

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591675

研究課題名(和文)統合失調症におけるアドレノメジュリンの遺伝学的解析

研究課題名(英文)Genetic analysis of adrenomedullin in schizophrenia

研究代表者

垣内 千尋(Kakiuchi, Chihiro)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90342766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症は、生物学的な病態の解明が急務である。かつての一卵性双生児不一致例を対象とした研究からアドレノメジュリン遺伝子mRNA発現の変化が病態に関与している可能性があり、本研究は、同遺伝子のDNA配列およびDNAメチル化の解析により病態への関与について検討した。DNA配列解析では、患者474例、健常対照475例について、全コーディング領域についての解析を行ったが、健常対照1例で1箇所を認めただけで関与は否定的であった。また、双生児不一致例二組のDNAメチル化解析では、不一致例内において差は認めなかった。今後はその他のmRNA発現量に影響を与える要因についての検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Schizophrenia is a severe mental disorder of which molecular mechanisms must be clarified. Previously, altered mRNA expression of adrenomedullin (ADM) was suggested to contribute to the pathophysiology by some studies including that of monozygotic twins discordant for the illness. In this study, all of the coding regions of ADM gene in 474 cases and 475 controls were re-sequenced, and I assessed the contribution of the rare variants to the illness. I further examined the difference of DNA methylation status in two pairs of the monozygotic discordant twins by using Human Methylation450 array. The rare variants was observed in only one control but not in patients, which did not show the contribution of the rare coding variants of ADM to the illness. The differences of the DNA methylation status for the 19 sites on the array among the twins were not observed. Further studies are needed to clarify the mechanism affecting the altered mRNA expression of ADM in schizophrenia.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 アドレノメジュリン ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、幻覚・妄想などの陽性症状および感情鈍麻・意欲低下・思考障害・社会的ひきこもりなどの陰性症状により社会的機能が低下する慢性精神疾患である。生涯有病率約 1%と推計され、思春期以降若年期に発症することが多い。当事者のみならず家族も大きな苦悩を抱え、罹患者数の多さや社会的損失の甚大さ、さらには十分な治療法が存在しないなどの理由から、病態、特に生物学的な病態の解明が急務である。

臨床疫学的研究からは、統合失調症における遺伝的要因の関与が示されてきた。これまで、複数のリスク遺伝子が発病に関与するという common disease, common variant 仮説をもとに、大規模集団を対象とした候補遺伝子関連解析がなされてきた。しかし近年続々と結果が出つつあるゲノムワイド関連研究も含め、様々な遺伝子の関連が示唆されているものの一定した結果がみられたものは乏しく、またオッズ比も低いなど病態を説明し得る状態ではない。臨床的には遺伝様式としても孤発例から負因が濃厚な家系まで多様であり、rare variant 仮説も注目されている。一方、ゲノムに対する知見の増大とともに、コピー数多型や DNA のメチル化による制御の関与も注目されている。いずれにしても従来の関連解析とは異なるアプローチが必要な状況にある。

申請者らは、かつて一卵性双生児統合失調症不一致例におけるリンパ芽球を用いた DNA マイクロアレイによる網羅的 mRNA 発現解析から、患者においてアドレノメジュリン遺伝子の発現が上昇していることを見出した(Kakiuchi C et al., 2008)。

アドレノメジュリンはカルシトニンスーパーファミリーに属する 52 個のアミノ酸からなる分子量約 6000 のペプチドで、強い血管拡張による降圧作用を有する。アドレノメジュリンは心臓血管・肺・腎など心臓血管系を中心に、内分泌・中枢神経系・消化管などの広範な組織で産生分泌される。当初、血管拡張作用を有する物質として注目されてきたが、その後の研究から細胞の遊走、分化制御、抗炎症作用など多彩な生理活性を持つことが分かってきた。中枢神経におけるアドレノメジュリンの主な産生源は脳血管内皮、脈絡叢、グリア細胞および神経細胞とされており、これまでに、神経伝達物質、神経修飾物質、神経ホルモンとして活動している可能性が指摘されている。

統合失調症との関連においては、既報として慢性期の統合失調症患者で血漿アドレノメジュリン濃度が約 3 倍に上昇しているとするものが二報あり(Zoroglu SS et al., 2002 and Yilmaz N et al., 2007)、自閉症・

躁うつ病においても上昇率は統合失調症よりは低い、有意な上昇が報告されている。また血漿のみならずリンパ芽球における mRNA レベルが男性の統合失調症患者で上昇していることを報告しており(Huang CH et al., 2004)、申請者らの報告とあわせ、反応性の上昇ではないことが推測される。さらに、精神疾患ゲノムワイド関連研究で初めてゲノムワイドに有意とされたのが、アドレノメジュリンの近傍の SNP であった(BPII)(Huang J et al., 2010)。

アドレノメジュリンが過剰発現した動物モデルでは、脳虚血後には血管新生や神経新生が高まる事が示されている(Miyashita K et al., 2006)。一方で、脳におけるアドレノメジュリンをノックアウトした動物モデルでは過度に不安した行動を取ることが示されており(Fernandez AP et al., 2008)、アドレノメジュリンは直接的に行動に関わっている可能性がある。また、関節リウマチの動物モデルで、病変部位へのアドレノメジュリン投与により症状が改善することが示されているが(Gonzalez-Rey E et al., 2007)、興味深いことに関節リウマチと統合失調症の合併における負の相関は繰り返し報告されている謎でもある。

上記背景より、アドレノメジュリン遺伝子の rare variant あるいは DNA メチル化の違いが統合失調症の病態に関与している可能性が想定される。

そこで、本研究では、統合失調症患者及び健常対照者を対象としてアドレノメジュリン遺伝子の次世代シーケンサーを用いた DNA シークエンスおよびアレイを用いた DNA メチル化解析を行い、DNA 変異、あるいは DNA メチル化の違いが病態に関与しているかを明らかにすることとした。

2. 研究の目的

アドレノメジュリン遺伝子の DNA シークエンスおよび DNA メチル化解析を行い、DNA 変異、あるいはメチル化の違いが統合失調症病態に関与しているかを検討する。

3. 研究の方法

アドレノメジュリン遺伝子全 coding 領域の DNA 配列解析：

東京大学医学部附属病院精神神経科で収集した統合失調症と診断された患者 474 例(男性 234 名、女性 240 名、年齢 43.1 ± 15.1 歳)と、年齢及び性別をマッチさせた健常対照 475 例(男性 240 名、女性 235 名、年齢 41.6 ± 12.5 歳)を対象とし、末梢血白血球より抽出したゲノム DNA を用いた研究を行った。患者は 2 名の精神科医が DSM-IV に基づき診断を行い、対照者は

精神疾患簡易構造化面接法 (M.I.N.I) を用いて、あるいは非構造化面接により精神疾患の有無を評価し、現在及び過去に精神疾患と診断されなかったものを対象とした。

アドレノメジュリン遺伝子全コーディング領域の配列解析を次世代シーケンサー miSeq (illumina, San Diego, CA, USA) を用いたターゲットドリシークエンスによる候補抽出及びサンガー法による確認を行った。アンプリコンは Truseq Custom Amplicon (illumina) により設計し、参照配列は UCSC hg19 (human genome 19) とした。解析は Miseq Reporter v2.3.32 (illumina) により行い、annovar (<http://annovar.openbioinformatics.org/>) による annotation を行った。

サンプルの 20% 以上がカバレッジ 10x 未満の領域及び次世代シーケンサーより得られた候補変異については、サンガー法により DNA 配列を決定した。プライマーは Primer3 v0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) で設計した。PCR 増幅を行い、ExoSAP-IT (affymetrix, Santa Clara, CA, USA) による精製を行った後、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて伸長反応を行い、Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer (Life Technologies) により DNA 配列を決定した。

一卵性双生児統合失調症不一致例における DNA メチル化解析：

DNA メチル化解析については、以前申請者がアドレノメジュリン遺伝子の mRNA 発現量の患者での上昇を見出した一卵性双生児統合失調症不一致例二組を対象とした。末梢血白血球由来のゲノム DNA を用い、DNA メチル化は Human Methylation450 BeadChip (illumina) により測定した。実験は、Illumina Infinium HD Methylation Assay, Manual Protocol に従い行った。

1µg のゲノム DNA を bisulfite 処理後、whole genome amplification を行い、Human Methylation450 BeadChip にハイブリダイゼーションを行った。一塩基伸長反応によって、プローブ末端に一塩基の標識ヌクレオチドを取り込ませた後、標識ヌクレオチドに対する蛍光色素標識抗体により染色を行い、iScan (illumina) を用いて蛍光イメージを取得した。出力された結果に対して、GenomeStudio (illumina) により、シグナル値が得られ、Detection p value ≤ 0.01 のプローブを抽出し、アドレノメジュリン遺伝子領域の DNA メチル化サイトについて双生児内での違いを検討した。

なお、本研究は、東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において承認されている。

4. 研究成果

アドレノメジュリン遺伝子全 coding 領域の DNA 配列解析結果：

統合失調症におけるアドレノメジュリン遺伝子の関与について、患者 474 例、健常対照 475 例について、全コーディング領域の配列解析を次世代シーケンサー及びサンガー法により DNA 配列解析を行った。

平均 depth が 20x 未満のサンプルを除外し、最終的に解析対象となったのは患者 464 例、健常対照 463 例である。

平均 depth は患者群では 363x、健常群では 328x で変異解析対象領域であり、変異解析対象領域内で 10x 以上の領域は全サンプル 96.7% であった。

非同義置換かつ db132 に含まれるものを除外し、filter により PASS のものを抽出、サンガー法により確認されたものは、健常対照者 1 名における 1 箇所のみで、患者では認めなかった。

以上の結果から、コーディング領域の変異が病態に関与している可能性は否定的と考えられた。

一卵性双生児統合失調症不一致例における DNA メチル化解析結果：

一卵性双生児統合失調症不一致例二組について、DNA メチル化解析を行った。

Human Methylation 450 アレイ上には 19 か所のアドレノメジュリン遺伝子領域の DNA メチル化サイトがあるが、いずれも不一致例内において >0.2 のものはみられず、それらのメチル化状態が mRNA 発現の違いに与える影響は否定的と考えられた。

本研究はアドレノメジュリン遺伝子について統合失調症患者及び健常対照多数例を対象としたコーディング領域における DNA 配列の検討ならびに一卵性双生児統合失調症不一致例を対象とした DNA メチル化解析を行ったが、いずれも疾患に関与する違いは見出されなかった。今後は、プロモーター領域や UTR などその他の mRNA 発現量に影響を与えうる領域についての検討が必要と考えられた。

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〕

出願状況（計 0件）
取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://npsy.umin.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者 垣内千尋
垣内 千尋 (Kakiuchi, Chihiro)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：90342788