

ている (図3)。

D.E. 考察と結論

DRD4 遺伝子の遺伝学的構造、および統合失調症における潜在的な遺伝学的影響を明らかにするために、我々は、DRD4 遺伝子上の4つの新規 SNP を含めた27多型について216名の日本人統合失調症患者および243名の健常対照者の遺伝子型を決定した。

驚くべきことではないが、ヨーロッパ系あるいは他の集団と比較すると、日本人集団でのいくつかの多型はアレル頻度が異なることが分かった。たとえば、-615A/G は白人では多型性を示すが、我々の研究ではモノモルフィックだった (Ronai et al., 2004)。-364A/G、-11C/T、+31G/C (Cichon et al., 1995)、および強迫性障害とパニック障害を示した一個人で報告された21bp 欠失 (Cichon et al., 1995) についても同様の現象が観察された。他の多型 (-1102A、-930T、-713T、-598T、-597 (G) 2、-597 (G) 5、-234A および -128T) は、日本人集団では、ひじょうにアレル頻度が低かった (表2)。

統合失調症と DRD4 遺伝子多型の関連を評価するために、我々は、日本人統合失調症患者群と健常対照者群のあいだで相関解析を実施した。単変量解析では多重仮説検定の補正後は統計学的に有意なマーカーはみられなかった。

統合失調症において、-521T/C 多型に関する相反する報告がある。オクヤマらは、この多型の T アレルでは DRD4 の転写の効率が C アレルと比べて40%低下したと報告しており、さらに、日本人においてはこのマーカーが統合失調症と相関していると報告した (Okuyama et al., 1999)。しかし、中国人や白人など他の人種ではこれらの結果を再現する試みは成功しなかった (Ambrosio et al., 2004; Jonsson et al., 2001; Xing et al., 2003)。これらの結果から、統合失調症では遺伝学的な異質性が存在することが推測される。しかし、別の日本人集団についての -521T/C に関する我々の否定的な所見から、オクヤマらの結果が第1種の過誤を反映してい

るという可能性が示唆される。

我々は、また、LD 解析とハプロタイプ解析を実施した。しかし、SNP が高密度であるという点と LD が低いという点から見ると、DRD4 遺伝子領域は例外的な領域である。その結果として、ハプロタイプに基づく相関解析方法の検出力は、SNP に基づく方法と大きな差がない。DRD4 遺伝子領域には、2つの SNP のみを含むだけの2つの LD ブロックが形成されるだけであった。その結果、ほとんどの多型は独立した変数として残った。これらの結果は DRD4 の集団遺伝学的構造についての報告 (Wang et al., 2004) と一致している。統合失調症のハプロタイプによる相関解析では統計学的な有意差はみられなかった。

今回の研究においては、いくつかの限界があることを心にとどめておくべきである。ひとつの問題は、対照者の集団が統合失調症患者と完全には適合されていない可能性である。男性の対照者の大多数は年齢が50歳の日本の自衛隊隊員である。この集団の特徴のいくつかは他の健常対照者集団とは異なるかもしれない。理想的には、バランスのとれた対照集団の選択のために、また、遺伝学的な変数とともに統計学的モデルに包括するために、より詳細な社会経済的情報が収集されるべきである。統合失調症の発症における環境要因の影響という点からもまた、環境要因に関する情報も可能なかぎり収集することが重要である。

結論として、我々は、日本人集団において DRD4 遺伝子の多型の構造を詳細に報告した。LD 解析により2つの小さなブロックが明らかになった。もっとも注目すべき点は本遺伝子全領域にわたり LD が低かったことである。LD 解析により選択された16個のタグ・マーカーを用いたハプロタイプ解析では、統合失調症の発症危険性と相関しないことが明らかになった。ドーパミン情報伝達系における DRD4 の生物学的な役割や、48bp リピート多型と相関した機能的効果についての報告にも関わらず、本遺伝子が統合失調症の発症危険性に有意に寄与するということを否定する文献が増加しているが、本報告は

これらの文献の内容と同一のものである。

F. 健康保険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mitsuyasu H, Kawasaki H, Ninomiya H, Kinukawa N, Yamanaka T, Tahira T, Stanton VP Jr, Springett GM, Hayashi K, Tashiro N, Kanba S.

Genetic structure of the dopamine receptor D4 gene (DRD4) and lack of association with schizophrenia in Japanese patients.

J Psychiatr Res. 41(9):763-75, 2007 Epub 2006

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 DRD4の多型の図解

DRD4 遺伝子は全長が約 3.9 k b p で、4 つのエクソンから構成される (黒色の四角はコーディング領域、白色の四角は非翻訳領域、斜線のある四角は複数の転写開始点を示す)。-1217 番目から+31 番目 (数字は開始コドン (ATG) の第 1 番目の塩基を 1 とした相対的な位置を示す) の領域が、本研究にて詳細に調査した領域である。合計 34 個の多型 (矢印) がデータベース (dbSNP ; Sherry et al., 1999, JSNP; Hirakawa et al., 2002)、文献 (PubMed)、および我々の実験データから収集された。34 個のうち 28 個の多型 (実線矢印) (4 個の新規多型 (アスタリスク) を含む) の遺伝子型を決定した。遺伝子型決定のために、5 つの DNA 断片 (太線) (長さが 549-bp、606-bp、1160-bp、792-bp、366-bp) が 5 つのプライマー対 (実線矢印) を使用して増幅され、示されたプライマー (矢頭) を使用して塩基配列を決定した (詳細は表 1 に示した)。白色矢頭の横の実線はそのプライマーで塩基配列を決定した領域およびその方向を示す。各断片上に存在する多型マーカーの正確な位置を縦方向の破線で示した。構造と各塩基の位置は AC021663 (GenBank) データベースの塩基配列に基づいた。

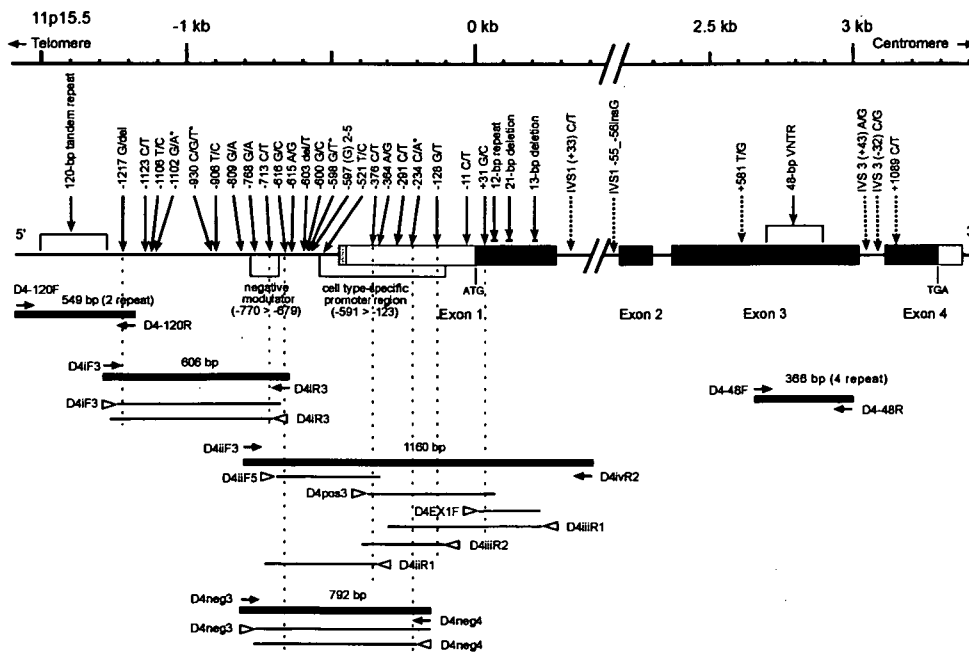


図2 DRD4 遺伝子の多型における LD の D' 係数の図示

菱形の中の数字は各マーカー同士の D' 値を示す。LD の表示は Haploview ソフトウェアによる。値のない菱形は完全な LD ($D' = 1$) を示す。濃い灰色の菱形は強い LD を示す。薄い灰色の菱形は情報とならない多型同士であることを示す。白色の菱形は低い LD を示す。LD ブロックは Haploview のアルゴリズム (Gabriel et al., 2002) により決定した。

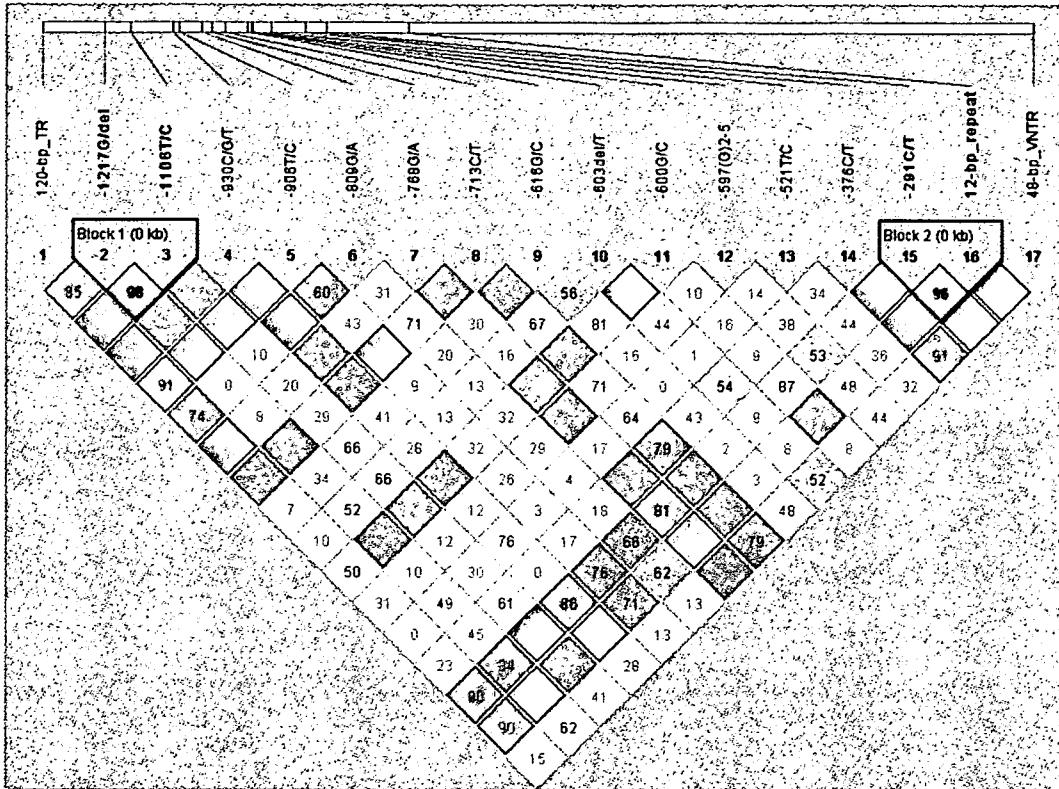


図3 DRD4 遺伝子のスライディング・ウインドウ・ハプロタイプ解析

X軸は本研究で解析した各多型を示す。Y軸は、各マーカーにおける、また、スライディング・ウインドウ・ハプロタイプ解析（ウインドウ幅2と3）における $-\log_{10}(P \text{ 値})$ を示す。白丸は、各多型の単一マーカーの解析（単変量解析）の結果を表す。二つの黒い四角を結ぶ横線は2つのマーカーでのスライディング・ウインドウ解析のp値を示す。三つの三角形を結ぶ破線は3つのマーカーでのスライディング・ウインドウ解析のp値を示す。

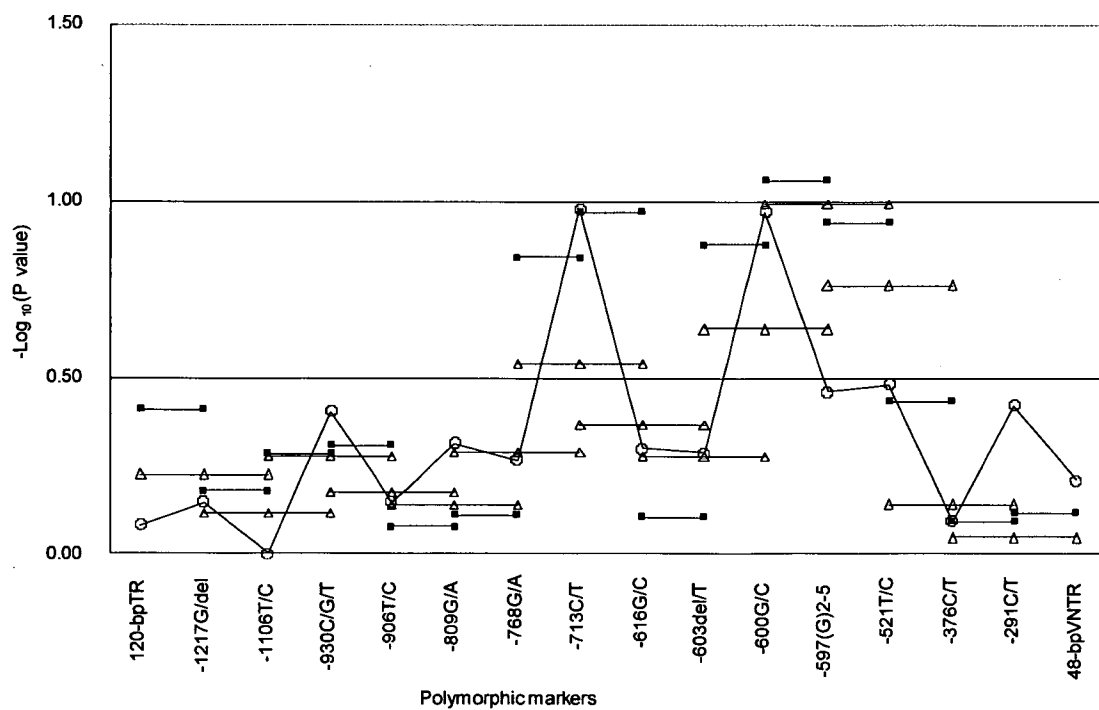


表1 実験に使用したプライマー

プライマー	塩基列 (5'-3')	方向	位置 ^o		産物長 (bp)	使用的
D4-120F ^a	GTTGTCTGTCTTTTCTCATTGTTTCCATTG	センス	-1726	-1697	429, 549	Amp ^f
D4-120R ^a	GAAGGAGCAGGCACCGTGAGC	アンチセンス	-1179	-1199		Amp
D4iF3	CACACCTGTCCCTGGTGCAGG	センス	-1256	-1236	606	Amp, Seq ^g
D4iR3	CCCACCCGTTGCACAGTTGATC	アンチセンス	-651	-672		Amp, Seq
D4iiF3	TACCTAGCTCACGGTCTTGGGC	センス	-765	-744	1160	Amp
D4ivR2	CTGGAAGCTCCGCACCAGAAAG	アンチセンス	395	374		Amp
D4iiF5	GCTGTCCGCCAGTTTCGGAG	センス	-706	-686		Seq
D4pos3 ^b	CTCAGGTCTTTCTGCGTCTGGC	センス	-472	-451		Seq
D4EX1F ^c	CGCCATGGGGAACCGCAG	センス	-4	14		Seq
D4iiiR1	GTGGCCACGCTCACGCACACG	アンチセンス	182	162		Seq
D4iiiR2	CGCTGAGCACCGCGGACAACG	アンチセンス	-17	-37		Seq
D4iIR1	TCGACGCCAGCGCCATCCTAC	アンチセンス	-346	-366		Seq
D4neg3 ^b	CAGGTCACAGGTCACCCCTCTT	センス	-947	-926	792	Amp, Seq
D4neg4 ^b	TTGCTCATCTTGAATTTTGCG	アンチセンス	-156	-177		Amp, Seq
D4-48F ^d	AGGTGGCACGTGCGCCAAGCTGCA	センス	2612	2636	174+(48xN ^h)	Amp
D4-48R ^d	TCTGCGGTGGAGTCTGGGGTGGGAG	アンチセンス	2929	2905		Amp

^aSeaman et al. (1999).

^bMitsuyasu et al. (1999, 2001).

^cCatalano et al. (1993).

^dNanko et al. (1993).

^o位置番号のものをとする (GenBank: AC021663).

^fAmp BR増幅

^gSeq, 直接配列

^hN, エクソのbp 繰り返し回数

表 2 日本人統合失調症と対照の DRD4 遺伝子多型の遺伝子型頻度の比較

-800G/C	n	240	210	103	84	137	118		rs10802180
	G/G	0.983	0.990	0.881	1.000	0.949	0.983	0.180 ^a	
	G/C	0.038	0.010	0.019	0.000	0.051	0.017		
	C/C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
-588G/T	n	236	207	100	83	136	114		
	G/G	1.000	0.985	1.000	0.989	1.000	1.000		
	G/T	0.000	0.005	0.000	0.011	0.000	0.000		
	T/T	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
-587(G) ₃₄	n	236	210	103	84	136	118		rs3842250 (IMS-JST108019)
	G2/G3	0.054	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.302 ^a	
	G3/G3	0.151	0.124	0.087	0.117	0.191	0.129		
	G3/G4	0.481	0.438	0.553	0.479	0.428	0.405		
	G3/G5	0.004	0.010	0.010	0.011	0.000	0.000		
	G4/G4	0.280	0.419	0.330	0.372	0.382	0.457		
	G4/G5	0.000	0.010	0.000	0.021	0.000	0.000		
-521T/C	n	236	208	102	83	137	113		rs1800955 IMS-JST108020
	T/T	0.389	0.325	0.402	0.237	0.380	0.368	0.930	
	T/C	0.491	0.515	0.441	0.548	0.511	0.487		
	C/C	0.130	0.160	0.157	0.215	0.109	0.115		
-378C/T	n	237	212	102	85	135	117		rs918455 IMS-JST108021
	C/C	0.814	0.835	0.843	0.832	0.793	0.838	0.452	
	C/T	0.181	0.160	0.147	0.158	0.207	0.162		
	T/T	0.004	0.005	0.010	0.011	0.000	0.000		
-364A/G	n	237	212	102	85	135	117		rs918456
	A/A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
	A/G	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
	G/G	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
-291C/T	n	234	214	102	85	132	119		rs918457 IMS-JST108022
	C/C	0.752	0.743	0.735	0.789	0.785	0.708	0.501 ^a	
	C/T	0.208	0.238	0.208	0.189	0.212	0.277		
	T/T	0.038	0.019	0.059	0.021	0.023	0.017		
-234C/A	n	237	212	102	85	138	117		
	C/C	0.886	1.000	1.000	1.000	0.983	1.000		
	C/A	0.004	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000		
	A/A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
-128G/T	n	237	214	102	85	135	118		
	G/G	0.986	1.000	1.000	1.000	0.983	1.000		
	G/T	0.004	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000		
	T/T	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
-11C/T	n	236	197	83	88	131	109		
	C/C	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
	C/T	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
	T/T	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
+31G/C	n	236	197	92	86	130	108		
	G/G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
	G/C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
	C/C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
12-bp repeat (+64→67)	n	236	197	104	88	135	108		
	2/2	0.736	0.990	0.721	0.708	0.748	0.876	0.205 ^a	
	2/1	0.222	0.284	0.231	0.258	0.215	0.306		
	1/1	0.042	0.025	0.048	0.034	0.037	0.019		
21-bp deletion (+108→126)	n	236	197	102	88	134	108		
	+/+	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
	+/-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
	-/-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
48-bp VNTR (+2898→2890)	n	237	212	102	95	135	117		
	4/4	0.696	0.736	0.716	0.726	0.681	0.750	0.170	
	4/2	0.186	0.160	0.167	0.158	0.200	0.164		
	4/5	0.055	0.047	0.059	0.063	0.052	0.034		
	4/3	0.013	0.014	0.029	0.000	0.000	0.028		
	4/6	0.017	0.009	0.000	0.011	0.030	0.009		
	4/7	0.013	0.005	0.000	0.000	0.022	0.009		
	2/2	0.004	0.009	0.010	0.021	0.000	0.000		
	5/5	0.008	0.005	0.000	0.011	0.015	0.000		
	3/3	0.000	0.005	0.000	0.011	0.000	0.000		
	5/2	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.008		
	5/3	0.004	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000		
	5/6	0.004	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000		

^a Polymorphism names of each SNP or the number below names stand for nucleotide variation and relative position to the first nucleotide of the initiation codon of reference sequence AC021863 (141798 = +1).

^b P values of chi square test (with Yates' correction for 2x2 table) or Fisher's exact test^c were not corrected for multiple testing. There was no statistical significance after correction. Detailed statistical method was described in the text.

^d dbSNP, a database of single nucleotide polymorphisms at National Center for Biotechnology Information.

^e JSNP, a database of common gene variations in the Japanese population (Hirakawa et al., 2002).

^f del, insertion / deletion polymorphism.

^g n: the number of subject genotyped at each polymorphism.

表 3 DRD4 多型の LD 値 (r^2)

	120-bp TR	-1217G/del	-1106T/C	-930C/G/T	-906T/C	-809G/A	-768G/A	-713C/T	-616G/C	-603del/T	-600G/C	-597(G) ₂₋₅	-521T/C	-376C/T	-291C/T	12-bp repeat
-1217G/del	0.04															
-1106T/C	0.03	0.59														
-930C/G/T	0.05	0.00	0.00													
-906T/C	0.66	0.04	0.03	0.06												
-809G/A	0.46	0.00	0.01	0.06	0.62											
-768G/A	0.06	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01										
-713C/T	0.03	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.00									
-616G/C	0.00	0.01	0.02	0.00	0.01	0.03	0.00	0.02								
-603del/T	0.01	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.28							
-600G/C	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.04						
-597(G) ₂₋₅	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.14	0.00					
-521T/C	0.00	0.07	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02				
-376C/T	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.05	0.05	0.08	0.00	0.03	0.02			
-291C/T	0.43	0.02	0.02	0.06	0.39	0.28	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.02		
12-bp repeat	0.47	0.03	0.02	0.08	0.37	0.27	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02	0.86	
48-bp VNTR	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.04	0.06	0.08	0.00	0.04	0.02	0.78	0.02	0.02

Paiwise LD maeasures (r^2) were calculated by Haploview software.

アデノシン A1 受容体遺伝子と統合失調症の相関解析

分担研究者 川寄 弘詔 九州大学大学院医学研究院精神病態医学 講師

研究要旨：我々はドーパミン・NMDA を始めとするいくつかの神経伝達系と相互作用をもち、神経伝達を調整するアデノシン神経伝達系の受容体サブタイプのひとつであるアデノシン A1 受容体 (ADORA1) 遺伝子上の 29 の SNP について双極性障害の対照疾患として統合失調症罹患群、および健常群にてゲノタイピングを行った。単変量解析・多変量解析・LD 解析・ハプロタイプ解析・スライディングウィンドウハプロタイプ解析を行った結果、多変量解析・スライディングウィンドウハプロタイプ解析において有意差が得られた。

このことから ADORA1 遺伝子は統合失調症の発症と弱い相関を持つことが示唆された。また、アデノシン神経伝達系が相互作用する他の神経伝達系の関与する精神神経疾患についても影響を与える可能性があり、更なる解析が必要と言える。

A. 研究目的

アデノシン神経伝達系はドーパミン・NMDA グルタミン酸などを介する神経伝達系と阻害的な相互作用を持つことが知られており、例えば、動物モデルにおいてアンフェタミンによる行動活性をアデノシンアゴニストが抑えるという報告や、NMDA アゴニストがアデノシンの放出とアデノシンを介した鎮静作用を示すという報告、そしてこの相互作用を利用してパーキンソン病の治療薬としてアデノシン A2A アンタゴニストの使用が検討されていることなどが、その実例として上げられる。

このようなアデノシン神経系のもつ他の神経伝達系への作用はアデノシン神経系自身の異常が他の脳内神経伝達物質を介した神経伝達系の異常を引き起こすことで間接的に精神神経疾患の病態に影響を与える可能性を示唆している。

そこで今回我々はドーパミン D1 受容体や NMDA 受容体との相互作用が示唆されている、ADORA1 遺伝子を候補遺伝子として選択し、双極性障害の対照疾患として、統合失調症罹患群および健常群においてゲノタイピング

を行った。

B. 研究方法

対象群：

我々は、全体で 410 名（男性：228 名，女性：182 名）の日本人を本研究において対象とした。

対象は DSM-IV により診断された統合失調症群 210 名（平均年齢 48.4 歳、男性 118 名、女性 92 名）および健常対照群 200 名（平均年齢 51.5 歳、男性 110 名、女性 90 名）である。

ゲノム DNA 抽出：

ゲノム DNA は Lahiri and Nurnberger の方法およびキアゲンカラム (Qiagen columns (Qiagen, GmBH)) を用い、末梢静脈血の白血球から抽出した。

PCR：

上記の方法により得られたゲノム DNA をテンプレートにし、PCR 法により、ゲノタイピングを行うそれぞれの領域を増幅した。増幅に用いたプライマーのペアは Table 1 に記載した。我々は日本人サンプルの SNP データベースである JSNP に登録されている ADORA1 遺伝子上の 29 個

の SNP を解析の対象とした。遺伝子上の SNP とエクソンの位置を図1として示した。

PCR の反応溶液の総量は 10 μ l とし、その溶液中にゲノム DNA 50ng、各プライマー 10pmol、dimethylsulfoxide 10%、AmpliTaq polymerase(Roche) 0.25unit、d NTP 各 2mmol、10xPCR Buffer II (Roche) 1 μ l を混入し、反応させた。

温度条件は、初めに 94 $^{\circ}$ C 1 分間、次に 94 $^{\circ}$ C 30 秒 (denaturation)、56 $^{\circ}$ C または 62 $^{\circ}$ C 30 秒 (primer annealing)、72 $^{\circ}$ C 1 分 (extension) を 40 サイクル繰り返した後、最後に 72 $^{\circ}$ C 5 分間 (final extension) とした。

直接塩基配列決定法：

PCR 法により増幅された DNA フラグメントを含んだ反応液 10 μ l に Shrimp alkaline phosphatase (Roche) 1U、10x Dephosphorylation buffer (Roche) 1.3 μ l、Exonuclease I、2U (NEW ENGLAND BioLabs) を混合し総量を 3 μ l にしたものに加え、37 $^{\circ}$ C 1 時間、80 $^{\circ}$ C 15 分の熱処理を加えた。そして、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) に付属のプロトコルに従いダイレクトシーケンスに用いるテンプレートを準備し、Table1 に示したプライマーを用いてシーケンシング反応を実行した。反応液の一部はプロトコルに従い、シーケンサ 3100 Genetic Analyzer (ABI) を使用してキャピラリ電気泳動を行い、各サンプルの塩基配列を決定した。

PCR および直接塩基配列決定法において使用したプライマーのリストを表1として示した。

塩基配列解析および統計学的解析：

ゲノタイピングは PCR 法とダイレクトシーケンシング法により行われた。目的部位を PCR 法により増幅した後 3100 シーケンサアナライザーを用いて解析して

いる。SNP の位置情報はデータベース JSNP を参照している (図1)。

統計解析：

ゲノタイピングの結果を元にしてアレル頻度のカイ二乗検定による統計解析を行った ($\alpha=0.05$)。有意差の水準を $p=0.05$ とした。ソフトウェアは単変量解析においては StatView-J ver4.11(SAS Institute Inc., U.S.A.) を、多変量解析においては SPSSv13J(SPSS.inc U.S.A.) を使用した (図3、表2)。

我々はコンピュータ・ソフトウェアであるフェイズを用いてハプロタイプ解析を行った。推定されたハプロタイプを元にカイ二乗検定による統計解析を行った ($\alpha=0.05$)。有意差の水準を $p=0.05$ とした。ソフトウェアは StatView-J ver4.11(SAS Institute Inc., U.S.A.) を使用した (表3)。

連鎖不均衡解析 (LD) に関しては、ペアワイズ LD コエフィシエント D' を Haploview 3.2 を用いて計算した (図4)。

我々はさらにスライディングウィンドウハプロタイプ解析を行った。本解析は Haplotype Trend Regression (NCSU U.S.A.) を用いて行い、ウィンドウ幅は 2~6 とした (図5)。

(倫理面への配慮)

血液採取に際しては、文書および口頭にてインフォームド・コンセントを本人および家族 (代諾者) から取得した。この研究は九州大学大学院医学研究院・ゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得て、3 省庁合同のガイドラインに従い実施された

C. 研究結果

本研究において我々は ADORA1 遺伝子上に 15 の PCR フラグメントを作り 29 の SNP を解析した (図2)。

アレル頻度の結果を元にカイ二乗検定による単変量解析を行った結果、男性のみの比

較において2つのマーカー、女性のみと比較において2つのマーカー、全体での比較において1つのマーカーが有意差を示した。(図3)だがこの有意差はボンフェローニの多重比較検定を行った結果消失した。

29 のマーカーと性別を独立変数として多変量解析を変数減少法/変数増加法(尤度法)の二通りを行った。その結果変数減少法において3つのマーカー、変数増加法において2つのマーカーが有意差を示した(表2)。

LD 解析を行った結果、二つのマーカーに比較的高い連鎖が見られた(図4)。

29 マーカーのゲノタイピングの結果を基にしたハプロタイプ解析を行った結果、407 ハプロタイプが PHASE プログラムにより推定された。そのうち頻度が0.01以上の11ハプロタイプを元にカイ二乗検定による統計解析を行ったが有意差は得られなかった(表3)。

続いてスライディングウィンドウハプロタイプ解析を試みた。その結果単変量解析において補正前に有意差が見られたマーカーを含むウィンドウ幅2の2つのハプロタイプと、ウィンドウ幅3の1つのハプロタイプ、そして別のウィンドウ幅2の1つのハプロタイプが有意差を示した(図5)。ウィンドウ幅4~6においては有意差は見られなかった。

D.E. 考察および結論

今回、我々は、日本人統合失調症において、アデノシン神経系に関与する ADORA1 遺伝子上の29のSNPについてゲノタイピングを行った。

単変量解析として、それぞれの多型のアリル頻度を統合失調症群およびコントロール群で統計学的に比較したが、補正後に有意差は認められなかった。

29 のマーカーと性別を独立変数とした変数減少法/変数増加法(尤度法)の二通りの多変量解析の結果、変数減少法において3つ

のマーカーが有意差を示した、変数増加法において2つのマーカーが有意差を示した。このように二つの多変量解析の手法から有意差を示す3つの多型マーカーが得られた。

LD 解析を行ったが、二つのマーカーに比較的高い連鎖が見られ、ひとつのブロックを形成したのみだった。このことから ADORA1 遺伝子の領域は連鎖が低く、タグ SNP を選び出すことが難しいと予想される。

LD が低かったため、ゲノタイピングを行った全てのマーカーである29マーカーの結果を基にしたハプロタイプ解析を行った。その結果、407ハプロタイプが PHASE プログラムにより推定された。推定されたハプロタイプが407種類と多かったため、もっとも頻度の高いハプロタイプでも全体の3%程度しか存在しなかった。そのうち頻度が0.01以上の11ハプロタイプを元にカイ二乗検定による統計解析を行ったが有意差は得られなかった。

通常ハプロタイプ解析ではハプロタイプの数が多すぎ意味のある解析が成立しにくかったため、続いてスライディングウィンドウハプロタイプ解析を試みた。その結果単変量解析において補正前に有意差が見られたマーカーを含むウィンドウ幅2の2つのハプロタイプと、ウィンドウ幅3の1つのハプロタイプ、そして別のウィンドウ幅2の1つのハプロタイプが有意差を示した。この新しい有意なハプロタイプは単変量解析において有意差を示していないSNPから構成されている。

本研究の結果は ADORA1 遺伝子が統合失調症の病態に弱い相関を持つことを示唆した。

このことはアデノシン神経伝達系が他の神経伝達系を介し精神神経疾患の病態に影響を与えるという仮説を支持するものであると考えられ、今後は統合失調症以外の精神神経疾患についても対象を広げ解析を行うことが必須であると考えられる。

F. 健康保険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿予定

2. 学会発表

Gotoh L, Mitsuyasu H, Kobayashi Y,
Oribe N, Takata A, Kawasaki H,
Kanba S:

Association Analysis of Adenosine A1
receptor (ADORA1) and Dopamine D1
receptor (DRD1) genes with
schizophrenia in the Japanese
population.

The American Society of Human
Genetics 2007 Annual Meeting ,
2007.10.25, アメリカ・サンディエゴ

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1、ADORA1 遺伝子構造

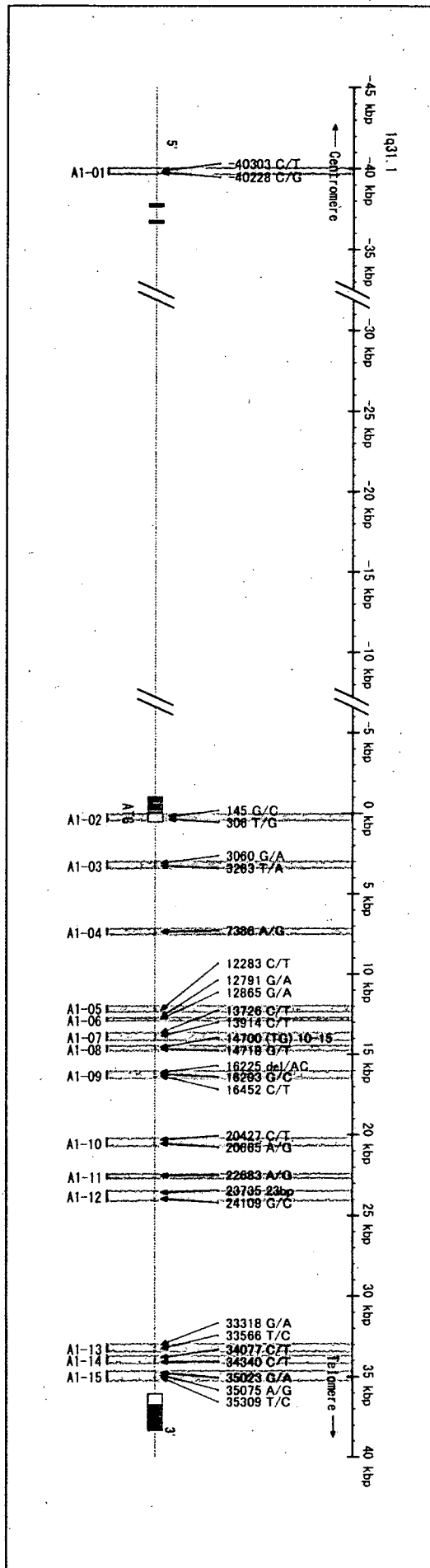


表 1、実験に使用したプライマーのリスト

Table 1

List of primers for genic DNA fragment amplification and sequencing reactions

Name of primer	Sequence (5'-3')	Direction	Position	Product size (bp)	Purpose	
A1-01-F	AGGATCCAGTGTGACTTACC	Sense	-40524	-40505	} 367	Amp
A1-01-R	TACAAACAGCCTACCCAACG	Antisense	-40177	-40158		Amp, Seq
A1-02-F	TACATCGGCATCGAGGTGC	Sense	34	52	} 550	Amp, Seq
A1-02-R	TTCAGCTCTGAGGTCATGGG	Antisense	564	583		Amp
A1-03-F	TCTACGTGGCTGGAGTCAGC	Sense	2962	2981	} 414	Amp, Seq
A1-03-R	ATAGGGCTTCAATTACCAAGC	Antisense	3355	3375		Amp
A1-04-F	TTACCCACACTGCAAATCCC	Sense	7020	7039	} 429	Amp
A1-04-R	TTCTAAGAGGACGTGTATGC	Antisense	7429	7448		Amp, Seq
A1-05-F	ATCCTGGCCTCTGCATGCC	Sense	12059	12077	} 467	Amp
A1-05-R	TGGTAGCCTCTGAGAGCAG	Antisense	12507	12525		Amp
A1-05-F2	TGCTGTAGAGCACTGAGTGG	Sense	12197	12216		Seq
A1-06-F	TGCTGGAATGGTACCTCACC	Sense	12650	12669	} 817	Amp
A1-06-R	AGAGTTGACAGTACCACGCC	Antisense	13467	13486		Amp
A1-06-F2	TAGAGTCTCACTTTGTTGCC	Sense	12762	12781		Seq
A1-06-R2	ATGAGCCTATAGTTCCAGC	Antisense	12870	12888		Seq
A1-07-F	TTGCACTATGAGGGCAGGG	Sense	13450	13466	} 628	Amp
A1-07-R	AACAGGGCATTGCGGCAGG	Antisense	14076	14094		Amp
A1-07-R2	AATTTACAGAGCTGCCAGGC	Antisense	13993	14012		Seq
A1-08-F	AGTGGCTTCAGGTTCTTAGTG	Sense	14651	14671	} 201, 203	Amp
A1-08-R	ATGGAGAATGAGGGACTGGG	Antisense	14834	14853		Amp
A1-08-R2	TTGAGCAAGCAGAAGTGAAGG	Antisense	14795	14815		Seq
A1-09-F	ATCCTCAACGGGTTCAAGCC	Sense	16109	16128	} 528, 530	Amp
A1-09-R	ATCCTTACAGGCGGCCGG	Antisense	16619	16636		Amp
A1-09-R2	AAGTGGGCACCATGGCAGC	Antisense	16513	16531		Seq
A1-10-F	TGCATGCCACCAAGACTGG	Sense	20181	20199	} 579	Amp
A1-10-R	TAATTAGGTGGTTCTCACAGG	Antisense	20739	20759		Amp, Seq
A1-11-F	TATGGAAACCATGTGACTGG	Sense	22586	22605	} 278	Amp
A1-11-R	AACAATTCCTTGAGCCTTGG	Antisense	22844	22863		Amp, Seq
A1-12-F	AGCCGCATAAAGCCATCAGC	Sense	23585	23604	} 638, 661	Amp
A1-12-R	AAGTTTGGATTTGCTCAGTGG	Antisense	24202	24222		Amp
A1-12-F2	TATTGTGAAATCGCCCAGGG	Sense	23867	23885		Seq
A1-12-R2	ACCTTGGCATTCTCAGCTC	Antisense	24001	24020		Seq
A1-13-F	AAGAGTCAGAGGCACCTTCC	Sense	33228	33247	} 470	Amp
A1-13-R	TGCTGCCGTCCAGCCTATG	Antisense	33679	33697		Amp, Seq
A1-14-F	AGCAGTTATGAGGATTACCTG	Sense	33942	33962	} 611	Amp
A1-14-R	AGGCCTGGTGCAGACACTG	Antisense	34534	34552		Amp
A1-14-F2	TATAAATGGCAGATGTGATGG	Sense	34003	34023		Seq
A1-15-F	TATAGCCTTCACAGAGCAGG	Sense	34891	34910	} 646	Amp
A1-15-R	TAGGCATTGCTCCCTGTGC	Antisense	35518	35536		Amp, Seq
A1-15-F2	AGAAAGCCGCAGATTCTGC	Sense	34991	35009		Seq

Amp, these primers were used for PCR amplification.

Seq, these primers were used for direct sequencing.

図 2、マイナーアレル頻度

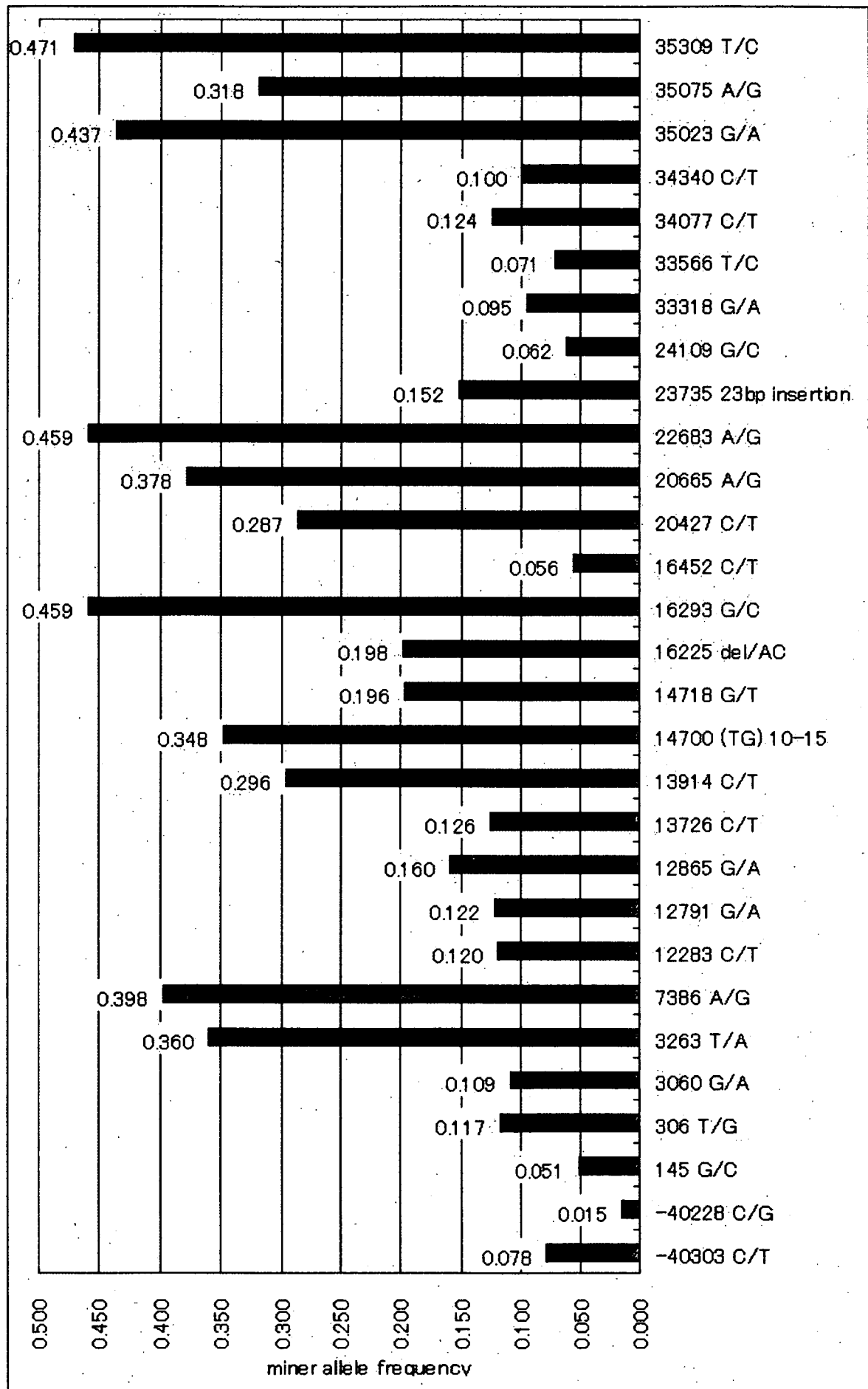


図3、単変量解析：統合失調症罹患群と健常対照群における各マーカーのアリル頻度の比較

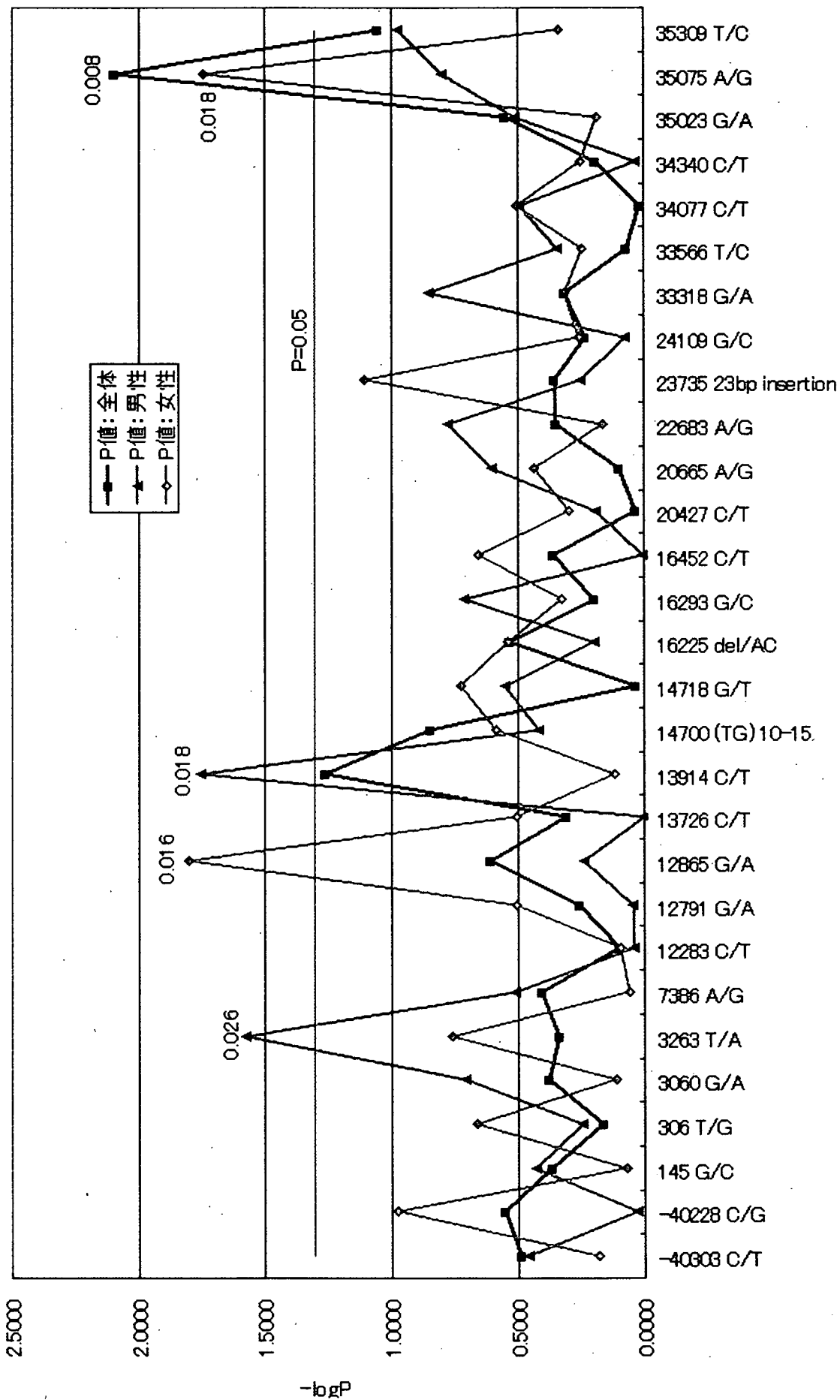


表 2、多変量解析の結果

Step-down procedure (likelihood method)			
SNP-Name	P-Value	Odds-ratio	CI
16225 del/AC	0.004	0.561	(0.377-0.834)
24109 G/C	0.041	0.544	(0.303-0.976)
35075 A/G	0.001	1.858	(1.298-2.659)
Step-up procedure (likelihood method)			
SNP-Name	P-Value	Odds-ratio	CI
16225 del/AC	0.024	0.65	(0.448-0.945)
35075 A/G	0.001	1.731	(1.244-2.408)

図4、LDブロック

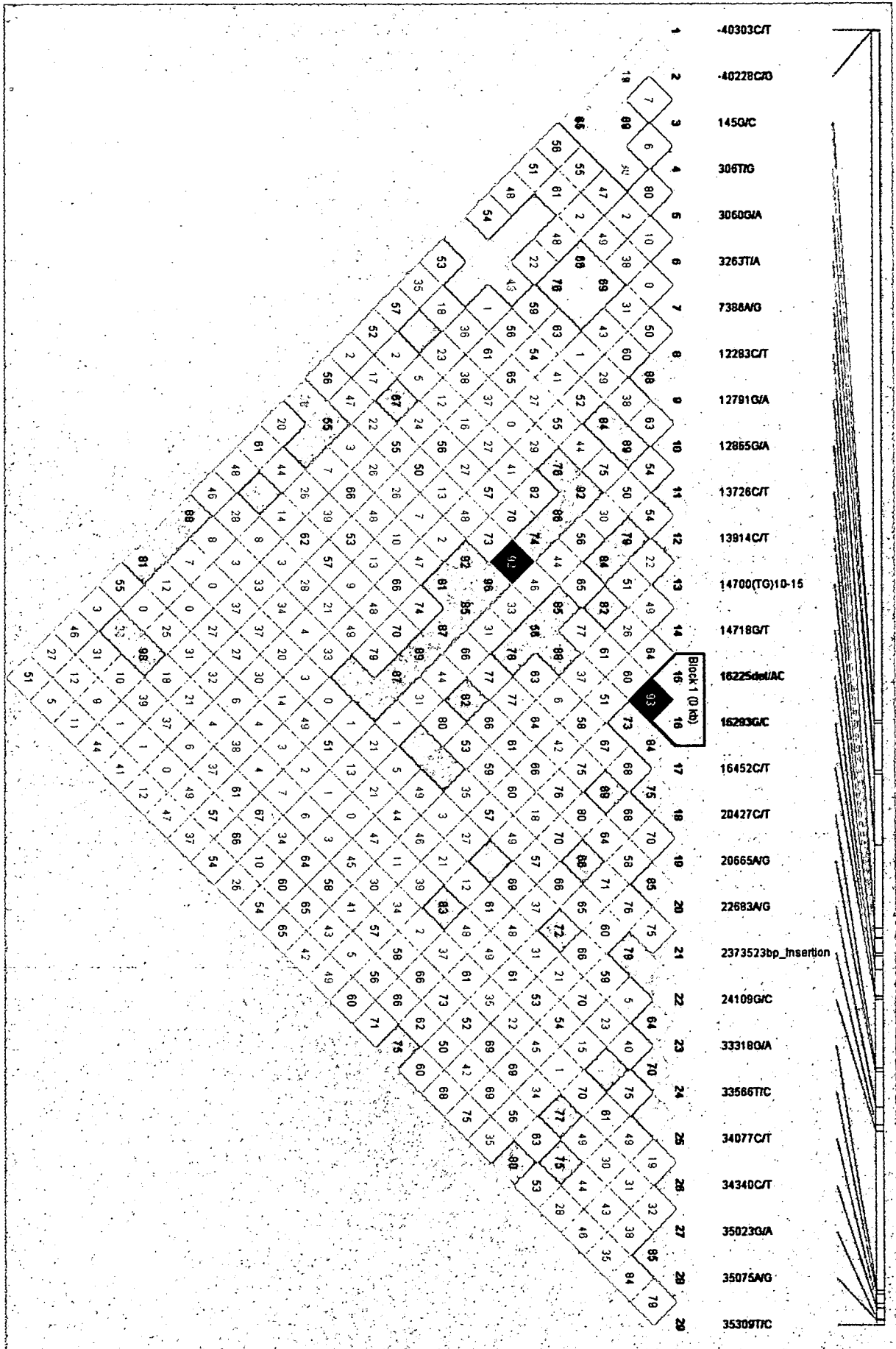


表 3、ハプロタイプ解析の結果

Haplotype	Sample number	Total	Haplotype frequency			P
			All		Schizophrenia	
			Control	420	400	
	820					
No1	CCGTGTACGGCT3G0GCCC4A0GGTCCAAAT	0.033	0.045	0.020	0.043	
No2	CCGTGTGCGGCC4G1CCTGG0GGTCCGGC	0.029	0.026	0.033	0.592	
No3	CCGTGTACGGCT4G0GCCC4A0GGTCCAAAT	0.029	0.029	0.030	0.903	
No4	CCGTGTGCGGCC5G1CCTGG0GGTCCGGC	0.022	0.019	0.025	0.561	
No5	CCGTGTGCGACC3G0GCCC4A0GGTCCAAAT	0.017	0.012	0.023	0.242	
No6	TCGTGAGTAGTC4T0CCCGG1GGTCCGAC	0.016	0.012	0.020	0.354	
No7	CCGTGTGCGGCC4G0CCTGG0GGTCCGGC	0.016	0.010	0.023	0.137	
No8	CCGTGAACGGCC3G0GCCC4A0GGTCCAAAT	0.016	0.019	0.013	0.453	
No9	CCGTGTGCGGC3G0GCCC4A0GGTCCAAAT	0.012	0.007	0.018	0.177	
No10	CCGTGAACGGCT3G0GCCC4A0GGTCCAAAT	0.012	0.014	0.010	0.573	
No11	CCGTGTACGGCT3G0GCCC4A0GGTCCGAT	0.011	0.017	0.005	0.109	
<0.01		0.787	0.790	0.783	0.781	
whole haplotype					0.223	

表4、スライディングウィンドウハプロタイプ解析の結果 (ウィンドウ幅 2, 3)

