

200730033A

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

統合失調症の生物学的病態解明と予防・治療法の開発

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 功刀 浩

平成 20 (2008) 年 4 月

## 目 次

I.	総括研究報告	
	統合失調症の生物学的病態解明と予防・治療法の開発	1
	功刀 浩	
II.	分担研究報告	
	1. 統合失調症の候補遺伝子研究による治療標的分子の解明	12
	尾崎 紀夫	
	2. 統合失調症のメチル化解析	20
	陣野 吉廣	
	3. 統合失調症末梢血の遺伝子発現解析と診断法の開発	22
	岩田 仲生	
	4. 統合失調症における周産期障害の分子病態の解析と治療薬の開発	28
	那波 宏之	
	5. BDNF 関連分子測定系の確立	32
	小島 正己	
	6. 統合失調症リスク遺伝子の探索	34
	尾関 祐二	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV.	研究成果の刊行物・別刷	40

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

統合失調症の生物学的病態解明と予防・治療法の開発

主任研究者 功刀 浩

研究要旨

本研究の目的は、最先端の生物学的手法を用いて、統合失調症の病態を明らかにし、予防法や新たな診断・治療法を開発することを目的とする。その結果、以下のような成果が得られた。

主任研究者の功刀は、統合失調症患者と健常者を対象に、一連の高次脳機能検査として、WAIS-R（知能）、JART（病前知能）、WMS-R（記憶）、WCST（前頭葉機能）、TCI（気質・性格）、PPI（情報処理）等を施行した。その結果、統合失調症では知能や記憶・前頭葉機能、情報処理、運動機能が全般的に低下しており、平均すると80～90の指数になること、このような低下は病前から低下しているのではなく、発症によって低下することを明らかにした。また、気質・性格でも特徴的な傾向があることを見出した。

統合失調症患者のMRI画像（拡散テンソル画像を含む）を撮像した結果、脳室の拡大や非特異的脳構造の体積の減少、神経ネットワークの障害が存在することが示唆された。

鍵分子であるBDNF遺伝子の多型と統合失調症や中間表現型としての認知機能や脳構造との関連について解析した結果、BDNFのプロモーター領域にある多型が統合失調症の脆弱性と関連すること、さらにそのリスクとなる対立遺伝子は、言語性IQや注意集中力の低下とも関連することを見出した。分担研究の小島と共同してBDNFの前駆体と成熟型タンパクの血中濃度測定を行った。

さらに、統合失調症のリスク遺伝子を探索することを目的に、5万SNPsを用いてを用いたスクリーニングを行い、これまでに第3段階の解析をおおむね終了し、4つのリスク遺伝子を同定した。分担研究者の尾関は、統合失調症患者における遺伝子数の減少もしくは増加（copy number variation: CNV）を検出した。

分担研究者の那波は、周産期障害による統合失調症の発症仮説にもとづいて創薬シーズを探索し、上皮成長因子受容体シグナル阻害剤であるエモジンやプロスタグランジンの合成阻害剤であるセレコキシブの慢性経口投与が統合失調症治療に有効である可能性を示唆する動物実験結果を得た。

分担研究者の陣野は、ハロペリドールによる遺伝子発現の変化とそのDNAメチル化との関連について解析中である。

分担研究者の岩田は、統合失調症患者の末梢血で発現する遺伝子を網羅的に検索し、その発現プロファイルを解析した結果、4つの遺伝子発現プロファイルで精度78%の診断法が確立された。

分担研究者の小島は、前駆体BDNF (proBDNF) に関して、その定量法 (ELISA) を確立した。主任研究者功刀が保有するヒト血漿 800 検体およびマウスサンプルを用いたアッセイを行った。

分担研究者の尾崎は、DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, 32kDa) を候補遺伝子として統合失調症との関連を検討したが、有意な関連は認められなかった。しかし、遺伝子領域で観察されたコピー数の多型性について、今後のさらなる解析が必要であると考えられた。

#### 分担研究者

尾崎紀夫	名古屋大学大学院医学系研究科・教授
陣野吉廣	琉球大学大学院医科学研究科・教授
岩田仲生	藤田保健衛生大学 医学部・教授
那波宏之	新潟大学脳研究所・教授
小島正己	産業技術総合研究所・グループ・チーム長
尾関祐二	国立精神・神経センター・室長

治療・予防法を開発することは、厚生労働行政上極めて重要な課題である。本研究は、最先端の生物学的手法を用いて、統合失調症の病態を明らかにし、予防法や新たな診断・治療法を開発することを目的とする。

統合失調症の病因として遺伝的要因が強く関与するとされ、脳由来神経栄養因子 (BDNF) などの有力な遺伝子が報告されており、本研究ではこのような分子の役割について詳細に解析し、診断・治療法の開発につながる知見を得る。いっぽう、統合失調症の発病脆弱性は既報の遺伝子だけでは説明できない。そこで、ヒトゲノム全領域をカバーする網羅的遺伝子関連解析や候補遺伝子研究を行うほか、患者血液サンプルの網羅的遺伝子発現解析を行い、未知の感受性遺伝子や病態に強く関与する鍵分子を同定する。感受性遺伝子については、神経心理学的所見、神経生理学的所見、脳画像所見、血液中の発現などとの関連について詳細に調べるとともに、動物・細胞レベルでの分子生物学的解析を行い、

#### A. 研究目的

統合失調症の生涯罹患率はおよそ1%であり、わが国では約70万人が治療を受けており、入院患者数(21万人)はあらゆる病気の中で最も多い。医療費による国家の直接的経済損失や職業的機能障害などによる間接的経済損失も莫大である。このような現状であるのは、統合失調症の根本的治療法や発症予防法が無いためであり、病気の本態を解明し、新たな診断・

その機能を明らかにすることをめざしている。

## B. 研究方法

1) ヒト研究試料の収集と統合失調症の高次脳機能異常の解明： 国立精神・神経センター武蔵病院において治療中の統合失調症患者と健常者を対象として、ゲノム DNA、血液中の RNA、血漿サンプルを多数収集するとともに、神経心理学的テストバッテリー（WAIS-R、ウエックスラー記憶力検査、実行機能[WCST]など）を用いた認知機能所見、プレパルス抑制テストを用いた感覚・運動ゲイティング機能の測定、MRI による脳構造や脳機能画像所見などの多次元データを収集し、統合失調症における脳構造異常と高次脳機能異常を明らかにしている。今年度は、病前 IQ を推定できる JART (Japanese adult reading test)を用いて、統合失調症にみられる知的機能の低下が発症前から存在するのか、発症によって低下するかについて検討した。

2) 有力候補遺伝子の解析： BDNF 遺伝子の機能的多型 (BDNF-linked complex polymorphic region: BDNF-LCPR)と統合失調症との関連、高次脳機能機能との関連について解析した。

3) 網羅的遺伝子関連解析： 昨年度までに統合失調症患者 105 例と年齢・性がマッチした健常者 105 例（第一スクリーニング）、患者 100 名と健常者 89 名（第二スクリーニング）を用い

て 5 万 SNPs（一塩基多型）を一度にタイプングできる遺伝子チップ（アフィメトリックス社の GeneChip Human Mapping 50K Array Xba 240）を用いてゲノムワイドな遺伝子関連解析を概ね終了していた。今年度はこの結果に基づき、両スクリーニングで  $p < 0.05$  を示した 154 個の SNPs について、統合失調症患者 485 名と健常対照者 813 名のサンプル（確認セクション）で TaqMan 法により順次タイプングを行っている。今年度は遺伝子上に存在する SNPs について終了した。

なお、上記遺伝子 chip を用いた解析では遺伝子のコピー数の異常も検出可能であり、これについては分担研究者の尾関の分担研究報告書に詳細に記載した。

4) 末梢血の網羅的遺伝子発現解析： 統合失調症患者 15 例、健常者 15 例の末梢血を芽球化し、そのサンプルから RNA を抽出し、およそ 5 万の遺伝子転写産物の発現プルファイルについてマイクロアレイ（Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array）を用いて解析している。解析ソフトウェアは GeneSpring GX 7.3.1 とパスウェイ解析に IPA5.5 を使用している。

（倫理面への配慮）

本研究の主要部分は、精神疾患患者、健常対照群を対象とした遺伝子解析研究を含む臨床研究である。遺伝子解析研究では、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、経済産業省による「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、倫理審査委員会において承認を受けた上で研究を行っている。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）などを徹底している。また、脳画像、認知機能検査、生理機能検査などのデータ収集に際しては、「臨床研究に関する倫理指針」に準拠した研究計画によって、倫理審査委員会での承認を受けて行っている。動物実験についても研究機関の倫理委員会の審査を経て行っており、苦痛を最小限にするなどの必要な処置を講じている。

#### C. D. 研究結果、考察

##### 1) 統合失調症の高次脳機能異常の解明：

①認知機能障害：統合失調症における知能低下、記憶障害、実行機能の障害、性格・気質の障害について明らかにした。また、病前 IQ を推定する JART を用いて、IQ や記憶力の低下が発症前から存在するのか、発症によって低下するのかについて明らかにした。その結果、推定病前 IQ がマッチした統合失調症患者と健常者を比較すると、現在の IQ や記憶力は、患者群で健常者より有意に低く、特に記憶力の低下

が目立った（図1）。このことから、統合失調症患者は発症によって IQ や記憶力が低下し、特に記憶の低下が強いことが示唆された。

性格・気質については、クローニンジャーの TCI によって測定を行った結果、統合失調症患者においては新奇性追求の低下、報酬依存の低下、損害回避の増加、自己超越性の増大などの特徴があることが明らかになった（図2）。

統合失調症の運動機能について normal drawing test、pegboard test、finger movement test などによって調べると、統合失調症患者ではこれらの運動機能が著明に障害されており、特に器用な運動が障害されていることが明らかになった。

以上の結果から統合失調症は知能、記憶、運動ともに健常者と比較して著明な機能障害があり、「汎高次脳機能障害」をもつといえる。気質・性格面では探求性が乏しい、危険を回避する傾向、神秘的な考えに捉われる傾向などをもつことが明らかになり、これによって社会的機能が種々の障害を受けている可能性が示唆された。

②感覚・運動ゲイティング異常：これまでに 450 名の被験者に対して日本の測定機器によるブレパルス抑制テストを施行し、日本人統合失調症患者でも異常があることを立証した。これは世界最大級のデータベースである。一方、うつ病患者では PPI の低下はみられず、鑑別に有用であることが示唆された（図3）。

2) 統合失調症有力遺伝子 BDNF の解析：われわれは昨年度までに、BDNF の新しい機能的多型を見出し(BDNF・LCPR)、それが転写活性に影響を与えることや双極性障害と関連することについて報告してきた。今年度は、統合失調症の大規模サンプルを用いて解析し、この多型が統合失調症と関連すること(表1)、健常者の注意・集中力や言語性 IQ と関連することを見出した(図4)。

また、BDNF タンパクは前駆体と成熟体とでは機能が著しく異なることから、分担研究者の小島と共同で血中の BDNF 前駆体タンパクの濃度測定を行った(小島による分担研究報告書を参照)。

3) 網羅的遺伝子解析：今年度は遺伝子上に存在する SNPs について確認セクションによる解析を終了した。その結果、4つの遺伝子が統合失調症と関連することが示唆された。遺伝子 A は細胞接着に関与する分子( $p=0.031$ )、遺伝子 B は軸索ガイダンスに関与する分子( $p=0.024$ )、遺伝子 C はプリン代謝に関与する分子( $p=0.005$ )、遺伝子 D はグリシン代謝に関与する分子( $p=0.007$ )であった。

4) 末梢血の網羅的遺伝子発現解析：抹消血芽球化サンプルにおける統合失調症と健常者の遺伝子発現には多数の遺伝子の差異がみられたが、パスウェイ解析を行った結果、最も変化

が大きいのは PI3K, Ras, JNK などを中心としたネットワークであり、次のネットワークは MAPK, AKT, PDGF やインシュリンといった成長因子の系(発達系の分子)であった。

## E. 結論

統合失調症、健常者の血液サンプル(DNA, RNA, 血漿)を多数収集した。統合失調症における知能低下、記憶障害、実行機能などに重度の認知機能障害があることや、プレパルス抑制テストによって感覚・運動ゲイティング異常について明らかにした。また、上記の認知機能障害は、発症前から存在するのではなく、発症によって低下することが示唆された。

BDNFは統合失調症の有力な遺伝子であることが示唆された。注意・集中力や言語性 IQ といった知的機能とも関連することから、統合失調症やその認知機能障害の治療標的であることが示唆される。

網羅的遺伝子解析によって統合失調症と有意に関連するSNPsを4つ同定した。今後、さらに独立なサンプルでの関連の確認や、動物・細胞を用いた機能解析を行っていく必要がある。

末梢血の網羅的遺伝子発現解析も進行中である。これによって、病態において重要な役割を果たしている遺伝子を同定することができるとともに、診断法の開発につながる可能性がある。

## F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表 (主なもの)

Nunokawa A, Watanabe Y, Kitamura H, Kaneko N, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N, Kunugi H, Itokawa M, Ozaki N, Someya T: Large-scale case-control study and meta-analysis of a functional polymorphism in the glutamate receptor, metabotropic 3 gene in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* (in press)

Hiroaki Hori, Hiroko Noguchi, Ryota Hashimoto, Shigeo Okabe, Osamu Saitoh, Hiroshi Kunugi: IQ decline and memory impairment in Japanese patients with chronic schizophrenia. *Psychiatry Research* (in press)

Numata S, Ueno SI, Iga JI, Yamauchi K, Hongwei S, Hashimoto R, Takeda M, Kunugi H, Itakura M, Ohmori T: TGFBR2 gene expression and genetic association with schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 2007 Jun 7; [Epub ahead of print]

Hori H, Noguchi H, Hashimoto R, Nakabayashi T, Saitoh O, Murray R.M., Okabe S, Kunugi H: Personality in schizophrenia assessed with the Temperament and Character Inventory (TCI).

Midorikawa A, Hashimoto R, Noguchi H, Saitoh O, Kunugi H, Nakamura K: Impairment of motor dexterity in schizophrenia assessed by a novel finger-movement test. *Psychiatry Research* (in press)

Hashimoto R, Mori T, Nemoto K, Moriguchi Y, Noguchi H, Nakabayashi T, Hori H, Harada S, Kunugi H, Saitoh O, Ohnishi T: Abnormal microstructures of the basal ganglia in schizophrenia revealed by diffusion tensor imaging. *World J Biol Psychiatry* (in press)

Ozeki Y, Mizuguchi T, Hirabayashi N, Ogawa M, Ohmura N, Moriuchi M, Harada N, Matsumoto N, Kunugi H: A case of schizophrenia with chromosomal microdeletion of 17p11.2 containing a myelin-related gene PMP22. *The Open Psychiatry Journal* 2: 1-4, 2008.

Hashimoto R, Hashimoto H, Shintani N, Chiba S, Hattori S, Okada T, Nakajima M, Tanaka K, Kawagishi N, Nemoto K, Mori T, Ohnishi T, Noguchi H, Hori H, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Nakabayashi T, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Weinberger DR, Kunugi H, Baba A: Pituitary adenylate cyclase-activating



- polypeptide is associated with schizophrenia.  
Mol Psychiatry 12 (11):1026-1032, 2007
- Tamura Y, Kunugi H, Ohashi J, Hohjoh H.  
Epigenetic aberration of the human REELIN  
gene in psychiatric disorders. Molecular  
Psychiatry 12(6):519, 593-600, 2007.
- Kunugi H, Tanaka M, Hori H, Hashimoto R, Saitoh  
O, Hironaka N: Prepulse inhibition of acoustic  
startle in Japanese patients with chronic  
schizophrenia. Neuroscience Research  
59(1):23-28, 2007. Epub 2007 May 25.
- Fujii T, Iijima Y, Kondo H, Shizuno T, Hori H,  
Nakabayashi T, Arima K, Saitoh O, Kunugi H.  
Failure to confirm an association between the  
PLXNA2 gene and schizophrenia in a Japanese  
population. Progress in  
Neuropsychopharmacology and Biological  
Psychiatry 2007 May;31(4):873-7. Epub 2007  
Feb 7.
- 功刀浩：統合失調症の認知障害と分子生物学。  
Schizophrenia Frontier 8 (4): 292-296, 2008.
- 功刀浩：脳由来神経栄養因子遺伝子多型とスト  
レス脆弱性。精神神経学雑誌 109 (8) 771-776,  
2007.
- (学会発表：主なもの)
- Hashimoto R, Noguchi H, Hori H, Nakabayashi T,  
Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Kosuga A, Tatsumi  
M, Kamijima K, Harada S, Takeda M, Kunugi H:  
Genetic variations in the dysbindin gene are  
associated with human memory performance.  
Silver Congress of the International  
Psychogeriatric Association, Osaka, Japan, Oct  
15, 16, 2007.
- Ozeki Y, Matsumoto N, Hirabayashi N, Kondo H,  
Shizuno T, Hori H, Arima K, Saitoh O, Kunugi  
H: Chromosomal microdeletion of schizophrenia.  
XV World Congress on Psychiatric Genetics,  
New York, USA, Oct 10, 2007.
- Iijima Y, Noguchi H, Okada T, Hashimoto R,  
Shizuno T, Hori H, Kunugi H: Association  
between BDNF-linked complex polymorphic  
region (BDNF-LCPR) and cognitive function.  
XV World Congress on Psychiatric Genetics,  
New York, USA, Oct 8, 2007. (Young  
Investigator Award 受賞)
- 橋本亮太、服部聡子、室谷知孝、松崎伸介、石  
塚智子、熊本奈都子、大井一高、井池直美、  
安田由華、遠山正彌、大和谷厚、功刀浩、武  
田雅俊：統合失調症脆弱性遺伝子ディスバイ

ンジンによる統合失調症の病態解明研究. 第  
3回日本統合失調症学会、東京、3月14日、  
2008.

橋本亮太, 功刀浩, 馬場明道: PACAP 遺伝  
子は統合失調症と関連する. 第30回日本神  
経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・  
第17回日本神経回路学会大会 合同年会、  
横浜、2007年9月11日.

安達直樹, 沼川忠広, 熊丸絵美, 泉愛子, 功刀  
浩: フェンサイクリジンによる培養大脳皮質  
ニューロンからの急速なグルタミン酸放出  
の増加とBDNFの発現上昇. 第30回日本神  
経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・  
第17回日本神経回路学会大会 合同年会、  
横浜、2007年9月10日.

橋本亮太, 服部聡子, 室谷知孝, 松崎伸介, 石  
塚智子, 熊本奈津子, 武田雅俊, 遠山正彌,  
大和谷厚, 功刀浩: 統合失調症脆弱性遺伝子  
であるデイスバインジン欠損マウスにおけ  
る異常行動. 第29回日本生物学的精神医学  
会・第37回日本神経精神薬理学会合同年会、

札幌, 7.11, 2007

橋本亮太, 沼川忠広, 大西 隆, 熊丸絵美, 矢  
ヶ崎有希, 石本哲也, 森 健之, 根本清貴,  
安達直樹, 泉 愛子, 鈴木竜世, 岩田仲生,  
尾崎紀夫, 田口隆久, 神谷 篤, 小菅麻子,  
巽 雅彦, 上島国利, 澤 明, 功刀 浩: DISC1  
遺伝子 Ser704Cys 機能多型はうつ病のリスク、  
ヒトの脳構造、神経細胞保護に影響を与える.  
第29回日本生物学的精神医学会・第37回日  
本神経精神薬理学会合同年会, 札幌, 7.13,  
2007

飯嶋良味, Richards Misty, 岡田武也, 近藤仁美,  
志津野朋子, 亀ヶ谷洋子, 堀 弘明, 中村哲  
夫, 有馬邦正, 斉藤 治, 功刀 浩: 統合失調  
症における Epsin 4 (ENTH) 遺伝子多型の関  
連. 第29回日本生物学的精神医学会・第37  
回日本神経精神薬理学会合同年会, 札幌, 7.12,  
2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 推定病前IQ (JARTによる) をマッチさせた患者/健常者の現在のIQ と記憶力

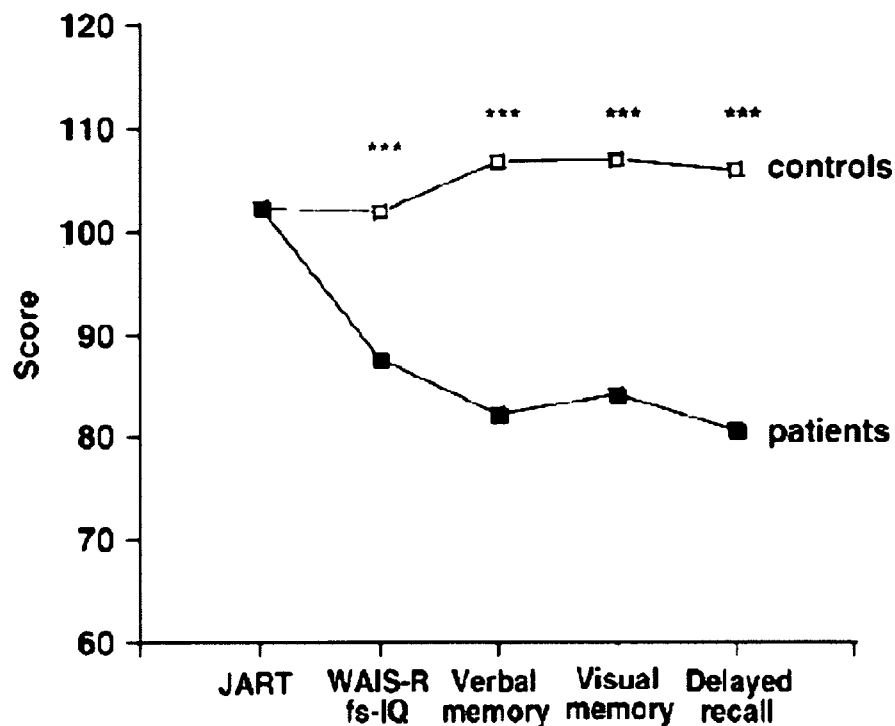
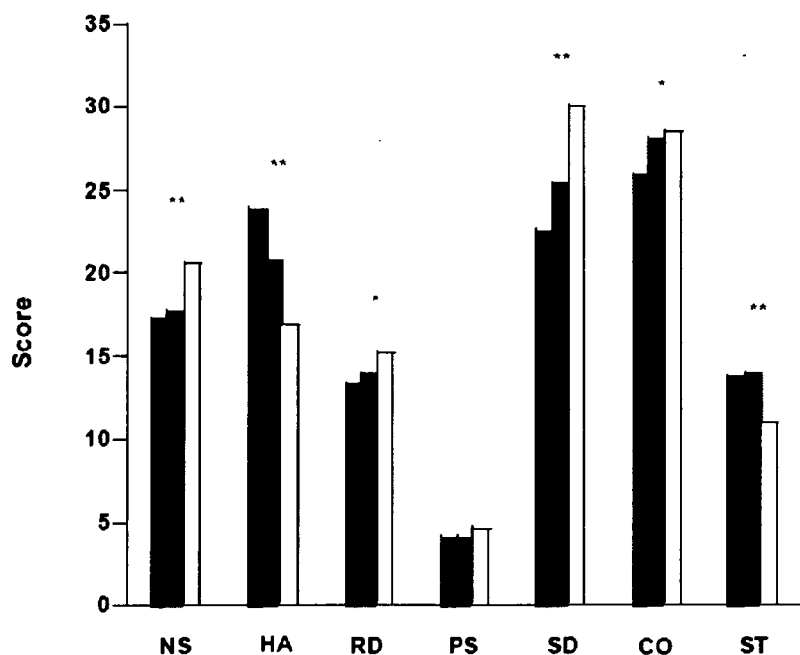
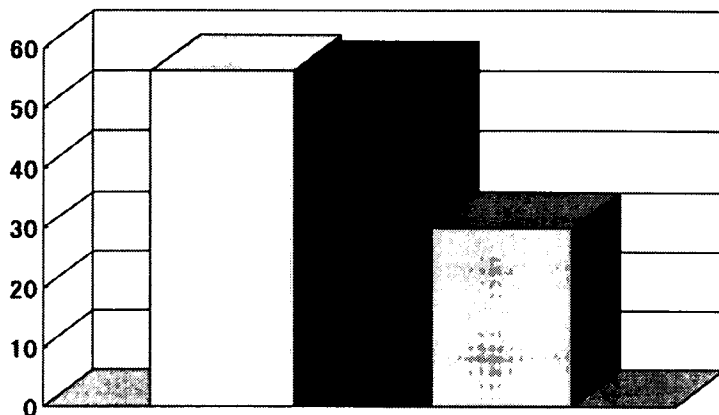


図2 統合失調症患者の気質・性格



NS 新奇性追求 ; HA 損害回避 ; RD 報酬依存 ; PS 持続性 SD 自己志向 CO 良心性 ST 自己超越性 (黒 : 統合失調症男性、灰色 : 統合失調症女性、白 : 健常者)

図3 統合失調症患者、うつ病患者、健常者におけるプレパルス抑制テスト所見  
(パルス-プレパルス間隔が 120msec でプレパルスが 90dB の条件)



(左：健常者 中：うつ病患者 右：統合失調症)

表1 BDNF 遺伝子多型と統合失調症との関連

	n	Genotype count (frequency)			P
		Del/Del	Del/4,5	4,5/4,5	
統合失調症	n=927	23 (0.025)	157 (0.169)	744 (0.823)	0.005
コントロール	n=908	7 (0.008)	176 (0.194)	728 (0.802)	

図4 健常者における認知機能と BDNF 遺伝子多型の関連 (注意集中力：p<0.01；言語性 IQ：p<0.05)

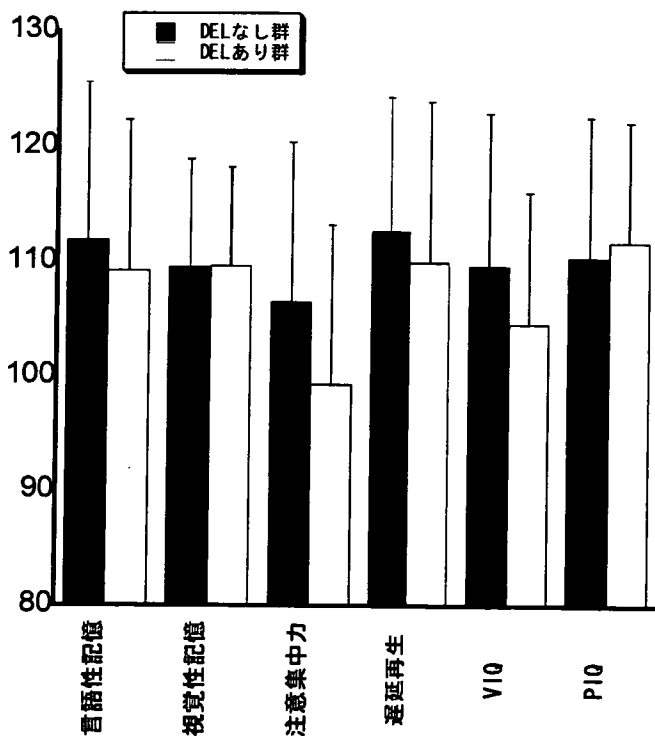
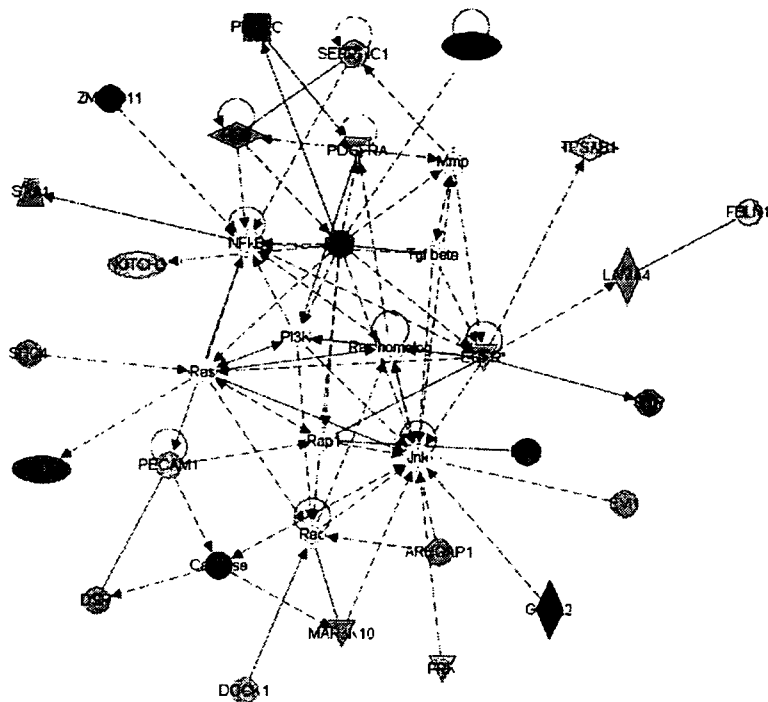


図5 抹消血芽球化サンプルにおける統合失調症と健常者の遺伝子発現の差異によるパスウェイ解析  
 a) 最も変化が大きいのはPI3K, Ras, JNK などを中心としたネットワーク

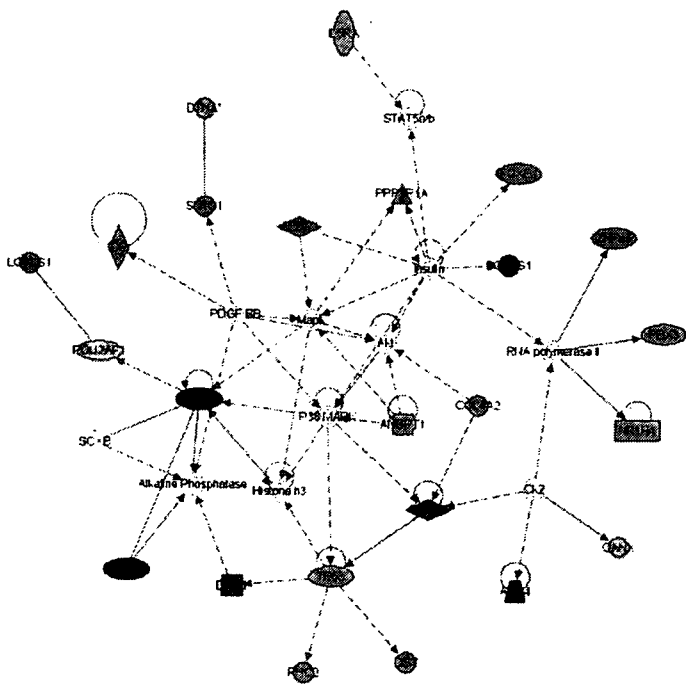
Network 1 All Samples 1.2 fold up/down - 2007-11-15 04:28 PM All Samples 1.2 fold up/down.txt



© 2000-2007 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

b) 第二のネットワーク (発達系の分子で MAPK, AKT, PDGF やインシュリンといった成長因子の系)

Network 2 All Samples 1.2 fold up/down - 2007-11-15 04:28 PM All Samples 1.2 fold up/down.txt



© 2000-2007 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

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

統合失調症の候補遺伝子研究による治療標的分子の解明

分担研究者 尾崎紀夫  
名古屋大学 大学院医学系研究科 教授

研究要旨

DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, 32kDa) はドパミン作動性神経系やグルタミン酸作動性神経系など多岐にわたる細胞内情報伝達に重要な役割を果たしており、連鎖解析や死後脳解析の結果から DARPP-32 遺伝子 (*PPP1R1B*) の発現調節が様々な精神疾患 (統合失調症、双極性障害など) の発症脆弱性に関与する可能性が示唆されている。本研究では、統合失調症および双極性障害を対象として、*PPP1R1B* 遺伝子多型と各疾患との関連解析を行った。その結果、*PPP1R1B* 遺伝子多型と統合失調症との関連は認められなかった。一方、双極性障害に関してボンフェローニ検定 (Bonferroni test) による統計値 ( $p$  値) の補正後においても rs12601930 (遺伝子型  $p = 0.000588$ ) および rs907094 (対立遺伝子  $p = 0.040$ ) について有意な関連が認められた。関連が認められた SNP について、独立したサンプル群を用いて検証したところ、いずれにおいても有意な関連は認められなかった。コピー数多型解析において *PPP1R1B* には、遺伝子のコピー数の多型性が認められたことから、遺伝子のコピー数の多型性が遺伝子型の解析に影響を及ぼす可能性が推察される。

結論として、*PPP1R1B* 遺伝子多型と各疾患との間には関連は認められないことが示唆された。一方で、*PPP1R1B* 遺伝子領域で観察されたコピー数の多型性について、今後のさらなる解析が必要であると思われる。

A. 研究目的

統合失調症および双極性障害の発症には、ドパミン作動性神経系、セロトニン作動性神経系やグルタミン酸作動性神経系の機能異常が関与していることが報告されている。DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, 32kDa) は、大脳基底核の線条体に選択的に発現するリン酸化タンパク質であり、Thr34 残基が PKA によりリン酸化されることによりプロテインホスファターゼ-1 の活性を抑制する。ドパミンやセロトニンをはじめとする神経伝達物質は DARPP-32 リン酸化反応および

PP-1 活性の調節 (DARPP-32/PP-1 情報伝達機構) を介して線条体におけるドパミン作動性神経やセロトニン作動性神経の機能を調節している。最近では、グルタミン酸が結合する受容体の1つである N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体の活性化が細胞内情報伝達系を介して DARPP-32 Thr34 残基の脱リン酸化を促進することが示唆されており、DARPP-32 はグルタミン酸作動性神経系も調節していることが報告されている。このように DARPP-32 は、ドパミン作動性神経系、セロトニン作動性神経系やグルタミン酸作動性神経系の機能を調節している細胞内情報伝達物質の1つであり、各疾患の発症に関与

していると報告されている。

DARPP-32 は、大脳皮質領域の中でも前頭前皮質 (PFC) や帯状回に多く発現しており、その発現異常は PFC の体積減少や活性低下、作業記憶、実行機能などの高次機能連合に影響をおよぼすことが示唆されている。統合失調症患者および双極性障害患者の死後脳解析において背外側前頭前皮質の DARPP-32 の発現が減少していること、DARPP-32 遺伝子の高頻度ハプロタイプ (CGCACTC) が統合失調症と有意に関連していることが報告されている。このハプロタイプを有する健常人では、線条体 (特に腹側被殻領域) の体積の減少や作業記憶課題 (N-back) 中の脳活性の低下などが認められている。DARPP-32 遺伝子 (*PPP1R1B*) の位置する染色体部位 (17q12) は統合失調症および双極性障害の発症脆弱性遺伝子座位であることが示唆されている。

一方、DARPP-32 欠損マウスを用いた研究では DARPP-32 欠損マウスの発育や中枢神経の形態には異常は認められないが、DARPP-32 欠損マウスにおいて依存性薬物の覚醒剤やコカインによって惹起される運動過多の増強の減弱、ドパミン受容体作動薬によるケージ登り行動の減少が認められたこと、また、野生型マウスにおいて強制水泳試験における意欲の低下 (無動状態) は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬あるいは新規抗精神病薬によって緩解されるが、DARPP-32 欠損マウスにおいては抗うつ薬投与による無動状態の緩解作用が減弱することから、DARPP-32 はドパミンあるいはセロトニンなどの神経伝達物質を介した細胞内情報伝達機構に重要な役割を担うことが示唆されている。

以上の知見から、DARPP-32 の発現低下あるいは機能低下は、ドパミン作動性神経系、セロトニン作動性神経系あるいはグルタミン作動性神経系などを介した細胞内情報伝達系を障害し、統合失調症、双極性障害あるいは覚醒剤精神病で認め

られる様々な精神興奮症状 (幻覚、妄想、気分の高揚など) や精神抑制症状 (興味・意欲の低下、抑うつ気分など) に影響をおよぼしている可能性が示唆される。

本研究では、統合失調症患者および双極性障害患者を対象として *PPP1R1B* 遺伝子多型との関連解析を行った。さらに近年、多くの遺伝子においてコピー数多型 (CNV) の存在が認められていることから、SNP の遺伝子型の同定の精度に影響を及ぼすことが想定される。したがって、ハーディ-ワインベルグ平衡から逸脱した SNP については、その周辺におけるコピー数を解析することによって遺伝子型同定に与える影響について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

統合失調症患者 377 名、双極性障害患者 318 名および健常者 384 名を対象とした。双極性障害において有意な関連が認められた SNP については、双極性障害患者 366 名、健常者 370 名を対象として再度検証した。コピー数の解析においては、統合失調症患者 24 名、双極性障害患者 24 名および健常者 24 名を対象とした。さらに独立したサンプル群各 72 名ずつを対象として追加解析を行った。

各疾患の診断は DSM-IV に基づいて行い、すべての対象者からは十分な説明の後、文書による同意を得た。尚、本研究を実施するにあたり、名古屋大学医学部、藤田保健衛生大学医学部および理化学研究所における各倫理委員会の承認を得た。

### 2. LD 解析および tagging SNP の選出

Hap Map データベース [release #21a; phase II, January 2007, Japanese in Tokyo, minor allele frequency (MAF)>0.05] および NCBI データベースより DARPP-32 遺伝子の全エクソンお

よびプロモーター領域を網羅する SNP に関して LD 解析を行い、Haploview 3.32 を用いて Tagger プログラム「pairwise tagging only  $r^2 > 0.8$ 」の基準に従い tagging SNPs を選出した。

### 3. 遺伝子型解析

tagging SNP の遺伝子型は PCR-RFLP 法および TaqMan 法により同定した。

### 4. コピー数解析

コピー数の解析は、ハーディ-ワインベルグ平衡から逸脱した SNP (rs12601930) の 200 塩基上流を検出領域として行った。プロスタグランジントランスポーター遺伝子 (*SLCO2A1*) を内在性コントロール遺伝子とし、 $\Delta\Delta$ Ct 法にて解析した。

### 5. 統計学的解析

tagging SNP の連鎖不平衡解析、対立遺伝子頻度の関連解析および各遺伝子多型のハーディ-ワインベルグ平衡からの逸脱の評価は Haploview 3.32 を用いて行った。対立遺伝子頻度、遺伝子型頻度の関連解析は  $\chi^2$  検定を用いた。ハーディ-ワインベルグ平衡から逸脱した遺伝子型の関連解析には、コ克蘭-アーミテージ傾向検定を用いた。ハプロタイプの解析は、Haploview 3.32 を用いて LD ブロックを定義した後、ブロック内の頻度が 5% 以上のハプロタイプについて Unphased version 2.403 により解析した。すべての統計解析における有意水準を  $p < 0.05$  とし、多重比較の補正にはボンフェローニ検定を用いた。検出力の計算は、Genetic Power Calculator を用いて算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、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を受けた上で研究を行った。

## C. 研究結果

統合失調症群において各 tagging SNP の対立遺伝子頻度、遺伝子型頻度およびハプロタイプ頻度について解析したところ、いずれにおいても有意な関連は認められなかった。双極性障害患者群の対立遺伝子頻度において 1 つの SNP に有意な関連が認められ(rs907094:  $p = 0.036$ )、遺伝子型頻度においては 2 つの SNP に有意な関連が認められた (rs12601930:  $p = 0.000147$ , rs907094:  $p = 0.010$ )。ハプロタイプ解析においても有意な関連が認められた (global  $p = 0.030$ )。ボンフェローニ検定による  $p$  値の補正後において、rs12601930 (対立遺伝子  $p = 0.000588$ ) および rs907094 (対立遺伝子  $p = 0.040$ ) について有意な関連が認められた。健常者群にて rs12601930 がハーディ-ワインベルグ平衡から逸脱していたため、この SNP についてはコ克蘭-アーミテージ傾向検定を用いて遺伝子型の解析を行った。その結果、有意な関連は認められなかった (Armitage's  $p = 0.804$ )。遺伝子型頻度において有意な関連が認められた 2 つ SNP (rs12601930, rs907094) について、独立したサンプル群 (双極性障害患者 366 名、健常者 370 名) を用いて検証したところ、対立遺伝子頻度、遺伝子型頻度およびハプロタイプ頻度のいずれにおいても双極性障害との有意な関連は認められなかった。なお、追加した健常者サンプル群において、ハーディ-ワインベルグ平衡からの逸脱は認められなかった。検出力の解析では、統合失調症および双極性障害における遺伝子型相対危険度の範囲がそれぞれ 1.35 から 1.51、1.24 から 1.39 であり、80% より大きい検出力が得られた。

コピー数解析の結果、統合失調症患者群、双極性障害患者群および健常者群において遺伝子コピー数に変異が認められた。独立したサンプル群



を追加して再検討したところ、統合失調症患者群、双極性障害患者群および健常者群のいずれにおいても同様にコピー数に変異が認められた。

#### D. 考察

本研究において、*PPP1R1B* 遺伝子多型と統合失調症患者との関連解析を行った結果、*PPP1R1B* と有意な関連は認められなかった。双極性障害患者群においては、ボンフェローニ検定による補正後も 2 つの SNPs (rs12601930, rs907094) について有意な関連が認められた。rs12601930 については、ハーディ-ワインベルグ平衡からの逸脱が認められたことから、ハーディ-ワインベルグ平衡を仮定しないコクラン-アーミテージ傾向検定を用いて遺伝子型頻度の関連解析を行ったところ、有意な関連は認められなかった (Armitage's  $p = 0.804$ )。したがって、rs12601930 の変異は双極性障害の発症に関与しないものと推察される。

双極性障害患者群においては有意な関連が認められた 2 つの SNP (rs907094, rs12601930) について独立したサンプル群を用いて、再度検証した。その結果、対立遺伝子頻度、遺伝子型頻度およびハプロタイプ頻度のいずれにおいても有意な関連は認められなかったことから、サンプリングバイアスあるいはサンプル数の不足による第一種の過誤であった可能性が考えられる。以上の結果から、両疾患において遺伝子型頻度、対立遺伝子頻度およびハプロタイプ頻度に有意な関連が認められなかったことから、*PPP1R1B* 遺伝子多型は日本人における統合失調症および双極性障害の発症には関与しないと推察される。

近年、遺伝子の塩基配列の多型の他に、遺伝子の数の多型が存在することが明らかとなっている。この多型はコピー数多型 (CNV) と呼ばれており、多くの遺伝子領域に認められている。CNV

は遺伝子の発現に影響を及ぼすことが知られていることから、様々な疾患との関連性が報告されている。CNV の存在は遺伝子型の同定にも影響することが推察されることから、ハーディ-ワインベルグ平衡から逸脱した rs12601930 の上流 200 塩基を標的としてコピー数多型解析を行った。その結果、統合失調症患者群、双極性障害患者群に加え、健常者群においてコピー数の多型性が認められた。したがって、コピー数の違いによって遺伝子型頻度に影響を及ぼした可能性が想定され、ハーディ-ワインベルグ平衡からの逸脱にも関与している可能性がある。しかし、今回の研究では、遺伝子コピー数の変化が実際に遺伝子型頻度にどのように影響するか具体的な検証を行っておらず、各疾患の病態生理との関連性についても未解明の部分が多い。現在、CNV は各疾患の病態生理を解明する上で重要な因子の一つとして注目を集めつつあり、今後は CNV の明確な分子遺伝学的役割を追究することが重要である。

#### E. 結論

*PPP1R1B* 遺伝子多型と統合失調症および双極性障害との間に有意な関連は認められなかった。しかし、DARPP-32 はそのリン酸化を介してドパミンを始めとする様々な神経伝達物質の細胞内情報伝達系を調整しており、精神機能に重要な役割を果たしている。さらに、前頭前皮質における認知機能との関連が報告されており、今後は遺伝子多型や臨床表現型のみならず、中間表現型を加味した解析を導入していくことが、*PPP1R1B* 遺伝子多型が両疾患の病態生理に及ぼす役割を解明する上で重要である。最後に、考察でも述べたように、CNV の存在意義が明確化されることで、各疾患の病態像を知る上でも重要な知見が得られるものと考えられる。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Kishimoto M, Okahisa Y, Kotaka T, Harano M, Inada T, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S: The glycine transporter 1 gene (GLYT1) is associated with methamphetamine-use disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147 (1):54-8, 2008

・Kishimoto M, Ujike H, Motohashi Y, Tanaka Y, Okahisa Y, Kotaka T, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Hori T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S: The Dysbindin Gene (DTNBP1) Is Associated with Methamphetamine Psychosis. *Biol Psychiatry* 63 (2):191-196, 2008

・Saito S, Takahashi N, Maeno N, Ito Y, Aleksic B, Usui H, Iidaka T, Inada T, Ozaki N: An association study of tachykinin receptor 3 gene with schizophrenia in the Japanese population. *Neuroreport* 19 (4):471-473, 2008

・Masui T, Hashimoto R, Kusumi I, Suzuki K, Tanaka T, Nakagawa S, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Kato T, Takeda M, Kunugi H, Koyama T: A possible association between missense polymorphism of the breakpoint cluster region gene and lithium prophylaxis in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32 (1):204-8, 2008

・Hashimoto T, Hashimoto K, Miyatake R, Matsuzawa D, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iyo M: Association study between polymorphisms in glutathione-related genes and methamphetamine use disorder in a Japanese population. *Am J Med*

*Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008

・Yoshida K, Higuchi H, Ozaki N: Successful treatment of severe antidepressant-induced nausea with a combination of milnacipran and olanzapine. *Pharmacopsychiatry* 40 (2):84-5, 2007

・Yoshida K, Higuchi H, Kamata M, Takahashi H, Inoue K, Suzuki T, Itoh K, Ozaki N: The G196A polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and the antidepressant effect of milnacipran and fluvoxamine. *J Psychopharmacol* 21 (6):650-6, 2007

・Urata T, Takahashi N, Hakamata Y, Iijima Y, Kuwahara N, Ozaki N, Ono Y, Amano M, Inada T: Gene-gene interaction analysis of personality traits in a Japanese population using an electrochemical DNA array chip analysis. *Neurosci Lett* 414 (3):209-12, 2007

・Tomita Y, Ikeda M, Mutoh H, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Honda H: Association study between Apolipoprotein L and schizophrenia by exhaustive and rule-based combination analysis for identification of multilocus interactions. *J Biosci Bioeng* 103 (4):303-10, 2007

・Tabuse H, Kalali A, Azuma H, Ozaki N, Iwata N, Naitoh H, Higuchi T, Kanba S, Shioe K, Akechi T, Furukawa TA: The new GRID Hamilton Rating Scale for Depression demonstrates excellent inter-rater reliability for inexperienced and experienced raters before and after training. *Psychiatry Res* 153 (1):61-7, 2007

・Saito S, Takahashi N, Ishihara R, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Iwata N, Yamada M, Yoshida K, Inada T, Ozaki N: Association Study between Vesicle-Associated Membrane Protein 2 Gene Polymorphisms and Fluvoxamine Response in Japanese Major Depressive Patients. *Neuropsychobiology* 54 (4):226-230, 2007

- Ohnishi T, Yamada K, Ohba H, Iwayama Y, Toyota T, Hattori E, Inada T, Kunugi H, Tatsumi M, Ozaki N, Iwata N, Sakamoto K, Iijima Y, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Nanko S, Osumi N, Detera-Wadleigh SD, Kato T, Yoshikawa T: A Promoter Haplotype of the Inositol Monophosphatase 2 Gene (IMPA2) at 18p11.2 Confers a Possible Risk for Bipolar Disorder by Enhancing Transcription. *Neuropsychopharmacology* 32 (8):1727-37, 2007
- Nakayama H, Kitaichi K, Ito Y, Hashimoto K, Takagi K, Yokoi T, Ozaki N, Yamamoto T, Hasegawa T: The role of organic cation transporter-3 in methamphetamine disposition and its behavioral response in rats. *Brain Res* 1184 260-9, 2007
- Miura H, Kitagami T, Ozaki N: Suppressive effect of paroxetine, a selective serotonin uptake inhibitor, on tetrahydrobiopterin levels and dopamine as well as serotonin turnover in the mesoprefrontal system of mice. *Synapse* 61 (9):698-706, 2007
- Matsuzawa D, Hashimoto K, Miyatake R, Shirayama Y, Shimizu E, Maeda K, Suzuki Y, Mashimo Y, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Hata A, Sawa A, Iyo M: Identification of Functional Polymorphisms in the Promoter Region of the Human PICK1 Gene and Their Association With Methamphetamine Psychosis. *Am J Psychiatry* 164 (7):1105-14, 2007
- Maeno N, Takahashi N, Saito S, Ji X, Ishihara R, Aoyama N, Branko A, Miura H, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Iwata N, Inada T, Ozaki N: Association of SOX10 with schizophrenia in the Japanese population. *Psychiatr Genet* 17 (4):227-231, 2007
- Maeno N, Takahashi N, Saito S, Ji X, Branko A, Ishihara R, Yoshida K, Inada T, Iidaka T, Ozaki N: Association study between the transferrin gene and schizophrenia in the Japanese population. *Neuroreport* 18 (5):517-20, 2007
- Koga M, Ishiguro H, Horiuchi Y, Albalushi T, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Muratake T, Someya T, Arinami T: Failure to confirm the association between the FEZ1 gene and schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Lett* 417 (3):326-329, 2007
- Kimura H, Tonoike T, Muroya T, Yoshida K, Ozaki N: Age of onset has limited association with body mass index at time of presentation for anorexia nervosa: Comparison of peak-onset and late-onset anorexia nervosa groups. *Psychiatry Clin Neurosci* 61 (6):646-50, 2007
- Ito M, Yoshida K, Kimura H, Ozaki N, Kurita K: Successful Treatment of Trigeminal Neuralgia With Milnacipran. *Clin Neuropharmacol* 30 (3):183-185, 2007
- Ishiguro H, Koga M, Horiuchi Y, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Muratake T, Someya T, Arinami T: PICK1 is not a susceptibility gene for schizophrenia in a Japanese population: Association study in a large case-control population. *Neurosci Res* 58 (2):145-148, 2007
- Ishiguro H, Horiuchi Y, Koga M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Muratake T, Someya T, Arinami T: RGS4 is not a susceptibility gene for schizophrenia in Japanese: association study in a large case-control population. *Schizophr Res* 89 (1-3):161-4, 2007
- Ikeda M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Suzuki T, Kitajima T, Kinoshita Y, Inada T, Iwata N: No association between the glutamate decarboxylase 67 gene (GAD1) and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res* 91 (1-3):22-6, 2007
- Ikeda M, Ozaki N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kishi T, Sekine Y, Iyo

M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Iwata N: Possible association of beta-arrestin 2 gene with methamphetamine use disorder, but not schizophrenia. *Genes Brain Behav* 6 (1):107-12, 2007

・Horiuchi Y, Ishiguro H, Koga M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Muratake T, Someya T, Arinami T: Support for association of the PPP3CC gene with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12 (10):891-893, 2007

・Hashimoto R, Hashimoto H, Shintani N, Chiba S, Hattori S, Okada T, Nakajima M, Tanaka K, Kawagishi N, Nemoto K, Mori T, Ohnishi T, Noguchi H, Hori H, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Nakabayashi T, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Weinberger DR, Kunugi H, Baba A: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12 (11):1026-1032, 2007

・Deng X, Shibata H, Takeuchi N, Rachi S, Sakai M, Ninomiya H, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y: Association study of polymorphisms in the glutamate transporter genes SLC1A1, SLC1A3, and SLC1A6 with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144 (3):271-8, 2007

・Aleksic B, Ishihara R, Takahashi N, Maeno N, Ji X, Saito S, Inada T, Ozaki N: Gap junction coding genes and schizophrenia: a genetic association study. *J Hum Genet* 52 (6):498-501, 2007

## 2. 学会発表

・齋藤真一, 高橋長秀, 伊藤圭人, Branko A, 石原良子, 吉田契造, 稲田俊也, 飯高哲也, 貝淵弘三, 尾崎紀夫: MAPK1 (Mitogen activated protein kinase 1) を候補遺伝子とした統合失調症との関連研究. BP/NP 合同年会, 2007

・野田明子, 湧田雄基, 小島隼, 原祐樹, 助川真代, 宮田聖子, 中田誠一, 尾崎紀夫, 福田敏男, 古池保雄: 睡眠-覚醒リズムコントロール法. 日本睡眠学会第 32 回定期学術集会・第 14 回日本時間生物学会学術大会 (合同大会), 2007

・臼井比奈子, 高橋長秀, 齋藤真一, 石原良子, 吉田契造, 飯高哲也, 稲田俊也, 尾崎紀夫: MPZL1 遺伝子と統合失調症との関連解析. BP/NP 合同年会, 2007

・臼井比奈子, 吉村智子, 吉見陽, 齋藤真一, 石原良子, 吉田契造, 飯高哲也, 稲田俊也, 尾崎紀夫: GDNF 遺伝子と統合失調症との関連解析. 第 15 回日本精神・行動遺伝医学会, 2007

・羽瀧: 羽瀧 PD 精神症状総合病院抄録. 2007

・池田匡志, 高橋長秀, 齋藤真一, 山之内芳雄, 木下葉子, 北島剛司, 稲田俊也, 尾崎紀夫, 岩田仲生: 日本人統合失調症患者と NRG1 の関連解析. 第 2 回日本統合失調症学会, 2007

・岸太郎, 北島剛司, 池田匡司, 山之内芳雄, 木下葉子, 川島邦裕, 大河内智, 尾崎紀夫, 岩田仲生: Nuclear receptor Rev-erbalpha 遺伝子 (NR1D1) と日本人双極性障害との関連解析. 日本睡眠学会第 32 回定期学術集会・第 14 回日本時間生物学会学術大会 (合同大会), 2007

・岩本邦弘, 高橋正洋, 中村由嘉子, 川村由季子, 石原良子, 内山祐二, 江部和俊, 野田明子, 吉田契造, 飯高哲也, 尾崎紀夫: 抗うつ薬が運転技能及び認知機能に与える影響. 第 17 回日本臨床精神神経薬理学会, 2007

・尾崎紀夫: 身体疾患を持ったうつ病患者の社会復帰: 「頑張る」ことの意味. 総合病院精神医学会イブニングセミナー, 2007

・尾崎紀夫: 口腔内灼熱症候群に対するミルナシプランの効果. 総合病院精神医学会, 2007

・尾崎紀夫: シンポジウム「疾患領域横断的遺