

ローカスおよびゲノムワイド関連解析による統合失調症の分子基盤の解明

●服巻 保幸

九州大学生体防御医学研究所

<研究の目的と進め方>

統合失調症は多因子病のなかでも遺伝要因の関与が高い疾患の一つであり、同胞相対リスク (λ_s) は 10、遺伝率は約 80% と推定されている。また集団にかかわらず約 1% と高い頻度で見られる。従ってその本態の解明には疾患感受性遺伝子の同定が必須である。統合失調症の発症に関わる遺伝子群の同定を、ローカスおよびゲノムワイド関連解析により行い、診断・治療・予防法の開発に資することを目的としている。本研究では、これまでゲノムワイド罹患同胞対解析の結果、効果の弱い遺伝子 ($\lambda_s < 3.0$) の関与が考えられ関連解析が有利であることが判明したことを勘案し、関連解析を基盤とした 2 つのアプローチと機能アプローチの 3 つのアプローチをとり、新たな統合失調症の感受性遺伝子の同定へと迫ることが特色である。具体的には (1) ローカスワイド関連解析: i) グルタミン酸伝達系に関わるグルタミン酸受容体遺伝子群、グルタミン酸トランスポーター遺伝子群や、グルタミン酸の代謝に関わる酵素遺伝子群を対象とした関連解析を行う。ii) NMDA 受容体のアンタゴニストであり、統合失調症様症状を惹起することが知られている PCP を投与したラットの中枢神経で発現変化を来す遺伝子をマイクロアレイにより検索し、これを対象とした関連解析を行う。(2) ゲノムワイド関連解析: 上記モデルに基づかない新たな枠組みに属する感受性遺伝子の同定を目指し、全ゲノムをカバーする約 3 万個のマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド関連解析を行う。(3) 細胞・個体レベルでの機能解析: 機能 SNP についての細胞もしくは当該遺伝子の変異マウスを用いた解析による機能面での検証を行う。

<2008 年度の研究の当初計画>

(1) ローカスワイド関連解析: i) グルタミン酸伝達系関連遺伝子群の関連解析: 対象遺伝子領域につき HapMap の日本人のデータから、tag Picker により、 $MAF > 0.1$ および $r^2 > 0.8$ の条件で SNP を選択し、ローカスワイド関連解析を行う。対象遺伝子であるが、グルタミン酸受容体遺伝子群やグルタミン酸トランスポーター遺伝子群に加えて、グルタミン酸代謝経路においてグルタミン酸に直結するグルタミンデカルボキシラーゼ遺伝子 (*GAD2*)、グルタミン合成酵素遺伝子 (*GLUL*) の解析を進める。ii) PCP 応答遺伝子群の関連解析: 統合失調症様症状を惹起する NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストである PCP 投与ラットの脳の 5 部位 (内側前頭皮質、側坐核、線条体、海馬、後帯状皮質) から、マイクロアレイを用いて発現に変化を来す遺伝子を見出している (発現亢進 71 個、発現低下 31 個)。その中から定量的 RT-PCR 法により 2 倍以上の変化を来す 10 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子について上記手法によりローカスワイド関連解析を行う。

(2) ゲノムワイド関連解析: ゲノムワイドな 30,393 個のマイクロサテライトマーカーを用いた関連解析を続行する。3 次スクリー

ニングで選択されたマーカーについて、1 次～3 次スクリーニング間における有意差が見られるアレルの一致度等を考慮し、さらにマーカーを絞り込む。このようにして選択したマーカー周辺の tag SNP につきタイピングを行い有意差が見られる SNP を選別する。確認のために大規模サンプルによる解析を行う。

(3) 細胞および個体を用いた機能解析: 先に関連を認めた *GRIA4* についてノックアウトマウスを作出した。C57BL/6 マウスとかけ合わせ、6 世代戻し交配を行い、運動、感覚、認知、生理、社会行動についての解析を完了する。一方 *GRM3* についてはコンディショナルターゲティング用ベクターによる ES 細胞のターゲティングが終了しており、ノックアウトマウス作出を行う。

<2008 年度の成果>

(1) ローカスワイド関連解析: i) グルタミン酸伝達系遺伝子群を対象に解析を進めている。中性アミノ酸トランスポーター遺伝子 *SLC1A4*, *SLC1A5*、およびグリシントランスポーター遺伝子 *SLC6A5*, *SLC6A9* について関連解析を行い、*SLC6A5* について関連を見出した。*GAD2*、および *GLUL* について同様な解析を行ったが、関連は見いだせなかった。またこれらのグルタミン酸代謝関連遺伝子と、6 個のグルタミン酸受容体遺伝子 *GRIA4*, *GRIN2D*, *GRIK3*, *GRIK4*, *GRIK5*, *GRM3* との遺伝子間相互作用の統合失調症発症への関与を MDR (multifactor dimensionality reduction method) 法で解析したが、有意な相互作用は見られなかった。グルタミン酸受容体遺伝子 *GRM4* および *GRM7* について関連解析を行い、*GRM7* について関連を認めた。ii) PCP 投与ラットの脳の 5 部位から、マイクロアレイによるスクリーニング後、定量的 RT-PCR 法により、2 倍以上の変化を来すことを確認した 10 個の遺伝子について関連解析を行った。6 個につき終了し、そのうちの 4 個に関連を見出した。これらにつき大規模サンプル (約 2,450 ペア) による確認のための関連解析を行い、2 つの遺伝子について関連を見出した。

(2) ゲノムワイド関連解析: 約 3 万個のマイクロサテライトマーカーにつき 1 次、2 次および 3 次スクリーニングを行い、マーカー 352 個 (34.7%) に有意差を認めた。それぞれのマーカーにつき各スクリーニング毎に有意差の見られるアレルの再現性を検討し、マーカー 59 個を選出した。さらにその周辺約 200 kb の領域の 1,564 個の tag SNP について全スクリーニングサンプル約 450 ペアにより関連解析を行った。その結果、1,349 個につきデータが得られ、うち 167 個の SNP に有意差を認めた。この中から 31 個の SNP を選択し、独立の 2,450 ペアのサンプルにつき解析を行ったところ、1 個の SNP で有意差が見られた。さらに周辺の 6 個の SNP のタイピングを全サンプル約 2,900 ペアで行ったところ、先に有意差が見いだされた *SLC23A3* の 5' 上流領域の SNP とともに、*SLC23A3* の 5' 側に位置している *C2orf24* の 3' 下流、およびそのコード領域内の SNP にも有意差が見られた。両遺伝子とも中枢神経系

での発現が観察されている。*SLC23A3*はsolute carrier family 23, member 3をコードしており、ヌクレオベーストランスポーターの機能を持つ。*C2orf24*は機能未知の410アミノ酸をコードする遺伝子である。

(3) **個体を用いた機能解析**: i) 先に関連を報告し作出したGluR4ノックアウトマウスのC57BL/6マウスへの戻し交配システムを用いて行動解析を行った。その結果、統合失調症のエンドフェノタイプであるPrepulse inhibition(PPI)の障害が見られた。また変異型マウスは野生型マウスより早いタイムコースでNMDA型受容体の選択的人工アンタゴニストMK-801による影響があらわれ、MK-801に対する感受性が增大していることがわかった。以上から*GRIA4*が統合失調症の病態の一端を担っている可能性が考えられた。

ii) mGluR3 ノックアウトマウスに関しては、キメラマウスからノックアウトマウスの作出に成功した。現在発現解析とともに、行動解析に向け戻し交配を行っている。

<国内外での成果の位置づけ>

(1) **ローカスワイド関連解析**: グルタミン酸トランスポーター遺伝子群の系統的な解析を行ったのは、国内外で我々のグループのみである。*SLC1A6*についての関連解析の報告は我々が最初である。またPCP応答遺伝子群についての系統的な関連解析もこれまで例を見ない。

(2) **ゲノムワイド関連解析**: 今回用いたような約3万個からなる高密度なマイクロサテライトマーカーを用いた統合失調症のゲノムワイド関連解析 (GWAS) はこれまで報告がない。ただし444個のマイクロサテライトマーカーを用いて家族サンプルについて伝達不平衡解析を行い、11q11-13に関連を見いだしたYamadaらの報告はある(2004)。しかし今回の解析で有意差がみられたSNPは2q35に位置するため、これには一致しない。一方、最近報告されたSNPを用いたゲノムワイド関連解析の報告においては、上記*SLC23A3*や*C2orf24*の記載はない (Sullivan *et al.*, 2008; O'Donovan *et al.*, 2008)。また統合失調症関連遺伝子のデータベースであるSchizophrenia Research Forumのデータベースにおいても、本遺伝子はリストされていない。従って、今回見いだされた遺伝子は、新たな疾患感受性遺伝子候補と考えられる。

(3) **個体を用いた機能解析**: GluR4ノックアウトマウスの行動異常についてはまだ報告が無い。GluR4が他のAMPA受容体サブタイプのシナプス膜上へのリクルートに関与していることが報告されており、今回の行動異常は興味深い結果である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

(1) **ローカスワイド関連解析**: 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のシナジェステイックな効果による可能性も考えられる。エピスタシス効果の統計学的な評価や、効率的なシーケンシング法の導入が必要である。

(2) **ゲノムワイド関連解析**: マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド関連解析では、有意差のある遺伝子が大規模サンプルを用いた解析後2個のみであった。3回のスクリーニングのため検出力の低下を来している可能性もあるが、マーカーを選択する際のバイアスの問題も残されている。

<今後の課題>

(1) **ローカスワイド関連解析**: PCP応答遺伝子に関しては、残り

の遺伝子について解析を進める。また関連が見られた遺伝子については機能SNPの検索を行う。

(2) **ゲノムワイド関連解析**: 今回の解析において関連が認められた*C2orf24*の発現や機能についての解析を行う。また今回の1,349個のSNPのタイピングデータから大規模サンプルによる確認関連解析への選択に際しては、*p*値や、複数の検定での有意差を考慮して31個を選択した。今後は、これから集積されるSNPによるゲノムワイド関連解析のデータを参考に、今回の167個のSNPから確認解析のための再選択を行うとともに、3次スクリーニング後のマイクロサテライトマーカー選択の再検討も試みる。

(3) **個体を用いた機能解析**: GluR4変異マウスのシナプトソームにおけるグルタミン酸サブタイプの分布を解析する。また本ノックアウトマウスは、統合失調症の患者にも見られるNMDA受容体アンタゴニストに対する感受性亢進がみられた。MK801投与後の発現プロファイリングを行い、野生型との比較やパスウェイ解析から、統合失調症の分子病態に迫る。さらに*GRM3*についてはノックアウトマウスが得られたため、戻し交配を行い行動解析を行う。

<成果公表リスト>

(1) 0806220026 Deng, X., Sagata, N., Takeuchi, N, Tanaka, M Takeuchi, N., Rachi, N., Ninomiya, H., Iwata, N., Ozaki, O., Shibata, H., and Fukumaki, Y.: Association study of polymorphisms in the neutral amino acid transporter genes *SLC1A4*, *SLC1A5* and the glycine transporter genes *SLC6A5*, *SLC6A9* with schizophrenia. *BMC Psychiatry* 8:58(9 pages), 2008.

(2) 0806242141 Arai, K., Shibata, H., Sakai, M., Ninomiya, H., Iwata, N., Ozaki, N., and Fukumaki, Y.: Association analysis of the glutamic acid decarboxylase 2 and the glutamine synthetase genes (*GAD2*, *GLUL*) with schizophrenia. *Psychiatr. Genet.* 19:6-13, 2009.

(3) 0801192318 Shibata, H., Tani, A., Chikuhara, T., Kikuta, R., Sakai, M., Ninomiya, H., Tashiro, N., Iwata, N., Ozaki, N., and Fukumaki, Y.: Association study of polymorphisms in the group III metabotropic glutamate receptor genes, *GRM4* and *GRM7*, with schizophrenia. *Psychiatry Res.* in press, 2009.

○ゲノムワイド関連解析については、九州大学生体防御医学研究所の山本 健博士、東海大学医学部の猪子 英俊博士、および筑波大学大学院人間総合科学研究科の有波 忠雄博士との共同研究である。