

Table 1 continued

| | | | | |
|---------|---------------------------------|-----|-------------------------------------|--------------------------------|
| | (R) 5'-GCCGTGAGAAGCAATGTGCAA | | 96 bp downstream to exon 9 | |
| Exon 10 | (F) 5'-GCTGGAGAGCCACAGTGATG | 520 | 400 bp upstream to exon 10 | Taq ^b |
| | (R) 5'-TTCAGGAAGCTTGGAAATGG | | 78 bp downstream to exon 10 | |
| Exon 11 | (F) 5'-CCTGGACTCAACAAAGCTTTG | 826 | 97 bp upstream to exon 11 | Expand & Buffer 1 ^d |
| | (R) 5'-GTGGTGTCCATCCTGCTGGC | | nt 3599 in exon 11 | |
| | (F) 5'-TCATCGGCACCACCAAGCTGCTGT | 467 | nt 3527 in exon 11 | Expand & Buffer 3 ^d |
| | (R) 5'-TCGTCCTTCTATGGCTTTGC | | 108 bp downstream to the stop codon | |

^a Nucleotide (nt) positions are assigned on the cDNA as the A of Initiation codon ATG is 1.

^b Taq polymerase was Ex Taq from Takara.

^c MasterAmp buffers were from Epicentre Technologies, Madison, WI, USA.

^d Expand enzyme and Buffer 1 and 3 were from Expand System of Boehringer Mannheim.

Table 2 Summary of DNA polymorphisms of the ADCY9 gene

| DNA Polymorphism | Location | Genotype frequency |
|----------------------------------|----------|---|
| IVS5-44T>C | intron 5 | TT : 0.04, TC : 0.35, CC : 0.61 ^a |
| 2316A>G (Ile772Met) | exon 7 | AA : 0.36, AG : 0.47, GG : 0.17 ^b |
| IVS8-51A>G | intron 8 | AA : 0.36, AG : 0.47, GG : 0.17 ^a |
| 2706A>G | exon 9 | AA : 0.44, AG : 0.40, GG : 0.16 ^a |
| IVS9+60G>A | intron 9 | GG : 0.21, GA : 0.43, AA : 0.36 ^a |
| 3162C>T | exon 11 | CC : 0.46, CT : 0.15, TT : 0.38 ^a |
| (TTTA) _n ^c | exon 11 | 171/171 : 0.06, 171/175 : 0.40, 175/175 : 0.54 ^b |
| 5067C>A ^d | exon 11 | |

^a The data was calculated based on the analysis of randomly selected 40 Japanese samples.

^b The data was based on all the genotypes analyzed in the present study using Japanese cohorts.

^c 171: n = 4, 175: n = 5

^d This polymorphism is derived from that the cDNA analyzed showed heterozygote at this site.

資料 No. 5-7 :
ADVY9 図 4

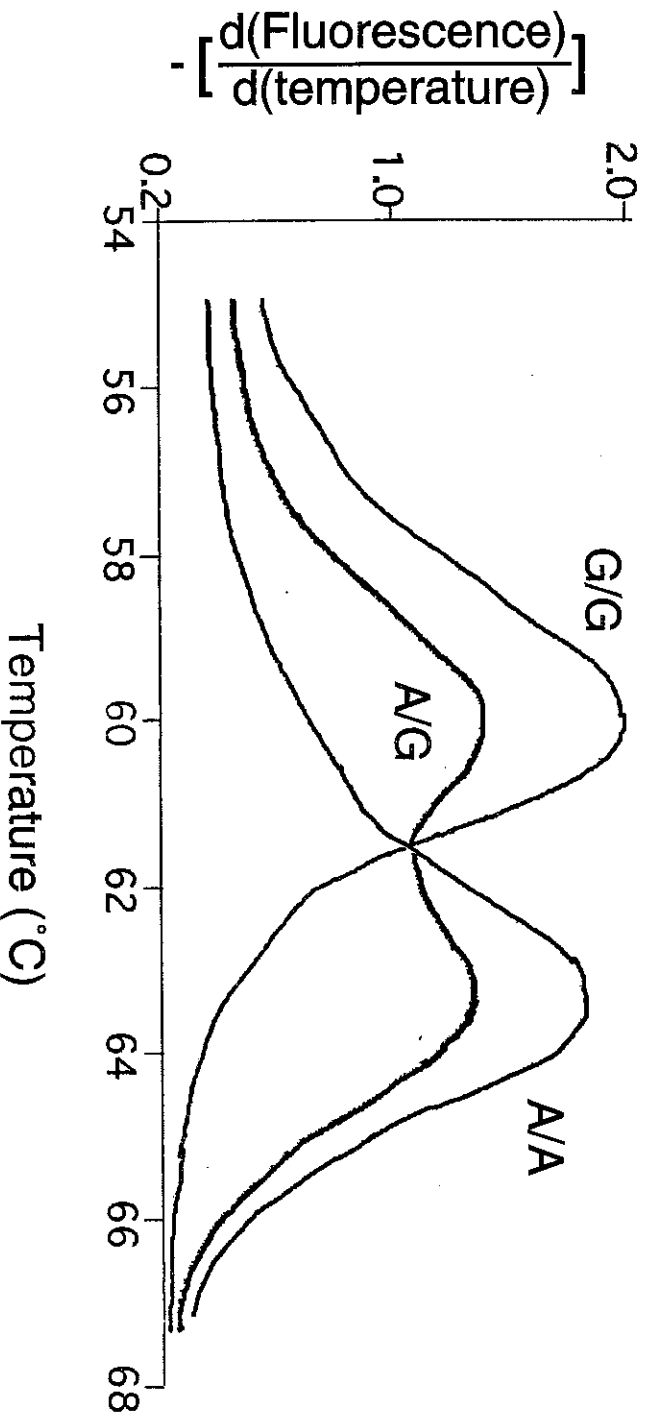
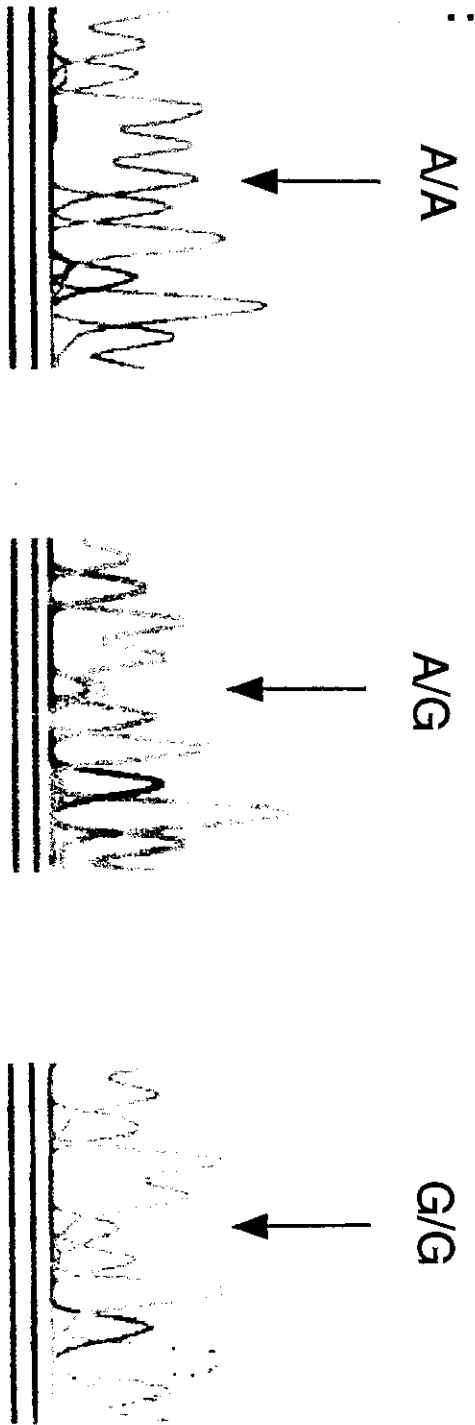


Table 3 Distribution of the 2316A>G and (TTTA)_n polymorphisms of the ADCY9 gene in Japanese

| Polymorphisms | Subject Counts (percentage) | | | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | Mood disorder total (n = 245) | Unipolar (n = 128) | Bipolar (n = 117) | Schizophrenia (n = 122) | Controls (n = 316) |
| 2316A>G (116772MeI) | | | | | |
| Genotype | A/A | 53 (0.41) | 45 (0.38) | 36 (0.30) | 114 (0.36) |
| | A/G | 104 (0.42) | 58 (0.45) | 46 (0.39) | 69 (0.57) |
| | G/G | 43 (0.18) | 17 (0.13) | 26 (0.22) | 17 (0.14) |
| | P-value | 0.383 | 0.317 | 0.218 | 0.084 |
| | P for HWE ^a | 0.097 | 0.857 | 0.038 | 0.079 |
| Allele | A | 300 (0.61) | 164 (0.64) | 136 (0.58) | 141 (0.58) |
| | G | 190 (0.39) | 92 (0.36) | 98 (0.42) | 103 (0.42) |
| | P-value | 0.521 | 0.191 | 0.747 | 0.676 |
| (TTTA)_n^a | | | | | |
| Genotype | 171/171 | 15 (0.06) | 7 (0.06) | 8 (0.07) | 7 (0.06) |
| | 171/175 | 101 (0.42) | 52 (0.42) | 49 (0.43) | 36 (0.31) |
| | 175/175 | 122 (0.51) | 66 (0.53) | 56 (0.50) | 73 (0.63) |
| | P-value | 0.423 | 0.881 | 0.389 | 0.122 |
| | P for HWE ^b | 0.325 | 0.431 | 0.536 | 0.376 |
| Allele | 171 | 131 (0.28) | 66 (0.26) | 65 (0.29) | 50 (0.22) |
| | 175 | 345 (0.72) | 184 (0.74) | 161 (0.71) | 182 (0.78) |
| | P-value | 0.373 | 0.691 | 0.287 | 0.288 |

^a 171: n = 4, 175: n = 5^b P-value for Hardy-Weinberg equilibrium

資料No. 5-9 p. 23

Table 4 Results of PDT analysis of the NIMH bipolar pedigrees

| Polymorphisms | P-value (chi square value) | | |
|----------------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|
| | ASM I ^a | ASM II ^a | ASM III ^a |
| 2316A>G (Ile772Met) | 0.1016 (2.680) | 0.5029 (0.449) | 0.0332 (4.537) |
| (TTTA) _n ^b | 0.5495 (1.198) | 0.0199 (7.832) | 0.0395 (4.240) |

^a ASM: affection status model

^b 171: n = 4, 175: n = 5

機能性精神疾患の系統的遺伝子解析に関する研究

分担研究者 有波忠雄 筑波大学 基礎医学系 助教授

研究要旨 日本人の精神分裂病の罹患同胞対の 142 家系を対象に 5, 10, 15 番染色体の連鎖解析を行った。連鎖解析には simulation の方法を活用した。5q31-33 領域に $p < 0.05$ の領域が検出された。5q31-33 領域に存在している 19 マーカーを追加して検討した結果も弱い連鎖を支持していた。この予備的な結果から、精神分裂病の連鎖領域を検出するためには 400 家系以上必要であることが算出され、精神疾患 DNA バンクの必要性が示された。

A. 研究目的

ヒトゲノムシーケンズプロジェクトの進行とともに連鎖解析によるゲノムの位置的情報に基づいた複雑疾患の疾患感受性遺伝子の同定も現実のものになってきた。この方法によれば、生化学的根拠に基づく候補遺伝子法と異なり、未知の疾患感受性遺伝子の同定が可能である。本研究では、日本人における連鎖情報に基づいた精神分裂病の疾患脆弱性遺伝子の同定を目指した。連鎖解析は多くの家系サンプルを必要とするので、日本における大規模な共同研究として本研究を行うため、日本人精神分裂病の罹患同胞対法による連鎖解析を目指している多施設共同研究グループの JSSLG (Japanese Schizophrenia Sib-pair Linkage Group)の一部を担当した。この研究は精神疾患 DNA バンクのモデル事業とも言える位置にあり、これにより、DNA バンクの意義と今後勧めるべき方向性を検討することとした。

B. 研究方法

罹患同胞対法は JSSLG で集められた家系サンプル142家系、367人を対象とした。5, 10, 15 番染色体の 23, 20, 12 ヶ所のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型決定を行った。マイクロサテライトは Weber ver 9 のを使用し、連鎖の可能性が示唆された 5q32-33 はさらに 19 マーカーを追加して、検討した。ま

た、全体の連鎖解析の集計を担当した。

遺伝子型決定は ABI377 シークエンサーと、GeneScan と Genotyper プログラムを用いた。

統計解析は、GeneHunter ver 2, SLINK, SIMULATE, STRUCTURE プログラムを用いた。連鎖の有意性については、用いた家系構造とマーカーの遺伝子頻度から連鎖がない場合の架空の遺伝子型を SIMULATE プログラムで作り、それを GeneHunter で解析することを 1000 回繰り返す simulation の方法で行った。検出力の検定は、病因遺伝子があると仮定して SLINK で架空の遺伝子型を作り、1000 回 simulate して推定した。

(倫理面への配慮)サンプルは JSSLG のプロトコールに基づき、患者とその家族に口頭および文書にて遺伝子解析をすることを説明し、文書にて同意が得られたものを対象とした。同意書には共同研究として他施設で分析が行われることも明記してあるものである。

C. 研究結果

JSSLG では統計的に有意な連鎖領域は検出されなかった。22 番染色体に連鎖を示唆する領域が見られた。検出力の検定では、ラムダ S が 2 以下の影響力の遺伝子を検出するには 400 家系ほど必要と算定され、さらに、家系を蓄積することが研究を遂行する上で必要であることが分かった。多重比較による補正をしない場合は、5q において $p < 0.05$ の

連鎖領域が見られ、その領域におけるマイクロサテライトマーカーで精神分裂病との連鎖不平衡がみられ、この領域に弱い精神分裂病感受性遺伝子があることが示唆された。この他、この研究の経過で日本人でもマイクロサテライトマーカーの遺伝子頻度に地域差があることが判明した。

D. 考察

精神分裂病は最も活発に連鎖解析が行われている疾患で、欧米ではこの2年間でもすでに10以上の報告がある。しかし、このような研究にもかかわらず、連鎖領域が収束しない。この状況は、多くの家系においては影響力の強い遺伝子が存在しないことを示している。本研究でのJSSLGの結果もこれまで欧米の報告と一致した結果となっている。精神分裂病疾患感受性遺伝子の信頼できるゲノムマッピングには多くの家系が必要であり、ここに精神疾患DNAバンクの必要性がある。これによる全ゲノム連鎖解析が精神分裂病に関わる遺伝子がどのようなものであるかの全貌を概観できる唯一の方法である。

D. 結論

日本人の精神分裂病の連鎖解析のデータを共同研究として提出した。日本人の精神分裂病においても、発症脆弱性に多くの遺伝子が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. Sakurai K, Toru M, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T: Mutation analysis of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) in schizophrenia, *Neurosci Lett*, 296:168-170, 2000
2. Ohtsuki T, Ishiguro H, Yoshikawa T, Arinami T: WFS1 gene mutation search in depressive patients: Detection of 5 missense polymorphisms but no

association with depression or bipolar affective disorder. *J Affect Disord*, 58:11-17, 2000

3. Ishiguro H, Saito T, Shibuya H, Arinami T: Association study between genetic polymorphisms in the 14-3-3 h chain and dopamine D4 receptor genes and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*, 24:343-347, 2000
4. Okuyama Y, Ishiguro H, Nankai M, Shibuya H, Watanabe A, Arinami T: Identification of a polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with the human personality trait of novelty seeking. *Mol Psychiatry*, 5:64-69, 2000
5. Ishiguro H, Okuyama Y, Toru M, Arinami T: Mutation and association analysis of the 5' region of the dopamine D3 receptor gene in schizophrenia patients: Identification of the Ala38Thr polymorphism and suggested association between DRD3 haplotypes and schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 5: 433-438, 2000
6. Ohtsuki T, Ichiki R, Toru M, Arinami T: Mutational analysis of the synapsin III gene on chromosome 22q12-q13 in schizophrenics. *Psychiatry Research*, 94:1-7, 2000
7. Arinami T, Ohtsuki T, Takase K, Shimizu H, Yoshikawa T, Horigome H, Nakayama J, Toru M: Screening for 22q11 deletions in a schizophrenia population. *Schizophr Res* in press.
8. Takase K, Ohtsuki T, Migita O, Toru M, Inada T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T: Association of ZNF74 gene genotypes with age at onset of schizophrenia. *Schizophr Res* in press.
9. Kitao Y, Inada T, Arinami T, Hirotsu C, Aoki S, Iijima Y, Yamauchi T, Yagi G: A

- contribution to genome-wide association studies: search for susceptibility loci for schizophrenia using DNA microsatellite markers on chromosomes 19, 20, 21, and 22. *Psychiatric Genetics*, in press
10. Arinami T, Ishiguro H, Onaivi ES: Polymorphisms in genes involved in neurotransmission in relation to smoking, *Eur J Pharmacol*, 410:215-226, 2000
 11. Ishiguro H, Saito T, Shibuya H, Toru M, Arinami T: Mutation and association analysis of the Fyn kinase gene with alcoholism and schizophrenia, *Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genetics section)*, 96:716-720, 2000
 12. Ohtsuki T, Sakurai K, Dou H, Toru M, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T: Mutation analysis of the NMDAR2B (GRIN2B) gene in schizophrenia, *Mol Psychiatry*, 6:211-216, 2001

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業） 分担研究報告書

機能性精神疾患の系統的遺伝子解析：マイクロサテライトマーカーを用いた精神分裂病の発症脆弱性に関連する遺伝子関連研究：

分担研究者 稲田俊也

国立精神・神経センター精神保健研究所

研究要旨： 精神分裂病の発症脆弱性に関連する遺伝子座位を見出す試みとして、われわれは DNA マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムスキャンをすすめており、これまでに第 19, 20, 21, 22 番染色体上にある 34 の DNA マーカーについての検討を行い、それらの結果を国際誌に報告してきた(Kitao et al., 2000)。本年度は精神分裂病群 (n=130) と健常対照群 (n=161) の 2 群間で、第 5, 6 番染色体上の 40 カ所の DNA マーカーを用いて、それらのアリアル分布頻度の違いについての比較検討を行った。その結果、健常者群における D5S400, D6S426, D6S434 の heterozygosity 出現頻度は、Hardy-Weinberg の平衡法則から得られた理論値よりも有意に低かった。また heterozygosity の出現頻度は、40 の DNA マーカーのうち 18 部位で日仏間の有意な人種差が認められた。精神分裂病群と健常対照群との群間比較では D6S287 において Bonferroni の多重比較補正後も有意な差 ($\alpha < 0.0013$) が認められた。以上より、D6S287 の近傍に精神分裂病の発症脆弱性に関連する遺伝子の存在する可能性が考えられる。

Key words : 精神分裂病, マイクロサテライト, DNA, 関連研究, D6S287

研究協力者： 北尾淑恵, 飯嶋良味 (国立精神・神経センター精神保健研究所), 有波忠雄 (筑波大学基礎医学系遺伝医学), 広津千尋 (明星大学理工学部), 青木 敏 (東京大学大学院工学系研究科) 山内惟光 (社会福祉法人桜ヶ丘記念病院), 八木剛平 (慶應義塾大学医学部精神神経科学教室)

A. 研究目的

精神分裂病などの精神疾患の遺伝子解析研究は近年広く行われており、その重要性が認識されている。本研究の目的は、精神分裂病患者を対象にマイクロサテライトマーカーを用いてその発症脆弱性に関連する遺伝子座位を系統的に探索し、最終的には精神分裂病の発症に関連する遺伝子を見いだすことである。臨床遺伝学的研究から精神分

裂病に遺伝要因の関与することが示されているが、全ゲノムスキャンによる精神分裂病の遺伝子連鎖研究では最近その報告数が増加しているにもかかわらず、これまでに一貫して連鎖陽性を示す所見は得られていない。精神分裂病の病因遺伝子が 1 部位に限定されず、また多くの集団に共通する major gene が存在しない可能性も示唆されていることから、われわれは Genetic risk factor の存在を想定して、精神分裂病の発症脆弱性に関連する遺伝子座位を見出す試みとして、DNA マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムスキャンをすすめており、これまでに第 19, 20, 21, 22 番染色体上にある 34 の DNA マーカーについての検討結果を報告してきた¹⁾。本年度は第 5, 6 番染色体上にある 40 の DNA マーカーについて、各マーカーにおけるアリアル出現頻度の 2 群間の違いを

systematic に検出できる統計量を用いて検討したので報告する。

B. 研究方法

対象は東京近郊に位置する複数の精神病院に入院中の患者で、DSM-III-R²⁾で精神分裂病の診断を受けた者から文書及び口頭で本研究の目的及び意義についての説明を行い、書面での同意の得られた精神分裂病患者 130 名と、自発的意志により本研究に参加した主に医療従事者からなる健常対照者 161 名である。これらの対象者から血液を採取して市販のキットを用いて DNA を抽出し、第 5, 6 番染色体上にある 40 の DNA マイクロサテライトマーカー (D5S406, D5S630, D5S416, D5S419, D5S426, D5S418, D5S407, D5S647, D5S424, D5S428, D5S644, D5S433, D5S421, D5S471, D5S393, D5S436, D5S673, D5S422, D5S400, D5S429, D5S408, D6S344, D6S309, D6S470, D6S289, D6S422, D6S276, D6S426, D6S271, D6S257, D6S462, D6S434, D6S287, D6S262, D6S292, D6S308, D6S441, D6S305, D6S264, D6S281) について、それらを含む部位をそれぞれ特異的な蛍光プライマー (ABI PRISM Linkage Mapping Set Ver. 1) を用いて PCR 法により増幅し、Genetic Analyzer (ABI PRISM 310)により各対象者の CA リピートの繰り返し配列回数を判定した。PCR 増幅成功例が精神分裂病群で 85 例、健常対照群で 75 例を越えた時点で、両群の各マーカーにおけるマイクロサテライト繰り返し配列回数の出現頻度をそれぞれ集計し、群間比較を行った。対象者についてはまず最初に各マイクロサテライトの heterozygosity の出現頻度を各群ごとに算出し、それらが Hardy-Weinberg の平衡法則から得られる理論値との間に有意差 ($p < 0.05$) があるかどうかを調べ、さらに健常対照者については既に Genethon human genetic linkage map (Gyapay et al., 1994) に報告されているフランス人健常者との間にアリアル出現頻度の分布に有意差 ($p < 0.05$) が認められるかどうかについても検討した。統計解析は Hirotsu ら (1992)⁴⁾の提唱している Max (最大 chi square 統計量, 最大 1-to-others 型検定統計量) を統計量として選び、Bonferroni の多重比較補正後の有意水準については、 $\alpha < 0.0013 (=0.05/40)$ で有意差あり、 $\alpha < 0.0025 (=0.1/40)$ で有意傾向あり

とした。

C. 研究結果

今回調べた第 5, 6 番染色体上の 40 の DNA マーカーのうち、D5S400, D6S426, D6S434 の健常対照群において heterozygosity の出現頻度は、Hardy-Weinberg の平衡法則から得られた理論値よりも有意に低かった。また heterozygosity の出現頻度は、40 の DNA マーカーのうち 18 部位では日本人とフランス人の間に有意差 ($p < 0.05$) がみられた。Hardy-Weinberg の平衡法則から逸脱しない部位について、精神分裂病群および健常対照群との間で群間比較を行ったところ、CA リピートの繰り返し配列回数の全体的な出現頻度の分布については、D5S421, D5S433, D6S264, D6S287, D6S426, D6S434 では有意差 ($p < 0.05$) が認められ、このうち Bonferroni の多重比較補正後も有意差 ($\alpha < 0.0013$) がみられたものは D6S287 であった。

D. 考察

今回われわれが行った結果からは、精神分裂病群と健常対照群のアリアル出現頻度の違いは D6S287 で有意な差が認められた。この結果は D6S287 の近傍に精神分裂病の発症と何らかの関連を有する遺伝子が存在する可能性を示唆するものと考えられる。したがって、今後はこれらの近傍の DNA マーカーを用いた検討や、これらの近傍に位置する遺伝子の機能が精神分裂病に及ぼす影響について検討するなど、更に多角的な側面から検討をすすめる必要があるものと考えられた。

E. 結論

今回の研究結果は D6S287 の近傍に精神分裂病の発症と何らかの関連を有する遺伝子の存在する可能性があることを示唆するものと考えられる。

F. 文献

1. Kitao Y, Inada T, Arinami T, et al.: A contribution to genome-wide association studies: search for susceptibility loci for schizophrenia using DNA microsatellite markers on chromosomes 19, 20, 21 and 22. *Psychiatric Genetics* 10: 139-143, 2000.
2. American Psychiatric Association (Ed.): *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 3rd rev.,

Washington DC. 1987.

3. Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., et al.: The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nature Genet.* 7, 246-339, 1994.
4. Hirotsu C, Aoki S, Inada T, Kitao Y: An exact test for the association between the disease and alleles at highly polymorphic loci -With particular interest in the haplotype analysis-. *Biometrics*, in press.

G. 研究発表論文

1. Kitao Y, Inada T, Arinami T, et al.: A contribution to genome-wide association studies: search for susceptibility loci for schizophrenia using DNA microsatellite markers on chromosomes 19, 20, 21 and 22. *Psychiatric Genetics* 10: 139-143, 2000.
2. Drube J, Kawamura N, Inada T et al.: No leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide part of neuropeptide Y (NPY) in Japanese population or Japanese with alcoholism. in press.
3. Takase K, Ohtsuki T, Inada T, et al.: Association of ZNF74 gene genotypes with age at onset of schizophrenia. *Schizophr Res*, in press.
4. Nakamura A, Inada T, Kitao Y, et al.: Association between Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Poly- morphism and Severe Alcoholic Withdrawal Symptoms in Male Japanese Alcoholics. *Addiction Biology*, in press.
5. Iwata N, Ozaki N, Inada T, et al.: An Association of a 5-HT_{5A} Receptor Polymorphism, Pro15Ser, to Schizophrenia. *Mol Psychiatry*, in press.
6. Hirotsu C, Aoki S, Inada T, Kitao Y: An exact test for the association between the disease and alleles at highly polymorphic loci -With particular interest in the haplotype analysis-. *Biometrics*, in press.
7. 稲田俊也, 高橋清久: 精神医学研究と倫理. 中根允文, 松下正明 (編集): 臨床精神医学講座 第 12 巻 「精神医学・医療における倫理とインフォームド・コンセント」. 中山書店, 東京, pp335-347, 2000.
8. 稲田俊也, 伊豫雅臣 (監訳): 米国国立精神保健研究所分子遺伝学研究グループによる遺伝研究のための精神科診断面接 [DIGS] 日本語版 (The Japanese version of Diagnostic Interview for Genetic Studies [DIGS]). 星和書店, 東京, 2000.10.28.

機能性精神疾患の系統的遺伝子解析に関する研究

分担研究者 神庭 重信 山梨医科大学医学部精神神経医学講座 教授

研究要旨

連鎖研究による双極性障害の最も有望な染色体領域は 21 番長腕 22.3 にあるマーカーPFKL から D21S171 である。我々はこの PFKL 近傍に新たにクローニングされたカルシウムチャネル蛋白遺伝子 TRPC7 に着目した。TRPC7 遺伝子はカルシウムチャネルに関連して脳に発現することから双極性障害の位置的候補遺伝子となる。最初の段階として変異・多型スクリーニングを行い翻訳領域に 1 塩基置換多型を 5 部位発見した。

緒言

躁うつ病 (気分障害) の成因、とりわけ双極性気分障害に関しては遺伝要因の関与が強く示唆されてきた。現在までの連鎖研究により、躁うつ病において複数のグループから一致した報告のある染色体領域は 18 番染色体の動原体周辺部と 21 番の長腕 22.3 にあるマーカーPFKL から D21S171 である。そこで我々はこの染色体 21 番の PFKL 近傍に新たにクローニングされたカルシウムチャネル蛋白遺伝子 TRPC7 (Transient Receptor Potential related Channels) (Nagamine K et al, 1998) に注目した。

A. 研究目的

TRPC7 遺伝子は躁うつ病での連鎖が報告された感受性領域に存在すること、機能的にも脳に発現し、躁うつ病患者で異常がわかっているカルシウムチャネルに関連していることから疾患の候補遺伝子としては有望である。我々は TRPC7 遺伝子の変異・多型解析を行い、得られた多型について躁うつ病との関連を検討する。

B. 研究方法

双極性患者 40 名と精神疾患のない健康対照者 40 名の血液より得た DNA を鋳型として TRPC7 遺伝子の 32 エキソンすべてについて PCR 法により、翻訳領域の増幅を行う。PCR 産物を SSCP (single strand conformation polymorphism analysis) にて変異スクリーニングを行った。PCR は GenAmp 9600/2400 (Perkin Elmer) を、SSCP には DNA フラグメント解析用電気泳動装置 (Amersham Pharmacia Biotech)、シークエンスには ABI 310 (ABI) を使用した。

(倫理面への配慮)

なお、研究参加者には文書にて説明し、署名による同意を得た。本研究については山梨医科大学倫理委員会による承認を事前に受けている。

C. 結果および考察

SSCP 法を用いて TRPC7 遺伝子の変異を検索し、現在までに翻訳領域に 5 カ所の 1 塩基置換を確認した。

TRPC7 遺伝子は 90kb にわたり 32 のエキソンがあり、1503 アミノ酸残基により構成される。相同性検索から transient receptor potential 蛋白 (trp) ファミリーに属すると考えられる。TRPC7 には 7 回の膜貫通領域が存在することから、trp として Ca²⁺チャネルを形成していると考えられる。躁うつ病患者にカルシウム動員の異常が認められ、その治療薬がカルシウム動員に調整的に働くことは多くの研究から明らかにされている。

D. 結論

TRPC7 にも躁うつ病の候補遺伝子として注目に値する機能を持つことが推測される。今後は新たな多型の発見をすすめるとともに、これらの多型と躁うつ病の発症との関連研究を進める。

E. 研究発表

1. 論文発表

神庭重信 他：病前性格は気分障害の発症規定因子か 性格の行動遺伝学的研究 精神医学 42 (5): 481-489, 2000.

2. 学会発表

Shioe, K., Kanba, S., et al.: Candidate-gene analysis of mood disorders. Symposium: Genetics of Psychiatric Disorders. The 3rd International congress of neuropsychiatry, April 9-13, 2000, Kyoto, Japan.

Hirano, M., Kanba, S., et al: New findings on genetics of personality; Results from Keio Twin Study. Workshop: Biology of Personality. The 3rd International congress of neuropsychiatry, April 9-13, 2000, Kyoto, Japan.

研究成果の刊行

神庭重信、平野雅己、大野 裕：病前性格は気分障害
の発症規定因子か 性格の行動遺伝学的研究
精神医学 42 (5): 481-489, 2000.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書
機能性精神疾患の系統的遺伝子解析に関する研究

分担研究者 染矢俊幸 新潟大学大学院医歯学総合研究科 精神医学分野 教授

研究要旨

精神分裂病の病因として神経発達障害が注目されている。神経成長因子である BDNF の遺伝子多型と精神分裂病との関連研究を行った。患者群、対照群で差はなく、関連は見られなかった。

A. 研究目的

機能性精神疾患のなかで、精神分裂病はその有病率の高さや社会的機能の低下から、社会経済的損失および医療福祉コストの負担が極めて大きい。薬物療法の進展により、予後は改善しているものの、発症の原因が不明のため、難治例が数多く存在する。これまでにいくつかの要因の関与が言われてきているが、遺伝要因が最も大きな因子とされている。精神分裂病発症脆弱性遺伝子は未だ特定されておらず、これを特定することが新たな治療法の開発に大きく貢献するだろう。そこで、本分担研究者は、精神分裂病の候補遺伝子として神経成長因子である BDNF の 5 上流の 2 塩基繰り返し配列多型で関連研究を行った。

B. 研究方法

新潟大学医学部附属病院およびその関連施設に通院もしくは入院中のもので DSM-V により精神分裂病と診断されたものを患者群(N=111)とした。対照群(N=105)として精神科の受診歴のないものとした。それぞれ、末梢血から抽出したゲノムDNAを鋳型に、蛍光プライマーを用いたPCR法で関心領域を増幅し ABI377 で電気泳動した。BDNF の転写活性に関与する可能性のある 5 上流の 2 塩基繰り返し配列を調べ、遺伝子型を決定した。統計解析は χ^2 検定を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部倫理委員会で承認されている。すなわち、研究への参加に先立ち研究の趣旨を説明し自署による同意の得られたも

のを対象とした。

C. 研究結果

表に示すようにアレル頻度で患者群と対照群とで差を認めなかった。

表. BDNF アレル頻度

| アレル | 患者群(n=222) | 対照群(n=210) |
|-----|------------|------------|
| 1 | 42.3% | 41.9% |
| 2 | 9.0% | 9.0% |
| 3 | 40.5% | 40.0% |
| 4 | 5.9% | 6.2% |
| 5 | 2.3% | 1.9% |
| 6 | 0% | 1.0% |

遺伝子型の分布はアレル頻度を基に Hardy-Weinberg 式で予測されたものと一致した。

D. 考察

本研究の結果から、BDNF 遺伝子が精神分裂病発症に影響している可能性は考えにくい。しかし、神経成長因子およびその関連物質は多数あるので、これらを順次調べる必要がある。

E. 結論

BDNF 遺伝子多型と精神分裂病に関連を認めなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

2. 学会発表

BDNF 遺伝子多型と精神分裂病との関連研究 金子尚史、村竹辰之、田中敏恒、池内健、辻省次、染矢俊幸 第 22 回生物学的精神医学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

機能性精神疾患の系統的遺伝子解析に関する研究

分担研究者：丹羽真一・福島県立医科大学医学部神経精神医学教室・教授

研究要旨

精神分裂病の関連遺伝子の検索による病因解明

A. 研究目的

我々の研究目的は、家族性に認められる精神分裂病患者を対象に、連鎖解析を用いて病因関連遺伝子座位を同定することである。この研究の背景として、古くから提唱されている精神分裂病におけるモノアミン過剰説がある。

モノアミン（ドパミン系、セロトニン系を中心に）機能に関連する遺伝子座位を手がかりに、連鎖解析を用いて精神分裂病の原因遺伝子座位を共同研究施設と協力しながら同定する。

B. 研究方法

1. 精神分裂病の連鎖解析対象の収集

対象は、福島県立医科大学付属病院神経精神科および福島県内の精神科関連病院に通院・入院している患者のうち、完全家系（少なくとも2人の兄弟が発病し、家系内に3人以上に精神分裂病が認められ、3世代にわたり1人以上が発症している）、不完全家系（家系内で、2世代にわたり2人以上の精神分裂病が認められる）、sib pair（同胞内に2人以上の精神分裂病が認められる）を対象とし、研究概要を記載した文書を配布すると共に、口頭で説明を行い、患者およびその家族より文書での同意を得る。

2. 採血・DNAの抽出

上記の条件を満たすもので、同意の得られた患者およびその家族より20mlの採血を行い、リンパ球を分離し genomic DNA を抽出し、TE buffer に溶解し-20~-80℃で冷蔵保存する。

3. 連鎖解析、候補遺伝子解析

抽出された genomic DNA について、約50サンプル（完全家系・不完全家系・sib-pairを含む）を目標に収集し、共同研究機関に送り遺伝子型・連鎖解析を依頼する。

また、収集されたサンプルを用いて、神経伝達物質受容体や神経伝達物質関連酵素の候補遺伝子（DRD5(4p15.3-15.1), HTR2A(13q14-q21), CYP2D(22q13.1), TH(11p15.5)など）との関連性を追試検討する。

なお、この研究計画については、当院の倫理委員会からの承認を得ている。

C.研究結果

現在、35 サンプルの抽出が終了しており、そのうち、18 サンプルについては JSSLG の解析分担研究施設に配送済みである。連鎖解析結果については、JSSLG の「P329 Initial genome-wide sib-pair linkage analysis of schizophrenia In japanese」を参照していただきたい。候補遺伝子の解析に関しては、サンプル収集が目標数に到達次第、開始する予定である。

D.考察および結論

本来の研究課題を、進めるためには単独の施設での研究は困難であり、サンプル数を増やすため、または解析結果の信頼度を上げる意味でも全国規模の DNA バンクの設立が必要不可欠である。今後のクリアすべき課題としては、診断基準・倫理委員会承認・プライバシー保護の方法などを各施設間で統一することが考えられる。

E.研究発表

・論文発表

1. 丹羽真一

「精神分裂病の最近の研究の進歩」

生体の科学

2. 宮本百合子、管るみ子、丹羽真一

「部分発作とみなされるてんかん発作症状を持つ良性成人型家族性

ミオクローヌステんかん (BAFME) の一家系」

てんかん研究、17、3~10、1999

3. 丹羽真一、管るみ子ら

「てんかん・熱性けいれん遺伝子解析に関する多施設共同研究」

てんかん治療研究振興財団研究年報、11、83~91、1999

F.知的所有権の取得状況

特記すべきことなし

研究要旨

躁うつ病の病態・病因を解明するためには、躁うつ病発症の基礎となっていると推測されるストレス脆弱性の分子生物学的基盤を明らかにすることが不可欠であると考えられる。そこで、ストレス脆弱性のモデルとしてグルココルチコイド受容体を介する視床下部-下垂体-副腎皮質系のフィードバック異常を示す胎生期ストレス負荷ラットを用い、脳内における正常動物との遺伝子の発現量の差を検出するために cDNA マイクロアレイを作成する。この cDNA マイクロアレイを作成するため、まずは正常ラット海馬の cDNA ライブラリーに含まれる各々のクローンをプラスミドとして抽出・単離し、プライマーを用いて両側よりシーケンシングを行い発現配列タグ (EST) として配列決定を行った。これによりおよそ 96 X 200 plate のランダムクローンが得られた。今後は得られた配列情報から、重複するクローンや無効なクローンを除いた後、PCR による断片の増幅を行い、生成物を精製してスライドガラス上にスポットし cDNA マイクロアレイとして使用する予定であり、これらの動物をモデルとしてフィードバック異常に関連する遺伝子群を明らかにできれば、次に、ヒトの相同な遺伝子群を同定する。

A. 研究目的

躁うつ病などの気分障害の研究は日々発展しているが、未だに病因・病態は不明である。躁うつ病の誘因としてストレスが挙げられるが、そのストレスは誰もが経験するようなライフイベントであるため、躁うつ病を発症する患者は素因としてストレス脆弱性を持っており、もともとストレス脆弱性を持った個体にストレスが加わることにより躁うつ病を発病するものと考えられる。そこで、このストレス脆弱性の生物学的基盤を解明し、また、ストレスが加わった後、どのような変化が脳内で起こっているのかを解明することが必要になってくる。躁うつ病患者では、グルココルチコイド受容体を介する視床下部-下垂体-副腎皮質系のフィードバック機能の異常が 65% に見出されており、ストレス脆弱性という素因の一つの表現型であると考えられるが、このフィードバック異常の分子生物学的基盤を解明することは、ストレス脆弱性の生物学的な基盤を解明することにつながる。グルココルチコイド受容体を介するフィードバック異常は、胎生期あるいは新生児期のストレス負荷により再現することができるため、これらの動物をモデルとしてフィードバック異常に関連する遺伝子群を明らか

かにできれば、ヒトでも相同な遺伝子群を同定できる可能性がある。そこで、本研究では、上記のストレス脆弱性モデル動物と正常動物を使用し、遺伝子の発現量を比較することによって発現量に差のある遺伝子群を同定し、また、これらの動物にストレスや薬剤を負荷する事で遺伝子発現量の変化の違いを明らかにし、ヒトの相同な遺伝子群を同定する。

B. 研究方法

1) Microarray の作成

我々の研究室では、Rambda Zap library (Rat hippocampus) を用いて in vivo excision を行い、Blue-White color selection により選択したクローンを 96-well plate にて 24 時間培養後、Biomek2000 を用いた全自動プラスミドミニプレップを施行し、ランダムクローンを取得する。これらのクローンについて T3, T7 の両方向からそれぞれ Big Dye を用いた 3700 sequencer (ABI) によるシーケンスを行い、発現配列タグ (EST) として配列決定を行う。全ての行程のユニットは、96 well plate によるシステムとして構築され、作業の効率化を図っている。

これらのクローンを template として、T3, T7 primer を用いた PCR を施行し、電気泳動にて single band を示すものをピックアップして Sephadex により精製したものを 3x SSC に溶解し、スタンフォード大学のプロトタイプスポットターを用いてスポットター専用の精巧コーティングを施したスライドガラスに 1 plate あたり 4000-5000 をスポットしている。

2) Target の調製

今回用いる動物は、胎生期ストレスとして妊娠ラットに生理食塩水を 1ml/kg、胎性 14-20 日の 7 日間にわたって皮下注射し、その母胎より出生した雄の仔ラットとし、正常対照は同一週齢の未処置ラットを用いる。標的組織は海馬とし、そこから RNA 抽出キットを用いて total RNA を抽出し、さらに Oligotex dT30(タカラ)を用いて mRNA を調製し、アミノアリル法にて Cy3, Cy5 を mRNA に incorporate している。

3) Hybridization & Analysis

2)で作成した probe を用いて 3.5 x SSC, 0.5% SDS にて hybridization を施行する。Hybridization は 65°C, 12-18 時間を目安としている。Hybrid 形成後、washing し、除水後すぐにスライドガラスを ChipReader にかけて signal を読みとり、両動物における遺伝子の発現パターンの差を調べる。

C. 結果および考察

上記方法により、海馬 cDNA ライブラリーから 96 X 200plate=約 2 万のランダムクローンを取得した。全クローンについて 5, 3 の両方向からシーケンシングを行い、配列情報を得た。現在、得られた配列情報を元に BLAST によるホモロジー検索を行い、重複したクローンや無効なクローンのチェックを行っているところである。

D. 結論

正常ラットの海馬 cDNA ライブラリーより約 2 万のランダムクローンを得た。今後、配列情報を元に選別を行い、PCR に供する。これを元に cDNA マイクロアレイを作成し、ストレス脆弱性モデルの分子生物学的基盤に迫るため、モデルと正常動物とで海馬で発現している様々な遺伝子の

mRNA 量を比較検討する予定である。

E. 研究発表

なし。

F. 知的所有権の取得状況

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|----------------------|--------------------------|--------------|---|------|-----|------|-----------|
| 吉川武男 豊田倫子 | 精神疾患感受性遺伝子地図 | 岡崎祐士 米田博 | 臨床精神医学講座 S11 精神疾患と遺伝 | 中山書店 | 東京 | 2000 | 379 - 399 |
| 有波忠雄 | 多因子遺伝疾患（複雑疾患）の感受性遺伝子研究方法 | 岡崎祐士 米田博 | 臨床精神医学講座 S11 精神疾患と遺伝 | 中山書店 | 東京 | 2000 | 37 - 49 |
| 村竹辰之 染矢俊幸 | 向精神薬反応性と遺伝子 | 岡崎祐士 米田博 | 臨床精神医学講座 S11 精神疾患と遺伝 | 中山書店 | 東京 | 2000 | 343 - 356 |
| 稲田俊也 高橋清久 | 精神医学研究と倫理 | 中根允文 松下正明 | 臨床精神医学講座第 12 巻「精神医学・医療における倫理とインフォームド・コンセント」 | 中山書店 | 東京 | 2000 | 335 - 347 |
| 稲田俊也 伊豫雅臣 (監訳) | | | 米国国立精神保健研究所分子遺伝学研究グループによる遺伝研究のための精神科診断面接〔DIGS〕日本語版(The Japanese version of Diagnostic Interview for Genetic Studies (DIGS)) | 星和書店 | 東京 | 2000 | |