

「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 2006 年度までに終了し、第 1 染色体短腕(1p)、第 14 染色体長腕(14q)、第 20 染色体短腕(20p)に日本人の統合失調症の連鎖領域を同定した。1920 人ずつの症例・対照解析により 1p 領域と 14q 領域から各々関連遺伝子を同定した。さらに 20p 領域のもっとも関連が強かった領域からは未知の転写産物を同定した。ゲノムワイド関連解析から 3 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実施し、別の集団での関連の確認を終了した。遅発性ジスキネジアと関連する 3 遺伝子を同定した。

平成 19 年度では連鎖解析、ゲノムワイド関連解析、遺伝子発現解析で同定された関連遺伝子の統合失調症における分子病態の関与の解明、及び、抗精神病薬原性遅発性ジスキネジアの関連遺伝子の機能解析から遅発性ジスキネジアの分子病態の解明を目指す。これによりヒト、マウス双方からの証拠を固めて関連遺伝子であることを確かなものにする。また、抗精神病薬による治療反応性の候補遺伝子の選択も終了し、テーラーメイド医療に役立つ遺伝情報のリストを作成する。これらの関連遺伝子のパスウェイから治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】

目的：連鎖解析とそれに続く連鎖領域内の関連遺伝子の同定

平成 17 年度までで日本人の統合失調症の連鎖解析を行い、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) を行い、関連 SNPs の候補を選択し、さらに 576 人ずつの症例・対照解析で確認し、確認された SNPs をさらに 1344 人ずつの症例・対照解析で確認する、という 3 段階の独立したサンプルを用いた replication 法により関連遺伝子を絞った。

目的：ゲノムワイド関連解析による統合失調症関連遺伝子の同定

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 200 人の患者と 135 人の対照について解析を行い、関連候補 SNPs を選択した。その後さらに 576 人ずつの症例・対照解析で確認し、確認された SNPs をさらに 1344 人ずつの症例・対照解析で確認する、という 3 段階の独立したサンプルを用いた replication 法により関連遺伝子を絞った。

目的：マイクロサテライトマーカーによる統合失調と関連する領域の同定と関連遺伝子の同定

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い、さらに、3 段階で関連を確認した。関連が見られたマイクロサテライトマーカーの近傍の SNPs を用いて関連遺伝子の同定を行った。

目的：トランスクリプトーム解析に基づく統合失調症脳の遺伝子発現変化を伴う遺伝子の同定

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、関連が示唆された遺伝子について 576 人ずつの症例・対照解析で確認し、確認された SNPs をさらに 1344 人ずつの症例・対照解析で確認する、という 3 段階の独立したサンプルを用いた replication 法により関連遺伝子を絞り、統合失調症と関連する遺伝子発現に影響のある SNPs を同定する方法をとった。

目的：脳の DNA メチル化解析により統合失調症と対照群の脳で DNA メチル化の違いのある遺伝子を同定する。

統合失調症患者脳および非患者脳の DNA を bisulfite 処理し、メチル化の違いに基づく

スクリーニングを行い、さらに遺伝子発現量の違う遺伝子の CpG アイランド領域のメチル化の程度について Pyrosequence, Sequenom による定量評価によりメチル化の機序がからむ統合失調症関連遺伝子の同定を試みた。

目的：抗精神病薬反応性及び副作用脆弱性

抗精神病薬リスペリドンによる治療反応性、及び、定型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について約 10 万の SNPs チップによるゲノムワイド関連スクリーニングを行い、さらに別の独立した集団で確認して、関連遺伝子を同定する方法をとった。

【結論】

連鎖領域の 1p での関連遺伝子は *NTNG1* であった。もっとも強い関連が見られた領域は 20p で、そこは広い範囲にわたって遺伝子の登録されていない領域であった。EST を手がかりに関連する領域から転写産物を同定した。ゲノムワイド関連解析から 3 遺伝子に関連していることが明らかとなった。そのうちの 1 遺伝子は *PPP3CC* 遺伝子であった。

患者、対照間で遺伝子発現の異なる遺伝子を同定した。そのひとつは *PDLIM5* であった。関連が示唆された SNP はプロモーター領域にあり、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。モデル動物の実験により、症状、治療と発現量には相関があることを確認し、少なくとも統合失調症の病態に関与していることが示唆された。統合失調症脳で高メチル化、低発現の遺伝子を同定した。抗精神病薬原性遅発性ジスキネジアのゲノムワイド関連解析を行い、*HSPG2*, *GABRG3*, *KCNB2* が関連遺伝子であることを同定した。しかし、これらがどのように遅発性ジスキネジアに関わっているかは次年度の課題として残った。これまで同定された統合失調症との関連遺伝子は、多く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

(1) 「連鎖・SNP 解析」グループ

①研究者名

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

(2)「家系収集統括」グループ

①研究者名

岡崎 祐士（東京都立松沢病院 院長）

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

(3)「マイクロサテライト解析」グループ

①研究者名

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

(4)「抗精神病薬反応性解析」グループ

①研究者名

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全ゲノム関連解析

(5)「脳サンプル収集、変異探索」グループ

①研究者名

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と症候性統合失調症症例の変異の探索

(6)「プロテオーム解析」グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

○ Fukuda, Y., Koga, M., Arai, M., Noguchi, E., Ohtsuki, T., Horiuchi, Y., Ishiguro, H., Niizato, K.,

- Iritani, S., Itokawa, M., & Arinami, T. Monoallelic and unequal allelic expression of the HTR2A gene in human brain and peripheral lymphocytes. *Biol Psychiatry*. 60: 1331-5, 2006.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B.E., Liu, Q.R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasensfitz, L., & Uhl, G.R. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci* 1074, 514-36 2006.
 - Watanabe, Y., Muratake, T., Kaneko, N., Nunokawa, A., Someya, T.: No association between the brain-derived neurotrophic factor gene and schizophrenia in a Japanese population. *Schizophrenia Research*, 86: 29-35, 2006.
 - Watanabe, Y., Fukui, N., Muratake, T., Amagane, H., Kaneko, N., Nunokawa, A., Someya, T.: Association study of a functional promoter polymorphism of the X-box binding protein 1 (XBP1) gene in Japanese patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 60: 633-635, 2006.
 - Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Maeno N, Aoyama N, Ji X, Miura H, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N, Inada T: Association between chromogranin A gene polymorphism and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res* 83: 179-183, 2006.
 - Aoyama N, Takahashi N, Saito S, Maemo N, Ishihara R, Ji X, Miura H, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Yoshida K, Iwata N, Inada T, Ozaki N: Association study between kynurenine 3-monooxygenase gene (KMO) and schizophrenia in the Japanese population. *Genes Brain Behav* 5: 364-368, 2006.
 - Usui H, Takahashi N, Saito S, Ishihara R, Aoyama N, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Yoshida K, Iwata N, Inada T, Ozaki N: The 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and oligodendrocyte lineage transcription factor 2 genes do not appear to be associated with schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res*, Sep 27, 2006.
 - Kunugi H, Hashimoto R, Okada T, Hori H, Nakabayashi T, Omori M, Takahashi S, Tsukue R, Anami K, Hirabayashi N, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Asada T, Harada S, Arima K, Saitoh O. Possible association between nonsynonymous polymorphisms of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene and schizophrenia in a Japanese population. *J Neural transm.* 11310:1569-73, 2006
 - Kawai N, Yamakawa Y, Baba A, Nemoto K, tachikawa H, Hori T, Asada T, Iidaka T. High-dose of multiple antipsychotics and cognitive function in schizophrenia: The effect of dose-reduction. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30:1009-14, 2006.
 - Ide M, Ohnishi T, Murayama M, Matsumoto I, Yamada K, Iwayama Y, Dedova I, Toyota T, Asada T, Takashima A, Yoshikawa T. Failure to support a genetic contribution of AKT1 polymorphisms and altered AKT signaling in schizophrenia. *J Neurochem*. 99(1):277-87. 2006
 - Ishiguro, H., Horiuchi, Y., Koga, M., Inada, T., Iwata, N., Ozaki, N., Ujike, H., Muratake, T., Someya, T., & Arinami, T. RGS4 is not a susceptibility gene for schizophrenia in Japanese: association study in

a large case-control population. *Schizophr Res.* 89, 161-4, 2007.

- Inoue S, Imamura A, Okazaki Y, Yokota H, Arai M, Hayashi N, Furukawa A, Itokawa M, Oishi M. Synaptotagmin XI as a candidate gene for susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 144(3):332-40, 2007.
- Doi N, Itokawa M, Hoshi Y, Arai M, Furukawa A, Ujike H, Sora I, Yoshikawa T. A resistance gene in disguise for schizophrenia? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 144(2):165-73 2007.
- Watanabe Y, Fukui N, Nunokawa A, Muratake T, Kaneko N, Kitamura H, Someya T. No association between the ERBB3 gene and schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Res.* 57(4):574-578, 2007.
- Ishiguro, H., Iwasaki, S., Teasensfitz, L., Higuchi, S., Horiuchi, Y., Saito, T., Arinami, T., & Onaivi, E.S. Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenomics J* (in press).
- Koga, M., Ishiguro, H., Horiuchi, Y., Albalushi, T., Inada, T., Iwata, N., Ozaki, N., Ujike, H., Muratake, T., Someya, T., & Arinami, T. Failure to confirm the association between the FEZ1 gene and schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Lett* (in press).
- Ishiguro, H., Koga, M., Horiuchi, Y., Inada, T., Iwata, N., Ozaki, N., Ujike, H., Muratake, T., Someya, T., & Arinami T. PICK1 is not a susceptibility gene for schizophrenia in a Japanese population: Association study in a large case-control population. *Neurosci Res* in press.
- Horiuchi Y, Ishiguro H, Koga M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Muratake T, Someya T, Arinami T: Support for association of the PPP3CC gene with schizophrenia. *Mol Psychiatry* (in press).