

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791351

研究課題名(和文) まれな遺伝性疾患との併発家族例を手がかりとした統合失調症候補遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of schizophrenia-associated gene based on a familial case who suffered from the comorbidity of major mental disorders and rare hereditary disease

研究代表者

倉富 剛 (KURATOMI, GO)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00593592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：新たに統合失調症との関連が示された小胞輸送関連遺伝子HPS4と認知機能及び臨床症状の関連を、240名の統合失調症患者と年齢・性別を群間でマッチングした240名の健常者を対象として解析した。HPS4の遺伝子多型は統合失調症患者の遂行機能及び健常者のワーキングメモリと関連することが明らかになった。一方で、HPS4の遺伝子多型と陽性・陰性症状評価尺度のスコアとの関連は認められなかった。また、HPS4はマウスの脳において海馬CA1・CA3錐体細胞層と内側手綱核に発現が認められた。本研究により、HPS4遺伝子が統合失調症患者における遂行機能の障害に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the association of HPS4 variants with clinical symptoms and cognitive function in 240 patients with schizophrenia and 240 healthy control subjects who were group matched for age and sex. Variants of HPS4 were significantly associated with executive function in patients with schizophrenia and with working memory in healthy control subjects. There was no significant association between HPS4 variants and Positive and Negative Symptom Scale scores. HPS4 was mainly expressed in mice medial habenula and hippocampal CA1 and CA3 pyramidal cells. The present study suggested the involvement of HPS4 gene in the executive function deficits in patients with schizophrenia.

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：統合失調症 認知機能 遂行機能 ワーキングメモリ

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は一般人口中の約 0.7%が生涯中に罹患する精神疾患であり、主に青年期以降に発症し、陽性症状(幻覚・妄想等)や陰性症状(意欲低下・感情の平板化等)を示すことを特徴とする。近年においては、患者の社会機能や生活の質に影響を与える認知機能障害も、統合失調症の主要な症状の一つとして扱われている。慢性の統合失調症患者においては、認知機能のうち言語性記憶、ワーキングメモリ、運動機能、言語流暢性、注意、遂行機能などのドメインに障害が認められる(Keefe RS et al, Schizophr Res, 2004)。特にワーキングメモリや遂行機能などは遺伝要因による影響を受けており、複数の遺伝子多型との関連が報告されている。統合失調症における認知機能障害の病態機序を明らかにするために、認知機能バッテリーを用いて脆弱性遺伝子と認知ドメインの関連を包括的に解析することは有用である。

Hermansky-Pudlak Syndrome type 4 (HPS4) 遺伝子は、ヒト染色体の 22q12.1 に位置する 14 個のエクソンからなる遺伝子である。HPS4 タンパク質は HPS1 と複合体 (Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex-3: BLOC-3) を形成し、初期エンドソームを介した細胞内輸送に関わる。本遺伝子は眼皮膚白皮症や出血傾向、間質性肺炎などを示す稀な常染色体劣性遺伝疾患であるヘルマンスキー・パドラック症候群 (Hermansky-Pudlak Syndrome: HPS) の原因遺伝子の一つである。統合失調症の有力な関連遺伝子である dysbindin も本症候群の原因遺伝子の一つであり、BLOC-1 を構成する。本研究室では、症例対照関連解析により、HPS4 の 5 個の遺伝子多型 (rs4822724, rs61276843, rs9608491, rs713998, rs2014410) より構成されるハプロタイプと統合失調症に有意な関連があることを示した (Saito A et al, Psychiatr Genet, 2013)。加えて、HPS と統合失調症、大うつ病性障害の併発を示す家族例を見出した。本家族例では HPS4 遺伝子のエクソン 7 にナンセンス変異が認められた。

HPS4 については繊維芽細胞やメラニン細胞等における分子機能に関する解析は報告されているが、本遺伝子が統合失調症の症状に対してどのように関連しているか、脳神経系においてどのような機能を持つかについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新たな統合失調症関連候補遺伝子である HPS4 について、統合失調症の認知機能障害及び臨床症状との関連を明らかにすることである。

統合失調症患者と健常者について、HPS4 遺伝子多型と認知機能の各ドメインとの関連を解析する。また統合失調症患者について、評価尺度を用いて測定した臨床症状と HPS4 遺伝子多型との関連を解析する。認知機能及

び臨床症状との関連が認められた多型について、遺伝子発現量に対する影響を解析する。Hps4 遺伝子の脳神経系における機能を検討するために、Hps4 にナンセンス変異を有するマウスを分離する。さらにマウス全脳における Hps4 の組織学的解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 対象

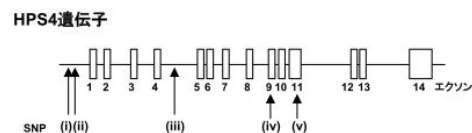
240 名の統合失調症患者(平均年齢 48.1 歳、男性 139 名、女性 101 名)と、年齢・性別を群間でマッチングさせた 240 名の健常者(平均年齢 48.0 歳、男性 143 名、女性 97 名)を対象とした。

認知機能は、統合失調症認知機能簡易評価尺度日本語版 (Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia, Japanese language version: BACS-J) を用いて、言語記憶 (言語性記憶課題)、ワーキングメモリ (数字順列課題)、運動機能 (トークン運動課題)、言語流暢性 (言語流暢性課題)、注意 (符号課題)、遂行機能 (ロンドン塔検査) について評価を行った。病前 IQ は日本語版 National Adult Reading Test (JART) を用いて測定した。統合失調症患者の臨床症状については陽性・陰性症状評価尺度 (Positive and Negative Syndrome Scale: PANSS) を用いて評価した。

本研究は獨協医科大学生命倫理委員会の承認を得ており、ヘルシンキ宣言に従って十分な説明をした上で全ての被験者から書面による同意を得た。

(2) 遺伝子型判定

本研究では HPS4 遺伝子の 5 つの遺伝子多型 (rs4822724, rs61276843, rs9608491, rs713998, rs2014410) を解析対象とした (図 1)。遺伝子型判定は被験者の末梢血由来 DNA より、Taqman プローブ法およびダイレクトシーケンス法によって行った。遺伝子多型と認知機能の関連解析は、性別、年齢、教育年数、病前 IQ を共変量として PLINK version 1.0.7 の線形回帰モデルを用いて解析した。



No.	多型 (アリル)	位置 (アミノ酸塩基置換)
i	rs4822724 (A/G)	5'近傍領域
ii	rs61276843 ¹ (Del/Ins)	5'近傍領域
iii	rs9608491 (T/C)	イントロン 4
iv	rs713998 (G/A)	エクソン 9 (p.G229E)
v	rs2014410 (C/G)	エクソン 11 (p.L443V)

¹21塩基脱落/挿入 (Del/Ins) 多型

図 1 HPS4 遺伝子内の解析対象多型

(3) 遺伝子発現量解析

32 名の統合失調症患者(平均年齢 62.6 歳、

男性 22 名、女性 10 名)と、62 名の健常者(平均年齢 41.8 歳、男性 22 名、女性 40 名)を対象とした。末梢血由来の cDNA に対し、*HPS4* cDNA を標的とした Taqman プローブを用いて定量的 RT-PCR を行い、遺伝子発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) *HPS4* 遺伝子多型と認知機能の関連解析

6 種類の認知ドメイン(言語記憶、ワーキングメモリ、運動機能、言語流暢性、注意、遂行機能)に対する BACS-J サブテストの結果について、統合失調症患者群と対照健常群の間で比較を行った。統合失調症患者群は、全てのサブテストにおいて対照健常群より 1 標準偏差以上得点が低く、特に言語性記憶(Zスコア = -2.01)、注意(-1.97)、ワーキングメモリ(-1.95)で強い障害が認められた(図 2)。

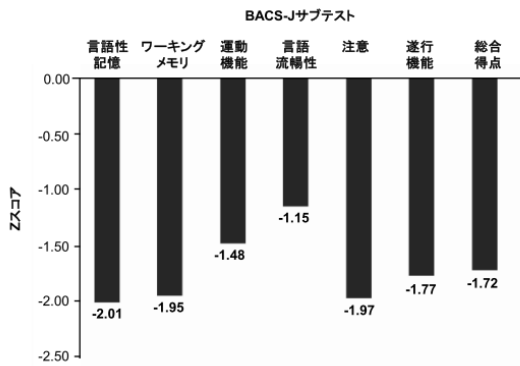


図 2 統合失調症患者における BACS-J 各テストの結果(健常者の得点を基準とする)

次に統合失調症患者と健常者について、*HPS4* の遺伝子多型(rs4822724、rs61276843、rs9608491、rs713998、rs2014410)と BACS-J サブテストの結果との関連を、3 種類の遺伝モデル(優性・劣性・相加)に基づき解析した。統合失調症患者においては、優性遺伝モデルで rs713998 多型と遂行機能の間に有意な関連が認められ、A アレル保有者は G/G 保有者に比べ高い遂行機能を示した($P = 0.0073$ 、図 3)。健常者においては、劣性遺伝モデルで rs9608491 及び rs713998 とワーキングメモリとの間に関連が認められた(rs9608491: $P = 0.001$ 、rs713998: $P = 0.0065$ 、図 4、5)。rs9608491 多型では T アレル保有者に比べ C/C 保有者が高いワーキングメモリを示し、rs713998 多型では A/A 保有者に比べ G アレル保有者が高いワーキングメモリを示した。さらにハプロタイプ解析を行った結果、健常者において 2 種類のハプロタイプがワーキングメモリと有意な関連を示した(rs9608491-713998: $P = 0.0025$ 、rs61276843-9608491-713998: $P = 0.0064$)。遺伝子多型と病前 IQ および PANSS スコア(陽性尺度、陰性尺度、総合精神病理尺度)の間には有意な関連は認められなかった($P >$

0.05)。

本研究により、*HPS4* 遺伝子が統合失調症患者の遂行機能、および健常者のワーキングメモリと関連することが明らかになった。統合失調症患者の遂行機能及び健常者のワーキングメモリに影響を与える rs713998 はアミノ酸塩基置換を伴う多型(p.G229E)であることから、このアミノ酸の周辺部位が *HPS4* の分子機能に重要である可能性が示唆される。

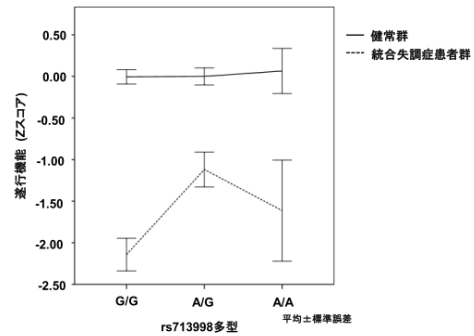


図 3 rs713998 多型と遂行機能

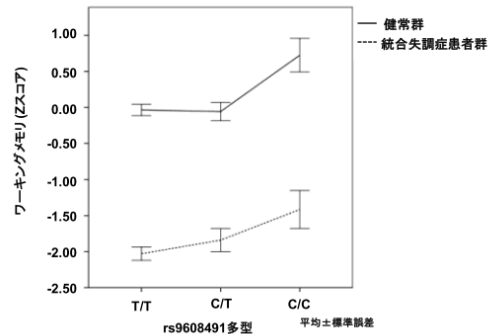


図 4 rs9608491 多型とワーキングメモリ

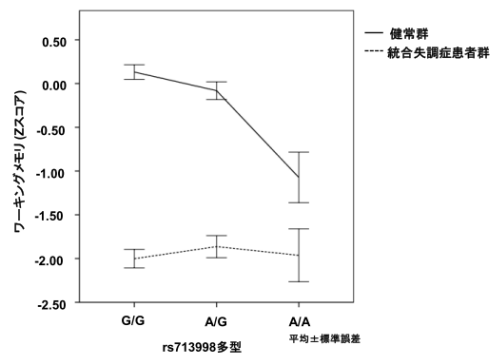


図 5 rs713998 多型とワーキングメモリ

(2) *HPS4* 遺伝子多型と発現量の関連解析

健常者においてワーキングメモリとの有意な関連が認められた rs9608491 は、*HPS4* 遺伝子のイントロン 4 に位置する。rs9608491 多型が *HPS4* 遺伝子発現量に与える影響を調

べるために、健常者および統合失調症患者末梢血由来 cDNA を用いて定量的 RT-PCR 法による発現量解析を行った。健常者、統合失調症患者ともに rs9608491 多型と *HPS4* の発現量の間には有意な関連は認められなかった ($P > 0.05$)。また他の *HPS4* 遺伝子多型 (rs4822724、rs61276843、rs713998、rs2014410) についても、*HPS4* 遺伝子発現量との間に有意な関連は認められなかった。

(3) *HPS4* 遺伝子のマウス脳組織学的解析

HPS・統合失調症併発家族例で同定されたナンセンス変異と類似した変異を持つマウスとして、コンジェニック系統である light ear (le) マウスが報告されている。le マウスは *HPS4* タンパク質の N 端側ドメイン (longin ドメイン) をコードする配列にナンセンス変異を持つと共に、*Hps4* 遺伝子近傍 (約 1.6 cM) の *Pde6b* 遺伝子にも変異を持つ。*Pde6b* 遺伝子変異は網膜変性を引き起こすため、le マウスを行動実験や神経系の組織学的解析に用いることは困難であった。本研究では le マウスを神経科学的解析に用いることができるようにするため、le マウスのヘテロ接合体をインタークロスし、*Hps4* 遺伝子にのみ変異を持つ分離個体を作成した。また、野生型マウスの全脳に対して in situ ハイブリダイゼーション法を行い、*Hps4* 遺伝子の組織学的解析を行った。*Hps4* 遺伝子は海馬の CA1、CA3 錐体細胞層および内側手綱核において特異的な発現が認められた。本研究は、獨協医科大学動物実験員会の承認を得たうえで実施した。

認知機能解析で用いた遂行機能課題 (ロンドン塔検査) は空間記憶との関連が示唆されていること、空間記憶に関連する海馬領域で *Hps4* 遺伝子の発現が認められたことより、本遺伝子が空間記憶に関連する認知機能に対して影響を与える可能性が示唆される。今後は、海馬等に発現する *Hps4* 遺伝子の認知機能に対する影響を評価するために le マウスを用いた解析を進めることを検討している。

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 2 件)

Kuratomi G, Saito A, Ozeki Y, Watanabe T, Fujii K, Shimoda K, Inukai T, Mori H, Ohmori K, Akiyama K. Association of the Hermansky-Pudlak syndrome type 4 (HPS4) gene variants with cognitive function in patients with schizophrenia and healthy subjects. BMC Psychiatry. 13:276. 2013. 査読有 DOI: 10.1186/1471-244X-13-276

Saito A, Kuratomi G, Ito C, Matsuoka H, Suzuki T, Ozeki Y, Watanabe T, Fujii K, Shimoda K, Fukushima Y, Inukai T,

Ohmori K, Akiyama K. An association study of the Hermansky-Pudlak syndrome type 4 gene in schizophrenic patients. Psychiatr Genet. 23(4):163-73. 2013. 査読有 DOI: 10.1097/YPG.0b013e32836130a9

[学会発表] (計 6 件)

Kuratomi G. Association of genetic variants in the HPS4 gene with cognitive function in schizophrenia patients and healthy subjects. Neuroscience 2013. San Diego. Nov. 11, 2013.

Akiyama K. Cognitive function assessment with BACS-J and PANSS in Japanese schizophrenia patients. 11th World congress of biological psychiatry. Kyoto. Jun. 26, 2013.

Kuratomi G. Effect of the HPS4 gene polymorphism on working memory and executive function in schizophrenia patients. Neuroscience 2012. New Orleans. Oct. 17, 2012.

秋山一文、統合失調症の認知機能障害とドーパミンレセプター多型との関係。第 34 回日本生物学的精神医学会、神戸、2012 年 9 月 30 日

Kuratomi G. Association study of HPS4 gene polymorphism with cognitive function in schizophrenia. Washington, DC. Nov. 13, 2011.

倉富剛、小胞輸送関連遺伝子 HPS4 と統合失調症の関連研究及び認知機能への影響。第 33 回日本生物学的精神医学会、東京、2011 年 5 月 22 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉富 剛 (KURATOMI, Go)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00593592