

- 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 CINP 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

統合失調症の病態に関連しうる候補遺伝子として、kynurenine 3-monooxygenase, complexin1 and complexin2, chromogranin A, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, oligodendrocyte lineage transcription factor 2, serotonin transporter gene (SLC6A4), DARPP-32 (PPP1R1B), Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor-Type, Z polypeptide 1, gap junction genes, FXYP domain containing ion transport regulator 6, tachykinin receptor, PLP1 の各遺伝子を選択し、候補遺伝子上の SNP から HapMap データベースをもとに tagging SNPs を選定し、統合失調症および健常者の DNA を用いて genotype し、統合失調症と各遺伝子との関連解析を行った。

その結果、PPP1R1B は統合失調症と有意な関連は確認されなかったが、著しくハーディワインバーク平衡から逸脱している SNP があったこと、この領域が Copy Number Variation(CNV)が存在する領域であること、の二点を鑑み、本領域の CNV と統合失調症の病態との関連を検討した。その結果、健常者と比較して、コピー数の増えている個体が統合失調症では少ないことが確認され、今後、CNV の機能的意義を確認する必要があると思われる。

それ以外の各候補遺伝子に関しては、関連が見出されなかった。

A. 研究目的

統合失調症の病態は明確化されていないが、神経発達の障害が関係していること、あるい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、が推測されている。

また、統合失調症は双生児研究などの結果から遺伝率が 0.8 と高く、遺伝因子の関与が発症に関わっていることも明らかである。

以上を踏まえ、我々は、統合失調症の病態と関連することが推測される多様な遺伝子、kynurenine 3-monooxygenase, complexin1 and complexin2, chromogranin A, 2',3'-cyclic

nucleotide 3'-phosphodiesterase, oligodendrocyte lineage transcription factor 2, serotonin transporter gene (SLC6A4), DARPP-32 (PPP1R1B), Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor-Type, Z polypeptide 1, gap junction genes, FXYP domain containing ion transport regulator 6, tachykinin receptor, PLP1 の各遺伝子を選択し、統合失調症との関連解析を行ってきた。

B. 研究方法

1. 対象

統合失調症患者および健常者各々約 500 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. LD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 データベースより各遺伝子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、tagging SNPs 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. 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

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クラン-アーミテージ傾向検定を用いた。ハプロタイプの解析は、Unphased 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

今回、候補遺伝子とした kynurenine 3-monooxygenase, complexin1 and complexin2, chromogranin A, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, oligodendrocyte lineage transcription factor 2, serotonin transporter gene (SLC6A4), DARPP-32 (PPP1R1B), Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor-Type, Z polypeptide 1, gap junction genes, FXFD domain containing ion transport regulator 6, tachykinin receptor, PLP1 各遺伝子は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。

PPP1R1B においては、rs12601930 がハーディ-ワインベルグ平衡から逸脱していたため、コピー数解析を行ったところ、統合失調症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. 考察と結論

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 PPP1R1B の 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、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、統合失調症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. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 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)

・Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Okochi T, Inada T, Ozaki N, Iwata N: Genetic association analysis of tagging SNPs in alpha4 and beta2 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes (CHRNA4 and CHRN2) with schizophrenia in the Japanese population. *J Neural Transm* 115 (10):1457-61 (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 FXRD domain containing ion transport regulator 6 (FXRD6) gene, encoding phosphohippin, in susceptibility to schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Lett* 438 (1):70-5 (2008)

・Inada T, Koga M, Ishiguro H, Horiuchi Y, Syu A, Yoshio T, Takahashi N, Ozaki N, Arinami T: Pathway-based association analysis of genome-wide screening data suggest that genes associated with the gamma-aminobutyric acid receptor signaling pathway are involved in neuroleptic-induced, treatment-resistant tardive dyskinesia. *Pharmacogenet Genomics* 18 (4):317-323 (2008)

・Ikeda M, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kitajima T, Yoshimura R, Hashimoto S, O'Donovan MC, Nakamura J, Ozaki N, Iwata N: Variants of dopamine and serotonin

- candidate genes as predictors of response to risperidone treatment in first-episode schizophrenia. *Pharmacogenomics* 9 (10):1437-43 (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, Toyo-oka 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)
 - 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)
 - 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)
 - 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)
 - Usui H, Takahashi N, Saito S, Ishihara R, Aoyama N, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Yoshida K, Iwata N, Inada T, Ozaki N: The 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and oligodendrocyte lineage transcription factor 2 genes do not appear to be associated with schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res* 88 (1-3):245-50 (2006)
 - Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Maeno N, Aoyama N, Ji X, Miura H, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N, Inada T: Association between chromogranin A gene polymorphism and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res* 83 (2-3):179-83 (2006)
 - Kishi T, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N, Iwata N: No association of complexin1 and complexin2 genes with schizophrenia in a Japanese population. *Schizophr Res* 82 (2-3):185-9 (2006)
 - Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: No association of serotonin transporter gene (SLC6A4) with schizophrenia and bipolar disorder in Japanese patients: association analysis based on linkage disequilibrium. *J Neural Transm* 113 (7):899-905 (2006)
 - Ikeda M, Iwata N, Kitajima T, Suzuki T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: Positive association of the serotonin 5-HT7 receptor gene with schizophrenia in a

Japanese population. *Neuropsychopharmacology* 31 (4):866-71 (2006)

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, 羽瀧知加子, 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

・ 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: 抗うつ薬が運動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ブランの効果。総合病院精神医学会，2007

・尾崎紀夫：シンポジウム「疾患領域横断的遺伝学」統合失調症のゲノム解析：表現型同定とCDCV 仮説の問題を中心に。日本人類遺伝学会第52回大会，2007

・尾崎紀夫：精神障害に関与する遺伝因と環境因をどの様に患者・家族に伝えるべきか：精神科臨床における遺伝カウンセリング。第103回精神神経学会教育講演，2007

・尾崎紀夫：うつ病の病態：「心か脳か？」から「心も脳も」への発想へ。医学会総会2007：セッション名-新しい「うつ」の理解と対応，2007

・尾崎紀夫：現在の精神医学診断体系におけるうつ病の位置づけ：今一度、うつ病とは何かを考える。第14回日本産業精神保健学会：特別講演，2007

・伊藤圭人，齋藤真一，高橋長秀，稲田俊也，岩田仲生，尾崎紀夫：ポスター；FXD6 遺伝子と統合失調症との関連解析。日本人類遺伝学会第52回大会，2007

・中村公樹，木村宏之，吉田契造，尾崎紀夫：頭頸部悪性腫瘍における心理的負担について。総合病院精神医学，2007

・Usui H, Takahashi N, Saito S, Ishihara R, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, KY, Inada T, Iidaka T, Iwata N, Ozaki N: Association study between the MPZL1/PZR gene and schizophrenia in the Japanese population. 15th World Congress on Psychiatric Genetics, 2007

・Saito S, Takahashi N, Ito Y, Aleksic B, Ishihara R, Yoshida K, Inada T, Iidaka T, Ozaki N: Association study between the TACR3 gene polymorphisms and Japanese schizophrenia. 15th World Congress on

Psychiatric Genetics, 2007

・Ozaki N, Ikeda M, Taya S, Kaibuchi K, Iwata N: DISC1-interacting molecules and pathogenesis of schizophrenia: A Candidate gene approach. 2nd WFSBP International Congress of Biological Psychiatry :Symposium Pathogenesis of Schizophrenia, 2007

・Aleksic B, Ishihara R, Nagahide T, Maeno N, Saito S, Inada T, Ozaki N: Gap Junction Forming Proteins and Schizophrenia: Genetic Association Study. 第2回日本統合失調症学会，2007

G. 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

ハロペリドール投与でメチル化の修飾を受ける DNA 配列を同定するため網羅的発現解析を行った。アレイ解析で 294 遺伝子に有意の差が認められた。85 遺伝子を選び PCR 自動定量装置で検証し、36 遺伝子(42%)で再現の結果が得られた。

A. 研究目的

統合失調症へのメチル化異常の関与の有無の解明を目指してハロペリドールのメチル化修飾作用を見出し、修飾される遺伝子同定のため発現解析を行った。

B. 研究方法

処理済みのラット脳から RNA を抽出しマイクロアレイで発現解析を行った(理研の加藤・岩本先生との共同研究)。アレイ結果は PCR 自動定量装置で検証した。

(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

ラット遺伝子 31,099 のスクリーニングで、294 遺伝子が有意 ($p < 0.05$) な発現の差を示した (1.5 倍以上または 1.5 分の 1 以下に増減)。これらから 85 遺伝子を選んで

リアルタイム PCR を行った結果、36 遺伝子 (42%) で再現性を確認できた。

D. 考察

PCR 自動定量装置での cDNA の定量は、4 つの比較対照遺伝子で補正しており信頼度は極めて高い。アレイ結果を自動定量装置で検証したのは 3 割弱 (85/294) だが、その 4 割で増減の確認が得られており、アレイ結果はそれだけでも変化の概観を把握するのに有用と思われる。これらはメチル化解析の対象候補になる。

E. 結論

ハロペリドールによって発現が変化する 36 遺伝子を同定した。アレイ結果の高い正解率から、これらを含む 294 遺伝子はメチル化解析の候補と成り得る。

F. 研究発表

1. 論文発表

①Shimabukuro M et al. Behav Brain
Funct 2: 37, 2006. (online journal)

②Shimabukuro M et al. J Psychiat Res
41(12): 1042-1046, 2007.

③Shen H et al. J Hum Genet 51(5):
440-450, 2006.

2. 学会発表

①神山聡子ほか3名. 第14回日本精神・行動遺伝医学会(東京,2006)

②神山聡子ほか3名. 第15回日本精神・行動遺伝医学会(東京,2007)

③Sakamoto H et al. XVIth World
Congress on Psychiatric Genetics (Osaka,
2008)

④坂本秀樹ほか4名. 第31回日本分子
生物学会年会(神戸, 2008)

G. 知的所有権の取得状況

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 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。最初の株化細胞のどの段階で解析を行うべきかを検討し、株化樹立直前での発現プロファイルが最も再現性よく安定した発現プロファイルが得られることを確認した。次に14例対15例でのパイロット試験を行った。この段階で3つの遺伝子によるfuzzy rule法による判別で100%の正当率が得られた。しかし引き続きサンプル数を総計患者群29例、対照群30例にして解析したところ、その再現性は45%になった。そこで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。

H. 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状である。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ウイ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談に応じる体制を構築し対応する環境を整備している。

J. 研究結果

1. どの段階のリンパ球を用いるか?

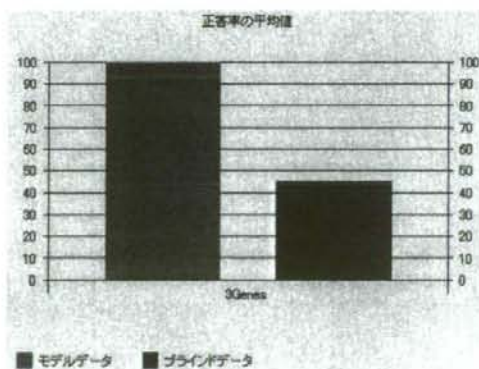
株化したBリンパ球からRNAを抽出し逆転写を行いcDNAを合成したのちチップ解析をすすめた。株化中のどの時点かによってRNA発現量が変化するか否かについてまず予備実験を行った。即ち1.末梢血を採血直後の新鮮な血液から抽出した場合、2.株化が成立して凍結する直前のBリンパ球、3.一度凍結保存した後再凍結して培養を行い安定した状態について検討したところ、一部の遺伝子については発現量が大きく変化することが判明した。本研究の目標は診断方法の確立にある。数日単位の早急な診断法は現実の臨床場面は要求しておらず、むしろ確実な診断法と病態生理に関連する未知の遺伝子群を発見することが重要と考え本研究では2の確立直後のサンプルを用いて標準化されたサンプル群として行った

2. まず患者群14サンプル、対照群15サンプルの合計30サンプルについて発現解析を行った。約2万5千の遺伝子について発現解析を行い $P < 0.05$ で有意となった遺伝子が

1212個となった。この時点で何らかの生物学的情報を加えた選別を行うにはサンプル数が少なく、 α 及び β エラーが多く今後の詳細な解析にはいるには不十分と結論した。しかしこの時点でFuzzy ruleに基づいた選択法を用いて解析を行ったところ下図の通り3遺伝子の発現の過多で100%の正解率で患者群とそれ以外を判別することができた。

Fuzzy Rule		1. CDC2L5			
		High		Low	
		3. HAN11		3. HAN11	
2. GPH	High	0/3	0/3	0/3	14/0
	Low	0/0	0/2	1/0	0/3
Control / Case					

3. そこでサンプル数を総数29例:30例まで追加実験を行い再度上記の方法で解析を行ったところその正当率は45%となった。



統計学的方法a)で選出された候補とb)で選出された候補では、BFCSの正答率が高くなかったため、a)とb)の平均値から選出した候補を改めて選出した。下図は横軸にa)による差異を、縦軸にb)による差異を遺伝子ごとにプロットしたものである。

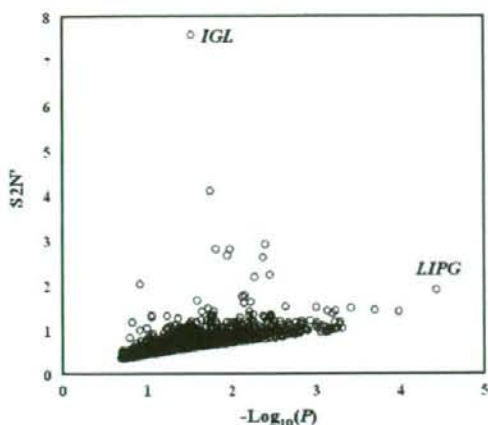
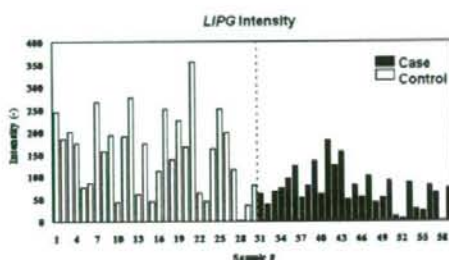


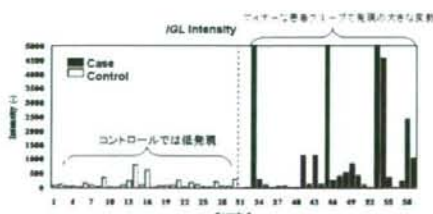
Figure 2 T-test vs. S2N' 2D plot

a)の方法で最も差異が大きくなる遺伝子はLIPGでありその発現の違いは以下の通りである。



平均の差異は最も大きいそれぞれの変動範囲は重なっており、判別という意味では明確でない。

S2N'による方法で最も差異が大きくなった遺伝子はIGLであり以下の通りである。



平均では大きな差異とはならないもののいくつかの患者群ではどの健常者群よりも10倍から数百倍の発現の差異があり判

別という意味ではより明確になる遺伝子が選出される。

4. 両者の方法でも上位となる遺伝子をBFCSによってシミュレーションを行ったところでは、3遺伝子が最も正答率が高く、test dataの正答率は83%とある程度精度の高いモデルを構築できた。しかし、真に判別に有用な遺伝子かどうかを確かめるべくvalidationとして、サンプルをランダムに2群に分け、一致率を確認した。その結果、この3遺伝子は傾向が異なることが判明した。このことは、新たにサンプルを増やした場合、異なる結果を示す可能性が示唆され、このサンプル数でのBFCSを用いた判別は困難である可能性が考えられた。この戦略を用いてb)でのtopであるIGLを再び検討してみると、判別には適さなかったが、マイナーグループで発現が大きく異なっている傾向が確認された。

そこでb)によるTop10遺伝子を用いて診断正答率のシミュレーションを行ったところ、4つの遺伝子による診断率が83%となり概ね良好な結果を得た。

Gene #	Accession	UniGene	Gene Name	T-test Rank	S2N' Rank	Average rank
1	215562_s_at	Hs_71465	SOLE	4	9	6.5
2	221535_s_at	Hs_201724	DKFZp434E248	3	10	6.5
3	221286_s_at	Hs_122492	LOC51237	2	13	7.5
4	202314_s_at	Hs_226213	CYP51	7	12	9.5
5	238963_s_at	Hs_269829	ESTs	12	8	10
6	204429_s_at	Hs_33084	SLC2A5	10	11	10.5
7	227212_s_at	Hs_139966	DKFZP276G051	9	14	11.5
8	21734_s_at	Hs_272557	IGVH3	19	7	12
9	221751_s_at	Hs_418004	CSPG2	27	3	15
10	211794_s_at	Hs_289110	IGLJ3	30	1	15.5

ここで選出された4遺伝子 (DKFZp43, CYP51, DKFZP272, IGLJ3) について統合失調症との関連解析を行ったが、何れの遺伝子とも疾患との関連は示さなかった。

K. 考察

昨年度まで得られた方法論を検討すべく症例数を増やして検討した結果少数症例からの遺伝子群とは全く別の遺伝子が選別され

た。これは今回の29例：30例から得られた結果も検討した例数が少数であることから α エラーである可能性は否定できない。本来なら多量サンプルにおける発現確認を行うべきだが、本研究課題期間には終了できなかった。今後の課題として引き続き検討を加えたい。

今回我々が開発使用した判別法の開発にもちいた統計学的手法は、特に少数症例と大量データ（全ゲノムデータ）を解析する上で非常に有用な方法論である可能性が示唆された。今後さらなる検討を加えることにより、本方法論の改良を進めていきたい。

判別という点で、疾患群・対照群での平均の差を重視すると、妥当性ある判別は困難であったが、S2N¹を用いたtopの遺伝子IGLは、マイナーなcaseサンプルでの発現変動が大きいものであり、真の傾向ならば、診断に適用可能である可能性が示唆された。

末梢血のどの時点のデータが適当であるかは今後の検討が必要であるが、将来の臨床応用を展望した場合、どの時点での採血データからでも正確に予測できる遺伝子群を選出する必要がある。これらの遺伝子が選出されれば診断法としてはより安価なELIZA法を用いた蛋白発現なども考慮に入れていく必要があると考える。

L. 結論

結果として4つの遺伝子発現プロファイで精度83%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。

M. 健康危険情報

特記すべきことなし。

N. 研究発表

1. 論文発表 (2006-2009)

2009

1. Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Yoshida T, Takahashi H, Iike N, Fukumoto M, Takamura H, Iwase M, Kamino K, Ishii R, Kazui H, Sekiyama R, Kitamura Y, Azechi M, Ikezawa K, Kurimoto R, Kamagata E, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Ogasawara M, Okochi M, Tokunaga H, Numata S, Ikeda M, Ohnuma T, Ueno SI, Fukunaga T, Tanaka T, Kudo T, Arai H, Ohmori T, Iwata N, Ozaki N, Takeda M. Association study of the G72 gene with schizophrenia in a Japanese population: A multicenter study. *Schizophr Res*. 2009 Feb 21. [Epub ahead of print]
2. Kishi T, Kitajima T, Ikeda M, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Okochi T, Okumura T, Tsunoka T, Inada T, Ozaki N, Iwata N. Association study of clock gene (CLOCK) and schizophrenia and mood disorders in the Japanese population. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2009 Feb 17. [Epub ahead of print]
3. 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. Epub 2009 Jan 9.

4. Nishiyama T, Ozaki N, Iwata N. Use of questionnaire infeasibility in order to detect cognitive disorders: example of the Center for Epidemiologic Studies Depression Scale in psychiatry settings. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2009 Feb;63(1):23-9.
5. Arai S, Shibata H, Sakai M, Ninomiya H, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y. Association analysis of the glutamic acid decarboxylase 2 and the glutamine synthetase genes (GAD2, GLUL) with schizophrenia. *Psychiatr Genet*. 2009 Feb;19(1):6-13.

2008

6. 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]
7. Ezaki N, Nakamura K, Sekine Y, Thanseem I, Anitha A, Iwata Y, Kawai M, Takebayashi K, Suzuki K, Takei N, Iyo M, Inada T, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Mori N. Short allele of 5-HTTLPR as a risk factor for the development of psychosis in Japanese methamphetamine abusers. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Oct;1139:49-56.
8. Kotaka T, Ujike H, Morita Y, Kishimoto M, Okahisa Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. Association study between casein kinase 1 epsilon gene and methamphetamine dependence. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Oct;1139:43-8.
9. Arai S, Shibata H, Sakai M, Ninomiya H, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y. Association analysis of the glutamic acid decarboxylase 2 and the glutamine synthetase genes (GAD2, GLUL) with schizophrenia. *Psychiatr Genet*. 2009 Feb;19(1):6-13.
10. Kinoshita Y, Ikeda M, Ujike H, Kitajima T, Yamanouchi Y, Aleksic B, Kishi T, Kawashima K, Ohkouchi T, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Iwata N. Association study of the calcineurin A gamma subunit gene (PPP3CC) and methamphetamine-use disorder in a Japanese population. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Oct;1139:57-62.
11. Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Inada T, Harano M, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Iyo M, Sora I, Sekine Y, Ozaki N, Ujike H, Iwata N. Glutamate cysteine ligase modifier (GCLM) subunit gene is not associated with methamphetamine-use disorder or schizophrenia in the Japanese population. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Oct;1139:63-9.
12. Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Inada T, Harano M,

- Komiyama T, Hori T, Yamada M, Iyo M, Sora I, Sekine Y, Ozaki N, Ujike H, Iwata N. Alpha4 and beta2 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes are not associated with methamphetamine-use disorder in the Japanese population. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Oct;1139:70-82.
13. Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Inada T, Harano M, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Iyo M, Sora I, Sekine Y, Ozaki N, Ujike H, Iwata N. Prostate apoptosis response 4 gene is not associated with methamphetamine-use disorder in the Japanese population. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Oct;1139:83-8.
14. 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]
15. Ikeda M, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kitajima T, Yoshimura R, Hashimoto S, O'Donovan MC, Nakamura J, Ozaki N, Iwata N. Variants of dopamine and serotonin candidate genes as predictors of response to risperidone treatment in first-episode schizophrenia. *Pharmacogenomics.* 2008 Oct;9(10):1437-43.
16. O'Donovan MC, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, Nikolov I, Hamshere M, Carroll L, Georgieva L, Dwyer S, Holmans P, Marchini JL, Spencer CC, Howie B, Leung HT, Giegling I, Hartmann AM, Möller HJ, Morris DW, Shi Y, Feng G, Hoffmann P, Propping P, Vasilescu C, Maier W, Rietschel M, Zammit S, Schumacher J, Quinn EM, Schulze TG, Iwata N, Ikeda M, Darvasi A, Shifman S, He L, Duan J, Sanders AR, Levinson DF, Adolfsson R, Osby U, Terenius L, Jönsson EG, Cichon S, Nöthen MM, Gill M, Corvin AP, Rujescu D, Gejman PV, Kirov G, Craddock N, Williams NM, Owen MJ. Analysis of 10 independent samples provides evidence for association between schizophrenia and a SNP flanking fibroblast growth factor receptor 2. *Mol Psychiatry.* 2009 Jan;14(1):30-6. Epub 2008 Sep 23.
17. Kishi T, Kitajima T, Ikeda M, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Okochi T, Ozaki N, Iwata N. Association analysis of nuclear receptor Rev-erb alpha gene (NR1D1) with mood disorders in the Japanese population. *Neurosci Res.* 2008 Dec;62(4):211-5. Epub 2008 Aug 30.
18. Yamasaki N, Maekawa M, Kobayashi K, Kajii Y, Maeda J, Soma M, Takao K, Tanda K, Ohira K, Toyama K, Kanzaki K, Fukunaga K, Sudo Y, Ichinose H, Ikeda M, Iwata N, Ozaki N, Suzuki H, Higuchi M, Suhara T, Yuasa S, Miyakawa T. Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders. *Mol Brain.* 2008 Sep 10;1(1):6.
19. 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 Oct;18(5):255-6.
20. O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, Nikolov I, Hamshere M, Carroll L, Georgieva L, Dwyer S, Holmans P, Marchini JL, Spencer CC, Howie B, Leung HT, Hartmann AM, Möller HJ, Morris DW, Shi Y, Feng G, Hoffmann P, Propping P, Vasilescu C, Maier W, Rietschel M, Zammit S, Schumacher J, Quinn EM, Schulze TG, Williams NM, Giegling I, Iwata N, Ikeda M, Darvasi A, Shifman S, He L, Duan J, Sanders AR, Levinson DF, Gejman PV; Molecular Genetics of Schizophrenia Collaboration, Gejman PV, Sanders AR, Duan J, Levinson DF, Buccola NG, Mowry BJ, Freedman R, Amin F, Black DW, Silverman JM, Byerley WF, Cloninger CR, Cichon S, Nöthen MM, Gill M, Corvin A, Rujescu D, Kirov G, Owen MJ. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat Genet.* 2008 Jul 30. [Epub ahead of print]
 21. Ikeda M, Hikita T, Taya S, Uruguchi-Asaki J, Toyo-Oka 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.* 2008 Jul 24. [Epub ahead of print]
 22. Deng X, Sagata N, Takeuchi N, Tanaka M, Ninomiya H, Iwata N, Ozaki N, Shibata H, Fukumaki Y. Association study of polymorphisms in the neutral amino acid transporter genes SLC1A4, SLC1A5 and the glycine transporter genes SLC6A5, SLC6A9 with schizophrenia. *BMC Psychiatry.* 2008 Jul 18;8:58.
 23. 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.* 2008;53(9):863-6. Epub 2008 Jul 5.
 24. Kishimoto M, Ujike H, Okahisa Y, Kotaka T, Takaki M, Kodama M, Inada T, Yamada M, Uchimura N, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S. The Frizzled 3 gene is associated with methamphetamine psychosis in the Japanese population. *Behav Brain Funct.* 2008 Aug 15;4:37.
 25. Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Okochi T, Inada T, Ozaki N, Iwata N. Genetic association analysis of tagging SNPs in alpha4 and beta2 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes (CHRNA4 and CHRNB2) with schizophrenia in the Japanese population. *J Neural Transm.* 2008 Oct;115(10):1457-61. Epub 2008 Sep 2.
 26. Kanahara N, Miyatake R, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iyo M, Hashimoto K. Association study between the PIK4CA gene and methamphetamine use disorder in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008 Jun 2. [Epub ahead of print]

27. 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.* 2008 Oct 5;147B(7):1327-31.
28. Ito Y, Nakamura Y, Takahashi N, Saito S, Aleksic B, Iwata N, Inada T, Ozaki N. A genetic association study of the FXYP domain containing ion transport regulator 6 (FXYP6) gene, encoding phosphohippolin, in susceptibility to schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Lett.* 2008 Apr 9. [Epub ahead of print]
29. 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 Apr;62(2):239-40.
30. Ohtsuki T, Horiuchi Y, Koga M, Ishiguro H, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Watanabe Y, Someya T, Arinami T. Association of polymorphisms in the haplotype block spanning the alternatively spliced exons of the NTNG1 gene at 1p13.3 with schizophrenia in Japanese populations. *Neurosci Lett.* 2008 Apr 25;435(3):194-197. Epub 2008 Feb 29.
31. Nitta M, Narita T, Umeda K, Hattori M, Naitoh H, Iwata N. Influence of negative cognition on the parental bonding instrument (PBI) in patients with major depression. *J Nerv Ment Dis.* 2008 Mar;196(3):244-6.
32. 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 Mar 6; [Epub ahead of print]
33. Uhl GR, Drgon T, Liu QR, Johnson C, Walther D, Komiyama T, Harano M, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iyo M, Iwata N, Yamada M, Sora I, Chen CK, Liu HC, Ujike H, Lin SK. Genome-wide association for methamphetamine dependence: convergent results from 2 samples. *Arch Gen Psychiatry.* 2008 Mar;65(3):345-55.
34. 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.* 2008;101(1-3):1-8.
35. Otani K, Ujike H, Sakai A, Okahisa Y, Kotaka T, Inada T, Harano M, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. Reduced CYP2D6 activity is a negative risk factor for methamphetamine dependence. *Neurosci Lett.* 2008 Jan 19; [Epub

ahead of print]

36. 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 Jan 9; [Epub ahead of print]
- 2007
37. 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.* 2007 Dec 17; [Epub ahead of print]
38. Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Ozaki N, Iwata N, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Imamura A, Okazaki Y, Kato T. Up-regulation of ADM and SEP1 in the lymphoblastoid cells of patients in monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007 Dec 14; [Epub ahead of print]
39. 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.* 2007 Dec 4; [Epub ahead of print]
40. Albalushi T, Horiuchi Y, Ishiguro H, Koga M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Watanabe Y, Someya T, Arinami T. Replication study and meta-analysis of the genetic association of GRM3 gene polymorphisms with schizophrenia in a large Japanese case-control population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007 Oct 19; [Epub ahead of print]
41. 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.* 2007 Oct;12(10):891-3.
42. Inui Y, Toyama H, Manabe Y, Sato T, Sarai M, Kosaka K, Iwata N, Katada K. Evaluation of probable or possible dementia with lewy bodies using 123I-IMP brain perfusion SPECT, 123I-MIBG, and 99mTc-MIBI myocardial SPECT. *J Nucl Med.* 2007 Oct;48(10):1641-50. Epub 2007 Sep 14.
43. 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.* 2008 Jan 1;32(1):204-8. Epub 2007 Aug 19.
44. Tanaka M, Kobayashi D, Murakami Y, Ozaki N, Suzuki T, Iwata N, Haraguchi K, Ieiri I, Kinukawa N, Hosoi M, Ohtani H, Sawada Y, Mine K. Genetic polymorphisms in the 5-hydroxytryptamine type 3B receptor gene and