

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 倉富 剛

本研究は、双極性障害と関連する DNA メチル化異常を同定するために、一卵性双生児双極性障害不一致例（片側のみが双極性障害を発症している一卵性双生児ペア）を用いて、MS-RDA 法を行い、同定されたメチル化異常に対し双極性障害患者群と健常者群を用いてケースコントロール研究を行なったものである。研究の結果、下記の結果を得ている。

1. 一卵性双生児双極性障害不一致例間における DNA メチル化の差異を包括的に調べるために、不一致例双生児由来のリンパ芽球様細胞から抽出した DNA を用いて MS-RDA 法を行なった。MS-RDA 法は、2 つのゲノム間を DNA メチル化感受性酵素 *HpaII* で切断後、2 ゲノム間でサブトラクションを行なうことにより、ゲノム間の DNA メチル化差異を包括的に探索、同定することができる手法である。MS-RDA 法の結果、計 92 クローンが得られ、このうち 10 クローンが遺伝子発現に関わる可能性のある領域から得られた。具体的には、8 クローンは既知遺伝子/EST の 5'側 CpG アイランド領域、2 クローンは既知遺伝子/EST の第 1 エクソン領域に由来していた。
2. MS-RDA 法で得られた 10 領域に対し、一卵性双生児双極性障害不一致例における実際の DNA メチル化状態を確認するために、不一致例双生児リンパ芽球様細胞由来 DNA のメチル化状態をバイサルファイトシーケンス法で調べた。計 10 領域のうち 4 領域において実際に双生児間で DNA メチル化状態が異なっていた。4 領域はそれぞれ、*PIP5KL1* (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like 1)、*ARMC3* (Armadillo repeat containing 3)、*SMS* (Spermine synthase)、*PPIEL* (Peptidylprolyl isomerase E-like) の第 1 エクソン周辺に存在していた。計 4 領域のうち、最も広範な DNA メチル化差異が見られたのは *PPIEL* のプロモーター領域であった。*PPIEL* のプロモーター領域は、健常双生児ではほぼ完全にメチル化されていたが、患者双生児ではメチル化が全体的に低下していた。
3. *PPIEL*・*PIP5KL1*・*SMS*・*ARMC3* の計 4 遺伝子で見られたメチル化差異が、双極性障害の患者群において一般的に確認できるかを調べるために、パイロシーケンス法を用いてこれらの遺伝子の双極性障害患者群と健常者群の DNA メチル化状態を調べ、ケースコントロール研究を行なった。測定の結果、4 遺伝子のうち *PPIEL* において DNA メチル化状態に有意な差異が認められた。性別と年齢をマッチングさせて比較した結果、*PPIEL* の予測プロモーター領域内にある CpG サイトは、健常者群に比べ双極 II 型障害患者群において Bonferroni 補正後も有意にメチル化率が低かった。年齢や性別、服薬

4. *PPIEL* の予測プロモーター領域内にある CpG サイトのメチル化が、*PPIEL* の遺伝子発現に影響を与えるかを検討するために、*PPIEL* のメチル化率と遺伝子発現量の相関を調べた。被験者全体について分析した結果、CpG サイトのメチル化率と *PPIEL* 発現量は、強く逆相関していた。
5. *PPIEL* は本研究で新たに同定された遺伝子であり、その予想アミノ酸配列は PPI ドメイン (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase domain) を部分的に保持していた。PPI ドメインを持つ他の遺伝子と *PPIEL* との相同性を調べるために、これらの遺伝子の mRNA 配列を Clustal W により多重整列し、近接結合法 (NJ 法) を用いて分子系統樹を作製したところ、*PPIEL* は *PPIE* (Peptidylprolyl isomerase E) と最も高い相同性を持つことが示された。
6. *PPIEL* のヒト脳組織における発現を調べるために、ヒト死後脳の cDNA サンプルを用い、定量的 RT-PCR 法でその発現量を測定した。その結果、*PPIEL* は脳内に普遍的に発現していることが示された。*PPIEL* は下垂体や黒質で特に強く発現していた。

以上、本論文は一卵性双生児双極性障害不一致例における DNA メチル化差異を 4 領域同定し、このうち *PPIEL* のメチル化異常が双極 II 型障害と関連することを示した。本研究は、双極性障害において DNA メチル化に変化があること、メチル化の変化が双極性障害の病態生理に影響を与えている可能性があること、を示した最初の研究であり、また精神疾患におけるリンパ芽球様細胞を用いた DNA メチル化状態のケースコントロール研究としても初めての研究である。これより、本研究は双極性障害の病態生理の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。