

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860931

研究課題名(和文) 血漿ホモシステイン濃度に影響する遺伝子多型の同定に基づく統合失調症の病態解析研究

研究課題名(英文) Genome-wide association study of plasma total homocysteine in schizophrenia

研究代表者

木下 誠 (KINOSHITA, Makoto)

徳島大学・大学病院・特任助教

研究者番号：40622478

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)：統合失調症は罹患率1%と頻度が高く、思春期から成人早期に発症し、慢性・再発性の経過をたどる。統合失調症は多因子疾患であり、遺伝因子と環境因子が相互に作用して発症すると考えられている。ホモシステインは必須アミノ酸の1つであるメチオニンの代謝過程で生成されるアミノ酸で、高ホモシステイン血症が統合失調症のリスク因子の1つであることが、複数の疫学観察研究論文で報告されている。今回我々は合計384名の統合失調症患者のDNAを用い、ゲノムワイドなジェノタイプングを行い、血漿ホモシステイン濃度に影響を与える遺伝子多型を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：Homocysteine is a sulfur amino acid and a key substance in the methionine cycle. Previous meta-analyses of association studies between blood homocysteine and schizophrenia have demonstrated an elevated blood homocysteine level in schizophrenia. We conducted a genome-wide association study in 384 patients with schizophrenia. We found novel associations of 3 SNPs with the plasma total homocysteine levels. This is the first genome-wide association study of the plasma total homocysteine in patients with schizophrenia.

研究分野：遺伝学

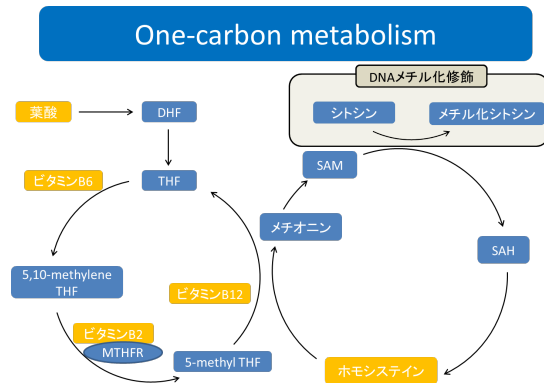
キーワード：統合失調症 ホモシステイン ゲノムワイド遺伝子関連解析 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は罹患率1%と頻度が高く、WHOによれば長期的な障害をきたす疾患のうちでトップ10に入る主要疾患である。統合失調症は、思春期から成人早期に発症し、慢性・再発性の経過をたどる。統合失調症は多因子疾患であり、遺伝因子と環境因子が相互に作用して発症すると考えられている。ホモシステインは必須アミノ酸の1つであるメチオニンの代謝過程で生成されるアミノ酸で、高ホモシステイン血症が統合失調症のリスク因子の1つであることが、複数の疫学観察研究論文で報告されている (Muntjewerff et al., Mol Psychiatry, 2006 review)。統合失調症の病態におけるホモシステインの関与の機序については、NMDA受容体のグルタミン部位の部分拮抗薬作用、神経毒性、などが考えられている。

我々の教室でも血漿ホモシステインと統合失調症との関連に注目した研究を行ってきた。日本人の統合失調症患者381名と健常者998名の血漿ホモシステインを測定し、既報論文同様に、統合失調症群は健常者群とを比較して血漿ホモシステイン濃度が高いことや、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子の機能性多型 C677T (rs1801133) が統合失調症患者の血漿ホモシステイン濃度に影響することを明らかにした。続いて血漿ホモシステインへの影響が明らかになった MTHFR 遺伝子 C677T 多型について、日本人サンプルを用いて遺伝子関連研究ならびにメタアナリシスを行い (4,316名の統合失調症患者と6,062名の健常者) 統合失調症の発病リスクでもあることを明らかにした。 (Nishi et al. Schizophr Bull 2013)。

これらの研究は、統合失調症で血漿ホモシステイン濃度に影響を与える遺伝子多型が、統合失調症発病のリスク多型でもある可能性を示唆している。さらに我々は、One-carbon metabolism において、ホモシステインが SAM (S-adenosyl methionine) から SAH (S-adenosyl homocysteine) へと代謝される過程で、メチル基を DNA シトシン塩基に付与し DNA メチル化修飾に關与することに注目した。



DNA メチル化修飾は、DNA 塩基配列上で、シトシンとグアニンが連続している部位 (CpG サイト) のシトシン塩基の 5'位にメチル基付加される反応のことである。DNA メチル化修飾は、エピジェネティクスという、DNA 塩基の変化を伴わずに遺伝子機能に変化をもたらすメカニズムの一つとして、近年精神疾患でも注目されており、統合失調症患者の末梢血や死後脳を用いた研究が数多く報告されている。我々は、血漿ホモシステイン濃度を測定した 42 名の統合失調症患者の血液から抽出したゲノミック DNA を用いてゲノムワイドに DNA メチル化修飾解析を行った。解析には、約 48 万の CpG サイトの解析が可能は、Illumina 社 HumanMethylation450 BeadChip を用いた。その結果、血漿ホモシステイン濃度が特定の遺伝子の DNA メチル化修飾に影響を与えて統合失調症の病態に關与することを明らかにした (Kinoshita et al., Epigenetics, 2013)。

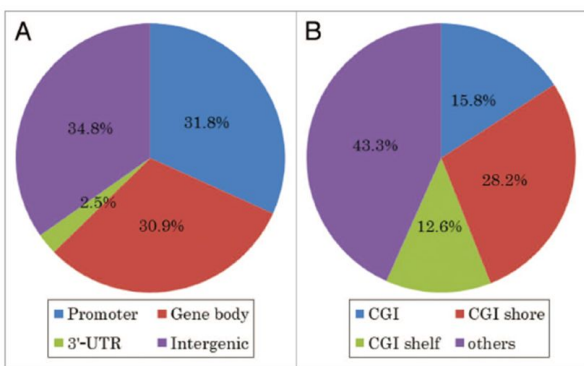
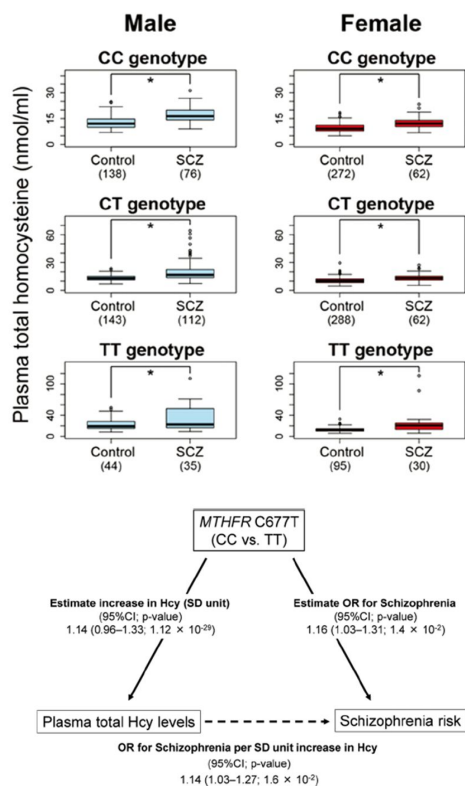
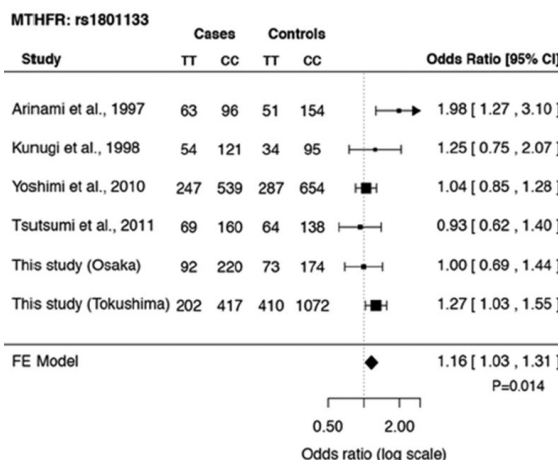


Figure 3. Percentages of 1,338 CpG sites at which plasma total homocysteine and DNA methylation were significantly correlated. (A) Of the 1,338 CpG sites, 425 (31.8%) were located in promoter regions, 414 (30.9%) were located in gene bodies and 34 (2.5%) were located in 3'-UTRs. (B) Of the 1,338 CpG sites, 212 (15.8%) were located in CGIs, 377 (28.2%) were located in CGI shores and 169 (12.6%) were located in CGI shelves.

血漿ホモシステイン濃度に影響を与える他の遺伝子多型を調べた研究には、アメリカ人の健康女性約 14,000 サンプルを用いたゲノムワイド関連解析や、ヨーロッパ人の健康人約 44,000 サンプルを用いたメタ解析などがあり(Pare et al., *Circ Cardiovasc Genet.* 2009; van Meurs et al., *Am J Clin Nutr.* 2013)、複数の遺伝子多型と血漿ホモシステイン濃度の関連が明らかになっている。しかし、遺伝子多型が血漿ホモシステイン濃度に与える影響は、25~44%と見積もられているにも関わらず(Souto et al., *J Am J Hum Genet.* 2005; Vermeulen et al., *Thromb Haemost.* 2006)、現在明らかになっている遺伝子多型の影響は数%である。また、統合失調症患者を対象にしたホモシステインと遺伝子多型との関連を調べたゲノムワイド遺伝子関連研究は、これまでに報告されていない。以上のことを踏まえ、本研究では、日本人統合失調症患者の血漿ホモシステイン濃度に影響を与える新規の遺伝子多型を、ジェノタイピングアレイを用いて同定し、続いて遺伝子関連研究ならびにメタアナリシスを行い、血漿ホモシステイン濃度に注目した疾患病態解明を行いたいと考えた。

2. 研究の目的

高ホモシステイン血症は統合失調症のリスク因子の1つであることが、疫学観察研究により知られている。本研究では、統合失調症患者の血漿ホモシステイン濃度に影響を与える新規の遺伝子多型を、ジェノタイピングアレイを用いて同定することを目的とした。統合失調症患者の血漿ホモシステイン濃度に影響を与える遺伝子多型で、これまでに同定されているのはMTHFR 遺伝子C677T多型だけである(Feng et al., *Psychiatry Res.* 2009; Muntjewerff et al., *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005)。本研究は、ゲノムワイドなジェノタイピングアレイを用いて、統合失調症患者の血漿ホモシステイン濃度に影響を与える新規の遺伝子多型を同定する点が独創的である。これは、世界初の試みである。一度に20万以上の一塩基多型を解析可能なマイクロアレイを用いることにより、特定の仮説に基づかない新たな知見を得られることが期待でき、その結果未知の遺伝子多型を複数発見することが可能であると考えた。また、本研究で同定される統合失調症の血漿ホモシステイン濃度に影響を与える遺伝子多型が、統合失調症脆弱性候補遺伝子(遺伝要因)の同定につながる可能性がある点も、本研究の学術的な特色であると考えた。実際に、本研究で使用する統合失調症患者382名の血漿ホモシステイン濃度に影響を与えたMTHFR 遺伝子C677T多型は、我々の日本人約1万人を用いた遺伝子関連研究でも、統合失調症との関連が明らかになっている(Nishi et al., *Schizophr Bull* 2013)。



また、高ホモシステイン血症は冠動脈疾患のリスクとしても知られているが、健康者の血中ホモシステイン濃度に影響を与えるHNF1A遺伝子多型が、冠動脈疾患のリスク遺伝子でもあったことが報告されている(van Meurs et al., *Am J Clin Nutr.* 2013)。本研究で同定される可能性のある、統合失調症患者の血漿ホモシステイン濃度に影響を与える遺伝子多型が、統合失調症における、それらの異常を改善する薬物の治療反応性に寄与する遺伝子多型の同定につながる可能性がある点も、本研究の特色である。高ホモシステイン血症を示す統合失調症患者に葉酸・ビタミンB12・pyridoxineの投与すると、臨床症状を改善させることや(Levine et al., *Biol Psychiatry.* 2006)、葉酸投与による統合失調症の陰性症状の改善効果に、血中ホモシステイン濃度に関連するMTHFR 遺伝子C677T多型が関与することが報告されている(Hill et al., *Schizophr Res.* 2011)。さらに、日本人の健康者に葉酸を経口的に投与して、血漿ホモシステイン濃度の変化をMTHFR 遺伝子C677T多型について検討した研究では、遺伝子多型により血漿ホモシステイン濃度の低下量が異なることが報告されている(Miyaki et al., *J Hum Genet.* 2005)。これらの結果は、ホモシステインに関連する遺伝子多型が、葉酸投与によるホモシステイン濃度の低下量ならびにその臨床反応に関連する可能性を示唆していると思われた。

3. 研究の方法

本研究では、血漿ホモシステイン濃度のデータが得られている統合失調症患者382名のゲノミックDNAを用いて、ゲノムワイド遺伝子関連研究を行い、血漿ホモシステイン濃度に影響を与える新規の遺伝子多型を同定することを目的とし、以下の方法を用いて研究を行った。

【対象】

DSM- の診断基準を満たす統合失調症患者、ならびに冠動脈疾患の既往のない70歳以下の健康ボランティアを対象とした。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて作成し徳島大学医学部ヒトゲ

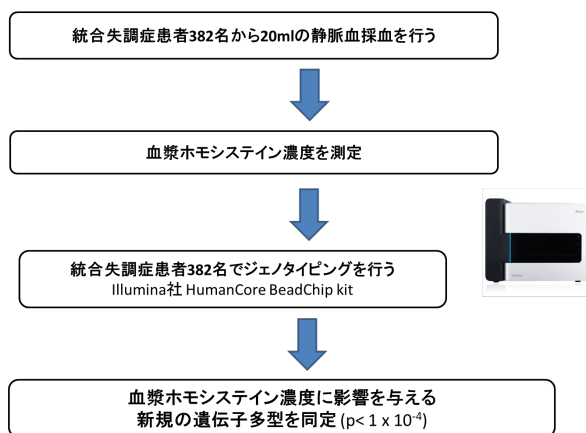
ノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会です承されたプロトコールに基づき、文書によるインフォームドコンセントを得た。

【試料採取】

研究参加の同意が得られた対象者から約20mlの静脈血採血を1回行った。末梢白血球を用いてゲノミックDNAの抽出を行い、血漿ホモシステインの測定を株式会社エスアールエルに依頼した。382名のゲノミックDNAを、Illumina社製 HumanCore BeadChip kitを用いてゲノムワイドなジェノタイピングを行い、統合失調症患者において血漿ホモシステイン濃度に影響を与える遺伝子多型の同定を行った。

ゲノムワイドなジェノタイピングの結果は、PLINKを用いて抽出を行った。統計学的解析では、マイナーアレルのadditiveモデルを採用し、linear regression解析を行った。有意水準は、ボンフェローニ補正後 $p < 0.05$ ($p < 1 \times 10^{-4}$)とした。また、得られたすべての遺伝子多型とそのp値を用いて、パスウェイ解析を行った。解析ソフトは、i-GSEA4GWASv2 (Zhang et al., 2015)を用い、FDR $q < 0.25$ を有意水準とした。

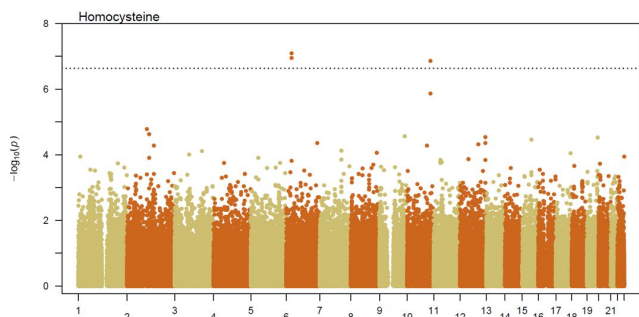
研究計画・方法概略図



4. 研究成果

統合失調症において、血漿ホモシステイン濃度に影響を与える3つの遺伝子多型を同定した (ボンフェローニ補正後 $p < 0.05$)。

パスウェイ解析を行った結果、統合失調症の病態仮説として知られる炎症反応や、one-carbon metabolismを含む複数の経路が有意な関連を示した (FDR $q < 0.25$)。



Gene Set Name
 GO: INFLAMMATORY RESPONSE
 KEGG: LINOLEIC ACID METABOLISM
 GO: GTPASE ACTIVITY
 GO: ORGAN MORPHOGENESIS
 GO: GOLGI APPARATUS
 GO: RIBOSOME
 BioCarta: VEGF PATHWAY
 GO: ONE CARBON COMPOUND METABOLIC PROCESS
 BioCarta: SPPA PATHWAY
 BioCarta: MYOSIN PATHWAY
 GO: CARBOXYLESTERASE ACTIVITY
 KEGG: LONG TERM DEPRESSION
 KEGG: ALDOSTERONE REGULATED SODIUM REABSORPTION
 GO: REGULATION OF CELL ADHESION

この研究は、統合失調症サンプルを用いて、血漿ホモシステイン濃度と関連のある遺伝子多型を同定した、世界で初めてのゲノム網羅的遺伝子解析研究である。これらの遺伝子多型はこれまでに報告されていない新規の遺伝子多型である。この遺伝子多型を詳しく解析することで、新たな統合失調症脆弱性候補遺伝子の同定につながり、血漿ホモシステインを低下させる薬物が、統合失調症の新たな治療薬になる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

Society for Neuroscience 2015
(2015.10.17-21 Chicago, USA)

Makoto Kinoshita, Shusuke Numata, Atsushi Tajima, Akira Nishi, Issei Imoto, Tetsuro Ohmori. Genome-wide association study of plasma total homocysteine in schizophrenia.

日本生物学的精神医学会 タワーホール船堀(2015.9.24-26 東京都・江戸川区)

木下誠

ホモシステイン代謝経路に着目した統合失調症病態解析研究

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

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

木下誠 (KINOSHITA, Makoto)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：40622478

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：