

# 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>

集団にかかわらず約1%の頻度で見られる統合失調症は、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( $\lambda_s$ )は10、遺伝率は約80%と推定されている。従ってその本態の解明には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。統合失調症に関しては、過去多数の遺伝子が疾患感受性遺伝子として報告されては、否定されてきた。しかし2002年になりアイスランドの集団で明らかにされたニューレグリン遺伝子(*NRG1*)の報告を皮切りに再現性の高い遺伝子の報告がなされた。これらの多くはいずれもグルタミン酸伝達系に関与していることから、統合失調症のグルタミン酸伝達異常モデルの信憑性が富に高まった。本研究では、このモデルをさらに発展させるべく、また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。(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および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) 罹患同胞対解析で連鎖傾向のある11領域を見出したが、その中で海外からの報告で再現性の高い5q33.1についてローカスワイド関連解析を行う。iii) 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脳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疾患感受性遺伝子の同定を目指し、全ゲノムをカバーする約30,000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。

## <2007年度の研究の当初計画>

(1) ローカスワイド関連解析：i) グルタミン酸代謝関連酵素遺伝子群をとりあげた関連解析を行う。その手法であるが、統計解析に十分な頻度(>0.1)をもつSNPを対象遺伝子領域全体にわたってHapMapの連鎖不平衡地図を参考に設定する。近接したSNPのタイピングの結果をハプロタイプ関連解析にも用いることで検出力の向上を図る(500ペアの検体で疾患感受性アレル頻度0.1の場合の検出力0.95以上)。十分な連鎖不平衡が見られない場合、さらにcommon SNPを追加して解析の精度を高める。設定した全ての

SNPについて日本人統合失調症罹患群と健常群サンプルについてタイピングを行い、各SNP単独での疾患との関連を検討する。さらに複数SNPのタイピングの結果を統合して、ハプロタイプ関連解析を、EHプログラム等を用いて行う。グルタミン酸代謝に関わる遺伝子群のなかでも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(*GAD1*, *GAD2*)、グルタミン酸アンモニリアーゼ(*GLUL*)、グルタミナーゼ(*GLS*)について解析を行う。ii) PCP投与ラットの大脳5部位から、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た(発現亢進71個、発現低下31個)。その中で2.0倍以上の変化を来す10個の遺伝子を定量的RT-PCR法により確認している。これらの遺伝子について関連解析を開始しているが、これを進め疾患感受性遺伝子の同定を目指す。

(2) ゲノムワイド関連解析：ゲノム上約100 kbごとに選択された約30,000個のマイクロサテライトマーカーにつき、157症例群および157健常群をそれぞれプールの1次サンプル、150サンプルをプールの2次サンプルを用いた関連解析、さらに同数サンプルをプールの3次サンプルを用いたスクリーニングを終了した。有意差が見られるマーカー付近のSNPを用いた1~3次サンプルについてタイピングを行い、感受性領域を絞り込む。

(3) 細胞および個体を用いた機能解析：先に関連が認められた*GRIA4*についてノックアウトマウスを単離した。C57BL/6系マウスとの戻し交配を終了したマウスを用いて行動解析を行う。同様に関連を認めた*GRM3*のノックアウトマウスの作出を行う。

## <2007年度の成果>

(1) ローカスワイド関連解析：i) 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、グルタミン酸代謝関連酵素遺伝子群について：グルタミン酸受容体遺伝子群のなかでカイニン酸受容体7型、KA1型、KA2型各遺伝子(*GRIK3*, *GRIK4*, *GRIK5*)につき連鎖不平衡を考慮し選択したSNPを用いて関連解析を行った。*GRIK3*, *GRIK4*, *GRIK5*については関連を認めなかった。グルタミン酸トランスポーター遺伝子EAAT3, EAAT1, EAAT4(*SLC1A1*, *SLC1A3*, *SLC1A6*)について同様の関連解析を行い、*SLC1A6*についてハプロタイプで関連を認めた。*GAD1*について同様な解析を行い、ハプロタイプにより関連を認めた。ii) PCR応答遺伝子群について：PCP投与ラットの大脳5部位から、マイクロアレイおよび定量RT-PCRにより選別してきた発現に変化を来す10個の遺伝子について、上記と同様の手法で関連解析を進め、6個の遺伝子について解析を終了した。そのうち2個の遺伝子に関連を見出した。

(2) ゲノムワイド関連解析：1次スクリーニングを終了し情報が得られた28,082個マーカー中2,966個につき有意差が認められた。これらのマーカーについて2次サンプルを用いたスクリーニング

を行い、2,894個のマーカー中1,019個で有意差が見られた。次に3次サンプルを用いた解析で1,014個のマーカー中352個(34.7%)につき有意差を認めた。これらの領域について、各スクリーニング間で有意差の見えるアレルの再現性の確認等を行い59マーカーを選択した。これらのマーカーを中心に200 kbの領域におけるMAF > 0.1,  $r^2 > 0.8$ のTag SNPを合計1,564個選びタイピングを行った。その結果115個のSNPに有意差が認められた。うち86個が遺伝子内に位置していた。この中で有意差を示すSNPが集中している遺伝子を中心に、JIRAS (Japanese Genetics Initiative for Replicating Association of Schizophrenia) のサンプル (約2000ペア) を用いて確認の関連解析を行う。

(3) 個体を用いた機能解析：先に関連を報告し作出した*GRIA4*ノックアウトマウスについて、昨年度の電気生理学的解析に引き続き、C57BL/6系マウスへの戻し交配を続け6世代まで終了し現在行動解析を実施中である。統合失調症のエンドフェノタイプとして指摘されているPrepulse Inhibitionの障害が、本変異マウスでも見られている。一方*GRM3*については*Cre-Lox*系を用いたコンディショナルマウスの作出を試みているが、当該領域に*loxP*配列を有するマウスを作出した。

#### <国内外での成果の位置づけ>

(1) ローカスワイド関連解析：グルタミン酸受容体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。その結果複数の遺伝子に関連を見出し、海外誌からReview articleの依頼がありすでに発表した(Fukumaki & Shibata, 2004)。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：ゲノムワイドに分布する約30,000個のマイクロサテライトマーカーを用いて解析を行っている。まだこのような解析は統合失調症において報告されておらず、新たな疾患感受性遺伝子の同定が期待できる。

(3) 個体を用いた機能解析：*GRIA4*ノックアウトマウスについてはまだ報告が無い。また本遺伝子のコードするGluR4が他のAMPA受容体サブタイプの出生後のシナプス形成における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、興味深い結果が期待出来る。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

(1) グルタミン酸受容体遺伝子群の関連解析では遺伝子のサイズが比較的大きいこと、頻度の高いSNPの同定に予想外の時間がかかったが、HapMapのデータを活用し、ほぼ終了した。論文作成中である。

(2) 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、効率的なリシークエンシング法の導入が必要である。

#### <今後の課題>

(1) ローカスワイド関連解析：i)グルタミン酸トランスポーター遺伝子に加え、グルタミン酸やセリンのトランスポートにも働く中性アミノ酸トランスポーター遺伝子*SLC1A4*, *SLC1A5*、およびNMDA受容体のモジュレーターであるグリシンの取り込み関わるグリシントランスポーター遺伝子*SLC6A5*, *SLC6A9*の関連解析を行う。さらにグルタミン酸代謝関連遺伝子として*GLUL*, *GLS*の解

析を進める。ii) PCP応答遺伝子に関しては、残り4個の遺伝子について解析を進める。

(2) 関連解析を行ったグルタミン酸伝達関連の遺伝子間の相互作用をMDRで評価し、統合失調症病態に関わっているパスウェイを検討する。

(3) ゲノムワイド関連解析：1次～3次サンプルを用いたSNPによるタイピングを終了し、有意マーカーを選別する。これらにつき、ラージスケールの4次サンプルを用いた確認実験を行う。有意差が再現出来る領域については、高密度なSNPによるタイピングを行い、領域を狭める。さらにリスクハプロタイプにつき罹患者群検体を用いてリシークエンシングを行い、機能SNPの同定を試みる。

(4) 個体を用いた機能解析：先に関連を報告し作出した*GRIA4*の行動解析を終了する。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の異常を検討する。以上につき論文としてまとめる。*GRM3*については*loxP*配列を有するマウスを作出したが、これを進めノックアウトマウスを作出する。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文

(1) 0702132232 Deng, X., Shibata, H., Takeuchi, N., Rachi, N., Sakai, M., Hideaki Ninomiya, H., Iwata, N., Ozaki, O., and Fukumaki, Y.: Association study of polymorphisms in the glutamate transporter genes *SLC1A1*, *SLC1A3* and *SLC1A6* with schizophrenia. *Am. J. Med. Genet.* 144B, 271-278, 2007.

(2) 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.

##### 2) データベース/ソフトウェア

なし

○ゲノムワイド関連解析については、基盤ゲノムの九州大学生体防御医学研究所の山本 健博士、および応用ゲノムの東海大学医学部の猪子 英俊博士と共同研究を行っている。

また変異マウスの行動解析については、生命システム情報の京都大学医学研究科先端技術センターの宮川 剛博士と共同研究を行っている。