

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860916

研究課題名(和文) 精神異常発現薬応答性非翻訳RNAと発達依存性に着目した統合失調症の解明

研究課題名(英文) Association study of schizophrenia focusing on schizophrenomimetics responsive non-coding RNAs and development dependent

研究代表者

治徳 大介 (Jitoku, Daisuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10613854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、統合失調症様症状を誘発するグルタミン酸受容体遮断薬に応答する非翻訳RNAに注目し、これらのターゲット遺伝子について日本人健常者2000人と統合失調症患者2000人の末梢血から得られたゲノムDNAを用いて解析した。その結果、コラーゲン関連遺伝子であるCOL4A4遺伝子と統合失調症好発年齢である16-25歳発症の統合失調症患者との有意な関連が示された。今後、COL4A4遺伝子を含むシグナル伝達機構の解明が統合失調症の病態理解に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We focused on microRNAs responding to schizophrenomimetic glutamate receptor antagonist and examined their target genes. The subjects were a Japanese cohort (2,000 patients with schizophrenia and 2,000 control subjects). As the result, we detected a significant association between COL4A4 gene and subjects with schizophrenia which developed from 16 to 25 years old. The present findings suggest that modification of the COL4A4 gene signaling pathway warrants further study in terms of the pathophysiology of schizophrenia.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 遺伝子研究 コラーゲン マイクロRNA

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、思春期以降に好発し、幻覚・妄想・無為・自閉などを主体とした遺伝基盤の関与が強く疑われる疾患である。有病率が約 1%と比較的頻度の高い疾患であるにもかかわらず、既存の抗精神病薬では治療抵抗性の症状の残存がみられ、長期予後不良となる場合や社会復帰が困難となる場合が少なくない。統合失調症に関連する年間医療費は 8500 億円以上、経済損失は 3~4 兆円にのぼるとも言われており、新規治療薬の開発及び薬物反応性予測法の開発が社会的要請としても喫緊の課題と考えられる。統合失調症の少なくとも一部においてはグルタミン酸 NMDA 受容体機能低下が推定されており、ヒトにおいて統合失調症様症状を誘発するフェンサイクリジン (PCP) はこの NMDA 受容体のアンタゴニストとして作用する。これまで本申請者は、統合失調症の原因に関わる分子機構のひとつとして、ミエリン・グリア関連タンパクおよび NMDA 受容体シグナル系を解析してきた。当研究室では、マイクロアレイを用いて、PCP 投与ラットの脳皮質で誘導される遺伝子のうち、統合失調症の好発年齢に相当するラットの臨界期以後のみに発現が著明に上昇する遺伝子産物を調べ、*prt6* (*PCP responsive transcript 6*) を同定した。このラットの *prt6* とヒトでの相同領域の双方に共通して、非コード RNA である二つのマイクロ RNA の配列が含まれていた。マイクロ RNA は、複数の標的遺伝子の発現を抑制するが、統合失調症の発症には非常に多くの疾患脆弱性遺伝子が関与するという複雑遺伝疾患モデルとも矛盾しない。さらに、脳内に発現するマイクロ RNA は、神経分化やシナプソームの局在やシナプス可塑性など、統合失調症との関連が示唆される機能に関わる。最近、ヒト死後脳発現研究で統合失調症とマイクロ RNA との関連の報告が相次いでいる (Proc Natl Acad Sci USA 2011;108:4447-4452, Biol Psychiatry 2011;69:180-187)。そのような中、*prt6* 内に位置するマイクロ RNA についても、ヒト死後脳での有意な発現の上昇が報告され、そのターゲット遺伝子の一部は NMDA 受容体の複数のサブユニットをコードする遺伝子 (*GRIN1A*, *GLIN2A*, *GLIN2B*) やドーパミン受容体をコードする遺伝子 (*DRD1*) などと強い相互作用を認めた (Schizophr Res 2010;124:183-191)。

本研究は *prt6* 内のマイクロ RNA の標的遺伝子を統合失調症との遺伝的関連という面から調べることにある。我々は、ラットのマイクロアレイデータの結果と標的遺伝子予測プログラムを組み合わせることで、マイクロ RNA の標的遺伝子として抽出された遺伝子について統合失調症との遺伝子関連研究を行ってきた。*Prt6*、ヒストン関連遺伝子である H-z、翻訳調節に関わるポリ A 関連タンパクをコードする Pst1

(PCP-suppression transcript 1) に関して、関連解析を行い、H-z 遺伝子と統合失調症との関連を示した (申請者の H24 若手研究 (B) 採択課題)。

このマイクロ RNA の標的遺伝子はこれら二遺伝子のほかにも複数ある。ノルアドレナリントランスポーターをコードする *Slc6a2* (Solute carrier family 6, member 2)、翻訳調節に関わる *Npas4* (Neuronal PAS domain protein 4)、コラーゲン関連タンパクである *Col4a4* (Collagen, Type IV, Alpha-4) は、いずれも機能的な側面から統合失調症と関連が疑われる。*Slc6a2* のヒト相同遺伝子である *SLC6A2* は、統合失調症や双極性障害のヒト死後脳で発現量の変化を認める (The Stanley Medical Research Institute Online Genomics Database)。さらに、統合失調症の連鎖領域に位置する (Am J Hum Genet 2003;73:34-48)。*Npas4* のヒト相同遺伝子である *NPAS4* は、神経発達や抑制性シナプスの調節に関わっており、ノックアウトマウスでは、統合失調症様行動が見られる (PloS One 2012;7:e46604)。さらに、同じ neuronal PAS domain protein である *NPAS3* は、複数の報告で統合失調症との関連が強く示唆されている (Schizophr Res 2010;120:143-149, Schizophr Bull 2013;39:396-406)。*Col4a4* のヒト相同遺伝子である *COL4A4* は 2 番染色体に存在し、統合失調症で行われたメタ解析により有意な関連が報告された領域に含まれる。これらのことから *Prt6* 内のマイクロ RNA の標的遺伝子である *SLC6A2*, *NPAS4*, *COL4A4* 遺伝子は、いずれも統合失調症との遺伝的関連が推察され、統合失調症の治療ターゲットやバイオマーカーになりうる可能性がある。

そこで本研究では、ヒト血液 DNA サンプルを用いて、これらの遺伝子と統合失調症との関連を調べることとした。

### 2. 研究の目的

本研究は、統合失調症の発症やグルタミン酸受容体遮断薬による統合失調症様症状の誘発が発達依存的である (神経発達の臨界期以後である) ことに着目して、我々が同定したマイクロ RNA のターゲット遺伝子である *SLC6A2*, *NPAS4*, *COL4A4* 遺伝子について遺伝子関連解析を行うことを目的としている。

### 3. 研究の方法

対象は、DSM-III-R あるいは DSM-IV に基づいて統合失調症と診断された日本人統合失調症患者群と対照群で、その血液 DNA サンプルを用いた。統合失調症群 2000 名、対照群 2000 名からなる大規模症例対照サンプルを用いた。

SNP 選択に関しては、*SLC6A2*, *NPAS4*, *COL4A4* のヒト相同領域およびその周辺領域について、国際 HapMap データベースおよび Carlson らの方法 (Am J Hum Genet

2004;74:106-120) を用いて,  $r^2$  (連鎖不平衡の指標) が常に高い tagSNP を求めることでジェノタイプすべき SNP を過不足なく選択した。

遺伝子型解析は, 遺伝子多型自動解析装置 (ABI 7900HT) を用い, 遺伝子断片の増幅 (PCR) を行った。遺伝子型判定は Taqman アッセイ (Applied Biosystems 社) により行った。

遺伝統計解析は, PLINK program を用いて, アレルテストやハプロタイプテストをおこなった。

なお, 本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて本学医学部附属病院と理化学研究所における遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の審査ならびに承認を受けている。また, 文書および口頭による説明および文書による同意とその撤回を含んだインフォームドコンセントの確立および人権への配慮を十分に行った。

#### 4. 研究成果

いずれの遺伝子においても, 疾患/対照群の間に allele 頻度, genotype 頻度, ハプロタイプ頻度の有意な差は見られなかった。

性別・発症年齢別解析を行ったところ, COL4A4 で, 「男性・16~25 歳」群で SNP-11 [ Allelic P = 0.003 ( permutation P = 0.046) ], 「女性・15 歳以下」群で SNP-17 [ Allelic P = 0.001 ( permutation P = 0.020) ], 「女性・16~25 歳」群で SNP-7 [ Genotypic P = 0.003 ( permutation P = 0.049) ] と SNP-8 [ Genotypic P = 0.002 ( permutation P = 0.029) ] と SNP-9 [ Genotypic P = 0.001 ( permutation P = 0.021) ] で有意差を認めた。これらは多重検定補正後も有意な関連を認めた。

COL4A4 は IV 型コラーゲンのサブユニットの一つをコードしている。IV 型コラーゲンは各種臓器における細胞基底膜の主要構成成分と考えられる。細胞基底膜は, 組織構造維持の足場, 物質の選択的透過のための障壁だけでなく, 細胞の極性形成・代謝・生存・増殖・分化・移動などの機能とも深く関わっている。COL4A4 は, 脳において脈絡叢上皮基底膜に高い発現が認められている。腎系球体 (血液-尿関門を構成), 肺胞 (血液-空気関門を構成) の基底膜にも特徴的に発現し, COL4A4 の変異によりアルポート症候群などの疾患を引き起こすことから, 中枢神経系においては, 血液-脳関門および血液-髄液関門機能との関連が示唆される。統合失調症患者の脈絡叢において, D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) の発現量の上昇が報告されている。DAO により代謝される D-アミノ酸のひとつである D-セリンは, NMDA 型グルタミン酸受容体の機能を促進する選択的アゴニストであるため, D-セリン系の異常と精神神経疾患との関連が疑われ, 今までに多くの研究が行われてきた。これらのことから, 統

合失調症の発症には COL4A4 が関与する脳脈絡叢を含む細胞基底膜機能の脆弱性が関与する一群が存在する可能性が推測される。

また, 本研究で, 統合失調症好発年齢である 16-25 歳発症の女性患者で有意な関連を示した SNP-7, 8 は, CTCF binding site の存在が推測された領域にある SNPs である。そのため, この領域における機能変異が転写調節に何らかの影響を与えているのかもしれない。

上記の結果をまとめると, コラーゲン関連遺伝子である COL4A4 遺伝子と統合失調症好発年齢である 16-25 歳発症の統合失調症患者との有意な関連が示された。今後, COL4A4 遺伝子を含むシグナル伝達機構の解明が統合失調症の病態理解に寄与する可能性がある。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

治徳 大介 (Jitoku Daisuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 10613854

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：