

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 坂井 美和子
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 652 号
学位授与の日付 平成 27 年 9 月 24 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Assessment of copy number variations in the brain genome of schizophrenia patients
(統合失調症患者の脳内ゲノムにおけるコピー数変異の評価)

論文審査委員 主査 教授 池内 健
副査 教授 染矢 俊幸
副査 教授 那波 宏之

博士論文の要旨

【緒言】

ヒト脳細胞のうち 30% 近くが染色体構造の異常を有し、また一卵性双生児間にも体細胞のゲノム構造差があるという報告がなされている。ヒト脳細胞ゲノム構造の異常はアルツハイマー型認知症、ハンチントン病といった神経変性疾患との関連性も指摘されている。このように近年、体細胞ゲノム変異と染色体異常は、脳疾患ゲノム研究において注目を集めている。統合失調症では、末梢リンパ球 DNA を分析したゲノムコピー数変異 (CNV) が報告されている。今回申請者は、統合失調症患者と統合失調症非罹患患者の死後脳線条体 DNA を用いて、マイクロアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (aCGH) 法でゲノム DNA を比較することで、脳細胞の体細胞 CNV が統合失調症に関連する可能性を検討した。

【方法】

統合失調症患者 48 名 (患者群) と統合失調症非罹患患者 48 名 (対照群) の死後脳線条体から Gentra Pure Gene Tissue kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、患者群および対照群 DNA から無作為に 1 名ずつを対にした。この 48 サンプル対において、100 万プローブを持つ 2 色法 aCGH を用いて有意な遺伝子量変化を ADM-2 アルゴリズム (Agilent) で統計し、候補ゲノム領域を検出した。さらに各候補領域ごとに、DNA 量シグナル比を \log_2 に変換後、48 サンプル対のデータ偏りを t 検定を行い、グローバルな DNA 量シグナル偏差を持つ領域をボンフェローニ補正を加えて検出した。またこの CNV 検出方法の妥当性を確認するため、シグナル偏差の大きい領域を選抜して、定量 PCR を行い、その遺伝子量を定量、比較した。前頭前野から抽出した DNA でも同様に定量 PCR を行い、同一個体の脳部位間 CNV 偏差も検定した。なお、本研究は、新潟大学医学部、ならびに共同研究者の在籍機関のヒトゲノム研究倫理委員会の承認のもとに実施された。

【結果】

aCGH で得られた 48DNA 対のシグナル比を、ADM-2 アルゴリズムにより、患者群と対照群間の遺伝子量偏差として統計したところ、常染色体上の 1381 領域でゲノムコピー数に有意差が検出された。さらにこれらの遺伝子領域のシグナル比を t 検定およびボンフェローニ補正を用いて、ゲノムコピー数偏差の見られる領域を 85 個に絞った。このうち 26 領域は既報のアジア人共通の CNV 領域と一致しておらず、新規の統合失調症に関連する CNV である可能性が考えられた。実際、これらの選出ゲノム領域には、統合失調症をはじめとする脳疾患に関与する ANTXRL, CHST9, DNMT3, NDST3, SDK1, STRC, SKY 遺伝子が存在していた。しかしいずれも aCGH 上の \log_2 シグナル比は -0.59 から $+0.59$ と DNA 量シグナル偏差は 1.5 倍以下の低値であった。また上記候補領域から、遺伝子量シグナル変化が大きい 10 ゲノム領域を選出し当該ゲノム領域の定量 PCR を、DNA 量シグナル偏差を顕著に示したサンプル対、もしくは 48 サンプル対全部を用いて行った。その結果、患者群と対照群間で有意な DNA 量差が 4 領域で確認された。前頭前野から抽出した DNA でも、当該領域で定量 PCR を行ったが、線条体と前頭前野では 当該ゲノム領域にコピー数偏差は見られなかった。

【考察】

脳・線条体は神経幹細胞を含んでおり、そのミトコンドリアゲノムでは体細胞変異を起こしていると報告されている。申請者は線条体が脳内ゲノム構造の体細胞モザイクを示しうる脳部位と仮定し、統合失調症患者と精神疾患非罹患者の死後脳線条体 DNA のコピー数を aCGH により比較することで体細胞レベルでの CNV 検出を試みた。使用した患者と対照者の末梢組織を入手できなかったため、同一個体での脳領域間比較、ならびにアジア人白血球由来 CNV のデータベース比較を行うことで、体細胞 CNV の可能性を考察した。今回の統合失調症患者に関連する脳内 CNV の候補領域 26 個には、アジア人の既報 CNV で報告されていない CNV が存在した。これらのゲノム領域では、aCGH 上のシグナル比の偏差は確かに有意を示したが、その差は多くの場合で非常に小さく、こうした微細な偏差を定量 PCR 法で検証することは技術上困難を伴った。しかし、シグナル比の偏差の大きい領域では、確かに定量 PCR 法でその半数で DNA コピー数の変化が確認できた。体細胞ゲノムモザイクを呈する腫瘍組織では、多くの周辺正常組織により、がん細胞の異常 CNV が抽出 DNA 中で希釈されることが知られている。特に脳組織はグリア細胞や神経細胞など、多種多様な細胞群から成るモザイク構造を有するため、同様の異常 CNV の希釈が、本研究で使用した死後脳 DNA でも起きていた可能性がある。

今回の研究で統合失調症に関連する脳内体細胞 CNV の候補部位を示すことができた。しかし今後、これらの候補領域において、定量 PCR 法を上回る精度を持つ方法で体細胞 CNV の確証を得る必要がある。

審査結果の要旨

統合失調症患者由来の末梢リンパ球由来のゲノム DNA を用いた解析によりゲノムコピー数変異 (CNV) が統合失調症の発症に関与していることが報告されている。本論文では、統合失調症患者 (48 名) と対照者 (48 名) 由来の死後脳線条体組織からゲノム DNA を抽出し、脳細胞の CNV が統合失調症に関連する可能性を検討した。ゲノム DNA をマイクロアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション法で解析し、有意なゲノムコピー数の変化について ADM-2 アルゴリズムを用いて検出した。その結果、1381 領域で有意な CNV を認めた。さらに多重比較補正を行ったところ、候補領域は 85 個に絞られた。このうち 26 領域は既報のアジア人の CNV 領域と一致しておらず、統合失調症に関連する新規の CNV である可能性がある。さらに、遺伝子量シグナル変化が大きい 10 領域を選び出し、定量 PCR 法による遺伝子量変化を検証した。その結果、4

領域で有意な遺伝子量の差異を確認した。統合失調症の患者群には遺伝子コピー数が整数倍にならないサンプルが存在したことから、体細胞変異による CNV が存在することが示唆された。

以上、本論文において日本人・統合失調症患者においてゲノムコピー数が有意に変化しているゲノム領域を見出し、体細胞変異がその原因の一端を担っている可能性を示した点に、学位論文としての価値を認める。