

20020848

厚生労働科学研究費補助金

こころの科学研究事業

自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子の解明

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 功刀 浩

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I.	総括研究報告	
	自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子の解明-----	3
	功刀 浩	
II.	分担研究報告	
1.	染色体異常からのクローニング-----	11
	岡崎祐士	
2.	Association of a Haplotype in the Serotonin 5-HT4 Receptor Gene (HTR4) with Japanese Schizophrenia -----	14
	尾崎紀夫ほか	
3.	Effect of DRD2, 5-HT2A, and COMT genes on risperidone treatment response -----	33
	尾崎紀夫ほか	
4.	Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder-----	47
	氏家 寛ほか	
5.	Gene expression related to synaptogenesis, neuritogenesis, and MAP kinase in behavioral sensitization to psychostimulants-----	55
	氏家 寛ほか	
6.	自殺を惹起する精神疾患における chromogranin B 遺伝子の関連解析--	68
	稲田俊也	
7.	Relationship between catechol-O-methyltransferase polymorphism and treatment-resistant schizophrenia-----	76
	稲田俊也ほか	
8.	神経発達障害仮説による遺伝子解析-----	83
	辻田高宏	
9.	Brain derived neurotrophic factor gene and schizophrenia: polymorphism screening and association analysis-----	87
	功刀 浩ほか	
10.	Polymorphism screening of the neurotrophin receptor p75 gene and association analysis with schizophrenia -----	101
	功刀 浩ほか	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	105

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子の解明

主任研究者 功刀 浩

研究要旨

近年、自殺が増加している。そこで本研究は、自殺を惹起する精神疾患として統合失調症、躁うつ病、薬物依存症をとりあげ、これらの疾患感受性遺伝子を見出すことを目的とする。

方法論的には、上記精神疾患患者のゲノム DNA を多数収集し、セロトニン系遺伝子、神経発達に関与する遺伝子、カテコラミン系に関与する遺伝子などを候補遺伝子として、遺伝子変異と疾患との関連の有無を検討している。また、染色体異常からの遺伝子クローニングという細胞遺伝学的アプローチも行っている。

平成14年度（初年度）の研究成果として、5-HT₄受容体遺伝子の変異と統合失調症との関連、chromogranin B遺伝子の変異と統合失調症との関連、BDNF遺伝子の5'非翻訳領域の塩基置換と統合失調症との関連を示唆する結果が得られた。これらが統合失調症と関連する可能性について今後さらにサンプルを増やして検討する必要がある。覚醒剤依存症に関しては、神経細胞の構造可塑性に関与する遺伝子が重要な候補遺伝子であることが示唆された。

細胞遺伝学的アプローチでは、22番染色体の微小欠失と統合失調症との関連をみたが、マイクロサテライトでの解析ではコントロール群に比べて統合失調症群に多い可能性が示唆されたが、FISHを用いた方法では確認できず、さらに検討を要する。また、統合失調症との連鎖が示唆されている染色体8p21上に分断点がある染色体異常症例の解析は、分断点の塩基配列の解析が終了した。次年度以降、変異スクリーニングを行い、統合失調症や躁うつ病との関連をみていく必要がある。

統合失調症における身体小奇形と神経発達障害関連遺伝子との関連については、次年度以降さらに症例を増やして検討する必要がある。

分担研究者	
岡崎祐士	三重大学医学部・教授
尾崎紀夫	藤田保健衛生大学医学部・教授
氏家 寛	岡山大学大学院医歯学総合研究科・助教授
稲田俊也	名古屋大学大学院医学系研究科・助教授
辻田高宏	長崎大学大学院・講師

A. 研究目的

近年、自殺者数が急増している。人口動態統計（厚生労働省）によれば、1980年、1990年、1995年、2000年の自殺者数は20542人、20088人、21420人、30251人であり、1980～90年代前半までは概ね横ばいであったものが、1995年頃より急増し、年間3万人台に達している。これによって失われる寿命、経済への影響などは甚大であり、自殺によって親を失った子供への経済的・精神的影響なども社会問題となっている。従って、自殺や自殺を生じやすい精神疾患への対応策を探ることは、厚生労働行政において緊急な重要課題である。

自殺においては心理社会的要因が強く関連することは明らかであり、家族や職場から得られるソーシャル・サポートが自殺予防に重要であることは言うまでもない。他方、自殺を生じやすい遺伝的素因が存在することも

明らかにされており、それにストレスが加わることによって特有の脳の生物学的変化を生じ、自殺に至ると考えられている。事実、家系研究、双生児研究、養子研究によって自殺には遺伝的要因が強く働いていることが示されている。自殺の心理社会的側面に注目した対応策に関してはわが国でもいくつかの研究がなされつつあるが、遺伝的素因などの生物学的側面に関する研究は不十分である。

本研究は、分子遺伝学的手法を用いて、自殺行動ならびに自殺を生じやすい精神疾患の遺伝的素因を明らかにすることを目的とする。本研究では自殺を生じやすい精神疾患として、躁うつ病、精神分裂病と薬物依存症をとりあげた。自殺者の2/3以上が躁うつ病（単極型ないし双極型）であるとされ、躁うつ病患者のおよそ1 / 5は自殺するとされる。また、統合失調症は、生涯罹患率がおよそ1%であり、常時およそ70万人の患者がいるとされるが（厚生労働省推計）、そのうち10～15%が自殺という不幸な転帰をたどることが知られている。欧米による統計によれば、薬物依存症では概して一般人口より自殺の危険性が4倍以上高まることが知られている。

本研究によって、自殺行動や自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子が明らかになれば、自殺に至る脳の生物

学的変化に関する重要なつながりとなり、自殺の予防薬の開発などにおいて重要な知見を提供することが期待される。

B. 研究方法

1. サンプル収集（担当：全員）

自殺を惹起し易い精神疾患の患者のDNAサンプルを多数収集し、各症例について自殺未遂歴に関する情報を得ている。

サンプル収集に際しては倫理的側面に十分配慮した。すなわち、本研究は精神疾患患者、健常対照群を対象とした遺伝子解析研究であり、試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第1号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、研究施設での倫理委員会において承認に基づいて上で研究を行った。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理（匿名化）などを徹底した。

2. セロトニン系、GABA系遺伝子の検討（主たる担当：尾崎）

自殺の病因としてはセロトニン

(5-HT)系の異常が重要視されている。そこで、分担研究者の尾崎はセロトニン受容体の各サブタイプについて変異解析を行い精神疾患との関連を検討している。最近、5-HT_{5A}受容体のミスセンス変異を見出し、分裂病と強く関連することを見出した。また、GABA系遺伝子も精神疾患の病態と関連している可能性が強く示唆されている。本研究では、5-HT_{3A}、5-HT₄受容体およびGABA_A受容体遺伝子に関し、DHPLC法を用いた変異解析と精神疾患との関連解析を行った。

3. Chromogranin Bおよびカテコラミン系の遺伝子研究（主たる担当：稲田、尾崎）

稲田らは、最近、20番染色体短腕上のマーカーD20S95と統合失調症との間に連鎖不平衡が存在することを強く示唆する結果を得た。この染色体領域には中枢神経系の分化などにおいて重要な働きをしていることが示唆されているchromogranin B遺伝子がある。そこで、稲田はこの遺伝子の変異を解析し、統合失調症、躁うつ病、覚醒剤依存症との関連を解析した。

また、稲田はカテコラミンを代謝する酵素であるcatechol-O-methyl transferase (COMT)を候補遺伝子として、統合失調症との関連解析、抗精神病薬に対する治療反応性を検討し

た。尾崎はCOMTやドーパミン受容体(DRD2)などの遺伝子多型と抗精神病薬への治療反応性の関連を薬理遺伝学的に検討した。

4. 染色体異常を用いた研究(主たる担当:岡崎、功刀)

多くの遺伝性疾患が、転座や微小欠失などの染色体異常をてがかりに遺伝子がクローニングされてきた。そこで、岡崎は、長崎大の黒滝直弘医師を研究協力者として、三重県、長崎県での統合失調症患者をスクリーニングし、染色体異常例からの遺伝子の単離を試みる。今年度は、スクリーニング症例がまだ十分集積されていないので、逆に染色体構造異常と精神病(統合失調症、双極性障害)の関連が頻度高く報告されている染色体22q11領域の欠失の有無を、統合失調症患者について検討した。22q11に属する5個のマイクロサテライトマーカーのハプロタイプ解析を行い、欠失の可能性が示唆されたマーカーD22S446を含む領域を健常者リンパ芽球細胞染色体によりFISH解析を行った。

功刀は東大人類遺伝学教室と協力し、統合失調症圏の相互平衡転座例を株化し、分断点からの遺伝子クローニングを行っている。1例は統合失調症の連鎖領域として注目されている染色体8p21に分断点をもつ症例である

が、分断点がほぼ明らかになっている。今年度はその分断点を含む領域をシーケンスした。

5. 神経発達や神経可塑性と関連する遺伝子の研究(主たる担当:氏家、功刀、辻田)

神経発達や神経可塑性において重要な働きをする神経栄養因子やその受容体は、近年統合失調症や躁うつ病などの機能性精神病の病態発生と治療において重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで功刀・氏家・辻田は、神経栄養因子やその受容体をコードする遺伝子を候補として、機能性精神病との関連の可能性を検討する。初年度は、ニューロトロフィンのBDNF、NT-3及びその受容体であるp75を中心に検討を行った。また、辻田は神経発達の指標となり、統合失調症に多いことが指摘されている身体小奇形とニューロトロフィンとの関連についても検討を開始した。

また、薬物依存症の依存形成においては、神経ネットワークの構造変化が想定されている。そこで氏家は、覚醒剤の投与によって生じる遺伝子発現の変化についてシナプス形成や神経突起形成などに関与する遺伝子について動物を用いた検討を行った。

C. 研究結果

1. サンプル収集

氏家は、覚醒剤依存症の遺伝子研究を行う全国組織（JGIDA）を通じて収集し、本年度までに覚せい剤使用者171名の患者ゲノムサンプルが集まった。乱用のみが14名、依存が157名で、そのうち145名が薬物誘発性精神病を合併していた。また、対照コントロールも210名集めた。辻田は、統合失調症患者男性80名、女性56名の血液サンプルを収集し、DNA抽出を行った。

2. セロトニン系、GABA系遺伝子の検討

尾崎は、セロトニン(5-HT)系およびGABA系を候補遺伝子としてこれら遺伝子上の多型同定、各精神障害との関連解析を行った。また、抗精神病薬であるrisperidoneへの反応性と遺伝子多型との関連に関する薬理遺伝学的検討を行った。

その結果、5-HT_{3A}、5-HT₄受容体およびGABA_A受容体遺伝子上にも新たに多数の多型を同定し、関連解析を行った。このうち、5-HT₄受容体遺伝子上の多型を用いてハプロタイプ解析を行ったところ、覚醒剤使用障害および統合失調症との関連が示唆された。

3. Chromogranin Bおよびカテコラミン系の遺伝子研究

1) Chromogranin B

統合失調症を対象とした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において有意な差がみられた20番染色体上のマーカーD20S95の近傍に存在するchromogranin B遺伝子の変異検索を行い、5'側調節領域において5つの変異とexon 4に11個のアミノ酸置換を伴う変異を見いだした。これらの遺伝子変異について統合失調症患者187名と健常対照者192名を対象として症例対照群間比較を行った結果、exon 4の4つ変異において、互いの連鎖不平衡、および統合失調症との関連が認められた。このほか、双極性障害および覚醒剤精神病についても健常対照者との症例群間比較を行ったが有意な関連は見いだせなかった。

2) カテコラミン系の遺伝子

稲田は、カテコラミン類を代謝する酵素であるCOMT遺伝子の機能的ミスセンス変異と統合失調症との関連を検証したが、有意な関連を認めなかった。しかし、抗精神病薬の1日投薬量と遺伝子型との間に有意な関連を見出し、この遺伝子が1日投薬量を規定している可能性が示唆された。

尾崎は、risperidoneに対する治療効果と、5-HT_{2A}、DRD2、COMTにおける6つの遺伝子多型との関連を検討した

結果、risperidone による不安・抑うつ効果と DRD2 上の-141delC と *Taq I* A ハプロタイプとの有意な関連を見出した。

4. 染色体異常を用いた研究

岡崎らによる 22 番染色体に関する解析では、患者 33 人のうち 14 人に、コントロール群では 2 名に、D22S446 を含む領域の欠失を示唆する所見を得た。次にこの欠失が多型である可能性を調べるために健常者 20 名のリンパ芽球細胞の染色体を用いて、D22S446 を含む BAC クローン、RP11-47L16 をプローブとして FISH を行ったところ、同領域の欠失は確認されなかった。

功刀は、染色体8p21領域に分断点をもつ統合失調症例の株化細胞を用いて、分断点を含む領域のDNA塩基配列を得た（この領域はゲノムのドラフト・シーケンスでは塩基配列が決定されていない領域であった）。

5. 神経発達や神経可塑性と関連する遺伝子の研究

氏家は、欧米において関連が指摘されていたBDNF遺伝子のミスセンス変異と躁うつ病との関連を検討したが、欧米で得られた結果は再現されなかった。また、覚醒剤依存の依存形成に関わる遺伝子について検討し、アン

フェタミンの単回投与によって、シナプス形成のマーカである synaptophysin、神経突起形成のマーカ-stathnin、神経突起伸長のマーカ-arc、さらにMKP-1、MKP-3などの mRNAが脳内で増加していることを見出した。これらのうち、arc、MKP-1、MKP-3はアンフェタミンの慢性投与によっても高発現が持続することを示した。

功刀は、BDNF遺伝子の変異スクリーニングと統合失調症との関連について検討し、新たに見出した5'非翻訳領域の一塩基置換C270Tが統合失調症と有意に関連することを見出した。また、BDNFなどのニューロトロフィンの低親和性受容体であるp75の変異スクリーニングを行い、ミスセンス変異とサイレント変異を検出したが、ミスセンス変異と統合失調症との関連をみたところ有意な関連は見出されなかった。辻田も統合失調症とBDNF、NT-3との関連について検討中である。

D. E. 考察および結論

以上のような結果から、5-HT₄受容体遺伝子の変異と統合失調症との関連（尾崎ら）、chromogranin B遺伝子の変異と統合失調症との関連（稲田）、BDNF遺伝子の5'非翻訳領域の塩基置換と統合失調症との関連が示唆され（功刀）、これらが統合失調症

と関連する可能性について今後さらにサンプルを増やして検討する必要があると考えられた。

覚醒剤依存症に関しては、神経細胞の構造可塑性に関与する遺伝子が重要な候補遺伝子であることが示唆された（氏家）。

染色体異常のスクリーニング（岡崎）に関しては、次年度以降さらに症例を増やして検討を行う必要がある。また、染色体8p21上に分断点がある染色体異常症例の解析（功刀）は、次年度以降、変異スクリーニングを行い、統合失調症や躁うつ病との関連をみていく必要がある。

統合失調症と身体小奇形との関連やこれと神経栄養因子などの神経発達障害関連遺伝子との関連（辻田）についても次年度以降、引き続き症例を増やして検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（主要なものを選択）

Matsumoto S., Sasaki T., Imamura A., Matsuo K., Kayashima T., Hashida A., Ono S., Tsujita T., Matsumoto S., Nakane Y., Tokunaga, K., Okazaki Y: HLA class I distribution in Japanese patients with schizophrenia. *Am J Med Genet.* 114: 42-45, 2002

Fujimaru K., Imamura A., Tsujita T., Uruguchi M., Hashida A., Mori T., Matsumoto S., Okazaki Y., Nakane Y: Minor Physical Anomalies in Japanese Patients with Schizophrenia. *Acta Med. Nagasaki* 47: 133-137, 2002.

Yanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M, Ozaki N: Effects of DRD2, 5-HT2A, and COMT Genes on Risperidone Treatment Response. *The Pharmacogenomics Journal* (in press)

Suzuki T, Iwata N, Kitamura Y, Kitajima T, Yamanouchi Y, Ikeda M, Kamatani N, Ozaki N: Association of Novel Genetic Variants in the Serotonin 5-HT4 Receptor Gene (HTR4) with Japanese Schizophrenia. *Am J Med Genet* (in press)

Ujike H, Takaki M, Kodama M, Kurida S: Gene expression related to synaptogenesis, neuriteogenesis, and MAP kinase in behavioral sensitization to psychostimulants. Ali SF (ed.) *Cellular and Molecular Mechanisms of Drugs of Abuse II, Cocaine, Substituted Amphetamines, GHB, and Opiates.* Ann New York Acad Sci New York, 2002, pp. 55-67.

Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T, Katsu T, Tanaka Y, Hamamura T, Kuroda S Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. *Neurosci Lett* 337: 17-20, 2003.

Inada T, Nakamura A, Iijima Y:

Catechol-O-Methyltransferase (COMT)
Polymorphism and Schizophrenia: Possible
relation with the treatment-resistant subgroup.
Am J Med Genet (in press)

Kunugi H, Hirasawa H, Kato N, Nabika T,
Kobayashi S, Nanko S: Brain derived
neurotrophic factor gene and schizophrenia:
polymorphism screening and association
analysis. Schizophrenia Research (in press)

2. 学会発表 (主要なものを選択)

Ozaki N: Serotonergic candidate gene analysis
of amphetamine-related disorders. XII World
Congress of Psychiatry (Symposium)
Yokohama, August, 2002

Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y,
Ikeda M, Nishiyama T, Abe T, Ozaki N:
Mutation screening of the human 5-HT₄
receptor gene in Japanese schizophrenia. 10th
World Congress on Psychiatric Genetics.
Brussels, October, 2002

Yanouchi Y, Iwata N, Ozaki N: The
Pharmacogenetic prediction of risperidone
response and safety. 10th Meeting of the
Pacific Rim Association for Clinical
Pharmacogenetics (Symposium) Osaka, 2002

Ujike H, Inada T, JGIDA: Molecular Genetics
of Drug Addiction Vulnerability (Symposium)
Methamphetamine psychosis and
dopamine-related genes. XII World Congress
of Psychiatry, Yokohama, August, 2002.

Iijima Y, Inada T, Ohtsuki T, Kitao Y, Arinami
T: Mutation search of the chromogranin B gene
in schizophrenia. XII World Congress of
Psychiatry, Yokohama, August, 2002.

Kunugi H, Nanko S: Polymorphism screening
of the neurotrophin receptor p75 gene and
association analysis with schizophrenia. 10th
World Congress on Psychiatric Genetics,
Brussels, October, 2002.

Kunugi H, Nanko S: Possible role of the BDNF
gene in schizophrenia. XII World Congress of
Psychiatry, Yokohama, August 26, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

鈴木竜世, 岩田仲生, 尾崎紀夫: 核酸
試料中のセロトニン5-HT₄受容体遺伝
子の型を検出する方法. 出願番号: 特
願2002-327197 (平成14年11月)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子の解明

〔分担研究課題〕 染色体異常からのクローニング

分担研究者 岡崎 祐士（三重大学医学部精神神経科学・教授）

研究要旨

本研究の目的は、染色体構造異常（転座、欠失など）と精神病（統合失調症、双極性障害）を合併する症例や家系を発見し、疾患感受性遺伝子をクローニングしようとする計画である。精神疾患には遺伝的異種性が想定されているので、染色体構造異常近傍から見出される遺伝子が、表現型（合併精神病）を規定している可能性がある。このように合併精神病が染色体構造異常によってもたらされたと仮定し、染色体構造異常が遺伝子の翻訳領域や転写調節部位に切断点（ブレイクポイント）を有する症例を見出せるならば、切断点に跨る遺伝子やその近傍遺伝子が疾患感受性遺伝子である可能性が高い。このような仮説のもとに、所属の研究倫理委員会で承認された説明による同意を得て精神病を有する患者さんの末梢血を広く採取し、染色体構造異常のスクリーニングを行い、構造異常と精神病的合併例（孤発例及び家系列）を複数見出し、その染色体異常の細胞遺伝学的・分子遺伝学的検討を行う。今年度は、スクリーニング症例がまだ十分集積されていないので、逆に染色体構造異常と精神病（統合失調症、双極性障害）の関連が頻度高く報告されている 22q11 領域の欠失の有無を、統合失調症患者について検討した。22q11 に属する 5 個のマイクロサテライトマーカーのハプロタイプ解析を行い、欠失の可能性が示唆されたマーカー D22S446 を含む領域を健常者リンパ芽球細胞染色体により FISH 解析を行った。しかし、今のところ欠失の有無は確認できていない。

○本研究の目的

22q11.2 微細欠失は、DiGeorge 症候群、口蓋帆・心臓・顔症候群 (Velo-cardio-facial syndrome, VCFS)、円錐動脈幹異常顔貌症候群の原因で 22q11 欠失症候群を形成する。一方、22q11.1 欠失は統合失調症や双極性障害を高頻度に合併することから、この領域においてこれらの精神障害の責任遺伝子を同定する試みが繰り返されてきた。そもそも精神疾患は多因子遺伝と想定されており、疾患が単一遺伝病であるという大前提に立脚する染色体異常からの疾患遺伝子の同定法は、精神疾患の分子遺伝学的研究にはそぐわないと言う批判がある。また、後成的要因 (エピジェネティクス) が精神疾患の発症に関わるという予想もあり、シーケンスレベルでの遺伝子検索は重要ではないという議論も聞かれる。しかし、多因子疾患の可能性、エピジェネティックスの関与についてはそれらの可能性、あるいは予想されるといった報告は多数あるが、確固たる信頼できるデータの報告は、未だほとんどない。このような現状では、精神疾患の遺伝的異質性の可能性を考慮すると今なお、染色体異常からの遺伝子検索は意義を失っていないと考える。

□方法・対象

22q11 欠失症候群においては 25%以上の患者において精神障害を合併し、統合失調症の 2%以上において同欠失を認めるという報告がある。この領域には COMT, SNAP29, UFD1L などの疾患感受性を示唆される遺伝子がマップされており、現在でもなお、22q11 領域についての検討は精神障害の関連遺伝子を検索する際に重要であると考へ同領域の欠失に関する検討を行った。ここでの報告は欠失を確認するための予備実験である。22q11 にマップされるマイクロサテライトマーカの Linkage-Mapping Set-LD10 から選択した 5 個のマーカ、D22S420, D22S427, D22S539, D22S446, D22S1174 で ABI377 オートシーケンサーと Gene Scan プログラムを用いてハプロタイプ解析を試みた。なお本研究は関連施設での倫理委員会の承認のもと実施された。

□結果

その結果、患者 33 人の内、14 人に、コントロール群では 2 名に、D22S446 を含む領域の欠失を示唆する所見を得た。次にこの欠失が多型である可能性を調べるために健常者 20 名のリンパ芽球細胞の染色体を用いて、D22S446 を含む BAC クローン、RP11-47L16 をプローブとして FISH (in

situ 蛍光ハイブリダイゼーション) 解析を行ったところ、同領域の欠失は確認されなかった。

□考察

以上の結果から、現時点では患者、健常者両者における欠失の有無を確定するには至っていない。今後、より多くの健常者を対象とした FISH 解析において欠失の有無を確認すること、D22S446 の近傍の他のマーカーにおいて患者、および健常者のハプロタイプ解析を行うことを予定している。

○研究の今後の方向

顔面奇形や微小奇形 minor physical anomalies と精神病 (統合失調症、双極性障害) を合併表現型とする患者の末梢血における微小染色体異常例の細胞遺伝学的スクリーニング、及び遺伝子マーカーを用いた精神病 (統合失調症、双極性障害) 患者 DNA による分子遺伝学的微小染色体構造異常スクリーニングにより、孤発例及び家族例を発見し、ブレイクポイント周辺遺伝子等から、疾患感受性遺伝子のクローニングを行う。

○論文

1 . Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N,

Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita Ha HA, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura Ki K, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N : Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. Nat Genet 30:365-366, 2002

2 . Fujimaru K, Imamura A, Tsujita T, Uruguchi M, Hashida A, Mori T, Matsumoto S, Matsumoto S, Okazaki Y, Nakane Y: Minor physical anomalies in Japanese patients with schizophrenia. Acta Med Nagasaki 47 : 133-137,2003

○研究協力者

黒滝直弘 (長崎大学医学部原研遺伝学)

藤丸浩輔 (長崎大学医学部精神神経科)

Association of a Haplotype in the Serotonin 5-HT₄ Receptor Gene (HTR4) with Japanese Schizophrenia

T Suzuki¹, N Iwata¹, Y Kitamura^{2,3}, T Kitajima¹, Y Yamanouchi¹, M Ikeda¹, T Nishiyama¹, N Kamatani², N Ozaki¹ (分担研究者 尾崎紀夫)

¹Department of Psychiatry, Fujita Health University, Toyoake, Aichi, Japan;

²Division of Statistical Genetics, Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan; ³Mitsubishi Research Institute, Inc., Tokyo, Japan

ABSTRACTS

The serotonin 5-HT₄ receptor (5-HT₄) is implicated in cognitive function, of which impairment is hypothesized as one of the core disturbances of schizophrenia. Linkage analysis shows that 5q33.2, in which HTR4 is located, is schizophrenia-susceptibility loci. We therefore hypothesized that variation in the 5-HT₄ receptor gene (HTR4) modifies genetic susceptibility to schizophrenia. HTR4 coding regions and introns that include the branch sites of HTR4 were investigated in 96 unrelated Japanese schizophrenics using denaturing high-performance liquid chromatography analysis. One silent single nucleotide polymorphism (SNP) within the coding region and six intronic SNPs were detected. 353+6G>A was located in the branch site that could be effect to RNA splicing. None of the four SNPs in which rare-allele frequencies were more than 10% was associated with 189 schizophrenics, in comparison to 299 controls. However, a highly significant association between schizophrenia and haplotype A-T (OR= 0.13 [0.03-0.58]) was detected. These findings suggest that haplotype A-T itself may inhibit the occurrence of schizophrenia, or that another susceptible genetic variants may exist within linkage disequilibrium.

INTRODUCTION

Cognitive dysfunction has been regarded as an fundamental problem of schizophrenia [Andreasen et al. 1996; Andreasen et al. 1999; Elvevag and Goldberg 2000], therefore molecular mechanisms of cognitive function may have an important role in the pathophysiology of schizophrenia. The 5-HT₄ receptor (5-HT₄) is widely believed to be one of the important neurotransmission receptor which participates in cognitive function [Buhot 1997; Buhot et al. 2000].

Stimulation of cAMP, which is triggered by the activation of 5-HT₄, plays an important role of the hippocampal long-term potentiation (LTP) [Otmakhova et al. 2000] that is the basic cellular mechanism underlying learning and memory [Bliss and Collingridge 1993]. Added to this, the stimulation of cAMP also induces facilitation of acetylcholine release that is of importance for the mechanisms in memory functions. Augmentation of LTP formation induced by a 5-HT₄ agonist SC 53116 was prevented by selective 5-HT₄ antagonist GR 113808, as well as by scopolamine [Matsumoto et al. 2001]. From behavioral studies in rats, 5-HT₄ agonists and antagonists modulate the cognitive process in regard to short-term and long-term memory [Letty et al.

1997].

Genome wide linkage analysis confirms that there is strong support, from multiple studies, for schizophrenia-susceptibility loci on 5q33.2, [Kendler et al. 2000; Levinson et al. 2000; Gurling et al. 2001] in which HTR4 located in (5q31-5q33).

Furthermore, HTR4 is composed of five exons and produces nine splice variants, 5-HT_{4(a)}, 5-HT_{4(b)}, 5-HT_{4(c)}, 5-HT_{4(d)}, 5-HT_{4(h)}, 5-HT_{4(gef)}, 5-HT_{4(n)} (Figure 1) [Blondel et al. 1998; Claeysen et al. 1999; Bender et al. 2000; Vilaro et al. 2002]. These variants alter the mRNA expression levels at each brain area and have different pharmacological profiles, particularly in the hippocampus, thalamus and cerebellum [Medhurst et al. 2001; Vilaro et al. 2002]. These regions are important areas for cognitive function so that the discrepancies of the expression pattern of splice variants among individuals may reflect the diversity of the cognitive function.

Considering these findings, we selected HTR4 as a candidate gene for vulnerability to schizophrenia and searched polymorphisms in the HTR4 coding regions, as well as intronic branch sites that may influence the alternative splicing. We identified a silent mutation and six intronic single nucleotide polymorphisms (SNPs),

using the denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC) method [Spiegelman et al. 2000]. We also performed association and haplotype analysis to test that these SNPs have been associated with schizophrenia compared to ethnically matched controls.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

Subjects consisted of 189 patients with schizophrenia and 299 controls. The patients were recruited from psychiatric clinics of Fujita Health University Hospital. Consensus diagnosis according to DSM-IV by at least two experienced psychiatrists was made for each patient on the basis of unstructured interviews and information from medical records. None had severe medical complications or other Axis-I disorders according to DSM-IV. The controls, which were comprised of hospital staff and medical students, were not assessed for psychiatric symptoms by any structured interview method; however, they showed good social functioning and reported they were in good health. All subjects were unrelated to each other and ethnically Japanese. After description of the study, written informed consent was obtained from each subject. This study was approved by the Fujita Health University Ethics Committee.

SNP Identification

PCR amplification

Genomic DNA from the subjects was prepared using PUREGENER (Gentra systems, Minneapolis, MN55447, USA). Amplification of genomic DNA was accomplished with the primer pairs listed in Table III. These primer pairs amplify 17 regions that cover the entire 5-HT₄ coding sequence and adjacent intronic sequences including branch sites. Positions of the exon-intron boundaries were predicted based on the published human sequences, and the position of the splice variants were based on each splice variant. DNA amplification was performed using a GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems Japan Ltd., Tokyo, Japan). The reaction mixture was in a 12 µl volume containing a 40 ng sample DNA, 6 nM of each primer, 200 µM each dNTP, 1X PCR Gold Buffer, 1.5 or 2.5 mM MgCl₂, and 0.3 U of AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems Japan Ltd.). Initial denaturation at 95°C for 9 min was followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, primer annealing at each suitable temperature for 20 s, and primer extension at 72°C for 30 s, and a final extension reaction was performed at 72°C for 7 min.

dHPLC analysis

The PCR products were denatured at 95°C for 4 min, then cooled

to 25°C over 45 min. Only the heterozygous DNA, heteroduplexes were generated through hybridization. Each product was run on an automated WAVE™ dHPLC instrument equipped with a DNASep™ column (Transgenomic Japan Ltd., Tokyo, Japan). PCR products were separated at a flow rate 0.9 ml/min by means of a linear acetonitrile gradient. The column mobile phase consisted of a mixture of 0.1 M triethylamine acetate (pH7.0) with (buffer B) or without (buffer A) 25% acetonitrile. DNA elution was monitored by UV detection. The product's recommended temperature and Gradient parameters were calculated with the WAVE™ Maker program (version 3.3.4) of the WAVE™ instrument (Table III).

Cycle Sequencing

The PCR products were purified by two methods. One was as follows; the PCR products, which were predicted as heterozygous from the peak pattern of dHPLC analysis, were purified by WAVE™ instrument using an application of a Fragment Collector. We collected the peak on the Double Stranded Single Fragment method of WAVE™ condition, and then used Amplicon™ Microcon™-PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore Japan Ltd., Tokyo, Japan) in order to concentrate the collection up to 20 ng/μl. The other method was performed with

AdvanTage™ PCR Cloning Kit (Clontech Japan Ltd., Tokyo, Japan) and was carried out when the mutation was not found with a conventional method, although on the dHPLC analysis there was an apparent heteroduplex pattern. The PCR products were then sequenced with BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems Japan Ltd.) according to the manufacturer's instructions with an AMI PRISM™ 377 DNA sequencing system (Applied Biosystems Japan Ltd.)

SNP Genotyping

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

Table IV shows primer pairs, restriction enzymes, and condition used for PCR-RFLP assays. Assays for 353+6A and 508-36C were developed in which a base substitution was introduced adjacent to the codon of interest, creating an artificial restriction site to detect the presence of one allelic form [Haliassos et al. 1989]. One to three U of each restriction enzyme was added directly to the mixture after which the PCR amplicon was restriction enzyme digested in a total volume of 10 μl containing 1X recommended buffer for 3h at 37°C. DNA fragments were resolved by electrophoresis in a 6% acrylamide gel stained with ethidium bromide.

Primer extension using dHPLC

For 353+6A and 508-36C, PCR-RFLP was not suitable, because

the primer sets need to be modified. To analyze these two SNPs, primer extension methods using dHPLC [Hoogendoorn et al. 1999] were developed. PCR for the fragments was performed the same conditions described above, although the total volume was 6 μ l. Then PCR reactions were treated by 0.5 U of Shrimp Alkaline Phosphatase and 0.5 U of Exonucleases I (both from Amersham Japan Ltd., Tokyo, Japan) at 37°C for 60 min, after which the enzymes were deactivated by incubation at 80°C for 15 min in order to remove unincorporated primers and dNTPs. Primer extension reactions were carried out in 10 μ l containing 30 ng input PCR product, 25 μ M of the appropriate ddNTPs, 12.5 pmol primer and 0.25 U Thermo Sequenase (Amersham Japan Ltd.) in the buffer provided by the manufacturer. The reaction was carried out in a thermal cycler with an initial denaturation step of 1 min at 96°C for 10 s, 43°C for 15 s and 60°C for 1 min. At the end of thermal cycling, the reaction was heated to 96°C for 1 min and immediately placed on ice. PCR primer sets and nucleotide compositions are listed in Table III. Four μ l of primer extension reaction product was loaded at 70°C on an automated WAVE™ dHPLC instrument (Transgenomic Japan Ltd.).

Statistical analysis

Deviation from the genotype counts predicted by Hardy-Weinberg equilibrium expectations was tested using an exact test, as described by Weir [Weir 1996] and implemented in software written by Lewis and Zaykin (2001; Genetic Data Analysis (GDA), version 1.0 (d16c)). D (disequilibrium parameter), D' (standardized disequilibrium coefficient measurement) and Δ^2 (measure of disequilibrium) for pairwise linkage disequilibrium (LD) were calculated.

Estimation of the haplotype frequencies was performed by the expectation-maximization (EM) algorithm. LDSUPPORT, which implements the EM algorithm, is available for academic use from N.K. on request [Kitamura et al. 2002]. The genetic status of an individual concerning linked loci can be expressed by the combination of two haplotypes (diplotype configuration).

Association tests for single markers were performed using CLUMP [Sham and Curtis 1995] that calculates empirical P values by Monte Carlo procedure.

Haplotypes were assessed using odds ratios (ORs) and were calculated using the statistical software JMP (version 5.0, SAS Institute Japan, Tokyo). Hence, all ORs were calculated using the appropriate two-side test for the 2 x 2 contingency table. Multiple testing was corrected for 8 tests; 4 examining association analysis and 4 examining haplotype analysis.

An effect size was estimated by power, which was calculated using a statistical program prepared by Ohashi

J[Ohashi and Tokunaga 2001]. We assumed a significance level at 0.05 and penetrance of haplotype A-T and G-C to 0.04 and 0.01, respectively.

RESULTS

We analyzed HTR4 locus from the 96 Japanese schizophrenic patients for sequence variation using dHPLC followed by direct sequencing. We detected a silent polymorphism in exon 5 and six intronic SNPs, which were designated to '612A>G', '26+14T>C', '353+6G>A', '508-36T>C', 'd-25T>C', 'd+22G>A', and 'd+27,delT' (Figure 1). An intronic SNP '508-36T>C' locates in the consensus sequences of the branch site at 5' upstream from exon 5, that could be effect on the alternative splicing.

For rapid genotyping, PCR-RFLP and primer extension assays were developed. Typing 96 subjects by both PCR-RFLP and primer extension yielded identical results. In the 189 Japanese, the frequencies of the rare alleles 612G, 26+14C, 353+6A, 508-36C, valiant d-25C, alleles were 0.004, 0.1, 0.27, 0.28, 0.47, respectively. All genotype distributions were consistent with Hardy-Weinberg expressions in this ethnic population (Table I).

For ease of presentation and because we did not have sufficient resources to evaluate differences in frequency between rare genotypes, only

those with a frequency >10% were compared. In the 299 normal controls, the frequencies of the rare alleles 26+14C, 353+6A, 508-36C, valiant d-25C were 0.08, 0.26, 0.24, 0.42, respectively. No association was found between each variant and schizophrenia (Table I).

Following the concept of common disease-common variant common-origin hypothesis[Kruglyak 1999], several mutations of genes may participate in the etiology of schizophrenia and a combination of the SNPs may have an important meaning for this disorder. We examined LD with the four SNPs, '26+14T>C', '353+6G>A', '508-36T>C', 'd-25T>C'. Among them, '353+6G>A' and '508-36T>C' were tightly linked in LD ($D'=0.96$), therefore we analyzed haplotypes that consist of the two SNPs. Individual haplotypes were counted case and controls using LDSUPPORT software[Kitamura et al. 2002]. Estimated frequencies of 4 haplotypes were 71.7% (G-T), 26% (A-C), 1.5% (G-C), 0.8% (A-T), respectively in schizophrenic patients. We then compared case and control number to those with/without each haplotype. It was detected that haplotype A-T significantly decreased in schizophrenic patients than in the normal controls (Table II). Among 198 schizophrenics and 206 controls, there

were 15 controls had A-T haplotype, but only 2 schizophrenics had the A-T haplotype (corrected $P=0.014$, $OR=0.13$, 95% CI [0.03-0.58], effect size denoting by power =0.5).

DISCUSSION

The results of the present study may lead to two interpretations that 1) haplotype A-T inhibits the occurrence of schizophrenia, or 2) haplotype A-T is just a marker, and there are true common disease variations relating to schizophrenia within the areas constructed in the LD. For example, within 1 000 kb around HTR4, many genes are addressed including protein phosphatase 2 (formerly 2A), dihydropyrimidinase-like 3, interleukin 17B, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α (CaMKII), and casein kinase $\alpha 1$. Among them, CaMKII is required for hippocampal long-term potentiation (LTP) and spatial learning.[Rotenberg et al. 1996]

Genetic linkage results must be received with caution until replicated, or until convergent findings become available. One limitation of the study is the small effect size (power=0.5), although this result is consistent with the expected multigenic and multifactorial origins of schizophrenia. Another limitation is that population stratification can lead to spurious

associations between a phenotype and an unlinked genetic locus[Altshuler et al. 1998]. Despite the precaution of ethnic matching in this study, there may have been ethnic stratification bias between patients and controls. To avoid false positive results due to stratification, methods using control loci[Pritchard and Rosenberg 1999] are available for follow-up studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge helpful discussions with Dr. J Ohashi on several points in the paper. We thank Ms Y Zusho and Ms M Miyata for their technical supports. This work supported in part by research grants from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, The Ministry of Health, Labor and Welfare.

REFERENCES

- Altshuler D, Kruglyak L, Lander E. 1998.
Genetic polymorphisms and disease. *N Engl J Med* 338: 1626.
- Andreasen NC, Nopoulos P, O'Leary DS,
Miller DD, Wassink T, Flaum M. 1999.
Defining the phenotype of
schizophrenia: cognitive dysmetria
and its neural mechanisms. *Biol Psychiatry* 46: 908-20.
- Andreasen NC, O'Leary DS, Cizadlo T, Arndt