

統合失調症発症患者リンパ芽球細胞株を用いた疾患特異抗原の網羅的探索と患者特異的異常スプライシング群の同定と分析

1. 序論

近年の脳研究がめざましい進歩を遂げているにも関わらず、統合失調症研究は未だ萌芽状態にある。1%という高い有病率、10%にもおよぶ自殺率等、多岐に渡る精神症状が社会に及ぼす深刻な影響に鑑みれば当疾患発症機構の解明と有効な治療法開発は焦眉の急といえる。一方、ヒトの遺伝子は高々2,3万個であるが、発達段階・組織特異的に選択的スプライシングを行うことにより10万種類以上の分子が機能しているといえる。このスプライシングの破綻は、発達段階はもちろん多くの疾患病態に関与していることが想定され、実際多くの脳疾患患者において、種々の遺伝子のスプライシング異常が報告されている。例えば我々は、孤発性アルツハイマー病においてその原因遺伝子プレセニリン2の異常スプライシングを発見し、そのメカニズム解明を世界に先立って報告してきた(1-7)。また近年、この因子のスプライシング異常が、統合失調症患者前頭前野において報告されたことは非常に興味深い(8)。統合失調症発症メカニズムは、その症状の多様性から、多くの可能性が示唆されているにも関わらず、未だ解明されていない。そんな中でも当疾患の主要な研究として、遺伝研究は勿論のこと、神経伝達物質、シナプス、オリゴデンドロサイト、環境要因、疫学的調査などが挙げられる。一方当疾患における異常スプライシングが比較的報告されつつあるにも関わらず、スプライシング異常に積極的に焦点を当てた研究はほとんどされておらず、ある特定の遺伝子のみを選択的スプライシング研究はなされているもの(GRM3, NCAM1, RGS4など)、当研究課題の様なグローバルな異常スプライシング解析に関してはほとんど研究されていない。一方近年、統合失調症において、多くの蛋白質や血小板などに対して、自己免疫、自己抗体の関与が示唆されている(9, 10)。これらは、統合失調症患者末梢血中の免疫系に何らかの変化を来している可能性を示唆するものである。

上記の背景から本研究課題では、統合失調症患者のリンパ芽球細胞株を用いて、軽鎖可変部位の再構築パターンの違いをグローバルに解析する。統合失調症群特異的な軽鎖可変領域をもつクローンを用いて、抗体作成および抗原の特定を目指す。また異常因子群を特定し、それら因子群のスプライシング異常をスクリーニングし、さらにはそのメカニズム解明を大きな目的とする。

2. 方法

統合失調症患者の末梢血液から樹立したリンパ芽球様細胞株Bリンパ球を単離培養し、各クローンの軽鎖可変部位のシーケンスを、PCRにより一斉に解析し、コントロールと比較する。これは、一個のBリンパ球は一個の抗原という原則に基づいている。軽鎖可変領域を用いるのは、重鎖が少なくとも9千通り以上のバリエーションをもち、その解析は到底不可能であるのに対して、軽鎖のそれは百数十種類と比較的少なく、実現可能であることによる。

3. 研究成果

まず初めに、我々の用いた患者リンパ芽球様細胞株の特徴を詳細に解析した。その結果、末梢リンパ血中の成分比率とは異なり、目的のBリンパ球様細胞の割合が非常に少なく、10%を割っていることが明らかとなった。従って、患者リンパ芽球様細胞株そのままをクローン化したのでは、非常に効率の悪い結果を招く恐れがあったため、Bリンパ球に対する特異的抗体である抗CD20抗体を吸着させたマグネティックビーズを用いて粗精製を行いその吸着画分中の細胞について、それぞれクローン化を行った。各クローンからゲノムDNAおよび、蛋白質抽出液を調整した。蛋白質抽出液について、B細胞マーカーCD20でウエスタンブロットを行うと、精製前に比べて効率よくB細胞クローンが得られた。

次に軽鎖ラムダ鎖のJ1, J2, J3, J7について、ゲノムの組み換えが起った時のみそれぞれを特異的にアンプリファイできるプライマーを設定し、それぞれのクローンのゲノムDNAをテンプレートに、PCRを行い、アガロースゲル電気泳動を行った。この時、各サンプルはJ1-3, 7のいずれかのプライマーでのみ増幅され、バンドが検出されないものは他のリンパ球成分（あるいは一部は血球成分）、二個以上のプライマーで増幅されるものはコンタミネーションであることを想定している。スクリーニングの結果、まず、統合失調症ではB細胞の割合が正常人に比べ少ない可能性が示唆された。次にJ1-3, 7のそれぞれが組み換えに選択される割合を検討した結果、正常人では若干のばらつきはあるもののほぼ均等に選択されていたのに対して、統合失調症患者では、J1, 2が正常人よりも少なくJ3, 7が多いことが明らかとなった。これらの結果は、B細胞数の違いを換算しても同様であった。

#### 4. 結語

今回、統合失調症患者において、B細胞自体の減少や、J領域の割合の変化は当疾患と免疫系の異常の関連を示唆するものである。現在は、変化のあったクローンを培養し、形質細胞への分化を促し、抗体を産生させることによって、統合失調症特異的な抗原の特定を試みている。また、疾患コントロールとの比較も検討しており、末梢リンパ血を用いた新しい当疾患のバイオマーカーとしての応用も目指している。

#### 5. 参考文献

- (1) Manabe *et al.*, 2007. HMGAlA: Sequence-specific RNA-binding factor causing sporadic Alzheimer's disease-linked exon skipping of presenilin-2 pre-mRNA. *Genes Cells.*, 12, 1179-1191.
- (2) Yanagita T., Manabe T., *et al.*, 2005. Possible involvement of the expression and phosphorylation of N-Myc in the induction of HMGAla by hypoxia in the human neuroblastoma cell line. *Neurosci. Let.*, 374, 47-52.
- (3) Higashide *et al.*, 2004. Identification of regulatory cis-acting elements for alternative splicing of PS2 exon 5 under hypoxic stress conditions. *J. Neurochem* 91, 1191-1198.
- (4) Nishikawa A., Manabe T., *et al.*, 2004. Novel function of PS2V: change in conformation of tau proteins. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 318, 435-438.
- (5) Matsuzaki S., Manabe T., *et al.*, 2004. Metals accelerate production of the aberrant splicing

isoform of the presenilin-2. *J. Neurochem.* 88, 1345-1351.

(6) Manabe *et al.*, 2003. Induced HMGAla Expression Causes Aberrant Splicing of *PS2* Pre-mRNA in SAD. *Cell Death Differ.*, 10, 698-708.

(7) Manabe *et al.*, 2002. The cytosolic inclusion bodies that consist of splice variants that lack exon 5 of the *PS2* gene differ obviously from Hirano bodies observed in the brain from SAD. *Neurosci. Lett.*, 328, 198-200.

(8) Smith *et al.*, 2004. Expression of truncated presenilin 2 splice variant in Alzheimer's disease, bipolar disorder, and schizophrenia brain cortex. *Brain Res Mol Brain Res.*, 127, 128-35.

(9) Ganzinelli *et al.*, 2009. Autoantibodies from schizophrenia patients induce cerebral cox-1/iNOS mRNA expression with NO/PGE2/MMP-3 production. *Int J Neuropsychopharmacol.* 19, 1-11.

(10) Knight *et al.*, 2007. Rationale for a trial of immunosuppressive therapy in acute schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 12, 424-31.