

精神疾患の遺伝子探索

●岡崎 祐士¹⁾²⁾ ◆谷井 久志²⁾ ◆佐々木 司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³⁾ ◆功刀 浩⁸⁾

1) 財団法人東京大学医学研究機構東京精神医学総合研究所, 2) 三重大学大学院医学系研究科, 3) 東京大学保健センター, 4) 理化学研究所脳科学総合研究センター
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し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とし、他に統合失調症、双極性障害および自閉症について、それぞれ感受性遺伝子を探索・同定し、病態と創薬・治療法の手がかりを見いだすことを目的としている。

方法は、パニック障害についてはゲノム疫学研究（ゲノムワイドスクリーンによる連鎖不平衡解析、染色体微小異常スクリーニングと一卵性双生児不一致例のマイクロアレイによる遺伝子発現差異解析による候補遺伝子探索を行い、相関解析その他によって感受性遺伝子の同定を行う。なお、双生児法は研究者ら（Kakiuchi et al, Nature Genet 35: 171-175, 2003）が双極性障害関連遺伝子 XBP1 を発見した方法である。

<2007年度の研究の当初計画>

本年度の重点は、①昨年度実施した500KSNPsチップ（Affymetrix社製 GeneChip Human Mapping 500K Array Set）を用いて行ったパニック障害患者200人対対照者100人のゲノムワイドスクリーン（応用ゲノムタイピングセンター東大医学部人類遺伝学教室）に対照者100名のゲノムワイドスクリーンを追加、②そこで得られる候補遺伝子の多型すべてを配置したチップ DigTag 2（東大医学部人類遺伝学教室開発）により他のパニック障害600サンプル以上を用いた相関解析、④パニック障害不一致一卵性双生児の遺伝子発現差異解析、および⑤CGHアレイによる染色体微小異常スクリーニング、⑥脳画像によるパニック障害の中間表現型の検討、⑦パニック障害試料サンプリングの継続であった。これらは昨年と同様すでに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された手続きに従い、文書による説明と同意により行った

<2007年度の成果>

1. パニック障害患者の試料サンプリング（分担研究者：佐々木、谷井、岡崎、研究協力者：貝谷、井上、梅景、栃木）

赤坂クリニックと名古屋メンタルクリニックには、昨年と同じく、研究の説明と同意の取得、及び被検者には構造化面接、心理検査を行いながら実施した。このコーディネーターには臨床心理技術者をコーディネーターとして雇用したが昨年のように適切な人材が継続的に雇用できなかったこともあり、サンプリングは昨年までよりもスピードが落ちた。しかしパニック障害患者サンプルは、平成20年1月末日現在、赤坂クリニックと名古屋メンタルクリニック合わせて、900サンプルを超えた。昨年度現時点には770であったので、130サンプルを追加したことになる。今年度末までには1000サンプルを超え目標の1000サンプルの達成の見込みは確実である。臨床評価の遺り残しも少なからずあり、次年度のサンプリング体制が必要である。この他に、新潟大学13例、大分医科大学と千葉大学から約200例のサンプル協力が得られる予定である。韓国のパニック障害遺伝子研究者から協同研究の申し出があり、200例余のサンプル提供が確定されている。罹

患同胞例や2世代発症の家系など多発家系例も20以上株化保存している。CBGアレイ解析の対象として現在解析中である。なお、健常対照サンプルは500例が集積された

2. ゲノムワイド関連解析（岡崎、分担研究者：佐々木、谷井、研究協力者：梅景、栃木、音羽、および分担研究者：有波、吉川、功刀）：500K SNPチップの結果から以下の用雨量で絞り込みを行った。Genotype calling algorithmはBRLMM (Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis) GTYPE 4.1使用。Confidence score = 0.5で解析した。すなわち1. minor allele frequency >5%、2. Hardy-Weinberg平衡で $p > 0.1\%$ 、3. Call rateが患者・対照いずれにおいても >95%である。この条件を満たすSNP数はX染色体を除く490,032 SNPsのうち、253,902 SNPsであった（この数は、全ゲノムでの偶然による期待値=500,000 × 10⁻³ = 500個の約3倍）期待値より多い。それは連鎖不平衡で近位のSNPを別々に数えてしまっている可能性が1つ考えられる）。各p-valueのレベルで有意な結果が得られたSNP数は以下の通りである。

$p < 0.01$: 3,093 SNPs

$p < 0.001$: 380 SNPs

$p < 0.0001$: 49 SNPs

$p < 0.00001$: 20 SNPs

$P < 0.0001$ 以上の71SNPsのうち、32SNPsについては、現在すでにDigTag2により解析中であり、今年度内に結果が出る予定である。

3. パニック障害不一致一卵性双生児の網黒アレイ解析（分担研究者：加藤忠史、研究協力者：垣内、石渡、および今村）

2組についてマイクロアレイによる遺伝子発現差異の解析を実施した。2組のペアのため統計学的解析を用いることが出来ない、リンパ芽球mRNA発現量→培養条件等により変動しやすいという問題があるので、同じサンプル（ペア）に対し各5回の独立した実験を行った。培養リンパ芽球細胞を各サンプルについて5本の別チューブ由来でおこした（双生児のペアは同時に培養した）。おこしてから採取までの時間は揃えた。Hu133Aチップ（Affymetrix）によるDNAマイクロアレイにより発現差異を解析した（GenseSpring softwareを用いた）MAS5.0及びAffy(RMA)の2種類の補正及び正規化を行い、それぞれから得られた発現量データをmedianで補正、それぞれの組で半分以上presenceの遺伝子を対象とした。Non-Parametric、Parametric testを行い、どちらでも $p < 0.05$ のものを選択、さらにMAS5.0及びAffyともに $p < 0.05$ のものを選択し選られた遺伝子リストのうち2組で共通のもの、さらに方向性が同じもの（両ペアともに患者で上昇、あるいはその逆など）を最終的なリストとした。その結果、パニック障害患者で上昇していたのは15遺伝子、低下していたのは28遺伝子であった。マイクロビーズアレイによる遺伝子発現解析結果との比較照合を行っているところである。また、ゲノムワイドスクリーンの追加対照者100人を加えて得られる候補遺伝子の結果と比較対照し、絞り込み、今後の相関研究の候補遺伝子とする予定である。

長崎で発見した一卵性双生児自閉症不一致例ゲノムのチップに

よる SNPs 解析を行い、copy number variation(CNV) 解析ツールキット第3版 (CNAT3.0)を用いて分析したところ、4p16 と 9q34 の2箇所、自閉症罹患双生児に CNV を見出した。現在、同部位の解析、表現型への影響の有無の検討を開始している(本知見の発表は国際精神科遺伝学会(2006, イタリア)でベストポスター賞を受賞した)。この箇所の検索が今年度は、新たな DNA 試料が必要であるが、被検者のアクセスに時間がかかり、間に合わなかった。次年度は可能になる予定である。

4. CGHアレイによる染色体スクリーニング(分担研究者:松本、谷井、研究協力者:井上)

昨年度開発作成した 4.2K マイクロアレイの改良版 4.3K アレイによって解析を行った。これまでに少なくともパニック障害および他の機能性精神疾患が家族に2人あるいはそれ以上認められるパニック障害家系例 132 例から検体収集が完了した(名古屋メンタルクリニックより 130 例、三重大学より 2 例)。全ての検体から FISH 検証用細胞ペレットならびにゲノム DNA 抽出が完了している。これまでの 24 例の解析では、パニック障害患者 1 例の染色体 17 にコピー数異常と重複、他の患者の染色体 13 に欠失を見出している。これら異常の疑われる部位を FISH あるいは定量 PCR で検証中である。

(5) 生理学的中間表現型の検討(分担研究者:谷井、染矢。研究協力者:西村、梶木、横山、塩入)平成 17 年度の検討で、5%程度の CO₂ 吸入への反応が感度・特異度が相対的に優れていると判断され、倫理委員会の承認のもと 3 例のパニック障害患者から同意を得たが、病状が不安定のため実施に至っていない。したがって、このパニック発作を誘発することによる中間表現型の確認法は、同意の取得率も高くなく、実現が困難と考えられるので、NIRS などの他の方法への変更が妥当と判断した。

そこで、一卵性双生児パニック障害不一致男性ペアに NIRS 検査を行った。その結果、前頭葉内側部の言語流暢課題による脳血流賦活は、2人とも低下していたが、前頭葉外側部は、パニック障害罹患患者では賦活がやはり低下していたが、非罹患双生児では賦活が認められた。このことから、前頭葉内側部はパニック障害の形質的な所見であり、外側部はじ状態的な所見であると考えられる。ケースコントロール研究で、西村、谷井、岡崎ら先に 100 例以上のパニック障害患者の言語流暢課題による前頭葉賦活の NIRS 所見を得ているが、パニック障害家族歴がある患者群は、家族歴のない患者群に比較して、前頭葉内側部の賦活が有意に悪かった。これらの知見から、前頭葉内側部の賦活障害が、パニック障害負因の表現型である可能性が高い。また、前頭葉賦活障害の時間経過パターンに特徴がある可能性があり、次年度はその点の検討も加える予定である。

<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が、パニック発作という明瞭な症状を有する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。パニック障害の遺伝子研究も欧米が先行したが、相関研究については韓国の研究者の相関研究がアジアから報告された。サンプル数も 200 例以上あり、最も大きい標本の一つである。今までの大部分の標本数は 300 例以下と小さい。昨年度のサンプリングで、すでに世界最大の標本数となっていたが、今年度は 900 に達したので、文字通り世界最大のパニック障害 DNA 標本数となった。年度末までには、1000 例の目標超過達成が確実である。これは、パニック障害専門診療施設存在と協力(貝谷)が大きい。また、パニック障害不一致一卵性双生児 2 組、および近縁の社会不安障害不一致一卵性双生児の発見も世界では初めてである(投稿中)。

500kSNPs チップによるゲノムワイドスキャンも世界で初めて実施されたものであり、今年度の DigTag 2 による相関解析の結果は期待が大きい。ただちに出版する予定である。一卵性双生児不一致例の遺伝子発現再解析による発現増加/低下遺伝子との照合によって、より重要な候補遺伝子が絞り込まれる可能性がある。また自閉症不一致一卵性双生児ゲノムの CNV 所見も研究代表者らのオリジナルな方法によるものであり、パニック障害とともに有望な所見である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

基本的に達成できなかったことはない。ただ、中間表現型の検討で、パニック発作誘発法による判定は、同意を得られることが少ないことが分かった。今年度の検討で、NIRS による脳血流賦活を中間表現型としていくのは妥当と考えるにいたったので、変更することにした。

昨年にも討論したが、健常対象の試料サンプリングが以外に困難である。これは神経疾患等との共用が、領域代表のイニシアチブで実現しそうであり、それによって解決できると期待される。

また、500K、さらに 1000K チップのように益々稠密度を増す DNA マーカーによって健常群との間に有意な差が認められた遺伝子をどこまで拾うかの基準がない。有意水準のみでは各遺伝子の関与の度合いを評価できないと思われるが、現実的な基準を設定せざるを得ない。引き続き検討が必要である(徳永、吉川、有波、功刀、岡崎)。

<今後の課題>

1. 今後の課題

- (1) サンプリングの追加、目標(1000)の超過達成
- (2) パニック障害感受性候補遺伝子の絞込み
- ①パニック障害200対健常対照200の500KSNPsチップ解析によるパニック障害候補遺伝子リストの二次サンプルによる相関解析等(DigTag2チップおよび個別)
- ②パニック障害不一致一卵性双生児リンパ芽球における遺伝子発現解析と家族例の CGH アレイによる染色体微小構造異常のスクリーニングからの候補遺伝子を上記に追加する。
- (3) 自閉症不一致双生児法からの CNV による候補遺伝子の抽出

2. 学会発表及び論文文化

- (1) 学会:2008International Conference on Pharmacogenomics (Busan, April 9-12th, 2008)、2nd Asia-Pacific WFSBP Regional Meeting(Toyama, September11-13,2008)、World Congress of Psychiatry (Prague, September 20-25,2008)
- (2) 論文発表:①パニック障害不一致一卵性双生児の所見、②パニック障害 200 対 200 例の解析結果、③サブサンプルの相関研究結果などを 18 年度中に発表できる予定である。

<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(名古屋市立大学医学部公衆衛生学講座)
西村幸香(三重大学大学院医学系研究科)
梶木直美(三重大学大学院医学系研究科)
横山知加(三重大学大学院医学系研究科)
梅景 正(東京大学保健センター)
栃木 衛・音羽健司(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)