

琉球大学学術リポジトリ

精神疾患の遺伝及び環境要因の媒介としてのメチル化と内在性レトロウイルス

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: 出版者: 陣野吉広 公開日: 2010-01-18 キーワード (Ja): 精神疾患, 遺伝要因, 環境要因, メチル化, 内在性レトロウイルス キーワード (En): RNAi, psychiatric disorders, genetic factors, environmental factors, DNA methylation, human endogenous retroviruses 作成者: 陣野, 吉広, 杉本, 潤, 松原, 忍, 小田, 高也, Jinno, Yoshi, Sugimoto, Jun, Matsubara, Shinobu, Oda, Takaya, 陣野, 吉廣 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12000/14838 |

研究成果報告書

精神疾患の遺伝及び環境要因の媒介としてのメチル化と内在性レトロウイルス

(研究課題番号 15591236)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成17年5月

琉球大学附属図書館
医学部分館

研究代表者 陣野吉広
(琉球大学大学院医学研究科教授)



0020055000487

は し が き

統合失調症にしる躁鬱病にしる共に遺伝性疾患である。しかし、「遺伝子」のみで発病を説明することは困難である。精力的な遺伝子解析研究が為されているにもかかわらず、明快な答えを得るに至っていない。これらの疾患における遺伝要因と環境要因の作用を一元的に説明するものとして、内在性レトロウイルス（HERV）と DNA メチル化に代表されるエピジェネティクスに着目した。そこから作業仮説を立て、本研究課題では期間内達成目標に以下の三項目を設定した。

1. 脳での潜在的発現活性能を保持している HERV を探索し同定する。
2. それらのうち、脳の発育や機能に重要な遺伝子の近傍に存在するものについて、異常な条件下で近傍の遺伝子の発現制御に干渉する可能性を検証する。
3. 以上によって絞り込んだ HERV の健常者白血球 DNA におけるメチル化状態を明らかにし、統合失調症患者におけるメチル化異常の有無を検討する。

結果は「研究成果」の項で述べるが、満足に遂行できたのは、上の目標項目 1 のみで、2 及び 3 は途中経過にとどまった。原因は、研修医制度の変化によって臨床から来ていた研究生が臨床に戻らざるをえなかったことと、改組に伴う「学部教育負担」による戦力不足である。しかし、本研究課題の根幹である「機能性精神疾患へのエピジェネティクスの関与の有無の検討」は興味深い結果を着実に出して、今後の発展がおおいに期待される。

研究組織

研究代表者：陣野 吉広（琉球大学大学院医学研究科教授）

研究分担者：杉本 潤（琉球大学大学院医学研究科助手）

研究分担者：松原 忍（琉球大学医学部研究生）

研究分担者：小田 高也（琉球大学大学院医学研究科助教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-------|------|-------|
| 平成15年度 | 2,600 | 0 | 2,600 |
| 平成16年度 | 900 | 0 | 900 |
| 総計 | 3,500 | 0 | 3,500 |

研究発表

(1) 学会誌等（発表者名、テーマ名、学会誌名、巻号、年月日）

Nakamura A, Okazaki Y, Sugimoto J, Oda T, Jinno Y. Human endogenous retroviruses with transcriptional potential in the brain. *J Hum Genet* **48** (11): 575-581, 2003

Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, Sugimoto J, Oda, Miura K, Miyazaki T, Ogura C, Okazaki Y, Jinno Y. Age related changes of the 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet* **68** (Pt 3): 196-204, 2004

Okahara G, Matsubara S, Oda T, Sugimoto J, Jinno Y, Kanaya F. Expression analyses of human endogenous retroviruses (HERVs): tissue-specific and developmental stage-dependent expression of HERVs. *Genomics* **84** (6): 982-990.

(2) 口頭発表（発表者名、テーマ名、学会等名、年月日）

岳原吾一, 発現活性型ヒト内在性レトロウイルスの探索・同定と特性解析, 第48回日本人類遺伝学会: 2003年10月21-24日

中村明文, メチル化の組織特異性とエピジェノタイプ解析, 第48回日本人類遺伝学会, 2003年10月21-24日

島袋盛洋, HPLCを用いた統合失調症のメチル化異常の有無の検討, 第11回日本精神行動遺伝医学会, 2003年10月25日

杉本潤, 精神疾患/機能関連遺伝子のメチル化解析-特に、組織特異性及び個人差, 第12回日本精神行動遺伝医学会, 2004年10月16日

島袋盛洋, 統合失調症における低メチル化要因の検討, 第12回日本精神行動遺伝医学会, 2004年10月16日

(3) 出版物（著者名、書名、出版社名、年月日）: なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況: なし

研究成果

1. 脳での潜在的発現活性能を保持している HERV の探索・同定.

5つのHERVファミリーについてEST database(dbEST)のBLAST検索を行い、600個を回収した。このうち、111個が脳と何らかの関連性がある組織（または細胞）から作製されたcDNA libraryに由来するものであった（癌または株化細胞, 77; 正常組織, 34）。これらから4つを抽出し、胎児脳RNAを用いたRT-PCRのクローン化産物の配列解析で確認を行った。最終的に、脳での潜在的発現活性能を持つHERVとして同定されたのは22番染色体(22q12)のHERV-Hと1番染色体(1q21-q22)のHERV-K102の2つだけであった。(J. Hum. Genet. 2003) 網羅的検索の必要性を痛感し、データベースの包括的探索法を確立した。約465万個のESTのうち脳関連組織のmRNAから作製されたEST約44万個を選別し、12ローカスを期待できるものとして抽出した。胎児脳RNAを用いてこれらの潜在的転写活性能を検討した。その結果、HERVK9やMER61AなどのHERV配列をもつ6ローカス(3p22.1, 5p15.3, 4p16.3, 4q31.3, 1p36.13)を新たに同定した。(なお、このほか、正常組織においてノーザン解析で検出されるHERVを新規に3つ同定した。Genomics 2004)

2. 上記 HERVs による近傍遺伝子の発現制御への干渉の検証.

22q12のHERV-Hは、シナプシン3(SYN3)の約4kb下流に逆向きに存在する。このHERV-Hからのread-through転写物によるRNAiを介したSYN3への干渉を、株化細胞を用いて検証することを試みた。ルシフェラーゼ遺伝子の3'端にSYN3のexon13(Ex.13)を組み込み、Ex.13のanti-sense strandを発現するようにしたプラスミドと共トランスフェクションして40%の活性抑制が得られた。HERV-Hからのread-through転写物の存在とその効果を確認するため、これに必要な3種のコンストラクトを作製した。発現ベクターpGL3-basic(3.4kb)に、HERV-H 3'LTRからSYN3のEx.13までのゲノム配列(5.7kb)を挿入したもの、Ex.13を含まないもの(5.2kb)及びEx.13を逆向きに挿入したもの(5.7kb)の3種である。現在、種々の細胞を用いて最も効率の良い細胞及び条件を検討中である。

3. 統合失調症患者における HERV メチル化異常の有無の検討

サザン法により、HERV-K loci のメチル化の組織特異性および個人差の有無の予備的検討を行った。サンプルは、白血球、(胎児)脳・肝臓・胎盤のそれぞれ3例ずつを用いた。組織及び個人間でのメチル化の程度に差が認められた。強い順に、白血球>脳>肝臓>胎盤であった。仮に3例の胎盤におけるメチル化が、 $A > B \geq C$ とすると、この関係は肝臓でも成り立っていた。このことは、個々の遺伝子のメチル化状態が組織によって異なっているにもかかわらず、全体レベルにおいては

メチル化の個人差や患者と健常者間の相違を抹消白血球 DNA で検出できる可能性を示唆する。

そこで、この研究課題で計画したものではないが、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて抹消白血球 DNA のメチルシトシン含有量 (mC) を測定し、統合失調症と健常者で相違がないか比較検討することにした。その前に、HPLC の感度や精度が差を検出できるか、健常者における mC の加齢変化を指標に検討した。加齢変化はマウスや培養細胞で言われているほど大きくなく、DNA 処理条件および HPLC 測定条件の改良を必要とした。この実験から mC の男女差が存在することを見出した (Ann. Hum. Genet. 2004)。

東大・長大・琉大から集められた統合失調症患者 210 例 (男性, 124; 女性, 86) 及び健常対照者 237 例 (男性, 108; 女性, 129) の白血球 DNA について、HPLC による mC の測定ならびに比較解析を行った。その結果、以下の事柄を明らかにした。(論文投稿中)

- (1) 男性患者の mC は健常男性に比べて低い ($P = 0.048$)。特に、この相異は若年者に顕著であった (35 才以下の比較で、 $P = 0.019$)。
- (2) 一方、女性では患者および健常者の間に差は見られなかった。