

精神疾患の早期治療的介入技術の研究開発

筑波大学 プレシジョン・メディシン開発研究センター
神経・免疫疾患分野

向井 淳

【Ⅰ】研究目的

自閉症を含む神経発達障害や統合失調症における認知機能障害は、長期の治療によっても耐性であり、患者の社会生活及び社会復帰を拒む。認知機能障害に対する薬剤の開発は、統一病態生理の不在と複雑な遺伝学的構造により依然として困難である。本研究計画は、ヒストンメチル化の異常がこれらの精神疾患発症のリスクを上昇させる因果関係の明確な科学的前提に基づき、信頼性の高い動物及び細胞モデルを使用して、その認知機能・行動に関する病的神経回路がどのように構築されるのかを明らかにし、発達早期における介入可能な革新的な治療薬・治療法の開発へ展開することを目指す。

【Ⅱ】研究計画の背景

精神障害(統合失調症、双極性障害、大うつ病)の大規模なゲノムワイド関連解析(GWAS)データにおける4,939の生物学的経路の中で、ヒストン3リジン4残基(H3K4)メチル化は、最も強い統計学的リスクを示す。これら common variants に対し、H3K4メチル化を触媒するメチル化酵素(lysine methyltransferase: KMT)と脱メチル化酵素(lysine demethylase: KDM)の機能喪失(loss of function: LoF)変異は、*KMT2A* (Wiedmann-Steiner syndrome), *KMT2D* (Kabuki syndrome) において常染色体優性遺伝による重度の神経発達障害を起こし、*KMT2C* (Kleefstra syndrome)、*KMT2E*における *de novo* LoF rare variant は自閉症の発症リスクと関連する(図1)。この特定の生物学的経路において、common variants および rare variants の両方の変異体が集約するという事実は、精神障害の病因に対するH3K4メチル化の重要性を強調する。

H3K4メチル化はクロマチン構造に影響を与える不可欠な要素であり、DNAアクセシビリティの変化を介して遺伝子発現を調節する動的プロセスであり、エンハンサーやアクティブに転写されるゲノム遺伝子座のプロモーターに広く関与する。リジンのメチル化の3つの状態、mono- (me1)、di- (me2)、および tri-methyl (me3) グループは、クロマチン再構成の過程に複雑さを与え、H3K4me1はエンハンサーの特徴であり、H3K4me2/3は活発に転写される遺伝子のプロモーターであることを示す。発達中の神経系におけるこのメチル化マークの機能と調節は完全には理解されておらず、脳におけるクロマチン調節のダイナミクスは、中枢神経系の発達と機能に不可欠であり、神経エピジェネティクスの新たな分野の焦点である。

最近、我々の研究グループは統合失調症患者の全エクソームシーケンス(WES)によってH3K4メチルトランスフェラーゼをコードする *SETD1A/KMT2F* 遺伝子の *de novo* LoF rare variant を同定し、統合失調症リスクにおけるクロマチン制御因子の関与を明らかにした。その後患者6000人を対象とした大規模WES解析により再確認されたが、これはWESによる統合失調症の発症リスクとの関連が明白に確立された唯一の例であり、深い浸透率(オッズ比35.2)を持つ統合失調症疾患モデルとしての重要性が示唆された。

SETD1A/KMT2F はH3K4をメチル化するKMT活性を持ち、ヒストンタンパク質のN末端テールのリジン4残基のメチル化の3つの修飾(me1/2/3)を共有結合し、ヒストンのコンフォメーションを変化させることでクロマチンのリモデリングを導き、遺伝子の活性化に関連するDNAアクセシビリティの変化を介して遺伝子発現を調節する。

【Ⅲ】結果

(1) ヒストンメチルトランスフェラーゼ *Setd1a* に関する研究

Setd1a は、ChIP-Seqにより34%がプロモーターに、66%がエンハンサーに結合することが分かった。*Setd1a* 結合エンハンサーを持つ遺伝子は、統合失調症および神経発達障害リスク遺伝子のリストと非常に特異的なオーバーラップを示し、ヒトの *SETD1A* 欠失は、疾患リスク遺伝子のネットワークの誤調節を介して部分的に生理学的欠失につながる可能性があることを明らかにした。

Setd1a をノックアウト(KO)したマウス *Setd1a*^{-/-} は、認知行動試験により、統合失調症患者と共通する認知機能の核である作業記憶の欠失がみられた。また、神経細胞軸索の分岐数減少やスパインの減少等の解剖学的 connectivity や、短期シナプス可塑性の変化等の機能的 connectivity に関する表現系を明らかにし、シ

ナプス接続の dysconnection による変調が病態生理の根底にあることが示唆された。これらの表現型は、統合失調症の発症リスクに関連する因果関係の明確な疾患遺伝子 *DISC1*, あるいは 22q11.2 微小欠失をもとに作製された疾患マウスモデルに共通するものであり、*Setd1a*^{+/-}マウスの統合失調症疾患マウスモデルとしての妥当性を示した。これら統合失調症マウスモデルに共通した解剖学的 connectivity の表現型である神経細胞軸索の分岐数減少を利用した独自の 1 次スクリーニング法を開発し、LSD1/KDM1A の阻害剤 ORY-1001 が、神経細胞軸索分岐数減少をレスキューすることを見出し、それらの成体への全身投与後、作業記憶が完全に回復することを見出した。またスクリーニングで別の lysine demethylase (KDM) isoform の阻害剤を見出し(未発表)、現在作業記憶に対する効果を検証中である。これまでの研究の重要な側面の 1 つは、*Setd1a* 機能の成人期での回復を目的とする遺伝学的介入と、薬理的介入の両方によって、*Setd1a* 欠失脳における特定の認知および神経回路の障害を克服できることの実証である。これらの介入による結果は、正常な作業記憶に関する神経回路において、*Setd1a* 機能の持続的な発現が必要とされることを示し、生涯にわたる時間枠で統合失調症の治療機会があることを示唆した。これらの成果を *Neuron* 誌に発表した(Mukai, et al., *Neuron*, 2019)。

感覚刺激の皮質処理の異常は、統合失調症患者において一貫して見られる変化であり、知覚の歪みに寄与すると考えられている。統合失調症のアンサンブル仮説は、特定された数百の候補遺伝子、分子、及び細胞レベルのリスク経路が、細胞レベルで疾患に関する下流の多様な病因経路に共通の収束点を示し、本質的にアンサンブル活性と可塑性の信頼性を損なう。*Setd1a*^{+/-} マウスにおけるアンサンブルの崩壊は、より大きな脳ネットワーク間のシンクロニーを損ない、認知と行動制御の基礎となるより複雑な情報処理に影響を与えることを明らかにした。この成果を *Biological Psychiatry* 誌に発表した(Hamm, Mukai, et al., *Biol Psychiatry*, 2020)。

(2) 神経発達障害・自閉症に関連する KMT ファミリー遺伝子の研究

Setd1a/Kmt2f のホモログである lysine methyltransferase (Kmt)、*Kmt2b*, *2c*, *2e* の null mouse と floxed KO-first mouse を新たに作製した(図 1)。また *Kmt2a*, *2d* のコンディショナル KO マウスを作製中である(null マウスのコロニー形成が難しいため)。これらのマウスに対して、作業記憶、恐怖条件付け、社会記憶、不安(open field)等の認知行動試験を概ね終え、各 floxed KO-first mouse を用いて、各種認知行動表現型をレスキューする時間枠の特定を進めている。またそれぞれのミュータントマウスの RNA-Seq、ChIP-Seq を概ね終えた。

【IV】考察と今後の展望

今回の研究の重要な側面の 1 つは、*Setd1a* 機能の成人期での回復を目的とする遺伝学的介入により、*Setd1a* 欠失脳における特定の認知および神経回路の障害を克服できることの実証である。これらの介入による結果は、正常な作業記憶に関する神経回路において、*Setd1a* 機能の持続的な発現が必要とされることを示し、生涯にわたる時間枠で統合失調症の治療機会があることを示唆する。rare variant に起因する SETD1A を標的とした治療法は、H3K4 メチル化に関連する経路が統合失調症の GWAS データの生物学的経路の中で強く濃縮されるという事実によって示唆されるように、より広い患者層に適用される可能性がある。

クロマチンリモデリング、転写因子経路の druggable なターゲットの分析は、神経薬理学における創薬の新時代に貢献する。統合失調症を含む異なる精神疾患で共有される転写ネットワークに対する疾患の影響や、統合失調症における前頭葉のヒストン修飾の変更に関する研究が、精神障害の根底にあるゲノム構造や転写機構への洞察を提供してきたが、今回の LSD1 阻害剤の認知機能障害への治療効果は、これらの転写制御ネットワークをターゲットとしたエピジェネティックなモジュレーターの使用によって、精神疾患によって影響を受ける遺伝子経路の改変をする可能性があることを示した。神経細胞転写制御ネットワークの制御因子を変更する直接的および間接的な治療戦略は、最終的には、疾患によって影響を受ける認知機能に関する神経回路可塑性の回復に効果的な可能性がある。

【V】助成採択後から現在までの研究課題に関する業績

【論文・総説】

1. 福田 菜由, 向井 淳, 「統合失調症の認知機能障害を改善するエピゲノム治療薬の開発」精神科、第38巻第2号 (2021).
2. Hamm JP, Shymkiv Y, Mukai J, Gogos JA, Yuste R. Aberrant cortical ensembles and schizophrenia-like sensory phenotypes in *Setd1a* mice. *Biol Psychiatry* 88 (3): 215-223 (2020).
3. Mukai J, Cannavo E, Sun Z, Crabtree G, Diamantopoulou A, Thakur P, Chang CY, Lomvardas S, Takata A, Xu B, Gogos JA. Recapitulation and reversal of schizophrenia-related phenotypes in *Setd1a*-deficient mice. *Neuron* 104: 471-487 (2019).

【学会】

1. 福田 菜由, 向井 淳 「統合失調症の認知機能障害を改善するエピゲノム治療薬・治療法の探索」第 44 回

2. 福田 菜由, 向井 淳. Development of epigenome therapeutic agents and treatments to improve cognitive impairments in schizophrenia. 第94回 日本薬理学会年会、札幌 2021年3月



図1. 本研究計画の概要

精神神経疾患に関連するKMTとKDM遺伝子
 KMT2A, 2Dは常染色体優性遺伝による重度の神経発達障害を引き起こし、KMT2C, 2E, 2FにおけるLoF rare variantはASDや統合失調症の発症リスクと関連する。H3K4メチル化に関連する精神疾患を包括的に解析する。

認知行動表現型をレスキューする時間枠の特定
 floxed KO-Firstマウスに対し、異なる発達段階でタモキシフェン誘導性の組換えにより、KMT, KDMの発現を回復させ、各発達段階でのKMT, KDMの必要性と、神経回路欠陥の可逆性・不可逆性を解析し、各認知行動障害への治療的介入の適切な時期・時間枠を特定する。

疾患横断的なマルチオミクス解析
 マルチオミクス解析を通じて疾患横断的に共有される分子病態と疾患特異的な分子病態を理解する。

シナプスの接続性
 マイクロエンドスコープによる自由行動下でカルシウムイメージングを記録し、皮質、海馬等のアンサンブルを解析する

3次元ゲノム構造と転写調節
 記憶・認知行動における神経機能調節に必要な3次元ゲノム構造、活動依存性転写制御を解析する。

新しい治療薬の開発
 独自に開発したスクリーニング系に加え、マルチオミクス解析から得た標的遺伝子に対して、アンチセンス、ゲノム編集を使って、新しい治療薬・治療法を開発する。

ヒト iPSC による translational research
 ゲノム編集により、ヒト疾患 iPSC モデルを樹立し、マルチオミクス解析により、マウス-ヒト間のbidirectionalな研究を可能にする