

〔別紙1〕

論文の内容の要旨

論文題目 ゲノムワイド関連解析によるパニック障害の
候補遺伝子研究

指導教員 笠井 清登 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 湊 崇暢

1. はじめに

パニック障害は、家系研究や双生児研究から発症に遺伝要因が関与していることが指摘され、これまで多くの連鎖研究や関連研究の報告がある。しかしいずれの関連研究もサンプル数は 200 程度と小規模であるうえ、関連が認められないとする報告も多く、結論が得られていないのが現状である。

本邦では、Otowa らが日本人を対象としたパニック障害患者に対し GWAS (Genom-wide association studies : GWAS) を行っている。1 次サンプルとして患者 200 人、対照 200 人に対し、500K SNP チップを用い、疾患候補遺伝子にアプローチした。

1. 2 Otowa らの先行研究の概要 (1 次サンプルのゲノムワイド関連解析)

1. 2. 1 対象

第 1 段階のゲノムワイド関連解析では、パニック障害を主要対象疾患とする精神科外来クリニック (東京、名古屋各 1 箇所) に通院中のパニック障害患者 200 名 (男 64 名、女 136 名、平均年齢 39.5 ± 9.4 歳) を対象とし、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と年齢、出身地域をマッチさせた 200 名 (男 64 名、女 136 名、平均年齢 38.5 ± 9.8 歳) を用いている (1 次サンプル)。診断は主治医の診断に加えて MINI (Mini-International Neuropsychiatric Interview : 精神疾患簡易構造化面接法) を用いた診断面

接で確認した上で、DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) に基づいて行っている。

1. 2. 2. 方法 (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 のタイピングは、東大医学部 SNP タイピングセンター (人類遺伝学教室) に依頼し、Affymetrix 社製の SNP チップ (GeneChip Human Mapping 500K Array Set) を使用している。

500K SNP チップの結果から候補となる SNP の選択については、GeneChipViewer (Dynacom, Japan) を用いて SNP の allele p 値を計算している。条件設定は、Miyagawa らの、全 389 例での simulation 結果を参考として、1. 患者群でも対照群でも call rate が 95% 以上であること、2. 対照群での Hardy-Weinberg 平衡が: $p \geq 0.001$ であること、さらに 3. minor allele frequency (mAF) を: $\geq 1\%$ or 5% or 10% in all のそれぞれについて検討している。

1. 2. 3. 統計解析

1 次サンプルの各多型の遺伝子型分布および対立遺伝子頻度を患者・対照間でカイ二乗検定によって比較している。ゲノムワイドスクリーニングでは、解析用ソフトウェアとして GeneChipViewer (DYNACOM, Japan) を使用している。なお 1 次サンプルの allele p 値は $p \leq 1.0 \times 10^{-4}$ の条件を満たすものを候補 SNP としている。

1. 2. 4 500K SNP チップを用いたゲノムワイド関連解析の結果

1 次サンプルの全 400 検体については、BRLMM アルゴリズムを用いて遺伝子型を決定している。その結果、患者群、対照群ともに call rate は約 98%であった。

次に HWE で $p > 0.1\%$ 、call rate $> 95\%$ を満たす SNP 数を調べた結果、X 染色体上の SNPs を除く 490,032 SNPs のうち、mAF $> 1\%$ のものは 275,329 SNPs、mAF $> 5\%$ のものは、253,902 SNPs、mAF $> 10\%$ のものは 219,349 SNPs 存在した。

以上、Otowa らの先行研究の結果を踏まえ、1 次サンプルと重複しない 2 次サンプル (患者 558 人、対照 566 人) を用いた、Digi-Tag2 法によるゲノムワイド関連解析について話を展開してゆく。

2. 対象と方法 (2 次サンプルのゲノムワイド関連解析)

2. 1. 対象

第一段階の結果から選択した候補 SNP について、1 次サンプルと重複のない 2 次サンプルを用いて case-control 比較を行った。2 次サンプルは、1 次サンプルと同じクリニックに通院中のパニック障害患者 558 名（男 175 名、女 383 名、平均年齢 38.9 ± 11.1 歳）と、関東周辺、関西・中部・東海周辺でリクルートされた健常対照者 566 名（男 272 名、女 294 名、平均年齢 35.7 ± 12.9 歳）で構成される。患者群の診断については、ゲノムワイドスクリーニング（1 次サンプル）での方法と同様に行った。なお、1 次サンプル、2 次サンプルともに、患者群において兄弟サンプル、親子サンプルの除外を行っている。

2. 2. 方法（DigiTag2 法を用いた 2 次サンプルのゲノムワイド関連解析）

1 次サンプルの結果から得た候補 SNP について、新たに 2 次サンプルを対象に DigiTag2 法を用いた解析を行った。DigiTag2 法は東大人類遺伝学研究室と Olympus とで共同開発した SNP 解析システムで、SNP の遺伝子型を DCN（DNA Coded Numbers）と呼ばれるオリゴ DNA へ変換してマルチプレックス SNP タイピングを行うものである。DCN は物理的、化学的に性質が一樣となるように設計したオリゴ DNA で、DCN を使用することにより正確な DNA 分子反応を行うことが可能となる。DCN は解析対象となる SNP に対して自由に割り当てることができるため、結果表示に用いる DNA チップは解析対象に依存せず汎用的に使用できるという特徴を持っている。DigiTag2 法の実用性と信頼性に関しては、IL-4、IL-13 を中心とした 610kb 領域に存在する 96 種類の SNP を対象として 936 検体で検討し確認されている。

2. 3. 統計解析

各多型の遺伝子型分布および対立遺伝子頻度を患者・対照間でカイ二乗検定によって比較した。

2 次サンプルの allele 頻度比較は $p < 0.1$ であった SNPs に対して行い、最後に 1 次・2 次サンプルでの minor allele 頻度比較（方向性の確認）を行なった。

なお、サンプルの検出力は Ohashi、Tokunaga らの算出手法に基づき計算した。

3. 結果

Otowa らの 500K SNP チップを用いたゲノムワイド関連解析の結果、X 染色体上の SNPs を除く 490,032 SNPs のうち、 $mAF > 1\%$ のものは 275,329 SNPs、 $mAF > 5\%$ のものは、253,902 SNPs、 $mAF > 10\%$ のものは 219,349 SNPs 存在した。

これらの SNPs について患者-対照の allele 頻度を比較して、p-value のレベルごとに観察数と期待数の割合 (Observed/Expected) を検討した。この結果から、 $p < 0.001$ のレベルまでにおいて比較し、観察値/期待値が 1.5 を下回る $mAF > 10\%$ を条件として採用することとした。 $mAF > 10\%$ で $p < 10^{-4}$ の SNPs は 28 個認められた。12 番染色体上には 5 SNPs 存在したが、そのうち 2 SNPs は同一ハプロタイプ上に存在する tag SNP であったため、最終的に 27 SNPs を 2 次サンプルで検討する候補 SNPs とした。DigiTag2 システムでは一度に 32 SNPs が解析できることからこれら 28 SNPs のほかに、 $mAF > 5\%$ 、HWE で $p > 0.1\%$ 、call rate $> 95\%$ を満たす 48 SNPs のうち、1) 前記の 28 SNPs を除く、2) allele p 値が高値である、3) 候補 SNP が遺伝子上に存在するものを 5 つ選択し 2 次サンプルで検討する SNPs に追加した。

1 次サンプルで得た 27 候補 SNPs に上記 5 SNPs を追加した 32 SNPs について DigiTag2 を用いゲノムワイド関連解析を行った結果、SNP29、SNP30、SNP31 を除く 29 SNPs で結果を得ることができ、タイピング成功率は 90.6% であった。全 1,122 検体中、不良サンプルは 29 検体で average call rate は 99.57% と比較的高い値であった。この結果、SNP2 で allele p 値 = 0.014、genotype p 値 = 0.043 が、SNP4、SNP32 において allele p 値 = 0.021 および 0.25 が得られた。ただしこれらの結果を 1 次サンプルでの結果と比較してみると、SNP2 は 1 次サンプルでは患者群で mAF が対照群より高く、2 次サンプルでは対照群の方が高くなっていた。なお同様に 2 次サンプルで allele p 値 < 0.1 の基準を満たす他の SNPs (SNPs 8, 12, 16, 25) についても 1 次サンプルの結果と比較したところ、SNP8 では SNP2 と同様逆方向の結果であった。

4. 考察

2 次サンプルの解析は、32 の SNPs について行ったので、検定の多重性を考慮すると $p = 0.001$ 程度が結果の有意性を判断する上で要求されると考えられるが、残念ながらそのレベルに達する p 値は得られなかった。

しかしながら nominal $p < 0.05$ (allele 頻度) で 1 次サンプルと同じ傾向を示した SNP が 2 つ認められた (SNP4 と SNP32)。また他に 3 つの SNPs が $p < 0.1$ のレベルで 1 次サンプルと同じ傾向を示した。なお SNP4 は遺伝子上に存在しなかったが、SNP32 は 22q12.3 上で、APOL3 遺伝子 (APOLIPOPROTEIN L-3: アポリポプロテイン L-3) の promotor 領域に位置するなど機能的にも興味深いものが含まれていた。統計学的有意性には欠けるが、パニック障害が polygenic でかつ個々の遺伝子多型の示す odds ratio が比較的小さいと想定されることを考えれば、これらの SNP は今後の検討で注目すべき知見と考えられる。

(3,990 字)