

統合失調症関連遺伝子群および結核発症に関連する宿主遺伝要因の 解明

●服巻 保幸¹⁾ ◆楠原 浩一²⁾

1) 九州大学生体防御医学研究所遺伝情報実験センターゲノム機能学分野 2) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野

〈1〉統合失調症関連遺伝子群の解明

〈研究の目的と進め方〉

精神疾患の中核をなす統合失調症の発症に関わる遺伝子群の同定を行い、診断・治療・予防の開発に資することを目的として、(1)ゲノムワイド罹患同胞対解析、(2)ゲノムワイドおよびローカスワイド関連解析、連鎖不平衡解析、(3)疾患モデルラットの発現解析による候補遺伝子の選択と関連解析、(4)変異マウス作出による機能面からの解析を行う。統合失調症は生涯有病率が1%と高く、主に思春期に発病し、罹患者のみならず、家族そして社会への負荷が甚大な精神疾患である。したがってその解明は重要かつ急務である。本疾患は罹患者の遺伝学的な解析に加え、双生児法や養子法などによる解析から遺伝子とともに環境因子が発症に関与する多因子病であると結論されている。しかも同胞相対リスク (λ_S) は10程度であり、多因子病のなかでも遺伝子の関与が比較的強い疾患と考えられる。したがってその本態の解明には遺伝子の同定が必須であるが、その解析は困難を極めている。その理由としては疾患自体に遺伝的異質性がある可能性、さらに発症に比較的弱い効果をもつ複数の遺伝子が関与している可能性などが考えられる。本研究では、この点を考慮し4つのアプローチにより、本疾患の解明を目指すことが特色である。一つは遺伝的に比較的均一と考えられる日本人集団を対象とした罹患同胞対法によるゲノムワイドスクリーニングを行い、関連遺伝子座の同定を試みる。第二に比較的效果が弱い関連遺伝子の同定を目指し、ゲノムワイドおよび候補遺伝子を用いた関連解析を行う。この際統合失調症に関する薬理的な知見から推定されているグルタミン酸伝達異常モデルに基づき、これらに関わる遺伝子につき系統的に解析を行う。第三には統合失調症様症状を惹起することが知られているメタンフェタミンやフェンシクリジン投与ラット等のモデル動物を用いた候補遺伝子の探索とこれを用いた関連解析である。第四に変異マウス作出による疾患感受性遺伝子の機能的検証とともに疾患発症の分子機構の解明である。以上のアプローチを統合することにより本疾患の遺伝的基盤が明らかとなり、ゲノタイプに基づく客観的な診断基準の確立や、薬剤の選択、開発、さらには発症の予防法の確立が期待される。

〈研究開始時の研究計画〉

(1)罹患同胞対解析: 罹患同胞対を含む110家系サンプルにつき、約10 cMおきの全ゲノムにわたる約380個のマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行う (1次スクリーニング)。このようにして推定された領域についてさらに新たなマーカーを用いて1 cMの間隔で解析を行い、関連遺伝子座領域を限定する (2次スクリーニング)。(2)関連解析: 候補遺伝子として、統合失調症に関する薬理的な知見からその関与が推測されているドーパミン受容体 D1 - 5 遺伝子とグルタミン酸受容体 NR1, NR2A, 2B, 2C, 2Dおよびメタボトロピックグルタミン酸受容体 mGluR 1 - 8 遺伝子を取りあげる。多型の一次検索法

として罹患群100検体につきPCR-SSCPを行い変異の検出を行う。得られた変異の同定はダイレクトシーケンシングで行う。同定された多型については、RFLPやドットプロット法、TaqManプローブによる簡便な検出法を確立し、より多数の検体に適用し統合失調症との関連解析に用いる。

a) ドーパミン受容体遺伝子の解析: ドーパミン受容体遺伝子の多型については報告があり、統合失調症との関連解析も行われているが、これまでのところ確定的な結果は得られていない。我々は陰性症状に効果が見られるクロザピンへの親和性が高いと考えられるドーパミン受容体D4遺伝子(DRD4)に注目し、まだ解析の進んでいなかったプロモーター領域の構造およびその機能解析を行い、さらに多数の多型を見いだした。この多型情報を用いて、罹患群および健康群それぞれ250検体について、各多型の頻度を算出し、統計的な有意差の有無を判定する。有意差が認められる場合は培養細胞を用いたCATアッセイによる機能解析を行う。

b) グルタミン酸受容体遺伝子群の解析: cDNA配列のみが知られていたメタボトロピックグルタミン酸受容体 mGluR2 遺伝子(GRM2)について、我々はゲノミッククローンの単離と5'RACEによって、エクソン、イントロン及び5'上流領域の全塩基配列を決定している。既に翻訳領域内に多型を見だし、関連解析を行っているがこれを完了する。

NMDA型受容体の共通なサブユニットであるNR1の遺伝子であるGRIN1は、21のエクソンからなるゲノムDNA配列が既に報告されている。この全翻訳領域を14のPCR断片に分け、罹患群100検体を用いて多型検索を行う。また5'上流領域はプロモーター活性の報告されている約300 bpを含む1 kbを3つのPCR断片として解析する。同様にゲノムDNA配列が既知であるGRM3は6つのエクソンと上流域1 kbを11個のPCR断片に分割して同様に多型を検出する。

cDNA配列のみが知られているGRM1, 4~8及びGRIN2A~Dについては、ゲノミッククローンの単離、塩基配列決定を行い、これらの情報に基づき多型を検索する。

(3)モデル動物を用いた解析: 覚醒剤であるメタンフェタミンを慢性投与するとヒトでは統合失調症様の症状を呈し、加えて薬剤への反応性が亢進する逆耐性現象が形成されることが知られている。これはラットにおいても認められており、統合失調症の動物モデルと考えられている。逆耐性現象はひとたび獲得されると長期にわたり持続することや、タンパク質合成阻害剤投与により阻止できることから、その形成には遺伝子の関与が推定されている。これらの遺伝子は統合失調症の発症に関わる脳の脆弱性を規定し、疾患関連遺伝子の候補と考えられる。そこでメタンフェタミン慢性投与ラットにおける応答遺伝子の検索をDifferential displayにより行っているが、単離し

た遺伝子については関連解析を行い統合失調症への関わりを検討する。

- (4)変異マウスを用いた解析：Mohnら(1999)により、NMDA受容体のコアのサブユニットであるNR1受容体の発現が正常の5%程度に低下したノックダウンマウスでは運動亢進や社会行動の異常など、統合失調症様症状を呈すること、しかもこれらの症状が精神治療薬であるハロペリドールやクロザピンで軽減することが報告され、統合失調症のマウスモデルとして注目されている。そこで遺伝統計学的解析法で見出した遺伝子について、その変異マウスを作出し、機能面からの評価を行う。

＜研究期間の成果＞

(1)罹患同胞対解析：全国規模の共同研究グループであるJSSLG (Japanese Schizophrenia Sip-pair Linkage Group)として収集および解析をおこなった。148の罹患同胞対を含む130家系、338名について、7施設共同で417個のSTRマーカーを用いてゲノムワイドスクニングを終了した。GENEHUNTERによる解析の結果連鎖を示す領域は見出されなかったものの、1q23.3, 2q36.3, 3q23, 4q23, 5q33.1, 8p12, 9q21.1-21.2, 9q21.31, 14q23.1, 17q12, 20q11.2に $P < 0.05$ と連鎖傾向を示す領域を見出した(MLS 1.46) (図1)。

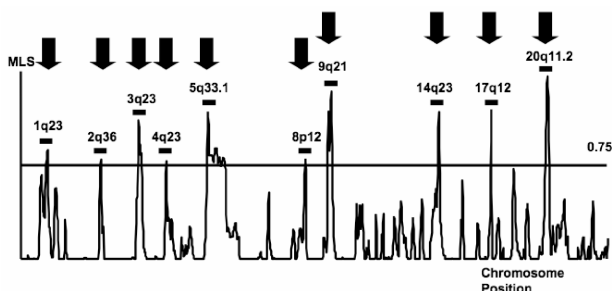


図1. 1次罹患同胞対解析結果

連鎖傾向が見られる領域を矢印で示している。

またexclusion mappingを行ったところλSが3および2の領域は全ゲノムのそれぞれ98%および70%から排除された。したがって効果の弱い多数の遺伝子の関与が考えられた。以上の結果を文献9として発表した。

その後、検体の集積を続け先の解析で用いた122家系由来のサンプルを含む236家系の268罹患同胞対について、ゲノムワイドに分布した5,861個のSNP(Illumina Bead Array Linkage Panel IV)を用いて解析が行われた。連鎖不平衡状態のSNPを除きMERLINでの解析により、1p21.2-1p13.2 (LOD=3.39)に連鎖が認められ、また14q11.2-q13.2 (LOD=2.33)と20p12.1-p11.2 (LOD=2.33)に連鎖が示唆された(図2)。これらの領域はLewis(2003)らによるメタ解析で指摘されている10の連鎖領域にほぼ含まれるが、これまでそれほど注目されていなかった領域でもある。今回の解析はすでに報告されているヨーロッパ人集団の罹患同胞対解析に匹敵するサイズの研究であり、この点でアジアの単一集団を対象とした罹患同胞対解析としては現在のところ唯一の研究である。以上の結果から異なる集団間で共通の疾患感受性遺伝子が存在するものの、それらは集団特異的な効果を有していることが考えられた。以上の結果を文献15として発表した。

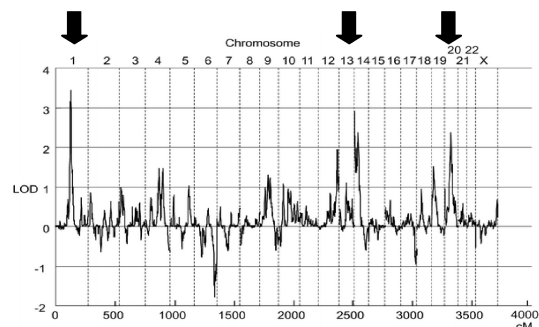


図2. 2次罹患同胞対解析結果

(2)関連解析

- a) ドーパミン受容体遺伝子：我々は先行研究でヒトドーパミンD4受容体遺伝子(DRD4)の上流領域にnegative modulator regionとcell-type specific promoter regionを見出していた(Kamakura et al.,1997)。本研究では両領域内および領域間において見出していたSNP(Mitsuyasu et al., 1999)を用いて統合失調症との関連解析を行った(図3)。 $-768G>A$ (negative modulator region内)、 $-521C>T$ 、 $-376C>T$ 、 $-291C>T$ (cell type-specific promoter region内)、 $-616C>G$ (両領域間)について罹患群208名と健常群210名のタイピングを行った。その結果アレル頻度およびゲノタイプ頻度において両群間での有意差は認められなかった。以上からDRD4のプロモーター領域は統合失調症発症への主要な寄与はないものと結論し、これを文献3として発表した。

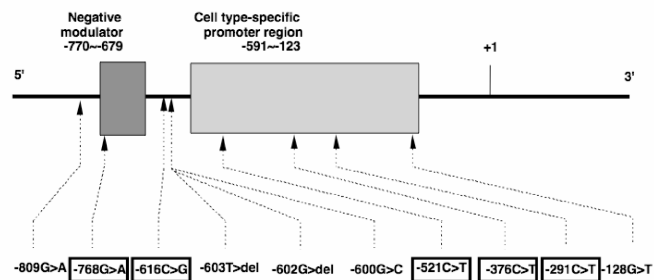


図3 ドーパミンD4受容体遺伝子(DRD4)の上流領域の多型関連解析に用いたSNPを四角で囲んでいる。

- b) グルタミン酸受容体遺伝子：研究開始後グルタミン酸伝達異常モデルの信憑性が高まったため、グルタミン酸受容体遺伝子群の解析に力点を置くことにした。系統的な解析を開始したが、当初解析したGRM2については遺伝子配列が未定であったため、自ら決定した。しかしGRIK1解析以降はヒトゲノムデータベースが充実したため、配列情報はそれによった。またGRM2についてはSNPのゲノタイプ、アレル頻度のみによる関連解析を行ったが、検出力に問題があるため、この解析以後は遺伝子全領域にほぼ均等(約10-30 kb)に頻度の高い(マイナーアレル頻度：MAFが10%以上)SNPを選択し、連鎖不平衡の状況を明らかにしてこれに基づくハプロタイプの関連解析も行った(ローカスワイド関連解析)。
- i) メタボトロピックグルタミン酸受容体mGluR2遺伝子(GRM2)：メタボトロピックグルタミン酸受容体には8つのサブタイプが知られている。そのなかでグループIIに属するGRM2は、NMDA受容体のアンタゴニストであるPCPが統合失調症様症状をもた

らすことや、グループIIメタボトロピック受容体のアゴニストであるLY354740が、この反応を抑制することから、統合失調症感受性遺伝子の有力な候補と考えられる。そこで構造が未定であったGRM2のクローンを単離し、その配列を決定するとともに、転写開始点およびRH mappingにより染色体上の位置を決定した(3p12-p11)。さらにエクソン領域のSNPを探索し13個のSNPを検出した。そのうち10個は非同義置換であり、1個は同義置換、残りの2つは5'非翻訳領域の塩基置換であった(図4)。

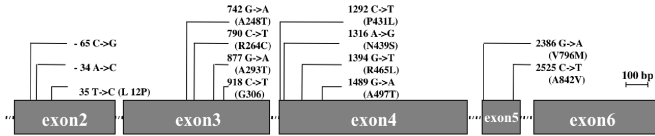


図4 メタボトロピックグルタミン酸受容体mGluR2 遺伝子(GRM2)のエクソン内の多型

これらのSNPについて日本人罹患群213名と健常群220名のタイピングを行った。その結果アレル頻度およびゲノタイプ頻度において両群間で有意な差は認められなかった。したがってGRM2は日本人集団では統合失調症の主要な感受性遺伝子ではないと結論し、結果を文献1として報告した。

ii) カイニン酸受容体GluR5 遺伝子 (GRIK1) :カイニン酸受容体GluR5の遺伝子であるGRIK1のコード領域の多型検索を行った。その結果6個のSNPを検出した。3個は既知のSNPであり(522A/C:174T, 1173C/T:391D, 2705C/T:902L/S)、後の3個は新規SNPであった(995C/T:332A/V, 2400C/T:800L, 2585A/G:862R/Q)。この中で頻度の高い3個のSNP(522A/C, 1173C/T, 2705C/T)について日本人罹患群193-203名、健常群199-215名でタイピング後、関連解析を行った。その結果アレル頻度およびゲノタイプ頻度、さらにハプロタイプ頻度においても、両群間で有意な差は見られなかった。したがってGRIK1は日本人集団の統合失調症において、主要な感受性遺伝子ではないと結論し、文献2として発表した。

iii) カイニン酸受容体GluR6 遺伝子 (GRIK2) :本遺伝子は連鎖解析により示されている統合失調症の感受性領域である6q16.3-q21に位置している。GRIK2全領域700 kb以上にわたり計15個のSNPを選択しタイピングを行い(図5)、関連解析を行った。その結果GRIK2領域は150 kb以上の3つの連鎖不平衡が高く維持されている領域からなることがわかった。SNPのゲノタイプ、アレルおよびハプロタイプ頻度は、罹患群と健常群間で有意な差は認められなかった。以上からGRIK2は、統合失調症において主要な関与はないものと考えられ文献5として発表した。



図5 カイニン酸受容体GluR6 遺伝子 (GRIK2) の関連解析に用いたSNP

iv) NMDA受容体NR1 遺伝子 (GRIN1) :GRIN1の発現低下が統合失調症の死後脳で観察されている。またGRIN1の発現低下を来したマウスでは統合失調症様の症状がみられ、それが統合失調症治療薬で軽減することが報告されている。そこで統合失調症におけるGRIN1の転写異常を考え、ラットパラログ(Grin1)で同定されているプロモーター領域に対応するGRIN1の翻訳開始コドン上流約1 kbの領域について、SNPの検索を行った。17個のSNPを見出し、そのうち10個がSP1結合サイトに位置しており、うち7つはGSG結合サイトにも位置していた。4つのSNPが罹患群のみでみられたが、見出した17個のSNPは-855G/Cを除きすべて低頻度(<2.3%)であった。いずれのSNPもアレルおよびゲノタイプ頻度には、罹患群と健常群間で有意な差は認められなかった(表1)。以上から、これらのSNPは統合失調症への主要な関与はないものと考えられ、文献4として発表した。

表1 NMDA受容体NR1 遺伝子 (GRIN1) の上流領域の多型の検索と関連解析

(ゲノタイプ、アレル頻度においてケース、コントロール間では有意な差が見られなかった)

Polymorphism	Genotype count and frequency (%)			Allele count and frequency (%)	
-855 G/C	GG	GC	CC	G	C
Schizophrenics	107 (55.2)	81 (41.7)	6 (3.1)	295(76.0)	93 (24.0)
Controls	120 (59.4)	70 (34.7)	12 (5.9)	310 (76.7)	94 (23.3)
-497 C/T	CC	CT	TT	C	T
Schizophrenics	191 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	382 (0.0)	0 (0.0)
Controls	215 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	431 (99.77)	1 (0.23)
-489 C/T	CC	CT	TT	C	T
Schizophrenics	190 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	381 (99.74)	1 (0.26)
Controls	216 (100)	0 (0.00)	0 (0.0)	432 (100)	0 (0.0)
-437 C/T	CC	CT	TT	C	T
Schizophrenics	191 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	382 (100)	0 (0.0)
Controls	215 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	431 (99.8)	1 (0.2)
-414 C/T	CC	CT	TT	C	T
Schizophrenics	191 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	382 (100)	0 (0.0)
Controls	215 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	431 (99.8)	1 (0.2)
-395G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	188 (98.4)	3 (1.6)	0 (0.0)	379 (99.2)	3 (0.8)
Controls	209 (96.8)	7 (3.2)	0 (0.0)	425 (98.4)	7 (1.6)
-388G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	189 (99.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	380 (99.5)	2 (0.5)
Controls	216 (100)	0 (0.00)	0 (0.0)	432 (100)	0 (0.0)
-387G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	191 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	382 (100)	0 (0.0)
Controls	215 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	431 (99.8)	1 (0.2)
-387G/T	GG	GT	TT	G	T
Schizophrenics	191 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	382 (100)	0 (0.0)
Controls	215 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	431 (99.8)	1 (0.2)
-385G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	191 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	382 (100)	0 (0.0)
Controls	215 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	431 (99.8)	1 (0.2)
-384G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	191 (100)	0 (0)	0 (0.0)	382 (100)	0 (0.0)
Controls	215 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	431 (99.8)	1 (0.2)
-382G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	189 (99.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	380 (99.5)	2 (0.5)
Controls	214 (99.1)	2 (0.9)	0 (0.0)	430 (99.5)	2 (0.5)
-381G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	190 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	381 (99.74)	1 (0.26)
Controls	216 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	432 (100)	0 (0.0)
-379G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	186 (97.4)	5 (2.6)	0 (0.0)	377 (98.7)	5 (1.3)
Controls	207 (95.8)	9 (4.2)	0 (0.0)	422 (97.7)	9 (2.3)
-374G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	187 (98.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	378 (99.0)	4 (1.0)
Controls	214 (99.1)	2 (0.9)	0 (0.0)	430 (99.5)	2 (0.5)
-373G/A	GG	GA	AA	G	A
Schizophrenics	188 (98.4)	3 (1.6)	0 (0.0)	379 (99.2)	3 (0.8)
Controls	216 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	432 (100)	0 (0.0)
-353C/T	CC	CT	TT	C	T
Schizophrenics	191 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	382 (100)	0 (0.0)
Controls	215 (99.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	431 (99.8)	1 (0.2)

v) AMPA受容体GluR4 遺伝子 (GRIA4) :GRIA4を対象に、371 kbの全遺伝子領域に6個のSNPを設定して解析を行った(図6)。各SNP間の連鎖不平衡係数D'が0.5に低下するのに要する距離は66.9 kbであっ

た。イントロン13,15のSNP、およびイントロン5, 13, 15のSNPによるハプロタイプについて関連解析を行ったところ、それぞれ $P = 0.0057, 0.0085$ と有意差が認められた(表2)。以上から統合失調症へのGRIA4の関与が考えられ、文献6として発表した。

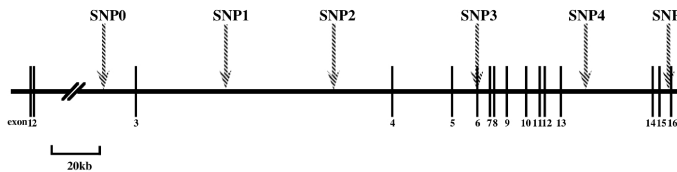


図6 AMPA受容体4型遺伝子(GRIA4)の関連解析に用いたSNP

表2 GRIA4のハプロタイプ関連解析

Region	Sequence	Cases	Controls	Total	χ^2	P
SNP1/SNP2	AA	0.62	0.634253	0.627121	7.42	0.0597
	AG	0.03	0.025747	0.027879		
	TA	0.00	0.025747	0.012879		
	TG	0.35	0.314253	0.332121		
SNP3/SNP4	AA	0.60615	0.62018	0.612419	1.6	0.6594
	AG	0.25885	0.24982	0.255081		
	GA	0.06885	0.03982	0.055081		
	GG	0.06615	0.09018	0.077419		
SNP3/SNP5	AA	0.531640	0.598142	0.580994	7.5	0.0576
	AG	0.301836	0.271858	0.286506		
	GA	0.056836	0.006858	0.031506		
	GG	0.078164	0.123142	0.100994		
SNP4/SNP5	AA	0.493334	0.560431	0.530105	12.54	0.0057
	AG	0.181666	0.099569	0.137395		
	GA	0.126666	0.044569	0.082395		
	GG	0.198334	0.295431	0.250105		
SNP3/SNP4/SNP5	AAA	0.458650	0.553821	0.509491	18.9	0.0085
	AAG	0.145528	0.071042	0.104123		
	AGA	0.106007	0.044398	0.072079		
	AGG	0.154815	0.200739	0.181807		
	GAA	0.033145	0.006766	0.019414		
	GAG	0.037677	0.028372	0.034472		
	GGA	0.022198	0.000015	0.011516		
	GGG	0.041980	0.094848	0.067099		

vi) メタボトロピックグルタミン酸受容体mGluR3遺伝子(GRM3): 全遺伝子領域にわたりSNPを6個選択し、タイピング後、本遺伝子領域の連鎖不平衡状態の評価とともに、関連解析を行った。各SNPの関連解析ではイントロン3内のSNP4でゲノタイプ、アレル頻度ともに有意差を見いだした。さらにこのSNPを含む2つもしくは3つのSNPによるハプロタイプの関連解析で極めて強い有意差(最低値 $P = 0.00083$)を見いだした。以上の結果からGRM3は統合失調症感受性遺伝子であると結論し、文献7として発表した。また、上記の関連を日本人別集団で確認するとともに、本遺伝子のプロモーター領域、エクソン領域のSNP検索を行ったが、機能に関わるようなSNPは見られなかった。SNP4の周辺に密にSNPを選択し解析を行った(図7)。SNP4を含み低いP値を示すSNPが位置する約40 kbの連鎖不平衡ブロックが見出されたが(図中両矢印)、ここにも明らかな機能SNPは見られなかった。複数SNPの組み合わせにより、遺伝子発現へ弱い効果もたらしている可能性が考えられた。

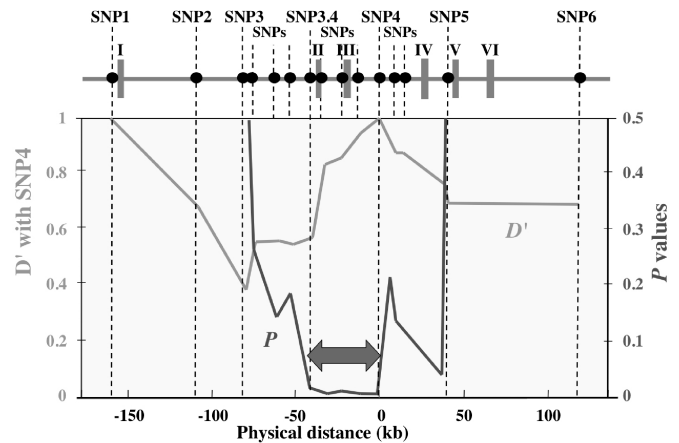


図7 メタボトロピックグルタミン酸受容体mGluR3遺伝子(GRM3)のSNP4周辺の連鎖不平衡の状況と関連解析におけるアレル頻度のP値

vii) メタボトロピックグルタミン酸受容体mGluR8遺伝子(GRM8): GRM8全領域を連鎖不平衡でカバーすることを目的に、22個のSNPを選択し(図8)、統合失調症例および健常群各100例につきタイピングを行った。その結果SNP2とSNP3の間の領域は組換えのホットスポットの存在が示唆されが、それ以外の領域は連鎖不平衡でカバー出来た(図9)。SNP18とSNP19について、ゲノタイプおよびアレル頻度と疾患との間に関連を認めた。しかしBonferroniの補正によりその有意差は消失した。ハプロタイプの関連解析を行ったところSNP5-SNP6において有意差が認められ、SNP4-SNP5-SNP6($P = 0.0075$, $P_{corr} = 0.015$)およびSNP5-SNP6-SNP7($P = 0.0011$, $P_{corr} = 0.0022$)においてBonferroni補正後も有意差が認められた(表3)。以上の結果から、GRM8は日本人の統合失調症の発症に関わっていると結論し、文献10として発表した。

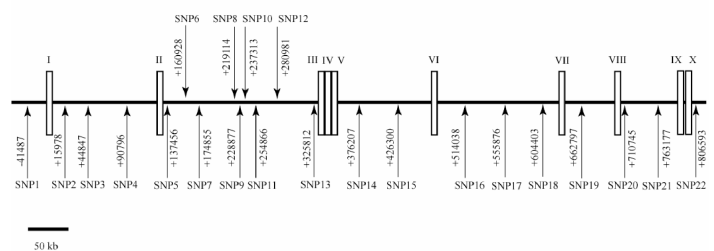


図8 メタボトロピックグルタミン酸受容体mGluR8遺伝子(GRM8)の関連解析に用いたSNP

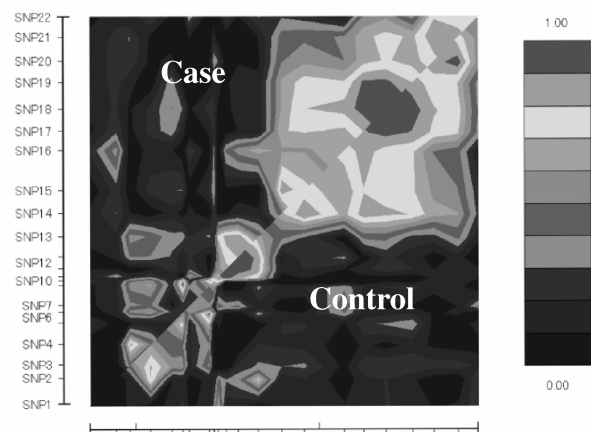


図9 GRM8における罹患者群と健常群における連鎖不平衡の程度

表3 GRM8のハプロタイプ関連解析

Region	Sequence	Control	Case	Total	χ^2	p
SNP5/SNP6	C-C	0.2161	0.1100	0.1615	18.12	0.0004 (0.0924*)
	C-T	0.0439	0.1200	0.0835		
	T-C	0.0789	0.1800	0.1310		
	T-T	0.6611	0.5900	0.6240		
SNP4/SNP5/SNP6	A-C-C	0.1182	0.0691	0.0942	27.50	0.0075
	A-C-T	0.0296	0.0016	0.0158		
	A-T-C	0.0367	0.1148	0.0764		
	A-T-T	0.0755	0.0645	0.0686		
	C-C-C	0.0975	0.0399	0.0673		
	C-C-T	0.0147	0.1194	0.0677		
	C-T-C	0.0426	0.0663	0.0546		
	C-T-T	0.5852	0.5244	0.5554		
SNP5/SNP6/SNP7	C-C-A	0.0697	0.0239	0.0460	23.92	0.0011
	C-C-G	0.1460	0.0875	0.1156		
	C-T-A	0.0217	0.0228	0.0226		
	C-T-G	0.0226	0.0957	0.0608		
	T-C-A	0.0664	0.0864	0.0785		
	T-C-G	0.0128	0.0922	0.0524		
	T-T-A	0.0922	0.0918	0.0905		
	T-T-G	0.5686	0.4996	0.5337		

p: χ^2 tests, case vs. control (d.f. = 2).

*: p with Bonferroni correction (N = 231).

viii) NMDA受容体NR2D遺伝子 (GRIN2D): NMDA受容体のアンタゴニストであるPCPにより統合失調症様症状が生じることから、NMDA受容体サブユニット遺伝子は統合失調症感受性候補遺伝子として注目される。そこでGRIN2Dを対象に関連解析を行った。全てのエクソンとエクソン-イントロン境界およびエクソン1の5'上流1.7 kbの領域について32人の日本人統合失調症検体を用いて多型の検索を行った。その結果13個のSNPと1個のSTR見出した。さらにイントロン10の中にデータベースからSNPを選択した。これらから頻度およびHardy-Weinberg平衡を加味して7つのSNPを選択し、統合失調症例群201名と、健常群221名の検体についてタイピングを行った。ゲノタイプとアレル頻度について両群間での比較を行ったが、いずれのSNPについても有意差は認められなかった。各SNP間の連鎖不平衡を検討したところ、SNP4-SNP5間を除きLDが保たれていた。ペアワイズのハプロタイプ関連解析を行ったところ、SNPによる5種類の組み合わせによるハプロタイプに有意差が認められた。多重検定のためFDR(BL法)による補正を行ったところ、閾値のP値が 2.908×10^{-3} においてSNP3-SNP6, SNP5-SNP6, SNP6-SNP7の有意差が確認された (図10)。これらの結果からSNP5からSNP7にわたる領域が統合失調症に関連していると結論し、文献13として発表した。

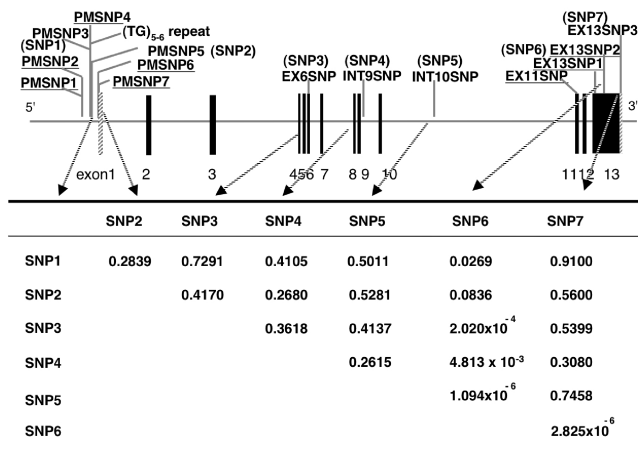


図10 NMDA受容体NR2D遺伝子 (GRIN2D) のSNP検索とハプロタイプ関連解析

ix) カイニン酸受容体GluR7, KA1, KA2遺伝子 (GRIK3, GRIK4, GRIK5): それぞれの遺伝子のサイズ (240 kb, 430 kb, 90kb) に応じ16, 24 としての5個のMAF 0.1以上SNPを選択した。次に100 ペアのケース、コントロール群のタイピングを行いゲノタイプ、アレル頻度における両群間での有意差を検定したが、GRIK3の1個のSNP以外では有意差は認められなかった。しかしこのSNPの示す有意差も、Bonferroni補正により消失した。またペアワイズハプロタイプの関連解析ではGRIK3で7つの、GRIK4で4つのペアワイズハプロタイプで両群間での有意差が見られた。しかしこれらもBonferroni補正により消失した。また別サンプルセットを用いた解析でも、関連は再現されなかった。以上からGRIK3, GRIK4およびGRIK5は日本人の統合失調症への主要な関与はないものと結論し文献16として発表した。

x) まとめ: グルタミン酸受容体遺伝子群と統合失調症との関連につき、総説依頼があり、我々の結果を中心にまとめ、文献8として発表した。またGRIA2, GRIA3, GRIN3B, GRM1, GRM4, GRM5, GRM7についての関連解析もほぼ終了しつつあり、順次論文として発表予定である。

c) グルタミン酸トランスポーター遺伝子: 解析の進行とともに、統合失調症におけるグルタミン酸伝達系の関与の可能性が高まったため、グルタミン酸トランスポーター遺伝子に関わる関連解析も開始した。

グルタミン酸トランスポーターEAAT2遺伝子 (SLC1A2) の全領域を連鎖不平衡でカバーするためMAF > 0.1のSNPを11個選定し、九州地区の統合失調症罹患群と健常群、それぞれ100人につきタイピングを行った。SNP2についてゲノタイプ、およびアレル頻度で関連を見出したが ($P = 0.012, 0.083$) いずれもBonferroni補正で有意差が消失した。しかしこのSNPと他の8個のSNPによるペアワイズハプロタイプの関連解析で有意差が認められた (最低値 $P = 9.4 \times 10^{-5}$, $P = 0.0052$ Bonferroni補正後)。さらにBonferroni補正後に有意差が認められるハプロタイプについて愛知地区のサンプル100ペアを追加したところ有意差が認められ ($P = 5.0 \times 10^{-4}$) (図11) 文献11として報告した。以上からSLC1A2は日本人の統合失調症の発症への関与が考えられた。すでに我々はGRM3が統合失調症に関与することを報告している (Fujii et al., 2003, 文献7)。その後GRM3の統合失調症との関連とともに、GRM3ゲノタイプとSLC1A2の発現との関連が米国のグループから報告されている (Egan et al., 2004)。したがって今回の結果はGRM3-SLC1A2パスウェイの統合失調症病態への関わりを支持するものと考えられる。

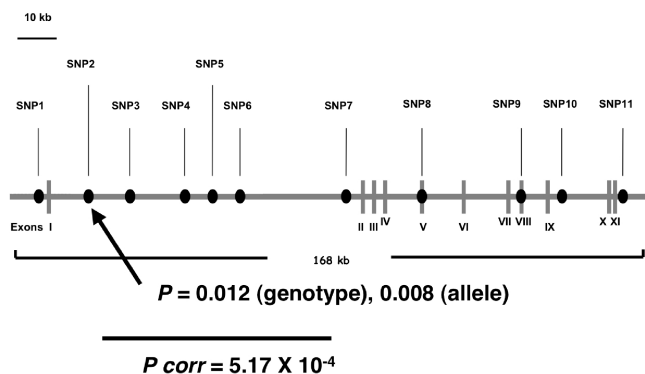


図11 グルタミン酸トランスポーターEAAT2遺伝子(SLC1A2)のシングルマーカーおよびハプロタイプ関連解析

d) ゲノムワイド関連解析：先の罹患同胞対解析から効果の弱い遺伝子の関与が示唆された。このような遺伝子の検出には関連解析が有力であることから (Risch, 2000)、ゲノムワイドな関連解析をスタートした。東海大学医学部 猪子 英俊 博士、九州大学生体防御医学研究所 山本 健 博士の協力を得て、ゲノムワイドに分布した約27,000個のマイクロサテライトマーカーにつき、プールした1次サンプル（罹患群、健常群の157検体ペア）を用いた関連解析を行った。データ取得マーカー数26,962個であり、そのなかで有意マーカー数は3,242 (12.0%) であった。1-18番、20番染色体はほぼ終了した。これと並行して独立に収集調製した2次サンプル（罹患群、健常群の150検体ペア）を用いてマーカーの絞り込みを行った。データ取得マーカー数2,176個であり、その中で有意マーカー数 720 (33.1%) であった。1 - 5 番染色体、9-18番染色体、20番染色体についてはほぼ終了している。今後2次スクリーニングを終了し、3次スクリーニングによるさらなる絞り込み、ついで、4次スクリーニングによる個別タイピングによる有意マーカーの選別と、その付近のSNPを用いたタイピングにより、統合失調症感受性遺伝子の同定を行う予定である。

(3)疾患モデルラットの解析

a) メタンフェタミン投与ラット：先行研究により、メタンフェタミン (5 mg/kg) を3日間投与したラットで逆耐性現象が見られることを確認していた (Hamamura et al., 1999)。これに基づき3回目の投与を行った24時間後のラットの大脳皮質からRNAを調製し、cDNAを合成後、Research Geneticsのプライマーセットを用いてdifferential displayを行った。その結果発現変化を来すクローンを複数個単離した。そのなかでアンフィファイン遺伝子 (AMPH) を同定しin situ hybridizationによりその発現変化を確認した。次にこれを候補遺伝子とした関連解析を行った。遺伝子の全長約250 kbをカバーする7つのSNPを選択し (平均heterozygosity 34.3%)、罹患群100検体、及び健常群100検体を用いて各SNPのタイピングを行った。その結果、各SNPの両群間でのゲノタイプやアレル頻度、またハプロタイプ頻度には両群間で有意な差は認められなかった。

b) PCP投与ラット：NMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニストであるPCPは統合失調症様症状を引き起こすことが知られている。PCP投与 (5 mg/kg) 1時間および4時間後のラットの大脳の5部位 (内側

前頭皮質、側坐核、線条体、海馬、後帯状皮質) から、マイクロアレイ (Agilent Technologies, G4105A) を用いて生食投与群に比べ1.5倍以上の変化を来す90種類の遺伝子を見出した。その中で2.5倍以上の変化を来す10種類の遺伝子を定量的RT-PCR法により確認した (表4)。現在それらについてのローカスワイド関連解析を行っている。

表4 PCP投与ラット脳各部位における発現変化を来す遺伝子数

変化程度 (倍)	Medial frontal cortex	Prefrontal cortex	Hippocampus	Nucleus accumbens	Striatum	Posterior cingulate cortex
3.0<	1	3	0	2	1	7
2.5~3.0	4	2	1	0	1	8
2.0~2.5	8	9	1	0	6	24
1.5~2.0	13	16	6	9	23	67
<1.5	1	1	1	0	3	6
合計	27	31	9	11	34	112

(4)変異マウスによる機能解析：先に関連が認められたGRIA4の統合失調症発症への関与や、高次脳機能における役割を明らかにするため、標的遺伝子組換え法により (図12)、細胞膜ドメインのうちM1とM2を含む領域をコードしているエクソン12を欠損させた変異マウスを作出した (図13)。GluR4はAMPA型グルタミン酸受容体の膜への輸送に関与しているとの報告もある。そこでウェスタンブロット法及び免疫組織染色法により、GluR4 KOマウスの海馬及び小脳でGluR1やGluR2の発現量及び分布を調べたが、成体マウスではWTとの顕著な差は見られなかった。現在海馬スライスをを用いた電気生理学的解析を進めるとともに、行動解析のために戻し交配を行っている。

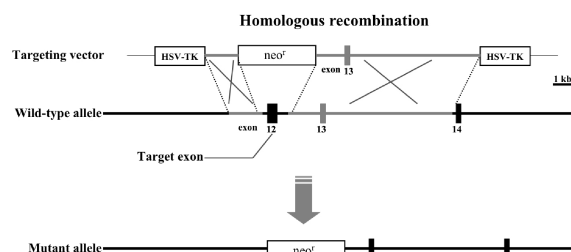
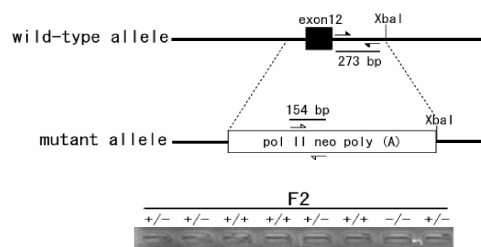


図12 GRIA4領域のターゲティングベクターと相同組換え後の構造



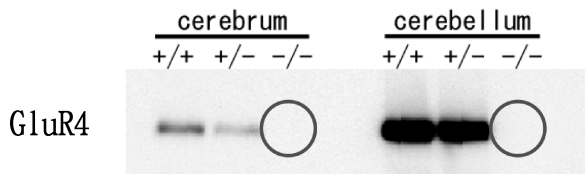


図13 ターゲティングマウスのDNAおよびタンパク質レベルでの確認

〈国内外での結果の位置づけ〉

- (1) 罹患同胞対解析については、1次解析では有意な連鎖領域は見いだせなかった。しかし2次解析では検体数の増加や5,861個のSNPを用いたことなどから検出力が高まり、有意な連鎖領域を見いだすことができた。ここで用いた122家系由来のサンプルを含む236家系の268罹患同胞対のサンプルサイズは、これまで行われた単一集団を対象とした統合失調症の連鎖解析のサイズとしてはアジア集団に関しては最大のものであり、意義が高い。連鎖が認められた1p21.2-1p13.2や、連鎖が示唆された14q11.2-q13.2、20p12.1-p11.2については、これまで国外からの連鎖解析により報告されている領域にほぼ一致しているが、これまでそれほど注目されていた領域ではなかった。統合失調症感受性遺伝子の集団間での寄与度の違いを示唆する結果と考えられる。
- (2) グルタミン酸受容体遺伝子群の系統的な関連解析を行っているのは我々のみであり、総説依頼をうけ文献8として発表した。先に関連を見出したGRM3については(文献7)その後これらのSNPを含めたハプロタイプがヨーロッパ系アメリカ人集団を用いたTDTにおいても、統合失調症と関連していることが認められた(Egan et al., 2004)。しかも認知機能評価テストにより多型と前頭葉や側頭葉の機能との関連が認められ、またこの結果はfMRIを用いた解析によっても確認されている。さらにリスクゲノタイプがシナプスや、組織内グルタミン酸のレベルを反映すると言われているNNA(N-acetyl aspartate)のレベルや、前頭前野のグルタミン酸トランスポーター遺伝子SLC1A2の発現レベルと関連していることが示されている。GRM3の特定の多型や複数の多型によりGRM3の発現に軽微な変化が起こり、SLC1A2の発現が変化することにより脳の高次機能に関わるグルタミン酸伝達系の機能低下を来とし、統合失調症発症脆弱性をもたらしている可能性が考えられる。我々はSLC1A2についても関連解析を行い、疾患との関連を見出し報告した(文献11)。また中国人集団においても、GRM3のハプロタイプとの関連が報告された(Chen et al., 2005)。さらにGRM3の上流領域の多型とオランザピンによる陰性症状の改善度との関連も報告されている(Bishop et al., 2005)。また関連を見出したGRIA4, GRM8, GRIN2Dについてはこれまで関連を示す報告がなく、GRM3の結果と相まって、グルタミン酸伝達系異常の統合失調症発症への関与を支持する知見と考えられる。
- (3) PCP応答遺伝子の検索として、前頭前野のみを用いた報告はあるが(Kaiser et al., 2004)我々の様に大脳の5部位(内側前頭皮質、側坐核、線条体、海馬、後帯状皮質)のサンプルを用いた報告はなく、より正確な発現変化を反映した遺伝子の探索ができると考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- (1) グルタミン酸受容体遺伝子群の関連解析を完了する予定であったが、遺伝子のサイズが比較的大きいこと、頻度の高いSNPの同定に予想外の時間がかかり、完了できなかった。今後HapMapのデータを参考にしながら解析を進める予定である。
- (2) 関連が見られる遺伝子における機能SNPの同定には至っていない。複数のSNPのシナジスティックな効果による可能性も考えられる。
- (3) GRIA4ノックアウトマウスの作出には成功したが、戻し交配に時間がかかっている。特に出産率が悪いことが理由である。組織学的な解析でも、本来GRIA4の発現が高い若齢マウス(PND3)での解析に時間がかかっている。これも上記と同様の理由である。

〈今後の課題〉

- (1) グルタミン酸受容体遺伝子群の関連解析を終了する。
- (2) グルタミン酸トランスポーター遺伝子群およびグルタミン酸代謝系遺伝子群の関連解析を進めるとともに、PCP応答遺伝子群からの疾患感受性遺伝子の同定を行う。
- (3) リスクハプロタイプにおける機能SNPの同定を進める。
- (4) 罹患同胞対解析により連鎖が見られた領域について関連解析を行い、感受性遺伝子を同定する。
- (5) ゲノムワイド関連解析の3次および4次スクリーニングを終了し、さらにSNPによる関連解析を行い感受性遺伝子の同定を行う。
- (6) マウスによる疾患感受性遺伝子としての機能的検証を行う。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

最後にまとめて記載した。

〈2〉 結核発症に関連する宿主遺伝要因の解明

〈研究の目的と進め方〉

結核菌やBCGをはじめとする抗酸菌に対する感受性を決定する宿主側遺伝要因を解明し、今後の有効な結核対策に資することを目的として、1) 結核同胞例を対象とした全ゲノム領域の罹患同胞対連鎖解析、sTDT解析、関連解析、2) 結核菌およびその他の抗酸菌による重症/反復感染症例を対象としたTh1サイトカイン/受容体遺伝子の解析を行う。

〈研究開始時の研究計画〉

- (1) 結核の罹患同胞対解析、sTDT解析および関連解析：結核同胞例から得られた血液からDNAを抽出し、全ゲノム領域にわたる罹患同胞対連鎖解析を行う。また、結核患者とその非罹患同胞とのペア検体を収集してDNAを抽出しsTDT解析を行う。これらの解析により、日本人において結核発症に関与している遺伝子の染色体上の位置が決定されれば、さらにその遺伝子座に存在する候補遺伝子について関連解析を行い関連遺伝子を同定する。また、単独の結核患者検体の収集も並行して行い、ビタミンD受容体遺伝子、NRAMP1、IL-12/IFN- γ 経路のサイトカイン/レセプターおよびその関連分子、などの各種候補遺伝子について関連解析を行う。
- (2) BCG菌その他の抗酸菌による重症/反復感染症例の遺伝子解析：結核/非定型抗酸菌の重症/難治/反復例およびBCGの重症副反応例の集積を行い、IL-12/IFN-

γ 経路のサイトカイン/レセプターの遺伝子を解析して、変異の有無を調べる。また、遺伝子多型についても、その頻度を正常集団と比較することにより、これらの症例における重症化の遺伝的側要因を明らかにする。

＜研究期間の成果＞

- (1) 結核患者を対象とした候補遺伝子の関連解析: 全国の4施設から結核同胞例の8家系21検体（うち家系内対照4検体）を集積した。また、sTDT解析のための同胞検体4組8検体および関連解析のための結核患者検体74検体を収集した。これらの検体のうち同胞による重複を除外した結核患者検体87検体について、正常対照265名とともに、一塩基多型(以下SNP)をマーカーとした候補遺伝子の関連解析を行った。スクリーニングとして、21の候補遺伝子の118個のマーカーSNPについて、Assays-on-Demandを用いた関連解析を行なった。次に、複数のマーカーSNPが結核と関連を示した遺伝子について、そのマーカーSNPの近傍のcoding SNP(以下cSNP)を検索し、アミノ酸置換を伴うcSNPについて関連解析を行った。

表1 マーカー SNPs を用いた結核感受性候補遺伝子の関連解析

候補遺伝子	解析した SNPs の数	Control 群の MAF >0.1の SNPs の数	$P < 0.05$ のマーカー-SNPs の数			
			2X3	A1+ vs A1-	A2+ vs A2-	allele (2X2)
関連を示す報告が複数ある遺伝子						
<i>SLC11A1</i> (<i>NRAMP1</i>)	4	3	0	0	0	0
<i>VDR</i>	12	9	0	1	0	0
<i>IL1B</i>	5	5	2	2	2	3
IL-12/IFN- γ 経路関連の遺伝子						
<i>IFNG</i>	2	1	0	0	0	0
<i>IFNGR1</i>	4	2	0	0	0	0
<i>IFNGR2</i>	8	7	2	0	0	0
<i>IL12A</i> (p35)	2	2	0	0	0	0
<i>IL12B</i> (p40)	3	3	0	1	0	0
<i>IL12RB1</i>	9	8	2	2	2	2
<i>IL12RB2</i>	5	5	0	0	0	0
<i>STAT1</i>	9	7	1	1	0	1
<i>IL18</i>	6	5	0	0	0	0
<i>IL18R</i>	12	11	0	0	0	0
<i>IL23A</i> (p19)	3	0	0	0	0	0
<i>IL23R</i>	4	4	0	0	0	0
<i>IL27</i> (EBI3, p28)	3	3	0	0	0	0
<i>IL27RA</i> (WSX-1)	4	4	0	0	0	0
TNF- α 経路関連の遺伝子						
<i>TNF</i>	5	4	0	0	0	0
<i>TNFRSF1A</i>	5	5	0	0	0	0
<i>TNFRSF1B</i>	8	8	1	0	1	1
連鎖解析による候補遺伝子						
<i>UBE3A</i> (15q11-13)	5	4	0	0	0	0
計	118	100	8	7	5	7

MAF: Minor allele frequency

表1にマーカーSNPによるスクリーニングの結果を示した。解析した候補遺伝子は、関連を示す報告が複数ある遺伝子3個、IL-12/IFN- γ 経路関連の遺伝子14個、TNF- α 経路関連の遺伝子3個、連鎖解析によって最近候補に挙げた遺伝子1個の計21個であり、全て常染色体上にある。このうち、IL-1 β をコードするIL1BとIL12レセプター β 1をコードするIL12RB1について、関連を示した複数のマーカーSNPの近傍のcSNPを検索した。IL1Bにはアミノ酸置換を伴うcSNP認められなかったため、以下、IL12RB1の解析を行った。図1はマーカーSNPの関連解析結果を示す。このうち、結核との関連を示したrs2305739とrs383483の近傍に、アミノ酸置換を伴うcSNPが4つあり、これらについて関連解析を行なった。641A/Gでは、GGゲノタイプとGアリルは、有意に結核群で多くゲノタイプ頻度の2×3解析でも有意差がみられた(表2上)。表2下に1094T/Cおよび1132C/Gの関連解析の結果を示す。この2つのcSNPはTとGを入れ替えると全く同じ頻度であった。CCゲノタイプとCアリルは、有意に結核群で多く、ゲノタイプ頻度の2×3解析でも有意差がみられた。1573G>Aでは、ゲノタイプ頻度、アリル頻度とも有意差はみられなかった。

連鎖不平衡解析の結果を表3に示す。641A/G、1094T/C、1132C/Gはほぼ完全な連鎖不平衡にあり、

1573G/Aと他の3つのcSNPの間には緩やかな連鎖不平衡がみられた。表4はこの4つのcSNPによるハプロタイプの推定頻度を示す。GCCGハプロタイプは、結核群で多い傾向がみられ、ATGGハプロタイプは結核群で有意に低頻度であった。

SNP	P value (chi)		Frequency	
	2x3	2x2	A1	A2
rs436857	0.110	0.158	Cont. 0.81	0.19
			TB 0.76	0.24
rs2305742	0.071	0.118	Cont. 0.20	0.80
			TB 0.26	0.74
rs2305739	0.008	0.037	Cont. 0.79	0.21
			TB 0.71	0.29
rs383483	0.033	0.011	Cont. 0.41	0.59
			TB 0.52	0.48
rs404733	0.092	0.054	Cont. 0.44	0.56
			TB 0.52	0.48

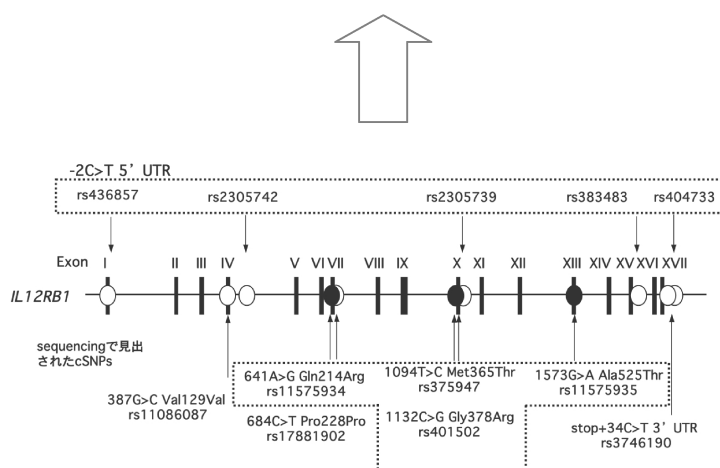


図1 IL12RB1の構造とSNPs

表2 結核患者群と正常対照群におけるIL12RB1の641A/G、1094T/Cおよび1132C/G多型のゲノタイプ頻度およびアレル頻度

<i>IL12RB1</i> cSNPs	Control	TB	OR [95%CI]	<i>P</i> -value
641A/G				
Genotype 頻度				
AA	98 (38%)	23 (27%)	1.46 [0.82-2.59]	0.20
AG	120 (47%)	41 (48%)		
GG	37 (15%)	22 (26%)		
Total	255	86	2.53 [1.43-5.08]	0.0078
(2×3: <i>P</i> = 0.030)				
Allele頻度				
A	316 (62%)	87 (51%)	1.59 [1.12-2.25]	0.0087
G	194 (38%)	95 (49%)		
1094T/C (1132C/G)				
Genotype 頻度				
TT (GG)	96 (37%)	20 (23%)	1.69 [0.93-3.05]	0.080
TC (GC)	125 (48%)	44 (51%)		
CC	39 (15%)	23 (26%)		
Total	263	87	2.83 [1.43-5.73]	0.0032
(2×3: <i>P</i> = 0.013)				
Allele頻度				
T (G)	317 (61%)	84 (48%)	1.67 [1.18-2.36]	0.0034
C	203 (39%)	90 (52%)		

- (2) BCG菌その他の抗酸菌による重症/反復感染症症例IL-12/IFN- γ 経路の遺伝子解析

- a) 抗酸菌易感染例の検体46検体、対照検体10検体を集積した。これら56検体についてIFN- γ レセプター1遺伝子(IFNGR1)の解析を行い、うちBCG骨髄炎症例13例中3例と、抗酸菌に易感染性を示した患者の父親1例に優性IFN- γ R1部分欠損症を本邦で初めて見出し(818del4: 3例、814del4: 1例)(表5、図2)、文

表3 *IL12RB1* の4つの non-synonymous cSNPs の連鎖不平衡解析

	641A>G Gln214Arg	1094T>C Met365Thr	1132C>G Gly378Arg	1573G>A Ala525Thr
641A>G		0.95	0.95	0.64
1094T>C			1.00	0.81
1132C>G				0.81

表4 *IL12RB1* の4つの cSNPs によるハプロタイプの推定頻度

ハプロタイプ	頻度			
	Control n=249	TB n=86	qui-square	P
ATGG	0.598	0.483	7.46	0.0063
GCCA	0.026	0.058	3.85	0.022
GCCG	0.339	0.436	5.23	0.050
others [#]	0.037	0.023		

* 頻度<0.03のハプロタイプ

献¹⁷として報告した。

- b) IFNGR1の異常がみられなかったBCG骨髄炎症例10症例のうち、8例でIFNGR2、5例でIL12B・IL12RB1・IFNG・STAT1、6例でIL23(p19)・IL23R、7例でIL27R(WSX-1)の遺伝子解析を行ったが、IL27Rのsynonymous cSNP (276T/A)が3例にみられた以外には、異常をみとめなかった。また、BCG骨髄炎以外の抗酸菌易感染例8例についてIFNGR2の解析を行ったが、異常は認められなかった。以上の結果を、表6に示した。
- c) 結核患者検体95検体について、優性IFN- γ R1部分欠損症の中でわが国で最も頻度の高い818del4をPCR-RFLPにて検索したが、全て正常パターンであった。
- d) BCG骨髄炎症例についてBCG刺激単核球のDNAマイクロアレイ解析を行った。Cytokine CHIP (242spots)では、優性IFN- γ R1部分欠損症の2症例でIRF-1の発現低下がみられたが、IFNGR1,2に異常のない3例では対照との相異はみられなかった。AceGene Human Oligo Chip 30K (30,000 spots)を用いた解析では、既知のIL-12/IFN- γ 経路に異常のない1症例と対照との間で逆の発現パターンをとる遺伝子5個を見出した。

表5 BCG骨髄炎症例における遺伝子解析結果のまとめ

症例 No.	IFNGR1	IFNGR2	IFNG IL12B IL12RB1 STAT1	IFN- γ R1の発現
1	811del4	正常	ND	↑↑
2	818del4	正常	ND	↑↑
3	818del4	正常	ND	↑↑
4	正常	正常	正常	正常
5	正常	正常	正常	正常
6	正常	正常	正常	正常
7*	818del4	正常	ND	↑↑

* 症例2の父、結核性リンパ節炎および骨髄炎の既往あり

〈国内外での成果の位置づけ〉

(1) 結核患者を対象とした候補遺伝子の関連解析

アフリカで行われた結核の罹患同胞対解析とその後のfine-mappingの結果、15q11-13にあるUBE3Aまたはその近傍に結核感受性ローカスが存在することが示唆されている (Bellamy et al. Proc Natl Acad Sci 2000およびCervino et al. Hum Mol Genet 2002)。このグループ以外では、国内外で同様の解析は行われていない。私たちは、UBE3Aを含む21の結核感受性候補遺伝子についてSNPsマーカーを用いた関連解析を初めて行い、IL12RB1の2

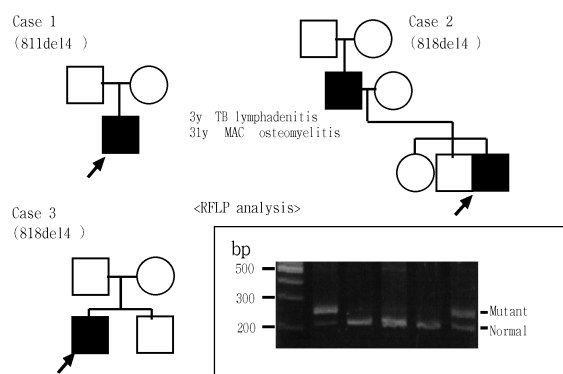


図2 家族のRFLP解析

表6 抗酸菌易感染例における IL-12/IFN- γ 経路のサイトカイン/レセプターの遺伝子解析

症例 No.	診断	IFNGR1	IFNGR2	IFNG IL-12B IL-12RB1 STAT-1	IL-23 (p19) IL-23R	IL-27R (WSX-1)
1	BCG 骨髄炎	818del4	正常	ND	ND	ND
2	BCG 骨髄炎	818del4	正常	ND	ND	ND
3	BCG 骨髄炎	811del4	正常	ND	ND	ND
4	BCG 骨髄炎	正常	正常	正常	正常	ND
5	BCG 骨髄炎	正常	正常	正常	正常	正常
6	BCG 骨髄炎、 重症結核	正常	正常	正常	正常	正常
7	症例1の父 (結核, MAC)	818del4	正常	ND	ND	ND
8-17	症例1~3の 家族	正常 (Seq or RFLP*)	ND	ND	ND	ND
18-19	BCG 骨髄炎	正常	正常	ND	ND	正常
20	BCG 骨髄炎	正常	正常	ND	ND	ND
21-26	重症結核	正常	正常	ND	ND	ND
27-29	骨髄炎以外の BCG 副反応	正常	正常	ND	ND	ND
30-35	結核	正常 (RFLP*)	ND	ND	ND	ND
36-49	骨髄炎以外の BCG 副反応	正常 (RFLP*)	ND	ND	正常	276T/A [#]
50	BCG 骨髄炎	正常	正常	ND	正常	276T/A [#]
51	BCG 骨髄炎 (多発性)	正常	正常	正常	ND	正常
52	BCG 骨髄炎	正常	正常	正常	ND	ND
53	BCG 骨髄炎	正常	正常	ND	ND	ND
54	MAC 肺膿瘍	正常	ND	ND	ND	276T/A [#]
55	BCG 骨髄炎	正常 (RFLP*)	ND	ND	ND	ND
56	BCG リンパ節 炎(多発性)	正常	ND	ND	ND	ND
57-151	結核	正常 (RFLP*)	ND	ND		

*818del4の検索、[#]cSNP (塩基置換なし)

つのcSNP(1094T>C, 1132C>G)が結核発症と関連していることを見出した。これらのcSNPと結核との関連は本邦のAkahoshiら (Hum Genet 2003)も報告しているが、本研究では多数の候補遺伝子を対象としたマッピングの結果として関連が見出された点が意義深く、IL12RB1が日本人における結核感受性遺伝子の一つであることを強く示唆している。一方、モロッコと韓国での検討ではこのクラスターと結核との関連は認められず、また、モロッコでの検討で関連が認められたプロモーター領域のSNPは今回の解析では関連が見られなかった (Remus et al. J Infect Dis 2004およびLee et al. Respiration 2005)。IL12RB1の結核感受性への関与は民族間で異なる可能性が考えられる。この成果は2005年11月に開催された1st Congress of Asian Society for Pediatric Research (ASPR)で発表し、日本人における結核感受性遺伝子の同定として注目を受けた。

(2) BCG菌その他の抗酸菌による重症/反復感染症例IL-12/IFN- γ 経路の遺伝子解析

今回の研究で見出した優性IFN- γ R1部分欠損症症例は、わが国では初めての報告であり、その後は、国内の他施設から1例が学会報告されているのみである。国内では、我々の施設以外で抗酸菌に対する易感染性に関連するIL-12/IFN- γ 経路の異常症(IFN- γ R1, IFN- γ R2, IL-

12, IL-12R, STAT-1 欠損症)の系統的な解析を行っている施設はなく全国の医療機関から抗酸菌易感染例の解析の依頼を受けている。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

結核同胞例からの検体の集積が難航し、罹患同胞対解析を行うことができず、結核発症に関与している遺伝子の染色体上の位置決定に至らなかった。これは、同胞例の多くが現在、通院/入院中でないことが主な理由である。また、新たな共同研究機関は同胞例1組のところが多く、1組の検査を行うために各機関の倫理委員会に申請を行うことについて共同研究者の理解が得られにくいという面もある。

＜今後の課題＞

関連解析およびマイクロアレイを用いた新規候補遺伝子の検索によって、本邦において結核患者の発症に関与している新たな感受性遺伝子を同定する。結核発症と関連する新たなSNPsが見出された場合には、機能解析を行って結核の発症病理に果たす役割を明らかにする。

- 1) ローカスワイド関連解析によって結核との関連を示す SNPs マーカーが見出された遺伝子のうち、IL1B, STAT1, TNFRSF1B について、マーカー近傍の SNP (とくに cSNP) の検索を行い、結核との関連を解析する。
- 2) 抗酸菌に対する易感染性を示しながら Th1 経路の異常が見出されていない症例について、30 K チップを用いた DNA マイクロアレイ解析の例数を増やし、その結果に基づいて新たな感受性遺伝子の解明を進める。
- 3) 上記 1) 2) により結核発症と関連する新たな SNPs が見出された場合には、機能解析を行って結核の発症病理に果たす役割を明らかにする。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1. 0602032320
Joo, A., Shibata, H., Ninomiya, H., Kawasaki, H., Tashiro, N. and Fukumaki, Y.: Structure and polymorphisms of the human metabotropic glutamate receptor type 2 gene (GRM2) : analysis of association with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 6(2): 186-192, 2001.
2. 0602032349
Shibata, H., Joo, A., Fujii, Y., Tani, A., Makino, C., Hirata, N., Kikuta, R., Ninomiya, H., Kawasaki, H., Tashiro, N. and Fukumaki, Y.: Association study of polymorphisms in the GluR5 kainate receptor gene (GRIK1) with schizophrenia. *Psychiatr. Genet.* 11(3): 139-144, 2001.
3. 0602032215
Mitsuyasu, H., Hirata, N., Sakai, Y., Shibata, H., Takeda, Y., Ninomiya, H., Kawasaki, H., Tashiro, N. and Fukumaki, Y.: Association analysis of polymorphisms in the upstream region of the human dopamine D4 receptor gene (DRD4) with schizophrenia and personality traits. *J. Hum. Genet.* 46(1): 26-31, 2001.
4. 301201801
Tani, A., Kikuta, R., Itoh, K., Joo, A., Shibata, H., Ninomiya, H., Tashiro, N. and Fukumaki, Y.: Polymorphism analysis of the upstream region of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 gene (GRIN1): implications for schizophrenia.

Schizophr. Res. 58(1):83-86, 2002.

5. 301201755
Shibata, H., Shibata, A., Ninomiya, H., Tashiro, N. and Fukumaki, Y.: Association study of polymorphisms in the GluR6 kainate receptor gene (GRIK2) with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 113(1-2): 59-67, 2002.
6. 301201805
Makino, C., Fujii, Y., Kikuta, R., Hirata, N., Tani, A., Shibata, A., Ninomiya, H., Tashiro, N., Shibata, H. and Fukumaki, Y.: Positive association of the AMPA receptor subunit GluR4 (GRIA4) haplotype with schizophrenia: linkage disequilibrium mapping using SNPs evenly distributed across the gene region. *Am. J. Med. Genet.* 116B(1): 17-22, 2003.
7. 0402070003
Fujii, Y., Shibata, H., Kikuta, R., Makino, C., Tani, A., Hirata, N., Shibata, A., Ninomiya, H., Tashiro, N., and Fukumaki, Y.: Positive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 3 gene (GRM3) with schizophrenia. *Psychiatr. Genet.* 13(2), 71-76, 2003.
8. 0402070013
Fukumaki, Y. and Shibata, H.: Glutamate receptor genes as candidates for schizophrenia susceptibility. *Drug Development Research* 60: 137-151, 2003.
9. 0403291505
JSSLG (Arinami, T., Ishiguro, H., Minowa, Y., Ohtsuki, T., Tsujishita, T., Imamura, A., Yoshikawa, T., Toyota, T., Kamada, K., Shimizu, H., Yoshitsugu, K., Shibata, H., Fujii, Y., Fukumaki, Y., Tashiro, N., Inada T., Iijima, Y., Kitao, Y., Furuno, T., Someya, T., Muratake, T., Kaneko, N., Tsuji, S., Mineta, M., Takeichi, M., Ujike, H., Takeshita, Y., Tanaka, Y., Nakata, K., Kitajima, T., Nishiyama, T., Yamanouchi, Y., Iwata, N., Ozaki, N., Ohara, K., Ohmori, O., Shinkai, T., Hori, H., Nakamura, J., Kojima, T., Takahashi, S., Tanabe, E., Yara, K., Nanko, S., Yoneda, H., Kusumi, I., Kameda, K., Koyama, T., Fukuzako, H., Hashiguchi, T., Tanabe, K., Okazaki, Y.) : Initial genome-wide scan for linkage with schizophrenia in Japanese Schizophrenia Sib-pair Linkage Group (JSSLG) families. *Am. J. Med. Genet.* 120B(1): 22-28, 2003.
10. 0503281839
Takaki, H., Kikuta R., Shibata, H., Ninomiya, H., Tashiro, N. and Fukumaki, Y.: Positive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 8 gene (GRM8) with schizophrenia. *Am. J. Med. Genet.* 128(1): 6-14, 2004.
11. 0503281851
Deng, X., Shibata, H., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, N., and Fukumaki, Y.: Association study of polymorphisms in the excitatory amino acid transporter 2 gene (SLC1A2) with schizophrenia. *BMC Psychiatry* 4: 21 (6 pages), 2004.
12. 0503281839
Hamamura, M., Watanabe, S. and Fukumaki, Y.: Selective changes in the shapes of parasagittal bands of Aldoc (Zebirin) mRNA in the rat vermis of the cerebellum after repeated methamphetamine injections.

- Cerebellum 3(4): 236-247, 2004.
13. 0601252113
Makino, C., Shibata, H., Ninomiya, H., Tashiro, N. and Fukumaki, Y.: Identification of single-nucleotide polymorphisms in the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2D gene, GRIN2D, and association study with schizophrenia. *Psychiatr. Genet.* 15(3): 215-221, 2005.
 14. 0601252141
Lee, H.J., Song, J.Y., Kim, J.W., Jin, S.Y., Hong, M.S., Park, J.K., Chung, J.H., Shibata, H., Fukumaki, Y.: Association study of polymorphisms in synaptic vesicle-associated genes, SYN2 and CPLX2, with schizophrenia. *Behav. Brain Funct.* 1: 15 (7 pages), 2005.
 15. 0601262058
Arinami, T., Ohtsuki, T., Ishiguro, H., Ujike, H., Tanaka, Y., Morita, Y., Mineta, M., Takeichi, M., Yamada, S., Imamura, A., Ohara, K., Shibuya, H., Ohara, K., Suzuki, Y., Muratake, T., Kaneko, N., Someya, T., Inada, T., Yoshikawa, T., Toyota, T., Yamada, K., Kojima, T., Takahashi, S., Osamu, O., Shinkai, T., Nakamura, M., Fukuzako, H., Hashiguchi, T., Niwa, S.I., Ueno T, Tachikawa, H., Hori, T., Asada, T., Nanko, S., Kunugi, H., Hashimoto, R., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Arai, H., Ohnuma, T., Kusumi, I., Koyama, T., Yoneda, H., Fukumaki, Y., Shibata, H., Kaneko, S., Higuchi, H., Yasui-Furukori, N., Numachi, Y., Itokawa, M., Okazaki, Y.; Japanese Schizophrenia Sib-Pair Linkage Group.: Genomewide high-density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of schizophrenia susceptibility Loci on chromosomes 1p, 14q, and 20p. *Am. J. Hum. Genet.* 77(6):937-944, 2005.
 16. 0601262110
Shibata, H., Aramaki, T., Sakai, M., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, N. and Fukumaki, Y.: Association study of polymorphisms in the GluR7, KA1 and KA2 kainate receptor genes (GRIK3, GRIK4, GRIK5) with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 141(1): 39-51, 2006.
 17. 0303270933
Sasaki, Y., Nomura, A., Kusuhara, K., Takada, H., Ahmed, S., Obinata, K., Hamada, K., Okimoto, Y. and Hara, T.: Genetic basis of patients with Bacille Calmette-Guérin osteomyelitis in Japan: identification of dominant partial interferon- γ receptor 1 deficiency as a predominant type. *J. Infect. Dis.* 185(5): 706-709, 2002.
 18. 0303270947
Inoue, T., Kira, R., Nakao, F., Ihara, K., Bassuny, W.M., Kusuhara, K., Nihei K, Takeshita K, Hara T: Contribution of the interleukin 4 gene to susceptibility to subacute sclerosing panencephalitis. *Arch. Neurol.* 59(5): 822-827, 2002.
 19. 0602061057
Torisu, H., Kusuhara, K., Kira, R., Bassuny, W.M., Sakai, Y., Sanefuji, M., Takemoto, M. and Hara, T.: Functional MxA promoter polymorphism associated with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Neurol.* 62(3): 457-460, 2004.
 20. 0602061110
Kusuhara, K., Nomura, A., Nakao, F. and Hara, T.: Tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome with a novel mutation in the TNFRSF1A gene in a Japanese family. *Eur. J. Pediatr.* 163(1): 30-32, 2004.