

機関番号：14501

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790838

研究課題名（和文） 死後脳研究に基づいた統合失調症候補遺伝子の同定

研究課題名（英文） Explore of schizophrenia susceptible genes based on the findings in postmortem study

研究代表者 福武 将映（FUKUTAKE MASAOKI）

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80457085

研究成果の概要（和文）：統合失調症がその病態の基底にもつ生物学的な脆弱性に着目し、その疾患感受性を担う遺伝子変異の同定を試みた。神経発達障害仮説などの従来の仮説に基づいた標的遺伝子の探索に加えて、従来の視点とは異なる手法として大規模な遺伝子発現プロファイリングが可能である DNA chip を統合失調症死後脳に用い、その結果を基に相関解析を行った。その結果、いくつかの遺伝子多型において統合失調症との相関が見出された。

研究成果の概要（英文）：Focusing on the biological vulnerability on which the pathogenesis of schizophrenia have been considered to be based, we have explored the genetic variants of schizophrenia susceptible genes. We have conducted association analysis of the interest genetic variants with schizophrenia based on the hypothesis such as the neurodevelopment model of schizophrenia. In addition, we have approached the subject from another perspective to identify the novel schizophrenia susceptible genetic variants using DNA microarray experiments to the postmortem study of schizophrenia, and based on the findings of the microarray analysis, we have conducted further association analysis. As a result, we have identified several important genetic variants associated with schizophrenia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：統合失調症、気分障害

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、自殺、相関研究、遺伝子多型、SNP、ハプロタイプ

1. 研究開始当初の背景

ここ数十年の研究成果により、統合失調症の病態に関与する生物学的変異の知見が数多く集積されつつある。統合失調症の病因検索

において、死後脳を用いた研究は最も直接的な方法であり、これまでに、抗精神病薬の作用機序の視点からドパミンなどの神経伝達系や、また近年では、神経発達障害仮説から

グルタミン酸系神経伝達など、統合失調症脳における分子生化学的変化が明らかにされてきた。一方、近年になって分子遺伝学的アプローチからの研究も盛んに行われるようになり、統合失調症のような複合遺伝子疾患においてもその疾患感受性を担う遺伝子変異の同定を目指した研究がなされ一定の成果をあげている。しかし、統合失調症における相関研究の有意な結果はその多くがオッズ比が 1.2~1.3 といった低い関与に留まっており、いまだその病態や病因を十分に解明するに至るほどの確定的な知見は得られていないといえる。そのため、より幅広い視点、すなわち、従来の仮説や病因論から導かれるような、病態に機能的に関与する分子に着目するだけではなく、全く別の視点からのアプローチの有用性が確立されつつある。その中に、大規模なヒトゲノム情報を基にした DNA chip 解析を統合失調症死後脳に用い、未知の病因変異を検索するという手法がある。また、疾患家系を中心とした linkage study などの遺伝統計学的解析からの染色体上の疾患関連領域の同定である positional cloning も、同様の意味でその有用性が明らかにされてきている。

2. 研究の目的

(1) これまでに当教室がおこなってきた統合失調症死後脳前頭前野を用いた DNA chip 解析の結果に基づき、統合失調症に特異的に発現変化のみられる遺伝子を同定し、それらの遺伝子における変異（一塩基多型 single nucleotide polymorphisms: SNPs）に着目して、統合失調症患者および正常対照者の血液サンプルを用いた相関解析により分子遺伝学的検討を行う。また、相関解析（association analysis）により有意差が同定された遺伝子について、統合失調症死後脳での脳内発現を調べ、統合失調症における変化を検証する。その他、これまでの統合失調症の分子遺伝学的、生化学的研究により得られた知見や仮説をもとに候補遺伝子を絞り込み、その遺伝子変異と統合失調症との関連を相関研究を用いて検証をする。

(2) また、統合失調症では一般人口よりも自殺関連行動が多いことが報告されているが、ストレスおよび自殺既遂と関連する遺伝子変異にも着目し、同じく相関解析を用いた自殺既遂群と正常対照群との統計学的比較により、自殺への感受性を担う遺伝子変異の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 統合失調症死後脳前頭前野を用いた DNA chip 解析の結果、統合失調症において発現の増加および減少が確認された遺伝子の中から、meta-analysis によって疾患関連領域と

考えられているいくつかの遺伝子座に存在する遺伝子に着目する。それら複数の遺伝子内および周辺に存在する一塩基多型 (SNPs) をマーカーとし、統合失調症患者と正常対照者の各血液サンプルから得られた DNA を用いて、Taqman 法および PCR-RFLP 法による genotyping を行う。得られた結果を統計学的に解析し、統合失調症候補遺伝子または疾患候補遺伝子多型としての可能性を検討する。また、統合失調症の死後脳を用いて、Western Blotting 法により候補遺伝子の免疫定量を行い、統合失調症に特異的な発現変化の有無を調べる。

さらに、その他の統合失調症候補遺伝子に関しても、同様に複数の SNPs に着目してタイピングを行い、それらの遺伝子多型と統合失調症との相関の有無を検証する。

(2) ストレスおよび自殺関連遺伝子についても同様に、SNPs に着目してタイピングを行い、自殺既遂群と健常正常群との間の有意差の有無を統計学的に検証する。

4. 研究成果

(1) 統合失調症死後脳前頭前野を用いた DNA chip 解析

統合失調症死後脳前頭前野において DNA マイクロアレイを用いて発現の増加および減少が確認された遺伝子のうち、グルタミン酸神経系の情報伝達に関わる Kruppel-like factor 5 (KLF5) 遺伝子に存在する多型が統合失調症と関連があることを見出し、死後脳海馬におけるその発現に変化がみられることを確認した。また、同様に DNA マイクロアレイにおける死後脳発現に変化のみられた遺伝子について、統合失調症群 339 名および正常対照群 358 名の血液サンプルを用いて相関解析を行った結果、染色体 8p21 に位置し、細胞間接着や蛋白分解など多彩な機能に関与していると推測される A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) ファミリーの一つである ADAM7 をコードする遺伝子について、その遺伝子内に存在するアミノ酸置換を伴う 1 つの多型と統合失調症との間に有意な相関が確認された。上記の多型を含めて複数箇所のアミノ酸置換を伴う多型について遺伝子多型解析を行った結果、統合失調症群と正常対照群で有意差が認められたのは上述の一箇所の多型のみであった。この遺伝子に関しては、Haploview ソフトウェアによる tag SNPs の絞り込みから、上記以外の遺伝子多型を用いてさらなる相関の有無を現在解析中である。

(2) TPH1/TPH2 遺伝子多型と統合失調症との相関研究

統合失調症の病態にセロトニンの関与が示唆され、様々な研究が報告されている。

Tryptophan hydroxylase (TPH) はセロトニン合成の律速酵素であり、その機能不全は自殺行動や精神障害と関連があるといわれている。TPH には TPH1/TPH2 の 2 種類のアイソフォームが存在するが、脳内では TPH2 の発現が TPH1 よりも高いことが報告されている。今回の研究では、TPH2 遺伝子について Haploview ソフトウェアを用いて 15 個の tag SNP を選定し、720 人の日本人サンプルを用いて（正常対照群 377 名、統合失調症群 343 名）統合失調症との相関を調べたが、個々の SNP について、またハプロタイプについても両群での統計学的有意差は認められなかった。

(3) 神経型一酸化窒素合成酵素 NOS1 遺伝子多型と統合失調症との相関研究

一酸化窒素(Nitric Oxide:NO)は、NMDA 受容体の下流において機能するが、その合成酵素のうち、中枢神経系で多く発現している神経型一酸化窒素合成酵素(NOS1)に着目した。相関の既報告があり、エクソン 1c のプロモータ領域に存在する G-84A(rs41279104)を含めた 7 つの SNPs について 720 人の日本人サンプルを用いて（正常対照群 377 名、統合失調症群 343 名）統合失調症との相関を調べた。その結果、G-84A 多型と統合失調症との間に有意な相関が見出された(genotype p value:0.0013, allele p value:0.0011(補正後 p=0.006))。また、男女別で解析した結果、同多型に関して、女性において有意差が見出された(genotype p value:0.0019, allele p value:0.0017(補正後 p=0.008))。さらに、死後脳を用いた蛋白発現解析により、この多型の A アレル保有者は A アレル非保有者と比べて NOS1 蛋白発現量が低下していることが示された(p=0.002)。

また A アレル保有者の発症時期が A アレル非保有者よりもより早期であった(p=0.018)。以上のように、統合失調症においては女性患者の特に早期発症群で、NOS1 遺伝子のプロモーター上の機能的一塩基多型との相関を認め、またこの一塩基多型はヒト死後脳における NOS1 蛋白発現とも有意な関連があることが確認された。

(4) ストレスおよび自殺関連遺伝子の相関研究

①FKBP5 遺伝子多型と自殺との相関

視床下部-下垂体-副腎皮質系(hypothalamic-pituitary-adrenal axis:HPA axis)の亢進と気分障害および自殺との関連が報告されている。HPA 系はグルココルチコイド受容体(GR)およびミネラルコルチコイド受容体(MR)を介したネガティブフィードバック機構により制御されているが、この GR の感受性を heat shock protein 90 (Hsp90)

のコ・シャペロンである immunophilin FK506 binding protein 5 (FKBP5) が制御していることが近年明らかにされてきた。以上より GR、MR をコードする遺伝子(各々 NR3C1 遺伝子、NR3C2 遺伝子)および FKBP5 遺伝子における変異が HPA 系の反応性に影響し、自殺における同系の亢進を惹起する可能性を考え、それらの遺伝子多型と自殺既遂との相関研究を行った。219 名の自殺既遂者と 228 名の正常対照群を用いて、FKBP5 遺伝子の 3 多型、NR3C1 遺伝子の 2 多型、NR3C2 遺伝子の 3 多型のタイピングを行ったが、両群間で有意差は認めなかった。しかしながら、ハプロタイプ解析では FKBP5 遺伝子の 2 つの多型から成るハプロタイプと自殺との相関が確認された。

②EP1 遺伝子多型と自殺との相関

動物実験においてプロスタグランジン E2 type1 (EP1) がマウスの衝動性・攻撃性に関与していることが報告されている。今回の研究では EP1 遺伝子と自殺との相関を調べるため、エクソン 2 に存在する 5 つの SNP およびプロモータ領域と推定される部位の 4 つの SNP について、287 名の自殺既遂群と 374 名の正常対照群の日本人サンプルを用いて相関の有無を検証した。その結果、プロモータ領域の 4 つの SNP のハプロタイプと女性の自殺既遂群に有意な相関が確認されたが、全体ではジェノタイプ、アレル、ハプロタイプ各々について両群間で有意差は見出されなかった。今回の結果からは、EP1 遺伝子多型と自殺既遂との相関は限定的であることが示唆された。

③その他の遺伝子多型と自殺との相関研究

自殺にはアルコール乱用、依存症の合併が高頻度に認められる。アジア人で認められる代謝酵素の多型は、アルコール依存症の発症に関与することが知られており、アルコール代謝に関わる ADH1B 遺伝子及び ALDH2 遺伝子における機能的多型と自殺との相関を検証した。その結果、ALDH2 遺伝子の非活性型遺伝子多型の頻度が男性自殺者で有意に低いこと、さらにアルコール依存症との関連が報告されている ADH1B 遺伝子の活性型遺伝子多型と ALDH2 遺伝子の活性型遺伝子多型の組み合わせが、男性自殺者で対照に比べ 10 倍高いことを見出した。このことは、飲酒行動にプロテクティブに働く遺伝子型は自殺のリスクが低いことを示している。これは自殺行動を制御するマーカーとして有用な可能性を示唆している。

また、上述の TPH2 に関して、自殺者においてはセロトニン神経系の生化学的な変化が報告されているが、TPH2 遺伝子と自殺との相関を解析した。15 の tag SNP を用い、ハプロタイプ解析を行ったが、有意な相関は認められなかった。

その他、自殺と相関が報告されている RGS2

遺伝子多型と不安障害との相関研究を行ったが、有意な相関は認められなかった。

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 14 件)

①Cui H, Supriyanto I, Sasada T, Shiroiwa K, Fukutake M, Shirakawa O, Asano M, Ueno Y, Nagasaki Y, Hishimoto A. Association study of EP1 gene polymorphisms with suicide completers in the Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. (査読有) 2011 Apr 3. [Epub ahead of print]

②Supriyanto I, Sasada T, Fukutake M, Asano M, Ueno Y, Nagasaki Y, Shirakawa O, Hishimoto A. Association of FKBP5 gene haplotypes with completed suicide in the Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. (査読有) 2011;35(1):252-6.

③Kyogoku C, Yanagi M, Nishimura K, Sugiyama D, Morinobu A, Fukutake M, Maeda K, Shirakawa O, Kuno T, Kumagai S. Association of calcineurin A gamma subunit (PPP3CC) and early growth response 3 (EGR3) gene polymorphisms with susceptibility to schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatry Res*. (査読有) 2011;185(1-2):16-9.

④Mouri K, Hishimoto A, Fukutake M, Nishiguchi N, Shirakawa O, Maeda K. Association study of RGS2 gene polymorphisms with panic disorder in Japanese. *Kobe J Med Sci*. (査読有) 2010;55(5):E116-21.

⑤Cui H, Nishiguchi N, Yanagi M, Fukutake M, Mouri K, Kitamura N, Hashimoto T, Shirakawa O, Hishimoto A. A putative cis-acting polymorphism in the NOS1 gene is associated with schizophrenia and NOS1 immunoreactivity in the postmortem brain. *Schizophr Res*. (査読有) 2010;121(1-3):172-8.

⑥Shiroiwa K, Hishimoto A, Mouri K, Fukutake M, Supriyanto I, Nishiguchi N, Shirakawa O. Common genetic variations in TPH1/TPH2 genes are not associated with schizophrenia in Japanese population. *Neurosci Lett*. (査読有)

2010;472(3):194-8.

⑦Hishimoto A, Fukutake M, Mouri K, Nagasaki Y, Asano M, Ueno Y, Nishiguchi N, Shirakawa O. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and risk for suicide: a preliminary observation in the Japanese male population. *Genes Brain Behav*. (査読有) 2010;9(5):498-502.

⑧福武将映、白川治. 生物学的視点からみた自殺. 自殺予防と危機介入. 2010. (査読無) 第30巻 第1号 84-91.

⑨Mouri K, Hishimoto A, Fukutake M, Shiroiwa K, Asano M, Nagasaki Y, Ueno Y, Shirakawa O, Nishiguchi N, Maeda K. TPH2 is not a susceptibility gene for suicide in Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. (査読有) 2009;33(8):1546-50.

⑩Takamatsu T, Hashimoto T, Taira M, Fukutake M, Maeda K. Scale for measuring self-recoverability in daily life for people with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. (査読有) 2009;63(3):277-82.

⑪菱本明豊、福武将映、山本泰司、毛利健太郎、白岩恭一、田中究、青山慎介、前田潔. 精神科外来における統合失調症患者に対する blonanserin の使用経験. 臨床精神薬理. (査読有) 2009, 12 (9), 1999-2009.

⑫Fukutake M, Hishimoto A, Nishiguchi N, Nushida H, Ueno Y, Shirakawa O, Maeda K. Association of alpha2A-adrenergic receptor gene polymorphism with susceptibility to suicide in Japanese females. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. (査読有) 2008;32(6):1428-33.

⑬Yanagi M, Hashimoto T, Kitamura N, Fukutake M, Komure O, Nishiguchi N, Kawamata T, Maeda K, Shirakawa O. Expression of Kruppel-like factor 5 gene in human brain and association of the gene with the susceptibility to schizophrenia. *Schizophr Res*. (査読有) 2008;100(1-3):291-301.

⑭Cui H, Nishiguchi N, Ivleva E, Yanagi M, Fukutake M, Nushida H, Ueno Y, Kitamura N, Maeda K, Shirakawa O. Association of RGS2 gene polymorphisms with suicide and increased RGS2 immunoreactivity in the

postmortem brain of suicide victims.
Neuropsychopharmacology. (査読有)
2008;33(7):1537-44.

〔学会発表〕(計1件)

① Hishimoto A, Sasada T, Fukutake M,
Shiroiwa K, Supriyanto I, Shirakawa O.
Association of FKBP5 gene haplotypes with
completed suicide in the Japanese
population. The 18th European Congress of
Psychiatry, March 15, 2011, Vienna (Austria)

② 菱本明豊、福武将映、その他、神経型一酸化窒素合成酵素 (NOS1) 遺伝子のシス活性を持つ一塩基多型は死後脳NOS1 免疫反応レベルと統合失調症に相関する、第 32 回日本生物学的精神医学会、2010 年 10 月 8 日、小倉

③ 福武将映、その他、精神科外来における統合失調症患者に対するblonanserinの使用経験、第 19 回日本臨床精神神経薬理学会、2009 年 11 月 13 日、京都

④ 毛利健太郎、福武将映、その他、RGS2 遺伝子多型とパニック障害との相関研究、第 31 回日本生物学的精神医学会、2009 年 4 月 25 日、京都

〔図書〕(計1件)

① 福武将映、菱本明豊、白川治、中山書店、
専門医のための精神科臨床リュミエール 29
自殺予防の基本戦略 III. 自殺の生物学的知見、2011、24-34

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福武 将映 (FUKUTAKE MASA AKI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80457085