

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791202

研究課題名(和文) 精神異常発現薬応答性非翻訳RNAとそのターゲット遺伝子に着目した統合失調症の解明

研究課題名(英文) Association study of schizophrenia by focusing on non-coding RNAs and their target genes responding to psychotomimetic drugs.

研究代表者

治徳 大介 (Jitoku, Daisuke)

東京医科歯科大学・医歯(薬)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) 3,300,000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、ヒストン関連遺伝子であるH-Z遺伝子と男性統合失調症患者との有意な関連が示唆された。今後、H-Z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 H-Z gene (histone-associated gene) and the male patients with schizophrenia. The present findings suggest that modification of the H-Z 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：遺伝子研究 統合失調症 ヒストン 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 投与ラットの大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、神経分化やシナプト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 とそ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。ラットのマイクロアレイデータの結果とターゲット遺伝子予測プログラムを組み合わせ、ヒストン関連遺伝子である H2AFZ と翻訳調節に関わるポリ A 関連タンパクをコードする PST (*PCP-suppression transcript*) の二遺伝子をマイクロ RNA の標的遺伝子として抽出した。両遺伝子とも核内タンパクをコードする遺伝子である。H2AFZ はクロマチンリモデリングに関わるが、複数の統合失調症の全ゲノム関連解析で、クロマチンリモデリングに関わるヒストン関連遺伝子群が位置する領域で強い関連を認めている (Nature 2009;460:744-747, Nature 2009;460:748-752, Nature 2009;460:753-757)。また、これらの遺伝子のヒト相同遺伝子である H2AFZ と PST の発現は、統合失調症や双極性障害のヒト死後脳で低下している (The Stanley Medical Research Institute Online Genomics Database)。さらに、PST は、統合失調症の連鎖領域に位置する (Am J Hum Genet 2003;73:34-48)。これらのことから PRT6 内のマイクロ RNA のターゲット遺伝子で核内タンパクをコードする H2AFZ、PST は、いずれも統合失調症との遺伝的関連が推察される。このように、PRT6 内のマイクロ RNA やその標的遺伝子は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、PRT6 のヒト相同領域およびそのターゲット遺伝子である H2AFZ 遺伝子と PST 遺伝子が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、我々が同定した遺伝子 (PRT6 遺伝子) および PRT6 遺伝子に含まれたマイクロ RNA のターゲット遺伝子である H2AFZ 遺伝子、PST 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。本研究は二段階のステージに分けて行うこととした。まずは予備実験として統合失調症群 160 名、感情障害群 104 名、

対照群 160 名からなる症例対照サンプルを用いた。その後、本実験として統合失調症群 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、PRT6、H2AFZ、PST1 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

PRT6 遺伝子には tagSNP が存在せず、SNPs を用いた関連解析が困難であった。そこで、解析対象は H2AFZ 遺伝子と PST 遺伝子のみとした。まず、日本人健常者 160 人と統合失調症患者 160 人の末梢血から得られたゲノム DNA を用いて、H2AFZ 遺伝子の 4 箇所の SNPs と PST1 遺伝子の 8 箇所の SNPs について関連解析を行ったが、関連を示唆する結果は得られなかった。これはサンプル規模が小さいことによる検出力の低下に基づくものが考えられた。

次に、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 H2AFZ 遺伝子の関連解析を行った。疾患/対照群の間に allele 頻度、genotype 頻度の有意な差は見られなかったが、性別解析を行ったところ、SNP02 は男性における統合失調症との有意な関連を認めた (allelic $P=0.003$ 、genotypic $P=0.008$)。これらの関連は多重検定補正後も有意であった。

また、ハプロタイプ解析では、SNP02 を含むハプロタイプと男性統合失調症患者群との関連が有意であった (P

$=0.018$)。この関連も多重検定補正後も有意であった。

一方、いずれの解析においても女性統合失調症患者群との関連は認められなかった。

さらに、発症年齢別解析を行ったが、関連を認めなかった。

SNP02 は H2AFZ 遺伝子のイントロン 3 に位置し、その機能は明らかでないが、イントロン SNP の変異が転写活性に影響を与えることが最近報告されている。さらに、スタンレー研究所の死後脳データベースでは、H2AFZ 遺伝子の発現が統合失調症患者で低下傾向にある。そのため、SNP02、あるいは SNP02 と連鎖不平衡にある他の変異が遺伝子の転写調節や機能に影響を与えているのかもしれない。

H2AFZ は変異ヒストンの一種で、ゲノム中の多くの遺伝子の 5' 端に結合して、遺伝子発現を調整する。H2AFZ のアセチル化は遺伝子発現を促進し、H2AFZ のユビキチン化は遺伝子発現を抑制する。H2AFZ は多くの遺伝子やパスウェイに影響を与えており、多くの遺伝子やパスウェイが関与するとされる統合失調症の病態仮説と矛盾しない。また、統合失調症の GWAS (Genome Wide Association Study) のメタアナリシスでは、H2AFZ 近接の遺伝子である *HIST1H2AH* (histone cluster 1, *H2ah: a member of the histone H2A family gene*) で有意な関連が報告されている。

さらに、H2AFZ を含むヒストンの脱アセチル化酵素 (HDAC1) の発現が統合失調症患者の前頭前野で増加しており、HDAC1 を海馬で強制発現させたマウスの PPI は低下しているという報告もある。これらのことは、ヒストンの調節障害が統合失調症に関与している可能性を示唆しているのかもしれない。

上記の結果をまとめると、ヒストン関連遺伝子である H2AFZ 遺伝子と男性における統合失調症との関連が示唆された。今後、H2AFZ 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 1 件)

Jitoku D, Yamamoto N, Iwayama Y, Toyota T, Miyagi M, Enokida T, Tasaka Y, Umino M, Umino A, Uezato A, Iwata Y,

Suzuki K, Kikuchi M, Hashimoto T, Kanahara N, Kurumaji A, Yoshikawa T, Nishikawa T. Association study of H2AFZ with schizophrenia in a Japanese case-control sample. Journal of Neural Transmission、

査読有り、Vol.11、P.1-9.

〔学会発表〕(計 2 件)
1. Daisuke Jitoku, Naoki Yamamoto, Yoshimi Iwayama, Masakazu Umino, Asami Umino, Akihito Uezato, Akeo Kurumaji, Takeo Yoshikawa, and Toru Nishikawa. Association study of H2AFZ with schizophrenia in a Japanese case-control sample. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology、2014年06月22日~2014年06月26日、バンクーバー。

2. 治徳 大介, 山本 直樹, 岩山 佳美, 上里 彰仁, 吉川 武男, 車地 暁生, 西川 徹. H2AFZ 遺伝子と統合失調症との遺伝子関連研究. 第36回日本生物学的精神医学会 / 第57回日本神経化学会大会 合同年会、2014年09月29日~2014年10月01日、奈良。

〔図書〕(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 精神行動医科学分野
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：