

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890067

研究課題名（和文）DNAメチル化による難治性統合失調症の原因解明および診断への応用

研究課題名（英文）Development of diagnosis of intractable schizophrenia by the analysis of DNA methylation.

研究代表者

宇野 恭介（UNO KYOSUKE）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・助教

研究者番号：30608774

研究成果の概要（和文）：メタンフェタミン連続投与したマウスおよびコントロールマウス脳部位および血中のゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化解析を試みた。また血中メチル化状態と脳部位ごとのメチル化状態の相関性について検討した。*Shati* のメチル化について検討したところ、側坐核においては特定の CpG ユニットで有意な変化が確認された。また血中の *Shati* ゲノムのメチル化についても興味深いことに側坐核と同様の CpG ユニットで有意な変化が確認できた。このことより、血中のメチル化の測定が、脳内のメチル化を反映する可能性が考えられる。さらなる解析が必要であるものの血中 DNA メチル化解析による統合失調症診断への応用の可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused DNA methylation as one of gene expression regulators. To analyze the DNA methylation variant, mice were treated with METH or saline for 6 days. Mice genomic DNA was extracted from NAc tissue and peripheral blood 2 h after the last injection. In METH treated mice, the methylation level of *Shati/Nat8l* promoter specific region prepared from NAc was lower than that of saline treated mice. Moreover, same domain of genome DNA extracted from cardiac blood in METH treated mice was less methylated compared with saline treated mice. These results indicate that expression of *Shati/Nat8l* might be regulated by DNA methylation, and to analyze the blood level of methylation at *Shati/Nat8l* specific genomic region could help a diagnosis of psychiatric disorders in clinical field.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：DNAメチル化 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の1%が思春期に発症する疾

病である。また一旦発症すると完治は難しく、薬物治療を受けながら、一生病気と関わっていかなければならない。病気の診断についても、熟練した臨床医の技術が必要で、画期的な治療薬の開発も難航しているのが現状である。さらには病状を反映した動物モデルの作成が困難であることも治療薬開発の遅延につながっている。申請者の所属研究室は、覚せい剤を連続投与することによって作成した統合失調症モデルマウス側坐核で発現が増大しているタンパクSHATI、PICCOLOおよび、第3の分子Aを見出している。SHATI、PICCOLO両分子は、ドパミントランスポーターの機能障害を抑制することが報告されている。

2. 研究の目的

精神疾患は、患者数が多いにも関わらず原因解明が不十分で、病気の診断も難しく、画期的な治療薬の開発も難航しているのが現状である。さらには病状を反映した動物モデルの作成が困難であることも研究の遅延につながっている。近年の報告では、精神疾患患者死後脳において様々な遺伝子のメチル化が上昇しているといった報告が多数存在する。申請者の所属する研究室では、薬物依存の研究過程で、覚せい剤であるメタンフェタミンを投与されたマウスでは、これら精神疾患で生じる行動学的変化が観察されることを見出しており、投与マウスにおいてSHATI、PICCOLO、新規たんぱく質A（未発表）の発現上昇が確認され、精神疾患に関与する可能性を報告してきた。したがって本研究においてはこれらの新規遺伝子が、精神疾患患者のバイオマーカーとなり得るかどうかについて検討する。

3. 研究の方法

メタンフェタミン連続投与した統合失調症モデルマウスおよびコントロールマウス脳内における3つの遺伝子の発現について、*in*

situ ハイブリダイゼーションや免疫染色、さらに定量的PCRにより部位ごとに検証する。さらに脳部位ごとのゲノムDNAを抽出し、各遺伝子におけるメチル化の状態についてエピジェネティックな解析を試みる。同時に、遺伝子改変動物における行動学的変化について評価する。さらにメタンフェタミン連続投与したマウスより血液を回収した後、上記3遺伝子の血中たんぱく質濃度について測定するとともに、RT-PCRにより遺伝子発現について検討する。同時に、ゲノムDNAも抽出し、血中におけるメチル化の状態についても検討し、ゲノムのメチル化が、精神疾患におけるバイオマーカーとなり得るかどうかをメタンフェタミン繰り返し投与したマウスあるいはその他の統合失調症モデルマウスにおいて検討を行う。さらにその結果を元に、富山大学附属病院の精神科や神経内科医師に協力を仰ぎ、神経・精神疾患患者の血液を採取し上記遺伝子のたんぱく質濃度および、DNAメチル化を測定し、臨床への応用適用を目指す。

4. 研究成果

メタンフェタミン連続投与したマウスおよびコントロールマウス脳部位ごとのゲノムDNAを抽出し、各遺伝子におけるメチル化の状態についてエピジェネティックな解析を試みた。さらに、同動物より血液を回収した後、SHATI、PICCOLO、TMEM168の血中におけるメチル化の状態についても検討し、ゲノムのメチル化が、精神疾患におけるバイオマーカーとなり得るかどうかを検討した。昨年度までの研究において、メタンフェタミン繰り返し投与により、海馬、側坐核、前頭前皮質において上記の遺伝子の上昇が*in situ* ハイブリダイゼーションおよびリアルタイムPCRにより確認された。また血中メチル化状態に変化がある可能性が認められたため、その変化が脳部位ご

とのメチル化状態をも反映するかどうか、脳部位ごとのメチル化解析を行い、血中との相関性について検討した。まず、TMEM168については、目的とした脳部位においてはほとんどメチル化がおこっておらず、メタンフェタミン連投マウスとコントロールマウスにおいて変化は確認されなかった。次に、Shatiのメチル化について検討したところ、側坐核においてはメタンフェタミン群ではコントロール群と比較して、Shati転写開始点上流であるCpGアイランド1のDNAメチル化率が減少しており、特定のCpGユニットで有意な減少が確認された。また血中のShatiゲノムのメチル化についても確認したところ側坐核と同様に減少が確認され、興味深いことに側坐核と同様のCpGユニットで有意な減少の確認できた。このことより、血中のメチル化の測定が、脳内のメチル化を反映する可能性が考えられる。さらなる解析が必要であるものの血中DNAメチル化解析による統合失調症診断への応用の可能性が示唆される。

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)

[学会発表] (計 19 件)

- 1) Kyosuke Uno.: Changes of DNA methylation of Shati/Nat81 in psychiatric disorder mice models induced methamphetamine treatment. The 3rd International Symposium on Life Science in Toyama, 2013, 3, 14, Toyama.
- 2) 石川雄大, 宮本嘉明, 鷺見和之, 家垣典幸, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美.: マウスにおけるShati/NAT81のメタンフェタミン応答性作用メカニズムについて. 日本薬学会北陸支部第124回例会, 2012, 11, 18, 富山.
- 3) 新田淳美, 石川雄大, 鷺見和之, 家垣典幸, 宇野恭介, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明.: マウス側坐核でのShatiの過剰発現によるメタンフェタミンの毒性の増強は代謝型グルタミン酸受容体3によって調節されている. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012, 10, 25-26, 名古屋.
- 4) 石川雄大, 宮本嘉明, 鷺見和之, 家垣典幸, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美.: シャチの側坐核特異的過剰発現は代謝型グルタミン酸受容体3を介してマウスにおけるメタンフェタミン誘発性ドパミン遊離量増加を抑制する. 第22回日本臨床精神神経薬理学会・第42回日本神経精神薬理学会合同年会, 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
- 5) 宇野恭介, 長倉美由紀, 玉地亜衣, 鍋島俊隆, 尾崎紀夫, 宮本嘉明, 新田淳美.: 精神疾患患者の血清サンプルにおける新規分子SHATI濃度測定法の開発. 第22回日本臨床精神神経薬理学会・第42回日本神経精神薬理学会合同年会, 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
- 6) 齊鹿絵里子, 宮本嘉明, 村松慎一, 宇野恭介, 新田淳美.: マウス側坐核における精神疾患関連分子transmembrane protein 168の過剰発現が行動に与える影響. 第22回日本臨床精神神経薬理学会・第42回日本神経精神薬理学会合同年会, 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
- 7) 家垣典幸, 宮本嘉明, 宇野恭介, 日比陽子, 鍋島俊隆, 新田淳美.: Shati過剰発現マウスにおける行動解析. 第22回日本臨床精神神経薬理学会・第42回日本神経精神薬理学会合同年会, 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
- 8) 家垣典幸, 宮本嘉明, 宇野恭介, 日比陽子, 鍋島俊隆, 新田淳美.: マウスにおけるShati過剰発現は社会行動およびメタンフェタミン反応性に影響する. 第63回日本薬理学会北部会, 2012, 9, 14, 新潟.
- 9) 新田淳美, 宇野恭介, 宮本嘉明.: 新規薬物依存関連遺伝子の生理機能の解明および治療開発にむけての研究. 平成24年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会(シンポジウム), 2012, 9, 7-9, 札幌.
- 10) Takaoka, K., Uno, K., Inagaki, R., Nagakura, M., Tamaji, A., Ozaki, N., Miyamoto, Y., Nitta, A.: Involvement of Shati on depression-like behavior in the postpartum period in human and mice. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012, 9, 29-10, 2, Kobe.
- 11) Sumi, K., Miyamoto, Y., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Muramatsu, S., Hibi, Y.,

Nabeshima, T., Uno, K., Nitta, A.: The differences of the action of shati between the nucleus accumbens and dorsal striatum on the methamphetamine-induced addictive behaviors in mice. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012, 9, 29-10, 2, Kobe.

- 12) Nitta, A., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Muramatsu, S., Nabeshima, T., Furukawa-Hibi, Y., Uno, K., Miyamoto, Y.: Overexpression of shati in the nucleus accumbens affects the abnormal behavior induced by methamphetamine in mice. The 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, 2012, 6, 3-7, Stockholm, Sweden.
- 13) 新田淳美, 宇野恭介, 日比陽子, 鍋島俊隆, 宮本嘉明.: 統合失調症精神疾患関連の3つの新規遺伝子について. 統合失調症学会, 2012, 3, 16-17, 名古屋.

他 6 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 精神障害の検査方法および検査キット
発明者: 新田淳美 宇野恭介
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 2013-29643
出願年月日: 2013年2月19日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 恭介 (UNO KYOSUKE)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
助教
研究者番号: 30608774