

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791311

研究課題名(和文) 視床皮質神経回路の発達を制御する遺伝子の統合失調症関連解析および死後脳研究

研究課題名(英文) Genetic association and postmortem studies for genes regulating the development of thalamocortical circuit in schizophrenia

研究代表者

上里 彰仁 (UEZATO, Akihito)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90547449

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)：統合失調症と区別できない症状を誘発するphencyclidine(PCP)等のNMDA型グルタミン酸受容体遮断薬に対し、発達依存的に発現応答する遺伝子を疾患感受性遺伝子として同定した。本研究では統合失調症をはじめとする精神疾患を持つ患者のゲノムDNAを用いた遺伝子関連解析および死後脳を用いた発現解析を行った。当初研究対象としていた遺伝子であるLmod2では有意な所見は得られなかった。しかし同様の手法で同定した複数の遺伝子では、疾患との遺伝的関連および死後脳における発現変化が認められ、これらが疾患の発症過程に関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The NMDA-type glutamate receptor antagonists, such as phencyclidine (PCP), induce psychiatric symptoms indistinguishable from those of schizophrenia to healthy person. We have previously identified genes whose expression increase in response to PCP treatment in a development-dependent manner and positioned them as schizophrenia susceptibility genes (development-dependent PCP-responsive genes). In this study, we investigated genetic association of these genes with mental diseases using genome DNA and gene expression using postmortem brains. There were no significant findings for our originally targeted gene, Lmod2. However we found genetic association and altered gene expression for several other genes which were identified by the same method as development-dependent PCP-responsive genes, suggesting their involvement with the onset of mental diseases.

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：臨床精神分子遺伝学 統合失調症 死後脳 関連解析

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、主に思春期以降に1%前後の高率で発症する重大な障害であり、その発現機序の解明と治療法の開発が急務になっている。NMDA 受容体遮断薬である phencyclidine (PCP) は、陽性症状のみならず陰性症状・認知機能障害も引き起こし、統合失調症と区別しがたい精神病状態を出現させる。このことは統合失調症とグルタミン酸伝達異常の関連を強く示唆しており、現在までにグルタミン酸に関わる遺伝学・生化学・生理学から臨床研究・死後脳研究に至るまで広い分野で研究が行われている。

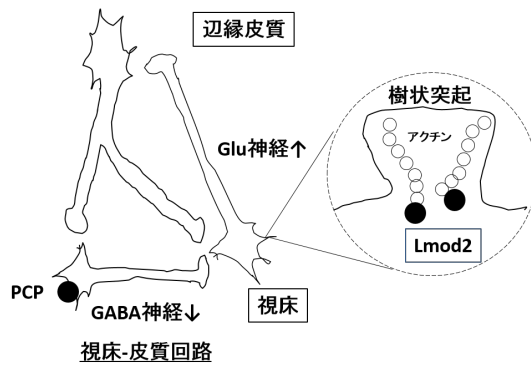
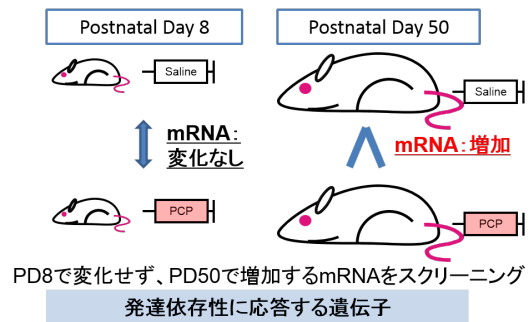
統合失調症は乳児期や小児期に発症することはほとんどない。更に興味深いことに、NMDA 受容体遮断薬の統合失調症様症状の誘発作用も乳児期や小児期に起こることは稀である。これは動物モデルでも同じことが示されている。これらのことから、統合失調症の症状発現には、脳の神経回路の基盤がある発達段階を終えている必要があること、すなわち発達依存的事であることが推測される。更に統合失調症に関連した神経回路や分子は、NMDA 受容体遮断薬に対して発達依存的な応答を示すことが推測され、その同定が病態解明に役立つことが期待される。我々はこのような概念のもと、PCP を投与したラットの皮質における mRNA を測定することにより、幼弱期ラットで応答せず成熟期ラットで応答する、すなわち発達依存的に PCP に応答する遺伝子をスクリーニングし、複数の遺伝子を同定して、精神疾患のリスク遺伝子として位置付けた。

### 2. 研究の目的

本研究では我々の同定した、PCP に発達依存的に応答し、発現がラット視床に局限する遺伝子 Lmod2 が統合失調症の病態と深く関連する可能性があることから、統合失調症患者の血液サンプルを用いて一塩基多型を利用し疾患との関連を解析すること、および死後脳を用いて遺伝子やタンパク質発現の変化を検索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではヒトに関して、(1)一塩基多型 (SNPs) を用いた統合失調症と Lmod2 遺伝子の関連解析、および(2)統合失調症死後脳を用いて Lmod2 遺伝子の発現解析を行う。



(1) Lmod2 遺伝子について NCBI データベースよりゲノムの構造や SNP の位置を取得し、対象とする SNP を選定する。タイピングには TaqMan SNP Genotyping Assay method を用い、アリル特異的蛍光は既に我々の研究室に装備されている ABI 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) によりを計測する。得られたデータについて統計ソフト SNPalyze を用いて統計解析を行う。Hardy-Weinberg 平衡の検定には 二乗検定を行い、遺伝子型および対立遺伝子頻度の検定には 二乗検定, Fisher's exact test, また SNP 間の連鎖不平衡解析には expectation-maximization algorithm を用いてハプロタイプ頻度より D' および r<sup>2</sup> を計算することにより行う。

(2) 統合失調症の死後脳を用いて in situ hybridization により Lmod2 遺伝子の mRNA 発現を解析する。研究の施行に当たっては、東京医科歯科大学の死後脳研究に関する倫理審査委員会の承認を得る。死後脳はスタンレー脳バンクおよびオーストラリアの脳バンクより提供される。In situ hybridization に用いるプローブは [35S]-UTP で放射線標識し、フィルムを感光させることにより放射線量を定量し、mRNA の発現量の解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) SNPs を用いた遺伝子関連解析  
Lmod2 について、統合失調症との関連を調べた。日本人の健常者 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、合計 16 か所の SNPs を利用して case-control study による関連解析を行った。

うち 8 か所の SNPs では日本人では多型が存在しないか、minor allele 頻度がごく低いことがわかった。残るいずれの SNP においても、疾患・対象群の間に genotype, allele, haplotype 頻度の優位な差は見られなかった。また、連鎖不平衡の解析により、今回解析した SNP は一つの haplotype block を形成していることがわかった。続いて、健常対照者 160 人と気分障害患者 104 人を比較したところ、疾患・対象群の間に genotype, allele, haplotype 頻度の優位な差は見られなかった。より多くのサンプルを用いた関連解析を行うため、合計数十例の健常対象者・統合失調症および気分障害患者より血液サンプル採取・DNA 抽出を行い、サンプル蓄積を継続した。

その間、同様の概念のもと発達依存的に PCP 発現応答を示す、NMDA 受容体の足場タンパクである SAP97 遺伝子について、統合失調症患者 393 例と健常対照者 393 例の血液ゲノムを用いて、一塩基多型を利用した関連解析を行った。SAP97 は性特異的に男性の統合失調症と遺伝的関連があることを示し、これは先行研究を再現するものであり、論文発表した。

また同様に、我々の同定した PAPST1 (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter 1) は NMDA 受容体のコ・アゴニストである細胞内 D-セリンの蓄積を抑制するが、他にリン酸化の基質である PAPS を輸送する機能を持つ。PAPS は還元され PAP となるが、双極性障害の治療薬であるリチウムは PAP phosphatase を抑制することが知られている。申請者は PAPST1 について、双極性障害との遺伝的関連を見出した。この成果について論文投稿準備中である。

## (2) 死後脳を用いた遺伝子発現解析

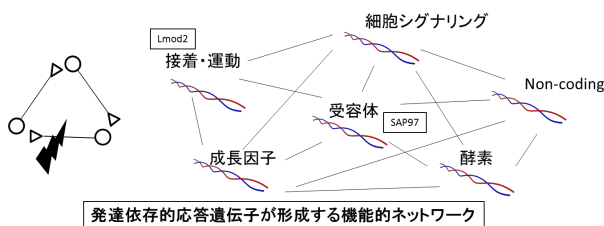
本研究ではヒト死後脳組織を取り扱うが、新たな組織を海外の死後脳バンク（オーストラリアブレインバンク）から本学に取り寄せて適正な研究を行うため、本学の倫理審査委員会が時間をかけて厳正に審査を行った結果、承認された。予備死後脳サンプルをオーストラリアブレインバンクより取り寄せ、Lmod2 mRNA の発現確認を行った。Lmod2 に特異的な DIG 標識 RNA プロブを用いて in situ hybridization を行ったが、動物実験で確認されていた視床部において、ヒト死後脳では Lmod2 mRNA の発現を確認することはできなかった。今後は引き続き、サンプルの品質やプロブの適性を調査した上で、in situ hybridization を再施行する。

その間、グルタミン酸神経伝達に関わる他の複数の遺伝子について、スタンレー脳バンクの前頭前皮質を用いて得られた遺伝子発現データの解析を行った。解析には quantitative RT-PCR を利用した。その結果、グルタミン酸受容体の足場タンパクに関わる遺伝子の発現が、統合失調症の特定の年齢

層で低下していることがわかった。この成果について現在論文投稿中である。

また申請者は上述の PAPST1 について双極性障害の死後脳における発現変化を見出した。発現変化は、患者のリチウムによる治療歴にも関連することが明らかになった。遺伝子関連解析の結果と合わせ、これらの所見から PAPST1 の、双極性障害におけるリン酸化過程と病態や治療との関連が推察され、学会発表し、現在論文投稿準備中である。

発達依存的に応答する遺伝子群は、さまざまな機能に分類され、下図のような機能的ネットワークを形成すると考えられる。



これらの遺伝子の疾患における役割を、遺伝子関連解析や死後脳研究により解明することにより、統合失調症や気分障害の発症過程機構の究明を促進し、その治療へと応用することができると考えている。

## 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 3 件)

Uezato A, Nishikawa T. [Molecular pathology of schizophrenia]. Nihon Rinsho. 2013;71(4):591-598. 査読なし

Uezato A, Kimura-Sato J, Yamamoto N, Iijima Y, Kunugi H, Nishikawa T. Further evidence for a male-selective genetic association of synapse-associated protein 97 (SAP97) gene with schizophrenia. Behav Brain Funct. 2012;8(1):2. 査読あり

上里彰仁, 西川徹. 統合失調症の病態メカニズム. ファルマシア. 2011;47(9):824-828. 査読なし

〔学会発表〕(計 9 件)

上里彰仁. 統合失調症とグルタミン酸系：シンポジウム 難治性病態の打開に向けて～統合失調症～. Paper presented at: 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 2013 年 10 月 25 日. 沖縄.

Uezato A, Kimura-Sato J, Hiraoka S, Yamamoto N, Kajii Y, Kuroda Y, Umino A, Iijima Y, Kunugi H, Nishikawa T. Identification of developmentally-regulated phencyclidine-inducible gene and its genetic association with schizophrenia.

Paper presented at: 11th World Congress of Biological Psychiatry; 23-27 June 2013, 2013; Kyoto.

上里彰仁. 双極性障害における sulfation 過程およびグルタミン酸伝達に關与する PAPS 輸送体の遺伝子關連解析と死後脳研究. Paper presented at: 日本生物学的精神医学会若手研究者育成プログラム奨励賞, 2012年9月27日; 神戸.

Uezato A. Gene association and expression analyses of PAPST1 (3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate Transporter 1) in bipolar disorder. Paper presented at: 日本生物学的精神医学会若手国際交流プログラム, 2012年9月22日; 台北.

上里彰仁. グルタミン酸/D-セリン系と精神疾患. Paper presented at: D-アミノ酸研究会奨励賞, 2012年9月8日; 滋賀.

上里彰仁. PCP 精神病: シンポジウム - 薬物誘発性精神病と統合失調症 - その類似点と相違点を探る. Paper presented at: 第21回臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会 合同年会; 2011.10.27; 東京.

Uezato A, Yamamoto N, Shimazau D, McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH, Nishikawa T. Alteration of genomic DNA and gene expression of D-serine modulator PAPST1 in schizophrenia. Paper presented at: The 32nd Naito Conference - Biological basis of mental functions and disorders; Oct. 18-21, 2011, 2011; Yatsugadake, Japan.

Uezato A. Genetic association and postmortem studies of D-serine modulator PAPST1 in bipolar disorder. Paper presented at: CBIR International Symposium: Function and dysfunction of D-amino acids in the central nervous system; Sept. 10, 2011, 2011; Tokyo.

上里彰仁, 嶋津奈, 山本直樹, McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH, 西川徹. 統合失調症における D-セリン調節因子 PAPST1 の遺伝子關連解析および死後脳研究. Paper presented at: 第34回日本神経科学大会; 2011.9.16; 横浜.

〔図書〕(計 1 件)

脳(ブレイン)バンク 精神疾患の謎を解くために. 光文社; 2011. 分担執筆

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

上里 彰仁 ( UEZATO, Akihito )

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号: 90547449