



統合失調症患者死後脳における体細胞変異の探索と母体免疫活性化の影響についての検討

仲地 ゆたか^{✉1)}, 杜 建彬^{1,2)}, 加藤 忠史³⁾, 文東 美紀¹⁾, 岩本 和也¹⁾

Yutaka Nakachi[✉], Jianbin Du, Tadafumi Kato, Miki Bundo, Kazuya Iwamoto

脳組織における体細胞変異は統合失調症の病因として重要な役割を果たす可能性があるが、細胞種特異的な解析や動物モデルを用いた検討は十分に行われていない。われわれは統合失調症患者および動物モデル試料を用いて全エクソームシーケンシング解析を行った。患者試料は、死後脳前頭葉について神経細胞核および非神経細胞核分画を行い、細胞種ごとに解析を実施した。動物モデル試料は、妊娠マウスに母体免疫活性化処理を行い、出生仔の前頭葉および尻尾サンプルを用いた解析を実施した。死後脳前頭葉の解析では、体細胞変異の数について群間で定量的な差異は認められなかったが、神経細胞特異的な体細胞変異は、患者群でより高いアレル頻度を示した。また、動物モデルでは、神経発達関連遺伝子に体細胞変異が生じていることや、処理群において大きな個体差がみられることが明らかにした。以上から、神経細胞分化初期で生じた体細胞変異が、統合失調症の病因や病態と関連する可能性や、母体免疫活性化は脳内の体細胞変異のプロファイルに影響を与えることが示唆された。

索引用語

細胞分化, 母体免疫活性化, 統合失調症, 体細胞変異, 全エクソーム解析

はじめに

ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study : GWAS) から、統合失調症は小さな効果量を有する多数の遺伝的変異が関係するポリジェニックな疾患であると考えられている^{33,37)}。しかし、疫学研究で示されているような遺伝要因の大きな関与は GWAS の研究結果だけでは説明できず^{10,20,22,34)}、効果量の大きなレアバリアントの影響に加え、受精後に生じうるエピジェネティックな変

化^{7,18,27,35,38)}や体細胞変異が発症リスクを高めている可能性がある^{3,11,28~30)}。

これまで統合失調症の体細胞変異研究では、Fullard, J. F. らにより、前頭葉神経細胞および非神経細胞における全エクソームシーケンシング (whole exome sequencing : WES) 解析から、体細胞一塩基変異 (somatic single nucleotide variant : sSNV) や変異アレル頻度 (variant allele fraction : VAF) の増加が報告されている¹⁴⁾。一方、Kim, M. H. らは、前頭葉での WES 解析により、sSNV の個数や VAF に差は認めなかったものの、統合失調症関連

著者所属：1) 熊本大学大学院生命科学研究部分子脳科学講座, Department of Molecular Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University 2) Department of Geriatric Psychiatry, The Affiliated Mental Health Center of Jiangnan University 3) 順天堂大学大学院医学研究科精神・行動科学, Department of Psychiatry and Behavioral Science, Juntendo University Graduate School of Medicine

本論文は PCN 誌に掲載された最新の研究論文¹²⁾を編集委員会の依頼により、著者の 1 人が日本語で書き改め、その意義と展望などにつき加筆したものである。

✉ E mail : nakachiy@kumamoto-u.ac.jp

受付日：2025年1月18日

受理日：2025年5月1日

doi : 10.57369/pnj.25-098

遺伝子に sSNV が集積することを報告している²¹⁾。Bae, T. らは、全ゲノムシークエンシング (whole genome sequencing : WGS) 解析から、診断群間で sSNV に有意差はなかったとする一方¹⁾、Maury, E. A. らは患者神経細胞で sSNV の変異シグネチャーに変化が認められたことを報告している²⁶⁾。

本研究では、死後脳前頭葉試料から神経細胞核と非神経細胞核を分離し^{6,19)}、細胞種特異的 WES 解析を行って細胞変異のプロファイルを患者群と健常者群で比較した。また、統合失調症発症のリスク要因の 1 つである母体免疫活性化 (maternal immune activation : MIA)^{4,9)}に着目し、妊娠マウスにポリイノシン-ポリシチジル酸 [poly (I : C)] を投与する poly (I : C) モデル^{8,13,15,16)}を利用し、仔マウス脳試料で WES 解析を行った。

I. 研究の方法および結果

1. 方法

米国スタンレー財団より提供された統合失調症患者および健常者それぞれ 10 例の前頭葉試料を使用した。蛍光標識をした抗 NeuN 抗体により神経細胞核 (NeuN+) と非神経細胞核 (NeuN-) を分画し^{6,19)}、それぞれから DNA を調整した。また、妊娠マウス (C57B/6 N) へ poly (I : C) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を胎生 (embryonic day : E) 12 日から E16 まで 5 日間連続腹腔内投与し、生後 1 日の仔マウス 4 例の前頭葉と尾部から DNA を調製した。本研究は所属機関の倫理委員会および動物実験委員会によって承認されたものである。

150 bp pair-read の WES を行い、ヒト死後脳試料では、NeuN+ 画分と NeuN- 画分のサンプルからそれぞれ 1 検体あたり平均深度 × 250, × 230 に相当するデータを得た。同様にマウス試料では平均深度 × 150 相当のデータを得た。Mutect2²⁾を用いて sSNV を同定した（図 1）。最初に NeuN+ および NeuN- サンプルで個別に単一サンプル解析を実施し、各被験者について 2 細胞種間で重複する sSNV 候補を得た。次にペアサンプル解析により、各被験者について NeuN+ または NeuN- 特異的な sSNV を検出した。マウスでは、同一個体の前頭葉と尾部とのペアサンプル解析により、前頭葉特異的な sSNV 候補を検出した。

2. 統合失調症患者前頭葉における sSNV

NeuN+ および NeuN- の両細胞種で共通して検出され

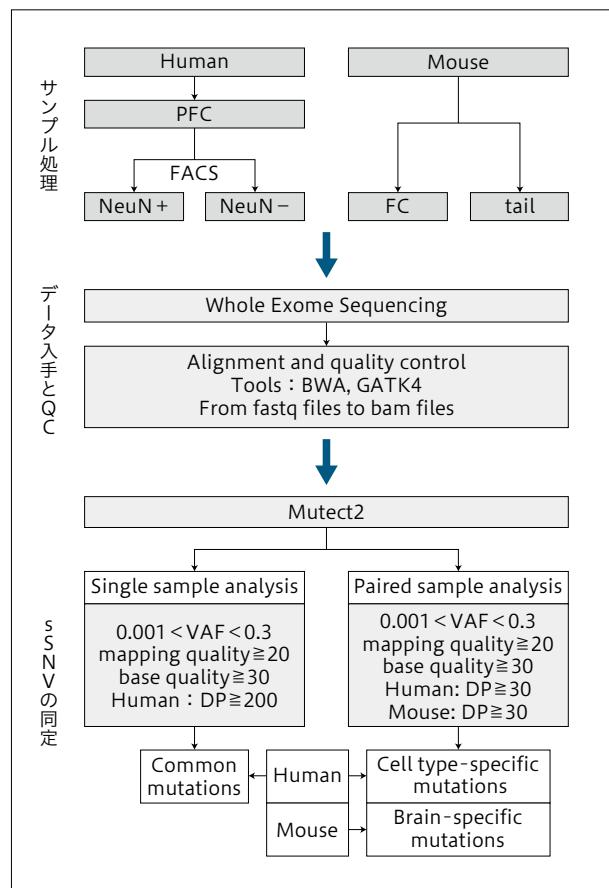


図 1 解析ワークフローの概略

VAF : variant allele fraction, DP : depth,
PFC : prefrontal cortex, FC : frontal cortex
(文献 12 より改変し引用)

た sSNV の個数は、健常者群では 1 人あたり平均 15.5 個、統合失調症群では 10.4 個であり、群間で差を認めなかつた（図 2）。平均 VAF は、健常者群 NeuN+ で 14.07%，NeuN- で 14.02%，統合失調症群ではそれぞれ 14.69% と 14.71% であり、診断群間で有意差を認めなかつた。

それぞれの細胞種に特異的な sSNV は、健常者群 NeuN+ で平均 11.8 個、NeuN- で 9.5 個、統合失調症群ではそれぞれ 5.5 個と 6.8 個であり、診断群間で有意差を認めなかつた。しかし、NeuN+ 特異的 sSNV の平均 VAF は健常者群で 5.71%，統合失調症群で 11.67% と有意差を認めた（図 2）。一方、NeuN- 特異的 sSNV の平均 VAF に有意差はなかつた。

タンパク質への機能的な影響をもつ有害な sSNV として、統合失調症群では両細胞種で検出された共通の sSNV から 6 個、NeuN+ 特異的 sSNV から 2 個、NeuN- 特異的 sSNV から 1 個を同定した。有害な変異をもつ sSNV の割

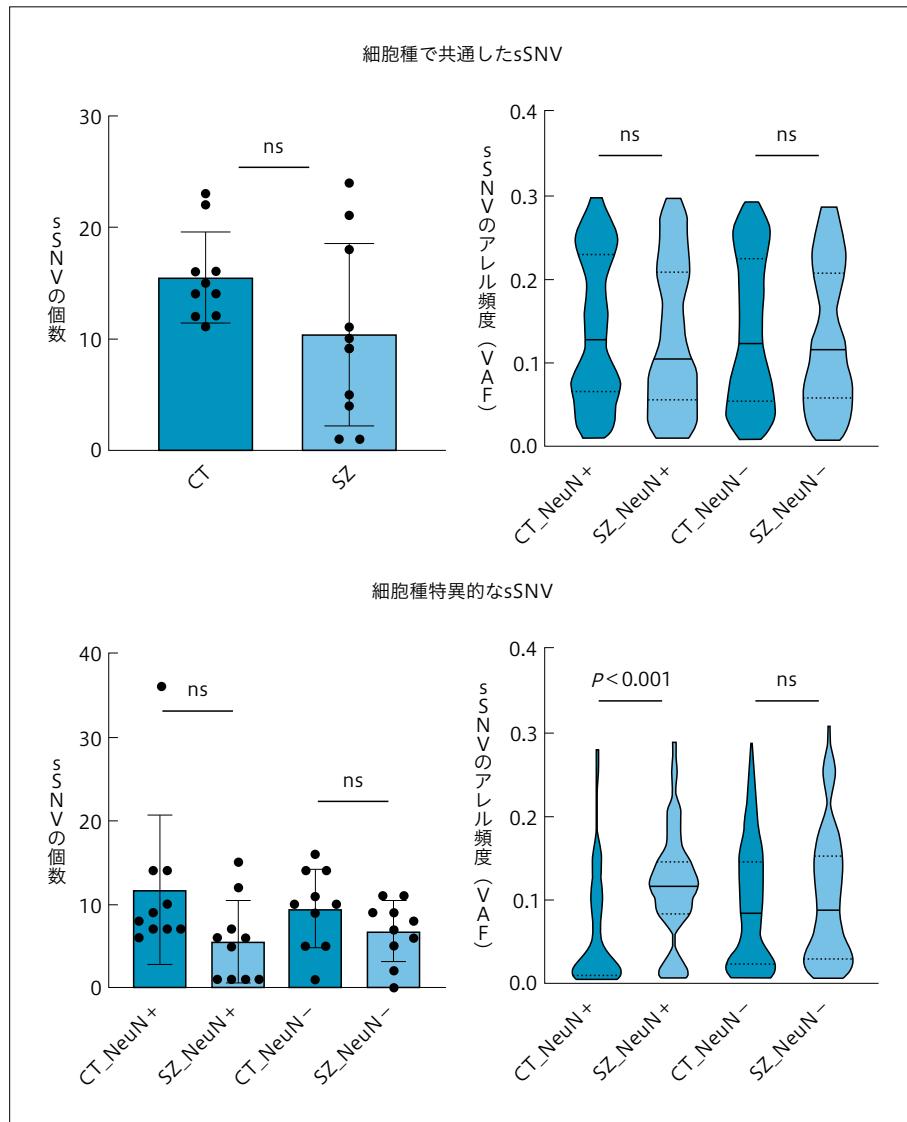


図2 死後脳前頭葉試料のsSNV解析結果

sSNV : somatic single nucleotide variant,
 CT : control, SZ : schizophrenia, ns : not significant
 (文献12より改変し引用)

合については、診断群間で有意差を認めなかった。

3. マウスモデルにおけるsSNV

sSNVは、PBS群で平均12.5個、VAFは6.22%，poly(I:C)群では平均23.5個、VAFは6.78%であった(図3)。sSNVの個数、頻度ともに有意差は認めなかつたが、poly(I:C)群では、PBS群と比較し、より大きな個体間変動を認めた。また、PBS群では合計3個、poly(I:C)群では11個の有害な変異を検出した。

II. 考察

統合失調症患者前頭葉の神経細胞特異的sSNVは健常者群と比較し高いVAFを示した。神経細胞と非神経細胞で共通するsSNVや、非神経細胞特異的sSNVのVAFは健常者と同程度であったことから、神経系細胞の分化過程で生じるsSNVが統合失調症の病因と関連することが示唆された。また、マウスモデルでの解析により、発症リスクを上昇させる代表的な環境要因の1つであるMIAは、一部の胎仔脳でより多くのsSNVを誘発していることが示唆さ

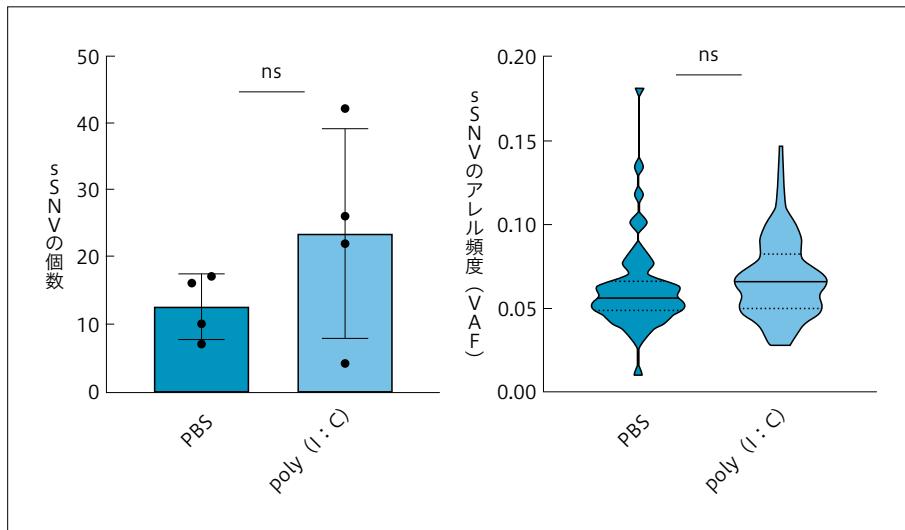


図3 マウスMIAモデルでのsSNV解析結果
 sSNV: somatic single nucleotide variant, ns: not significant
 (文献12より改変し引用)

れた。

先行研究と比較すると、以前報告されたsSNVのVAF増加¹⁴⁾や、診断群間でのsSNV総数に差がないことなど、部分的に一致が認められた^{1,21)}。一方、sSNVの増加¹⁴⁾や、統合失調症関連遺伝子群へのsSNVの蓄積²¹⁾はみられなかつた。これらの不一致は、研究対象サンプルの差異やシークエンシング手法などに起因する可能性がある。特にWGS解析では、統合失調症神経細胞において転写因子結合部位へのsSNV蓄積が報告されており²⁶⁾、WES解析では十分に検出できないゲノム領域への影響が考えられた。

統合失調症でみられたsSNVのVAF増加については、DNA修復機構が寄与しているかもしれない³¹⁾。この仮説検証のため、本研究で用いた検体を含む死後脳遺伝子発現データ¹⁷⁾を再解析したところ、DNA修復関連遺伝子ERCC6とXRCCIの発現変動を認めた。神経細胞におけるDNA修復関連遺伝子群の関与について今後の研究が期待される。

単一神経細胞WGS研究から、加齢は脳のsSNVを誘発することが報告されている^{23,24)}。老化によって引き起こされた体細胞変異の大部分は、各細胞に固有か、ごく少数の細胞にのみ存在するため³⁹⁾、検出の際に大きな課題となる²⁵⁾。本研究、および以前のWES・WGS解析は単一細胞解析ではなく、加齢とsSNV数の関連性は明確には報告されていない。このため、加齢で生じたsSNVについて、統合失調症との関連を検討するには、異なる解析アプローチ

が必要であろう。

本研究で検出された9つの有害変異は、これまでのsSNV研究で報告されているゲノム座位や遺伝子とは異なっていた。有害なsSNVが検出された遺伝子の1つであるCBY1は、βカテニンを抑制しWnt経路に影響を与えることが知られている³⁶⁾。Wnt経路は軸索誘導や神経発生などを通じて統合失調症と関連していることが知られおり、先行研究でも、WNT10BにおいてsSNVが同定されている¹⁴⁾。このため、Wnt経路に生じたsSNVが病因と関連している可能性が考えられる。また、他に有害なsSNVが検出された遺伝子の1つであるDOHHは、翻訳開始因子に不可欠なヒプシンの翻訳後修飾を触媒する酵素をコードしている³²⁾。DOHHの変異は、発育遅延、知的障害、小頭症などの神経発達表現型と関連していることが知られている⁴⁰⁾。

本研究では、マウスMIAモデルを使用したが、われわれはこのモデルにおいて、別のタイプの体細胞変異であるトランスポゾン新規挿入の増加を報告している⁵⁾。poly(I:C)投与群仔マウスでは、sSNVのVAF増加は検出されなかつたが、sSNVの個数に大きな変動を認めた。また、poly(I:C)投与群の11個の有害なsSNVのなかで、ある仔マウスは6個、別の仔マウスは4個のsSNVを有していた。これらの結果は、一部の仔マウスがよりMIAの影響を受け、体細胞変異の負担をもつ可能性を示唆している。poly(I:C)群で有害なsSNVが検出された遺伝子の

多くは、神経発生過程や精神神経疾患において重要な役割を果たしており、MIA によって誘発された sSNV が、統合失調症の病因と関連する可能性が示唆された。

III. 今後の課題および方向性

本研究ではサンプルサイズが小さいため、今後はより大きなコホートでの検証が必要であろう。また、今回は成熟ニューロンマーカーである NeuN を用いた分画を実施しているが、NenN+ 画分には、興奮性・抑制性といった神経サブタイプが含まれており、NeuN- 画分にも多様なグリア細胞種が含まれている。今後の研究では、より洗練された細胞種特異的なアプローチが必要になると考えられる。動物モデルの研究は、さまざまな要因を制御して解析できるという大きな利点があるが、これまで精神疾患動物モデルでの sSNV 研究はほとんどなかった。本研究では feasibility study 的な位置付けにとどまっているが、今後大規模な体系的解析の実施が望まれる。

おわりに

Bioinformatics 解析では、採用する解析法や閾値の設定で結果が大きく異なってしまいがちである。原著論文¹²⁾中で直接言及はしていないが、今回、多くの wet 実験を繰り返しながら、納得できる解析パイプラインを構築した。研究の背景に多くの苦闘があったことを付記しておきたい。

なお、本論文に関連して開示すべき利益相反はない。

謝辞

マウス WES は、JSPS KAKENHI 221S0002 によってサポートされた。また、JSPS KAKENHI JP18H02753, JP18H05430, JP21K07548, JP23H02840, JP23H03838, JP22K07583、および、AMED 助成金番号 JP19dm0207074 によってサポートされた。

文献

- 1) Bae, T., Fasching, L., Wang, Y., et al. : Analysis of somatic mutations in 131 human brains reveals aging-associated hypermutability. *Science*, 377 (6605) ; 511-517, 2022
- 2) Benjamin, D., Sato, T., Cibulskis, K., et al. : Calling somatic SNVs and indels with Mutect2. *bioRxiv*, 861054, 2019
- 3) Bizzotto, S., Walsh, C. A. : Genetic mosaicism in the human brain : from lineage tracing to neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 23 (5) ; 275-286, 2022
- 4) Brown, A. S., Meyer, U. : Maternal immune activation and neuro-psychiatric illness : a translational research perspective. *Am J Psychiatry*, 175 (11) ; 1073-1083, 2018
- 5) Bundo, M., Toyoshima, M., Okada, Y., et al. : Increased l₁ retro-transposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron*, 81 (2) ; 306-313, 2014
- 6) Bundo, M., Kato, T., Iwamoto, K. : Cell Type-Specific DNA Methylation Analysis in Neurons and Glia. *Epigenetic Methods in Neuroscience Research* (ed by Karpova, N.). Springer, New York, p.115-123, 2016
- 7) Bundo, M., Ueda, J., Nakachi, Y., et al. : 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, 2021
- 8) Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., et al. : The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351 (6276) ; 933-939, 2016
- 9) Choudhury, Z., Lennox, B. : Maternal immune activation and schizophrenia-evidence for an immune priming disorder. *Front Psychiatry*, 12 ; 585742, 2021
- 10) Dennison, C. A., Legge, S. E., Pardiñas, A. F., et al. : Genome-wide association studies in schizophrenia : recent advances, challenges and future perspective. *Schizophr Res*, 217 ; 4-12, 2020
- 11) D'Gama, A. M., Walsh, C. A. : Somatic mosaicism and neurodevelopmental disease. *Nat Neurosci*, 21 (11) ; 1504-1514, 2018
- 12) Du, J., Nakachi, Y., Murata, Y., et al. : 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, 2024
- 13) Fujii, S., Murata, Y., Imamura, Y., et al. : Sex-dependent behavioral alterations in a poly (I : C)-induced maternal immune activation mouse model without segment filamentous bacteria. *Neurosci Lett*, 814 ; 137467, 2023
- 14) Fullard, J. F., Charney, A. W., Voloudakis, G., et al. : Assessment of somatic single-nucleotide variation in brain tissue of cases with schizophrenia. *Transl Psychiatry*, 9 (1) ; 21, 2019
- 15) Guma, E., Bordignon, P. D. C., Devenyi, G. A., et al. : Early or late gestational exposure to maternal immune activation alters neurodevelopmental trajectories in mice : an integrated neuroimaging, behavioral, and transcriptional study. *Biol Psychiatry*, 90 (5) ; 328-341, 2021
- 16) Gumusoglu, S. B., Stevens, H. E. : Maternal inflammation and neurodevelopmental programming : a review of preclinical outcomes and implications for translational psychiatry. *Biol Psychiatry*, 85 (2) ; 107-121, 2019
- 17) Iwamoto, K., Bundo, M., Kato, T. : Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet*, 14 (2) ; 241-253, 2005
- 18) Iwamoto, K., Kato, T. : Epigenetic profiling in schizophrenia and major mental disorders. *Neuropsychobiology*, 60 (1) ; 5-11, 2009
- 19) Iwamoto, K., Bundo, M., Ueda, J., et al. : Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Res*, 21 (5) ; 688-698, 2011

- 696, 2011
- 20) Kato, H., Kimura, H., Kushima, I., et al. : The genetic architecture of schizophrenia : review of large-scale genetic studies. *J Hum Genet*, 68 (3) ; 175–182, 2023
- 21) Kim, M. H., Kim, I. B., Lee, J., et al. : Low-level brain somatic mutations are implicated in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 90 (1) ; 35–46, 2021
- 22) Legge, S. E., Santoro, M. L., Periyasamy, S., et al. : Genetic architecture of schizophrenia : a review of major advancements. *Psychol Med*, 51 (13) ; 2168–2177, 2021
- 23) Lodato, M. A., Woodworth, M. B., Lee, S., et al. : Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. *Science*, 350 (6256) ; 94–98, 2015
- 24) Lodato, M. A., Rodin, R. E., Bohrson, C. L., et al. : Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science*, 359 (6375) ; 555–559, 2018
- 25) Manders, F., van Boxtel, R., Middelkamp, S. : The dynamics of somatic mutagenesis during life in humans. *Front Aging*, 2 ; 802407, 2021
- 26) Maury, E. A., Jones, A., Seplyarskiy, V., et al. : Enrichment of somatic mutations in schizophrenia brain targets prenatally active transcription factor binding sites. *bioRxiv*, 481681, 2022
- 27) Nishioka, M., Bundo, M., Kasai, K., et al. : DNA methylation in schizophrenia : progress and challenges of epigenetic studies. *Genome Med*, 4 (12) ; 96, 2012
- 28) Nishioka, M., Bundo, M., Ueda, J., et al. : Identification of somatic mutations in monozygotic twins discordant for psychiatric disorders. *NPJ Schizophr*, 4 (1) ; 7, 2018
- 29) Nishioka, M., Bundo, M., Ueda, J., et al. : Identification of somatic mutations in postmortem human brains by whole genome sequencing and their implications for psychiatric disorders. *Psychiatry Clin Neurosci*, 72 (4) ; 280–294, 2018
- 30) Nishioka, M., Bundo, M., Iwamoto, K., et al. : Somatic mutations in the human brain : implications for psychiatric research. *Mol Psychiatry*, 24 (6) ; 839–856, 2019
- 31) Panier, S., Wang, S., Schumacher, B. : Genome instability and DNA repair in somatic and reproductive aging. *Annu Rev Pathol*, 19 ; 261–290, 2024
- 32) Park, M. H., Wolff, E. C. : Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. *J Biol Chem*, 293 (48) ; 18710–18718, 2018
- 33) Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium : Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511 (7510) ; 421–427, 2014
- 34) Smeland, O. B., Frei, O., Dale, A. M., et al. : The polygenic architecture of schizophrenia – rethinking pathogenesis and nosology. *Nat Rev Neurol*, 16 (7) ; 366–379, 2020
- 35) Sugawara, H., Murata, Y., Ikegame, T., et al. : DNA methylation analyses of the candidate genes identified by a methylome-wide association study revealed common epigenetic alterations in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*, 72 (4) ; 245–254, 2018
- 36) Takemaru, K., Yamaguchi, S., Lee, Y. S., et al. : Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature*, 422 (6934) ; 905–909, 2003
- 37) Trubetskoy, V., Pardiñas, A. F., Qi, T., et al. : Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature*, 604 (7906) ; 502–508, 2022
- 38) Ueda, J., Bundo, M., Nakachi, Y., et al. : Cell type-specific DNA methylation analysis of the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*, 75 (9) ; 297–299, 2021
- 39) Vijg, J., Dong, X. : Pathogenic mechanisms of somatic mutation and genome mosaicism in aging. *Cell*, 182 (1) ; 12–23, 2020
- 40) Ziegler, A., Steindl, K., Hanner, A. S., et al. : Bi-allelic variants in DOHH, catalyzing the last step of hypusine biosynthesis, are associated with a neurodevelopmental disorder. *Am J Hum Genet*, 109 (8) ; 1549–1558, 2022

Exploration of Somatic Mutations in Postmortem Brains of Schizophrenia Patients and Examination of Maternal Immune Activation Effects in Animal Models

Yutaka NAKACHI¹⁾, Jianbin DU^{1,2)}, Tadafumi KATO³⁾, Miki BUNDO¹⁾, Kazuya IWAMOTO¹⁾

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

2) Department of Geriatric Psychiatry, The Affiliated Mental Health Center of Jiangnan University

3) Department of Psychiatry and Behavioral Science, Juntendo University Graduate School of Medicine

Schizophrenia is a severe psychiatric disorder influenced by both genetic and environmental factors. Somatic mutations in the brain have been implicated in its pathogenesis, but their frequency, patterns, and underlying mechanisms remain poorly understood. Furthermore, analyses using relevant animal models are still limited. To address these gaps, we conducted whole exome sequencing (WES) on neuronal and non-neuronal nuclei isolated from the postmortem prefrontal cortex of schizophrenia patients and healthy controls. We identified somatic mutations and compared their distribution, focusing on both shared common mutations and cell type-specific ones. Additionally, we analyzed WES data from a maternal immune activation (MIA)-based animal model to explore how MIA might influence somatic mutation patterns. Our findings revealed no significant quantitative differences in the overall number of somatic mutations between schizophrenia patients and controls. However, neuron-specific somatic mutations in schizophrenia exhibited higher allele frequencies compared to those observed in controls. In the MIA mouse model, offspring showed greater variability in the number of somatic mutations, with mutations affecting genes related to neurodevelopment. These results suggest that somatic mutations occurring during early neuronal differentiation may play a critical role in schizophrenia pathogenesis. Furthermore, MIA appears to influence the somatic mutation profile in the brain, highlighting a potential environmental factor in shaping mutation patterns.

Authors' abstract

Keywords cell differentiation, maternal immune activation, schizophrenia, somatic mutation, whole-exome sequencing