害に寄与している」という仮説を検証し、上記の 2 つの仮説に対して検証を行うことで、双極性障害を中心とした気分障害の病態理解を進めることを目的とする。双極性障害脳組織において特定のミトコンドリア DNA 変異が多いことが報告されている (Kato et al. *Biological Psychiatry* 1997; Munakata et al, *Biological Psychiatry* 2005)。一分子というこれまでにない解像度でミトコンドリア DNA 変異を網羅的に検出することで、これまで報告されていない変異を中心に多種多様な変異の検出が可能となる点に独自性がある。末梢試料では網羅的なミトコンドリアモザイク変異 (ヘテロプラスミー) の報告があるものの (Wei et al. *Science* 2019)、ヒト脳におけるヘテロプラスミーの網羅的解析は乏しい。ヒト脳組織でのヘテロプラスミーの状態も明らかになり、気分障害にとどまらない新たな基礎的な知見の創造も期待できる。

また精神疾患に対する遺伝学的研究の文脈においても、概念的な独自性がある。これまでの精神遺伝学は、生殖系列の多型や変異を対象としたアプローチが主であった。例えば双極性障害に対して重要な知見があるものの (Ikeda et al. *Molecular Psychiatry* 2017; Stahl et al. *Nature Genetics* 2019)、報告された多型や変異のみでは当該表現型を十分に説明できるわけではない。ヒト成人神経細胞には数千個の体細胞変異が存在し、加齢とともに変異が蓄積する (Lodato et al. *Science* 2018; Bae et al. *Science* 2018)。生殖系列の多型や変異に加えて、体細胞変異が精神疾患に寄与している可能性が想定される (Nishioka et al. *Molecular Psychiatry* 2019)。ミトコンドリア DNA はゲノム DNA に比べて変異が生じやすく、より高率に体細胞変異の補足が可能である。精神障害に対する体細胞変異の意義づけの例を提出することで、精神遺伝学に対する独自性と創造性が期待できる。

## 3. 研究の方法

本研究は、上記の 2 つの仮説の検証を行うことで、双極性障害をはじめとする気分障害にミトコンドリア DNA 変異が関連していることを示す。対象として双極性障害死後脳試料と精神疾患非罹患者死後脳試料の比較を行う。スタンレー研究所の 19 対 19 の前頭葉試料 (申請受理済) 及び、日本ブレインバンクネットなどを通して収集している日本国内の双極性障害死後脳試料・コントロール試料を 20 名対 20 名分 (申請受理済) の解析をまず予定する (計 40 名対 40 名)。並行して死後脳試料収集を継続的に行い、より確証的な知見のため継続して試料を蓄積し、累積約 60 名対約 60 名の試料収集を目標とする。

方法としては、分子バーコードを用いたミトコンドリア DNA シーケンスを行い、一分子単位で変異を特定する。DNA フラグメント一分子ごとに複数塩基で構成される分子バーコードを付加することで一分子ごとのアイデンティティを維持し、ミトコンドリア DNA 領域を増幅した後に分子バーコードも含めたシーケンスを行う (Schmitt et al. *PNAS* 2012)。分子バーコードによ

り体細胞変異と PCR エラー・シーケンスエラーを区別することができ、一分子単位での変異の比較が可能となる。DNA の変異頻度は PCR エラー・シーケンスエラーに比べて低いため、このような区別が必要である。エラーとの区別が可能となるため、アレル割合が低い病的意義の大きなミトコンドリア DNA 変異の検出にあたり特異性が通常のシーケンスより大幅に改善する。

以上の方法により、「病的意義の大きなミトコンドリア DNA 変異」と「ミトコンドリア DNA 一分子あたりの変異の総数」を解析し、双極性障害をはじめとする気分障害と精神疾患非罹患者を比較することで、気分障害とミトコンドリア DNA 変異の関連を明らかにする。特に m.3243A>G などの効果の大きな変異について顕著な差があると想定し、脳部位ごとの変異分布も合わせて明らかになると期待する。本研究の範囲では関連の検討にとどまるが、気分障害の一部にミトコンドリア DNA 変異が関連していることが明らかになれば、そのような患者群について生物学的機序の探索を進める基礎を提供できるであろう。ミトコンドリア DNA 変異を起点として、ミトコンドリア機能障害から神経機能障害、そして精神症状に至る機序について研究を進める基礎づけを行いたい。

#### 4. 研究成果

2023 年度末現在で、双極性障害 54 名・コントロール 54 名の死後脳組織由来 DNA の解析を行い、ミトコンドリア DNA の一分子バーコードシーケンスを完了した。上記のモデル A/B に対応する仮説 1/2 を検証する目的で、バルクにおけるアレル割合 1%以上のヘテロプラスミー変異と、一分子ごとのミトコンドリア DNA 変異率を、ケース・コントロールで比較した。

108 名全体から、66 個のヘテロプラスミーを検出した。バルクにおけるアレル割合 1%以上のヘテロプラスミー変異は、ケースにおいてコントロールより多く、特に gnomAD (国際ゲノムデータベース) にホモプラスミーとして存在しないバリエーション (負の自然選択が想定されるレアバリエーション) については、ケース 15 個・コントロール 5 個と多い傾向を認めた (fisher exact test  $P = 0.0510$ )。特に rRNA 領域のヘテロプラスミー変異に差が顕著であり、ケース 6 個・コントロール 0 個と著名な差を認めた (fisher exact test  $P = 0.0285$ )。また、ミトコンドリア病 MELAS の原因バリエーションである m.3243A>G バリエーションが、双極性障害 2 名から検出され、コントロールでは検出されなかった。m.3243A>G バリエーションは、Nishioka et al. *Molecular Psychiatry* 2023 において双極性障害 2 名からの検出を報告し、死後脳試料における新たな解析でも、支持的な結果を得た。サンプルサイズが小規模～中規模であることを考えると、いずれも注目すべき結果であり、双極性障害の一部が、ミトコンドリア DNA の稀なヘテロプラスミー変異で説明できる可能性が強く示唆される。特に、m.3243A>G バリエーションと双極性障害の関連は有望である。(逆に、m.3243A>G バリエーションをもつミトコンドリア病患者は、特に双極性障害の発症リスクが高いことが知られている。[OR = 12.4, Colasanti et al. *JNNP* 2020])

一方、ミトコンドリア DNA における一分子あたりの変異率はケース・コントロールで差がなく、変異率としては、 $4.0 \times 10^{-6}$ /base 程度とこれまでの想定値と一致する結果であった。タンパクコード領域・tRNA 領域・rRNA 領域・Dloop 領域に分けて差がなかった。また上記のレアバリエーションに限定しても差がなかった。この事実から、双極性障害におけるヘテロプラスミー変異の濃縮は、ミトコンドリア DNA 全体の変異率の上昇ではなく、効果の高いバリエーションがドリフトし、確率的にそのアレル割合が多くなった結果と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 NISHIOKA MASAKI	4. 巻 68
2. 論文標題 The Current Progress of Psychiatric Genomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 2~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14789/jmj.JMJ21-0038-R	査読の有無 有
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 Nishioka Masaki, Takayama Jun, Sakai Naomi, Kazuno An-a, Ishiwata Mizuho, Ueda Junko, Hayama Takashi, Fujii Kumiko, Someya Toshiyuki, Kuriyama Shinichi, Tamiya Gen, Takata Atsushi, Kato Tadafumi	4. 巻 28
2. 論文標題 Deep exome sequencing identifies enrichment of deleterious mosaic variants in neurodevelopmental disorder genes and mitochondrial tRNA regions in bipolar disorder	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 4294~4306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41380-023-02096-x	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西岡将基
2. 発表標題 精神医学奨励賞 受賞講演
3. 学会等名 第118回日本精神神経学会学術総会、福岡、2022年6月25日（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西岡将基
2. 発表標題 双極性障害レアバリエーション研究の現在と未来
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会、京都、2021年7月16日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西岡将基
2. 発表標題 精神疾患のゲノム研究の最近の進歩
3. 学会等名 第354回順天堂医学会学術集会, 文京区, 2021年9月9日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西岡将基
2. 発表標題 ゲノミクス駆動型精神医学
3. 学会等名 第117回日本精神神経学会学術総会, 京都, 2021年9月21日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Nishioka
2. 発表標題 Discovery of the pathogenesis of psychiatric disorders: Elucidation of the pathology by genomic research
3. 学会等名 Neuro2023 (Sendai), August 3rd, 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西岡将基
2. 発表標題 精神疾患ゲノム研究の概観と双極性障害に対するレアバリエント研究
3. 学会等名 第53回日本神経精神薬理学会(東京)、2023年9月9日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西岡将基
2. 発表標題 双極性障害における体細胞変異の役割
3. 学会等名 第119回日本精神神経学会学術総会（横浜）、2023年6月22日
4. 発表年 2023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
---------	---------