

平成 20 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19591387

研究課題名 (和文)

統合失調症における E r b B 4 シグナリング経路の系統的遺伝子解析

研究課題名 (英文)

Systematic genetic study of the ErbB4 signaling in Schizophrenia

研究代表者

服部 栄治 (HATTORI EIJI)

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学研究チーム・研究員

研究者番号：80399443

研究成果の概要：

本研究は、ErbB4 シグナリング関連遺伝子を中心とした髄鞘化関連遺伝子を解析し、統合失調症との関わりを調べるものである。これら遺伝子につき日本人症例対照サンプル（合計 2,120 人）の解析を終了し、RTN4、MAG 遺伝子座の変異が疾患と関連することを見いだした。また、研究代表者らは同時に日本人集団の全ゲノム解析に従事し、本研究の解析に集団構造の特性による影響が無視できることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：E r b B 4 シグナリング、統合失調症、髄鞘化

## 1. 研究開始当初の背景

ニューレギュリンをコードする NRG1 (染色体 8 番短腕) はポジショナル法 (連鎖解析ゲノムスキャンと連鎖領域の関連スキャンにより感受性遺伝子を探索する手法) により統合失調症への関与が有力視されるに至った遺伝子の一つである (Am J Hum Genet 2002;71:877-892)。ニューレギュリンは神経細胞表面の受容体 ErbB4(v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene) に結合するが、その結果 NMDA 型グルタミン

酸受容体機能を低下させると報告されている。PSD-95 (post-synaptic density protein 95) は ErbB4 に結合し、ニューレギュリンを介した ErbB4 シグナリングを *in vitro* および *in vivo* において増強する (Neuron 2000; 26: 443-455)。また、ヒト死後脳 (前頭前野) 研究では、統合失調症において PSD-95 と ErbB4 の相互作用が増強しており (Nat Med 2006; 12: 824-828)。これらのことから、PSD-95 がニューレギュリンによる NMDA 型グルタミン酸受容体の調節機能を媒

介している可能性がある。我々は現在 PSD-95 をコードする DLG4 遺伝子を解析中である。ポジショナル法により注目された遺伝子 NRG1、DTNBP1 (dystrobrevin binding protein 1) および DAOA (G72) (D-amino acid oxidase activator) はいずれもグルタミン酸神経伝達系に間接的に関与していると考えられ、このことは統合失調症のグルタミン酸仮説に支持を与えている。しかし、そのいずれについても具体的にどの分子群と相互作用を持ちどのような機能的役割を果たしているのかという点が確立されていない。こうした現状を踏まえ、研究代表者らは最近の総説において、精神疾患の遺伝子研究は個々の関連を確認するという従来の作業に加えて、代謝経路の解明という課題に取り組まなければならないことを指摘した (Mol Psychiatry 2005; 10: 719-740)。

統合失調症研究においては、上述のような分子レベルのつながりのみならず、機能的なシステムを念頭において進める必要がある。ErbB4 シグナリングは神経細胞の髄鞘化に深く関与し、近年の研究から髄鞘化と精神疾患との関連が注目されていることから、本研究は髄鞘化に関与する遺伝子群に ErbB4 シグナリングの構成要素を含める形で進めた。

## 2. 研究の目的

ErbB シグナリングを含め、髄鞘化に関与する遺伝子群の遺伝的多型を解析し、これら多型と統合失調症との間に関連があるかと明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象サンプルの準備

解析対象は、症例対照サンプルとした。統合失調症の診断は DSM-III-R あるいは DSM-IV に基づいてなされた。症例対照研究として日本人症例 1060 例、同対照 1060 例の解析を行った。対照群は年齢および性をマッチさせた精神疾患既往をもたない病院職員などである。症例対照サンプルは当初の予定よりも大幅に拡充したことから、今回はこれに比較して小規模な家系サンプル (日本人トリオ (罹患者とその両親) 150 家系、中国人罹患同胞対 (トリオに罹患同胞 1 名を加えたもの) 290 家系) の解析は見合わせた。

### (2) タイプすべき多型の選択およびプロブ準備

国際 HapMap 計画のデータベース (<http://hapmap.org>) は各人種集団について個々のサンプルデータを提供しているので、これを元に連鎖不平衡解析を行いジェノタイプすべき SNP を過不足なく選択することが可能である。Carlson らは  $r^2$  (連鎖不平衡の指標) の高いマーカー同士をグループ化する

アルゴリズムを開発し、グループ化されたものを連鎖不平衡 bin、各 bin の SNP 中で他との  $r^2$  が常に高いものを tagSNP と呼んだ (Am J Hum Genet 2004;74:106-120)。本研究では Carlson らの方法ないしその変法を用いることにより tagSNP を求め、それらの遺伝子型解析を行った。我々は 2005 年以来この手法を導入し、既に発表した研究 (Hum Mol Genet 2006;15:1949-1962) に用いている。

また、既報において有意な関連が見いだされている SNP や機能変異 (アミノ酸置換など) と考えられる多型については、tagSNP との連鎖不平衡を加味しつつ必要に応じて解析対象に加えた。これらのうち一部分はアレル頻度が不明であるため、ジェノタイピングに先立って、統合失調症および対照群計 40 人からなるスクリーニングパネルを作成して、当該領域のシーケンスを直接解析した。

最終的に解析対象とした SNP につき、アッセイ用のプロブを準備した。

### (3) 遺伝子型解析 (ジェノタイピング) およびデータ品質管理

サーモ・サイクラーを用いて遺伝子断片の増幅 (PCR) を行う。遺伝子型判定は Taqman アッセイ (Applied Biosystems 社) により行う。これらに必要な試薬は本研究予算によりまかなう。遺伝子型判定の誤りは優秀な施設においても一定の率で生じ、これは関連解析において統計学的検出力の低下をもたらすため深刻である。本研究では、遺伝子型データは、実験データのクラスタリング、Hardy-Weinberg 比率について点検し、遺伝子型判定の誤りが疑われるサンプルについては再検を行った。しかし、タイプする SNP 数が多い場合にはコスト面での問題を回避するため、ジェノタイピングは二段階に分けて行った。すなわち第一段階においては、連鎖不平衡 bin においてより多くの SNP を代表する TagSNP を優先してタイプした (Best N 法、Nat Genet 2005;37:1217-1223)。

### (4) 遺伝統計解析

症例対照研究の関連解析法として、Armitage trend test (Biometrics 1955;11:375-386) を用いる。このテストは Hardy-Weinberg 平衡が成立しないときでも有効であるという点で標準的なアレルテストよりも優れている。我々は全ゲノム 10 万マーカーのタイピングデータをもとに主成分分析 (Nat Genet 38:904-909, 2006) による集団階層化の解析を行い、日本人においてはその影響は小さいことを確認している。個々の遺伝子と疾患との関連の相乗効果については、多重検定補正を加味したロジスティック回帰分析 (Am J Hum Genet 2006;78:15-27) を用いる。

#### 4. 研究成果

サンプル整備の進捗により、合計 2120 人の症例対照サンプル作業パネルを作成することができた。これに伴い家系サンプルの統計学的検出力が相対的に低くなったため、当初計画を変更して症例対照サンプルのみを解析した。

50 個余りの一塩基多型につき、症例対照サンプルの解析した結果、RTN4 (reticulon 4) 遺伝子および MAG (myelin associated glycoprotein) 遺伝子の複数の一塩基多型アレルが疾患と有意に関連することを認めた。(RTN4 については、rs2968864:  $P = 0.037$ , rs11894868:  $P = 0.047$ 。MAG については、rs7249617:  $P = 0.034$ , rs16970218:  $P = 0.029$ 。) これらは暫定的な解析結果であるが、今後他の遺伝子データも含め、遺伝子間の統計的相互作用を検討する。また、既報において報告されている多型のうち、今回解析対象にしなかったものについては、連鎖不平衡を加味したコンピュータ処理による遺伝子型推定(imputation)を試みている。

これらの関連は多重検定の補正により有意ではなくなるが、統合失調症の遺伝子効果が非常に弱いと想定されることを考慮すれば、現状のサンプル規模ではこれはやむを得ない。今回関連の認められたマーカーが既報において認められる関連シグナルとある程度一致ことを加味すると、髄鞘化が統合失調症に関与する可能性を示唆するものと考えることができる。今後国内外において統合失調症全ゲノム解析データが蓄積すれば、より正確な評価が可能になると期待される。(国内においては、当研究室がこれを行っているところである。)

これらと平行して、双極性障害の全ゲノム関連解析を終了させ(Hattori et al. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. in press)、統合失調症の有力な候補遺伝子である DRD4 遺伝子座につき自然淘汰が働いたとする従来の説を検証すべく解析を行い、結果を公表した(Hattori et al. Eur J Hum Genet. 2009;17:793-801)。特に前者において、研究代表者は日本人集団の全ゲノム解析に従事し、本研究を含む日本人の症例対照研究において集団構造の特性による影響が無視できることを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Hattori E, Toyota T, Ishitsuka Y, Iwayama Y, Yamada K, Ujike H, Morita Y, Kodama M, Nakata K, Minabe Y, Nakamura K,

Iwata Y, Takei N, Mori N, Naitoh H, Yamanouchi Y, Iwata N, Ozaki N, Kato T, Nishikawa T, Kashiwa A, Suzuki M, Shioe K, Shinohara M, Hirano M, Nanko S, Akahane A, Ueno M, Kaneko N, Watanabe Y, Someya T, Hashimoto K, Iyo M, Itokawa M, Arai M, Nankai M, Inada T, Yoshida S, Kunugi H, Nakamura M, Iijima Y, Okazaki Y, Higuchi T, Yoshikawa T. Preliminary genome-wide association study of bipolar disorder in the Japanese population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. in press  
査読有り

② Hattori E, Nakajima M, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Saitou N, Yoshikawa T. Variable number of tandem repeat polymorphisms of DRD4: re-evaluation of selection hypothesis and analysis of association with schizophrenia. Eur J Hum Genet. 2009;17:793-801.  
査読有り

③ Takeshita M, Yamada K, Hattori E, Iwayama Y, Toyota T, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Hashimoto K, Watanabe H, Iyo M, Kikuchi M, Okazaki Y, Yoshikawa T. Genetic examination of the PLXNA2 gene in Japanese and Chinese people with schizophrenia. Schizophr Res. 2008;99:359-64.  
査読有り

[学会発表] (計 5 件)

① 服部栄治: Psychiatric geneticsにおけるヒトゲノム情報の活用 2007年7月11日、日本生物学的精神医学会教育セミナー、日本神経精神薬理学会 合同年会(札幌)

② 服部栄治: 精神疾患の遺伝学 2007年11月22日、第14回慶應臨床遺伝セミナー 慶応義塾大学病院新棟11階大会議室(東京)

③ 服部栄治: ”双極性障害の遺伝子研究” シンポジウム「精神神経疾患におけるゲノムワイド解析」平成20年9月29日 第53回日本人類遺伝学会(横浜)

④ Eiji Hattori: “Genetics of Bipolar Disorder” in a symposium of 2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual meeting of JSBP (2008/9/11). Toyama, Japan

⑤ 治徳大介、服部栄治、岩山佳美、豊田倫子、山田和男、吉川武男: 2120人の日本人ケースコントロールサンプルにおける統合失調症とNogo関与遺伝子の関連研究 平成 21

年 4 月 24 日、第 31 回日本生物学的精神医学会（京都）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

服部 栄治 (HATTORI EIJI)

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学研究チーム・研究員

研究者番号：80399443

### (2) 研究分担者

岩山 佳美 (IWAYAMA YOSHIMI)

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学研究チーム・リサーチアソシエイト

研究者番号：60399441