

「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」  
平成 15 年度採択研究代表者

有波 忠雄

(筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授)

## 「大規模共同研究による統合失調症遺伝子の探索」

### 1. 研究実施の概要

統合失調症の罹患リスクには遺伝因子が強く関与しており、リスク遺伝子の同定により病態の解明、有効な治療法・予防法の開発、テーラーメイド医療の実現が期待されている。しかし、統合失調症に対する個々のゲノム変異の影響力は小さく、遺伝解析には大規模なサンプルが必要である。日本では 1997 年より統合失調症の連鎖解析のためのサンプル収集を目的にオールジャパン体制の JSSLG が活動してきた。本研究は、JSSLG サンプルを対象とした連鎖解析を中心に据え、さらに全ゲノム関連解析、脳の発現解析、プロテオーム解析のデータを補足して日本人における統合失調症の関連遺伝子の同定をめざした。これを補うものとしてゲノムワイド連鎖解析、死後脳を用いた遺伝子発現、ゲノムメチル化解析を併用した。さらに統合失調症のテーラーメイド医療の実現を目指して、治療反応性、副作用予測に利用可能な関連多型の同定と多型セットを作成することを目的とした。

JSSLG の連鎖研究は 2005 年春まで収集された家系を対象に解析を終了した。家系数は 236 で単一民族を対象としたものとしては世界最大規模の統合失調症の連鎖解析となった。その結果、第 1 染色体短腕に有意な連鎖領域を同定した。さらに、第 14 染色体長腕、第 20 染色体短腕にも日本人の統合失調症の連鎖領域を同定した。ゲノムワイド関連解析からは 2 つの関連遺伝子を同定した。脳の発現解析からは 1 遺伝子を関連遺伝子として同定し、脳の DNA のメチル化解析により 1 遺伝子を関連遺伝子として同定した。統合失調症の治療薬であるリスペリドンによる治療反応性および抗精神病薬の重篤な副作用である遅発性ジスキネジアの関連遺伝子同定のためゲノムワイド関連解析を終了した。

平成 18 年度で連鎖解析、ゲノムワイド関連解析、遺伝子発現解析に基づく関連遺伝子の候補の同定は終了する予定である。また、抗精神病薬による治療反応性、副作用（遅発性ジスキネジア）の候補遺伝子の選択も終了し、その予測のための遺伝子多型の候補リストもできる予定である。それに続いて関連遺伝子と統合失調症との関係を解析することにより、統合失調症の分子病態の解明と新規の治療の手かかりを得るとともに、テーラーメイド医療に役立つゲノム情報や診断マーカーの発見を目指す。

## 2. 研究実施内容

### 【研究目的と方法】

#### 連鎖解析

本年度の最大の目的は連鎖解析を行い、結果を発表することであった。連鎖解析は平成 16 年度末まで収集された連鎖用家系サンプルを対象に Illumina Linkage set ver 4 の 5,861 の 1 塩基置換多型 (SNP) を用いてタイピングを行った。一部、サンプル量の不足のため、全ゲノム増幅したサンプルも加えた。収集された家系は 300 家系近くになったが、連鎖に適さない家系、DNA の変性、実際の兄弟ではなかったなどのため解析できなかった家系が含まれていたため、最終的に解析された家系は 236 家系となった。これらの連鎖用家系はすべてタイピングは成功した。これにより、連鎖解析の家系情報量は約 400 のマイクロサテライトマーカーを用いたときの 0.4~0.6 に比べて、0.6~0.8 と上昇した。さらに、日本全国にわたって収集したサンプルであるため地域別の stratification も可能性があるため、STRUCTURE プログラムを使って家系の発端者の集団構造を 102 SNPs で検討した。その結果、stratification は検出されず、サンプルすべてを一緒に解析することの問題点は検出されなかった。連鎖解析の結果、第 1 染色体 1p21.2-1p13.2 に LOD 値 3.39、第 14 染色体 14q11.2 に LOD 値 2.87、第 14 染色体 14q11.2-q13.2 に LOD 値 2.33、第 20 染色体 20p12.1-p11.2 に LOD 値 2.33 が得られた。

これらの連鎖領域を 3,072 の SNPs で 160 家系 480 人を対象に伝達連鎖不平衡解析 (TDT) を行った。その結果第 1 染色体短腕において  $P = 1 \times 10^{-5}$ 、第 14 染色体長腕において  $P = 3 \times 10^{-5}$ 、 $P = 4 \times 10^{-5}$ 、第 20 染色体短腕において  $P = 2 \times 10^{-5}$  の関連が示唆された。さらにこれらの遺伝子のうち 2 遺伝子では 1,920 人ずつの症例・対照解析でも関連が見られ、有力な統合失調症のリスク遺伝子の候補と考えられた。

#### ゲノムワイド関連解析

遺伝子中心の約 10 万の SNPs がのっている Sentrix® Human-1 Genotyping BeadChip (Illumina) を用いて 100 人の患者について解析を終了した。JSNP データベースの日本人の遺伝子頻度をコントロールとした 12,327 SNPs について 1,920 人ずつの症例・対照解析を終了し、3 つの遺伝子をリスク遺伝子の候補として検出した。

#### マイクロサテライトマーカー

全ゲノムをカバーする約 32,000 のマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。一次スクリーニングは第 1~18 染色体、第 20 染色体はほぼ終了した。終了マーカー数は 25,074 で、その中で有意なマーカー数は 2,951 であった。2 次スクリーニングも第 1~6、第 9~18 染色体、第 20 染色体は終了し、終了マーカーは 1,868 でその中で有意なマーカー数は 638 であった。

#### トランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析により非統合失調症患者脳と比較して患者脳で遺伝子発現の変化のあった 118 遺伝子について各々遺伝子ごとに 1~8 SNPs を 192 症例・192 対照解析で

スクリーニングし、PDLIM5 遺伝子において関連が示唆された。関連が示唆された SNP はプロモーター領域にあり、ゲルシフトアッセイで対立遺伝子により結合タンパク質の結合差が見られ、遺伝子型と死後脳での mRNA 量とも関連していた。リスクアレルは高遺伝子発現と関連し、死後脳では患者群では対照群に比べて遺伝子発現が高かった。これらのことより、PDLIM5 遺伝子の高発現の傾向は統合失調症のリスクとなっていると結論された。

#### 脳の DNA メチル化解析

統合失調症患者脳および非患者脳のメチル化の違いに基づくスクリーニングを行い、30 遺伝子において違いを検出した。そのうち 1 遺伝子では統合失調症脳において遺伝子発現の低下と関連していた。

#### 抗精神病薬反応性及び副作用脆弱性

抗精神病薬による遅発性ジスキネジアを中心とした錐体外路症状脆弱性のサンプルについて約 10 万の SNPs チップによるスクリーニングを行い、5 SNPs において  $P < 0.0001$  となった。これにより選ばれた関連候補 SNPs は別の集団での確認作業を進行中である。また、抗精神病薬（リスペリドン）反応性の 91 人について同様の方法で解析を行った。

#### **【結論】**

平成 17 年度までにサンプルの収集はほぼ終わった。また、連鎖解析も終了し、連鎖解析に基づく関連解析、ゲノムワイド関連解析に基づく確認解析、遺伝子発現解析に基づく解析、抗精神病薬反応性、副作用のサンプルの解析は進んだ。これにより、平成 18 年度の半ばでジェノタイピングの作業はほぼ終了するめどとなり、これらの方法による統合失調症のリスク遺伝子が検出されるものと予想される。すでに、一部のリスク遺伝子が同定されているが、その遺伝子のほとんどはグルタミン酸神経系、ドパミン神経系のシナプス機能に関わる遺伝子であった。

### **3. 研究実施体制**

#### 「連鎖・SNP 解析」グループ

- ①研究分担グループ長：有波 忠雄（筑波大学、教授）
- ②研究項目：研究全体の統括、全ゲノム SNPs タイピング法決定及び実践、遺伝子発現に基づく候補遺伝子の関連解析

#### 「家系収集統括」グループ

- ①研究分担グループ長：岡崎 祐士（三重大学、教授）
- ②研究項目：日本人統合失調症遺伝子研究の大規模共同研究グループ JSSLG のサンプル収集の統括

#### 「家系収集集積・管理」グループ

- ①研究分担グループ長：今村 明（長崎大学、講師）

- ②研究項目：連鎖および連鎖不平衡・関連の確認のためのサンプル収集および臨床データの解析、多施設よりの収集されたサンプルの集配と二次匿名化

「マイクロサテライト解析」グループ

- ①研究分担グループ長：服巻 保幸（九州大学、教授）  
②研究項目：マイクロサテライトマーカーを用いた統合失調症の全ゲノム連鎖不平衡解析

「全ゲノム関連解析」グループ

- ①研究分担グループ長：吉川 武男（理化学研究所、チームリーダー）  
②研究項目：罹患同胞対家系及び TDT 用の家系収集および SNPs による全ゲノム関連解析

「抗精神病薬反応性解析」グループ

- ①研究分担グループ長：尾崎 紀夫（名古屋大学、教授）  
②研究項目：統合失調症患者の抗精神病薬による効果・反応性および副作用に関するサンプルの収集と薬物代謝候補遺伝子の解析

「遺伝子発現解析」グループ

- ①研究分担グループ長：加藤 忠史（理化学研究所、グループディレクター）  
②研究項目：統合失調症の死後脳の遺伝子発現プロファイルによる候補遺伝子の検出

「脳サンプル収集・調整」グループ

- ①研究分担グループ長：糸川 昌成（東京都精神医学総合研究所、プロジェクトリーダー）  
②研究項目：統合失調症患者の死後脳の mRNA およびタンパク質解析用サンプルの調整

「プロテオーム解析」グループ

- ①研究分担グループ長：朝田 隆（筑波大学、教授）  
②研究項目：統合失調症患者の髄液サンプルの収集、プロテオーム解析

#### 4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Arinami T, Ohtsuki T, Ishiguro H, Ujike H, Tanaka Y, Morita Y, Mineta M, Takeichi M, Yamada S, Imamura A, Ohara K, Shibuya H, Ohara K, Suzuki Y, Muratake T, Kaneko N, Someya T, Inada T, Yoshikawa T, Toyota T, Yamada K, Kojima T, Takahashi S, Osamu O, Shinkai T, Nakamura M, Fukuzako H, Hashiguchi T, Niwa SI, Ueno T, Tachikawa H, Hori

- T, Asada T, Nanko S, Kunugi H, Hashimoto R, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Arai H, Ohnuma T, Kusumi I, Koyama T, Yoneda H, Fukumaki Y, Shibata H, Kaneko S, Higuchi H, Yasui-Furukori N, Numachi Y, Itokawa M, Okazaki Y; Japanese Schizophrenia Sib-Pair Linkage Group: Genomewide high-density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 1p, 14q, and 20p. *Am J Hum Genet.* 77(6):937-944, 2005
- Horiuchi Y, Arai M, Niizato K, Iritani S, Noguchi E, Ohtsuki T, Koga M, Kato T, Itokawa M, Arinami T: A polymorphism in the PDLIM5 gene associated with gene expression and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59(5):434-439, 2006
  - Iwayama Y, Hashimoto K, Nakajima M, Toyota T, Yamada K, Shimizu E, Itokawa M, Hoshika A, Iyo M, Yoshikawa T: Analysis of correlation between serum D-serine levels and functional promoter polymorphisms of GRIN2A and GRIN2B genes. *Neurosci Lett* 13;394(2):101-104, 2006
  - Arai M, Yamada K, Toyota T, Obata N, Haga S, Yoshida Y, Nakamura K, Minabe Y, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M. Association Between Polymorphisms in the Promoter Region of the Sialyltransferase 8B (SIAT8B) Gene and Schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 59(7):652-659, 2006
  - Kato T, Iwayama Y, Kakiuchi C, Iwamoto K, Yamada K, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Nanko S, Yoshikawa T: Gene expression and association analyses of LIM (PDLIM5) in bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 10(11):1045-1055, 2005
  - Yamada K, Ohnishi T, Hashimoto K, Ohba H, Iwayama-Shigeno Y, Toyoshima M, Okuno A, Takao H, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Shimizu E, Itokawa M, Mori N, Iyo M, Yoshikawa T: Identification of multiple serine racemase (SRR) mRNA isoforms and genetic analyses of SRR and DAO in schizophrenia and D-serine levels. *Biol Psychiatry.* 57(12):1493-503, 2005
  - Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, Takao H, Iwayama-Shigeno Y, Yoshikawa T, Kato T: DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *J Neurosci.* 25(22):5376-81, 2005
  - Shibata H, Aramaki T, Sakai M, Ninomiya H, Tashiro N, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y: Association study of polymorphisms in the GluR7, KA1 and KA2 kainate receptor genes (GRIK3, GRIK4, GRIK5) with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 141(1):39-51, 2006
  - Lee HJ, Song JY, Kim JW, Jin SY, Hong MS, Park JK, Chung JH, Shibata H, Fukumaki Y: Association study of polymorphisms in synaptic vesicle-associated genes, SYN2 and CPLX2, with schizophrenia. *Behav Brain Funct.* 1:15, 2005
  - Makino C, Shibata H, Ninomiya H, Tashiro N, Fukumaki Y: Identification of single-nucleotide polymorphisms in the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit

NR2D gene, GRIN2D, and association study with schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 2005 15(3):215–221, 2005.

- Ikeda M, Iwata N, Kitajima T, Suzuki T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: Positive association of the serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor gene with schizophrenia in a Japanese population. *Neuropsychopharmacology.* 31(4):866–71, 2006
- Takao T, Tachikawa H, Kawanishi Y, Katano T, Sen B, Homma M, Kohda Y, Mizukami K, Asada T: Association of treatment-resistant schizophrenia with the G2677A/T and C3435T polymorphisms in the ATP-binding cassette subfamily B member 1 gene. *Psychiatr Genet.* 16(2):47–48, 2006
- Zhang X, Tochigi M, Ohashi J, Maeda K, Kato T, Okazaki Y, Kato N, Tokunaga K, Sawa A, Sasaki T: Association study of the DISC1/TRAX locus with schizophrenia in a Japanese population. *Schizophr Res.* 79(2–3):175–180, 2005