

2008330/0A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 功刀 浩

平成 21 (2009) 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.....	10
	尾崎 紀夫	
	2. 統合失調症のメチル化解析.....	15
	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.....	17
	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.....	25
	那波 宏之	
	5. BDNF 関連分子測定系の確立.....	28
	小島 正己	
	6. 統合失調症リスク遺伝子の探索.....	30
	尾関 祐二	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表.....	35
IV.	研究成果の刊行物・別刷.....	38

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

研究代表者 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。

研究代表者の功刀は、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。H20年度は、上記のような種々の高次機能障害を簡易に測定するためのテストとして統合失調症簡易認知機能スケール（BACS）を用いた検討を行い、BACSが統合失調症の認知機能障害の検出に極めて有効であることを示唆する結果を得た。

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。

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を用いたスクリーニングを行い、その後Taqman法による2段階の検証を終了し、少なくとも3つのリスク遺伝子を同定した。

分担研究者の尾崎は、NRG1-ERBB4シグナル伝達に関与するRPTPβをコードするprotein tyrosine phosphatase, receptor type, Z polypeptide 1 (PTPRZ1)を候補遺伝子として統合失調症との関連解析を行ったが、有意な関連を認めなかった。

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。また、t(3;9)(q13.12;q21.2)転座を持つ統合失調症

患者とその転座を母親から受け継いだ子（統合失調型パーソナリティ障害）を見出したため、その分子病態を解析した。

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、炎症性サイトカイン抑制剤であるフタルイミド系化合物の抗精神病薬としての有効性を評価した。その結果、フタルイミド系化合物の慢性経口投与は、モデル動物においてプレパルスインヒビションや社会行動を顕著に改善し、抗精神病作用をもつ可能性が示唆された。

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をマイクロアレイとqRT-PCRによって明らかにした。

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(DKFEZp43, CYP51, DKFZP727, IGLJ3)による診断率が83%となり概ね良好な結果を得た。しかし、これらの遺伝子と統合失調症との関連解析ではいずれも有意な関連を認めなかった。

分担研究者の小島は、前駆体BDNF (proBDNF) に注目し、その特異的抗体の作製を行い、精神疾患患者およびモデルマウスの血中 proBDNF を高感度に検出する抗体、さらには、抗体治療法の作製に貢献するモノクローナル抗体候補を60種以上見いだした。

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	獨協医科大学・准教授、国立精神・神経センター・室長

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・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、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、ウェ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、上記のような種々の高次機能障害を簡易に測定するためのテストとして統合失調症簡易認知機能評価尺度日本語版 (BACS-J) を用いた検討を行った。

2) 網羅的遺伝子関連解析：す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) を一度にタイピ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終了していた。この結果に基づき、昨年度までに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 (第一確認セッション) で TaqMan 法によりタイピングを行った。今年度は第二確認サンプル (統合失調症 568 名、健常者 553 名) を用いて、確認を行い、リスク遺伝子を同定した。

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。

(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。

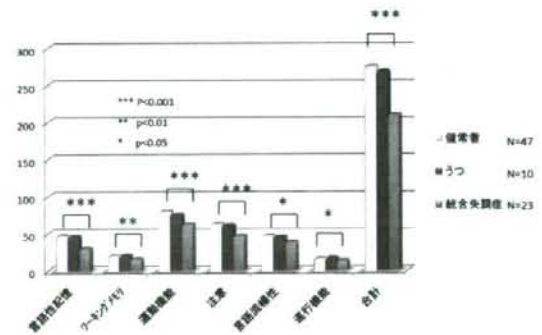
C. D. 研究結果、考察

1) 統合失調症の高次脳機能異常の解明：

昨年度までの検討に引き続き、統合失調症における知能低下、記憶障害、実行機能の障害、運動機能の障害、性格・気質の障害について症例数を増やして検討した。今年度は、これらの種々の認知機能障害を短時間で簡便に測定す

るテストとして、BACS-Jを採用した。その結果、図1のような結果が得られた。また、BACS-Jで得られたサブスケールの結果は、WAIS-RやWMS-Rなどの詳細な検査と高い相関を示した。図から明らかのように、BACS-Jは、統合失調症の認知機能障害を検出するための極めて有用なテストであることが示唆される。また、うつ病との鑑別にも有用であることが示唆された。

図1 統合失調症患者、うつ病患者、健常者におけるBACS-Jの比較



2) 2段階のスクリーニングと2段階の確認サンプルによる検証を経て、網羅的遺伝子関連解析を終了した。その結果、少なくとも3つの遺伝子が統合失調症と関連することを見出した。遺伝子 A は軸索ガイダンスに関与する分子 ($p=0.002$)、遺伝子 B はプリン代謝に関与する分子 ($p=0.002$)、遺伝子 C は細胞接着に関与する分子 ($p=0.022$)であった。

E. 結論

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をさらに症例数を増やして明らかにした。これらの多岐にわたる認知機能障害を簡便に測定するには、BACS-Jが極めて有用であることを明らかにした。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を少なくとも3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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表 (主なもの)

Izumi A, Iijima Y, Noguchi H, Numakawa T, Okada T, Hori H, Kato T, Tatsumi M, Kosuga A, Kamijima K, Asada T, Arima K, Saitoh O, Shiosaka S, Kunugi H. Genetic variations of human neuropsin gene and psychiatric disorders: polymorphism screening and possible association with bipolar disorder and cognitive functions. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33(13): 3237-45.

H ashimoto 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*. 2009;10(1):65-9.

Watanabe Y, Nunokawa A, Kaneko N, Muratake T, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N, Kunugi H, Itokawa M, Otowa T, Ozaki N, Someya T. Two-stage case-control association study of polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility genes with schizophrenia. *J Hum Genet*. 2009;54(1):62-5. .

Ishiguro H, Koga M, Horiuchi Y, Noguchi E, Morikawa M, Suzuki Y, Arai M, Niizato K, Iritani S, Itokawa M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Kunugi H, Sasaki T, Takahashi M, Watanabe Y, Someya T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Supportive evidence for reduced expression of GNB1L in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2008 Nov 14. [Epub ahead of print]

Hori H, Ozeki Y, Terada S, Kunugi H. Functional near-infrared spectroscopy reveals altered hemispheric laterality in relation to schizotypy during verbal fluency task. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(8):1944-51.

Noguchi H, Hori H, Kunugi H. Schizotypal traits and cognitive function in healthy adults. *Psychiatry Res*. 2008;161(2):162-9.

- Fujii T, Kunugi H: p75NTR as a therapeutic target for neuropsychiatric diseases. *Current Molecular Pharmacology* 2: 70-76, 2009.
- Adachi N, Kunugi H: Impaired secretion of brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric diseases. *The Open Neuroscience Journal* 2: 59-64, 2008.
- Ishiguro H, Imai K, Koga M, Horiuchi Y, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Itokawa M, Kunugi H, Sasaki T, Watanabe Y, Someya T, Arinami T. Replication study for associations between polymorphisms in the CLDN5 and DGCR2 genes in the 22q11 deletion syndrome region and schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 2008;18(5):255-6.
- Richards M, Iijima Y, Shizuno T, Kamegaya Y, Hori H, Omori M, Arima K, Saitoh O, Kunugi H. Failure to confirm an association between Epsin 4 and schizophrenia in a Japanese population. *J Neural Transm.* 2008;115(9):1347-54. .
- Mizuguchi T, Hashimoto R, Itokawa M, Sano A, Shimokawa O, Yoshimura Y, Harada N, Miyake N, Nishimura A, Saito H, Sasonkina N, Niikawa N, Kunugi H, Matsumoto N. Microarray comparative genomic hybridization analysis of 59 patients with schizophrenia. *J Hum Genet.* 2008;53(10):914-9.
- Hori H, Noguchi H, Hashimoto R, Nakabayashi T, Saitoh O, Murray RM, Okabe S, Kunugi H. Personality in schizophrenia assessed with the Temperament and Character Inventory (TCI). *Psychiatry Res.* 2008;160(2):175-83.
- Hattori S, Murotani T, Matsuzaki S, Ishizuka T, Kumamoto N, Takeda M, Tohyama M, Yamatodani A, Kunugi H, Hashimoto R. Behavioral abnormalities and dopamine reductions in sdy mutant mice with a deletion in *Dtnbp1*, a susceptibility gene for schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;373(2):298-302.
- Hashimoto R, Moriguchi Y, Yamashita F, Mori T, Nemoto K, Okada T, Hori H, Noguchi H, Kunugi H, Ohnishi T. Dose-dependent effect of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene on memory-related hippocampal activity. *Neurosci Res.* 2008;61(4):360-7.
- Hori H, Nagamine M, Soshi T, Okabe S, Kim Y, Kunugi H. Schizotypal traits in healthy women predict prefrontal activation patterns during a verbal fluency task: a near-infrared spectroscopy study. *Neuropsychobiology.* 2008;57(1-2):61-9.
- 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 Res.* 2008;159(3):281-9.

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 of a functional polymorphism in the glutamate receptor, metabotropic 3 gene in patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2008;62(2):239-40.

Ohtsuki T, Koga M, Ishiguro H, Horiuchi Y, Arai M, Niizato K, Itokawa M, Inada T, Iwata N, Iritani S, Ozaki N, Kunugi H, Ujike H, Watanabe Y, Someya T, Arinami T. A polymorphism of the metabotropic glutamate receptor mGluR7 (GRM7) gene is associated with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2008;101(1-3):9-16.

功刀浩：統合失調症の疾患概念と生物学的研究。特集「統合失調症の生物学的研究」（特集編輯：功刀浩）*メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 34 (11): 568-569, 2008.

堀弘明、功刀浩：統合失調症の神経生理学的研究。特集「統合失調症の生物学的研究」（特集編輯：功刀浩）*メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 34 (11): 582-585, 2008.

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.

学会発表（主なもの）

Kunugi H: Altered expression of BDNF gene and

vulnerability to stress in schizophrenia. In Symposium on "Stress sensitization in spontaneous recurrence of methamphetamine psychosis, schizophrenia and depression" (chaired by Kunio Yui and Charles Nemeroff). XXVI CIMP Congress. Munich, Germany, July 16, 2008.

Kunugi H: Genetic Variations of BDNF and Psychiatric Diseases. In Symposium on "The role of cytokine and brain-derived neurotrophic factor in psychiatric disorders" (chaired by Kim YS and Nakamura J). 2nd World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) and 30th Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry (JSBP), Toyama, September 12, 2008.

Horinouchi.K, Izumi A, Tohyama M, Shiosaka S, Arima K, Kunugi H: L1 mRNA was decreased in the hippocampal granule cells in the patients with schizophrenia, major depression, and bipolar disorder. the 38th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC, November 18, 2008

Iijima Y, Richards M, Shizuno T, Hori H, Omori M, Arima K, Saitoh O, Kunugi H. An association

study of the human Epsin 4 gene and schizophrenia in a Japanese population. XXVI CINP Congress, Munich, Germany, July 16, 2008

Izumi A, Iijima Y, Noguchi H, Numakawa T, Okada T, Hori H, Kato T, Tatsumi M, Kosuga A, Kamijima K, Asada T, Arima K, Saitoh O, Shiosaka S, Kunugi H: Possible association of the human neuropsin gene with bipolar disorder and cognitive functions. Society for Neuroscience 2008, Washington, DC 11/15-11/19 2008

兼田康宏, 住吉太幹, 中込和幸, 沼田周助, 古郡規雄, 橋本直樹, 佐久間寛之, 大下隆司, 船橋英樹, 功刀浩, 原田俊樹, 田中恒彦, 上岡義典, 伊東徹, 池澤聰, 長田泉美, 加藤淳一, 吉田悟己, 羽下路子, 芳賀大輔, 小林清香, 中谷真樹, 鈴木道雄, 久住一郎, 石郷岡純, 大森哲郎: 統合失調症認知機能簡易評価尺度-日本語版 (BACS-J) による統合失調症の認知機能評価 (続報). 第8回精神疾患と認知機能研究会, 東京, 11月8日, 2008.

尾関祐二, 橋倉都, 堀弘明, 三島和夫, 功刀浩: 記憶・知能検査と睡眠・睡眠衛生. 日本睡眠学会第33回定期学術集会, 福島, 6月25日, 2008.

安達直樹, 沼川忠広, 熊丸絵美, 伊丹千晶, 仙波りつ子, 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の細胞内BDNF発現上昇は, その後のシナプス機能阻害の一因となっている (Intracellular increased BDNF expression is involved in synaptic dysfunction caused by phencyclidine in cultured cortical neurons). 第31回日本神経科学大会 (Neuro2008), 東京, 7月9日, 2008.

橋本亮太, 服部聡子, 室谷知孝, 松崎伸介, 河本圭介, 山田浩平, 桑原隆亮, 石塚智子, 熊本奈都子, 武田雅俊, 大和谷厚, 遠山正彌, 功刀浩: 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 (Dysbindin and pathogenesis of schizophrenia). 第31回日本神経科学大会 (Neuro2008), 東京, 7月11日, 2008.

堀弘明, 永岑光恵, 曾雌崇弘, 岡部繁男, 寺田純雄, 金吉晴, 功刀浩: 統合失調症型人格傾向と語流暢課題遂行中の前頭前野賦活パターン: NIRSによる検討. Schizotypal traits and prefrontal activation patterns during a verbal fluency task: A near-infrared spectroscopy study. 第31回日本神経科学大会 (Neuro2008), 東京, 7月9日, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

NRG1-ERBB4 シグナル伝達はニューロンの移動、軸索ガイダンス、髄鞘化、オリゴデンドロサイトの発達、神経筋接合部の形成、シナプスの形成などに影響を与え、神経発達に重要な役割を果たすことが知られている。2007年には receptor protein tyrosine phosphatase beta (RPTP β) が membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing (MAGI) とともに NRG1-ERBB4 シグナル伝達の調整を行うこと、RPTP β をコードする protein tyrosine phosphatase, receptor type, Z polypeptide 1 (PTPRZ1) がイギリス人における関連解析において統合失調症の発症と有意な関連を認めたことが報告された。

本研究では、PTPRZ1 を候補遺伝子として、日本人において統合失調症患者 576 名、健常対照者 768 名を対象として関連解析を行った。全 29SNP を解析し、アレル、遺伝子型、ハプロタイプ頻度の比較を行った。rs1196511 の遺伝子型頻度のみ P 値が 0.05 を下回り、有意な傾向を認めたが、多重比較の補正後は有意差を認めなかった。PTPRZ1 は日本人においては統合失調症の発症と有意な関連は認められなかった。日本人と白色人種の連鎖不平衡構造の不一致、あるいは環境要因等の相違による統合失調症発症脆弱因子の人種差を反映している可能性が示唆された。

A. 研究目的

統合失調症は幻覚妄想や思考障害といった陽性症状、社会的引きこもりや無気力や感情の平板化といった陰性症状、認知機能障害を特徴とする重篤な慢性の精神疾患である。その有病率は約 1% で、遺伝率は 0.8 と算出されており、複数の遺伝要因と環境要因が発症に関与する多因子疾患と考えられている。また、統合失調症の病態に関しては、患者の脳において脳室拡大や神経細胞の配列異常がみられ、グリオシスがみられないことなどから神経発達障害仮説が唱えられている。これまでに様々な遺伝学的研究がなされており、連鎖解析による疾患感受性部位や関連解析によ

る疾患感受性遺伝子が報告されている。その中でも複数の人種で関連が確認されており、有望視されている候補遺伝子の一つに Neuregulin1 (NRG1) がある。NRG1 の機能は主にそのレセプターである v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian) (ErbB4) によって媒介され、ニューロンの移動、軸索ガイダンス、髄鞘化、オリゴデンドロサイトの発達、神経筋接合部の形成、シナプスの形成などに影響を与え、神経発達に重要な役割を果たすことが知られている。これまでに NRG1 を候補遺伝子とした関連解析が数多く行われ、日本人においても大規模サンプルで関連解析が行われたが、有意な関連は認められなかった。2007 年

には Buxbaum らによって NRG1 によって活性化された ErbB4 以降の新たなパスウェイとして receptor protein tyrosine phosphatase beta (RPTP β) が membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing (MAGI) とともに NRG1-ERBB4 シグナル伝達の調整を行うことが報告された。また、同時に RPTP β をコードする protein tyrosine phosphatase, receptor type, Z polypeptide 1 (PTPRZ1) がイギリス人における関連解析において統合失調症の発症との有意な関連が報告された。RPTP β には 4 つの splicing isoform があり、PDZ 領域をもつ蛋白を脱リン酸化する機能をもつ。主に中枢神経系において、胎生期から成体まで、ニューロンおよびグリアに発現を認め、中枢神経系の発達や機能調節に重要な役割を果たしていると考えられている。

これらの知見を基に、本研究では PTPRZ1 を候補遺伝子として、日本人において統合失調症との関連解析を行った。

B. 研究方法

1. 対象

統合失調症患者 576 名、健常対照者 768 名を対象とした。診断は 2 名以上の精神科医が Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition(DSM-IV)に基づいて行った。

2. 連鎖不平衡解析および tagging SNP の選出

Hap Map データベース [release #22; phase2, April 2007, Japanese in Tokyo, minor allele frequency (MAF)>0.05] および NCBI dbSNP データベースより PTPRZ1 の遺伝子領域全体および上下流 5000bp ずつに存在する SNP に関して連鎖不平衡解析を行った。先行研究で関連のみられた SNP は強制的に選択し、その他の SNP については Haploview 3.32 の Tagger プログラムを用い

て「pairwise tagging only $r^2>0.8$ 」の基準に従い、合計 29 個の SNP を選出した。

3. 遺伝子型解析

DNA は通常の方法で末梢静脈血より抽出した。すべての SNP の遺伝子型は 5'-exonuclease allelic discrimination assay (TaqMan 法) により同定した。

4. 統計学的解析

Haploview 3.32 を用いて各 SNP におけるハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱の評価および連鎖不平衡解析を行った。 χ^2 検定にてアレル頻度、遺伝子型頻度の解析を行った。度数が低い実際の遺伝子型の関連解析には Fisher の直接法を用い、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、Unphaged 2.403 を用いて sliding window 方式で解析を行った。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 SNPSpD を用いた。統計学的検出力の計算は、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、名古屋大学医学部倫理委員会において承認を受けた上で研究を行った。すべての対象者には十分な説明を行い、文書による同意を得た。

C. 研究結果

rs1206477, rs13241278 については健常対照者群にてハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱を認めたため、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。度数の低い 6 つの SNP の遺伝子型の関連解析には Fisher の直接法を用いた。

rs1196511 の遺伝子型頻度のみ $p=0.007$ となり、 P 値が 0.05 を下回り、有意な傾向を認めたが、SNPspD による多重比較後は $p=0.17$ となり、有意差を認めなかった。他の SNP のアレル頻度、遺伝子型頻度およびハプロタイプ頻度においてはいずれも有意差を認めなかった。

統計学的検出力の解析では、統合失調症の有病率を 1%、genotype relative risk を 1.25~1.61 と設定した場合に 80%以上の検出力が得られた。

D. 考察

'common disease-common variant'仮説においては統合失調症のように、進化的に中立な(繁殖への影響が少ない)多因子疾患は、ありふれた変異によって影響を受けていると仮定し、それぞれの多型がもつ疾患へのリスクは中等度(相対危険度は 1.1~1.5)だが、合計の遺伝学的影響は累積的であるとする。そのため、疾患感受性部位の多型が疾患の発症に関連しているならば、アレル、遺伝子型、ハプロタイプレベルの関連解析においてそのような多型(または病因となるアレルと連鎖不平衡にあるタグ SNP)が見つかるはずである。本研究においては日本人の連鎖不平衡とアレル頻度を考慮した SNP セットの解析を行ったが、有意な遺伝学的関連を認められなかったことから、日本人においては *PTPRZ1* と統合失調症の発症との間には有意な関連はないと考えられる。日本人と白色人種の連鎖不平衡構造の不一致、あるいは環境要因等の相違による統合失調症発症脆弱因子の人種差を反映している可能性が示唆された。

E. 結論

PTPRZ1 と統合失調症との間に有意な関連は認められなかった。しかし、*NRG1-ERBB4* シグナ

ル伝達は中枢神経系の発達や機能調節に重要な役割を果たしていると考えられる。今後は他の人種における *PTPRZ1* と統合失調症の関連や、*NRG1-ERBB4* シグナル伝達に関わる他の分子との相互作用も考慮した解析が必要であると考えられる。

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

・Yoshimi A, Takahashi N, Saito S, Ito Y, Aleksic B, Usui H, Kawamura Y, Waki Y, Yoshikawa T, Kato T, Iwata N, Inada T, Noda Y, Ozaki N: Genetic analysis of the gene coding for DARPP-32 (PPP1R1B) in Japanese patients with schizophrenia or bipolar disorder. *Schizophr Res* 100 (1-3):334-41 (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)

・Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Suzuki T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Ozaki N, Iwata N: No association between prostate apoptosis response 4 gene (PAWR) in schizophrenia and mood disorders in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B (4):531-4 (2008)

・Kawashima K, Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Takahashi N, Saito S, Ohi K, Yasuda Y, Hashimoto R, Takeda M, Inada T, Ozaki N, Iwata N: No association

between tagging SNPs of SNARE complex genes (STX1A, VAMP2 and SNAP25) and schizophrenia in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B (7):1327-31 (2008)

・ Ji X, Takahashi N, Saito S, Ishihara R, Maeno N, Inada T, Ozaki N: Relationship between three serotonin receptor subtypes (HTR3A, HTR2A and HTR4) and treatment-resistant schizophrenia in the Japanese population. *Neurosci Lett* 435 (2):95-8 (2008)

・ Ito Y, Yamada S, Takahashi N, Saito S, Yoshimi A, Inada T, Noda Y, Ozaki N: No association between the protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z Polypeptide 1 (PTPRZ1) gene and schizophrenia in the Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B (7):1013-8 (2008)

・ Ito Y, Nakamura Y, Takahashi N, Saito S, Aleksic B, Iwata N, Inada T, Ozaki N: A genetic association study of the FXD domain containing ion transport regulator 6 (FXD6) gene, encoding phosphohippolin, in susceptibility to schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Lett* 438 (1):70-5 (2008)

・ Ikeda M, Takahashi N, Saito S, Aleksic B, Watanabe Y, Nunokawa A, Yamanouchi Y, Kitajima T, Kinoshita Y, Kishi T, Kawashima K, Hashimoto R, Ujike H, Inada T, Someya T, Takeda M, Ozaki N, Iwata N: Failure to replicate the association between NRG1 and schizophrenia using Japanese large sample. *Schizophr Res* 101 (1-3):1-8 (2008)

・ Ikeda M, Hikita T, Taya S, Uruguchi-Asaki J, Toyooka K, Wynshaw-Boris A, Ujike H,

Inada T, Takao K, Miyakawa T, Ozaki N, Kaibuchi K, Iwata N: Identification of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet* 17 (20):3212-22 (2008)

・ Aleksic B, Ikeda M, Ishihara R, Saito S, Inada T, Iwata N, Ozaki N: No association between the oligodendrocyte-related gene PLP1 and schizophrenia in the Japanese population. *J Hum Genet* 53 (9):863-6 (2008)

2. 学会発表

・ Ozaki N: Glia-related gene and schizophrenia: Invited lecture. The Third Dual Congress on: "Psychiatry and the Neurosciences", 2008

・ Ozaki N: From Gene to Phenotype in Schizophrenia: Invited lecture. 2nd WFSBP Asia-Pacific Congress, 2008

・ Ozaki N: Endophenotype Approach of Mental Disorders: Bridging between Genotype and Phenotype 2008 International Conference on Pharmacogenomics Symposium 10:New Paradigm of Pharmacogenomics: to be alone or together Invited, 2008

・ Aleksic B, Ikeda M, Ishihara R, Saito S, Inada T, Iwata N, Ozaki N: No Association Between Oligodendrocyte Related Gene PLP1 and Schizophrenia in the Japanese Population. 16th WCPG, 2008 大阪 10/11-15

・ Aleksic B, Ikeda M, Ishihara R, Takahashi N, Saito S, Matsumoto A, Inada T, Iidaka T, Iwata N, Ozaki N: Gap Junctions, Bipolar Disorder and Schizophrenia: Genetic association Study. 第31回神経科学会, 2008 東京 7/9-11

・ 伊藤圭人, 山田真之亮, 高橋長秀, 齋藤真一,

吉見陽， 稲田俊也， 野田幸裕， 尾崎紀夫：
PTPRZ1 と統合失調症との関連解析。統合失調
症学会， 2008 東京 3/14-15

・関口裕孝， 羽瀨知加子， 入谷修司， 田谷真一
郎， 貝淵弘三， 尾崎紀夫：統合失調症モデル
マウスにおける組織学的検討 -予備的実験-。
第2回アジア・太平洋生物学的精神医学会・第
30回日本生物学的精神医学会， 2008 富山、
9/10-12

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

統合失調症のメチル化解析

分担研究者 陣野吉廣

琉球大学大学院医科学研究科生命統御医科学分野 教授

研究要旨

アレイ解析でハロペリドール投与群と非投与群間に有意の差があった 85 遺伝子について TaqMan 自動定量装置を用いて定量した。36 遺伝子(42%)で再現の結果が得られた。アレイ解析結果は薬による発現変化を把握するのに有用である。

A. 研究目的

ハロペリドールによってメチル化に変化を来す遺伝子または DNA 配列を同定する。今年度はアレイ結果を元に、薬によって発現が変化した遺伝子を同定する。

B. 研究方法

アレイ解析でハロペリドール投与群と非投与群で有意の差があると判定された 294 遺伝子のうち 85 遺伝子を選んで、リアルタイム PCR で検証した。

（倫理面への配慮）

特に該当する実験はなかった。

C. 研究結果

85 遺伝子（増加, 54;低下, 31）のうち、36 遺伝子(42%)で再現性が確認された。内訳は、増加した遺伝子が 22、低下した遺伝子が 14 だった。増加には *Drd2*, *Drd1a* 等のドーパミン伝達関連遺伝子が含まれ、*Agt*, *Enpp2* 等が低下していた。

D. 考察

TaqMan 自動定量装置を用いた cDNA の定量は、4 つの比較対照遺伝子 (*Actb*, *Tbp*, *Gapdh*, *Cf1l*) を設けて行っており、信頼度は極めて高い。アレイ解析で 1.5 倍以上または 1.5 分の 1 以下の有意な増加または減少が認められた 85 遺伝子の 4 割で増減の確認が得られた。これは、アレイ結果だけでも変化（または、効果）の概観を把握するのに有益であることを示唆する。

E. 結論

アレイ結果を qPCR で検証した。85 遺伝子のうち 4 割が確認された。遺伝子も理に適うものが多く含まれていた。アレイ結果は概観の把握に有益である。

F. 健康危険情報

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Sakamoto H et al. XVIth World
Congress on Psychiatric Genetics (Osaka,
08)

坂本秀樹ほか4名. 第31回
日本分子生物学会年会 (神戸,
08)

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

統合失調症末梢血の遺伝子発現解析と診断法の開発に関する研究

分担研究者 岩田 仲生 藤田保健衛生大学医学部精神医学教室 教授

研究要旨

統合失調症を末梢血サンプルから診断法の開発を行った。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新たな方法論を開発して解析した。前年度に引き続きサンプル数を総計患者群 29 例、対照群 30 例での解析を終了した。解析にあたり従来の平均値の差異のみならず判別度の差異に注目し新たな解析法の開発を行った。結果として 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。今回選択された予測遺伝子多型の精度を上げるべく選択された 4 つの遺伝子と疾患との関連について検討を行ったが疾患そのものとの関連性は認めなかった。今後遺伝子の発現と疾患の病態生理についてさらなる検討が必要である。

A. 研究目的

統合失調症の長期予後は未だ不良で 10% が自殺既遂し 80% が未雇用で社会・職業的障害が重度のままである。精神科領域においては多大な医療資源が必要とされており克服すべき疾患である。統合失調症の診断及び治療法については、現時点でその病態生理が不明であることから、診断については臨床症状のみから、また治療薬に関してもその病態生理との関連は不明のまま用いられているのが現況である。

ゲノム医学の進展は統合失調症についてもその原因遺伝子発見の期待が寄せられ世界中で研究が進められてきた。原因遺伝子が同定されれば必然的に新たな診断・治療法が開発される足がかりになるが、残念ながら確定的な原因遺伝子の発

見には至っていない。その理由は統合失調症が複雑な要因が絡み合って発症する複合多因子疾患であり、多数存在する原因遺伝子一つ一つの疾患発症への寄与率はかなり低いものであり、従って現状のゲノム医学技術による遺伝子探索が奏功しないものと推察される。

上記をふまえ本研究の目的は原因遺伝子そのものを同定する事ではなく、統合失調症という病態を特徴づける遺伝子の発現プロファイルを、しかも臨床簡便に取得できる末梢血サンプルから抽出することを第一の目標とした。

遺伝子発現プロファイルを網羅的に同定する技術として DNA チップを本研究でも用いるが、DNA チップを用いた研究の長所は余すところなく全ての遺伝子を検索できることである。一方そ

れが同時に短所となり膨大なデータを正しく解釈し明確で有用な情報を抽出することが困難になってしまうことである。従って本研究ではこれらの短所を回避するため

1. 臨床へすぐに還元できる材料と方法

2. 偽陽性を可能な限り排除したデータ

を実現するために敢えて患者末梢血サンプルから白血球の株化を行い安定した状態から定常的なRNAを抽出することとした。当然ながら病態の本体である脳での重要な発現情報を取得できないが、一方現在の科学技術では生体の脳での病態を安全に検索することは不可能である。従って末梢血サンプルで取得できる安定した情報の確定を目指した。

I. 研究方法

対象

対象は統合失調症患者及び性別と年齢をマッチさせた正常対照者。文書による説明を行い本人の同意署名を得た後に末梢血を採血した。診断には構造化面接としてSCIDを行った。

発現解析にはケース：コントロール＝29：30の合計59サンプルを用いた。この29例については統合失調症初発患者でかつ未投薬の状態での採血に同意の得られたものとした。また疾患との関連性をみるために統合失調症患者600例、対照者600例のDNAサンプルを使用した。

サンプルの調整

末梢血からBリンパ球を分離精製しEBウィルスを感染させることにより不死化させ株化を行った。遺伝子発現解析の為に、株化したリンパ球からtotal RNAを抽出しd(T)18プライマーを用いた1本鎖cDNAを合成した。これらの手順は使用するチップに合わせたラベリングキットに従って調整した。

DNAチップ発現解析

DNAチップはAffymetrix社のGeneChipプローブア

レイHuman Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いた。本アレイは1枚で約47000の転写産物/約54000のプローブセットが搭載されており、ヒト遺伝子をほぼ網羅して解析が可能である。解析には本学に共通機器として整備されたAffymetrix社のGeneChipマイクロアレイ解析システムを使用した。

統計学的解析

Classificationを行う前に、trimming stepとして、

発現の低いものを除外：Average intensity100以上、IQR100以下

a) Student-t test/Man Whitney Utest あるいは

b) S2N' での上位50をリストアップ

を用いた。Classificationとしては、ブースト化ファジー分類器(BFCS)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究課題は、統合失調症患者、健常対照群を対象とした遺伝子解析研究である。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」に即して編成された藤田保健衛生大学倫理委員会において本研究課題に直結するゲノム研究に関する課題、「遺伝子解析によるこころの健康とこころの病気に対するかかりやすさ(発症脆弱性)や薬の効きめや副作用(治療反応性)等の解明に関する研究」の研究計画書を提出し、承認を受け、これまでも研究を遂行してきた。

平成18年度も(平成19年度以降も)、試料提供者へのインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理(匿名化)などを徹底し、倫理的配慮を持って研究を進める。

また申請者は日本人類遺伝学会の臨床遺伝専門医として藤田保健衛生大学病院遺伝医療相談を担当しており、本研究のみならず様々な遺伝相