

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳科学研究戦略推進プログラム
(英語) Strategic Research Program for Brain Sciences

研究開発課題名： (日本語) エピジェネティック変化を介した核内受容体遺伝子発現制御による統合失調症病態メカニズム解明と治療法の開発
(英語) Understanding schizophrenia pathology, diagnosis and treatment through engagement of the brain nuclear receptor regulatory system

研究開発担当者 (日本語) 前川素子

所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Brain Science Institute, Research Scientist, Motoko Maekawa

実施期間： 平成 28 年 5 月 20 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

1. 核内受容体 *RXR*, *PPAR* 遺伝子と統合失調症の病因との関連性を明らかにするため、ヒト遺伝学的な解析により、統合失調症の検体を用いて核内受容体 *RXR*, *PPAR* 遺伝子のレアバリエーションの探索を行い、23 種類の変異を見出した。これらの変異について、公開されている一般人口ゲノムデータベース (約 70,000 例) の配列と比較し、「稀ではあるが統合失調症に特異的な遺伝子変異」を 7 種同定した。
2. 核内受容体の機能低下と統合失調症発症脆弱性との因果関係を個体レベルで明らかにするため、薬理的動物モデル (核内受容体アンタゴニスト投与マウス) を用いて、精神疾患関連行動試験を行った。*RXR* アンタゴニスト投与動物で、Y 迷路試験、オープンフィールド試験に行動変化が認められた。*PPAR* アンタゴニスト投与動物で、新奇物体認識試験に行動変化が認められた。
3. 核内受容体の機能低下と統合失調症発症脆弱性との因果関係を個体レベルで明らかにするため、遺伝子改変動物モデルの準備を行った。コンディショナルノックアウトマウス作製の準備として、CRISPR/Cas9/ドナーベクター法により *Rxra* floxed マウス、*Ppara* floxed マウスを作製した。脳内細胞特異的 Cre 発現マウスとして、*Gad1*-Cre ノックインマウス、*NG2*-Cre マウスを入手した。全身性 Cre 発現マウスとして、*E2a*-Cre マウスを入手した。これら 3 系統の Cre マウスについては、

遺伝的背景が均質ではなかったため、スピードコンジェニック法により遺伝的背景均質化作業を行い、均質化作業を完了した。核内受容体全身性ノックアウトマウスとして、CRISPR-Cas9n法により *Rxra* ノックアウトマウス、*Ppara* ノックアウトマウスを作製した。

4. 核内受容体遺伝子による統合失調症関連遺伝子群の発現制御機構の一端を明らかにするため、培養細胞を用いて核内受容体リガンド添加実験を行い、RXR パンアゴニストおよび PPAR パンアゴニストの添加により、オリゴデンドロサイト系遺伝子および GABA 系遺伝子の発現が誘導されることを見出した（これらの成果は、現在論文投稿中）。
5. 毛根細胞を用いた診断技術を開発する目的で、健常者および統合失調症患者の毛根細胞を用いて統合失調症診断マーカーの候補遺伝子を探索した結果、統合失調症の毛根細胞において一部の核内受容体遺伝子の発現低下が認められることを見出した（これらの成果は、現在論文投稿中）。
6. 統合失調症発症予測マーカーを開発する目的で、統合失調症ハイリスクグループの毛根細胞採取の準備を行った。各研究機関（協力研究機関を含む）の倫理承認を得た上で、毛根細胞収集を開始し、現時点で 140 名分の毛根細胞と付帯情報を得た。

English

1. By resequencing exons of the *RXR* and *PPAR* family genes, we identified 23 missense mutations in schizophrenia DNA samples (n = 1,200). Of them, 7 mutations were shown to be schizophrenia-specific by comparing with public genome databases (n = 70,000).
2. We evaluated behavioral characters of pharmacological animal model (RXR or PPAR ligand administered mice). Administration of an RXR antagonist altered behaviors in the Y maze and open field tests and administration of a PPAR antagonist altered behavior in the novel object recognition test.
3. We succeed in the generation of *Rxra* floxed and *Ppara* floxed mice by using the CRISPR/Cas9 system. As well, we successfully created conventional knockout mice for the *Rxra* and *Ppara* genes by using the same system. Three cre-driver mouse lines, *Gad1*-Cre, *NG2*-Cre and *E2a*-Cre, were obtained from outside researchers, and sequentially backcrossed them to the C57BL/6J strain to make their genetic backgrounds isogenic to that of C57BL/6J.
4. We examined effects of agonists of the nuclear receptors on gene expression using culture cells. A treatment of the cells with RXR agonist or PPAR agonist was shown to increase expression levels of the oligodendrocyte- and GABA-related genes (Maekawa et al., submitted).
5. We compared expression levels of *RXR* and *PPAR* transcripts in hair-follicle cells from subjects with and without schizophrenia. As a result, we discovered that *RXRA*, *PPARA*, and *PPARB/D* were significantly down-regulated in individuals with schizophrenia compared with the control subjects (Maekawa et al., submitted).
6. Upon approval of experimental protocols by the Ethics Committees of RIKEN and all participating institutes, we collected hair follicle samples from subjects at high risk for schizophrenia and control subjects. A hundred and forty samples were collected this year.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 2 件）

1. Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, Ohnishi T, Balan S, Hisano Y, Iwayama Y, Toyota T, Matsumoto T, Itasaka N, Sugiyama S, Tanaka M, Yano M, Dean B, Okano H, Yoshikawa T: Schizophrenia patient-derived induced pluripotent stem cells exhibit changes in neurogenic and gliogenic competences. *Translational Psychiatry* 6: e934, 2016.
2. Balan S, Yamada K, Iwayama Y, Hashimoto T, Toyota T, Shimamoto C, Maekawa M, Takagai S, Wakuda T, Kamenno Y, Kurita D, Yamada K, Kikuchi M, Hashimoto T, Kanahara N, Yoshikawa T: Comprehensive association analysis of 27 genes from the GABAergic system in Japanese individuals affected with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2017 Jan 7
3. 前川素子, 和田唯奈. 統合失調症と毛根細胞の遺伝子発現. 生体の科学. 2016, 67(5), 486-487.
4. 前川素子, 豊島学, 吉川武男: 遺伝子発現からみたうつ病の神経科学. うつ病の臨床: 現代の病理と最新の治療. 2016, 32-37.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Lipids and psychiatric disorders, 口頭, 前川素子, 春の神経発生研究会, 2016/4/13, 国内.
2. 統合失調症患者由来神経幹細胞における分化異常の分子病態, 口頭, 豊島学, 赤松和土, 岡田洋平, 大西哲生, 田中元雅, 岡野栄之, 吉川武男, 第 46 回日本神経精神薬理学会年会, 2016/7/2, 国外.
3. イメージング質量分析法を用いた統合失調症関連脂質の探索, ポスター, 島本知英, 大西哲生, 江崎加代子, 前川素子, 渡邊明子, 豊島学, 杉山栄二, 大和田祐二, 瀬藤光利, 吉川武男, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 国内.
4. 躁うつ病治療薬標的候補イノシトールモノホスファターゼ(IMPase)1 機能欠損マウスの脳のリン脂質解析, ポスター, 田端千夏, 大西哲生, 島本知英, 小林哲幸, 吉川武男, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 国内.
5. 毛根細胞を用いた精神疾患関連遺伝子の発現解析, 口頭, 前川素子, 大西哲生, 豊島学, 豊田倫子, 松崎秀夫, 森則夫, 吉川武男, 第 49 回精神薬療報告会, 2016/12/2, 国内.
6. A transcription regulator potentially involved in the pathogenesis of mental disorders, 口頭, Ohnishi T, RIKEN Epigenetics in Tsukuba, 2017/2/17, 国内.
7. 質量分析法を用いた統合失調症関連脂質の探索, ポスター, 島本知英, 大西哲生, 江崎加代子, 前川素子, 渡邊明子, 豊島学, 杉山栄二, 大和田祐二, 瀬藤光利, 吉川武男, 第 12 回日本統合失調症学会, 2017/3/24, 国内.
8. 患者由来 iPS 細胞を用いた神経発達障害に関わる miRNA の分子病態の解明, ポスター, 豊島学, 赤松和土, 岡田洋平, 大西哲生, 岡野栄之, 吉川武男, 第 12 回日本統合失調症学会, 2017/3/24, 国内.

(3)「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願