

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		脳科学研究戦略推進プログラム
研究開発課題名		自閉症スペクトラム障害 (ASD) と統合失調症のゲノム解析を起点として、発症因に基づく両疾患の診断体系再編と診断法開発を目指した研究 : 多面発現的効果を有するゲノムコピー数変異 (CNV) に着目して
機関名		国立大学法人名古屋大学
研究開発	所属 役職	大学院医学系研究科 教授
担当者	氏名	尾崎 紀夫

2. 研究開発成果の内容

① ASD・統合失調症のゲノムサンプリングと臨床情報の収集

ASD (自閉症スペクトラム障害) ゲノムサンプルの収集を継続した。国立大学法人名古屋大学ならびに関連施設と研究協力施設 (独立行政法人国立国際医療研究センター国府台病院、よこはま発達クリニック) に加え、脳プロ課題 F 内外 (国立大学法人東京大学、国立大学法人福井大学、国立大学法人金沢大学、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター)、その他の機関とサンプル共有化を行い、ASD 1010 名のゲノムと (可能であれば) 両親のゲノムを収集した (トリオ 220 以上)。ADI-R を用いた確認も進めた。統合失調症はゲノム共有化を含めると 3000 名以上のゲノムを収集し (トリオ 150 以上)、認知機能 (JART, WCST)、MRI 画像データを含めた臨床情報の収集を行った。

② ASD・統合失調症の CNV 解析と患者の表現型解析

ASD 1000 名と統合失調症 2000 名の CNV 解析を終了し (ただし、①の解析結果も含む)、ASD と統合失調症の患者それぞれ約 9% で発症に関与する病的 CNV を同定した。とくに X 染色体異常 (XXX/XXY)、22q11.2 欠失については統合失調症との統計学的に有意な関連を確認した。両親のゲノム解析から統合失調症においては合計で 11 個の *de novo* CNV を同定し、その病的意義を確認した。統合失調症の CNV データを用いた *gene set analysis* では酸化ストレス応答、ゲノム安定性などの新規パスウェイの関与が示唆された。病的 CNV を持つ統合失調症患者は治療抵抗性を示す率が有意に高いことも確認した。

③ CNV 解析結果に基づいた候補遺伝子のリシーケンシング解析

CNV 解析の結果、精神疾患に関連すると想定されたシナプス関連遺伝子 (*DLG1*、*DLG2*、*DLG4*、*DLGAP1*、*DLGAP2*、*SynGAP1*) に関して、次世代シーケンサーの Ion torrent を用いて、統合失調症 370 名、自閉スペクトラム症 192 名を用いてシーケンス解析を実施した。加えて、精神疾患に強い影響をもちうる変異を同定するために、同定された変異に関して *in silico* 解析を実施した。その結果、タンパク質機能に強い影響を及ぼすと予想された *DLG1*-G344R、*DLG4*-G241S、*DLGAP2*-R604C に

関して、独立したサンプル（1315SCZ(統合失調症)、382ASD、1793HC(健常者))を用いて、関連解析を実施したが、有意差は認められなかった。DLG-G241S DLGAP2-R604Cは、患者群のみに変異が同定され、精神疾患に強い影響を有すると考えられた。XRXN1, PCLOについては双方とも遺伝子が非常に大きく、解析範囲が広大であることから平成27年度内には完了出来なかったため、今後の課題である。

④ 患者由来リンパ芽球様細胞株を用いた CNV の機能解析

CNV を有する被験者由来リンパ芽球様細胞株の遺伝子発現解析を実施した。欠失を有する患者では遺伝子発現量が低下する傾向があり(21 遺伝子:ADK, ARHGAP10, ASTN, CACNA1C, CDK5RAP1, CYFIP1, DISC1, DLG2, FBXO45, IMMP2L, KDM4C, MBD5, NBEA, NDE1, NPHP1, PCLO, PMP22, PTPRM, RELN, SEPT14, VPS13B)、重複を有する患者では増加する傾向が認められた(6 遺伝子:CYFIP1, FBXO45, NDE1, PARK2, STS, VLDLR)。したがって、欠失または重複を有する患者の多くは遺伝子発現量の変化を伴い、CNV による遺伝子機能の変化が病態に関与している可能性がある。しかし、一部の遺伝子では発現量の変化がない、想定と逆方向への変化があるなど、CNV 以外の要因(上下流の遺伝子発現調節変化など)が病態に関与する可能性がある。また、平成27年度中に新規で樹立したリンパ芽球様細胞株の増加により、CNV を保有しない ASD、統合失調症と健常者との比較において、遺伝子発現量に有意な差が認められた遺伝子の遺伝子発現変化[CHRNA7(統合失調症で減少)、NDE1(統合失調症で増加)、DOCK4(ASD で増加)、STS(ASD で増加)、VLDLR(ASD で増加)]が病態と関連している可能性を高くした。

⑤ 人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立と分化誘導させた中枢神経系細胞の解析

平成27年度はiPS細胞からドパミン作動性ニューロンおよびGABA作動性ニューロンの誘導効率を上げる条件検討を実施した。その結果、ドパミン作動性ニューロンにおいて80%以上の選択的マーカーであるtyrosine hydroxylase抗体陽性率、GABA作動性ニューロンにおいても60%以上の選択的マーカーであるGABA陽性率をもつ細胞集団を得るための方法を確立した。各種ニューロンのリアルタイムPCR法による疾患関連遺伝子発現解析、各種抗体による免疫染色解析、神経伝達物質測定については、誘導法の改良に時間を要したため、今後の課題である。

⑥ ASD・統合失調症の神経画像や死後脳を用いた CNV の中間表現型に与える影響の検討

中間表現型の解析(脳組織解析)

近年の統合失調症の分子生物学的な検討においてグリア神経系が病態に強く関連していることが推量されている背景や、従前から脳画像研究でこの疾患において脳の形態的な異常が指摘されていることをうけて、実際のヒト死後脳を用いてこれらの組織上での現象の解明をすすめた。すでに、肉眼的レベルのマクロ観察において、この疾患における上側頭回の形態的な変化を報告しているが、平成27年度は同部位のミエリンの形成について顕微鏡的ミクロレベルの観察を発展的にすすめた。オリゴデンドロサイト/ミエリンに関しては、従前から上側頭回に対してミエリンタンパク質の特異的抗体であるMOG抗体を用いて免疫染色を行い、長期罹患の統合失調症の大脳皮質中間層(第III層から第IVに相当する部位)においてミエリン形成の不全を見いだした。平成27年度は、海馬CA3透明層においても同様のミエリン形成不全を見出した。さらに、まれな遺伝子変異すなわち22q11.2欠失を有する統合失調症症

例で、MOG の免疫染色を行い、これまでの 22q11.2 欠失のない統合失調症患者死後脳検討と同様に、上側頭回皮質の中間層、海馬 CA3 の透明層において、同様のミエリン形成不全所見を観察した。

中間表現型の解析（神経画像解析）

課題 fMRI は DTI と組み合わせて解析し、注意に関連する脳領域を結ぶ白質線維連絡とその微細構造を検討した。その結果、統合失調症患者と健常者では注意に関連する脳領域が異なる可能性があることを確認した。

安静時 fMRI を用いて、精神疾患と健常者を高い精度で判別する手法を開発した。名古屋大学で撮像した、統合失調症患者 40 名と健常者 40 名のデータを用いた。安静時 fMRI を脳内 90 領域の時系列データに変換し、領域間の相関係数を計算した。この領域間結合を表す値に対して、主成分分析 (PCA) を用いてデータ次元を削減した。次いで Support Vector Machine (SVM) により、各成分の重み値を計算した。各成分値の重み値に逆 PCA を行い、元の次元へ再変換した。領域間結合値とラベル（患者群か対照群か）をランダムに付け替えて同様の処理を行い、得られた重み値の上位 5% 以上に相当する重み値を持つ領域間結合を選択した。それらのデータにより SVM で 2 群の判別を行ったところ、100% に近い精度を示した。このような高い判別能を持つ領域間結合には、前頭葉内側面などのいわゆる Default Mode Network が含まれていた。

⑦ CNV によって影響を受ける遺伝子機能の分子細胞生物学的な検討

平成 26 年度までに、脳プロ課題 E 国立大学法人東京医科歯科大学田中研究室と共同で、ゲノム編集技術法のひとつである TALEN 法を用いて、ARHGAP10 CNV/SNV モデルマウスを作製した。平成 27 年度は、ARHGAP10 CNV/SNV モデルマウスの *in vitro* 表現型解析を、脳プロ課題 G 国立大学法人名古屋大学貝淵研究室と共同で詳細に検討した。具体的には、ARHGAP10 NS748 患者型 (CNV/SNV : 欠失/S490P) 変異モデルマウスの胎生 17 日～18 日胚の海馬より調製した初代培養神経細胞を 3 日間培養の後、神経突起の伸長に関する *in vitro* における形態学的解析を神経突起の長さおよび分枝 (branching) の数に着目して実施した。ARHGAP10 が欠失している神経細胞では、同腹の野生型神経細胞と比較して、神経突起の長さおよび分枝の数に顕著な差は現れなかった。一方、ARHGAP10 NS748 患者型の神経細胞では、同腹の野生型神経細胞と比較して、神経突起の長さおよび分枝の数に顕著な差を認めた。これらの結果より、ARHGAP10 NS748 型変異体由来マウス神経細胞は、*in vitro* の解析において、神経発達が遅延する傾向が明らかとなった。このような形態学的な表現型の解析に重点を置いたため、その神経発達遅延の表現型を説明するための分子細胞生物学的解析 (RNA マイクロアレイ、定量 RT-PCR、イムノブロット法による遺伝子発現解析、ARHGAP10 SNV 様変異タンパク質の局在解析および RhoGAP 活性の測定) については平成 27 年度中には完了しなかったため、今後の課題である。

⑧ CNV 解析に基づく ASD・統合失調症の遺伝子改変モデルマウスを用いた行動解析、神経化学的解析と神経病理学的解析

Orleans Reeler ヘテロマウスの運動学習・協調性障害は、定型抗精神病薬であるハロペリドールの連続投与で改善した。若齢期の Orleans Reeler ヘテロマウスでは、樹状突起のスパインの数、長さ、直径、表面積および体積数の異常は認められなかった。これまでの結果から、統合失調症発症関連候補変異である RELN 欠失と類似したマウス Reln のヘテロ欠失は、顕著な神経病理学的変化を伴わずにドパミン

及び GABA 神経系機能を障害し、不安様行動、社会性行動および運動学習・協調性を障害すると考えられる。また、脳機能の障害に対しては、定型および非定型抗精神病薬が有効である可能性が示唆された。

雄性 *ARHGAP10* 遺伝子変異マウスでは高架式十字迷路試験で不安様行動およびメタンフェタミン感受性の亢進が観察された。また、ニッスル染色および免疫染色による解剖学的解析では、著しい解剖学的変化は観察されなかった。ドパミンおよび GABA 関連分子の mRNA 発現解析において、雄性 *ARHGAP10* 遺伝子変異マウスの側坐核では GABA_A 受容体 $\alpha 2$ および $\gamma 2$ サブユニットの有意な減少が認められた。したがって、*ARHGAP10* 遺伝子変異はドパミンおよび GABA 神経系の機能異常に伴う脳機能障害を引き起こすと考えられる。

⑨ ニホンザルを対象とした CNV 解析

平成 26 年度までに、引き続き精神疾患との関連が言われている *ABCA13* 欠失のニホンザルの組織病理解析を行った。対象として *ABCA13* の欠失がないことの確認がされている個体と、行動異常が観察されていない群れにいた野生種個体とした。前頭葉皮質の HE、ニッスル染色標本において、皮質の細胞層構造が不明瞭で、皮質の錐体細胞の狭小化傾向、細胞密度の低下傾向が観察された。TH 染色においては、神経線維のシナプス様突起の減少傾向が観察された。GABAergic 細胞の指標の Calbindin28KD、および Parvalbumin の免疫染色を行った。その結果、Parvalbumin の皮質中間層での陽性細胞の密度の減少が観察された。これは、従来の齧歯類の動物モデルでも観察され、それが霊長類でも確認された。この *ABCA13* 欠失の個体においてセロトニン受容体 2C の変異をもっていることが近年わかり、平成 27 年度においては、5TH2c 受容体の免疫組織学的検討をおこなった。条件検討が困難であったが、その結果、野生種と比較し、大脳皮質において 2C レセプター陽性細胞数は減少し、また染色性の減弱、陽性突起の短小化がみられ、この個体でのセロトニン神経系の表現型に変異が観察された。その結果を受けて、NPY 免疫染色については平成 27 年度に実施したが、年度内に評価が完了せず、現在解析中である。

⑩ ASD を対象としたオキシトシン経鼻剤の多施設・並行群間比較・プラセボ対照・二重盲検・検証的試験

国立大学法人東京大学、国立大学法人金沢大学、国立大学法人福井大学との共同で、オキシトシンの経鼻噴霧剤連日投与の有効性と安全性を並行群間比較試験・プラセボ対照・二重盲検比較試験で検証した。年齢が 18 歳以上 55 歳未満の男性で、DSM-IV-TR において自閉性障害、アスペルガー障害、または特定不能の広汎性発達障害と診断され、Autism Diagnostic Interview-Revised(ADI-R)において、相互的対人関係の質的異常項目で 10 点を超え、ウェクスラー知能検査で言語性知能指数が 85 を越え、かつ総知能指数 80 を越え、除外基準に抵触しない被験者に対し、1 週間の単盲検（プラセボ）と 6 週間の二重盲検期間を設け、プラセボまたはオキシトシンを投与し、Autism Diagnostic Observation Schedule 得点を主要評価項目として、社会性の障害マーカー（Gaze finder）、臨床全般改善度、日常生活機能を副次項目として評価し、同時に安全性も確認した。名古屋大学では平成 27 年度に 27 例に対して臨床評価を実施し、うち 25 例を組み入れ、4 大学全体でも 109 症例を組み入れた。

⑪ 統合失調症及び ASD の全ゲノム CNV 解析

②の CNV 解析に加え、追加で統合失調症、ASD、コントロール、iPS 細胞由来ゲノム合わせて 480

名の CNV 解析を実施した。上述した通り、CNV データの *in silico* 解析 (gene set analysis) から酸化ストレス応答、ゲノム安定性、キナーゼ、低分子量 GTPase シグナルなどの新規パスウェイが統合失調症の病因に関与することが示唆された。

⑫ 健常者-患者間の網羅的遺伝子発現・疾患関連分子ネットワーク解析

平成 27 年度に支給された調整費によって、*ARHGAP10* 遺伝子欠失を有する患者 1 例から iPS 細胞を樹立した。また、*RELN* 欠失者 iPS 細胞および健常者 (CNV なし) iPS 細胞由来中枢神経系細胞を用いて、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析をおこなった。*RELN* 欠失中枢神経細胞で特異的に高発現する分子が同定された。

⑬ プロジェクトの総合的推進

平成 27 年 5 月 16 日及び 11 月 3 日に開催した分科会では、課題 F グループの進捗状況および研究方針の確認を行うとともに、ゲノムやデータの共有化を通じた共同研究体制の促進をより一層進めた。随時 P S、P O との連絡を密に行い、また外部有識者の助言を仰ぎながら、プロジェクト全体の進捗状況を確認しつつ、プロジェクトを推進した。プロジェクトで得られた成果については、積極的に公表した。また、関連する研究課題(特に脳プロ課題 E 「心身の健康を維持する脳の分子基盤と環境因子」、F 「精神・神経疾患の克服を目指す脳科学研究」、G 「脳科学研究を支える集約的・体系的な情報基盤の構築」)間の連携をさらに積極的に推進するなど、プロジェクトの推進に資した。