

## ミエリン・オリゴデンドロサイト関連遺伝子 *SOX10*

を標的とした認知機能と DTI（拡散テンソル画像）の評価

前野信久

### Myelin-oligodendrocyte related gene *SOX10*:

### Gene association study of cognitive function test and Diffusion

### Tensor Imaging (DTI)

Nobuhisa MAENO

#### Abstract

**Background:** Oligodendrocytes function in the formation of myelin, and facilitate interactions between neurons and glia during synaptic transmission. The *SOX10* is one of a key molecule that relates to oligodendrocyte dysfunction and abnormalities of myelination. **Objective:** The purpose of the present study was to examine the effect of *SOX10* SNP in healthy subjects with cognitive function tests and diffusion tensor imaging (DTI) on MRI. **Methods:** We performed an association analysis of healthy 128 subjects with cognitive function tests (Wisconsin Card Sorting Test: WCST, Continuous Performance Test -Identical Pairs: CPT-IP, N-back task) and in healthy 47 subjects with DTI. **Results:** No significant differences in genotype of *SOX10* SNP were observed in cognitive function tests. In contrast, in the DTI, subjects with G allele in *SOX10* (the allele which may work protectively against schizophrenia in the controls) showed significant higher FA values in splenium of corpus callosum ( $p=0.008$ ). **Conclusions:** The present results suggest that genetic variations in *SOX10* may influence the formation and maintenance of myelin sheath in the Japanese population.

**Keywords:** ミエリン・オリゴデンドロサイト関連遺伝子 *SOX10*, 認知機能検査, Diffusion Tensor Imaging (DTI), 中間表現型 (エンドフェノタイプ)

#### 1. はじめに

脳を構成する主な細胞は神経細胞とグリア細胞である。従来、神経細胞が脳の情報処理の中心的な役割を果たすのに対し、グリア細胞は神経細胞の間隙に存在し、神経細胞を取り巻く環境を整備する脇役的存在であると考えられていた。近年、神経ネットワークの働きに重要な役割を持つとしてグリア細胞が注目されている。中でもオリゴデンドロサイトは、ミエリン（髄鞘）を形成することによって、軸索を伝搬する電気的活動を飛躍的に速めることができる。この一般に知られた跳躍伝導の機能以外に、ミエリンは神経細胞の可塑性に重要な役割を持つことが分かってきた。例えば、ミエリンには神経突起が新たに成長することを抑制する軸索伸長阻害因子が存在し（Chen et al. 2000）、一度完成した神経回路網を固定化していると考えられる（Erik et al. 2001）。各グリア細胞の機能が脳の細胞構築やシナプス形成に必須であり、脳機能の発現に極めて重要な役割を果たして

いることが報告されている (Fields et al. 2002)。

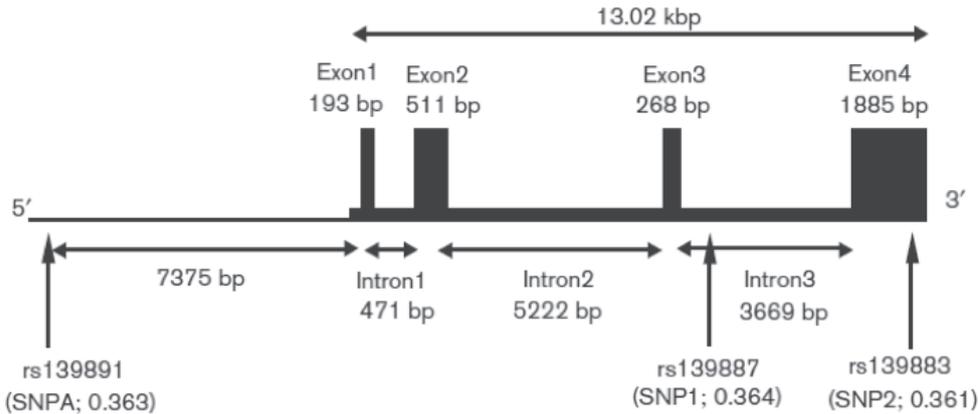
ミエリンあるいはオリゴデンドロサイト関連分子は、神経ネットワーク形成の障害に関与することが想定され、近年、様々なミエリン・オリゴデンドロサイト関連分子を標的とした精神神経疾患の分子病態の解析が行われている。我々は、以前、ミエリン・オリゴデンドロサイト関連遺伝子の1つである SOX10 遺伝子と統合失調症の間に有意な関連があることを報告した (Maeno et al. 2007)。SOX10 遺伝子は発生初期において、頭部神経堤の発生の調整に関わるホメオボックス転写因子 (HMG) ファミリーに属している。中枢神経ミエリン鞘、末梢神経シュワン細胞の発生および髄鞘化に重要な役割をもつと考えられ、この遺伝子の異常と考えられる脱髄性白質ジストロフィーでは、その青年期において、精神病症状を伴うことが報告されている (Hof et al. 2002)。我々は以前、健常者の SOX10 遺伝子多型 (rs139887, C>G, dbSNP database; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) のマイナーアレル頻度 (Minor allele frequency : MAF) (G allele を持つ頻度) が統合失調症患者よりも有意に高いことを報告し、この遺伝子の変異が統合失調症の発症脆弱性に関与している可能性を示唆した。SOX10 遺伝子多型がミエリンの維持や形成に影響を与え、シナプス接合の機能不全を起こしている可能性を推測し、この遺伝子の変異が統合失調症、あるいは健常者においても認知機能や脳画像に影響を与えているかもしれない。そこで、今回我々は、健常者において SOX10 遺伝子多型の変異の有無が脳の機能と構造、すなわち認知機能や脳画像に影響を与えているか否か、SOX10 遺伝子の遺伝子型の効果を検討した。

## 2. 対象と方法

対象は、地域住民、大学病院スタッフ、大学生を中心とした健常者 128 名 (男性 76 名 : 平均年齢 26.4±7.0 才、女性 52 名 : 平均年齢 25.8±6.3 才) である。対象者には、非構造化面接によって過去および現在において精神科への既往歴のないことを確認した。対象者は、すべて血縁のない日本人とし、すべての対象者の末梢血から genomic DNA を抽出した。認知機能検査は 128 名のすべての対象者に行われ、また、MR 画像の撮像は 128 名のうちの大学病院スタッフ、大学生を中心とした 47 名 (男性 28 名 : 平均年齢 35.2±5.3 才、女性 19 名 : 平均年齢 29.7±6.4 才) に実施された。本研究は、名古屋大学医学部・大学院医学系研究科倫理委員会の承認に基づき、すべての対象者に目的と方法を説明し文書による同意を得て行われた。

### 2.1. SNP Genotyping

SOX10 遺伝子は全長 13.02kb、4 つのエクソンを構成する。タイピングに用いられた SNP1; rs139887 は、SOX10 遺伝子のイントロンに存在し、アミノ酸置換を起こす変異ではないが (図 1)、本研究においては SOX10 遺伝子を代表する SNP (tagSNP) として選出した (我々は、先の研究において、統合失調症患者 96 名の SOX10 遺伝子の全 coding regions、promoter 領域、branch site をダイレクトシーケンシングによって mutation research したが、rs139887 と連鎖する未知の機能的 SNP を見つけることができなかった)。また、対象者の遺伝子型は Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法を用い、それぞれ G/G 型および G/C 型、C/C 型のいずれかに同定した (Maeno et al. 2007)。



矢印は体表的なSNP ID、()内は健常者96名のマイナーアレル頻度(MAF; Minor allele frequency)  
 図 1. SOX10 遺伝子の構造

## 2.2. 認知機能検査

認知機能検査は、Wisconsin Card Sorting Test (WCST) 前頭葉機能検査法 (Berg EA. 1948) (鹿島・加藤 1995) (図 2a, b)、Continuous Performance Test (CPT) 持続的処理課題 (Cornblatt et al. 1988) (図 3)、N-back task (N バック課題) 短期記憶課題 (Kirchner 1958) (図 4) を行った。

### 2.2.1. Wisconsin Card Sorting Test (WCST) (慶應大学版)

被検者はコンピュータのスクリーンの下部に表示されている 1 枚のカードを「色、形、数」から分類して、上部に表示されている 4 種類の基本カードから 1 種類のカードを選択する。被検者は正しい分類を知らされておらず、選択後「正しい」または「誤った」選択をしたか、コンピュータからフィードバックされる。被検者が 6 問続けて正しい選択をしたならば、コンピュータ内の分類は変更され被検者は正しい選択をするために他の分類を選択しなければならない。このカード分類は 48 回選択するまで行われる。今回の研究では Categories Achieved (CA: カテゴリーの達成)、Perseverative Errors of Nelson (PEN: 誤反応を続ける“保続性の誤り”)、Difficulty of Maintaining Set (DMS: 正しい分類を維持できない“セットの維持困難”) を算出した。

## WCST (Wisconsin Card Sorting Test)



カードを「色」、「形」、「数」のいずれかの基準で分類。この場合、形(丸)で分類して「間違いです」と表示される。

図 2 a. WCST 慶應大学バージョンの実施画面

## WCSTの進行例

DMS; セットの維持困難 (正しい分類を維持できない)

コンピュータ	色	色	色	色	色	色	色	形	形	形	形	形	形	形	形	形	形	形	形	...
被検者	数	形	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	色	...
判定	×	×	○	○	○	○	○	×	×	×	○	○	○	○	○	×	○	○	○	...

CA: カテゴリーの達成 (1回目)      PEM: 保続性の誤り (誤反応を続ける)

...	形	形	形	形	数	数	数	数	数	数	数	数	数	数	...
...	形	形	形	形	色	数	数	数	数	数	数	数	数	数	...
...	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	...

CA: カテゴリーの達成 (2回目)

カテゴリーの達成, 保続性の誤り, セットの維持困難が通常評価される。

図 2 b. WCST の進行例

### 2.2.2. Continuous Performance Test (CPT)

4 桁の数字が 1 つの刺激としてコンピュータスクリーンに提示され、被検者は全く同じ刺激が続

いた場合、できるだけ素早くマウスをクリックする。1つの刺激の提示時間は50msec.で刺激間は950msec.である。刺激の総計は150であり、そのうちの30が標的とされている。この研究では正解と不正解から計算される識別性である  $d'$  を算出した。

### Continuous Performance Test (CPT)



図3. CPTの実施画面

正解率と正解でないものへの反応率の2つの指標からDプライムの数値を算出。

#### 2.2.3. N-back task

被検者は一連の刺激を順番に呈示され、現在呈示されている刺激がN回前の刺激と同じかどうかを答える。この負荷因子Nによって課題の難易度を調節する。今回の研究では、2-back taskを2度行い、結果のよい方を採用した。

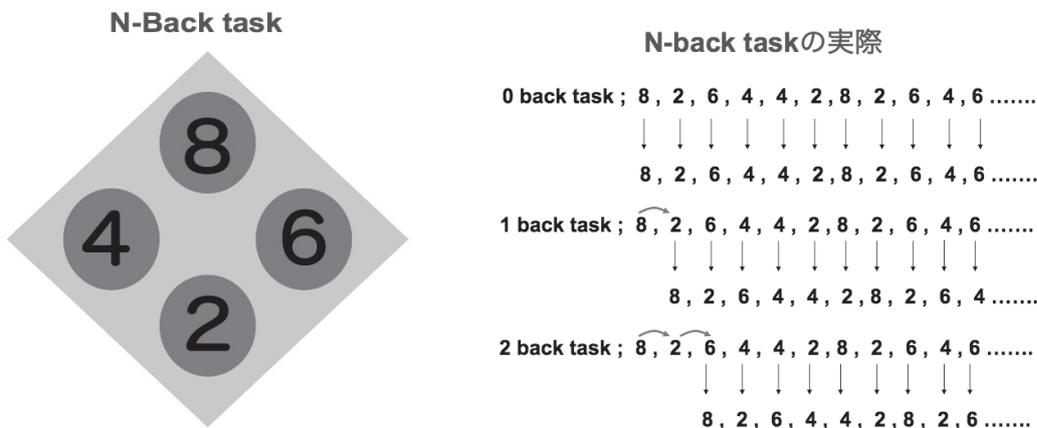


図4. N-back taskの実施画面

0 back task, 1back task, 2back taskの点キー入力の例。

#### 2.3. MR画像

MR装置は3T MRI system (Siemens, Allegra) が用いられ、すべての対象者に同一施設において3D T1強調画像 (MPRAGE; TR=2.5s, TE=4.38 ms, flip angle=8°, 256Å~256 matrix and 192 slices, voxel size=0.75Å~0.75Å~1 mm) を撮像した。MR画像の解析は、Statistical Parametric Mapping (SPM2) によるボクセルベースの解析 (Voxel-based morphometry:VBM) が用いられた (Ashburner et al. 2001)。

最初に、すべての対象者のオリジナル 3DT1 強調画像について、脳組織の信号強度の不均一性を補正し、組織の信号強度に基づいた白質 (White matter : WM) の抽出を行った。続いて、47名の対象者の画像データセットからカスタマイズされた WM テンプレートを作成するために、MNI (Montreal Neurological Institute) 標準脳座標系を用いて解剖学的標準化を行った。最後に、スムー

ジング処理として、FWHM (半値幅) 12mm を設定し画像の平滑化を行った。

### 2.3.1. Diffusion Tensor Imaging (DTI) 画像

拡散テンソル画像といい、白質や神経線維を撮るのに用いられるMRIの一手法である。生体内の水分子の拡散異方性を定量化、画像化する。脳内では水分子の移動を制限するのは白質の神経線維であり、水分子の異方性を調べることで、脳内の神経線維の走行を視覚化することができる (Basser et al.1994)。一般に、大脳白質の各ボクセル毎の拡散の大きさと異方性を異方性比率 (fractional anisotropy : FA) として表す。脳画像においては、例えば、脳梁は、その大きさと形に男女間に差異があることが知られている。また、脳梁における髄鞘化の過程には、年齢による髄鞘形成の違いが知られており、脳梁の神経線維の完全な髄鞘化は思春期頃と考えられている。本研究においては性別と年齢を共変量として補正した解析を行った。

### 2.4. 統計解析

統計処理には SPSS for Windows Version 12.0 の解析用ソフトを用いた。SOX10 遺伝子多型の G/G 群、G/C 群、C/C 群の 3 群間の各認知機能検査の結果について、一元配置分散分析法とボンフェローニ補正による多重比較検定により有意確率 p 値を比較した。また、我々の先の研究において、G allele の頻度が統合失調症患者よりも健常者群に多くみられたことから、G allele が統合失調症の発症脆弱性に対しプロテクティブに働くのではないかと推測し、G allele を持つ G/G、G/C 群と G allele を持たない C/C 群の 2 群間についても解析した。統計手法は、スチューデントの t 検定により有意確率 p 値を比較した。

## 3. 結果

### 3.1. SNP genotype と認知機能検査

認知機能検査を実施した 128 名について、SOX10 遺伝子の遺伝子多型 (rs139887) の組合せの頻度は、G/G 型は 11 名、G/C 型は 58 名、C/C 型は 59 名であった。また、G allele を持つ群 (G/G および G/C 型) は 69 名であった。各遺伝子型により分類した認知機能検査 (WCST, CPT-D', N-back task) の結果を表 1 に示す。

表 1. SOX10 遺伝子多型による認知機能検査の結果 (mean±SD)

genotype	AGE	WCST			CPT-D'	n-back
		CA	PEN	DMS		
G/G (n=11)	25.7±5.0	5.7±0.5	0.5±0.7	0.2±0.4	3.2±0.8	90.0±14.8
G/C (n=58)	27.1±7.7	5.6±0.8	1.0±1.4	0.4±0.7	2.7±0.9	91.0±11.7
*G/G or G/C (n=69)	26.9±7.3	5.6±0.8	0.9±1.3	0.3±0.7	2.8±0.9	90.9±12.1
C/C (n=59)	25.3±5.9	5.6±0.4	0.6±0.9	0.3±0.5	3.0±0.7	90.8±12.1
total (n=128)	26.2±6.7	5.7±0.7	0.8±1.2	0.3±0.6	2.9±0.8	90.8±12.0

\*G/G or G/C (n=69) は G/G (n=11) と G/C (n=58) の合計

WCST の結果は、3 群間および 2 群間に有意な差異を示す項目は認められなかった。しかしながら、PEN (保続性の誤り) において、G/C 群は C/C 群よりも得点が高い傾向 (p=0.076) が、また、G allele を持つ群は G allele を持たない群よりも得点が高い傾向 (p=0.061) が示された。

CPT-D'の結果は、G/G 群、G/C 群、C/C 群の 3 群間における一元配置分散分析の結果、3 群間に有意な差異は認められなかったもの G/G 群の得点が高い傾向が示された (p=0.068)。また、G allele

を持つ群と G allele を持たない群の 2 群間に有意な差異は認められなかった。

n-back の結果は、3 群間および 2 群間において有意な差異は認められなかった。

### 3.2. SNP genotype と MRI-DTI 画像

MR 画像対象者の 47 名について、G allele を持つ群は 30 名（男性 18 名、女性 12 名、平均年齢 33.3 ± 6.6 才）、G allele を持たない群は 17 名（男性 10 名、女性 7 名、平均年齢 32.4 ± 5.9 才）であった。2 群間に有意な関連の認められた DTI による白質の神経線維領域を図 5 に示す。

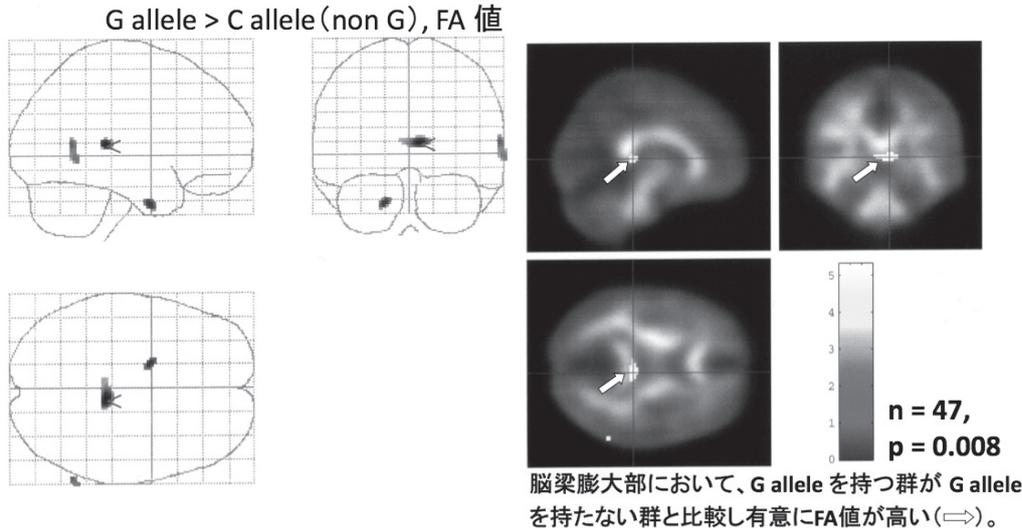


図 5. SOX10 遺伝子多型と有意な相関を認めた MRI-DTI 画像による白質の神経線維領域（矢印）

DTI によって有意な関連が認められた領域は、脳梁膨大であり (p=0.008)、G allele を持つ群が、G allele を持たない群と比較して有意に大きかった。

## 4. 考察

今回我々は健常者において、ミエリン・オリゴデンドロサイト関連遺伝子を標的とした認知機能および MRI-DTI 画像との関連性を検討した。オリゴデンドロサイトの機能不全がミエリンの形成障害をもたらし、さらには神経ネットワークの異常を引き起こすことを想定し、この過程において重要な役割を持つと考えられる SOX10 遺伝子を候補遺伝子とした。SOX10 遺伝子の働きに関連した生物学的意味付けとして、神経発達障害の表現型として注目される認知機能障害を調べる検査である認知機能検査を実施した。また、SOX10 遺伝子の重要な働きである髄鞘化形成に関して、白質の神経線維の方向性を視覚的に捉えることができる MRI-DTI 画像を検討した。

認知機能検査については、本研究対象者 128 名の WCST、CPT-D'、N-back task の結果は、SOX10 遺伝子多型との間に有意な関連を認めなかった。認知機能検査において、CPT は、統合失調症における遺伝率（遺伝因子の関与の指標）が WCST よりも高いことが報告されている（Heinrichs 2004）。本研究の対象者は健常者であるが、統合失調症の発症に対し保護的に作用している可能性のある G allele を持つ群について、G allele を 2 つ持つホモの群で、CPT のスコアが高い傾向が示された。CPT は持続的処理課題といわれ、不注意や衝動性を客観的に評価することができる検査方法として、近年、精神科領域、小児の発達領域で盛んに検査が行われている。CPT で評価される注意力の障害や衝動性および WCST で評価される課題遂行機能は、前頭葉機能である実行機能（executive function）の障害であると考えられており、後天的な生育環境（環境要因）のほか、中枢神経系の機能異常およびそれらをコードする遺伝子の異常（遺伝要因）の関与が指摘されている。本研究に

における健常者間において認知機能検査の結果に遺伝子多型の効果が認められなかったことは、本研究対象者のG alleleを2つ持つホモの群の頻度が少ないため、 $\beta$ エラーが生じている可能性もあり、今後、サンプル数を増やした解析を行う必要があると思われる。

一方、MRI-DTIについては、本研究対象者の47名のDTI画像は、SOX10遺伝子多型との間に有意な関連を認めた。関連が認められた脳梁（脳梁膨大部）は、左右に分かれた大脳半球どうしをつなぐ神経線維の束として、両半球の情報を相互に交換し合って協働している。脳梁膨大部はその尾側部に位置する。本研究の対象者である健常者間において、G alleleを持つ群がG alleleを持たない群と比較して脳梁領域（脳梁膨大部）の神経線維の走行性が有意に高かったことは大変興味深い。統合失調症の発症に対し保護的に作用している可能性のあるSOX10遺伝子多型が健常者においても脳梁膨大部の神経線維の髄鞘化を促進している可能性がある。今後、統合失調症患者群においても同様な検討を行う必要がある。

近年の精神疾患における遺伝医学的研究は、疾患などの表現型（フェノタイプ）と遺伝子の間に、遺伝的に規定される要因の大きい生物学的特徴として、中間表現型（エンドフェノタイプ）に着眼した研究が広く行われている。精神疾患における中間表現型は、前頭葉機能を測定する認知機能検査、脳画像診断、oddball課題遂行時のP50などの事象関連電位、プレパルスインヒビション（PPI）などが挙げられる。この中間表現型は患者のみならず第一度親族でも低下しており、遺伝率も高いことが知られている（Consortium on the Genetics of schizophrenia (COGS) by NJ. Schork）。精神疾患の分子遺伝学的研究が真の成果を挙げるには、疾患の発症に関連する脆弱性遺伝子と本研究のような中間表現型を組み合わせた研究が今後ますます重要になると思われる。

## 5. 結語

今回の研究において、健常者におけるSOX10遺伝子の変異が、脳の構造に変化を与えている可能性が示唆されたが、脳の機能には今回使用した検査において影響を認めなかった。すなわち、健常者におけるSOX10遺伝子の変異が白質の神経線維の髄鞘化に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究に参加して下さった対象者の方々に深くお礼申し上げます。また、本研究に際し、多大なるご助力をいただきました名古屋大学 大学院医学系研究科 精神医学・親と子どもの心療学分野 教授 尾崎紀夫先生、同大学 大学院医学系研究科 精神生物学 准教授 飯高哲也先生に心より深謝申し上げます。

## 文献

- Agartz I, Andersson JL, Skare S (2001) Abnormal brain white matter in schizophrenia: a diffusion tensor imaging study. *Neuroreport* 12:2251-2254.
- Arnold SE, Trojanowski JQ (1996) Recent advances in defining the neuropathology of schizophrenia. *Acta Neuropathologica* (Berlin) 92:217-231.
- Ashburner J, Friston KJ. (2001) Why voxel-based morphometry should be used. *Neuroimage*. Dec;14(6):1238-43.
- Basser PJ, Mattiello J, and Le Bihan D. (1994). MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys. J.* 66, 259-267.
- Berg EA (1948) A simple objective technique for measuring flexibility in thinking. *J. Gen. Psychol.* 39:

15-22

- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*. Jan 27;403(6768):434-9.
- Cornblatt BA, Risch NJ, Faris G, Friedman D, Erlenmeyer-Kimling L (1988) The Continuous Performance Test, identical pairs version (CPT-IP): I. New findings about sustained attention in normal families. *Psychiatry Res*; 26: 223-238.
- Erik M. Ullian, Stephanie K. Sapperstein, Karen S. Christopherson, Ben A. Barres (2001) Control of Synapse Number by Glia. *Science* 291, 657
- Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science*. Oct 18;298(5593): 556-62.
- Heinrichs RW (2004) Meta-analysis and the science of schizophrenia: variant evidence or evidence of variants? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* Jul;28(4):379-394.
- Hof PR, Haroutunian V, Copland C, Davis KL, Buxbaum JD (2002) Molecular and cellular evidence for an oligodendrocyte abnormality in schizophrenia. *Neurochemical Research* 27(10):1193-1200.
- 鹿島晴雄・加藤元一郎(1995) Wisconsin Card Sorting Test (Keio Version)(KWCST), 脳と精神の医学, Vol.6, No.2, 209-216
- Kirchner WK (1958) Age differences in short-term retention of rapidly changing information. *Journal of Experimental Psychology*, 55(4), 352-358
- Maeno N, Takahashi N, Saito S, Ji X, Ishihara R, Aoyama N, Branko A, Miura H, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Iwata N, Inada T, Ozaki N (2007) Association of *SOX10* with schizophrenia in the Japanese population. *Psychiatric Genetics* 17(4):227-231.