

精神疾患の遺伝子探索

●岡崎祐士¹⁾ ◆佐々木司²⁾ ◆谷井久志³⁾ ◆加藤忠史⁴⁾ ◆松本直通⁵⁾ ◆染矢俊幸⁶⁾
◆有波忠雄⁷⁾ ◆吉川武男⁴⁾ ◆功刀 浩⁸⁾

1) 東京都立松沢病院 2) 東京大学保健センター 3) 三重大学大学院医学系研究科 4) RIKEN BSI 5) 横浜市立大学大学院医学系研究科
6) 新潟大学大学院医歯学総合研究科 7) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 8) 国立精神神経センター神経研究所

<研究の目的と進め方>

本研究は、主要な精神疾患の感受性遺伝子を探索同定しようとするものである。研究期間内に、パニック障害を中心に、他に統合失調症、双極性障害及び自閉症についても、それぞれ感受性遺伝子を見出し、病態と創薬・治療法の手がかりを見いだすことを目的とする。

中心となるパニック障害は、交感神経の急激な興奮と強い不安を伴うパニック発作の繰り返しと、それに対する予期不安というクリアな症状を中心症状とし、全人口の2%以上が罹患する比較的頻度の高い精神疾患である。併発する広場恐怖（パニック発作の起こり易い場所（例：乗り物内）にいらなくなる）等のため社会活動が大きく障害される、医学的にも社会的にもその病態解明が必要とされている疾患である。

パニック障害の疾患感受性遺伝子探索については、これまで関連研究を中心に多数の研究があるが、いずれも対象数が小さく（最大で200人規模）、多因子・複雑疾患であるパニック障害の感受性遺伝子の検出にははるかに及ばないものである。また解析した遺伝子も、少数の候補遺伝子に限られてきた。これらの問題をクリアした本格的なパニック障害の感受性遺伝子を探索し、疾患感受性遺伝子群の同定を行うことが本研究の目的である。幸い我が国には、10,000人以上のパニック障害外来患者を擁する不安障害の専門医療機関があり（研究協力者：貝谷久宣）、他の国では望めない、大規模かつ統一的方法に基づいた対象リクルートが見込まれた。本研究はこの医療機関（研究協力者）の全面的協力のもとに立案・遂行を行った。

<研究の計画と進行>

研究の進行は下記の計画に沿って行った。すなわち1) パニック障害患者のリクルートとDNAサンプルおよび臨床・心理情報の収集、2) SNPチップを用いた全ゲノム関連解析およびそのreplication study、3) その結果同定されたパニック障害感受性遺伝子候補の機能解析、これらと並行して4) 多発家系サンプルを主な対象としてBACアレイCGHによる微小欠損・重複の解析、および5) 中間表現型の確立を目的とした近赤外線スペクトロスコープ(NIRS)による脳機能解析である。なおこれらは、東京大学医学部倫理委員会及び三重大学医学部研究倫理委員会で承認を得て行ったものである。

1. パニック障害患者のリクルートと試料収集

研究協力者 貝谷久宣の協力を得て、赤坂クリニック（佐々木司担当、梅景正、音羽健司、吉田栄二、安田新協力）、なごやメンタルクリニック（谷井久志担当、井上顕協力）を中心にパニック障害患者のリクルートと臨床情報、DNAサンプルの収集を行った。リクルートにあたっては、臨床心理技術者を支援班の援助で雇用し、精神疾患簡易構造化面接（MINI）による診断および合併症の確認、心理検査、研究説明の補足等の作業に従事した。心理検査としては気質・性格評価質問紙 NEO-PI-R等を施行した。

また専門クリニック2ヶ所のほかにも、分担研究者所属大学附属病院＝新潟大（染矢担当）、東京大（佐々木担当、音羽協力）、三重大（谷井担当）、理研（吉川担当）、千葉大（清水協力）、大分大（穉吉協力）等でも患者リクルートとDNA試料収集を進めた。



東京・名古屋の専門クリニックで用いた リクルート用パンフレット

なお本研究はパニック障害の解析をメインとしたが、他の精神疾患についても試料収集と解析を進めている。それらの試料については、上記両クリニック及び分担研究者の所属または関連の施設でリクルート・収集した（加藤忠史、功刀浩、有波忠雄、吉川武男、染矢俊幸）。

また健常対照者についても、研究分担・協力者及び施設関係者に協力を得て試料を収集した。

2. 染色体スクリーニング

多発家族例の一部は血液5mlを用いて、アレイCGH (Comparative Genomic Hybridization) で染色体増幅・欠失などの染色体構造異常をスクリーニングした（松本担当）。

3. 全ゲノム関連解析 (GWAS)

Affymetrix社製SNPチップを用いたGWASを、東京大学のSNPタイピングセンター（医学系研究科人類遺伝学教室、徳永教授）のご協力が進め、2次サンプルによるreplicationを同教室がOlympusと共同開発したDigiTag2システムを用いて行った。

なおSNPチップによるGWASは、当初500kチップによるパニック患者200人 vs. 健常対照200人で行ったが、その後パニック障害を支援班による900kSNPチップでの解析の対象疾患として選んでいただいたことから、同SNPチップによる患者・対照約600例ずつの解析が行われ、さらに患者800例、対照700例（2009年度末には1,000例となる予定）の二次サンプルでのreplication studyを進行中である。

4. NIRSによる脳機能解析

精神疾患では生化学あるいは病理学的所見に基づく指標が診断で利用できないのが現状である。そのため、感受性遺伝子の同定においては、現行の診断基準以上に遺伝的背景との関連性の高い指標となる中間表現型の確立が有用と考えられる。本研究では、近赤外線スペクトロスコピー (NIRS) を利用した前頭脳機能評価の、パニック障害の中間表現型としての利用可能性について検討を行った。

5. その他

当初の予定にはなかったが、本研究開始後に米国のNIMHを中心にスタートした北米、北欧、ドイツを中心とする10施設以上の研究機関によるパニック障害GWAS共同研究に、2008年度途中より参加した。またパニック障害ならびにその他の精神疾患(統合失調症、双極性障害)の発症不一致一卵性双生児リンパ芽球における遺伝子発現差異の解析のため、サンプルの一部を株化保存し、解析を行った。チップによる解析で差異が認められた遺伝子についてはRT-PCRによる確認と多型検索を行った。

<研究期間の成果>

1. パニック障害患者のリクルート

(1) 東京、名古屋の2つの中心的拠点において、1,000例近くのパニック障害患者(東京450例、名古屋・三重550例)のリクルートを達成した。これは1つの研究グループとしての収集として世界最大のものである。特に、直近の世代における民族の混血がないパニック障害のサンプルとしては世界に例のないものである。本研究のみでなく今後の研究発展においても非常に有用性の高いサンプルと考えられる。

この他に、大分大学、新潟大学、千葉大学、理研などの諸研究機関の協力で約300例、韓国の共同研究者からの約300例が利用可能となっている。また数は少ないが、多発家系のリクルート、一卵性双生児不一致例のリクルートも行った。

(2) 健常対照サンプル:患者サンプルと同様に健常対照サンプルのリクルートを進め、現在患者数とほぼ同数のサンプルが利用可能となっている(2010年2-3月には、さらに300例を収集予定)。

2. 染色体スクリーニング

分担研究者の松本は、FISH検証済みBAC4234クローンを搭載した全ゲノムマイクロアレイを作成、多発家系例を中心とするパニック障害42例においてCGH(Comparative Genomic Hybridization)を実施した。アレイCGHで異常が疑われる231箇所(重複90と欠失147)のうち、CNVデータベースに多型登録のない58クローンのFISHを当該症例に行った。その結果、明らかな重複1カ所を1例の母子例で、欠失2カ所(13番400kbと5番の400Kb未満)をそれぞれ1例ずつで検出、追加FISHを行って重複領域および欠損領域を追試・確認した。それぞれの病的意義をコピー数異常領域の遺伝子の正常などから考察するもパニック障害との明らかな関連性を見出すに至らず、また病的だとの判断に至らなかった。同方法で検討した統合失調症59例の解析結果(異常例10%)と比較してみると、病的であると判断される重複・欠損などの変異はパニック障害では低頻度(0%)であり、精神疾患の中でもアレイCGHで検出されるようなCNV頻度には疾患ごとに明らかな違いがある可能性が示唆された。

3. パニック障害のGWAS

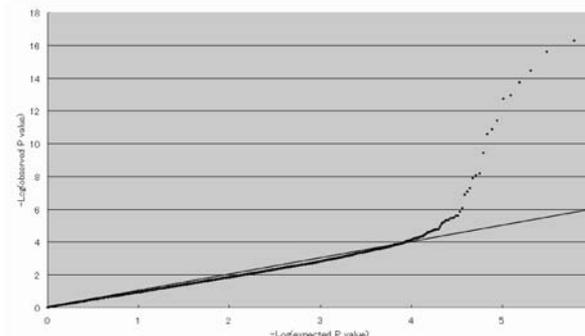
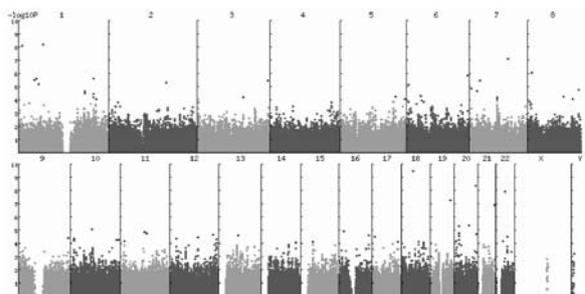
パニック障害のGWASは、当初Affymetrix社製の500k SNPチップ(GeneChip Human Mapping 500K Array Set)を用いて、患者

200例、健常対照200例で行った。その結果、allele p値 10^{-6} 以下のレベルで、*CLU*(Apolipoprotein J)遺伝子上のものなど7 SNPが見出された。

その後、同社製の900k SNPチップを用いたGWASの対象疾患の1つにパニック障害が選定されたため、自主購入のチップと合わせて、患者、健常対照それぞれ約600例でのGWASが施行された(data cleaningで残ってcase-control間の統計検定が実施できたサンプル数は患者560例、健常対照601例)。なおdata cleaningの条件は、call rate > 95%(患者、対照とも)、Hardy-Weinberg平衡のp値 > 0.1%、minor allele frequency > 1%とした。これによって検討できるSNP数はもとの905,376から658,212 SNPsとなった。これらのSNPの中から、allele p値 10^{-4} 以下のレベルのもの約60SNPs、これまでに行われた他の精神疾患(双極性障害、統合失調症など)のGWASで支持されたSNPでallele p値 10^{-3} 前後のもの約30SNPsを中心に、2次サンプルでのreplication用の96 SNPsを選択、現在、DigiTag2システムを用いたタイピングの作業を進めている。これらのSNPsには、500kチップのGWASでallele p値 10^{-6} レベルに達したSNPsが位置した遺伝子上のものは含まれなかったが、 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ レベルのSNPが位置した遺伝子については再現されたものが認められた。なお、2次サンプルは現時点ではパニック障害患者810例、健常対照710例であるが、年度末には健常対照を約1,000例に増加できる見込みである(患者、対照とも韓国人サンプルを300例と100例含む)。

2次サンプルの検出力(800例 vs. 700例)は、約100SNPsの確認であることから $\alpha = 0.0005$ と設定すると、odds ratio = 1.5の場合、MAF > 0.2で90%以上、odds ratio = 1.4の場合には、MAF > 0.3で80%以上である。 $\alpha = 0.01$ とした場合にはodds ratio = 1.3、MAF > 0.3で80%以上が確保される。

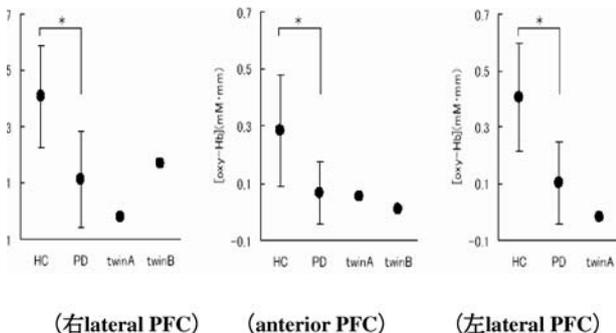
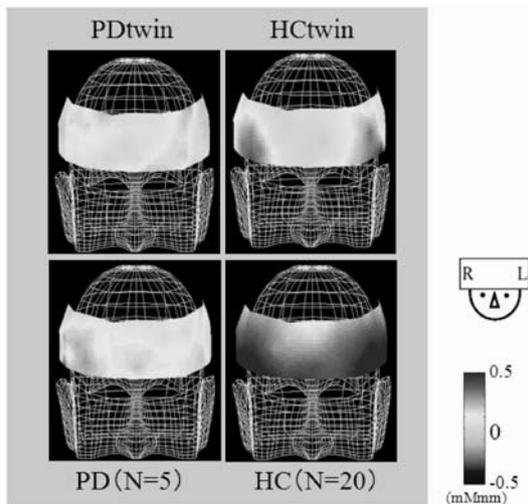
900kチップで検討したSNPs(data cleaning後)のallele p値のマンハッタンプロットおよびQQプロットを下に示す。なお500k SNPチップでのGWAS、900kチップでのGWAS、またそのDigiTag2システムでのreplicationは、いずれも東京大学人類遺伝学教室ならびに同SNPタイピングセンター(徳永勝士教授、西田奈央助教)のご協力のもとに進められたものである。



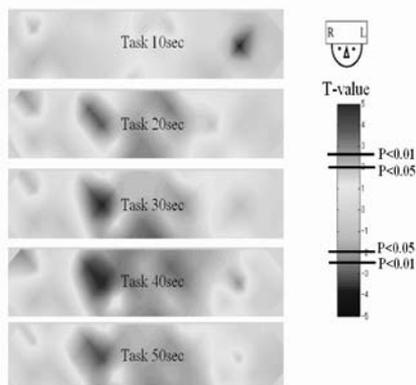
4. NIRSによる脳機能解析：中間表現型としての利用可能性

今後の疾患感受性遺伝子同定に役立つ中間表現型の確立を目的に、患者、対照、遺伝負因を有する患者、一卵性双生児不一致例において、MRI測定ならびに近赤外線スペクトロスコピー(NIRS)を用いた脳機能の評価を行った。

その結果、パニック障害患者では健常対照者と比較して、前頭前野(PFC)での脳機能低下を認め、このうち正中前部における低下は、一卵性双生児不一致例での所見から考えて、state dependentというよりもtrait dependentである可能性があり、中間表現型の有力な候補と考えられた。このことはパニック障害患者における家族歴の有無での比較からも支持された。



NIRSは臨床現場などでの施行が比較的容易であり、実際に今後、NIRSのデータを備えた対象を多数をリクルートすることで、疾患感受性遺伝子の同定にさらに役立つ研究の遂行が期待される。



家族歴(-) vs. 家族歴(+) t値のマップ

5. その他

上述のように、2008年より米国のNIMHを中心とする共同研究チームで始められたパニック障害の新たな大規模GWAS(pooling DNAを利用、Illumina社製550kチップを使用)に参加している。この結果が間もなく得られる見通しである。その結果から候補として考えられるSNPについても、二次サンプルでの確認を進める予定である。

また関節過伸展合併家系を含め、感受性遺伝子発見の手がかりとなる多発家系の発見とリクルートに努めた(岡崎、谷井、今村、染矢)。

また、パニック障害に関して不一致な一卵性双生児2組より株化した培養リンパ芽球を用いて、Affymetrix社GeneChip Hu133Aを用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。両ペア共通に患者で上昇していた遺伝子が15個、共通に患者で低下していた遺伝子が28個同定された。500KチップによるGWASの結果との比較では、重なりは見られなかったが、現在、900Kチップの結果との比較することにより、パニック障害の病態と関連する遺伝子を絞り込む予定である。

なお本グループを中心に日本人の双極性障害のGWASを行い、イオンチャネル関連遺伝子との関連を見出した。また、候補遺伝子(POLG)のリシーケンスを多数例で行い、結果を投稿準備中である。

<国内外での成果の位置づけ>

国際的にパニック障害の遺伝子研究は、アルツハイマー病、統合失調症、双極性障害に比較すると遅れている。しかし、まとまった表現型であり、社会的にも高率な発症、救急受診高頻度などにより医療費も少なくないことから、病態と根本的な治療法等への期待が大きい。実際の遺伝子研究は欧米が先行しているが、これまではいずれも小規模で、アジアでは韓国から発表された相関研究が最大の研究であった。今回本研究では、東京・名古屋での収集数約1,000例のほか、国内の他の研究施設から300例、韓国のサンプル300例を収集、パニック障害研究では現在世界最大規模のサンプルを擁するに至った。なお2008年10月のWorld Congress on Psychiatric Geneticsでは、米国のNIMHを中心に、北米、欧10余りの研究グループの協力で多様な民族からなる白人サンプルでのGWASの研究計画が発表された。この計画と比較しても、本研究で収集したパニック障害サンプルは、一民族のものとしては最も規模が大きい。なお我々は上述のように、この欧米のグループとの共同研究も進めているところである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

GWASとそのreplicationは、東大人類遺伝学教室・SNPタイピングセンターのご協力により無事進めてこられた。ただし諸々の事情から、900k SNPチップでのGWASのreplicationが2009年12月の時点では終了していない。このため、同定された疾患感受性遺伝子・多型の機能解析の着手にいたっていない。

<今後の課題、展望>

今後の課題は、2009年度末までに完了すべき作業も含めて以下の通りである。

1. 900k SNPチップの結果から選択した96 SNPの、2次サンプルでのreplication study (DigiTag2システムによる)を速やかに完了する。
2. NIMHとの共同研究で得られる候補SNPsについても2次サンプルでのreplicationを行う。

3. これらで同定されたSNPs、遺伝子の機能等についての実験を進めること。

4. NIRSによる所見 (e.g., 前頭内側部の機能低下) を中間表現型としたデータの収集・解析を開始・継続する。

5. 結果の論文化

(1) ①パニック障害不一致一卵性双生児の所見、②NIRSによる中間表現型の候補知見、③パニック障害200対200例の解析結果等を以下のように発表した。

(2) 今後、900K SNPチップとそのreplicationについての論文化を進める

<研究期間の全成果公表リスト>

1. 0902211616

Tanii H, Nishimura Y, Inoue K, Koshimizu H, Matsumoto R, Takami T, Hara N, Nishida A, Okada M, Kaiya H, Okazaki Y Asymmetry of prefrontal cortex activities and catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype in patients with panic disorder during a verbal fluency task: near infrared spectroscopy study. *Neurosci Lett*. 2009; 452: 63-67

2. 0902231951

Otowa T, Yoshida E, Yasuda S, Sugaya N, Nishimura Y, Inoue K, Tochigi M, Umekage T, Miyagawa T, Nishida N, Tokunaga K, Tanii H, Sasaki T, Kaiya H, Okazaki Y Genome-wide association study of panic disorder in the Japanese population. *J Hum Genet*. 2009; 54: 122-126

3. 0902211623

Nishimura Y, Tanii H, Hara N, Inoue K, Kaiya H, Nishida A, Okada M, Okazaki Y Relationship between the prefrontal function during a cognitive task and the severity of the symptoms in patients with panic disorder: a multi-channel NIRS study. *Psy Res. - Neuroimaging*, 172(2):168-172, 2009.

4. 0902211641

Nishimura Y, Tanii H, Hara N, Inoue K, Nishida A, Okada M, Kaiya H, Okazaki Y Specific panic attack symptoms in panic disorder patients with putative genetic factor. *Psy Clin Neurosci*, 63:251-252, 2009

5. 0902211658

Tanii H, Nishimura Y, Inoue K, Hara N, Nishida A, Okada M, Kaiya H, Okazaki Y Frontal lobe dysfunction in panic disorder: a comparison of multichannel near-infrared spectroscopy in monozygotic twins discordant for panic disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, in press

6. 0911161759

Otowa T, Shimada T, Kawamura Y, Liu X, Inoue K, Sugaya N, Minato T, Nakagami R, Tochigi M, Umekage T, Kasai K, Kato N, Tanii H, Okazaki Y, Kaiya H, Sasaki T. No association between the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and panic disorder in Japanese population. *J Hum Genet* 54(8):437-9, 2009.

7. 0911161807

Hattori E, Toyota T, Ishitsuka Y, Iwayama Y, Yamada K, Ujike H, Morita Y, Kodama M, Nakata K, Minabe Y, Nakamura K, Iwata Y, Takei N, Mori N, Naitoh H, Yamanouchi Y, Iwata N, Ozaki N, Kato T, Nishikawa T, Kashiwa A, Suzuki M, Shioe K, Shinohara M, Hirano M, Nanko S, Akahane A, Ueno M, Kaneko N, Watanabe Y, Someya T, Hashimoto K, Iyo M, Itokawa M, Arai M, Nankai M,

Inada T, Yoshida S, Kunugi H, Nakamura M, Iijima Y, Okazaki Y, Higuchi T, Yoshikawa T: Preliminary genome-wide association study of bipolar disorder in the Japanese population. *Neuropsychiatr Genet* 2009 Mar 3. [Epub ahead of print].

8. 0911161811

Arai M, Yuzawa H, Nohara I, Ohnishi T, Obata N, Iwayama Y, Haga S, Toyota T, Ujike H, Arai M, Ichikawa T, Tanaka Y, Furukawa A, Aikawa Y, Kuroda O, Niizato K, Izawa R, Nakamura K, Mori N, Matsuzawa D, Hashimoto K, Iyo M, Sora I, Matsushita M, Okazaki Y, Yoshikawa T, Miyata T, Itokawa M: Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* (in press).

9. 0911161933

Otowa T, Tanii H, Sugaya N, Yoshida E, Inoue K, Yasuda S, Shimada T, Kawamura Y, Tochigi M, Umekage T, Minato T, Miyagawa T, Nishida N, Tokunaga K, Okazaki Y, Kaiya H, Sasaki T, Replication of a genome-wide association study of panic disorder in a Japanese population. *J Hum Genet*, (in press)

<研究協力者>

貝谷久宣 (医療法人和楽会・パニック障害研究センター)

井上 顕 (藤田保健衛生大学)

西村幸香 (東京大学医学部、財団法人 精神神経科学振興財団)

梅景 正 (東京大学保健センター)

栃木 衛、音羽健司、河村代志也(東京大学大学院医学系研究科)

今村 明 (長崎大学医歯薬学総合研究科)

垣内千尋 (理化学研究所脳科学総合研究センター)

石渡みずほ (理化学研究所脳科学総合研究センター)

穂吉条太郎 (大分大学医学部)

清水栄司 (千葉大学大学院医学研究院)