

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591737

研究課題名(和文) DISC-Mが制御する遺伝子ネットワークの同定と精神疾患発症機序解明への応用

研究課題名(英文) Gene networks governed by DISC-M and schizophrenia

研究代表者

大西 哲生(OHNISHI, TETSUO)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：80373281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：均衡型染色体転座をもつ特異な統合失調症症例のゲノムDNAを用いて次世代シーケンサにより切断点を塩基レベルで決定した。患者由来細胞では、切断染色体からの切断点近傍遺伝子DISC-Mの発現が亢進していた。統合失調症関連行動異常を示すDisc-m KOマウスの脳では、様々な遺伝子の発現に異常を認めた。DISC-M遺伝子産物が転写調節複合体を形成することを証明した。双極性障害で発見されたミスセンス変異をもつDISC-Mは細胞内に蓄積した。DISC-Mは、下流遺伝子の発現制御を介して脳の正常な発達を支え、その異常は統合失調症、双極性障害の発症リスク形成に関わる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We focused on a schizophrenia case with a balanced chromosomal translocation. We determined the precise structure of the patient's genome. We found the DISC-M is a gene that is the most proximal to the breakpoint within chr.4. In cells from the patient, the expression of DISC-M was significantly unregulated. We confirmed that the DISC-M gene product forms various transcription complexes by co-immunoprecipitation assay, regulating the expressions of multiple genes in the brain. Rare mutations that were found in bipolar patients did not affect the efficiency of the protein complex formation. Interestingly, those two mutations appeared to stabilize the DISC-M protein in the cells. In conclusion, DISC-M support normal brain development by regulating the expressions of downstream genes, and the dysfunction of the gene and gene networks governed by DISC-M might form a predisposition to mental disorders such as schizophrenia and bipolar disorder.

研究分野：神経科学

キーワード：染色体転座 iPS細胞 転写因子

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、典型的には思春期以降に発症し、生涯罹患率が一般人口の約 1%を示す代表的な精神疾患である。その症状は極めて多岐にわたり、大きく陽性症状、陰性症状、認知障害に分類される。ドパミン D2 受容体ブロック作用を主な作用機序とする一連の抗精神病薬の投与により治療が行われるが、その効果は限定的であり、再発を繰り返すうち次第に社会機能も低下するといった症例も多く、一旦発症すると患者の QOL は大きく障害される。また医療経済学的な負担も膨大であることから、一刻も早い病因の解明とそれに基づく予防法・治療法の開発が求められている現状がある。統合失調症は、遺伝的素因と環境要因が絡み合って発症に至る複雑遺伝疾患と考えられている。近年の遺伝子研究により、遺伝学的にも効果が弱く、その遺伝子の生物学的機能にも微弱な影響しか与えない多型が極めて多く発見される一方、多くの患者に共通する原因遺伝子も脆弱性遺伝子は存在しないことが次第に明らかになってきた。このような状況ではこれらの遺伝子研究の結果から、特定の病因に収束させることも、heterogeneous な疾患を遺伝子情報に基づいて分類することも、創薬のターゲットを絞り込むことも不可能と思われる。

これらの困難な状況を打開するため、我々は統合失調症全体の中では頻度は低くてもごく少数(可能なら一つ)の遺伝子変異が発症に強く影響を与えたと考えられる症例に着目し、そこから、統合失調症一般の病態生理の理解に繋げるというアプローチも合わせて必要であると考えられる。その一例として 2004 年、均衡型染色体転座 t(4;13)(q16.1,q21.31)をもつ統合失調症症例を発見・報告した。この患者は「政府がマイクロチップを脳に埋め込んで自分をコントロールしようとしている」「はじめて会った人がみな自分のことをどんな人間か知ってい

る」といった典型的な妄想にとらわれていた。近親者に統合失調症を含む精神疾患発症者はおらず、この転座も *de novo* で生じたものであったことから、この転座がこの患者の統合失調症発症に強い効果を与えたものと予測された。

### 2. 研究の目的

本症例から抽出した情報を一般の症例に何らかの形で外挿するためには、まず患者細胞で *DISC-M* 遺伝子の発現がどのような異常を示しているのかを知り、その上で *DISC-M* タンパク質が転写調節因子としてどのような生物学的機能を果たしているのかを理解することが肝要である。本研究では患者由来細胞のゲノム解析、iPS 細胞の解析、*Disc-m* KO マウスの解析、分子生物学的な複合体解析など重層的なアプローチを用いて上記の目的の達成を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) **発端者のゲノム解析**: 本研究着手以前に転座 t(4;13)(q16.1,q21.31)の切断点を FISH 実験によりある程度絞り込んでおり、*DISC-M* 遺伝子が有力な候補として浮かび上がっていたが、本研究では切断点をピンポイントで確定させることで *DISC-M* 遺伝子の候補遺伝子としての該当性を確かめることを目指した。患者はすでに亡くなっており、かつ利用可能な生体材料がエプスタイン・バーウイルス(EBV)による株化リンパ球のみであったことから、そこから抽出したゲノム DNA を用いて次世代シーケンサによりゲノム構造を解析することとした。

(2) ***DISC-M* の発現解析**: 株化リンパ球においては *DISC-M* の発現は見られなかったことから発端者株化リンパ球から iPS 細胞を樹立し *DISC-M* の発現解析を進めた。

(3) ***DISC-M* 遺伝子産物の複合体解析**: *DISC-M* 遺伝子産物が転写調節因子として働くことは相同タンパク質の機能から予

測はされたが実体は不明であった。研究期間前までに東京都医学研の糸川チーム（現・新井チーム）と共同で yeast two hybrid screening で転写因子を含む結合タンパク質の候補を見出していた。本研究はこの知見をさらに確かなものとするため DISC-M に V5 タグ、結合タンパク質候補に HA タグを付加したコンストラクトを作製、HEK293T 細胞に発現させ共免疫沈降実験による結合活性の validation を行った。

(4) **Disc-m KO マウスを用いた解析:** 本研究開始までに *Disc-m* KO マウスには様々な精神疾患関連行動異常が現れること、マイクロアレイ解析により脳内において様々な遺伝子の発現異常が起こることを明らかにしてきた。従って、*Disc-m* は脳内で様々な遺伝子の発現制御を行うことにより脳機能を調節する因子であることが証明された。本研究においては、見出される行動異常が精神疾患治療薬で改善するかどうかを確かめることで統合失調症モデルマウスとしての予測妥当性を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) **発端者のゲノム解析:** 患者株化リンパ球のゲノム DNA からライブラリーを作製しイルミナ社次世代シーケンサ HiSeq2500 によるペアエンドリードによりゲノム構造の決定を行ったところ、4 番、13 番をまたぐリードを得ることが出来、最終的にその領域をカバーする gPCR と PCR 断片のサンガー法による塩基配列決定に成功、4 番側、13 番側の転座点を塩基レベルで決定することに成功した。4 番染色体側の切断点は、*DISC-M* 遺伝子の exon 1 上流約 35 kbp に位置しており、gene body そのものは直接破壊されていなかったものの、他の遺伝子からは数 Mbp 以上離れており、*DISC-M* が原因遺伝子であることを強く示唆する結果となった。13 番染色体側の切断点に関して事前の予測通り、いわゆる「遺伝子砂漠」にあり直接の原因遺伝子は

13 番染色体側に存在しない可能性がさらに高まった。

(2) **DISC-M の発現解析:** 作製した患者由来 iPSC から neurosphere さらには neuron を分化させた。*DISC-M* 転写物上のマーカー(CA リピートの数の違い)を用いてこれらの細胞がヘテロに有する正常 4 番染色体と転座 4 番-13 番染色体から発現する *DISC-M* 転写物の量を RT-PCR/subcloning により比較した。その結果、*DISC-M* 転写物は転座染色体からのものが 2-3 倍存在することが判明した。従って、患者の細胞では *DISC-M* 遺伝子の発現の調整異常、あるいはオーバードライブがかかっている可能性が強く示唆された。

(3) **DISC-M 遺伝子産物の複合体解析:** LIM ドメインのみを持つ転写調節因子、LIM ドメインとホメオドメインを持つ転写因子、トランスアクチベーター活性を持つ分子など yeast two hybrid screening で得られた分子との相互作用はすべてこの実験でも確認されたことから、擬陽性ではなく生物学的に意味がある結合パートナーである可能性がさらに高まった。また本解析結果から、*DISC-M* が転写調節因子であることのさらに強い証拠が得られた。*Disc-M* KO マウスの脳において多数の遺伝子に発現異常が認められたことと一致する結果である。また、*DISC-M* 遺伝子に双極性障害患者から見つかった二つのミスセンス変異は、結合パートナーとの結合自体には直接の影響を与えなかった。しかしながら両変異ともに、野生型と比較して細胞内に高い濃度で蓄積し、このことが病因と何らかの関連がある可能性が示唆された。

(4) **Disc-m KO マウスを用いた解析:** 統合失調症治療薬の投与により *Disc-m* KO マウスに見られる過活動性、恐怖条件付け異常は大きく改善した。したがって、*Disc-m* KO マウスは統合失調症モデ

ルマウスとしての予測妥当性を満たすと  
考えられた。

(5) **最後に：**

*DISC-M* の発現制御異常が、おそらく下流  
遺伝子の発現異常を介して統合失調症  
(少なくとも本症例) の病態に関連する  
可能性が、患者由来細胞の解析、KO マ  
ウスの解析、複合体解析のいずれからも  
明らかになった。*DISC-M* が制御する遺伝  
子発現ネットワークが精神疾患のバイオ  
マーカーになり得る可能性、そのネット  
ワークに含まれる遺伝子の変異が発症の  
要因になっている例があるのかなども念  
頭に、今後様々なレベルの詳細な検討が  
必要である。

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 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

大西哲生、渡辺明子、大羽尚子、岩  
山佳美、豊島学、島本知英、新井誠、  
山田一之、市川智恵、前川素子、野  
崎弥生、糸川昌成、吉川武男、「染色  
体転座をともなう統合失調症症例の  
転座点に存在する転写調節因子の生  
物学的役割」、日本統合失調症学会、  
2015 年 3 月 27 日、都市センターホテ  
ル、東京

Tetsuo Ohnishi, Akiko Watanabe,  
Kazuyuki Yamada, Hisako Ohba,  
Makoto Arai, Tomoe Ichikawa, Manabu  
Toyoshima, Akihiro Nakaya, Yoshimi  
Iwayama, Mitsuhiro Miyashita,  
Masanari Itokawa, Takeo Yoshikawa.  
Multiple Behavioral deficits reminiscent  
of schizophrenia in mice deficient in  
Disc-M (Disrupted\_in\_schizophrenia,  
Matsuzawa), a gene encoding a  
transcription regulator, CINP Annual

Meeting 2012, Stockholm, Sweden,  
June 5, 2012.

〔図書〕(計 1 件)

大西哲生、吉川武男、「統合失調症」、編  
集：福田正人 / 糸川昌成 / 村井俊哉 / 笠  
井清登、第 2 部「統合失調症の基礎と研  
究」のうち「第 20 章 動物モデル」、分  
担執筆、2013 年 5 月

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 哲生 (OHNISHI, Tetsuo)

研究者番号：80373281

(2) 研究分担者

吉川 武男 (YOSHIKAWA, Takeo)

研究者番号：30249958

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：