

特集 1 Omics 解析—神経精神疾患基盤解明に向けたマルチプルなアプローチ—

2. 脳の不均質性を考慮した精神疾患における
マルチオミックス解析

文東 美紀*, 岩本 和也*

抄録：統合失調症，双極症などの精神疾患の病因を解明するために，これまでに多くの患者死後脳を用いたゲノム・エピゲノム研究が行われてきた。しかし脳は多くの細胞種からなるきわめてヘテロジニアスな組織であるため，バルク組織を使用した研究で検出された所見は，単純に組織内の細胞種の割合の違いを反映しているのか，真に疾患にかかわる表現型を示しているのかを区別することはきわめて困難である。この問題を克服するために，筆者らは精神疾患患者死後脳から神経細胞・非神経細胞由来の細胞核を分離し，さまざまなオミックス解析を行ってきた。本稿では，近年発表した統合失調症患者における体細胞変異および双極症患者における DNA メチル化解析について概説する。両研究ともに，患者群において神経細胞で特異的な興味深い所見を見出し，今後のさらなる検証が期待される。

日本生物学的精神医学会誌 36 (2) : 61-65, 2025

Key words : schizophrenia, bipolar disorder, postmortem brains, somatic mutation, DNA methylation

統合失調症，双極症などの精神疾患の病因は，未だ多くの部分が不明な状態に留まっているものの，遺伝要因と環境要因が複雑に関与していることが示唆されている。精神疾患に関与する遺伝要因を特定するために，これまで多くの遺伝学的研究が行われてきており，近年の大規模な全ゲノム関連解析 (genome-wide association study : GWAS) では数百カ所の候補領域が同定されている。しかしそれらのオッズ比は 1.2 程度であり，おおむね小さいエフェクトサイズに留まっている¹⁾。

遺伝要因と疾患の間に存在するミッシングリンクを説明するために，筆者らは体細胞変異や DNA メチル化に着目している^{5, 7, 8)}。体細胞変異は受精後に生じ，個体内にモザイク状に存在するゲノム変異であり，生じるタイミングによって，個体に占める割合が異なる。受精後の比較的早い段階で生じた変異は，複数の組織や細胞種をまたいで多くの細胞で共有されることになるが，発生の後期で生じた場合には，一部の組織や細胞種に限局して存在することになる。体細胞変異のうち，脳組織に限定して存在

する変異は疾患発症にかかわる可能性があり，そのような変異は血液などの末梢組織由来の DNA を使用した GWAS で捉えることは困難である。

またストレス・化学物質の曝露や栄養状態などの環境要因を反映する生物学的事象として，エピジェネティックな修飾の一つである DNA メチル化が挙げられる。cytosine-phosphate-guanine (CpG) 部位におけるシトシンのメチル化は近傍遺伝子の発現に影響を及ぼすため，これまでに多くの患者検体を使用した DNA メチル化解析が行われてきているが，研究間で一貫した結果は得られていないという現状がある。

精神疾患の病因の解明を目的にしてこれらの研究を行う場合は脳組織を使用する必要があるが，患者死後脳を使用して脳特異的な体細胞変異や DNA メチル化の解析を行う際には，細胞種の不均一性 (heterogeneity) を考慮することが重要である。脳は興奮性・抑制性神経細胞，オリゴデンドロサイト，アストロサイト，ミクログリアなど多くの細胞種から成り立つ不均一性の高い組織である。これらの細

Multi-omics analysis of psychiatric disorders considering brain heterogeneity

*熊本大学大学院生命科学研究部 分子脳科学講座 (〒 860-8556 熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1) Miki Bundo, Kazuya Iwamoto : Department of Molecular Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University. 1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan

【文東 美紀 E-mail : bundo@kumamoto-u.ac.jp】

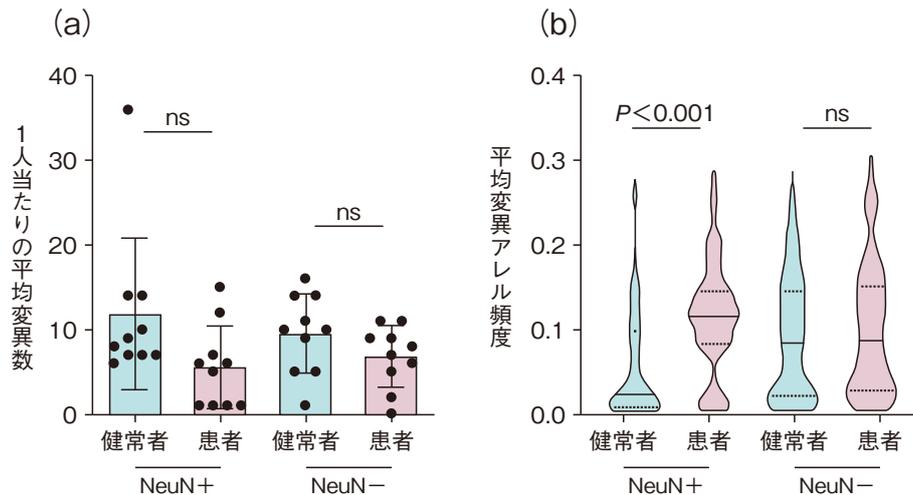


図 統合失調症患者における細胞種別体細胞変異数と変異アレル頻度
(Du J, et al : Psychiatry Clin Neurosci, 78 (4) : 237-247. 2024³⁾ より改変して引用)

胞群が生来有している DNA メチル化レベルや体細胞変異の割合はそれぞれ異なっており、疾患特有のプロファイルを正確に知るためには、細胞種ごとの解析が必須となる。筆者らは精神疾患患者死後脳から神経細胞・非神経細胞由来の細胞核を分離し、さまざまなオミックス解析を行ってきた。本稿では、1. 統合失調症患者前頭葉における体細胞変異解析³⁾、2. 双極症患者前頭葉における網羅的 DNA メチル化解析²⁾ について、筆者らの近年の研究結果を報告する。

1. 統合失調症患者前頭葉における体細胞変異解析

統合失調症患者の神経細胞・非神経細胞、それぞれの細胞種について体細胞変異解析を行うために、スタンレー医学研究所から供与された健常者および統合失調症患者 (n = 10 ずつ) 由来の前頭前野 (Brodmann area [BA] 46) から細胞核画分を調製し、神経細胞の細胞核のマーカータンパク質である NeuN に対する抗体で蛍光染色を行った後、セルソーターを使用して NeuN + (神経細胞)、NeuN - (非神経細胞) の細胞核の画分を行った¹⁾。それぞれの画分から調製した DNA を用いて、Agilent Technologies 社の SureSelect Human All Exon を使用してエクソーム解析を実施した。リードをアライメントしたのち、体細胞変異の検出を行うツールである Mutect2 を使用して、アレル頻度が 0.001 より大きく 0.3 未満である変異を体細胞変異として検出を行った。その結果得られた体細胞変異を、NeuN + / - の両方の画分で検出された変異 (共通変異)、

どちらか一方の細胞種のみで検出された変異 (細胞種特異的変異) の 2 通りに分類し、それぞれ解析を行った。

まず共通変異について、1 人当たりで検出された平均変異数を比較したところ、健常者群 15.5、患者群 10.4 であり、有意差は認められなかった。また変異の平均アレル頻度は健常者群、患者群のいずれにおいても、また NeuN + / - のいずれの細胞群においても 14 ~ 15% であり、こちらも有意差は認められなかった。

また細胞種特異的変異の 1 人当たりの平均変異数を比較したところ、NeuN + / - のいずれにおいても健常者群 - 患者群間で有意差はみられなかった。その一方、変異アレル頻度の比較では、NeuN + において患者群で有意に高値を示したが、NeuN - では変異アレル頻度に有意な差は認められなかった (図)。変異アレル頻度が高値となる原因の一つとして、体細胞変異が生じる時期が挙げられる。神経発達初期に分裂能をもつ神経前駆細胞に体細胞変異が生じた場合、その後の細胞分裂により、多くの細胞でその変異を共有することになることが考えられる。今回の結果により、患者では神経細胞発生の初期に生じた体細胞変異が多くの神経細胞で共有されており、これら変異が疾患に関与する可能性が示された。

次に、がんにおける体細胞変異カタログである catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC) データを使用して、検出された体細胞変異の塩基置換パターンから、変異出現の生物学的過程や背景因子などの推定を行うシグネチャー解析を行った。その結果、共通変異・細胞特異的変異のいずれにおい

表 双極症患者前頭葉における DNA メチル化変動遺伝子の遺伝子オンロジー解析

NeuN + ・患者群で高メチル化	NeuN - ・患者群で高メチル化
GO : 0030426 growth cone	GO : 0006486 protein glycosylation
GO : 0030427 site of polarized growth	GO : 0043413 macromolecule glycosylation
GO : 0005654 nucleoplasm	GO : 0044723 single-organism carbohydrate metabolic process
GO : 0030425 dendrite	GO : 0070085 glycosylation
GO : 0097481 neuronal postsynaptic density	
NeuN + ・患者群で低メチル化	NeuN - ・患者群で低メチル化
GO : 0003774 motor activity	GO : 0005887 integral component of plasma membrane
GO : 0003777 microtubule motor activity	GO : 0033018 sarcoplasmic reticulum lumen
	GO : 0031226 intrinsic component of plasma membrane

(Bundo M, et al : Mol Psychiatry, 26 (7) : 3407-3418. 2021²⁾ より改変して引用)

でも、C > T の変異が多く検出され、共通の変異ではチオプリン化学療法、細胞種特異的変異では、神経細胞・非神経細胞とも、DNA ミスマッチの修復やメチルシトシンの脱アミノ化にかかわる変異シグネチャーが検出されたが、健常者・患者での違いは認められなかった。また塩基配列の保存度から変異の機能予測を行う sorting intolerant from tolerant (SIFT) ツールを用いて、検出された変異の有害性を確認した。その結果、全変異に対する有害変異の割合は健常者群 - 患者群間で有意差は認められなかった。しかし患者で検出された有害変異の中には、chibby 1, beta catenin antagonist (*CBY1*), deoxyhypusine hydroxylase (*DOHH*) といった精神疾患との関連が報告されている遺伝子内に存在しているものがあり、このような遺伝子変異が発症に関与している可能性を示した。

2. 双極症患者前頭葉における網羅的 DNA メチル化解析

双極症患者の神経細胞・非神経細胞、それぞれの細胞種について DNA メチル化解析を行うために、スタンレー医学研究所から供与された、双極症患者 (n = 34), 健常者 (n = 35) 由来の前頭前野 (BA46) を使用して、前項と同様に NeuN + / - の細胞核の回収を行った。それぞれの画分から調製された DNA を用いて、methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) が付加されたビーズを用いてメチル化された DNA 断片を濃縮し、Affymetrix 社の GeneChip™ Human Promoter 1.0R Array を使用して、CpG がメチル化されているゲノム領域の同定を行った。

まずメチル化された領域数の比較を行ったところ、NeuN + / - 共に、健常者群と比較すると患者群で有意に少なかった。また健常者群 - 患者群間でメ

チル化差異を示すゲノム領域 (differentially methylated regions : DMRs) の検出を行ったところ、NeuN + / - 共に、患者群で低メチル化を示す領域が高メチル化を示す領域より多いことがわかった。DMR を含む遺伝子についてオンロジー解析を行ったところ、患者群の NeuN + で高メチル化を示す遺伝子には、growth cone, dendrite, neuronal postsynaptic density, 低メチル化を示す遺伝子には、motor activity, microtubule motor activity といった、神経機能にかかわるタームが検出されたが、NeuN - ではそのような傾向はみられなかった (表)。このように患者群では、ゲノム全体としては低メチル化傾向がみられるが、神経機能にかかわる一部の遺伝子は NeuN + で高メチル化を示し、独立の制御の変動が疾患に関与している可能性が示唆された。

次に既存の双極症の GWAS¹⁰⁾ で検出された領域と、今回検出された DMRs のオーバーラップを確認した。この GWAS では双極症に関与する領域として 30 カ所が同定されているが、そのうちの 8 カ所が、今回同定された DMRs の 12 カ所とオーバーラップしていた。その中には、lysine methyltransferase 2E (*KMT2E*) や spectrin beta, non-erythrocytic 2 (*SPTBN2*) といった、精神疾患との関与が報告されている遺伝子が含まれていた。また今回、神経細胞で検出された DMRs が既存の大うつ病⁴⁾、統合失調症⁹⁾、2つの双極症の GWAS^{6, 8)} で検出された領域に濃縮されているか検証したところ、大うつ病や統合失調症の GWAS 領域には濃縮が認められず、1つの双極症の GWAS⁶⁾ のみで有意に濃縮が認められた。神経細胞で検出された GWAS 領域のメチル化変動は、エピジェネティックな異常が双極症の分子動態にかかわる可能性を示している。

3. まとめ

本稿では、精神疾患死後脳における細胞種別の体細胞変異解析および網羅的 DNA メチル化解析の結果を概説した。その結果、どちらの研究でも神経細胞群で、精神疾患との関与が示唆される変化が認められた。これらの変動は、精神疾患に関与する特定の神経回路のみで起きている可能性があり、それらを同定するためには、今後詳細な空間解析が必要になる。またトランスクリプトーム解析やクロマチン構造解析などほかの網羅的解析と合わせた、さらなる検討が必要になると思われる。

本論文に記載した筆者らの研究についてすべて倫理的配慮を行っている。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Bundo M, Kato T, and Iwamoto K (2016) Cell type-specific DNA methylation analysis in neurons and glia. *NeuroMethods*, 105 : 115-123.
- 2) Bundo M, Ueda J, Nakachi Y, et al (2021) Decreased DNA methylation at promoters and gene-specific neuronal hypermethylation in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 26 (7) : 3407-3418.
- 3) Du J, Nakachi Y, Murata Y, et al (2024) Exploration of cell type-specific somatic mutations in schizophrenia and the impact of maternal immune activation on the somatic mutation profile in the brain. *Psychiatry Clin Neurosci*, 78 (4) : 237-247.
- 4) Howard DM, Adams MJ, Clarke TK, et al (2019) Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. *Nat Neurosci*, 22 (3) : 343-352.
- 5) Iwamoto K (2018) Understanding the epigenetic architecture of psychiatric disorders : modifications and beyond. *Psychiatry Clin Neurosci*, 72 (4) : 194.
- 6) Mullins N, Forstner AJ, O'Connell KS, et al (2021) Genome-wide association study of more than 40,000 bipolar disorder cases provides new insights into the underlying biology. *Nat Genet*, 53 (6) : 817-829.
- 7) Nishioka M, Bundo M, Iwamoto K, et al (2019) Somatic mutations in the human brain : implications for psychiatric research. *Mol Psychiatry*, 24 (6) : 839-856.
- 8) Nishioka M, Bundo M, Kasai K, et al (2012) DNA methylation in schizophrenia : progress and challenges of epigenetic studies. *Genome Med*, 4 (12) : 96.
- 9) Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511 (7510) : 421-427.
- 10) Stahl EA, Breen G, Forstner AJ, et al (2019) Genome-wide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder. *Nat Genet*, 51 (5) : 793-803.
- 11) Trubetskoy V, Pardiñas AF, Qi T, et al (2022) Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature*, 604 (7906) : 502-508.

■ ABSTRACT**Multi-omics analysis of psychiatric disorders considering brain heterogeneity**

Miki Bundo, Kazuya Iwamoto

Department of Molecular Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

Many genomic and epigenomic studies have been conducted on postmortem brains to elucidate the etiology of psychiatric disorders, such as schizophrenia and bipolar disorder. However, because the brain is an extremely heterogeneous tissue composed of many cell types, it is difficult to distinguish whether findings in studies using bulk tissue simply reflect differences in the proportions of cell types within the tissue or whether they actually indicate disease-related phenotypes. To address this issue, we isolated neuronal and non-neuronal cell nuclei from the postmortem brains of patients with psychiatric disorders and performed omics analyses. In this article, we review recent studies on somatic mutation in patients with schizophrenia and DNA methylation analysis in patients with bipolar disorder. Both studies revealed findings specific to neurons in the patient groups, and further validation is expected.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 36 (2) : 61–65, 2025)
