

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している。

中心とな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規模であった。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。

＜2008年度の研究経過＞

2007年度に引き続き、下記の研究計画に沿って、サンプリングを継続した。これらは、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にて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ている。

1. 関連解析用パニック障害患者試料の収集

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）、及び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、音羽健司協力）、三重大（谷井担当）、千葉大（清水協力）等でパニック障害患者の試料収集をさらに進めた。

なお、その他の疾患の試料は、両クリニック及び分担研究者所属及び関連の施設で収集し（加藤忠史、功刀浩、有波忠雄、吉川武男、染矢俊幸）、健常対照者についても研究者及び施設関係者に協力を得て試料を収集した。

2. 臨床評価の実施（佐々木、岡崎）

精神疾患簡易構造化面接（MINI）によるDSM-IV診断の他、ウエクスラー成人用知能検査改訂WAIS-R短縮版知能検査、パニック障害重症度評価（P & A尺度）、うつ病自己質問紙（SDS）気質性格評価質問紙NEO-PI-R等を行った。（このために臨床心理技術者を雇用している）

3. 染色体スクリーニング（松本直通）

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）。

4. 精神疾患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を行った（加藤、岡崎）

（1）パニック障害、統合失調症、双極性障害、自閉症等の精神疾患不一致一卵性双生児の発見（診断はMINIによるDSM-IV、パニック障害双生については、上記と同じ臨床評価）と末梢血を収集（岡崎、染矢、今村）。一部を株化保存した（加藤）。

（2）差異のあった遺伝子のRT-PCRによる発現解析・多型検索による疾患感受性遺伝子候補検索（加藤）

5. 全ゲノム関連解析（GWAS）の進展

前年度までにパニック障害の患者サンプルのうち200例、健常対照200例（性、年齢、出身地域をmatch）について、500k

SNPチップによるgenome-wide association studyを東大SNPタイプングセンター（徳永研究室）で実施した。この結果有意差の得られたSNPについて、DigiTag2法を用いて他の患者一対照サンプルでの再現性の検討を行った。関連可能性の示唆されたもののうち既知の遺伝子上に位置するSNPについては、遺伝子上の他のSNPの解析を進めた。なお今年度後半は900KチップによるGWASの準備を進めている。また今年度は海外でもようやく、米国のNIMHを中心とする共同研究チームによるパニック障害の大規模GWAS（pooling DNAを利用して、Illuminaチップを使用）が開始されたが、このチームと何らかの共同研究を進めるべく、現在NIMHグループと緊密な連絡を進めている。

6. パニック障害の中間表現型評価の検討及び特殊家系の発見

GWASを補助する目的で行った。1つは、病態生理学的中間表現型の確立のため、近赤外線分光顕微鏡を利用した前頭機能評価を中心に、脳画像所見の中間表現型としての利用価値の評価を継続して行った（谷井、岡崎）。

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）。

＜これまでの研究成果＞

1. パニック障害患者の試料サンプリング

（1）今年度、研究の説明と同意の取得、及び構造化面接、心理検査を担当する臨床心理技術者の交代があり赤坂では別の人材を雇用できたが、名古屋メンタルクリニックでは適切な人材が見つけれなかった。このことと、各クリニック利用患者のリクルートがやや飽和状態に近づきつつあることから、両クリニックでのサンプリングスピードは、2007年以前に比較すると残念ながらややダウンした。

患者サンプル：2008年末において、東京で約450例、名古屋・三重で約550例、合計1000例が収集された。この他、大分大学、新潟大学、千葉大学などの医療・研究機関から協力が得られ、約200サンプルが提供され、韓国のパニック障害遺伝子研究者との協同研究により315例のサンプルが利用可能となっている。

なお、罹患同胞例や2世代発症の家系など多発家系例も20以上発見・株化し、CGHアレイ解析（松本担当）を行った。

（2）健常対照サンプル：佐々木らは2008年度に新たに500例をリクルートし現在1,100サンプルを有している。岡崎らは約200サンプルを有している。岡崎らは別に爪DNAをすでに100人以上有している。これらの内、500k SNPチップで使用した200人分以外が、その後の検討に利用可能である。

（3）一卵性双生児不一致例における検討：

パニック障害不一致一卵性双生児2組を発見（長崎1組、名古屋1組）、他に関連疾患である社会不安障害不一致一卵性双生児1組を見出し、説明による同意を得て、株化保存し、このうち1組についてはマイクロビーズアレイによる遺伝子発現差異の解析を実施し、もう1組については株化が終了し、マイクロビーズアレイによる遺伝子発現解析を行っている（加藤、岡崎）。パニック障害2組については中間表現型評価としてMRIと光トポグラフィを実施し（岡崎、谷井）、罹患双生児における前頭葉機能低下が示めされた（Tanii et al. in press）。また家族歴のあるパニック障害患者では前頭葉の内側部で[oxy-Hb]の賦活が低下してい

た。MRIによる脳画像解析（VBM法による）では、罹患者における左上前頭回灰白質の萎縮、が認められた。また双生児ペアでは健常者に比べて右海馬傍回を中心とした領域での萎縮が認められた。これらの所見は、将来中間表現型としてさらに利用可能性を検討する価値があることを示している。

2. 500k SNPs チップによる検討：

昨年度までに行ったパニック障害と健常対照各200例の500KSNPsチップによるゲノムスキャン（「応用ゲノム」領域タイピングセンター（東大医学部人類遺伝学教室）で実施）で得られた数十SNPを候補として得た。このうちdata cleaningとallele p値の結果から絞り込んだ32SNPについて約560のcase-controlを対象に、徳永らの開発したDigiTag2法を用いてreplication studyを行い、いくつかのSNPでnominal p-valueで5%程度の有意水準が得られた。このうち既知の遺伝子上にある2SNPにつき、遺伝子上の他の多型についての解析を進めたが、現段階では十分な結果は得られていない。また今年度後半は、パニック障害は900KチップでのGWASの対象疾患として選ばれたため、約600のcase-controlを対象にサンプルの準備を行い、人類遺伝学教室（同上タイピングセンター）に依頼して解析を進めて頂いている。

3. Array-CGHによる解析：

FISH検証済みBAC4234クロンを搭載した全ゲノムマイクロアレイを用いて、パニック障害症例42例にCGHを行った。アレイCGHで異常が疑われる231クロンの内、CNVデータベースに多型登録がない58クロンのFISHを個別の症例に行った（松本）。この結果、明らかな重複1カ所と欠失1カ所をそれぞれ2例ずつにおいて検出し、追加FISHを行い重複領域および欠失領域を同定した。なお同じ方法で検討した統合失調症と比較してみると、重複、欠損などの変異はパニック障害では少なく、精神疾患の中でもこれらの変異の役割に大分違いがある可能性が示唆された。

<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、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ある（罹患者300例以下）。アジアでは韓国から発表された相関研究（患者数200超）が、主要なものとしてはほぼ唯一のものである。今回本研究では、東京・名古屋での収集数920例（近々1,000例に達する予定）のほか、国内の他の研究施設から300例、韓国のサンプル300例が検討可能であり、パニック障害研究では現在世界最大規模（日本人で1,300、アジア人で1,600）である。これまでパニック障害の大規模GWASは国内、国外ともに報告がなかったが、初めての報告を行うことができた（Otowa et al. in press）。2008年10月に行われたWorld Congress on Psychiatric Geneticsでは、米国のNIMHを中心に、北米、ヨーロッパの10余りの研究グループが協力して様々な民族からなる白人サンプルを用いたGWASを施行する計画が発表された。このグループとの共同研究も開始している。なおこの計画と比較してみても、本研究で収集したパニック障害サンプルは、1つの民族のものとしては突出して規模が大きいことが明らかとなった。

また、パニック障害不一致一卵性双生児2組の発見は、世界で全く報告がないので、この解析結果を世界で初めて報告した。なお、世界最高精度のBACマイクロアレイを完成したので、15q24-q26重複と連鎖するパニック障害家系例の報告（Cell, 106: 367-79, 2001）などから示唆される染色体微細構造異常とパニック障害の関連についても高精度の検出が可能となった。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

リクルート実務担当者の交代、リクルート済み当事者の飽和傾向など諸々の要因が重なり、今年度は患者サンプルリクルートの

スピードが予定より低下したことは否定できない。今後この問題を改善して、従前のリクルートスピードを回復したい。なお本研究計画に限らないが、疾患遺伝子探索研究における健常対照者の定義には難しい点がある。面接による主要精神障害罹患歴の除外は出来る限り行っており、また多くの対照でNEO-PIR等によるパーソナリティ評価を行っているが、不十分な面があることは否定できない。医療機関のスタッフなどに対照が偏りがちなことも注意を要する。なお2007年度は、一般社会人を対象にパニック障害患者と同様にMINIによる精神障害罹患歴の除外を行って500例の対照をリクルートできたが（佐々木）、今後は同様の方法でのリクルートを継続したい。また500Kチップの結果についてはdata cleaningをどのレベルで行うか、またどのレベルの優位水準まで含めるかなど、得られたデータを扱う基準設定が難しい点である。これについても今後さらに検討したい。

<今後の課題>

1. 2008年度末までの課題

最大の課題の1つはサンプルの保有数をさらに増加させることである。専門クリニックでのリクルートに加えて、共同研究先である千葉大学、大分大学、新潟大学等で同様の基準でリクルートしたサンプルを集めることも重要である。これらを合わせて日本人PDサンプル1300例以上としたい。2009年度には、900K GWASで検討する600を除く700例でreplication studyを行いたい。また同じ東アジア人である韓国人のPDサンプル300例以上も利用できる状態となっているので、これについても同様の検討を行い、replication studyとしては「東アジア人」で1,000例以上のデータを示したい。

今後これらの結果、感受性遺伝子多型が同定できれば、2009年度にはその機能解析を開始する（加藤、功刀、有波ら）。

2. 学会発表及び論文

(1) 学会：日本神経化学会（2008年9月）、国際精神科遺伝学（2008年10月、大阪）等で発表した。

(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例の解析結果を以下のように発表した。また、③サブサンプルの相関研究結果については20年度内に発表する予定である。

<成果公表リスト>

Otowa T, Miyagawa T, Nishida N, Tokunaga K, Tani H, Sasaki T, Kaiya H, Okazaki Y. Genome-wide association study of panic disorder in the Japanese population. J Hum Genet (in press).

Tani 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 Neurosciences, (in press)

Nishimura Y, Tani 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. Psychiatry Clin Neurosciences (in press)

Nishimura Y, Tani 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. Psychiatry Research - Neuroimaging (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（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）

渡みずほ（理化学研究所脳科学総合研究センター）