

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659563

研究課題名（和文）

次世代シーケンサーを活用した統合失調症のトランスクリプトーム解析

研究課題名（英文）

Transcriptome Analysis of Schizophrenia

研究代表者

尾崎 紀夫 (OZAKI NORIO)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40281480

研究成果の概要（和文）：

統合失調症のリンパ芽球様細胞株を検体としたトランスクリプトーム解析を実施し、分子病態に関与し得る遺伝子・エクソン発現変化を見出した。同定された遺伝子群の発現を制御する遺伝子座位を同定し、統合失調症との機能的な関連について pathway 解析により検討した。その結果、統合失調症の病態像を反映する遺伝子群の抽出、健常者との区別を可能にし得る遺伝子・エクソンセット、アレル特異的遺伝子発現変化を確認することができた。

研究成果の概要（英文）：

Transcriptome analysis of lymphoblastoid cell line derived from schizophrenic patients and healthy controls was performed to investigate dysregulation of alternative splicing by comparing the profiles observed. We found the subtle differences in gene and exon level analysis between schizophrenic patients and healthy controls. The top hit genes were tested using pathway and hierarchical clustering analysis. In addition we observed a number of regulatory SNPs (expression quantitative trait loci-eQTL) by integrating data from genotype and expression wise analysis. As a result, the genes which expression was affected by the disease status may be associated with molecular mechanisms that contribute to the pathophysiology of schizophrenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

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：トランスクリプトーム解析・統合失調症・分子精神医学・ゲノム医学・バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症では未治療期間(DUP)の長期化が予後不良の予測因子であり、発症後数年で病勢が進行し、中枢神経系に非可逆的な障害が惹起される。すなわち、DUP 長期化は、本人のQOLを損なうだけでなく、難治化や自殺に繋がる可能性が高く、統合失調症患者の予後改善には、早期診断・治療的介入が重要であり、DUPの短縮化が必須である。しか

し、統合失調症の診断は、精神症候学に依拠しており、非特異的な症状を呈する発症初期などには診断が困難であり、早期診断・早期介入に有用な検査法・治療法の開発が待望されている。しかし、統合失調症に関与すると考えられる脳内分子病態を検知することは極めて困難であり、検査法が開発が進んでいないのが現状である。

一方、ヒトは約22000個の限られた数の遺

伝子を基にして、精神現象を含む多様な生命機能を果たしている。各遺伝子は複数の mRNA を産生する選択的スプライシング制御機構により、数 10 万種類におよぶタンパク質の発現を制御しており、多様な生命現象が遺伝子発現制御機構に依拠している。脳は、特に選択的スプライシングによる遺伝子発現制御が活発な臓器であり、スプライシング制御機構の破綻によってシナプス可塑性や構造的可塑性が影響を受け、統合失調症等の精神障害の発症脆弱性に寄与すると推察される。

本研究では、スプライシング制御機構の破綻が、本疾患の分子病態に関与する可能性を考慮して、ゲノム解析に加えエクソンレベルの遺伝子発現解析を行い、スプライシング制御機構の病態への関与を検討した。

2. 研究の目的

リンパ芽球様細胞株を検体とした統合失調症のトランスクリプトーム解析を実施し、遺伝子発現変化とスプライシングバリエーションを網羅的に検討した。遺伝子発現を制御する遺伝子座位の検索を行い、統合失調症との関連を遺伝統計学的に検証した。これらを統合し、診断・治療法の開発へ繋がりうる成果取得を目的とした。

3. 研究の方法

統合失調症患者・健常者各 30 名より末梢血液を採取し、リンパ球の分離精製後にエプスタイン・バールウィルスにて不死化し、リンパ芽球様細胞株を調製した。リンパ芽球様細胞株より total RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を実施した。尚、計画当初は次世代シーケンサーによる解析を予定していたが、PCR を工程に含む RNA-seq はアレイ解析に比して発現量解析の信頼性が落ちる可能性が示唆されており、研究目的遂行のため、これまでに実績のある GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array (以下、Exon Array) を代用してトランスクリプトーム解析を実施した。

ゲノム解析には Genome-Wide Human SNP Array 5.0/6.0 (以下、SNP Array) を使用し、Exon Array 解析対象者の遺伝子型を同定した。

Exon Array と SNP Array のデータ処理には Partek® Genomics Suite を使用し、遺伝子/エクソンレベルの発現比較解析およびアレル-遺伝子発現相関解析 (eQTL 解析) を実施した。また、統合失調症 560 名、健常者 548 名から成る日本人全ゲノム関連解析 (J-GWAS) の結果から、遺伝子発現を制御する SNP と統合失調症との関連を調査した。

一連の解析により見出された遺伝子群について PANTHER による pathway 解析を実施し

た。

4. 研究成果

Exon Array による解析の結果、1115 遺伝子について発現量変化が認められ ($p < 0.05$)、統合失調症を含む精神神経疾患と関連が深い遺伝子が多く見出された。上位 45 遺伝子 ($p < 0.01$, fold change > 1.2) のクラスタリング解析の結果、患者群と健常者群を区別するクラスターに分類された (精度 87.5%)。エクソンレベルの解析では、発現量変化が認められた 1327 エクソン (1172 遺伝子, $p < 0.001$, fold change > 1.2) について pathway 解析した結果、軸索伸長、イオンチャンネル、細胞骨格系など統合失調症と関連する分子機能を有する遺伝子群が見出された。上位 197 エクソン (187 遺伝子, $p < 0.0001$, fold change > 1.2) のクラスタリング解析の結果、両群間を区別するクラスターに分類された (精度 93.3%)。スプライシングバリエーション解析では、1743 遺伝子について両群間で有意な変化が認められた ($p < 0.001$)。遺伝子レベル ($p < 0.01$)、エクソンレベル ($p < 0.001$)、スプライシングバリエーション ($p < 0.001$) の解析において共通する遺伝子群を探索した結果、23 遺伝子が抽出され、軸索伸長や Wnt シグナル経路などに関連が認められ、統合失調症の病態生理への関与が示唆された。

アレル-遺伝子発現相関解析 (eQTL 解析) においては、9972 SNPs について遺伝子発現の制御と関連が認められ ($p < 0.05$)、そのうち 87 SNPs については J-GWAS において統合失調症との名目上の関連が示唆された ($p < 0.05$)。これらの SNPs により発現量が制御され得る 50 遺伝子についての pathway 解析では、軸索伸長、Wnt シグナル経路、ムスカリン・ニコチンシグナル経路などに関連が認められた。

統合失調症の病態像を反映する候補遺伝子群が抽出され、健常者との区別を可能にし得る遺伝子・エクソンセットが見出された。また、遺伝子関連解析との統合により、アレル特異的遺伝子発現変化を確認することができた。一連の遺伝子解析により得られた成果から、より有力な統合失調症候補遺伝子群を絞り込み、効率的かつ感度・特異度を最適化した確度の高い診断モデルを構築し、診断技術の向上に加え、新規治療法の開発や病因・病態解明など臨床に還元可能な更なる研究が望まれる。

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 8 件)

- 1) Ikeda M, Aleksic B, その他 20 名, Ozaki N, O'Donovan MC, Iwata N, Genome-wide association study of schizophrenia in a Japanese population, Biol Psychiatry, 査読有、69 (5)、2011、472-478
DOI:10.1016/j.biopsych.2010.07.010
- 2) Kushima I, Nakamura Y, Aleksic B, Ikeda M, Ito Y, Shiino T, Okochi T, Fukuo Y, Ujike H, Suzuki M, Inada T, Hashimoto R, Takeda M, Kaibuchi K, Iwata N, Ozaki N, Resequencing and Association Analysis of the KALRN and EPHB1 Genes And Their Contribution to Schizophrenia Susceptibility, Schizophr Bull, 査読有、38(3)、2011、552-560
DOI: 10.1093/schbul/sbq118
- 3) Niwa M, Matsumoto Y, Mouri A, Ozaki N, Nabeshima T, Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders, Int J Neuropsychopharmacol, 査読有、14 (4)、2011、459-477
DOI: 10.1017/S1461145710001239
- 4) Sekiguchi H, Iritani S, Habuchi C, Torii Y, Kuroda K, Kaibuchi K, Ozaki N, Impairment of the tyrosine hydroxylase neuronal network in the orbitofrontal cortex of a genetically modified mouse model of schizophrenia, 査読有、1392、2011、47-53
DOI: 10.1016/j.brainres.2011.03.058
- 5) Takahashi N, Nielsen KS, Aleksic B, Petersen S, Ikeda M, Kushima I, Vacaresse N, Ujike H, Iwata N, Dubreuil V, Mirza N, Sakurai T, Ozaki N, Buxbaum JD, Sap J, Loss of Function Studies in Mice and Genetic Association Link Receptor Protein Tyrosine Phosphatase alpha to Schizophrenia, 査読有、70 (7)、2011、626-635
DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.06.016
- 6) Tanaka S, Syu A, Ishiguro H, Inada T, Horiuchi Y, Ishikawa M, Koga M, Noguchi E, Ozaki N, Someya T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T, DPP6 as a candidate gene for neuroleptic-induced tardive dyskinesia, Pharmacogenomics J, 査読有、13(1)、2013、27-34
DOI:10.1038/tpj.2011.36

- 7) Torii Y, Iritani S, Sekiguchi H, Habuchi C, Hagikura M, Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Ozaki N, Effects of aging on the morphologies of Heschl's gyrus and the superior temporal gyrus in schizophrenia: A postmortem study, Schizophr Res, 査読有、134、2012、137-142
DOI: 10.1016/j.schres.2011.10.024

- 8) Horiuchi Y, Iida S, Koga M, Ishiguro H, Iijima Y, Inada T, Watanabe Y, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Tochigi M, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T, Association of SNPs linked to increased expression of SLC1A1 with schizophrenia, Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 査読有、159B (1)、2012、30-7 DOI: 10.1002/ajmg.b.31249

〔学会発表〕 (計 5 件)

- 1) Ozaki N, Genome study of Japanese schizophrenia: GWAS, CNV and Rare variants: Symposium: Neuroscience and neurochemistry in Japan, WFSBP Congress 2011, 2011 年 5 月 31 日、Prague, Czech Republic
- 2) 尾崎紀夫, Protein tyrosine phosphatase alufa as novel candidate molecule for the etiopathology of schizophrenia: Genetic analysis and biological implications, 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、横浜
- 3) Akira Yoshimi, Nagahide Takahashi, Branko Aleksic, Itaru Kushima, Masashi Ikeda, Hiroshi Ujike, Takeshi Sakurai, Joseph D. Buxbaum, Jan Sap, Nakao Iwata, Norio Ozaki, Schizophrenia associated polymorphism regulates PTPRA transcript expression in lymphoblastoid cell lines, WCPG 2012, 2012 年 10 月 14 日-18 日、Hamburg, Germany
- 4) Ozaki N, Myelin-related abnormality of schizophrenia: genetic, imaging and postmortem study, the 15th Pacific Rim College of Psychiatrists Scientific Meeting (PRCP 2012) Symposium Genetics of Schizophrenia, 2012 年 10 月 25 日、Seoul, Korea
- 5) 尾崎紀夫, White matter abnormalities in schizophrenia: genetic, imaging and postmortem study, Neuro2012, 2012 年 9 月 20 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 紀夫 (OZAKI NORIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40281480

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

大野 欽司 (OHNO KINJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80397455