

第 110 回日本精神神経学会学術総会
精神医学奨励賞受賞講演

One-carbon Metabolism に着目した統合失調症研究

木下 誠 (徳島大学大学院医歯薬学研究部精神医学分野)

DNA メチル化修飾やホモシステインの代謝にかかわる one-carbon metabolism 経路に注目して、これまで統合失調症の病態解明研究を行ってきた。ゲノムワイド DNA メチル化修飾解析により末梢血において広範囲に統合失調症の DNA メチル化修飾変化を認めること、統合失調症患者において血漿ホモシステイン濃度が特定の遺伝子の末梢血の DNA メチル化修飾に影響を与えること、疫学観察研究のメタ解析により統合失調症患者において高ホモシステイン血症を認めること、メンデル無作為化解析により血中ホモシステイン濃度の上昇が統合失調症のリスクの原因であること、遺伝子関連研究のメタ解析により血漿ホモシステイン濃度に影響するメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子の C677T 多型が日本人において統合失調症の発症リスクであることを明らかにした。これらの知見は統合失調症の病態解明や治療法開発の一助になるとと思われる。

<索引用語：統合失調症，DNA メチル化修飾，one-carbon metabolism，ホモシステイン，メンデル無作為化解析>

はじめに

徳島大学大学院医歯薬学研究部精神医学分野では、one-carbon metabolism 経路に注目した統合失調症研究を行っており、そこを糸口として DNA メチル化修飾解析も進めている。DNA メチル化修飾は遺伝子の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現に影響を与えるエピジェネティクス機構の主要なメカニズムであり、シトシン塩基 (C) とグアニン塩基 (G) が連続している配列の部分 (CpG) でシトシン塩基の 5' 位の炭素原子にメチル基が付与されることをいい、クロマチン構造の安定性、ゲノム・インプリンティング、X 染色体の不活化、正常発達に寄与している^{7,17)}。統合失調症は遺伝要因と環境要因が相互に影響して発症する多因子疾患であるが、環境要因の精神疾患発病にかかわる分子生物学的メカニズムはいまだによくわかっていない。近年、環境要因が DNA メチル化修飾に影響を与え、遺伝子発現や行動を変化させる可能性を示唆する研究論文が報告されるよ

うになり^{20,23)}、DNA メチル化修飾が精神科領域でも注目されるようになってきている。本稿では、これまで筆者が行ってきた one-carbon metabolism 経路に関連する DNA メチル化修飾とホモシステインの統合失調症研究の成果を報告する。

I. 抗精神病薬を内服していない

統合失調症患者と一方のみが統合失調症を 発症した一卵性双生児を用いたゲノム網羅的 DNA メチル化修飾解析研究

我々は、抗精神病薬を内服していない統合失調症患者 24 名と年齢・性別をマッチさせた 23 名の健常者から得た末梢血白血球サンプルをファーストセット、一方のみが統合失調症に罹患した 3 組の男性の一卵性双生児ペアをセカンドセットとして、ゲノム網羅的 DNA メチル化修飾解析を行い、末梢血における統合失調症の DNA メチル化修飾異常の同定を行った。本研究のサンプルの詳細は表 1 に示した。

表1 ファーストセット (上) とセカンドセット (下) に用いたサンプルの詳細データ

	健常者 N=23	統合失調症患者 N=24
性別 (男性/女性)	10/13	11/13
平均年齢 (歳±SD)	31.9±9.7	30.9±10.5
発症年齢 (歳±SD)	—	27.4±10.1

性別 (男性/女性)	3組/0組
平均年齢 (歳±SD)	52.7±10.4
発症年齢 (歳±SD)	24.3±7.1
罹病期間 (歳±SD)	28.3±5.0

抗精神病薬は DNA メチル化修飾を変化させることが知られている^{6,9,13,14,15}。また、一塩基多型の DNA メチル化修飾への影響も報告されており^{4,17}、抗精神病薬を内服していない統合失調症サンプルと一卵性双生児サンプルを用いることは、薬物や遺伝子配列の影響を除外し疾患の DNA メチル化修飾の異常を同定するのに有用な方法である。解析は、抽出したゲノミック DNA のバイサルファイト処理を行った後、Infinium[®] HumanMethylation450 Beadchips (Illumina 社) を用いて 485,764 CpG サイトの DNA メチル化修飾レベルを調べた。メチル化レベルは、 β 値 (0-1) として表した。ファーストセットでは surrogate variable analysis を用いて DNA メチル化修飾の差異を比較し、false discovery rate 0.05 を有意水準とした。セカンドセットでは paired t-test を用いて DNA メチル化修飾の違いを比較し、 p 値 < 0.05 かつ、DNA メチル化修飾の差異 ($\Delta\beta$) > 0.01 を有意とした。

得られた結果は次の通りである。①ファーストセットでは 10,747 CpG サイトで、セカンドセットでは 15,872 CpG サイトで、統合失調症群と健常者群の 2 群間の DNA メチル化修飾の差異を認めた。②2 つのセット間で共通する DNA メチル化修飾の変化を 234 CpG サイトで認めた。これらのサイトは、CpG アイランドだけでなく近傍の CpG アイランドショーやシェルフにも位置し、遺伝子のプロモータ領域だけでなく Gene body や 3'-非翻

訳領域など遺伝子の広範囲に位置していた。これまでの多くの先行研究では解析対象の CpG サイトが遺伝子プロモータ領域や CpG アイランドに限定されていたが、本研究では統合失調症の DNA メチル化修飾の異常が遺伝子の広範囲にわたっていることを初めて明らかにした¹⁰。

II. 統合失調症患者における血漿ホモシステイン濃度と DNA メチル化修飾の関連研究

DNA メチル化修飾は、SAM (S-adenosylmethionine) をドナー基質として DNMT (DNA methyltransferase) の作用で付加され行われる。SAM は脱メチル化体として SAH (S-adenosylhomocystein) を生じ、これが加水分解されてホモシステインとなる (図 1)。

我々は、これらの DNA メチル化修飾にかかわる one-carbon metabolism 経路に注目し、血漿ホモシステイン濃度が末梢血の DNA メチル化修飾レベルに影響するかどうかを検証した。まず、統合失調症患者 42 名と年齢・性の一致した健常者 42 名の血漿ホモシステイン濃度を high performance liquid chromatography (HPLC) 法で測定し比較した。本研究のサンプルの詳細は表 2 に示した。

次に、統合失調症患者 42 名の末梢血から抽出したゲノミック DNA のバイサルファイト処理を行った後、Infinium[®] HumanMethylation450 Beadchips (Illumina 社) を用いてゲノムワイド DNA メチル化修飾解析を行った。最後に、統合失調症患者における血漿ホモシステイン濃度と DNA メチル化レベルの関連を調べた。DNA メチル化修飾にかかわる因子として、血漿ホモシステイン濃度のほかに、年齢、抗精神病薬の使用量をクロロプロマジン換算値として共変量に加え、重回帰分析を行った。

得られた結果は次の通りである。①統合失調症患者群の平均血漿ホモシステイン濃度は 19.5±7.2 nmol/mL、健常者群の平均血漿ホモシステイン濃度は 12.4±2.9 nmol/mL で、患者群で有意に高ホモシステイン血症を認めた (Mann-Whitney U 検

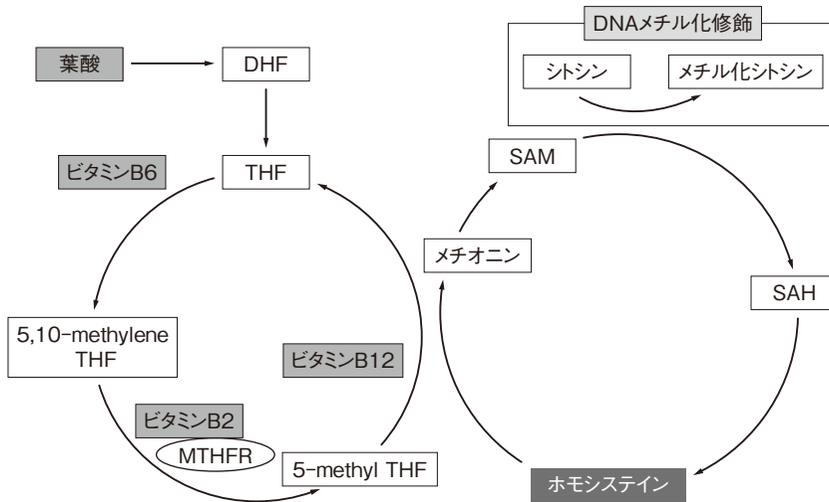


図1 One-carbon metabolism

DHF : dihydrofolate, THF : tetrahydrofolate, MTHFR : methylenetetrahydrofolate reductase, SAM : S-adenosylmethionine, SAH : S-adenosylhomocysteine

表2 血漿ホモシステイン濃度と DNA メチル化修飾の解析研究に用いたサンプルの詳細データ

	健常者 N=42	統合失調症患者 N=42
平均年齢 (歳±SD)	51.9±5.5	51.8±6.7
クロルプロマジン換算 平均抗精神病薬投与量 (mg/日±SD)	—	829.2±498.2

定, $p < 0.0001$). ②統合失調症患者で血漿ホモシステイン濃度と DNA メチル化レベルとの関連を調べたところ, 解析対象とした 164,657 CpG サイトのうち 1,338 CpG サイトで有意な関連を認めた ($p < 0.01$). 1,338 サイトのうち, 580 サイト (43.3%) で血漿ホモシステイン濃度と DNA メチル化レベルに正の相関を認めた. 特に CpG アイランド内の CpG サイトは正の相関を示す傾向を認めた (71.7%). 本研究は, 血漿ホモシステイン濃度と DNA メチル化修飾レベルとの関連をゲノムワイドに調べた初めての研究である. 既報論文では, 血漿ホモシステイン濃度と末梢血のゲノム全体の DNA メチル化レベルに相関はないと報告されていたが²⁾, 本研究では特定の遺伝子の DNA メ

チル化修飾レベルが血漿ホモシステイン濃度に関係することを明らかにした¹¹⁾.

Ⅲ. メンデル無作為化解析を用いた血中ホモシステイン濃度と統合失調症リスクの因果関係の推定

これまでに統合失調症患者では健常者と比較して血中ホモシステイン濃度が高いことや, 血中ホモシステイン濃度に影響を与えるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子の C677T 多型が統合失調症のリスクであることが報告されてきたが, 一致した見解は得られていなかった. 我々は, 統合失調症 381 名と健常者 998 名の血漿ホモシステイン濃度を HPLC 法で測定し比較し, 統合失調症患者群の平均血漿ホモシステイン濃度は 18.7 ± 12.7 nmol/mL, 健常者群の平均血漿ホモシステイン濃度は 11.9 ± 5.0 nmol/mL で, 患者群で有意に血漿ホモシステイン濃度が上昇していることを示した. 次に, 性 (男性・女性) と, 血漿ホモシステイン濃度に影響を与えることが知られているメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 C677T 多型 (CC, CT, TT) で 6 グループに分類して共分散解析を行い, 統合失調症患者群の血漿ホモシステイン濃度が, 6 つのいずれの分類群に

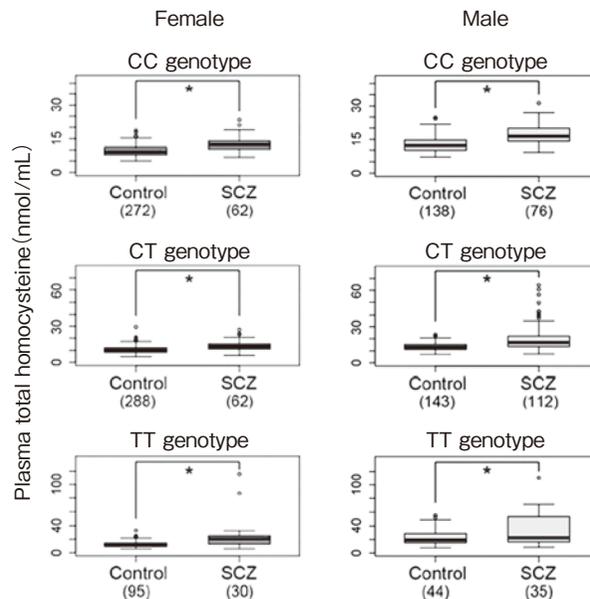


図2 性別と MTHFR 遺伝子 C677T 多型の遺伝子型に分けて行った ANCOVA の結果

においても健常者群と比較して高値であることを明らかにした (図2)。

続いて、既報の統合失調症と血中ホモシステイン濃度との関連を調べた論文を男女に分けて standardized mean difference (SMD) 法を用いたメタ解析を行い (男性統合失調症患者 1,079 名と男性健常者 1,559 名, 女性統合失調症患者 615 名と女性健常者 1,461 名), 男性・女性ともに統合失調症患者群は健常者群と比較して血中ホモシステイン濃度が高いことを明らかにした (男性: SMD=0.76; 95%CI=0.30-1.22; $p=1.2 \times 10^{-3}$, 女性: SMD=0.50; 95%CI=0.31-0.70; $p=5.9 \times 10^{-7}$).

しかしながら, 上記で行った疫学観察研究では全ての交絡因子の影響を考慮することが不可能であること, 因果関係の逆転の可能性があること, 選択バイアスなどの問題点があり, 統合失調症と血中ホモシステイン濃度との真の因果関係は明らかにできない。そこで我々はこの両者の因果関係を明らかにするため, メンデル無作為化解析法という方法を用いて血中ホモシステイン濃度と統合

失調症の関係を評価することにした。メンデル無作為化解析とは, 遺伝子型 (genotype) がメンデルの独立の法則に基づき, 非遺伝要因 (環境要因や交絡因子) とは独立して, 配偶子形成から受精時にかけて親から子へランダムに分配されることに基づいて行う, 遺伝子型を用いた操作変数分析である¹⁾。この手法により無作為化比較試験と同様の検討が可能であり^{5,21)}, 近年疾患と環境要因の因果関係の同定に成果を上げている^{8,18,22)}。

我々は操作変数としてメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子の C677T 多型を用いた。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子の C677T 多型の血漿ホモシステイン濃度への影響 (beta hcy/per TT genotype) には, 日本人健常者 980 名のデータを用いて, TT genotype (vs. CC genotype) の, 血漿ホモシステイン濃度 1SD 上昇の影響力を計算し, beta hcy/per TT genotype=1.14 (95%CI=0.96-1.33; $p=1.1 \times 10^{-29}$) を得た。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 C677T 多型の統合失調症への影響 (OR scz/per TT genotype) は, 日本人サンプルを用いた遺伝子関連研

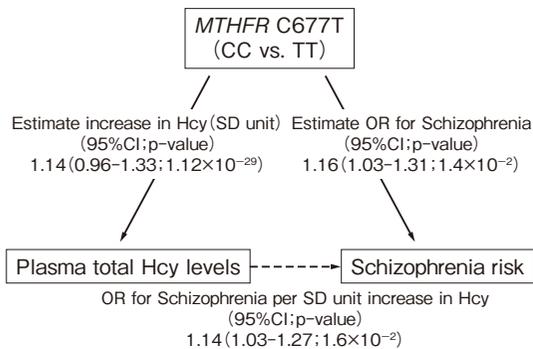


図3 日本人サンプルを用いた MTHFR 遺伝子 C677T 型と統合失調症リスクとの関連についてのメタ解析結果

Hcy : homocysteine, SD : standard deviation, OR : Odds ratio, CI : confident interval

究のメタ解析を行い (統合失調症患者 4,316 名と健常者 6,062 名), OR scz/per TT genotype = 1.16 (95%CI = 1.03-1.31; $p = 1.4 \times 10^{-2}$) を得た。最後に, 血漿ホモシステイン濃度の統合失調症への影響 (OR scz/hcy) は, $\log \text{OR scz/hcy} = (\log \text{OR scz/per TT genotype}) / \beta \text{ hcy/per TT genotype}$ で計算し, OR scz/hcy = 1.14 (95%CI = 1.03-1.27; $p = 1.6 \times 10^{-2}$) であり, 血漿ホモシステイン濃度の 4.8 nmol/mL 上昇あたり統合失調症の発症リスクが 1.14 倍に高くなるという結果を得て, 血漿ホモシステインが統合失調症の原因であるという因果関係を明らかにした (図 3)¹⁶⁾。胎生期の母親の血中ホモシステイン濃度の上昇が子どもの統合失調症の発症リスクを増加させるという縦断研究の結果や³⁾, 血中ホモシステイン濃度を低下させる葉酸やビタミンの統合失調症患者への有効性を示した臨床研究の結果は^{12,19)}, 我々の研究結果を支持するものである。

おわりに

我々は一連の研究を通じて, ①末梢血において, 遺伝子の広範囲領域で統合失調症の DNA メチル化修飾異常を認めること, ②統合失調症患者において血漿ホモシステイン濃度が特定の遺伝子の末梢血における DNA メチル化修飾レベルに影響すること, ③統合失調症患者において男性・女

性ともに血漿ホモシステイン濃度の上昇を認めること, ④血漿ホモシステイン濃度の増加が統合失調症リスクの原因であること, ⑤血漿ホモシステイン濃度に影響するメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子の C677T 多型が日本人において統合失調症の発症リスクであることを明らかにした。これらの知見は, 統合失調症の病態解明の一助になるだけでなく, 血漿ホモシステイン濃度を低下させる治療が統合失調症の治療に有効である潜在的可能性を見出した。今後も one-carbon metabolism の代謝経路に注目した統合失調症の病態解明研究や治療法開発研究を行っていきたいと考えている。

なお, 本論文に関連して開示すべき利益相反はない。

謝 辞 本研究は, 科学研究費助成事業若手研究 (B), 厚生労働科学研究費, CREST, 公益財団法人先進医薬研究振興財団研究助成, 統合失調症研究会助成より助成を受けた成果の一部である。

研究を行うにあたって, 徳島大学大学院医歯薬学研究所精神医学分野教授の大森哲郎先生, 同講師の沼田周助先生をはじめ, 徳島大学精神科医局の皆様には大変お世話になった。

また, 共同研究機関である, 東京都立松沢病院の岡崎祐士先生, 高知大学医学部神経精神科学教室の下寺信次先生, 長崎大学医学部精神神経学教室の小野慎治先生, 今村明先生, 大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室の大井一高先生, 橋本亮太先生, 武田雅俊先生, 金沢大学医薬保健研究域医学系革新ゲノム情報学分野の田嶋敦先生, 徳島大学大学院医歯薬学研究所人類遺伝学分野の井本逸勢先生に多大なご協力をいただいた。

文 献

- 1) Bochud, M., Rousson, V. : Usefulness of Mendelian randomization in observational epidemiology. *Int J Environ Res Public Health*, 7 ; 711-728, 2010
- 2) Bromberg, A., Levine, J., Nemetz, B., et al. : No association between global leukocyte DNA methylation and homocysteine levels in schizophrenia patients. *Schizophr Res*, 101 ; 50-57, 2008
- 3) Brown, A. S., Bottiglieri, T., Schaefer, C. A., et al. : Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 64 ; 31-39, 2007
- 4) Chen, Y., Lemire, M., Choufani, S., et al. : Discov-

ery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics*, 8 ; 2, 203-209, 2013

5) Davey, Smith, G., Ebrahim, S. : What can mendelian randomisation tell us about modifiable behavioural and environmental exposures? *BMJ*, 330 ; 1076-1079, 2005

6) Dong, E., Nelson, M., Grayson, D. R., et al. : Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 ; 13614-13619, 2008

7) Gut, P., Verdin, E., : The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature*, 502 (7472) ; 489-498, 2013

8) Holmes, M. V., Dale, C. E., Zuccolo, L., et al. : Association between alcohol and cardiovascular disease : Mendelian randomisation analysis based on individual participant data. *BMJ*, 349 ; g4164, 2014

9) Kim, S. H., Lee, H. Y., Yi, H., et al. : Haloperidol induces demethylation and expression of the dual specificity phosphatase 6 gene in MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells. *Life Sci*, 91 (25-26) ; 1317-1322, 2012

10) Kinoshita, M., Numata, S., Tajima, A., et al. ; DNA methylation signatures off peripheral leukocytes in schizophrenia. *Neuromolecular Med*, 15 (1) ; 95-101, 2013

11) Kinoshita, M., Numata, S., Tajima, A., et al. ; Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia. *Epigenetics*, 8(6) ; 584-590, 2013

12) Levine, J., Stahl, Z., Sela, B. A., et al. ; Homocysteine-reducing strategies improve symptoms in chronic schizophrenic patients with hyperhomocysteinemia. *Biol Psychiatry*, 60 ; 265-269, 2006

13) Melas, P. A., Rogdaki, M., Osby, U., et al. : Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia : Association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. *The FASEB Journal*, 26 ; 2712-2718, 2012

14) Melka, M. G., Castellani, C. A., Rajakumar, N., et al. : Olanzapine-induced methylation alters cadherin gene

families and associated pathways implicated in psychosis. *BMC Neurosci*, 15 (1) ; 112, 2014

15) Mill, J., Tang, T., Kaminsky, Z., et al. : Epigenomic profiling reveals DNAmethylation changes associated with major psychosis. *American Journal of Human Genetics*, 82 ; 696-711, 2008

16) Nishi A, Numata S, Tajima A, et al. : Meta-analyses of blood homocysteine levels for gender and genetic association studies of the MTHFR C677T polymorphism in schizophrenia. *Schizophr Bull*, 40 (5) ; 1154-1163, 2014

17) Numata, S., Ye, T., Hyde, T. M., et al. : DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex. *American Journal of Human Genetics*, 90 ; 260-272, 2012

18) Pichler, I., Del Greco, M. F., Gögele, M., et al. : Serum iron levels and the risk of Parkinson disease : a Mendelian randomization study. *PLoS Med*, 10 ; e1001462, 2013

19) Roffman, J. L., Lamberti, J. S., Achtyes, E., et al. : Randomized multicenter investigation of folate plus vitamin B12 supplementation in schizophrenia. *JAMA, Psychiatry*, 70 ; 481-489, 2013

20) Roth, T. L. Lubin, F. D., Funk, A. J., et al. : Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry*, 65 (9) ; 760-769, 2009

21) Thanassoulis, G. : Mendelian randomization : how genetics is pushing the boundaries of epidemiology to identify new causes of heart disease. *Can J Cardiol*, 29 ; 30-36, 2013

22) Voight, B. F., Peloso, G. M., Orho-Melander, M., et al. : Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction : a mendelian randomisation study. *Lancet*, 380 ; 572-580, 2012

23) Weaver, I. C., Champagne, F. A., Brown, S. E., et al. : Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation : altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci*, 25 (47) ; 11045-11054, 2005

One-carbon Metabolism and Schizophrenia

Makoto KINOSHITA

Department of Psychiatry, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School

One-carbon metabolism is a process whereby folate transfers one-carbon groups in a range of biological processes, including DNA methylation and homocysteine metabolism. We have focused on and examined the potential roles of this one-carbon metabolism in the pathology of schizophrenia. Firstly, we revealed that aberrant DNA methylation in schizophrenia occurred across the whole genome in peripheral leukocytes by conducting genome-wide DNA methylation profiling. Secondly, we demonstrated that plasma total homocysteine was associated with DNA methylation in patients with schizophrenia at specific genes. Thirdly, we demonstrated that blood homocysteine levels were significantly higher in patients with schizophrenia than in non-psychiatric controls by conducting meta-analysis of previous observational studies. Fourthly, we demonstrated a causal relationship between blood homocysteine and schizophrenia by conducting Mendelian randomization analysis. Finally, we demonstrated that the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism, which causes reduced enzyme activity and higher homocysteine levels, was a risk factor for developing schizophrenia in a Japanese population by conducting meta-analysis of previous genetic association studies. These results will add new insights into the pathology and treatment of schizophrenia.

< Author's abstract >

< **Keywords** : schizophrenia, DNA methylation, one-carbon metabolism, homocysteine, Mendelian randomization >
