

双極性障害の疾患感受性遺伝子の解明

●工藤 純

慶應義塾大学医学部

〈研究の目的と進め方〉

本研究では、二大精神疾患の一つである双極性障害の疾患感受性遺伝子の解明を目的とした。双極性障害に関しては家族内集積傾向、双生児研究、養子研究から遺伝要因の関与が強く示唆されており、連鎖解析による感受性遺伝子領域の検索が行われてきた。しかし、双極性障害が単一遺伝子疾患ではなく、遺伝と環境が複雑に関与する多因子疾患であること、また遺伝的異質性があり、複数の疾患感受性遺伝子が存在するなどの理由から、複数の施設からの報告で一致した染色体領域は極めて少なく、研究開始当時までの解析の結果有力な候補領域とされているのは、18番染色体の動原体周辺部と21番染色体の長腕21q22のみであった。このうち21番染色体は、当時ヒトゲノム全体の中でも最も遺伝子解析が進んだ染色体の一つであり、疾患候補領域の解析もほぼ完了しているという大きな利点があった。我々は21番・22番染色体のマッピング・シーケンシングと新規遺伝子の探索、疾患原因遺伝子のポジショナルクローニングを進めてきた。特に国際共同研究チームによるヒトゲノムプロジェクトの一環として行ったシーケンシングについては、本研究開始時までに22番染色体長腕の全塩基配列の決定（1999

年12月）に続き、21番染色体長腕の全塩基配列も決定（2000年5月）した。またそれまでに、ダウン症の原因遺伝子の探索、遺伝性自己免疫性多腺性内分泌疾患1型（APECED）、先天性非症候群性聾（DFNB8、DFNB10）等の単一遺伝子疾患のポジショナルクローニングを遂行する過程で21q22の双極性障害候補領域から多数のマーカー、有力な候補遺伝子も発見していた。このように21q22においては高精度ゲノムシーケンスのみならず、系統的に疾患感受性遺伝子に迫るための基盤となる情報が整備されており、本研究も当初は、21q22にマッピングされている双極性障害の疾患感受性遺伝子の解明を目的として開始した。その後、2002年頃までに全ゲノム連鎖解析の結果1q、4p16、10q21-q26、11p15、12q23-q24、13q11-q32、18p11、18q21、21q21-q22、22q11-q12、Xq26などが候補領域としてあげられたが、これまでに報告された全ゲノム連鎖解析の結果をまとめたメタ分析の論文では13番染色体と22番染色体が有力な候補領域であるという結果が報告された。我々は特に、22番染色体の22q12の候補遺伝子に注目し、解析対象に加えた。

21q22へのマッピングは、1994年、Straubらによって、東欧出身のユダヤ人の多世代からなる一大家系を用いた

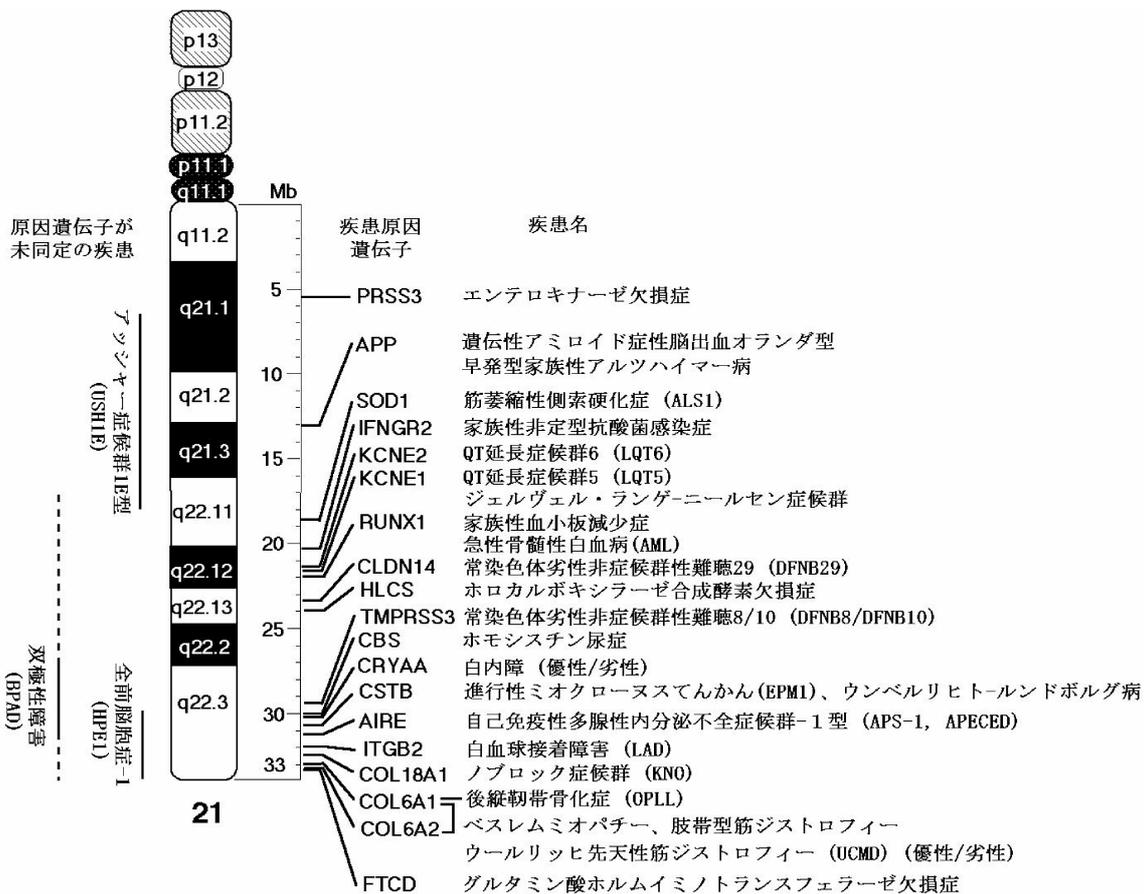


図1. 21番染色体の双極性障害疾患感受性遺伝子の候補領域と既知の疾患原因遺伝子

連鎖解析が行われ、21q22.3にあるDNAマーカーPFKL (phosphofructokinase, liver type) 近傍でロッドスコアが3.41であった、という報告がなされたのが最初である。以後、同領域周辺に関して、多数の家系を用いた複数の報告があり、これらの結果からは、必ずしもPFKL領域に限らず、21q22の広い領域にわたって、疾患感受性遺伝子が存在する可能性が示されている(図1左、点線で示した領域)。また、当初PFKLにマッピングしたグループによる多数の家系に対する解析では、PFKLよりも5cM(約3Mb)セントロメア寄りのマーカーD21S266、D21S1260周辺にピークがシフトしているが、D21S266からPFKL、D21S171にかけての約4Mbの領域(図1左、実線で示した領域)が最も疾患感受性遺伝子の存在する可能性が高いと考えられる。図2には、この領域の遺伝子地図を示した。我々はまず、この領域について網羅的な遺伝子探索と転写物の解析を行い、領域内の全ての候補遺伝子の構造決定を目指した。

また、機能的候補遺伝子については、21q22の全領域を対象として候補遺伝子を検討し、多型解析を行った。双極性障害患者の多型解析は、米国NIMHから入手した双極性障害22家系と山梨大学医学部で収集した双極性障害患者群(92名)のDNA(NIMH/NIH・Detera-Wadleigh、理研・吉川、山梨大・神庭、塩江らとの共同研究による)を用いて行った。

〈研究開始時の研究計画〉

1. 21q22の双極性障害候補領域の新規遺伝子の探索
ヒト21番染色体長腕のシーケンシングは、2000年4月ま

では、ほぼ完了しており、21q22.3の候補領域には、すでに我々が以前に発見した脳に多く発現する新しいタイプのカルシウムチャンネル蛋白TRPM2/TRPC7 (transient receptor potential melastatin 2/transient receptor potential-related channel 7) 遺伝子 (Nagamine, K. et al. Genomics, 1998, 54 (1), 124-131)、自己免疫調節遺伝子AIRE (Autoimmune Regulator) (Nagamine et al. Nature Genet, 1997, 17, 393-398)、ホスホジエステラーゼPDE9A遺伝子 (Guipponi M. et al. Hum. Genet. 1998, 103 (4), 386-392)、DNAメチルトランスフェラーゼ3類似遺伝子DNMT3L (Aapola, U. et al. Genomics, 2000, 65 (3), 293-298)、WDリピート蛋白WDR4 (Michaud, J. et al. Genomics, 2000, 68 (1), 71-79) など少なくとも40個の遺伝子が発見されているが、この他にも部分的にしか構造の分かっていない遺伝子や、エキソン予測プログラムによる解析から推定された遺伝子が十数個存在する。これらの新規遺伝子の全構造を明らかにするために、RT-PCR等、実験によってcDNAの単離を進める。さらにヒトの各種組織由来のcDNAを用いたPCRとノーザンブロット解析により、遺伝子発現の特異性を解析する。また、21q22の双極性障害候補領域内には、3ヶ所、計約100kbのクローンギャップが残されていた。双極性障害候補領域内のいかなる遺伝子も取り逃がすことのないよう完璧を期すため、これら3ヶ所のクローンギャップについて、ギャップ内に伸びたcDNAの配列を基にゲノムDNAからのPCRを行うなど様々な手段を尽くしてギャップを狭めるかあるいは解消することを目指す。

また、機能的観点から特に双極性障害との関連が疑わ

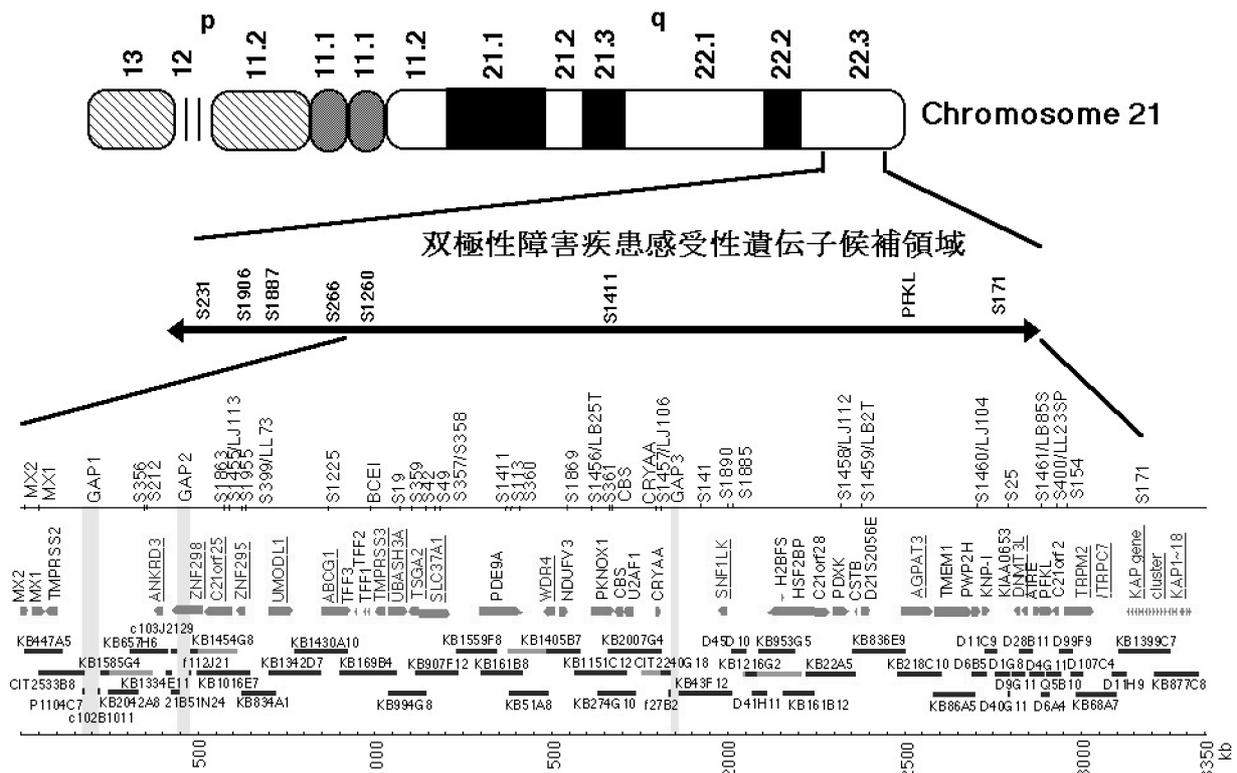


図2. 21q22.3の双極性障害疾患感受性遺伝子候補領域のBAC・コスミドコンティグ、遺伝子地図

最も可能性が高いと報告されている領域は、21番染色体の塩基配列上約4Mb程度に相当し、そのうち3.3Mbは我々がマッピング・シーケンシング・遺伝子探索を進めてきた領域である。遺伝子名に下線を引いた33個は2000-2004年に我々が転写物の解析から構造を決定した遺伝子である。この領域内には、3つのシーケンスギャップ(GAP1-3)が存在したが、このうち、GAP2をまたぐZNF298遺伝子のcDNAを発見し、そのcDNAの配列を用いてPCRによりギャップを埋めることに成功した。

れる重要な候補遺伝子については、遺伝子発現調節に重要と思われるプロモーター領域の多型解析を有効に行うために5' RACE法によりmRNAの5'末端を取得し、転写開始エキソンを決定する。

2. 双極性障害家系における候補遺伝子の多型の検索

これまでに連鎖解析で疾患感受性遺伝子の存在する可能性が示唆された21q22の候補領域にはすでに少なくとも40個の遺伝子が発見されており、それらのエキソンを合計すると500個を越える。そこで遺伝子産物の推定機能から病態との関連が特に疑われる有力な候補遺伝子から優先的に遺伝子解析を行う。米国NIMHから新たに入手した双極性障害22家系のDNA試料を用い、上記遺伝子についてPCR-変性HPLC法とシーケンシングにより、塩基置換、欠失、挿入等の有無を解析する。

〈研究期間の成果〉

1. 21q22の双極性障害候補領域の新規遺伝子の探索

21q22.3のゲノムシーケンスの解析から推定された遺伝子についてcDNAの単離を進め、グリセロール3リン酸透過酵素と推定されるSLC37A1/G3PP [1]、UBAドメインとSH3ドメインを持つUBASH3A [2]、膜貫通型セリンプロテアーゼTMPRSS3 (Transmembrane protease, serine

クZNF298 [8] など多数の新規候補遺伝子の構造を決定した。

候補領域内のいかなる遺伝子も取り逃がすことのないよう21q22に残された3ヶ所計100kbのクローンギャップ(GAP1-3)の解消を試み、新たに単離したクローン、PCRを用いて約40kbを埋めることに成功した。このうち、GAP2については、上述のZNF298遺伝子cDNAが、ギャップをまたいで存在することが先ず判明したため、ギャップ内のエキソンに相当するcDNAの配列から、PCRプライマーを作製し、ゲノムDNAからのPCRによって、ギャップをまたぐゲノムDNA断片を3本に分けて増幅することに成功したものである。増幅したDNAの塩基配列をショットガンシーケンシング法で解析したところ、CAリッチリピートの繰り返し領域2カ所が短いシーケンスギャップとして残ったものの、約25kbのギャップ内の塩基配列を決定することができた [8]。

また、ABCトランスポータースーパーファミリーの一員であるABCG1遺伝子についてはオキシコレステロールによって誘導される転写物の解析から、従来知られていなかったプロモーター、エキソン、コーディング領域を発見した [9]。

一方、我々が以前に発見した脳に多く発現する新しいタイプのカルシウムチャンネルTRPM2/TRPC7は、機能的、

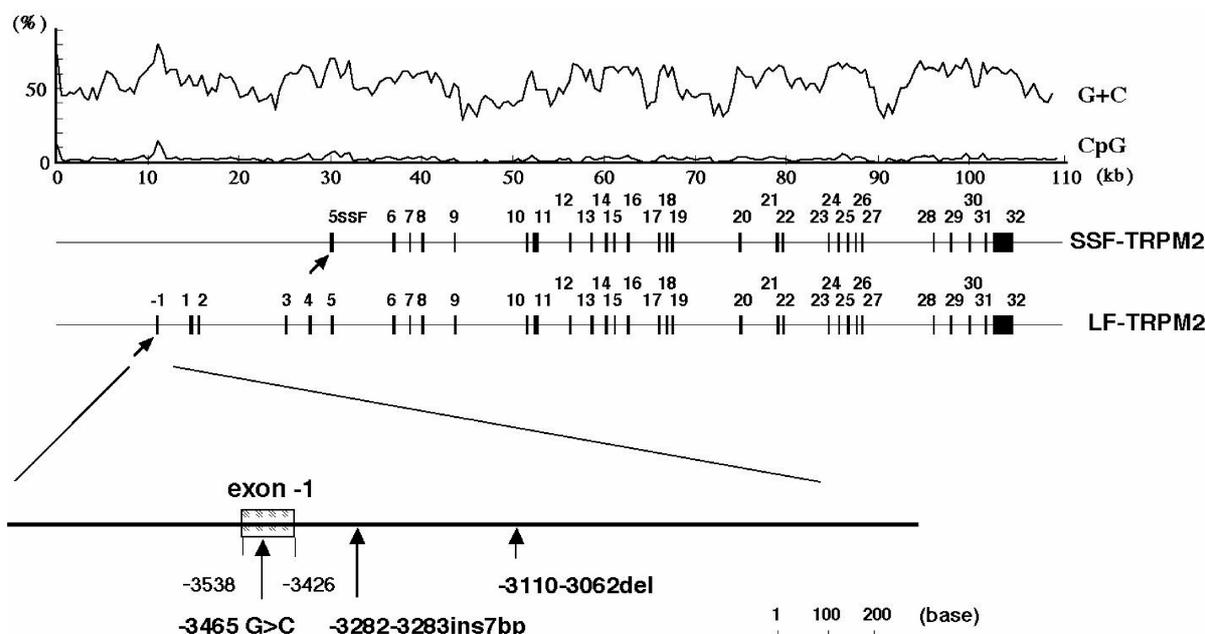


図3. ヒトTRPM2遺伝子の構造と転写開始部位周辺の多型

6.5kbの長型TRPM2 (LF-TRPM2) mRNAは、CpGアイランド中に存在する真の第1エキソン (便宜上 exon -1と命名した) から転写されていた。5.5kbの線条体特異的短型TRPM2 (SSF-TRPM2) mRNAは、イントロン4内の第2のプロモーターから転写されていた。この領域で発見した3つの多型は連鎖不平衡の関係にあった。

3) [3]、マウス精巣特異的遺伝子Tsga2のヒト型遺伝子TSGA2 [3]、C21orf24 [4]、C21orf25、アンキリンリピートを持つキナーゼANKRD3、WDリピート蛋白WDR9、C21orf29/TSPPEAR (Thrombospondin-N domain and Epilepsy-Associated Repeat domain) 遺伝子とそのイントロン内に存在する毛髪ケラチン付随蛋白 KAP (keratin-associated protein) 遺伝子クラスター (18個のKAP遺伝子から成る) [5]、Znフィンガー蛋白ZNF295 [6]、ウロモジュリン類似蛋白UMODL1 [7]、Znフィンガータンパ

位置的に有力な候補遺伝子であったが、本研究を進める間に、Yoon等によって (Biol Psychiatry, 2001, 50, 620-6)、一部の双極性障害I型患者由来培養B細胞でそのmRNA量の低下が報告されたため、TRPM2遺伝子の転写調節領域の多型によってmRNA量が低下し、それが双極性障害の引き金になっている可能性を検証する必要が重要課題として急浮上してきた。転写調節領域を明らかにするために脳のmRNAを用いたNorthern blot解析と5'RACEを徹底的に行った結果、脳のほとんどの組織で発現する6.5kbの

主要な転写産物が、従来知られていた開始コドンを含む第1エキソンよりも約3kb上流の非翻訳領域のみからなる新規エキソンから開始していることが明らかとなった(図3) [10]. さらに興味深いことに脳の線条体(被殻、尾状核)に特異的に発現する5.5kbの短型転写産物が、TRPM2遺伝子内の第二のプロモーターから転写されることを明らかにした [10]. 後者からのmRNAは、これまでに報告されていない線条体に特異的な短型TRPM2蛋白をコードしていたが、この短型TRPM2蛋白もカルシウムチャネルとして機能していた [10].

2. 双極性障害家系における候補遺伝子の多型の検索

1) 候補遺伝子の突然変異の検索:

既知遺伝子の中から、マーカーD21S1260近傍の位置的候補遺伝子としてMXA (myxovirus resistance 1, interferon-inducible protein), MXB, TMPRSS2 (Transmembrane protease, serine 2), BACE2 (beta-site APP-cleaving enzyme 2) を、また21q22の機能的候補遺伝子としてNCAM2 (neural cell adhesion molecule 2), SLC5A3 (solute carrier family 5/inositol transporter, member 3), SYNJ1 (synaptojanin) を選び、すべてのコーディング領域を増幅するPCRプライマーを作成し、PCRの条件を設定した。米国NIMHから入手した双極性障害22家系のDNA試料を用い、上記遺伝子についてPCR変性HPLC法とシーケンシングにより、塩基置換、欠失、挿入等の有無を解析した。合計132個のエキソンを解析し、106種類の多型を発見した。この内アミノ酸置換を伴うもの5種類、アミノ酸欠失を伴うもの1種類であった。

2) TRPM2遺伝子の転写調節領域の多型解析:

Table 1. Frequencies of L/S allele in the TRPM2 gene

	genotype			allele	
	L/L	L/S*	S/S	L	S
control (n=210)	202	8	0	412	8
bipolar disorder (n=92)	88	4	0	180	4

*S: Shorter allele with a 49-bp deletion and a 7-bp insertion

Table 2. Genotype frequencies of SNPs in the GRK3 promoter region

SNPs	P-1		P-2		P-3		J-1		P-4	
	-1330 T/C		-1306 A/G		-1197 T/G		-972 A/G		-901 A/G	
genotype	T/T	T/C	A/A	A/G	T/T	T/G	A/A	A/G	A/A	A/G
control (n=92)	92	0	92	0	84	8	91	1	84	8
bipolar disorder (n=92)	92	0	92	0	88	4	92	0	88	4

SNPs	P-5		J-2		J-3		J-4		J-5		P-6	
	-383 G/A		-236 G/A		-202 C/G		-189 C/delC		-186 C/A		-117 G/delG	
genotype	G/G	G/A	G/G	G/A	C/C	C/G	C/C	C/delC	C/C	C/A	G/G	G/delG
control (n=92)	92	0	91	1	91	1	87	5	91	1	91	1
bipolar disorder (n=91)	91	0	90	1	89	2	89	2	91	0	91	0

新たに発見した真の転写開始点を含む第1エキソン(exon -1)の周辺から変異を検索したところ、7 bpの挿入(-3282^3283 ins7bp)及び49 bpの欠失(-3110^3062del)を伴うexon -1内の1塩基置換(-3465 G>C)をみつけた(図3).

この多型について日本人患者群(92名)と対照群(210名)を用いて双極性障害との関連を検討したが、有意な関連は見いだせなかった(Table 1).

3) 22q12のADRBK2/GRK3遺伝子の多型解析:

北欧の双極性障害家系において疾患との関連が報告された22q12のADRBK2/GRK3 (adrenergic, beta, receptor kinase 2/G protein receptor kinase 3) 遺伝子のプロモーター領域の多型と本邦における双極性障害の発症との関連を検討した。北欧の家系において双極性障害との関連が示唆された同遺伝子のプロモーター領域の多型P-5 (G>A)のみならず、P-1 (T>C), P-2 (A>G)も、本邦においては、患者群、正常対照群のいずれにおいても見出せなかった。一方、多型P-3 (T>G), P-4 (A>G), P-6 (del G)は認められ、その他に新たにJ-1~5の5つの多型も見出したが、これらのプロモーター領域の多型についても、本邦における双極性障害の発症への関連は、見出せなかった(Table 2)。さらにハプロタイプ解析も行ったが、同様に有意な差は認められなかった。

<国内外での成果の位置づけ>

双極性障害感受性遺伝子の解明が、人口の0.5~1.5%が罹患すると言われる双極性障害の診断・予防・治療への着実な一歩となることは疑いの余地がない。双極性障害あるいは統合失調症など、主要な精神疾患の原因遺伝子の解明は永年待ち望まれており、本研究の成功は当該分野における世界的なブレイクスルーとなるのみならず、ヒトゲノムプロジェクトのもたらした画期的な成果の一つとして、社会に及ぼすインパクトの大きさは計り知れないものがある。

我々が発見した21q22.3の候補遺伝子TRPM2/TRPC7については、位置的・機能的に重要な候補遺伝子として注目されており、双極性障害との関連が、遺伝子発現レベル、遺伝子多型レベルで解析されている。

双極性障害において、細胞内Ca²⁺動員の異常が認められ、その治療薬がCa²⁺動員に調整的に働くことは多くの研究から明らかにされている。我々が注目しているTRPM2は、カルシウムチャネルの遺伝子であるが、ADP-riboseやH₂O₂等の活性酸素種により、細胞内にβ-

NAD⁺が生じ、それがTRPM2タンパクのC末端側ドメインに存在するNUDIXモチーフに結合することによりチャネルが活性開口し、その結果、Ca²⁺やNa⁺が細胞内に大量流入して細胞死をもたらすことが報告されている。このことは、虚血などで神経細胞死をもたらす、神経系の可塑性にも関与していると考えられる。

TRPM2遺伝子の

転写調節開始点を詳細に検討し、その後、多型解析を行ったところ、挿入、欠失を伴う一塩基置換をみつけたが、双極性障害との関連は認められなかった。しかしながら、双極性障害患者由来のBリンパ芽球細胞株のうち、細胞内Ca²⁺濃度の高い群において、TRPM2 mRNA量が有意に低下していることが報告され、その後、同グループによるTRPM2遺伝子のmRNA量が有意に低下している群を対象とした多型解析の結果、intron 18およびintron 19内に有意差のある一塩基置換が発見された。また、最近、McQuillinらは、600人の双極性障害患者を対象として関連解析を行い、TRPM2遺伝子のexon 11のアスパラギン酸からグルタミン酸へのアミノ酸置換を伴う一塩基置換と疾患との関連 (P=0.008) を発見したと報告した。これらの報告は、TRPM2遺伝子と双極性障害の関連を強く示唆するものであり、注目されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

我々の解析した患者群では、疾患に関連した多型と感受性遺伝子を決定することができなかった。双極性障害の発症に影響を与える遺伝的要因が、多岐にわたるため、個々の多型と疾患感受性との関連について有意な差を見出すためには、もっと症例数を増やして解析を進める必要があった。

〈今後の課題〉

双極性障害患者家系をより多く集めて、さらに解析を進め、TRPM2遺伝子多型と双極性障害の関連を実証することが重要である。また、TRPM2蛋白のアミノ酸置換による機能の変化とその生理学的影響の解析、イントロン内の多型による遺伝子発現の変化等も解析し、多型と疾患発症機序との関連が解明されれば、新しい創薬開発の糸口として脚光を浴びるであろう。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0602232307
Bartoloni, L., Wattenhofer, M., Kudoh, J., Berry, A., Shibuya, K., Kawasaki, K., Wang, J., Asakawa, S., Talior, I., Bonné-Tamir, B., Rossier, C., Michaud, J., McCabe, E.R.B., Minoshima, S., Shimizu, N., Scott, H.S., and Antonarakis, S.E., Cloning and characterization of a putative human glycerol 3-phosphate permease gene (SLC37A1 or G3PP) on 21q22.3: mutation analysis in 2 candidate phenotypes, DFNB10 and a glycerol kinase deficiency, *Genomics*, 70 (2), 190-200 (2000) .

2. 0602232319
Wattenhofer, M., Shibuya, K., Kudoh, J., Lyle, R., Michaud, J., Rossier, C., Kawasaki, K., Asakawa, S., Minoshima, S., Berry, A., Bonne-Tamir, B., Shimizu, N., Antonarakis, S.E., and Scott, H.S., Isolation and characterization of the UBASH3A gene on 21q22.3 encoding a potential nuclear protein with a novel combination of domains, *Hum Genet.*, 108, 140-147 (2001) .

3. 0602232322
Scott, H.S., Kudoh, J., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Berry, A., Chrast, R., Guipponi, M., Wang, J., Kawasaki, K., Asakawa, S., Minoshima, S., Younus, F., Mehdi, S.Q., Radhakrishna, U., Papasavvas, M.-P., Gehrig, C., Rossier, C., Korostishevsky, M., Gal, A., Shimizu, N., Bonne-Tamir,

B., Antonarakis, S.E., Insertion of b-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness, *Nature Genet.*, 27 (1), 59-63 (2001) .

4. 0602232331
Owczarek, C., Portbury, K., Hardly, M., O'Leary, D., Kudoh, J., Shibuya, K., Shimizu, N., Kola, I., and Hertzog, P.; Detailed mapping of the ERG-ETS2 interval of human chromosome 21 and comparison with the region of conserved synteny on mouse chromosome 16. *Gene*, 324, 65-77 (2004) .

5. 0403301835
Shibuya, K., Obayashi, I., Asakawa, S., Minoshima, S., Kudoh, J., and Shimizu, N., A cluster of 21 keratin-associated protein genes within introns of another gene on human chromosome 21q22.3, *Genomics*, 83 (4), 679-693 (2004) .

6. 0602232353
Shibuya, K., Nagamine, K., Okui, M., Ohsawa, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Hase, T., Kudoh, J., and Shimizu, N., Initial characterization of an uromodulin-like 1 gene (UMODL1) on human chromosome 21q22.3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319 (4), 1181-1189 (2004) .

7. 0602240000
Wang, J., Kudoh, J., Takayanagi, A., and Shimizu, N. Novel human BTB/POZ domain-containing zinc finger protein ZNF295 is directly associated with ZFP161. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 327 (2), 615-627 (2005) .

8. 0602240005
Shibuya, K., Kudoh, J., Okui, M. and Shimizu, N., Identification of a novel zinc finger protein gene (ZNF298) in the GAP2 of human chromosome 21q, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 332 (2), 557-568 (2005) .

9. 0602232327
Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., and Edwards, P.A., Characterization of the human ABCG1 gene. Liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein, *J. Biol. Chem.*, 276 (42), 39438-39447 (2001) .

10. 0602240002
Uemura, T., Kudoh, J., Noda, S., Kanba S., and Shimizu, N., Characterization of human and mouse TRPM2 genes: Identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328 (4), 1232-1243 (2005) .