

〔別紙1〕

論文の内容の要旨

論文題目 パニック障害の疾患感受性遺伝子の探索：
ゲノムワイド関連解析の結果に基づく1番染色体における
候補遺伝子の検討

指導教員 加藤 進昌 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 音羽 健司

1. はじめに

パニック障害 (panic disorder) は動悸、発汗、胸部不快感、めまい感など自律神経系の異常興奮を伴うパニック発作が長年にわたり繰り返されることを特徴とする。パニック障害はしばしば寛解と増悪を繰り返し、広場恐怖やうつ症状を合併することも多い (Weissmanら、1997)。初発は思春期後期から成人早期 (20歳代) で、生涯有病率は3%以上であり、幅広い年齢層に認められ (Finn と Smoller、2001)、男女比は約1:2である (Eatonら、1994)。

パニック障害の家系研究 (family study) や双生児研究 (twin study) から発症に遺伝要因が関与していることが指摘されている。これまで、ゲノムワイドの連鎖研究から数多くの領域に対する連鎖の報告がある。そのうちのひとつとして、1番染色体部位があげられる。Croweら、Gelernterらは、それぞれ1番染色体短腕 (1q) 部位に連鎖の報告をしている (Croweら、2001、Gelernterら、2001)。Smollerらは1家系を対象に調べ、マウスの不安の表現型の量的形質座位 (quantitative locus: QTL) に対応する部位について検討し、1qに小児期不安障害の発症と連鎖があることを報告している (Smollerら、2001)。

精神疾患に代表されるような多数の遺伝子が発症に関わる複雑疾患 (complex disease) では、従来の関連研究のような候補遺伝子をターゲットとした候補遺伝子アプローチには限界があり、またゲノムワイドの連鎖研究においても、疾患の候補領域を絞り込むには有効であっても、浸透率の低い疾患感受性遺伝子を直接同定することは困難であった。近年、

マイクロアレイ (microarray) 技術の発展に伴い、一度に多数の多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) をマーカーとしたゲノムワイドの関連解析が可能となってきた (Bunneyら、2003)。しかし、精神疾患では統合失調症や双極性障害の死後脳を用いた発現解析が中心に行われており、全ゲノムを対象とした SNP 解析はまだほとんど行われていない。

本研究においては、日本人を対象としたパニック障害に対し 50 万 SNPs をマーカーとしたゲノムワイドな関連解析を行い、その結果をもとに 1 番染色体領域におけるパニック障害の疾患感受性遺伝子の候補について検討した。

2. 対象と方法

2.1. 対象

研究実施に当たっては、東京大学大学院医学系研究科ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会および三重大学医学部研究倫理委員会の承認を受け、被験者には研究内容についての口頭・文書による説明と書面による同意を得た。

対象として、パニック障害患者 200 名 (男 64 名、女 136 名、平均年齢 39.5 ± 9.4 歳) と、健常対照群として関東周辺、関西・中部・東海周辺でリクルートされた性比を一致させた 100 名 (男 26 名、女 74 名、平均年齢 38.5 ± 9.8 歳) を用いた (1 次サンプル)。診断は主治医が診察し、カルテも参照した上で DSM-IV (American Psychiatric Association、1994) に基づいて行った。また健常対照群については、パニック障害の遺伝的基盤と共通する神経症傾向・不安特性の強い群である、NEO-PIR Neuroticism ≥ 125 および STAI (Anxiety-state) ≥ 53 は除外した。

ゲノムワイドスクリーニングの結果から選択した 1 番染色体上の候補遺伝子について 1 次サンプルに加えて、パニック障害患者 267 名 (男 96 名、女 171 名、平均年齢 37.9 ± 10.5 歳) と健常対照者 462 名 (男 181 名、女 281 名、平均年齢 34.6 ± 10.9 歳) を追加して解析を行った (2 次サンプル)。なお 462 人の健常対照群のうち、NEO-PIR Neuroticism ≥ 125 および STAI ≥ 53 を除外した 386 名 (男 162 名、女 224 名、平均年齢 36.8 ± 12.2 歳) を対象とした解析も行った。

2.2. SNP 解析

2.2.1. 500K SNP チップを用いたゲノムワイド関連解析

全ゲノム上に分布する 50 万 SNPs のタイピングを、東京大学ヒト SNP タイピングセンター (人類遺伝学教室) に依頼した。タイピングには Affymetrix 社製の 500K SNP チップ

(GeneChip Human Mapping 500K Array Set (Affymetrix, CA)) を使用した。

500K SNP チップの結果から候補となる遺伝子を選択する際に、患者・対照間の対立遺伝子頻度で nominal p -value < 0.01 である SNP が 2 つ以上連続して存在する固まりを集積部位とし、この集積部位の中から疾患と関連する SNPs に絞ることとした。 $p \leq 0.001$ の SNP 数を p 値の水準毎に調べ、そのうちで集積部位に含まれる SNP 数を数えた。集積部位に存在する SNPs ($p \leq 0.001$) を含む既知の遺伝子については、SNPbrowser Version 3.5 (Applied Biosystems, CA)を用いて調べた。

2.2.2. ゲノムワイド関連解析の結果から選択した 1 番染色体上の候補遺伝子の関連解析

1 番染色体上の候補遺伝子の関連解析には、TaqMan 法を用いて 1 次サンプル、2 次サンプルともに解析を行った。解析には ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA) を用いた。

2.3. 統計解析

患者・対照間で、対立遺伝子頻度および遺伝子型分布をカイ二乗検定によって比較した。各 SNP からなるハプロタイプ頻度を EM アルゴリズムを用いて推定し、permutation 法を用いて患者・対照間でのハプロタイプ頻度を比較した。各 SNPs 間の連鎖不平衡度は D' として計算した。

3. 結果

3.1. 500K SNP チップを用いたゲノムワイド関連解析

患者・対照間の対立遺伝子頻度で $p \leq 0.001$ の水準にある SNPs は全ゲノムにおいて 1643 個存在し、そのうち集積部位に存在する SNPs は 431 個であり、これらが位置する既知の遺伝子数としては 79 個見出された。1 番染色体上に位置する遺伝子は 7 個であった。

3.2. 1 番染色体上の候補遺伝子の関連解析

3.2.1. 1 番染色体上の候補遺伝子の選択

上記 7 個の候補遺伝子部位 (*PDE4B*、*BCAR3*、*ASTN*、*SYT2*、*PPF1A4*、*USH2A*、*NUP133*) について検討を行った。遺伝子の機能について NCBI データベースより調べ、神経機能に関

連する遺伝子であることや、*p* 値の水準を考慮し、*PDE4B*、*SYT2* 遺伝子について検討することとした。

3.2.2. *PDE4B* と *SYT2* の関連解析

PDE4B では 6SNPs を、*SYT2* に対しては 9SNPs についてタイピングを行った。

PDE4B 遺伝子における SNP のうち、1 次サンプルでは 4 つで nominal *p*-value で 1% の有意差が患者・対照間で認められた。2 次サンプル、1 次・2 次サンプルを合わせた結果ではいずれの SNP でも有意差を認めなかった。連鎖不平衡のパターンは、1 次サンプル、2 次サンプルともに患者・対照群で SNPs1-2 (Block1) と SNPs4-6 (Block2) の 2 つの連鎖不平衡ブロックを形成していた。患者・対照間のハプロタイプ頻度比較では、SNP3 と Block2 を合わせた SNPs3-6 の 4SNPs で、1 次サンプル、2 次サンプルともに global $p < 0.005$ と有意な結果が得られた。また 1 次サンプルでは、Block2 だけでも、SNPs1-6 全体でも有意な結果が得られた (global $p < 0.005$)。しかし、個々のハプロタイプでみると 1 次サンプル、2 次サンプルに共通して有意なハプロタイプは認められなかった。

SYT2 遺伝子における SNP では、1 次サンプルの 2 つで nominal *p*-value で 1% の有意差が患者・対照間で認められた。しかし、2 次サンプル、1 次・2 次サンプルを合わせた結果ではいずれの SNP でも有意差は認めなかった。連鎖不平衡のパターンはいずれのサンプルともに患者群、対照群で SNPs1-2 (Block1)、SNPs3-5 (Block2)、SNPs6-9 (Block3) の 3 つの連鎖不平衡ブロックを形成していた。患者・対照間のハプロタイプ頻度比較では、各ブロックのハプロタイプ解析で有意な差を認めなかったが、Block1 と Block2 を合わせた 5SNPs (SNPs1-5)、および 9SNPs (3 Blocks 全体) で、1 次サンプル、2 次サンプルともに、全ハプロタイプを総合した比較で有意な結果が得られた (global *p* values = 0.005 – 0.0001)。しかし、個々のハプロタイプでみると、1 次サンプル、2 次サンプルに共通して有意なハプロタイプは認められなかった。

4. 考察

本研究においては日本人を対象としたパニック障害におけるゲノムワイドの関連解析を行い、この結果をもとに 1 番染色体における候補遺伝子 *SYT2*、*PDE4B* について検討した。その結果、*SYT2*、*PDE4B* 遺伝子ともに、permutation 法によるハプロタイプ全体の比較で一部パニック障害との関連を示唆したものの、個々の SNP やハプロタイプでは関連を支持する所見を確認できなかった。このことから *SYT2*、*PDE4B* 遺伝子はパニック障害の候補遺伝子として今後も検討に値すると思われるが、結論を得るには、十分なサンプル規模をもつ新たな対象での研究が必要である。