

博士論文

論文題目 一卵性双生児不一致例を用いた
統合失調症の分子遺伝学的解析

氏 名 西村 文親

目次

要旨	6
第一章 研究の背景と目的.....	7
1-1 研究の背景.....	7
1-1-1 統合失調症の概要.....	7
1-1-2 統合失調症の遺伝研究.....	9
1-1-3 一卵性双生児不一致例研究.....	13
1-2 研究の目的.....	16
第二章 既報に基づく研究：ADM, SEPX1 及び CD200 の解析.....	17
2-1 背景.....	17
2-2 対象と方法.....	20
2-2-1 配列解析.....	20
2-2-2 mRNA 発現解析	26
2-3 結果.....	29
2-3-1 配列解析.....	29
2-3-2 mRNA 発現解析	36
2-4 考察.....	39

第三章 新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例の網羅的発現解析	42
3-1 背景	42
3-2 対象と方法	43
3-2-1 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 mRNA 発現解析	44
3-2-2 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 microRNA 解析	52
3-3 結果	54
3-3-1 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 mRNA 発現解析	54
3-3-2 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 microRNA 解析	64
3-4 考察	66
第四章 結語と今後の課題	74
謝辞	76
付録 1-1 : TruSeq Custom Amplicon 配列 (1 種類目)	77
付録 1-2 : TruSeq Custom Amplicon 配列 (2 種類目)	78
付録 2-1 : 用いた primer 配列と PCR 条件	79
付録 2-2 : 用いた primer 配列と PCR 条件	80
参考文献	82

図表目次

図 1	<i>ADM, SEPX1, CD200</i> の配列解析フロー.....	31
図 2	一卵性双生児統合失調症不一致例のリンパ芽球様細胞における <i>ADM, SEPX1, CD200</i> の発現量	38
図 3	一卵性双生児統合失調症不一致例内と一卵性双生児健常一致例内で mRNA 発現量が 2 倍以上の遺伝子の数.....	59
図 4	一卵性双生児統合失調症不一致例内と一卵性双生児健常一致例内で mRNA 発現量が 2 倍以上のプローブの数.....	60
図 5	一卵性双生児統合失調症不一致例のリンパ芽球様細胞における <i>DPYD</i> 及び <i>IGHM</i> の発現量	63
表 1	3 遺伝子(<i>ADM, SEPX1, CD200</i>)の変異解析対象領域.....	25
表 2	直接塩基配列決定法によって確認された <i>ADM, SEPX1, CD200</i> の変異	32
表 3	3 遺伝子での稀な非同義置換の変異保持者総数について統合失調症群と健常対照群との比較	33
表 4	配列解析から認めた頻度 5%以上の変異の関連研究結果.....	34
表 5	頻度が 5%以下の変異における変異保持者総数の統合失調症群と健常	

対照群との比較	35
表 6 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 mRNA 発現解析.....	58
表 7 一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組の遺伝子レベルから抽出され たリスト	61
表 8 一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組のプローブレベルから抽出さ れたリスト	62
表 9 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 microRNA 解析の結果	65

要旨

統合失調症は生物学的病態の解明が急務な疾患であるが、現在までに遺伝要因として同定されたものは一定せず、候補遺伝子は増大の一途を辿っている。

本研究では、1. 既報の一卵性双生児統合失調症不一致例から示された候補遺伝子 (*ADM*, *SEPX1*, *CD200*) の大規模集団における塩基配列解析並びに不一致例における発現解析、及び、2. 新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例を用いた網羅的発現解析を行った。候補遺伝子解析からは *CD200* の罹患双生児における発現低下を認めた。網羅的発現解析では、不一致例内に分子生物学的差異が存在する可能性を示し、さらに統合失調症の候補遺伝子として *DPYD* と *IGHM* を見出した。

第一章 研究の背景と目的

1-1 研究の背景

1-1-1 統合失調症の概要

統合失調症は、大きく分けて、陽性症状、陰性症状、認知機能障害の3つのカテゴリーに分けられる症状を主体とする内因性の精神疾患である[1, 2]。陽性症状として、妄想・幻覚・解体した会話や行動が代表的で、患者は病的体験に左右され、問題行動を呈することがある。陰性症状としては、感情鈍麻・意欲低下・自閉などがみられ、家に引きこもり、社会と交流を持つことが困難となることがある。また、注意力の持続低下、記憶力の低下といった症状を中心とする認知機能障害は、近年では統合失調症の中核症状の一つと考えられており、社会的機能の低下に与える影響が甚大なことから、予後に影響を与える最たるものである。生涯有病率は0.5-1.0%で[3, 4]、集団間の差は存在せず[4]、思春期以降に発症することが多い。根治的な治療法は存在せず、生涯にわたって慢性的な経過を辿ることから、当事者の苦悩は計り知れない。統合失調症患者が自殺を図る割合は約10%とも報告されている[5]。また、抗精神病薬の内服による

副作用や合併症の多さなど身体的な問題をも抱えてしまう事も多く、平均寿命は一般人口と比較すると 10-15 歳短い[6]。診断は操作的診断基準である米国精神医学会 (APA: American Psychiatry Association) による「精神疾患の診断・統計マニュアル (DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) 」もしくは世界保健機構 (WHO: World Health Organization) による国際疾病分類 (ICD: International Classified of Diseases) に基づいて行われる。根治的な治療法は確立しておらず、抗精神病薬を中心とした薬物療法ならびに精神療法を中心とした心理社会的治療などが主体である[7, 8]。陽性症状に対しては抗精神病薬が効果を発揮する場合があるが[7]、一方で陰性症状や認知機能障害への抗精神病薬の効果は乏しい[9, 10]。未だ原因不明の疾患であり、後述のような遺伝的要因の他に、周産期合併症[11]、出生地の緯度[12]、大麻の乱用[13]、都市部での出生[14]などの環境要因も発症に関与することが知られている。また、統合失調症患者の未就労な割合は 80-90%と報告されており[15]、疾患により就労が困難であることが知られており、発病以降に失われる労働力・医療資源といった社会経済的な点においても損失は計り知れない。当事者のみならず家族にも多大な苦悩を与え[16]、生物学的な病態の解明が急がれる疾患の一つである。

1-1-2 統合失調症の遺伝研究

家族研究や双生児研究や養子研究といった臨床疫学的研究から、統合失調症に遺伝要因が現在までに関与することが示されてきた。これまでの報告によると双生児のメタ解析では統合失調症の遺伝率は80%と推定され[17]、その他の双生児研究でも統合失調症の遺伝率は64%と見積もられているが[18]、いずれの研究においても統合失調症の遺伝性の高さが示されている。疾患頻度の高さから、ありふれた変異が疾患に複数関与するという common disease-common variant (CDCV) 仮説をもとに[19]、連鎖解析[20, 21]、リスク遺伝子を想定した大規模集団を対象とした候補遺伝子の関連研究[22]、近年では一塩基多型 (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) を網羅的に解析する全ゲノム関連研究 (GWAS: Genome Wide Association Study) を中心とする研究がなされてきた[23-25]。

連鎖解析は、統合失調症患者が複数いる家系を対象にして行われ、現在までのメタアナリシスで 2q と 5q においてゲノムワイドに有意であることが報告されている[26]。しかし、連鎖解析からの候補領域は様々であり、ほとんど全ての領域において報告が存在し、候補領域を絞り込むことが困難であった[27]。

関連研究では、ドパミン仮説、NMDA 受容体仮説、神経発達仮説に基づくものなど 100 以上の候補遺伝子が検討されてきた[27]。しかし、ほぼすべての候補

遺伝子について、パブリケーションバイアスがあるにも関わらずその関連を否定する報告がなされている。その中でも特に有望と考えられている *COMT* (catechol-O-methyltransferase)、*DISC1* (Disrupted in schizophrenia 1) や *DRD2* (Dopamine receptor D2) など 14 の候補遺伝子についても大規模サンプルを用いた研究で関連を否定する報告がされている[28]。

近年のアレイ技術の進歩により DNA マイクロアレイを用いた全ゲノム関連研究が行われるようになった。アレイによっては一度に約 90 万の SNPs を解析可能となり、盛んに解析が行われている。約 90 万の SNPs を一度に解析するために、厳しい多重補正を行うので、大規模集団を対象に研究を行う必要があり、多数の研究グループが国際的なコンソーシアムを形成し研究を行っている。現在までの全ゲノム関連研究では、サンプルサイズは疾患群において約 3 万人にまでおよび、100 を超える領域において、ゲノムワイドに有意なものが示されている[25]。いずれの疾患感受性遺伝子も、オッズ比 1.1-1.3 程と疾患への寄与は小さく、現在までの報告を合わせると統合失調症遺伝率の 23% が説明できると報告されている[29]。全ゲノム関連研究により、統合失調症遺伝要因の解明が大きく進むことが期待され、ゲノムワイドに有意な領域を絞り出すことに成功したが、ありふれた変異だけでは統合失調症の遺伝要因を十分に説明することができず、そのことを指して、*missing heritability* と呼ばれた[30]。統合失調症の高

い遺伝性を説明するため、ありふれた変異のみでは不十分と考えられ、近年では稀な変異が注目を集め、影響力の大きい稀な変異が統合失調症の病気に関与するという **common disease-rare variant (CDRV)** 仮説をもとにした研究も行われるようになった[31]。

CDRV 仮説に基づく研究の成功例としては、22q11.2 領域の欠失が報告されている[32]。この欠失は、4000 人に 1 人が有し[33]、DiGeorge 症候群もしくは **velo-cardio-facial** 症候群として知られている 22q11.2 欠失症候群を引き起こすが、その 25%が統合失調症を合併すると報告されている[32]。その他にも、Trio 解析からかなりの数の *de novo* 変異が報告されつつあり[34, 35]、さらにごく最近の大規模全エクソン解析においては多くの有力な候補遺伝子が示された[36]。以上のように稀な変異の探索では一定の成果をあげつつあるが、見出された稀な変異の多くが、それぞれの患者での原因遺伝子であるかどうかを明らかにすることは困難な状況であり、結果として統合失調症の候補遺伝子/変異の数は増大しているというのが現状である。

このような状況の中で、現在までに報告されている候補遺伝子の中から、別手法による研究により、疾患に真に関与する遺伝子/変異の絞り込みを行うことが、統合失調症病態解明の一助となる可能性がある。一卵性双生児統合失調症不一致例や統合失調症多発家系を対象とした研究は、そのアプローチのための

別手法の一つとなる可能性がある。特に、疾患以外の個人間差異を可能な限り打ち消すことが想定される一卵性双生児統合失調症不一致例は、もし分子生物学的な差異が存在するのであるならば、その差異は疾患に由来する差異である可能性があり、病態解明の手段として有効と考えられる。

1-1-3 一卵性双生児不一致例研究

一卵性双生児不一致例は、片側のみが疾患罹患双生児であり、もう片側が疾患非罹患双生児である一卵性双生児のことである。

画像研究による一卵性双生児統合失調症不一致例の比較は現在までに報告されており、MRI では罹患双生児において、島、上前頭回、内側前頭回、中心前回及び中心後回、帯状回、上側頭回及び中心傍小葉の灰白質体積が非罹患双生児に比べて減少していた[37]。¹H による核磁気共鳴スペクトロスコピーでは、罹患双生児で、海馬におけるクレアチニン及びクレアチニンリン酸、グリセロリン酸コリン及びリン酸コリン、N-アセチルアスパラギン酸の上昇が確認された[38]。³¹P による核磁気共鳴スペクトロスコピーでは、一卵性双生児不一致例（統合失調症、統合失調症感情障害、統合失調症様障害）で、左小脳前葉と下側頭皮質における ATP の上昇傾向を非罹患双生児で認めている[39]。

統合失調症の双生児研究において、一卵性双生児の発症一致率は 48%、二卵性のそれは 17%と報告されており[40]、一卵性双生児の一致率は二卵性双生児の一致率よりはるかに高く遺伝要因の関与を示す。しかしながら、同一のゲノムを持っていると想定される一卵性双生児における発症一致率は 100%とならず、環境要因の影響も示唆されている。一卵性双生児不一致例は疾患以外の個人間

差異が最も小さい 2 人と想定することが出来るため、一卵性双生児不一致例は最も理想的なケースコントロール研究であると考えられる。一方で、一卵性双生児不一致例内に本当に分子生物学的な差異が存在するかどうかという問題点がある。精神疾患においては、一卵性双生児を用いた研究は以前より行われており、統合失調症の一卵性双生児不一致例を用いた研究では、RLGS (restriction landmark genome scanning) 法によるゲノム DNA の制限酵素切断パターンに差異が報告されたが[41]、一方で RDA (representational differential analysis) 法を用いた不一致例研究では、DNA 配列並びにメチル化に差異を認めなかったとする報告がある[42]。一卵性双生児統合失調症不一致例のリンパ芽球様細胞を用いた DNA マイクロアレイによる網羅的発現解析からは患者における *ADM* (Adrenomedullin) 及び *SEPX1* (Methionine-R-sulfoxide reductase B1) の発現上昇と *CD200* (Cluster of Differentiation 200) の発現低下が報告されている[43]。血漿の脂質を測定した研究では罹患双生児における有意な LDL と VLDL の上昇を認めている[44]。また、双極性障害の一卵性双生児双極性障害不一致例では、リンパ芽球様細胞を用いた DNA マイクロアレイによる網羅的発現解析で、罹患双生児における *XBPI* と *GRP78* の発現の低下[45]、WNT シグナルの経路に關与する遺伝子の発現の変化が報告されており[46]、精神疾患の不一致例に差異がある可能性はある。しかし、本当に差が存在するのか、また存在するならばその差は疾患

由来の差なのか、ということは明瞭ではない。近年、精神疾患ではないが、一卵性双生児多発性硬化症不一致例において、全ゲノム解析、網羅的発現解析、網羅的 DNA メチル化解析を行い、一卵性双生児不一致例内に差異が認められなかったと報告されている[47]。

本研究では、上記背景より、一卵性双生児統合失調症不一致例を出発点とし、病態解明のための手掛かりを得ることを目的とした。

1-2 研究の目的

本研究は、

1. 一卵性双生児統合失調症不一致例の解析により候補遺伝子として示されている3遺伝子 (*ADM*, *SEPX1*, *CD200*) について多数例を用いた全コーディング領域の配列解析及び mRNA 発現検討
 2. 新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例および健常一致例を対象とした網羅的 mRNA 発現検討、網羅的 microRNA 発現検討
- を行い、一卵性双生児統合失調症不一致例に分子生物学的差異が存在するかを検証し、統合失調症病態に関わりうる遺伝子の同定を試みる。

第二章 既報に基づく研究：*ADM*, *SEPX1* 及び *CD200* の解析

2-1 背景

かつて一卵性双生児統合失調症不一致例のリンパ芽球様細胞を用いた DNA マイクロアレイによる網羅的 mRNA 発現解析から、患者において *ADM* 及び *SEPX1* の発現上昇と *CD200* の発現低下が報告されている[43]。*ADM* 及び *SEPX1* の統合失調症における発現上昇は、既に報告があり[48-50]、このことから一卵性双生児不一致例における分子生物学的差異の存在を示唆するものと考えられていた。

ADM はカルシトニンスーパーファミリーに属し、52 個のアミノ酸からなる分子量約 6000 のペプチドで、強い血管拡張による降圧作用を有している[51]。*ADM* は副腎髄質で発現を多く認めるが、血管内皮・心臓・腎臓・肺など心臓血管系を中心に、中枢神経を含む全ての臓器で発現している[52, 53]。当初、血管拡張作用を有する物質として注目されてきたが、その後の研究から細胞の遊走、分化制御、内皮細胞再生、抗炎症作用、抗アポトーシス作用など多彩な生理活性を持つことが判明している[54, 55]。中枢神経における *ADM* の主な産生源は脳血管内皮、グリア細胞および神経細胞であり[56]、これまでに、中枢神経系に存在する *ADM* は、神経伝達物質、神経修飾物質、神経ホルモンとして活動してい

る可能性が示唆されている[57]。*ADM* 過剰発現マウスでは、脳虚血後には血管新生や神経新生が上昇することが示されており[58]、脳特異的な *ADM* ノックアウトマウスでは不安の亢進など行動異常がみられることから[55]、*ADM* は直接的に行動に関わっている可能性が示唆されている。精神疾患との関連では、慢性期の統合失調症患者で血漿 *ADM* 濃度が約3倍に上昇することが繰り返し報告されており[50, 59]、他に自閉症・躁うつ病、うつ病においても有意な上昇が報告されている[60-62]。また、リンパ芽球様細胞を用いた研究では、*ADM* の mRNA 発現が男性の統合失調症患者で上昇していることが報告されている[49]。さらに、精神疾患の全ゲノム関連研究で初めてゲノムワイドに有意とされたのが、双極性障害 II 型においてであるが、*ADM* の近傍の SNP においてであった[63]。なお、統合失調症の合併と負の相関が報告されている慢性関節リウマチにおいて[64, 65]、そのモデル動物の病変部位への *ADM* 投与により症状が改善することが示されている[66]。

SEPX1 はセレノプロテインの一つであり、肝臓や白血球や脾臓に豊富に存在する。*SEPX1* がアクチン重合に必要な事が現在までに報告されている[67]。以前の研究では、セレンウムに結合する *SELENBP1* (selenium-binding protein1) が患者の脳と末梢血の白血球で発現上昇を認め、統合失調症のバイオマーカーである可能性が示されているが、その報告の中で *SEPX1* の患者での発現の上昇が報告

されている[48]。

以上から、既報の一卵性双生児統合失調症不一致例の網羅的発現解析において候補とされた *ADM*, *SEPX1*, *CD200* は統合失調症病態に関与している可能性が考えられた。そこで、本研究では *ADM*, *SEPX1*, *CD200* の配列解析を統合失調症の多数例において行い、疾患に関与し得る変異の探索を行った。さらに新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例において、*ADM*, *SEPX1*, *CD200* の定量的リアルタイム PCR (polymerase chain reaction) 法による発現解析を行い、既報と同様の結果を認めるかどうかの確認も行った。

2-2 対象と方法

ADM, *SEPX1*, *CD200* の患者群及び健常対照群での配列解析及び新規に見出した一卵性双生児不一致例 3 組の mRNA 発現解析を行った。なお、本研究は、「精神疾患発症にかかわる関連遺伝子の探索および解析」として、東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認に基づいて行われた(承認番号 639)。

2-2-1 配列解析

対象

東京大学医学部附属病院精神神経科で収集した統合失調症と診断された 474 名(男性 234 名、女性 240 名、年齢 43.1 ± 15.1 歳)とそれに対して年齢及び性別をマッチさせた健常対照者 475 名(男性 240 名、女性 235 名、年齢 41.6 ± 12.5 歳)を対象とし、末梢血白血球由来のゲノム DNA を用いて研究を行った。患者は 2 名の精神科医が DSM-IV に基づき、診断を行った。健常対照者は、精神科医が M.I.N.I. (精神疾患簡易構造化面接法)を用いて、あるいは非構造化面接により、精神疾患の有無を評価し、現在並びに過去に精神疾患であると診断されなかったものを対象とした。ゲノム DNA は標準的な手法を用いて白血球から抽出した。

方法

対象 3 遺伝子 (*ADM*, *SEPX1*, *CD200*) の配列解析は次世代シーケンサー Miseq (illumina, San Diego, CA, USA) を用いて行った。アンプリコンとして TruSeq Custom Amplicon (illumina) を用いた。アンプリコン長は 250bp で、Design Studio (<http://designstudio.illumina.com/>) により設計し、参照配列は UCSC hg19 (human genome 19) とした。対象となる 3 遺伝子の各エクソン領域の上流と下流 20bp を対象範囲として、既知の SNP が設計アンプリコン内に存在しないようにした。なお、アンプリコンは 2 種類存在している (付録 1)。

実験は、250ng のゲノム DNA を使い、プロトコルに従い、ライブラリ作成を行った。95 サンプル+1 サンプル (インナーコントロールサンプル) のマルチプレックスサンプルに対して同時に実験を行った。解析はシーケンサー内に搭載されている MiSeq Reporter v2.3.32 (illumina) により行い、出力された vcf ファイルに対して、annovar (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) を使用し、annotation を行った。また、MiSeq Reporter から出力された bam ファイルに対して、SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) を用いて、3 遺伝子のコーディング領域並びにコーディング領域のエクソンの前後 2bp を splice site として、この領域の depth の計算を行った。

直接塩基配列決定法

1 回毎の実験内で、サンプルの 20%以上がカバレッジ 10x 未満の領域については、サンガー法により可能な領域について塩基配列を決定した。また、解析から得られた変異についての確認もサンガー法により行った。プライマーは Primer3 v0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) を用いて設計し (付録 2)、PCR 増幅を行い、ExoSAP-IT (affymetrix, Santa Clara, CA, USA) にて PCR 産物の精製を行った後、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、伸長反応を行い、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Life Technologies) により塩基配列を決定した。

変異解析対象領域

今回、3 遺伝子のコーディング領域並びにコーディング領域近傍の splice site 2bp を変異解析対象とした (表 1)。

解析 (dbSNP132 に認めない非同義置換の変異探索)

MiSeq Reporter から得られた一塩基変異 (SNV: Single Nucleotide Variant) と微小な挿入もしくは欠失 (indel: insertion or deletion) から、解析が困難であると考えられる変異解析対象領域の平均 Depth 20x 未満のサンプルについては、サンプ

ル不良として除外し、それに含まれていた変異も除外した。その後の解析を以下に示す。

- ① *ADM*, *SEPX1*, *CD200* に関する領域 (UTR (Untranslated Region), coding region, intron, promoter) の SNV/indel を抽出
- ② 変異解析対象領域のみの SNV/indel を抽出
- ③ depth 10x 以上の SNV/indel を抽出
- ④ 同義置換を除外
- ⑤ 既知の SNP のデータベースである dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database) 132 に存在する SNV を除外
- ⑥ Filter において Pass を適用 (Locus GQX (Minimum of Genotype quality assuming variant position or Genotype quality assuming non-variant position) が 10 以上、及び、Low variant frequency が 20%以上)
- ⑦ 抽出された変異についてサンガー法で確認

サンガー法で使用したプライマー及び PCR プロトコルを付録 2 に示す。

直接塩基配列決定法によって確認されたそれぞれの遺伝子の変異保持者総数について統合失調症群と健常対照群において Fisher's exact test を行い、有意に稀な変異保持者総数が多いかどうかの検討を行った。

解析 (dbSNP132 に認めない非同義置換以外の変異探索)

解析 (稀な非同義置換の探索) で見出された変異以外で、dbSNP132 に含まれない同義置換並びに dbSNP132 に含まれている同義置換及び非同義置換についても解析を行った。解析の際に、変異の含まれる領域について、depth が 10x 以上のサンプルについてだけ抽出を行い、解析を行っている。MiSeq から見出されたこれらの変異についてはサンガー法で確認を行っていない。頻度が 5% 以上の変異については Fisher's exact test を用いて関連解析を行い、頻度が 5% 以下の変異については変異保持者数による Fisher's exact test を行った。

表 1 3 遺伝子(*ADM*, *SEPX1*, *CD200*)の変異解析対象領域

Gene	Chr	Start	Stop
<i>ADM</i>	11	10327248	10327347
		10327494	10327647
		10327877	10328188
<i>SEPX1</i>	16	1993101	1993157
		1991256	1991408
		1990777	1990895
		1989113	1989146
<i>CD200</i>	3	112052060	112052073
		112054788	112054866
		112059747	112059832
		112063807	112064137
		112066403	112066679
		112068557	112068668
		112080388	112080397

2-2-2 mRNA 発現解析

対象

東京大学医学部附属病院精神神経科で収集した統合失調症と診断された新規の一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組 (Twin Pair 1, Twin Pair 2, Twin Pair 3) に対して定量的リアルタイム PCR 法で解析を行っている。3 組の詳細については第 3 章で後述する。

細胞培養

リンパ芽球様細胞の細胞培養方法については、第 3 章の細胞培養で後述する。それぞれの一卵性双生児不一致例内で、1 組あたり 3 回の独立した培養を行った。各一卵性双生児をセットにして、同じ実験日に同手技で実験を行い、一卵性双生児それぞれについて 3 セットずつリンパ芽球様細胞を回収した。

定量的リアルタイム PCR 法

リンパ芽球様細胞から miRNeasy mini kit (QIAGEN, Hamburg, Germany) を用いて total RNA を抽出した。RNA の開始用量は Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies) を用いて、各サンプルとも 50ng とした。SuperScript™ III First-Strand

Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies) を用いて、cDNA の合成を行い、その cDNA を用いて、TaqMan®法にて、Applied Biosystems 7900HT (Life Technologies) を用いて、測定を行った。PCR プロトコルは以下のとおりである。

50°C 2min

95°C 10min

95°C 15sec	} 40 サイクル
60°C 1min	

対象遺伝子としては、*ADM*, *SEPX1*, *CD200* の 3 遺伝子、並びに標準化時のコントロールとして、*GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) と *ACTB* (actin, beta) を用いている。一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組それぞれから 3 セットのリンパ芽球様細胞を培養しており、それぞれのリンパ芽球様細胞から抽出された total RNA から合成された cDNA に対して、同時に 4 回発現量の測定を行った。

用いた TaqMan® Assay ID (Life Technologies) は以下の通りである。

ADM : Hs00969450_g1

SEPX1 : Hs00249482_m1

CD200 : Hs01033303_m1

ACTB : Hs01060665_g1

GAPDH : Hs02758991_g1

出力されたデータから以下のように解析をすすめた。

- ① 出力された Ct 値から、各遺伝子毎の median Ct を求めた。
- ② 解析対象遺伝子の median Ct 及び、コントロール遺伝子である *GAPDH* あるいは *ACTB* の median Ct から、 ΔCt を求め、2 の $-\Delta Ct$ 乗で *GAPDH* あるいは *ACTB* に対する相対発現量とした。
- ③ 各遺伝子の相対発現量を各双子内のペア同士で、paired t 検定を用いて、統計学的解析を行った。

2-3 結果

2-3-1 配列解析

解析 (dbSNP132 に認めない非同義置換の変異探索)

ADM, *SEPX1* 及び *CD200* の全コーディング領域について次世代シーケンスにより、depth が 10x 以上でデータが取得出来た領域は、全サンプル全解析対象領域の 94.8% (統合失調症群 96.9%、健常対照群 92.8%) であった。3 遺伝子の変異解析対象領域の平均 depth が 20x 未満になるサンプルについては、カバレッジ不良サンプルと判断し、統合失調症群では 10 サンプル、健常対照群では 12 サンプルを除外した。最終的に解析対象となったサンプルは、統合失調症群で 464 サンプル、健常対照群で 463 サンプルである。カバレッジ不良サンプル除外後の統合失調症群における平均 depth は 363x で、健常対照群での depth は 328x であった。変異解析対象領域内で 10x 以上の領域は全サンプルで 96.7% (統合失調症群 98.6%、健常対照群 94.8%) となった。

解析の流れに基づく、変異の数を図 1 に示す。直接塩基配列決定を行った後に、最終的に見出された変異の一覧が表 2 の通りである。

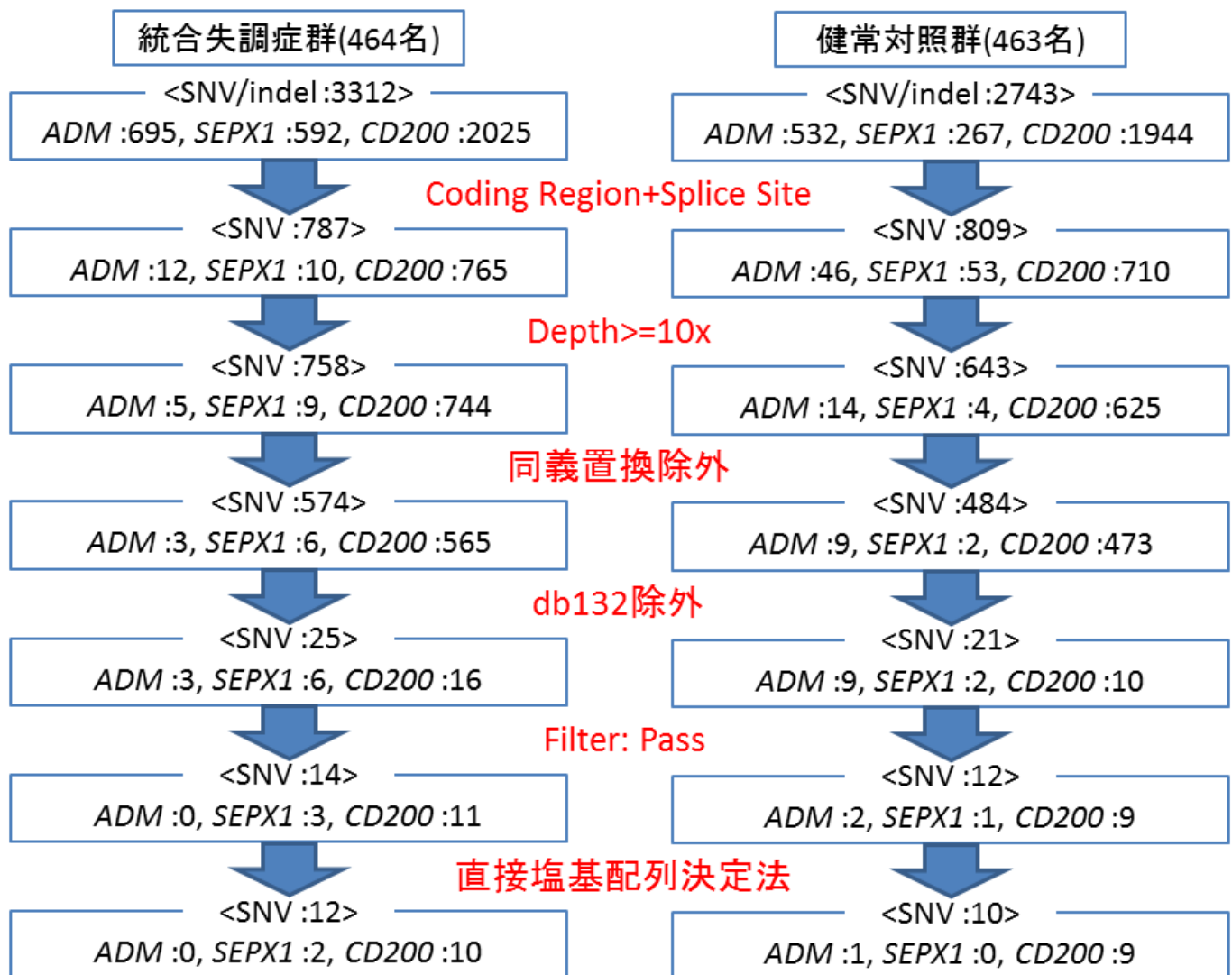
それぞれの遺伝子毎に、統合失調症群と健常対照群について稀な変異の数につ

いて、統計学的に検定を行ったが、3 遺伝子とも稀な変異の数に有意な差を認めなかった (*ADM* : $p=0.50$, *SEPXI* : $p=0.50$, *CD200* : $p=1.00$ (Fisher exact test)) (表 3)。

解析 (dbSNP132 に認めない非同義置換以外の変異探索)

dbSNP132 に認めない非同義置換以外の変異としては、頻度が 5% 以上の変異を 4 つ (非同義置換 2 つ、同義置換 2 つ)、頻度が 5% 以下の変異を 4 つ (同義置換 4 つ) 見出した。頻度が 5% 以上の変異については Fisher's exact test を用いて関連解析を (表 4)、頻度が 5% 以下の変異については変異保持者数による Fisher's exact test を行った (表 5)。頻度が 5% 以上の変異におけるアレル頻度における Fisher's exact test の結果により、2 箇所の変異において、 $p<0.05$ 以下を認めたが、多重補正にて統計学的に有意差を認めなかった。

図 1 ADM, SEPXI, CD200 の配列解析フロー



次世代シーケンサーから得られた変異から解析対象領域のみに変異を絞り、Depth>=10x 得られた変異を抽出、同義置換を変異の一覧から除いた。dbSNP132により既知の変異を除いた後、次世代シーケンサーの変異コールの際に Passと分類されたものを抽出し、得られた変異について直接塩基配列決定法により確認した。

SNV: Single Nucleotide Variation

indel: insertion or deletion

表 2 直接塩基配列決定法によって確認された *ADM*, *SEPX1*, *CD200* の変異

ADM

Sample	Chr	Position	Base call	Amino Acid Change
CT	11	10328182	T/G	Missense_F184L

SEPX1

Sample	Chr	Position	Base call	Amino Acid Change
SZ	16	1990779	C/T	unknown
SZ	16	1991399	G/C	Nonsense_Y21X

CD200

Sample	Chr	Position	Base call	Amino Acid Change
CT	3	112052062	G/A	Missense_M1I, Missense_M1I
SZ	3	112063833	G/A	Missense_R40K, Missense_R65K
CT	3	112066436	C/A	Missense_F151L, Missense_F176L
SZ	3	112066436	C/A	Missense_F151L, Missense_F176L
CT	3	112066653	A/A	Missense_D224N, Missense_D249N
CT	3	112066663	A/C	Missense_Q227P, Missense_Q252P
SZ	3	112068603	G/A	Missense_V247I, Missense_V272I

CT: 健常対照者

SZ: 統合失調症患者

表 3 3 遺伝子での稀な非同義置換の変異保持者総数について統合失調症群と健常対照群との比較

	<i>ADM</i>	<i>SEPXI</i>	<i>CD200</i>
健常対照群 (n=463 人)	1	0	10
統合失調症群 (n=464 人)	0	2	10
P value (Fisher's Exact Test)	0.50	0.50	≒ 1.00

表 4 配列解析から認めた頻度 5%以上の変異の関連研究結果

Chr	POS	synonymous / nonsynonymous	SZ				CT				Fisher's exact test for genotyping	Fisher's exact test for allele frequency
			ref/ref	ref/alt	alt/alt	Hardy-Weinberg Equilibrium	ref/ref	ref/alt	alt/alt	Hardy-Weinberg Equilibrium		
3	112059768	missense	30	168	266	0.62	30	155	183	0.72	0.09	0.03
3	112063850	missense	323	111	4	0.10	338	112	13	0.32	0.11	0.46
3	112064116	synonymous	442	2	0	0.96	448	7	0	0.87	0.18	0.18
3	112066562	synonymous	292	147	25	0.26	317	128	15	0.64	0.09	0.03

CT: 健常対照群

SZ: 統合失調症群

表 5 頻度が 5%以下の変異における変異保持者総数の統合失調症群と健常対
照群との比較

Variant	SZ	CT	Fisher's exact test
chr3: 112066667	0/464	1/463	$p \doteq 1.00$
chr3: 112068614	0/439	1/448	$p \doteq 1.00$
chr16: 1989125	1/461	0/463	$p \doteq 1.00$
chr16: 1991321	1/464	0/462	$p \doteq 1.00$

CT: 健常対照群

SZ: 統合失調症群

2-3-2 mRNA 発現解析

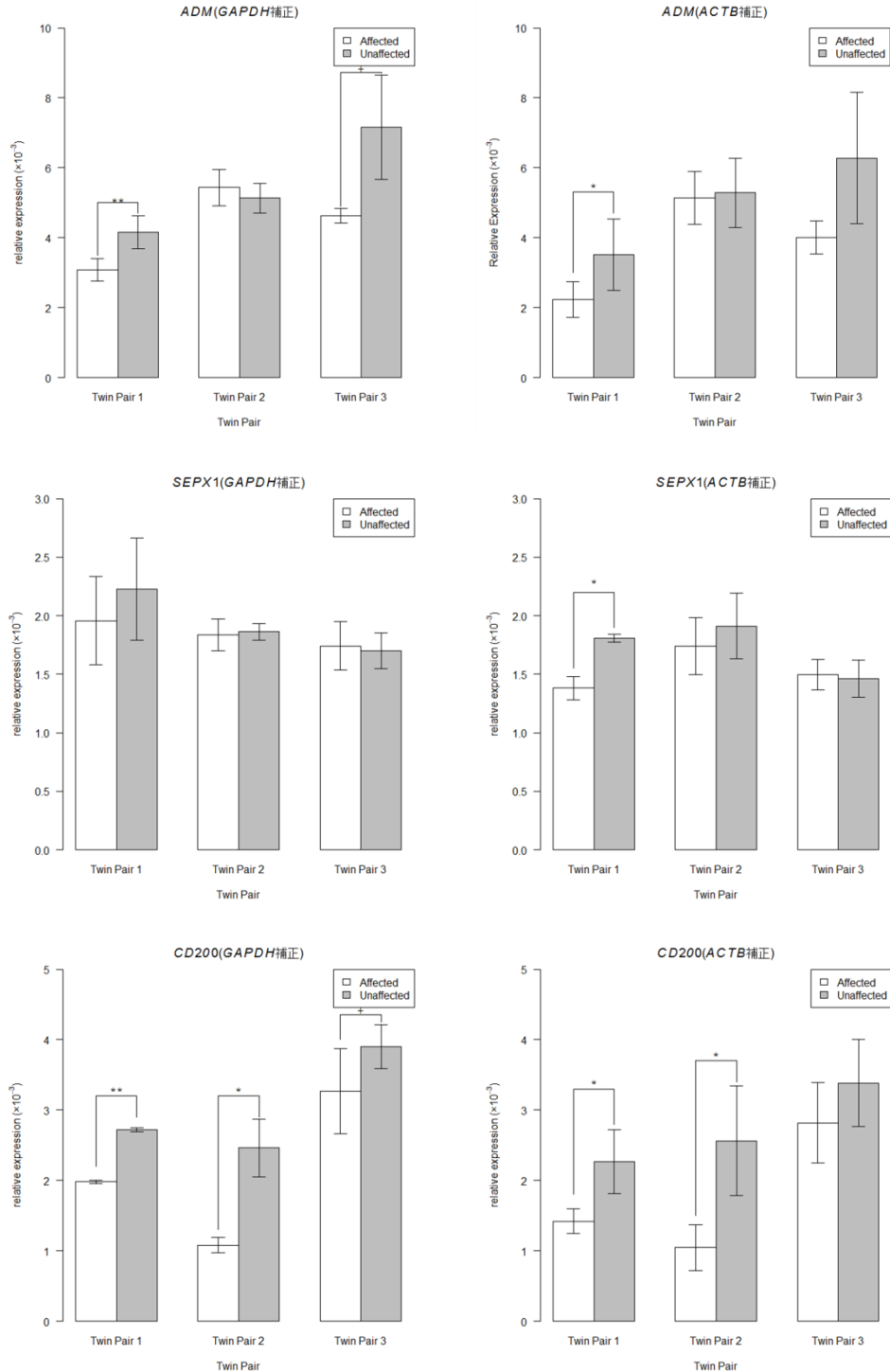
ADM, *SEPX1* 及び *CD200* の *GAPDH* あるいは *ACTB* により補正した相対的発現量を各一卵性双生児統合失調症不一致例において検討した。

ADM と *SEPX1* については、3組いずれの一卵性双生児統合失調症不一致例においても既報の所見を再現されなかった。 (*ADM* (*GAPDH* 補正) : Twin Pair 1; $p=0.007$, Twin Pair 2; $p=0.49$, Twin Pair 3; $p=0.08$ (paired t 検定), *ADM* (*ACTB* 補正) : Twin Pair 1; $p=0.06$, Twin Pair 2; $p=0.64$, Twin Pair 3; $p=0.15$ (paired t 検定), *SEPX1* (*GAPDH* 補正) : Twin Pair 1; $p=0.27$, Twin Pair 2; $p=0.76$, Twin Pair 3; $p=0.86$ (paired t 検定), *SEPX1* (*ACTB* 補正) : Twin Pair 1; $p=0.02$, Twin Pair 2; $p=0.15$, Twin Pair 3; $p=0.60$ (paired t 検定)) (図 2)

CD200 は、Twin Pair 1 と Twin Pair 2 において有意な mRNA 発現の低下を認め (*GAPDH* 補正: Twin Pair 1; 罹患双生児 0.00198 ± 0.00002 、非罹患双生児 0.00272 ± 0.00060 , $p=0.00001$ (paired t 検定), Twin Pair 2; 罹患双生児 0.00108 ± 0.00011 、非罹患双生児 0.00246 ± 0.00041 , $p=0.02$ (paired t 検定), *ACTB* 補正: Twin Pair 1; 罹患双生児 0.00142 ± 0.00018 、非罹患双生児 0.00227 ± 0.00045 , $p=0.045$ (paired t 検定), Twin Pair 2; 罹患双生児 0.00104 ± 0.00032 、非罹患双生児 0.00256 ± 0.00077 , $p=0.03$ (paired t 検定))、Twin Pair 3 でも低下している傾向がみ

られた (*GAPDH* 補正: Twin Pair 3; 罹患双生児 0.00327 ± 0.00060 、非罹患双生児 0.00390 ± 0.00031 , $p=0.07$ (paired t 検定), *ACTB* 補正: Twin Pair 3; 罹患双生児 0.00282 ± 0.00057 、非罹患双生児 0.00338 ± 0.00062 , $p=0.11$ (paired t 検定), Twin Pair 2; 罹患双生児 0.00104 ± 0.00032 、非罹患双生児 0.00256 ± 0.00077 , $p=0.03$ (paired t 検定)) (図 2)。

図 2 一卵性双生児統合失調症不一致例のリンパ芽球様細胞における *ADM*, *SEPX1*, *CD200* の発現量



相対的発現量を *GAPDH* もしくは *ACTB* による補正值として算出した平均値及び分散を示す。不一致例内において、paired t 検定を行い、統計学的に有意であるかどうかの検討を行った (+: $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, paired t 検定)。

2-4 考察

本章では、既報において一卵性双生児統合失調症不一致例の解析から候補遺伝子として示されていた *ADM*, *SEPX1*, *CD200* について、

1. 統合失調症群および健常対照群に対して、次世代シーケンサーを用いた変異の同定のための全コーディング領域の DNA 塩基配列解析
2. 3 組の一卵性双生児統合失調症不一致例のリンパ芽球様細胞に対して定量的リアルタイム PCR 法を用いた mRNA 発現解析を行った。

DNA 塩基配列解析では、統合失調症群と健常対照群において、見出された非同義置換及び同義置換の変異について 3 遺伝子とも統計学的な有意差は認められず、変異が病態に関与している可能性は否定的と考えられた。

mRNA 発現解析においては、*ADM* と *SEPX1* については、既報は再現されなかったが、*CD200* については 2 組の不一致例で罹患双生児側において統計学的に有意な発現の低下と、残りの 1 組の不一致例でも罹患双生児側において発現の低下傾向を認めた。既報の 2 組とあわせ計 5 組の一卵性双生児統合失調症不一致例において、*CD200* の発現が統合失調症患者側で低下しており、発現低下の病態への関与の可能性が示唆された。

CD200 は 3q12-13 に存在し、神経細胞にも発現し、その受容体である *CD200R1* (*CD200 receptor 1*) とともにミクログリアの活動を抑制的に制御することが報告されている[68, 69]。ミクログリアはグリア系細胞の一種であり、脳内細胞の 5-20%を占め[70]、炎症性サイトカインやフリーラジカルを産生し[71]、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に関与していることが報告されている[72, 73]。統合失調症患者では血清サイトカインの濃度上昇などの報告や PET 研究において脳内ミクログリアの活性が報告されており、統合失調症の病態への慢性炎症の関与が示唆されている[74, 75]。また、抗精神病薬によりミクログリアの炎症サイトカイン産生が抑制されることも報告されている[76-78]。今回みられた *CD200* の発現低下により、ミクログリアの活性が上昇し、統合失調症病態に関係している可能性が考えられた。一方、統合失調症の罹患と負の相関があることが繰り返し示されてきた慢性関節リウマチ患者において[64, 65]、単核細胞中の *CD200* 発現細胞の増加ならびに滑膜中の *CD200* 発現細胞の低下が報告されており興味深いと考えられた[79]。

本章の配列解析では、コーディング領域の変異についての解析を行っているが、mRNA 発現量に影響を与える領域として、プロモータやエンハンサーが知られており、今後も検討が必要であると考えられた。

本章では、既報の双生児不一致例から候補遺伝子として提示されていた *ADM*,

SEPX1, *CD200* のゲノム解析から双生児不一致例間に差異が存在する可能性についての傍証を得ることとともに、病態に関わりうる変異の同定を試みたが、ゲノム解析ではいずれも得られなかった。一方、新規に見出した双生児不一致例間においても罹患双生児で *CD200* の mRNA 発現量低下がみられたことより、双生児不一致例内での病態に *CD200* が関与している可能性があると考えられた。

第三章 新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例の網羅的発現解析

3-1 背景

序論でも示したように、一卵性双生児統合失調症不一致例において、分子生物学的差異が存在するかどうかは、示唆する報告はあるものの未だ不明瞭である。

そこで本章では、新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例及び健常一致例の解析から、分子生物学的な差異の有無を検討し、その上で病態に関わりうる候補遺伝子の同定を試みた。

3-2 対象と方法

新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例及び健常一致例の網羅的解析を、まずはリンパ芽球様細胞における網羅的 mRNA 発現解析から開始し、その後、網羅的 microRNA 発現解析も行った。なお、本研究は、「精神疾患発症にかかわる関連遺伝子の探索および解析」として、東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認に基づいて行われた（承認番号 639）。

3-2-1 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 mRNA 発現解析

対象

対象サンプルとして、一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組と一卵性双生児妄想性障害不一致例 1 組および一卵性双生児健常一致例 3 組の計 7 組の一卵性双生児を用いた。いずれの一卵性双生児も日本人である。

一卵性双生児不一致例の概要は以下のとおりである。一卵性双生児不一致例については、STR (short tandem repeat) 法を用いて一卵性双生児である事を確認した。15 箇所の STR ローカスを検出し、4 組の一卵性双生児不一致例いずれにおいても全てのローカスにおける STR 型は双生児内で一致し、一卵性双生児である確率は 99.9999%以上となった。

Twin Pair 1 : 精神科家族歴なし

統合失調症罹患双生児 : 41 歳、女性

23 歳で統合失調症を発症した。統合失調症の診断は 2 名の精神科医が DSM-IV に基づき行った。

非罹患双生児 : 41 歳、女性

既往歴に乳がんがある。M.I.N.I. を用いて、精神疾患の有無を評価し、現在並

びに過去に精神疾患であると診断されなかった。

Twin Pair 2 : 精神科家族歴なし

統合失調症罹患双生児 : 46 歳、女性

41 歳で統合失調症を発症した。統合失調症は 2 名の精神科医が DSM-IV に基づき、診断を行った。

非罹患双生児 : 46 歳、女性

M.I.N.I. を用いて、精神疾患の有無を評価し、現在並びに過去に精神疾患であると診断されなかった。

Twin Pair 3 : 精神科家族歴に父方いところに精神疾患の可能性はあるが、詳細不明

統合失調症罹患双生児 : 28 歳、女性、統合失調症

25 歳で統合失調症を発症した。統合失調症の診断は 2 名の精神科医が DSM-IV に基づき行った。

非罹患双生児 : 28 歳、女性

M.I.N.I. を用いて、精神疾患の有無を評価し、現在並びに過去に精神疾患であると診断されなかった。

Twin Pair 4 : 精神科家族歴としては、妹がパニック障害

妄想性障害罹患双生児 : 60 歳、女性

既往歴に慢性関節リウマチがある。51 歳で発症の妄想性障害を発症した。妄想性障害の診断は 2 名の精神科医が DSM-IV に基づき行った。

非罹患双生児 : 60 歳、女性

M.I.N.I. を用いて、精神疾患の有無を評価し、現在並びに過去に精神疾患であると診断されなかった。

一卵性双生児健常一致例は 3 組、41 歳 (Twin Pair 5) 、40 歳 (Twin Pair 6) 、56 歳 (Twin Pair 7) のいずれも女性であり、全員 M.I.N.I. を用いて、精神疾患の有無を評価し、現在並びに過去に精神疾患であると診断されなかったことを確認した。卵生診断は Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (affymetrix) を用いて一卵性である事を確認した。

細胞培養

リンパ球様細胞は、末梢血由来の白血球を EB ウィルス (Epstein-Barr virus) で形質転換することにより樹立した (SRL) [80]。培養は RPMI1640 培 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ・ 20%FBS (fetal Bovine Serum) (GIBXO,

Carlsbad, California, USA) ・ペニシリン (50U/ml) ・ストレプトマイシン (50 μ g/ml) (GIBCO) ・Tylosin 溶液 (60 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) により FALCON セルカルチャー フラスコ内を用い、5% CO₂ インキュベーター内で行った。継代は培養中の細胞から上清培地を取り除き、凝集した細胞をピペッティングにより懸濁し、そこに新しい培地を加えることにより行った。いずれも週三回のペースで最低 2 週間の継代を行っている。

細胞は 4°C、400 \times g、5 分間の遠心分離を行い、上清を取り除いた後、10ml の PBS により洗浄した。再度 4°C、400 \times g で 5 分間遠心分離した後、上清を取り除き回収し、実験に使用するまでは -80°C でリンパ芽球様細胞を保存した。

培養は各一卵性双生児内をセットとして揃え、それぞれの双生児について、1 組あたり 3 回の独立した培養を行っている

網羅的 mRNA 発現解析の方法

回収した細胞から miRNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。発現解析は SurePrint G3 Human Exon マイクロアレイキット 2x400K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて、exon array により行った。Total RNA 50ng から Cy3 標識されたターゲット RNA を作成した。作成された RNA を断片化し、exon array にハイブリダイゼーションし、その後 DNA マイクロアレイス

キャナ (DNA Microarray Scanner (G2565CA) (Agilent Technologies)) を用いて、画像の取得を行った。その画像から、Feature Extraction (Agilent Technologies) を用いて、QC Report、データを取得した。ハイブリダイゼーションからデータ取得まではタカラバイオ株式会社で行われた。

なお、アレイには一度に 2 サンプルのハイブリダイゼーションを行うことができるが、位置による影響を低減するため、exon array を同一サンプルに対して、ハイブリダイゼーションエリアを交換して 2 回行っている。すなわち、一卵性双生児 1 組に対しては、培養を 3 回行い、それぞれから得られたサンプルに対し exon array を 2 回行うこととなり、一卵性双生児一組あたり計 12 のエクソンデータが得られることとなる (3x2 ずつ 2 名分)。7 組に対し同じ実験を行ったため、合計で 84 の exon array のデータを取得した。

出力された結果は、解析ソフト GeneSpring (Agilent Technologies) を用いて、解析を行った。全サンプルの mRNA 発現量の 75 percentile でノーマライゼーションを行い、以下の手順で遺伝子レベル解析とプローブレベル解析を行った。

a) 遺伝子レベル解析

- ① ノーマライゼーションのデータに対して、全サンプルで発現している mRNA を抽出するため、flag filter として、全 84 サンプルで detected とな

っている遺伝子についてのみ解析対象とした。

- ② 解析対象となった遺伝子について、各々の一卵性双生児内において mRNA 発現量の差異がみられるものを統計学的に抽出した。

本研究では、それぞれの一卵性双生児で、3 回の独立した実験とそれぞれの実験での exon array データが 2 回分存在する。そこで、同一個人内の反復測定データを、各個人内にネストしている階層データとみなして、マルチレベルモデル（階層データ）分析[81]の枠組みで t 検定を行った。すなわち、データの階層性を考慮した階層線形モデルの枠組みで t 検定を行っている。t 検定を行う際に、個人内の反復測定データの非独立性を表す母数である個人内分散を推定しながら p 値を計算した。

Benjamini-Hochberg 法により False Discovery Rate (FDR) を算出したが、その際に有意水準を $\alpha=0.25$ として、 $m=14390$ 個の遺伝子対の下で上記の分析を行った。マルチレベルモデルに基づく分析には統計ソフト R の lme 関数を利用した。なお、本統計解析は筑波大学人間系心理学域宇佐美研究室との共同研究で行った。

- ③ ②により各一卵性双生児内において有意に発現量が異なり、かつ 2 倍以上の発現量の違いがある遺伝子を、各双生児内で発現量が異なっているものとして抽出した。

次に、各一卵性双生児内で抽出された遺伝子は、総数について統合失調症不一致群と健常一致例群との比較を χ^2 二乗検定で行った。その後、3組の不一致例で、共通、かつ、疾患と発現量の方向性が一致している遺伝子（いずれの双生児内でも罹患双生児が非罹患双生児より発現量が多い、あるいは、少ない）を病態に関わりうる候補遺伝子として抽出した。さらに、候補遺伝子として抽出された遺伝子数が疾患の有無に関与しているかの検定は、 χ^2 二乗検定により行った。

b) プローブレベル解析

遺伝子レベル解析と同様の解析を行った。ノーマライゼーション後のデータに対して、**flag filter** として、全 84 サンプルで **detected** となっているプローブについてのみ解析対象とし、統計処理では $\alpha=0.25$ の設定で、 $m=145919$ 個のプローブに対して解析を行った。

定量的リアルタイム PCR 法

Exon array により候補遺伝子として抽出された *DPYD* 及び *IGHM* は第 2 章と同様の定量的リアルタイム PCR 法により発現量の確認を行った。

用いた TaqMan® Assay ID は以下の通りである。

DPYD: Hs00559279_m1

IGHM: Hs00941538_g1

ACTB: Hs01060665_g1

GAPDH: Hs02758991_g1

3-2-2 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 microRNA 解析

対象

3-2-1-1 で示した一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組 (Twin Pair 1, Twin Pair 2, Twin Pair 3) を対象とした。

方法

3-2-1-1 で示したリンパ芽球様細胞から抽出された total RNA に対し、microRNA 発現は miRCURY LNA™ microRNA Array (Exiqon, Vedbaek, Denmark) を用いて行った。Array 解析は、miRCURY LNA™ microRNA Array Kit (Exiqon) を用い、Exiqon 社マニュアルに従って、1 色法での解析を行った。具体的には、miRCURY LNA™ microRNA Hi-Power Labeling Kit (Exiqon) を用いて、total RNA 750ng から microRNA を蛍光標識し、miRCURY LNA™ microRNA Array へのハイブリダイゼーションを HS 4800™ Pro Hybridization Station (Tecan, Männedorf, Switzerland) を用いて行った。SureScan Microarray Scanner System (G4900DA) (Agilent Technologies) により蛍光画像を取得し、ImaGene® 9 と Nexus Expression (BioDiscovery, CA, USA) により各スポットのシグナル強度を数値化した。出力された結果について GeneSpring を用い、解析した。ノーマライゼーションは

quantile normalization により行った。なお、蛍光標識からシグナル値の取得までタカラバイオ株式会社で行われた。

ノーマライゼーション後、flag filter として、全 24 サンプルで Present となっている microRNA についてのみ解析対象とした。

解析対象となった microRNA について、双生児内における発現の違いは、paired t 検定を施行した。FDR Benjamini-Hochberg 法により、 $\alpha \leq 0.25$ となるものを抽出した。

3-3 結果

3-3-1 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 mRNA 発現解析

Exon array による解析はそれぞれのエクソンレベルでのプローブレベルでの発現量及びその平均の遺伝子レベルでの発現量について行った。

a) 遺伝子レベル解析

アレイに搭載されている遺伝子総数は 25308 個であり、flag filter により、最終的に解析対象となった遺伝子は、14390 個であった。

各一卵性双生児内での統計学的解析の結果、双生児内で有意に変動していた遺伝子の数は Twin Pair1 で 5896 個、Twin Pair 2 で 4734 個、Twin Pair 3 で 3387 個、Twin Pair 4 で 0 個、Twin Pair 5 で 759 個、Twin Pair 6 で 4773 個、Twin Pair 7 で 1579 個の遺伝子であった。

その中で、各双生児内で、mRNA 発現量が 2 倍以上異なる遺伝子は Twin Pair1 で 129 個、Twin Pair 2 で 44 個、Twin Pair 3 で 107 個、Twin Pair 4 で 0 個、Twin Pair 5 で 36 個、Twin Pair 6 で 66 個、Twin Pair 7 で 43 個であった (表 6)。

変動していた遺伝子数について、統合失調症一卵性双生児不一致例 3 組 (Twin

Pair 1 , Twin Pair 2, Twin Pair 3) と健常一致例 3 組 (Twin Pair 5、Twin Pair 6、Twin Pair 7) で比較したところ、統合失調症不一致例では多い傾向であった ($p=0.09$, t 検定、片側検定)。

3 組の一卵性双生児統合失調症不一致例の共通の遺伝子数は 8 個で、3 組の一卵性双生児健常一致例における共通の遺伝子数は 1 個であった (図 3)。

統合失調症患者において、発現が同方向に変化している遺伝子は 3 個 (*DPYD* (Dihydropyrimidine dehydrogenase), *IGHM* (Immunoglobulin Heavy Constant Mu), *LOC100290146*) であり、いずれも罹患双生児において mRNA 発現量が低下していた (表 7)。

本研究の 2 - 3 - 2 から統合失調症罹患双生児において発現の低下を認めた CD200 について、本章における網羅的 mRNA 発現解析の結果をしてみると、遺伝子レベルでの解析において、3 組の一卵性双生児統合失調症不一致例内で有意に発現が変動しており、いずれの双生児不一致例においても罹患双生児における CD200 の発現低下を認め、TaqMan 法による発現解析と同様の結果が再現された。

b) プローブレベル解析

アレイに搭載されているプローブ数は、233316 個であり、flag filter により、最終的に解析対象となったプローブ数は、145919 個であった。各一卵性双生児内で有意に発現量の違いがみられたプローブ数は Twin Pair1 で 23427 個、Twin Pair 2 で 26809 個、Twin Pair 3 で 25464 個、Twin Pair 4 で 1 個、Twin Pair 5 で 2 個、Twin Pair 6 で 27806 個、Twin Pair 7 で 1 個であった。

その中で、一卵性双生児内で、mRNA 発現量が 2 倍以上異なるプローブは Twin Pair1 で 474 個、Twin Pair 2 で 1555 個、Twin Pair 3 で 1138 個、Twin Pair 4 で 0 個、Twin Pair 5 で 2 個、Twin Pair 6 で 862 個、Twin Pair 7 で 1 個であった(表 6)。

変動していたプローブ数について、統合失調症一卵性双生児不一致例 3 組 (Twin Pair 1 , Twin Pair 2, Twin Pair 3) と健常一致例 3 組 (Twin Pair 5, Twin Pair 6, Twin Pair 7) で比較したところ、統合失調症不一致例では多い傾向であった ($p=0.08$, t 検定, 片側検定)。このことは統合失調症不一致例において mRNA レベルでは差異が存在する可能性を示唆した。

3 組の一卵性双生児統合失調症不一致例の共通のプローブ数は 63 個で、3 組の一卵性双生児健常一致例における共通のプローブは認められなかった (図 4)。

統合失調症罹患双生児において、発現が同方向に変化しているプローブ数は 40 個であった (表 8)。

3組の統合失調症不一致例で共通に変動していたプローブの数は63個であり、その中で統合失調症罹患双生児において発現が同方向に変化しているプローブ数は40個であり、同方向を示すプローブ数の期待値は

$$63 \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{63}{4} \text{個}$$

と比べ、有意に多かった ($p=3.04 \times 10^{-5}$, χ^2 二乗検定)。このことも、不一例群と健常一致群のプローブ数比較結果とともに、mRNA レベルでは分子生物学的差異が存在し、本リストの中に候補遺伝子が含まれている可能性を示唆する。

遺伝子レベルの解析並びにプローブレベルの解析の両方において、発現が変化し、統合失調症罹患双生児で同方向の変化を認めた遺伝子は *DPYD* 及び *IGHM* の2つであった (表 7、表 8)。*DPYD* 及び *IGHM* の mRNA 発現量は、定量的リアルタイム PCR 法で確認し、不一致例 3 組いずれにおいても罹患双生児側における発現の低下を認め、exon array の結果は再現された (図 5)。

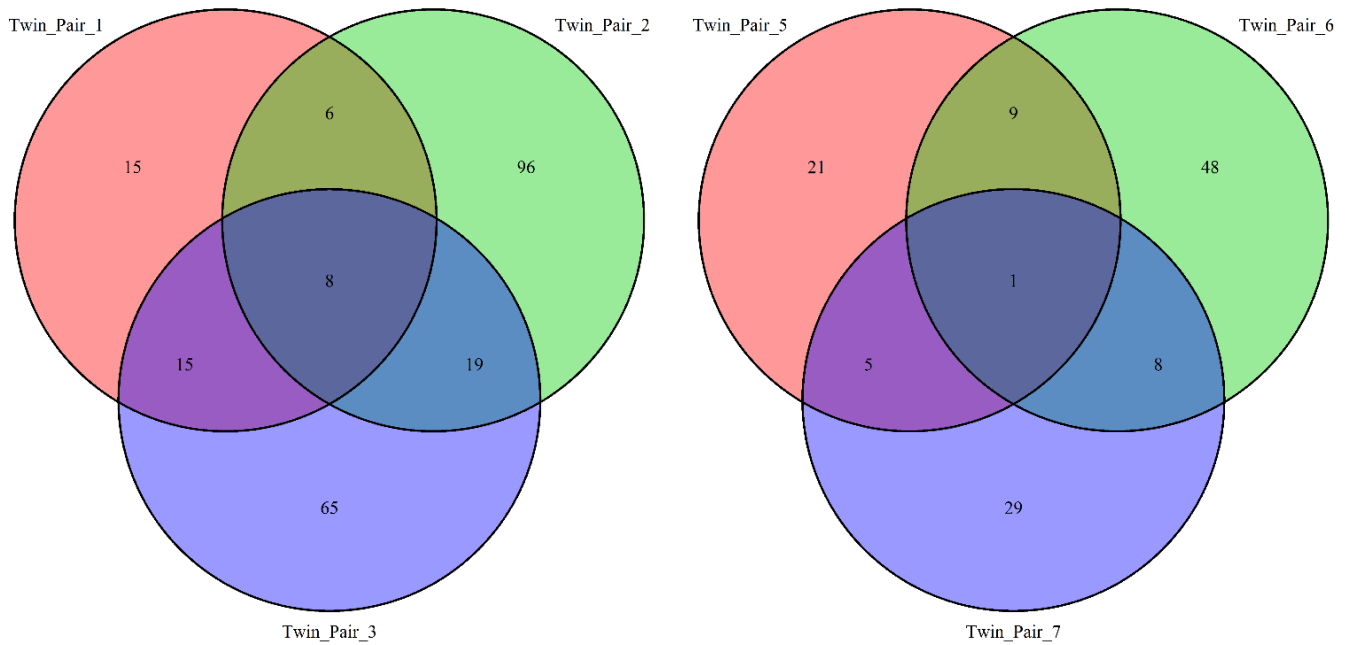
表 6 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 mRNA 発現解析

	Twin Pair 1	Twin Pair 2	Twin Pair 3	Twin Pair 4	Twin Pair 5	Twin Pair 6	Twin Pair 7
	統合失調症 不一致例	統合失調症 不一致例	統合失調症 不一致例	妄想性障害 不一致例	健常一致例	健常一致例	健常一致例
アレイに存在する全遺伝子数 (プローブ数)	25308 (233316)						
Flag filter後の解析対象遺伝子数 (プローブ数)	14390 (145919)						
統計解析後FDR $\alpha \leq .25$ の遺伝子数 (プローブ数)	5896 (23427)	4734 (26809)	3387 (25464)	0 (1)	759 (2)	4773 (27806)	1579 (1)
発現変化2倍以上の遺伝子数 (プローブ数)	129 (474)	44 (1555)	107 (1138)	0 (0)	36 (2)	66 (862)	43 (1)
3組共通の遺伝子数 (プローブ数)	8 (63)				1 (0)		
患者群で同方向の遺伝子数 (プローブ数)	3 (40)						

上段は遺伝子レベル解析の結果

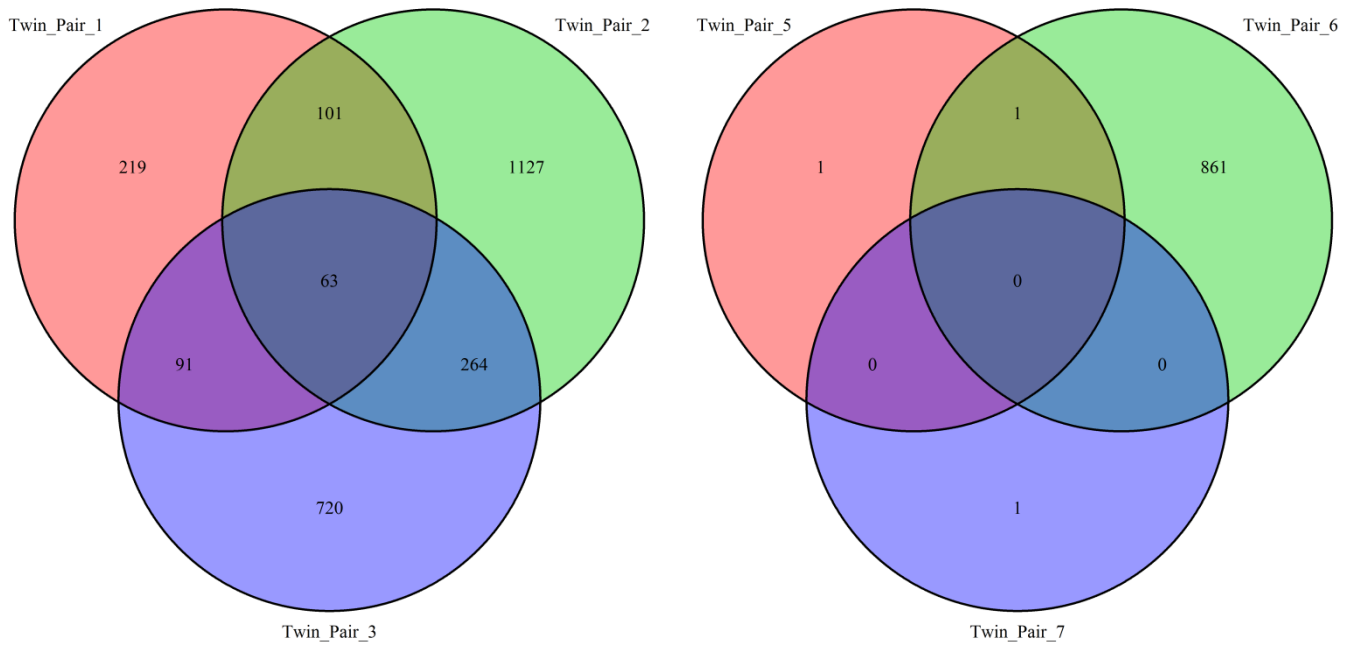
下段括弧内はプローブレベル解析の結果

図 3 一卵性双生児統合失調症不一致例内と一卵性双生児健常一致例内で mRNA 発現量が 2 倍以上の遺伝子の数



統合失調症一卵性双生児不一致例 3 組 (Twin Pair 1 , Twin Pair 2, Twin Pair 3) と健常一致例 3 組 (Twin Pair 5、Twin Pair 6、Twin Pair 7) の発現変化量 2 倍以上の遺伝子数についてのベン図で示した。統合失調症一卵性双生児不一致例 3 組の発現変化量 2 倍以上の共通遺伝子は 8 個、健常一致例 3 組の発現変化量 2 倍以上の共通遺伝子は 1 個であった。

図 4 一卵性双生児統合失調症不一致例内と一卵性双生児健常一致例内で mRNA 発現量が 2 倍以上のプローブの数



統合失調症一卵性双生児不一致例 3 組 (Twin Pair 1 , Twin Pair 2, Twin Pair 3) と健常一致例 3 組 (Twin Pair 5、Twin Pair 6、Twin Pair 7) の発現変化量 2 倍以上のプローブ数についてのベン図で示した。統合失調症一卵性双生児不一致例 3 組の発現変化量 2 倍以上の共通プローブは 63 個、健常一致例 3 組の発現変化量 2 倍以上の共通プローブは 0 個であった。

表 7 一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組の遺伝子レベルから抽出されたリスト

Chr	Gene Symbol	Twin Pair 1 p value	Twin Pair 2 p value	Twin Pair 3 p value	罹患双生児 / 非罹患双生児
1	<i>DPYD</i>	1.86×10^{-6}	1.79×10^{-3}	3.47×10^{-3}	down
14	<i>IGHM</i>	8.70×10^{-5}	4.23×10^{-3}	1.31×10^{-3}	down
14	<i>LOC100290146</i>	1.61×10^{-3}	3.08×10^{-2}	7.52×10^{-4}	down

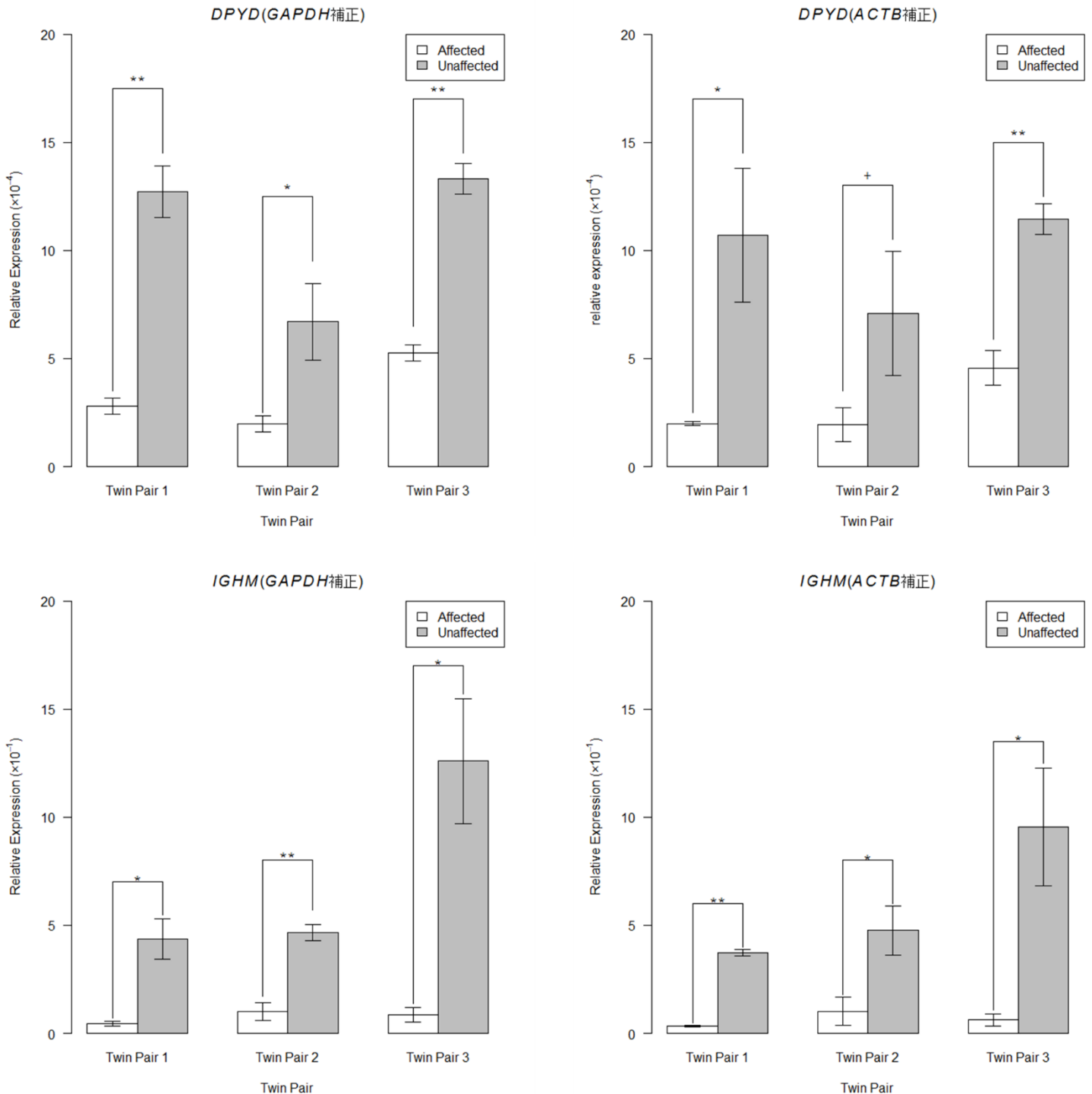
罹患双生児/非罹患双生児では、発現量の比較において罹患双生児 > 非罹患双生児ならば up、罹患双生児 < 非罹患双生児ならば down とした。

表 8 一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組のプロブレベルから抽出されたリスト

ProbeName	Chr	Start	End	GeneSymbol	Twin Pair 1 p value	Twin Pair 2 p value	Twin Pair 3 p value	罹患双生児 / 非罹患双生児
A_37_P345692	1	22200899	22200958	<i>HSPG2</i>	1.18×10^{-3}	1.06×10^{-4}	5.28×10^{-4}	down
A_37_P338744	1	23107914	23107973	<i>EPHB2</i>	9.82×10^{-3}	1.37×10^{-4}	6.58×10^{-4}	down
A_37_P130636	1	28286754	28286813	<i>XKR8</i>	2.30×10^{-3}	1.28×10^{-3}	3.76×10^{-4}	down
A_23_P135548	1	97543900	97543959	<i>DPYD</i>	1.67×10^{-5}	9.21×10^{-4}	2.01×10^{-3}	down
A_37_P120927	1	97547886	97547945	<i>DPYD</i>	1.45×10^{-4}	4.33×10^{-4}	7.52×10^{-4}	down
A_37_P344625	1	98015116	98015175	<i>DPYD</i>	3.49×10^{-5}	2.25×10^{-3}	1.81×10^{-3}	down
A_37_P344624	1	98039337	98039396	<i>DPYD</i>	3.79×10^{-5}	3.09×10^{-3}	4.17×10^{-4}	down
A_37_P344622	1	98060615	98060674	<i>DPYD</i>	1.21×10^{-4}	1.98×10^{-3}	1.91×10^{-3}	down
A_37_P124594	1	202719787	202719846	<i>KDM5B</i>	1.45×10^{-3}	7.04×10^{-3}	1.55×10^{-2}	down
A_37_P124587	1	202733177	202733236	<i>KDM5B</i>	9.52×10^{-4}	1.14×10^{-2}	3.12×10^{-2}	down
A_37_P124585	1	202742253	202742312	<i>KDM5B</i>	2.15×10^{-4}	4.92×10^{-3}	1.84×10^{-2}	down
A_37_P124584	1	202743741	202743800	<i>KDM5B</i>	4.75×10^{-4}	9.66×10^{-3}	1.45×10^{-2}	down
A_37_P124582	1	202777234	202777293	<i>KDM5B</i>	6.32×10^{-4}	2.52×10^{-3}	2.72×10^{-2}	down
A_37_P265703	2	95613859	95613918		3.48×10^{-4}	2.68×10^{-2}	7.11×10^{-4}	down
A_37_P042951	2	204594436	204594495	<i>CD28</i>	1.64×10^{-3}	1.21×10^{-3}	3.67×10^{-3}	down
A_23_P113793	3	111311845	111311904	<i>ZBED2</i>	4.16×10^{-3}	6.21×10^{-4}	7.38×10^{-3}	up
A_37_P003225	5	180017600	180017659	<i>SCGB3A1</i>	4.26×10^{-3}	1.49×10^{-3}	8.12×10^{-4}	down
A_37_P392515	8	59872502	59872561	<i>TOX</i>	1.70×10^{-3}	2.21×10^{-5}	5.01×10^{-4}	up
A_37_P394261	8	120605992	120606051	<i>ENPP2</i>	4.01×10^{-4}	5.72×10^{-3}	1.55×10^{-2}	down
A_37_P170549	8	120612927	120612986	<i>ENPP2</i>	1.50×10^{-3}	3.68×10^{-3}	8.18×10^{-3}	down
A_33_P3431595	8	144134801	144134860	<i>C8orf31</i>	5.99×10^{-4}	1.31×10^{-3}	6.91×10^{-5}	down
A_37_P422041	10	134020996	134021055	<i>STK32C</i>	4.48×10^{-4}	6.01×10^{-4}	4.81×10^{-4}	down
A_37_P209849	11	48134471	48134530	<i>PTPRJ</i>	1.40×10^{-3}	2.95×10^{-3}	3.13×10^{-3}	down
A_23_P162171	11	119180002	119180061	<i>MCAM</i>	5.32×10^{-4}	9.66×10^{-5}	2.98×10^{-3}	up
A_37_P281032	12	52307075	52307134	<i>ACVRL1</i>	4.87×10^{-3}	6.26×10^{-4}	1.24×10^{-4}	down
A_33_P3326767	13	49141734	49141793	<i>LOC100129597</i>	6.13×10^{-4}	2.21×10^{-3}	1.84×10^{-2}	down
A_37_P330426	14	106204111	106204170	<i>IGHG1</i>	4.62×10^{-4}	1.85×10^{-3}	7.10×10^{-4}	up
A_37_P447221	14	106320349	106320408	<i>IGHM</i>	2.40×10^{-4}	5.83×10^{-3}	3.70×10^{-3}	down
A_37_P223510	14	106321144	106321203	<i>IGHM</i>	5.30×10^{-5}	4.51×10^{-3}	1.31×10^{-3}	down
A_37_P223509	14	106321645	106321704	<i>IGHM</i>	6.68×10^{-5}	3.52×10^{-3}	8.68×10^{-4}	down
A_37_P447218	14	106322011	106322070	<i>IGHM</i>	1.73×10^{-4}	3.87×10^{-3}	1.10×10^{-3}	down
A_37_P259408	14	106610313	106610358	<i>IGHV3-15</i>	1.61×10^{-3}	3.08×10^{-2}	7.53×10^{-4}	down
A_33_P3331228	14	106610324	106610383	<i>IGHV3-15</i>	4.39×10^{-4}	4.61×10^{-4}	5.57×10^{-4}	down
A_37_P035697	14	106610701	106610760		1.64×10^{-4}	9.42×10^{-3}	3.71×10^{-3}	down
A_37_P447169	14	106725383	106725442	<i>IGHV3-23</i>	8.61×10^{-4}	2.81×10^{-2}	2.61×10^{-4}	down
A_37_P173208	15	78423592	78423651	<i>CIB2</i>	1.67×10^{-3}	3.37×10^{-3}	6.32×10^{-4}	down
A_23_P501822	17	39911150	39911209	<i>JUP</i>	2.68×10^{-3}	6.71×10^{-4}	9.40×10^{-3}	up
A_23_P153390	19	7793904	7793963	<i>CLEC4G</i>	6.18×10^{-5}	2.93×10^{-3}	6.08×10^{-4}	down
A_23_P39364	19	19040027	19040086	<i>HOMER3</i>	3.19×10^{-4}	1.16×10^{-4}	2.41×10^{-3}	up
A_23_P218675	20	44108669	44108728	<i>WFDC2</i>	3.08×10^{-2}	2.53×10^{-4}	1.64×10^{-4}	down

罹患双生児/非罹患双生児では、発現量の比較において罹患双生児 > 非罹患双生児ならば up、罹患双生児 < 非罹患双生児ならば down とした。

図 5 一卵性双生児統合失調症不一致例のリンパ芽球様細胞における *DPYD* 及び *IGHM* の発現量



相対的発現量を *GAPDH* もしくは *ACTB* による補正值として算出した平均値及び分散を示す。不一致例内において、paired t 検定を行い、統計学的に有意であるかどうかの検討を行っている (* p < 0.05, ** p < 0.01, paired t 検定)。

3-3-2 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 microRNA 解析

3-3-1 の mRNA 発現解析結果から、統合失調症不一致例に mRNA 発現において差異がみられ、共通して罹患双生児で低下している遺伝子として *DPYD* 及び *IGHM* が見出されたことから、不一致例双生児内で mRNA 発現の違いをもたらさうる可能性のあるものとし、統合失調症不一致例 3 組について microRNA の網羅的発現解析を行った。

アレイ上に存在する全 microRNA は 3098 個であるが、flag filter により解析対象となった microRNA は 1605 個であった。各不一致例内において統計解析を行ったが、FDR $\alpha < 0.25$ でいずれの不一致例でも差異はみられなかった (表 9)。

表 9 リンパ芽球様細胞に対する網羅的 microRNA 解析の結果

	Twin Pair 1	Twin Pair 2	Twin Pair 3
全microRNA	3098		
Flag filter後の 解析対象microRNA	1605		
paired t検定 FDR $\alpha \leq 0.25$	0	0	0

3-4 考察

本研究では、一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組と一卵性双生児健常一致例 3 組のリンパ芽球様細胞における網羅的 mRNA 発現解析において、①変動している遺伝子数及びプローブ数が不一致例では健常一致例に比して多い傾向であり、なおかつ、②不一致例で共通して変動しているプローブの分布はランダムでなく、疾患の有無と発現の増減が有意に関連していた、ことから、統合失調症不一致例において mRNA 発現レベルでは差異が存在する可能性が示唆された。さらに、統合失調症罹患双生児における *DPYD* 及び *IGHM* の発現低下を認め、統合失調症病態に関わりうる候補遺伝子であることを示した。mRNA 発現に差異をもたらす原因として、microRNA を網羅的に探索したが、双生児内で違いは見出されなかった。

本研究では、リンパ芽球様細胞を用いて研究を行っている。中枢神経系の疾患と考えられる統合失調症において、脳組織にアクセスし、解析を行っていくのが本来ならば望ましいと考えられる。しかし、脳組織は死後脳でなければアクセスはほぼ不可能であり、死後脳でさえ、入手は困難な状況である。その中で、末梢血は侵襲が少なく、比較的アクセスしやすいサンプルの一つである。幸い統合失調症病態に免疫系が関与している可能性は現在までに度々報告され

ており[25]、更に末梢リンパ球と脳組織との比較において遺伝子発現について類似性が報告されている[82]。そのため、比較的アクセス可能である末梢血を用いた研究を行う事により、統合失調症病態に関与しうる発現変化を検出出来る可能性があると考え、本研究では、リンパ球を EB ウィルスにより形質転換することにより樹立し、不死化したリンパ球様細胞を用いて、研究を行っている。リンパ芽球様細胞を培養することにより、無制限にサンプルを収集可能であり、さらに統合失調症患者の解析において、絶えず問題となる内服薬の影響を除去することが出来る可能性があると考えられた。現在入手しやすいサンプルの中でも、リンパ芽球様細胞は比較的アクセスしやすく、有用であると考え、研究を進めた。

今回新たにに見出した一卵性双生児不一致例のリンパ芽球様細胞の mRNA 発現解析を行うにあたって、以下の点を工夫している。手技による影響を低減するために、各一卵性双生児をペアとして培養を行い、さらに統計学的解析により双生児内で発現の異なっている遺伝子を見出すために各一卵性双生児に対し 3 回の独立した培養を行った。また、exon array による実験においては、ハイブリダイゼーションの位置による結果への影響を低減する目的で、ハイブリダイゼーションエリアを交換し、同じサンプルに対して 2 回のアレイ実験を行っている。解析においてもそれに即した統計学的手法を用い、確度の高いデータを

取得できたと考えられる。

先行研究において示唆はされてきたものの、そもそも一卵性双生児不一致例に分子生物学的な差異が存在するかどうかは明らかではなかったが、本結果は、健常一致例との変動している遺伝子総数及びプローブ総数の比較で不一致例において多い傾向であったこと、また統合失調症不一致例で共通して変動している遺伝子が疾患の有無と発現の増減が有意に関連していたこと、さらに、後述するが、*DPYD* が現在までの統合失調症候補遺伝子リストに何度も含まれていたことから、差異が存在することを強く支持するものと考えられる。一方、妄想性障害不一致例(pair4) において、変動しているプローブ数は認めなかった。妄想性障害罹患双生児は慢性関節リウマチも合併しており、慢性関節リウマチ不一致例でもある。慢性関節リウマチと統合失調症の非合併はよく知られており、症候学的に統合失調症と共通する部分のある妄想性障害と慢性関節リウマチの両方の不一致により、発現量の変動が双生児内で少ないという影響を与えていると考えられ、今後の検討が必要と考えられた。また、健常一致例の変動しているプローブ数においては、pair5、pair7 ではそれぞれ 2 個、1 個であったものの、pair6 では 862 個と極端な差がみられ、疾患ではないものの何らかの差を有しているものも存在していると考えられ、健常一致例と考えられるものでもさらなる注意深い検討が必要と考えられた。

様々な種類の変異により結果として統合失調症という症候群を呈している可能性が考えられ、本研究ではタンパク生成を通じ、生体機能により近いと考えられる mRNA 発現量の解析から開始した。候補遺伝子を抽出するにあたり、統合失調症不一致例 3 組で共通に変動している遺伝子もしくはプローブとしたことは、それぞれの不一致例における原因は異なる可能性がある中で妥当であったと考えられる。遺伝子レベル及びプローブレベルともに有意に発現の変化がみられた遺伝子は、今回の基準では *DPYD* 及び *IGHM* の 2 つであった。*DPYD* の mRNA 発現低下については定量的リアルタイム PCR 法により確認している。*DPYD* は本アレイでは 23 プローブが搭載されているが、5 プローブにおいて有意に発現の違いを認め、いずれも罹患双生児において発現が低下していた。*DPYD* のプローブレベルでの発現量を改めて再確認したがそれぞれのプローブにおける違いははっきりせず、全体量が低下していると考えられた。*IGHM* はアレイ上に 4 プローブが搭載されており、全 4 プローブにおいて罹患双生児において発現の低下を認めた。

本研究で見出された *DPYD* は統合失調症との関連においてすでに報告されている遺伝子であった。最初の報告は 2011 年の全ゲノム関連研究においてなされている[23]。第 1 段階で 21856 人、第 2 段階で 29839 人を用い、その統合解析から、統合失調症とゲノムワイドに有意な関連を示す 7 座位が得られ、このうち

最も強い関連 ($P = 1.6 \times 10^{-11}$) は、*MIR137* (microRNA 137) の近傍の rs1625579 に認められた。この SNP の LD block 内に *DPYD* も存在していたが、その後はむしろ *MIR137* への注目が集まり、研究がすすめられていた。しかし、2013 年に行われた全ゲノム関連研究 (5001 人の統合失調症群と 6243 人の健常対照群) とそれに以前に報告されていた全ゲノム関連研究 (8832 人の統合失調症群と 12067 人の健常対照群) の結果のメタ解析、さらに独立した検体 (7413 人の統合失調症群と 19762 人の健常対照群、及び 581 組のトリオ) における 168 個の SNP の確認実験から、ゲノムワイドに 22 座位が有意と見出され、この中に、*DPYD* が含まれていた[24]。さらに、2014 年に統合失調症患者群 36989 人と健常対照群 113075 人について、多段階の全ゲノム関連研究が報告され、108 座位の 128 個の SNP がゲノムワイドに有意であったが、この中で、2 位(rs1702294)と 107 位(rs76869799) に有意であった SNP が含まれた LD block 内に *DPYD* が存在している[25]。また、両親と孤発例統合失調症発端者の 231 トリオと非罹患の両親と子の 34 トリオについて全エクソン解析を行った研究では、アフリカ系白人 (オランダ系) における missense *de novo* 変異とアメリカ系白人 (北欧系) における nonsense *de novo* 変異が *DPYD* に見出されている[34]。以上のように、*DPYD* は近年の統合失調症の大規模全ゲノム関連研究で相次いで報告され、トリオ研究からは非同義置換の *de novo* 変異の報告が異なる集団で報告されるなど、統合失

調症との関連が強く疑われる。一方、統合失調症の罹患と負の相関があることが繰り返し示されてきた疾患である慢性関節リウマチにおいて、*DPYD* が関連研究において有意な関連が報告されていることも興味深い[83]。本研究で、*DPYD* が見出されたことは、*DPYD* が統合失調症病態に関与していることをさらに支持するとともに、このこと自身も一卵性双生児統合失調症不一致例に分子生物学的差異が存在への傍証であると考えられる。

DPYD は *DPYD* (Dihydropyrimidine dehydrogenase) をコードする遺伝子であり、ピリミジンの異化に関与する律速酵素として同定された[84]。5-FU の体内投与後の分解の主要な経路であることから、*DPYD* の活性が低下している場合、5-FU の投与は重大な副作用を起こすため癌研究の分野での報告が多い[85]。*DPYD* は β アラニンの産生に関与しているが、 β アラニンは統合失調症の病態に関与する可能性が示されているグリシンと GABA (γ -Aminobutyric acid) の構造上の中間型をとっており、GABA 受容体に結合して、受容体を活性化すること[86]、ならびに NMDA 受容体グリシン結合部位へのグリシンの結合阻害をすることが報告されている[87, 88]。また、近年の研究で EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) には *DPYD* が必要であり、*DPYD* により分解された産物であるジヒドロピリミジンの蓄積により EMT が起こることが示された[89]。EMT は神経堤細胞の発達分化に関与していることが知られているが[90]、興味深いことに神経堤細胞の発

達分化と統合失調症を高率で合併する 22q11.2 症候群の関係が報告されている [91]。DPYD の中枢における機能の探索は統合失調症病態の解明への端緒になる可能性があると考えられる。

IGHM は IgM の定常領域の μ 重鎖をコードする遺伝子である。免疫グロブリンは 2 つの固有の重鎖と軽鎖からなり、それらは、ジスルフィド結合で結びついている。免疫グロブリンの重鎖には、抗原結合部位を含む N 端の可変領域と、C 端の定常領域があり、C 端定常領域が μ 重鎖であるものは IgM のアイソタイプとなる。最新の統合失調症患者の全ゲノム関連研究において報告されている候補遺伝子が、免疫系特に B 細胞系において有意に発現している事が報告されており、本研究も B 細胞系である IgM の重鎖の定常領域をコードする遺伝子の発現の変化を認めており、B 細胞系の免疫と統合失調症の関連が示唆されたと考えられた [25]。さらに、未服薬初発統合失調症患者の血漿を用いたプロテオミクス解析において *Ig μ* の低下が報告されており、統合失調症の診断を補助するバイオマーカーとしての役割が期待されている [92]。また、統合失調症と同様に中枢神経疾患である考えられているアルツハイマー病と軽度認知障害 (MCI) のプロテオミクス解析において、*Ig μ* の上昇が認められた [93]。以上のように、*Ig μ* の中枢神経系への関与、ひいては統合失調症病態への関与の可能性が示唆されたと考えられる。

本研究では、mRNA 発現の差異をもたらす原因として、microRNA を想定し網羅的解析を行ったが、明らかな差異は見出せなかった。今後は、mRNA 発現の差異をもたらすエクソン配列解析、コピー数多型解析、DNA メチル化解析などを含めたその他想定されうる機序も検討する必要がある、見出し得た場合は、疾患の原因にさらに直結しうることから、今後の引き続きの探索が必要であると考えられた。

第四章 結語と今後の課題

本研究では、既報において候補遺伝子とされていた *ADM*, *SEPX1*, *CD200* の配列解析及び発現解析を行い、一卵性双生児統合失調症不一致例 3 組において *CD200* の統合失調症罹患双生児での発現の低下傾向を見出した。新規に見出した一卵性双生児統合失調症不一致例及び健常一致例のリンパ芽球様細胞における網羅的 mRNA 発現解析から、双生児不一致例における分子生物学的な差異の存在を示すとともに、*DPYD* と *IGHM* の罹患双生児における発現の低下を見出し、*DPYD* と *IGHM* が統合失調症の有力な候補遺伝子であることを示した。

近年の研究では、ゲノム解析技術の革新的な進歩に伴い、多数例の全ゲノム関連研究、多数例や家系を用いた全ゲノム解析や全エクソン解析が盛んに行われつつある。従来仮説をもとにした探索からは見出されえなかった候補遺伝子が次々と示され、有力なものが含まれていることは確かと考えられるが、一方で、もたらされる候補遺伝子の数は増加の一途をたどっており、むしろ動物モデルへの適用といったさらなる検討への選択が困難になっていると考えられる。そのような中で、本研究により一卵性双生児統合失調症不一致例に分子生物学的差異が存在し、*DPYD* がより注目すべき遺伝子として見出されたことは、より機能的な検討に移行するための一助を提示できたものと考えられる。

今後は双生児不一致例研究を進め、結果を蓄積していくとともに、日本人症例での *DPYD* の遺伝学的解析ならびに機能的解析、また新規の候補遺伝子であり得る *IGHM* の解析を行い、統合失調症病態解明のために研究を進めていきたい。

謝辞

ご協力いただきました患者様、ご家族様、また貴重な検体や臨床情報を収集して下さった多くのご担当の先生方に深謝いたします。

本稿を終えるにあたり、東京大学大学院医学系研究科脳神経学専攻精神神経科教室 笠井清登教授、垣内千尋准教授をはじめとする教室員各位には本研究に関しまして様々のご指導を賜りました。この場を借りまして、深く御礼を申し上げます。細胞培養や RNA 抽出にあたっては、理化学研究所脳科学総合研究所精神疾患動態チーム チームリーダー加藤忠史先生、石渡みずほ様を始めとするたくさんのスタッフにご助力を頂きました。統計解析につきましては、筑波大学人間系心理学域 宇佐美慧准教授にご指導頂きました。

実験の補助をして下さった東京大学大学院教育学部 加藤佳代子様に感謝いたします。

付録 1-1 : TruSeq Custom Amplicon 配列 (1 種類目)

Taeget Gene	Chr	Start Position	End Position	ULSO Sequence	DLSO Sequence	Expected Amplified Region Size(bp)
ADM	11	10326622	10326796	AGTTTAGGGCCTTGGCAAGCACTGCCC	CCAGCTCTGGTTCCTGTGCTTTATAAG	253
ADM	11	10327207	10328943	TGTACAGCGCTTAGGAAGGCAGCGAAC	TCAGACGCTTATCTCCCTCCGCGCAGA	227
ADM	11	10327207	10328943	ATGAAGCTGGTTCCGTCGCCCTGAT	CTGAACGCACGCGAATCGGGTCTGCTT	237
ADM	11	10327207	10328943	AGGGCGTAGTTACCTGTCTTCGG	TGACGCCAGGCCTGCCCTGCTCC	227
ADM	11	10327207	10328943	ACATGAAGGGTGCCTCTCGAAG	GGTGTGGGGCCAAAGCTCTGCTTGAT	225
ADM	11	10327207	10328943	TGAAGCTGGTAGATCTGGTGTGCCAG	GAACGGGAGCCATTCTAGAGCC	227
ADM	11	10327207	10328943	GCTTCGGGACGTGCACGGTGCAGAA	CGAGTGGAAAGTGCTCCCCACTTTCTTTA	226
ADM	11	10327207	10328943	AAGCGAAGCCCCAGAAGGAGGGGCC	GGGGCTGGAGCCCCGTGTGCTT	240
ADM	11	10327207	10328943	GGCGCGAGCTCTGGCTTTGCAA	ACGGCGTGTACCCCCACCAGGG	230
ADM	11	10327207	10328943	ACCTCGCTGAGACATTCACGCTTAA	AGAAATCAGTTTGTGGCGGAGCA	272
ADM	11	10327207	10328943	AAAAGCAATTATATTGTCTCCCTAT	GCTCTCACGCTAGGAAGGGAGG	257
SEPX1	16	1988214	1989164	AGGGGAGAAACCTAAACCCTGTTTC	CCCCATCTTAAGTAATTACTTTCTGGAGTA	249
SEPX1	16	1988214	1989164	AGGCAAGCTACTTCCGCACAGATT	ATTCTGTCTCCTAAGCAGCCTGGGAGAT	230
SEPX1	16	1988214	1989164	CTGACTTAGCCCCCTGCTCACT	AAACGGAGGCCGCCCTGCCAGCCGC	228
SEPX1	16	1988214	1989164	CCAGGGCTCACCTCTGGAGGCACCTA	GACGCCAGGGTTCCAACCTCAA	229
SEPX1	16	1988214	1989164	AGTGACTTGTCTTCTGCCCTTACC	AGACAGGAAGGCAGGGCGCAGTGGTTG	258
SEPX1	16	1990759	1990913	ATAGGCGTGTGGGAAGAAACACCATCT	TGGGGCCAGGCCTGTGTGGCCTTT	261
SEPX1	16	1991238	1991426	ACTCGTCTCCATGGCCGGCGTTCACC	CCTGTGCTCTGACCAGGGAGC	230
SEPX1	16	1991238	1991426	GCCACGCTGTGCGGTGAATGGTCT	GCCACGGGAGGCGCTGTGCTGAGCTCA	275
SEPX1	16	1993083	1993314	TCAGTTGGCAGCGCAAGCGCGCTGCG	TGCCGGGAGAAGCGAACAGGGG	237
SEPX1	16	1993083	1993314	AGAACGACATGGCGCCACCGGAA	ACGTTGACTCCTTGGGACCACT	234
CD200	3	112051896	112052091	TCTGTAGGCAGGCGGGAGGAGC	GGGGAAACTGACAAAGTGTGGAAAA	227
CD200	3	112051896	112052091	AGGTGCGGCAGGGGCACAGGTGA	GCGGAGCTTCGGCTCTTGCCACAATCT	225
CD200	3	112054770	112054884	TGAGGGAAATTTCAAGAGGAAGTACCA	AAAAATTAGAGCCAATATTGTCTCAGC	273
CD200	3	112059729	112059850	CTCCTCCAGGCAGATTACATGCTTAAA	CAGAAATGGGGGTTTGGATTGGACA	267
CD200	3	112063789	112064155	TTCTGGGCATTTTGCAGAGAGC	AGAAAACATTTATTTACATTCCTACGTGA	229
CD200	3	112063789	112064155	CAGCTGTACACACTGTCTCTTAAA	AATATCACCTGGAGGATGAAGGGT	229
CD200	3	112063789	112064155	AGACAAGAAAGGCTATCTTCTCATGAC	CAGAAGGTGATGGTTGAGTTTGGAGT	255
CD200	3	112066385	112066697	CTGTAATTTTCAATCCCTGACCGAGG	ATGGCATATCCTACCCAACTGGGG	274
CD200	3	112066385	112066697	GCCCCATGGTCTTCTGGAAGGT	TGTGTGCATGGACCTGGAAGGCAGTGAAT	261
CD200	3	112068539	112068686	CAGACAAAACACATTGTGCCATTCCC	AAGGAAAATGACATCACATGAGGAAAT	271
CD200	3	112080370	112081678	CCTCCTGCTTTTCTTGTGTCAAATT	CATTGGCAAAGATAAAGAAGTAGACATTC	225
CD200	3	112080370	112081678	ACAGCACCTGAAAGTGATTCCT	TGTAGGACTTGATTTTGTAAAGCAATGCC	231
CD200	3	112080370	112081678	TCTTCCCCTTTGTATTCCCTTTT	AGACCTGAGAGGTAACTGACTTCT	270
CD200	3	112080370	112081678	CCAAATAATTTACCACATAGCTCTAAAAC	CAGTTCTGCTTACTGCTTTGCTAATAG	234
CD200	3	112080370	112081678	AAAAATGTGAGCTATTGTCTAAGACTAAC	CTAGATACCAAATGATGGGGAAACAGAC	237
CD200	3	112080370	112081678	GTAACATTGGCAATCTAACTTATTCATTT	TCATATGCTTTGTCTCTGCTGGCTTC	254
CD200	3	112080370	112081678	CTTACACTTAATTCCTAGGCCACTGGA	TGGCTGACTGTATACAGGAAATCTC	240
CD200	3	112080370	112081678	TCAGTATCTTCTGCTTTGCTGTGCT	CTTGTCTTTTCCCATCATATGTAACCC	259

付録 1-2 : TruSeq Custom Amplicon 配列 (2 種類目)

Target Gene	Chr	Start Position	End Position	ULSO Sequence	DLSO Sequence	Expected Amplified Region Size(bp)
ADM	11	10326622	10326796	AGTTTAGGGCCTTGGCAAGCACTGCC	CCAGCTCTGGTTCTGTGCTTTATAAG	253
ADM	11	10327207	10328943	TGTCAGCGCCTAGGAAGGCGAGCGAAC	TCAGACGCTTATCTCCCTCCGCGCAGA	227
ADM	11	10327207	10328943	CAGGGTCTGCGCTTCGACCCGGGATGAA	TGAATGGGAGCAGGGACAGGCCT	225
ADM	11	10327207	10328943	AATAAGGGTCTGGGCAGGCCCGGCCT	TTCCCTTGCTGCCAGGTACCAGCA	230
ADM	11	10327207	10328943	GGAAGAGGGAAGTGCAGGATGTTCCA	GGCCCCGGGGATCGTCGGGGCTGGA	225
ADM	11	10327207	10328943	GGCATCCGGAAGTGTGCGGGCG	ACACCTTCCCTCCCTCCGTCCTGG	226
ADM	11	10327207	10328943	GGCAAAGCTCTGCTTGATGGG	GGACAAGGACAACGTCGCCCCCA	225
ADM	11	10327207	10328943	CTAAATCTAAAGAAAGTGGGGAGCACT	AGCTTCTGCACCGTGCACGTCC	228
ADM	11	10327207	10328943	TCGGACTCTGGTGTCTTCTAAGCCACAA	GTCCGGGAGGCACCGTCCGGCGGCGAGCT	227
ADM	11	10327207	10328943	GGTCTCAGCATTCTTCTCAGTTTCTC	GTCCCCACACCGCTCGGGAAGT	226
ADM	11	10327207	10328943	AAGTGCCTCAGGGGCGGGGTGCAAGAA	AGGAAAAGTGCAATGCGTGTGTAC	225
ADM	11	10327207	10328943	ACCTCGCTGAGACATTCACGCTTAA	AATAGTGAGGCTGCGCCCTGGTGGGGTGA	240
ADM	11	10327207	10328943	AAAAGCAATTATATTGCTCTCCCTAT	GTCTCAATGCTGATTCATTCTCTCGG	230
ADM	11	10327207	10328943	TTCTGCGCGCCCCACACAGAGAACAGA	GTTTATTGGTTTGTGTTCGATATCA	225
SEPX1	16	1988214	1989164	TCACTTCTGCTTAGAAAGCGGC	GTAATCAGGTGGAATCCATAGACAAATG	225
SEPX1	16	1988214	1989164	AGTGTGCACTGCAGGCCTCAG	CTGGAAGGGTTGACCAGAGCGGATCAT	230
SEPX1	16	1988214	1989164	TTTTCTGGCCCTGTCTCTGGACTCTCCC	TGTGACCTGCTGGGAAGCAGGCTGA	233
SEPX1	16	1988214	1989164	GGGCTAAGCTTCGGTGAGGACGAGA	TGTCCAGCAGAAGGCATGAACATCA	225
SEPX1	16	1988214	1989164	ACACGTTGGCCATTCACCTTG	TGACTTAGCCCCCTGCTCACTCTAGGT	226
SEPX1	16	1988214	1989164	CCTGCTCAGCGCCAGGTTCCAACT	CGGTGAAAGCCAGGTTAGGGCGAGAAA	228
SEPX1	16	1990759	1990913	TAAGGGCTTACATGTGGCTGTATCAT	GGCCAGGCTGTGGCCCTTGA	225
SEPX1	16	1991238	1991426	ACTCGTCTCCATGGCCGGCTTACC	CCTGTGCTCTGCCAGGGAGC	230
SEPX1	16	1991238	1991426	TGGCCACGCTGTCGGCGTGAATGGTCT	GACAGCGCTGCCCCGTTCCGAGGGTA	225
SEPX1	16	1993083	1993314	AGCGCAAGCGCGTCTCGGTTCCG	TGCCGGGAGAAAGCGAACAGGGG	228
SEPX1	16	1993083	1993314	AGCTGCAGAACGACATGGCGCCA	CTTCCCAGCTGGCCCCGCCACGTTGA	225
CD200	3	112051896	112052091	TCTGTAGGCAGGCGGGAGGAGCGT	GGGGAACTGACAAAGTGTGGAAAA	227
CD200	3	112051896	112052091	GGCGGGAGGTGCGGCAGGGCACAGGT	AGGCGCGGAGCTTCGGCTCTGCCACAAT	229
CD200	3	112054770	112054884	TGAGGGAAATTTCAAGAGGAAGTACCA	AAAAATTAGAGCCAATATTGCTCAGC	273
CD200	3	112059729	112059850	CTCCTCCAGGCAGATTACATGCTTAAA	CAGAAATGGGGGTTTGATTGGACA	267
CD200	3	112063789	112064155	CTGGGCATTTGCAAGAGCATTTTAAAG	AGAAAACATTTATTACATTCCTACGTGA	226
CD200	3	112063789	112064155	CATAGTGC AAGTGTGACCCAGGATGAAA	GCTGGGACTCCAAAACCTCAACCAT	228
CD200	3	112063789	112064155	GGCTATATCCAAACATTTTGCAAATAGT	GGGTAATGTTTATCTTGTCTTATAGGCA	226
CD200	3	112066385	112066697	GCTGGGCGGGCAGTGGCAGAGC	ATGGCATATCTACCCAAACTGGGGAC	226
CD200	3	112066385	112066697	ACAGCCCATAGTATCCCTTCACTACA	GAAGGAGGTGATCTGCCAGGTGCT	228
CD200	3	112066385	112066697	CCTTATTGCCCATTTCTTCCAAATAG	CCACCTGATTCTTAGGGTCTTTGATATGG	226
CD200	3	112068539	112068686	CAGACAAAACACATTGTTGCCATTTCC	AAGGAAAATGACATCAGATGAGGAAAT	271
CD200	3	112080370	112081678	GAAATGTCTACTTCTTTATCTTTGCCAATG	AATTTGACACAAGAGAAAAGCAGGAGG	225
CD200	3	112080370	112081678	CAACAGACCTGAGAGGTAACACTGACTTC	CTGTGTGACTTATTTAGGGCTCTGGATA	228
CD200	3	112080370	112081678	AGGATCCACGACTTTTACTGCCAT	CTCTGTTAGTCACTTTACCTCATCAAAG	227
CD200	3	112080370	112081678	AGGTAAGCTCTCTGTATTCTTTCTTCT	GTGAGCTCAGTGCTCTGATACTAATA	225
CD200	3	112080370	112081678	AAAAGGGAATAAGCAAGGGGGAAGA	TTTACTGTGTTCTTCATGTGCTTC	226
CD200	3	112080370	112081678	ACAGGGAGGCATGCTTCTCAAAA	AAAGCAGTAAGCAGGAACTGGACTAG	234
CD200	3	112080370	112081678	AATATTGTTAGTCTTAGACAATAGCTCACA	CTTCTTTTCCATGCGTTAACTTTTCCC	226
CD200	3	112080370	112081678	ATTCCTAGGCCACTGGATAGACACAGA	TGGCTGACTGCTATACAGGAAATCTC	229
CD200	3	112080370	112081678	AACCATAATTAGTTGCTTTTCTCAGTATCT	TGATATCTCTTGGGAAATGTGGAAATG	240

付録 2-1 : 用いた primer 配列と PCR 条件

次世代シーケンサーでは読めなかった領域について、直接塩基配列決定法での用いた PCR 条件と Primer

TaKaRa Ex Taq® (Takara)を用いての PCR 条件と Primer は以下の通りである。

98°C: 10 sec	} 40 サイクル
57°C: 30 sec	
72°C: 30 sec	

ADM-ex3F 5'- CGGAGTTTCGAAAGAAGTGAG -3'

ADM-ex3R 5'- ATTCTAGAGCCAGAGGGAGCTG -3'

ADM-ex4F 5'- GGAGGAGTTCTCTGTCTCCACTC -3'

ADM-ex3R 5'- CCTTGTCCTTATCTGTGAACTG -3'

SEPX1-ex3F 5'- TTTTGGGACAGTCATGATCAA -3'

SEPX1-ex3R 5'- ACAAAGGTCAACCTCTTATGTC -3'

付録 2-2 : 用いた primer 配列と PCR 条件

次世代シーケンサーから見出された変異についての、直接塩基配列決定法での用いた Primer と PCR 条件

TaKaRa Ex Taq® (Takara)を用いての PCR 条件と Primer は以下の通りである。

98°C: 10 sec	} 40 サイクル
57°C: 30 sec	
72°C: 30 sec	

SEPX1-Variant-1F 5'- TTTTGGGACAGTCATGATCAAC -3'

SEPX1-Variant-1R 5'- GTGATCTTTCCAGGTGTCCTGT -3'

SEPX1-Variant-2F 5'- GATCAACCAAGCGAGGAAG -3'

SEPX1-Variant-2R 5'- TGTGGGAAACAGGACAGGT -3'

SEPX1-Variant-3F 5'- GCAACAGGCCTGGAATAGAC -3'

SEPX1-Variant-3R 5'- AAGTGTGGCTATGAGCTGTTCTC -3'

SEPX1-Variant-4F 5'- GCAACAGGCCTGGAATAGAC -3'

SEPX1-Variant-4R 5'- CAAGGAGATAATTGTGAAAGGTGA -3'

ADM-Variant-1F 5' - CACCAGATCTACCAGTTCACAGA -3'

ADM-Variant-1R 5' - ACCTGAGCAAGGCTAAGGAAG -3'

CD200-Variant-1F 5' - TTGAAAAGGGAAAAATGTCTGA -3'

CD200-Variant-1R 5' - AATTGGAATGGAGAATCTGGA -3'

CD200-Variant-2F 5' - ATATTTCTCTGGCATCACGTAG -3'

CD200-Variant-2R 5' - GACCCTTTCTGTGGTTAAAATC -3'

CD200-Variant-3F 5' - TTTGTACTAGGCCAGTCTCCAT -3'

CD200-Variant-3R 5' - CCCCATTTCTTTCTCAAATAGA -3'

CD200-Variant-4F 5' - ACCTTGGCTATCCCATTTGTTA -3'

CD200-Variant-4R 5' - CGACGCATTTTAAAACAGTATC -3'

参考文献

1. Freedman, R., *Schizophrenia*. N Engl J Med, **349**(18): 1738-1749. 2003.
2. van Os, J., G. Kenis, and B.P. Rutten, *The environment and schizophrenia*. Nature, **468**(7321): 203-212. 2010.
3. McGrath, J., S. Saha, J. Welham, O. El Saadi, C. MacCauley, and D. Chant, *A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology*. BMC Med, **2**: 13. 2004.
4. Saha, S., D. Chant, J. Welham, and J. McGrath, *A systematic review of the prevalence of schizophrenia*. PLoS Med, **2**(5): e141. 2005.
5. Siris, S.G., *Suicide and schizophrenia*. J Psychopharmacol, **15**(2): 127-135. 2001.
6. Saha, S., D. Chant, and J. McGrath, *A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time?* Arch Gen Psychiatry, **64**(10): 1123-1131. 2007.
7. van Os, J. and S. Kapur, *Schizophrenia*. Lancet, **374**(9690): 635-645. 2009.
8. Insel, T.R., *Rethinking schizophrenia*. Nature, **468**(7321): 187-193. 2010.

9. Buckley, P.F. and S.M. Stahl, *Pharmacological treatment of negative symptoms of schizophrenia: therapeutic opportunity or cul-de-sac?* Acta Psychiatr Scand, **115**(2): 93-100. 2007.
10. Goff, D.C., M. Hill, and D. Barch, *The treatment of cognitive impairment in schizophrenia.* Pharmacol Biochem Behav, **99**(2): 245-253. 2011.
11. McNeil, T.F., *Perinatal risk factors and schizophrenia: selective review and methodological concerns.* Epidemiol Rev, **17**(1): 107-112. 1995.
12. Saha, S., D.C. Chant, J.L. Welham, and J.J. McGrath, *The incidence and prevalence of schizophrenia varies with latitude.* Acta Psychiatr Scand, **114**(1): 36-39. 2006.
13. Linszen, D.H., P.M. Dingemans, and M.E. Lenior, *Cannabis abuse and the course of recent-onset schizophrenic disorders.* Arch Gen Psychiatry, **51**(4): 273-279. 1994.
14. Krabbendam, L. and J. van Os, *Schizophrenia and urbanicity: a major environmental influence--conditional on genetic risk.* Schizophr Bull, **31**(4): 795-799. 2005.
15. Roick, C., A. Fritz-Wieacker, H. Matschinger, D. Heider, J. Schindler, S. Riedel-Heller, and M.C. Angermeyer, *Health habits of patients with*

- schizophrenia*. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol, **42**(4): 268-276. 2007.
16. Chan, S.W., *Global perspective of burden of family caregivers for persons with schizophrenia*. Arch Psychiatr Nurs, **25**(5): 339-349. 2011.
 17. Sullivan, P.F., K.S. Kendler, and M.C. Neale, *Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies*. Arch Gen Psychiatry, **60**(12): 1187-1192. 2003.
 18. Lichtenstein, P., B.H. Yip, C. Bjork, Y. Pawitan, T.D. Cannon, P.F. Sullivan, and C.M. Hultman, *Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study*. Lancet, **373**(9659): 234-239. 2009.
 19. Risch, N. and K. Merikangas, *The future of genetic studies of complex human diseases*. Science, **273**(5281): 1516-1517. 1996.
 20. Kennedy, J.L., L.A. Giuffra, H.W. Moises, L.L. Cavalli-Sforza, A.J. Pakstis, J.R. Kidd, C.M. Castiglione, B. Sjogren, L. Wetterberg, and K.K. Kidd, *Evidence against linkage of schizophrenia to markers on chromosome 5 in a northern Swedish pedigree*. Nature, **336**(6195): 167-170. 1988.
 21. Freedman, R., H. Coon, M. Myles-Worsley, A. Orr-Urtreger, A. Olincy, A. Davis, M. Polymeropoulos, J. Holik, J. Hopkins, M. Hoff, J. Rosenthal, M.C. Waldo, F.

- Reimherr, P. Wender, J. Yaw, D.A. Young, C.R. Breese, C. Adams, D. Patterson, L.E. Adler, L. Kruglyak, S. Leonard, and W. Byerley, *Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, **94**(2): 587-592. 1997.
22. Allen, N.C., S. Bagade, M.B. McQueen, J.P. Ioannidis, F.K. Kavvoura, M.J. Khoury, R.E. Tanzi, and L. Bertram, *Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database*. Nat Genet, **40**(7): 827-834. 2008.
23. Consortium., S.P.G.-W.A.S., *Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci*. Nat Genet, **43**(10): 969-976. 2011.
24. Ripke, S., C. O'Dushlaine, K. Chambert, J.L. Moran, A.K. Kahler, S. Akterin, S.E. Bergen, A.L. Collins, J.J. Crowley, M. Fromer, Y. Kim, S.H. Lee, P.K. Magnusson, N. Sanchez, E.A. Stahl, S. Williams, N.R. Wray, K. Xia, F. Bettella, A.D. Borglum, B.K. Bulik-Sullivan, P. Cormican, N. Craddock, C. de Leeuw, N. Durmishi, M. Gill, V. Golimbet, M.L. Hamshere, P. Holmans, D.M. Hougaard, K.S. Kendler, K. Lin, D.W. Morris, O. Mors, P.B. Mortensen, B.M. Neale, F.A. O'Neill, M.J. Owen, M.P. Milovancevic, D. Posthuma, J. Powell, A.L. Richards, B.P. Riley, D. Ruderfer, D. Rujescu, E. Sigurdsson, T. Silagadze, A.B. Smit, H.

Stefansson, S. Steinberg, J. Suvisaari, S. Tosato, M. Verhage, J.T. Walters, D.F.
Levinson, P.V. Gejman, K.S. Kendler, C. Laurent, B.J. Mowry, M.C. O'Donovan,
M.J. Owen, A.E. Pulver, B.P. Riley, S.G. Schwab, D.B. Wildenauer, F.
Dudbridge, P. Holmans, J. Shi, M. Albus, M. Alexander, D. Champion, D. Cohen,
D. Dikeos, J. Duan, P. Eichhammer, S. Godard, M. Hansen, F.B. Lerer, K.Y.
Liang, W. Maier, J. Mallet, D.A. Nertney, G. Nestadt, N. Norton, F.A. O'Neill,
G.N. Papadimitriou, R. Ribble, A.R. Sanders, J.M. Silverman, D. Walsh, N.M.
Williams, B. Wormley, M.J. Arranz, S. Bakker, S. Bender, E. Bramon, D. Collier,
B. Crespo-Facorro, J. Hall, C. Iyegbe, A. Jablensky, R.S. Kahn, L. Kalaydjieva,
S. Lawrie, C.M. Lewis, K. Lin, D.H. Linszen, I. Mata, A. McIntosh, R.M.
Murray, R.A. Ophoff, J. Powell, D. Rujescu, J. Van Os, M. Walshe, M. Weisbrod,
D. Wiersma, P. Donnelly, I. Barroso, J.M. Blackwell, E. Bramon, M.A. Brown,
J.P. Casas, A.P. Corvin, P. Deloukas, A. Duncanson, J. Jankowski, H.S. Markus,
C.G. Mathew, C.N. Palmer, R. Plomin, A. Rautanen, S.J. Sawcer, R.C. Trembath,
A.C. Viswanathan, N.W. Wood, C.C. Spencer, G. Band, C. Bellenguez, C.
Freeman, G. Hellenthal, E. Giannoulatou, M. Pirinen, R.D. Pearson, A. Strange,
Z. Su, D. Vukcevic, P. Donnelly, C. Langford, S.E. Hunt, S. Ekins, R. Gwilliam,
H. Blackburn, S.J. Bumpstead, S. Dronov, M. Gillman, E. Gray, N. Hammond,

- A. Jayakumar, O.T. McCann, J. Liddle, S.C. Potter, R. Ravindrarajah, M. Ricketts, A. Tashakkori-Ghanbaria, M.J. Waller, P. Weston, S. Widaa, P. Whittaker, I. Barroso, P. Deloukas, C.G. Mathew, J.M. Blackwell, M.A. Brown, A.P. Corvin, M.I. McCarthy, C.C. Spencer, E. Bramon, A.P. Corvin, M.C. O'Donovan, K. Stefansson, E. Scolnick, S. Purcell, S.A. McCarroll, P. Sklar, C.M. Hultman and P.F. Sullivan, *Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia*. *Nat Genet*, **45**(10): 1150-1159. 2013.
25. Consortium., S.W.G.o.t.P.G., *Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci*. *Nature*, **511**(7510): 421-427. 2014.
26. Ng, M.Y., D.F. Levinson, S.V. Faraone, B.K. Suarez, L.E. DeLisi, T. Arinami, B. Riley, T. Paunio, A.E. Pulver, Irmansyah, P.A. Holmans, M. Escamilla, D.B. Wildenauer, N.M. Williams, C. Laurent, B.J. Mowry, L.M. Brzustowicz, M. Maziade, P. Sklar, D.L. Garver, G.R. Abecasis, B. Lerer, M.D. Fallin, H.M. Gurling, P.V. Gejman, E. Lindholm, H.W. Moises, W. Byerley, E.M. Wijsman, P. Forabosco, M.T. Tsuang, H.G. Hwu, Y. Okazaki, K.S. Kendler, B. Wormley, A. Fanous, D. Walsh, F.A. O'Neill, L. Peltonen, G. Nestadt, V.K. Lasseter, K.Y. Liang, G.M. Papadimitriou, D.G. Dikeos, S.G. Schwab, M.J. Owen, M.C. O'Donovan, N. Norton, E. Hare, H. Raventos, H. Nicolini, M. Albus, W. Maier,

- V.L. Nimgaonkar, L. Terenius, J. Mallet, M. Jay, S. Godard, D. Nertney, M. Alexander, R.R. Crowe, J.M. Silverman, A.S. Bassett, M.A. Roy, C. Merette, C.N. Pato, M.T. Pato, J.L. Roos, Y. Kohn, D. Amann-Zalcenstein, G. Kalsi, A. McQuillin, D. Curtis, J. Brynjolfson, T. Sigmundsson, H. Petursson, A.R. Sanders, J. Duan, E. Jazin, M. Myles-Worsley, M. Karayiorgou, and C.M. Lewis, *Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia*. *Mol Psychiatry*, **14**(8): 774-785. 2009.
27. Alaerts, M. and J. Del-Favero, *Searching genetic risk factors for schizophrenia and bipolar disorder: learn from the past and back to the future*. *Hum Mutat*, **30**(8): 1139-1152. 2009.
28. Sanders, A.R., J. Duan, D.F. Levinson, J. Shi, D. He, C. Hou, G.J. Burrell, J.P. Rice, D.A. Nertney, A. Olincy, P. Rozic, S. Vinogradov, N.G. Buccola, B.J. Mowry, R. Freedman, F. Amin, D.W. Black, J.M. Silverman, W.F. Byerley, R.R. Crowe, C.R. Cloninger, M. Martinez, and P.V. Gejman, *No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics*. *Am J Psychiatry*, **165**(4): 497-506. 2008.
29. Lee, S.H., T.R. DeCandia, S. Ripke, J. Yang, P.F. Sullivan, M.E. Goddard, M.C.

- Keller, P.M. Visscher, and N.R. Wray, *Estimating the proportion of variation in susceptibility to schizophrenia captured by common SNPs*. *Nat Genet*, **44**(3): 247-250. 2012.
30. van Dongen, J. and D.I. Boomsma, *The evolutionary paradox and the missing heritability of schizophrenia*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **162B**(2): 122-136. 2013.
31. Pritchard, J.K., *Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases?* *Am J Hum Genet*, **69**(1): 124-137. 2001.
32. Bassett, A.S., C.R. Marshall, A.C. Lionel, E.W. Chow, and S.W. Scherer, *Copy number variations and risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome*. *Hum Mol Genet*, **17**(24): 4045-4053. 2008.
33. Oskarsdottir, S., M. Vujic, and A. Fasth, *Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden*. *Arch Dis Child*, **89**(2): 148-151. 2004.
34. Xu, B., I. Ionita-Laza, J.L. Roos, B. Boone, S. Woodrick, Y. Sun, S. Levy, J.A. Gogos, and M. Karayiorgou, *De novo gene mutations highlight patterns of genetic and neural complexity in schizophrenia*. *Nat Genet*, **44**(12): 1365-1369. 2012.

35. Fromer, M., A.J. Pocklington, D.H. Kavanagh, H.J. Williams, S. Dwyer, P. Gormley, L. Georgieva, E. Rees, P. Palta, D.M. Ruderfer, N. Carrera, I. Humphreys, J.S. Johnson, P. Roussos, D.D. Barker, E. Banks, V. Milanova, S.G. Grant, E. Hannon, S.A. Rose, K. Chambert, M. Mahajan, E.M. Scolnick, J.L. Moran, G. Kirov, A. Palotie, S.A. McCarroll, P. Holmans, P. Sklar, M.J. Owen, S.M. Purcell, and M.C. O'Donovan, *De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks*. *Nature*, **506**(7487): 179-184. 2014.
36. Purcell, S.M., J.L. Moran, M. Fromer, D. Ruderfer, N. Solovieff, P. Roussos, C. O'Dushlaine, K. Chambert, S.E. Bergen, A. Kahler, L. Duncan, E. Stahl, G. Genovese, E. Fernandez, M.O. Collins, N.H. Komiyama, J.S. Choudhary, P.K. Magnusson, E. Banks, K. Shakir, K. Garimella, T. Fennell, M. DePristo, S.G. Grant, S.J. Haggarty, S. Gabriel, E.M. Scolnick, E.S. Lander, C.M. Hultman, P.F. Sullivan, S.A. McCarroll, and P. Sklar, *A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia*. *Nature*, **506**(7487): 185-190. 2014.
37. Borgwardt, S.J., M.M. Picchioni, U. Ettinger, T. Touloupoulou, R. Murray, and P.K. McGuire, *Regional gray matter volume in monozygotic twins concordant and discordant for schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, **67**(10): 956-964. 2010.
38. Lutkenhoff, E.S., T.G. van Erp, M.A. Thomas, S. Therman, M. Manninen, M.O.

- Huttunen, J. Kaprio, J. Lonnqvist, J. O'Neill, and T.D. Cannon, *Proton MRS in twin pairs discordant for schizophrenia*. *Mol Psychiatry*, **15**(3): 308-318. 2010.
39. Nenadic, I., K. Langbein, M. Weisbrod, R. Maitra, R. Rzanny, A. Gussew, J.R. Reichenbach, H. Sauer, and S. Smesny, *31P-MR spectroscopy in monozygotic twins discordant for schizophrenia or schizoaffective disorder*. *Schizophr Res*, **134**(2-3): 296-297. 2012.
40. Singh, S.M. and R. O'Reilly, *(Epi)genomics and neurodevelopment in schizophrenia: monozygotic twins discordant for schizophrenia augment the search for disease-related (epi)genomic alterations*. *Genome*, **52**(1): 8-19. 2009.
41. Tsujita, T., N. Niikawa, H. Yamashita, A. Imamura, A. Hamada, Y. Nakane, and Y. Okazaki, *Genomic discordance between monozygotic twins discordant for schizophrenia*. *Am J Psychiatry*, **155**(3): 422-424. 1998.
42. McDonald, P., M. Lewis, B. Murphy, R. O'Reilly, and S.M. Singh, *Appraisal of genetic and epigenetic congruity of a monozygotic twin pair discordant for schizophrenia*. *J Med Genet*, **40**(2): E16. 2003.
43. Kakiuchi, C., M. Ishiwata, S. Nanko, N. Ozaki, N. Iwata, T. Umekage, M. Tochigi, K. Kohda, T. Sasaki, A. Imamura, Y. Okazaki, and T. Kato, *Up-regulation of ADM and SEPX1 in the lymphoblastoid cells of patients in*

- monozygotic twins discordant for schizophrenia. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **147B**(5): 557-564. 2008.
44. Tsang, T.M., J.T. Huang, E. Holmes, and S. Bahn, *Metabolic profiling of plasma from discordant schizophrenia twins: correlation between lipid signals and global functioning in female schizophrenia patients. J Proteome Res*, **5**(4): 756-760. 2006.
45. Kakiuchi, C., K. Iwamoto, M. Ishiwata, M. Bundo, T. Kasahara, I. Kusumi, T. Tsujita, Y. Okazaki, S. Nanko, H. Kunugi, T. Sasaki, and T. Kato, *Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. Nat Genet*, **35**(2): 171-175. 2003.
46. Matigian, N., L. Windus, H. Smith, C. Filippich, C. Pantelis, J. McGrath, B. Mowry, and N. Hayward, *Expression profiling in monozygotic twins discordant for bipolar disorder reveals dysregulation of the WNT signalling pathway. Mol Psychiatry*, **12**(9): 815-825. 2007.
47. Baranzini, S.E., J. Mudge, J.C. van Velkinburgh, P. Khankhanian, I. Khrebtukova, N.A. Miller, L. Zhang, A.D. Farmer, C.J. Bell, R.W. Kim, G.D. May, J.E. Woodward, S.J. Caillier, J.P. McElroy, R. Gomez, M.J. Pando, L.E. Clendenen, E.E. Ganusova, F.D. Schilkey, T. Ramaraj, O.A. Khan, J.J. Huntley,

- S. Luo, P.Y. Kwok, T.D. Wu, G.P. Schroth, J.R. Oksenberg, S.L. Hauser, and S.F. Kingsmore, *Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis*. *Nature*, **464**(7293): 1351-1356. 2010.
48. Glatt, S.J., I.P. Everall, W.S. Kremen, J. Corbeil, R. Sasik, N. Khanlou, M. Han, C.C. Liew, and M.T. Tsuang, *Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(43): 15533-15538. 2005.
49. Huang, C.H., M.L. Chen, Y.L. Tsai, M.T. Tsai, and C.H. Chen, *Elevated adrenomedullin mRNA in lymphoblastoid cells from schizophrenic patients*. *Neuroreport*, **15**(9): 1443-1446. 2004.
50. Zoroglu, S.S., H. Herken, M. Yurekli, E. Uz, H. Tutkun, H.A. Savas, C. Bagci, M.E. Ozen, B. Cengiz, E.A. Cakmak, M.I. Dogru, and O. Akyol, *The possible pathophysiological role of plasma nitric oxide and adrenomedullin in schizophrenia*. *J Psychiatr Res*, **36**(5): 309-315. 2002.
51. Kitamura, K., K. Kangawa, M. Kawamoto, Y. Ichiki, S. Nakamura, H. Matsuo, and T. Eto, *Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, **192**(2): 553-560. 1993.
52. Kitamura, K., J. Sakata, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, and T. Eto,

- Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin.* Biochem Biophys Res Commun, **194**(2): 720-725. 1993.
53. Zudaire, E., A. Martinez, L.L. Ozbun, and F. Cuttitta, *Characterization of adrenomedullin in non-human primates.* Biochem Biophys Res Commun, **321**(4): 859-869. 2004.
54. Lopez, J. and A. Martinez, *Cell and molecular biology of the multifunctional peptide, adrenomedullin.* Int Rev Cytol, **221**: 1-92. 2002.
55. Fernandez, A.P., J. Serrano, L. Tessarollo, F. Cuttitta, and A. Martinez, *Lack of adrenomedullin in the mouse brain results in behavioral changes, anxiety, and lower survival under stress conditions.* Proc Natl Acad Sci U S A, **105**(34): 12581-12586. 2008.
56. Igarashi, K., T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, H. Kawate, A. Yamauchi, Y. Toriyama, M. Tanaka, T. Liu, X. Xian, A. Imai, L. Zhai, S. Owa, T. Koyama, R. Uetake, M. Ihara, and T. Shindo, *Pathophysiological roles of adrenomedullin-RAMP2 system in acute and chronic cerebral ischemia.* Peptides, **62**: 21-31. 2014.
57. Ishimitsu, T., H. Ono, J. Minami, and H. Matsuoka, *Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders.*

- Pharmacol Ther, **111**(3): 909-927. 2006.
58. Miyashita, K., H. Itoh, H. Arai, T. Suganami, N. Sawada, Y. Fukunaga, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi-Kobayashi, K. Park, N. Oyamada, N. Sawada, D. Taura, H. Tsujimoto, T.H. Chao, N. Tamura, M. Mukoyama, and K. Nakao, *The neuroprotective and vasculo-neuro-regenerative roles of adrenomedullin in ischemic brain and its therapeutic potential*. Endocrinology, **147**(4): 1642-1653. 2006.
59. Yilmaz, N., H. Herken, H.K. Cicek, A. Celik, M. Yurekli, and O. Akyol, *Increased levels of nitric oxide, cortisol and adrenomedullin in patients with chronic schizophrenia*. Med Princ Pract, **16**(2): 137-141. 2007.
60. Akpınar, A., G.B. Yaman, A. Demirdas, and S. Onal, *Possible role of adrenomedullin and nitric oxide in major depression*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, **46**: 120-125. 2013.
61. Savas, H.A., H. Herken, M. Yurekli, E. Uz, H. Tutkun, S.S. Zoroglu, M.E. Ozen, B. Cengiz, and O. Akyol, *Possible role of nitric oxide and adrenomedullin in bipolar affective disorder*. Neuropsychobiology, **45**(2): 57-61. 2002.
62. Zoroglu, S.S., M. Yurekli, I. Meram, S. Sogut, H. Tutkun, O. Yetkin, E. Sivasli, H.A. Savas, M. Yanik, H. Herken, and O. Akyol, *Pathophysiological role of*

- nitric oxide and adrenomedullin in autism. Cell Biochem Funct, 21(1): 55-60. 2003.*
63. Huang, J., R.H. Perlis, P.H. Lee, A.J. Rush, M. Fava, G.S. Sachs, J. Lieberman, S.P. Hamilton, P. Sullivan, P. Sklar, S. Purcell, and J.W. Smoller, *Cross-disorder genomewide analysis of schizophrenia, bipolar disorder, and depression. Am J Psychiatry, 167(10): 1254-1263. 2010.*
64. Oken, R.J. and M. Schulzer, *At issue: schizophrenia and rheumatoid arthritis: the negative association revisited. Schizophr Bull, 25(4): 625-638. 1999.*
65. Mors, O., P.B. Mortensen, and H. Ewald, *A population-based register study of the association between schizophrenia and rheumatoid arthritis. Schizophr Res, 40(1): 67-74. 1999.*
66. Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, F. O'Valle, and M. Delgado, *Adrenomedullin protects from experimental arthritis by down-regulating inflammation and Th1 response and inducing regulatory T cells. Am J Pathol, 170(1): 263-271. 2007.*
67. Lee, B.C., Z. Peterfi, F.W. Hoffmann, R.E. Moore, A. Kaya, A. Avanesov, L. Tarrago, Y. Zhou, E. Weerapana, D.E. Fomenko, P.R. Hoffmann, and V.N. Gladyshev, *MsrB1 and MICALs regulate actin assembly and macrophage function via reversible stereoselective methionine oxidation. Mol Cell, 51(3):*

- 397-404. 2013.
68. Hoek, R.M., S.R. Ruuls, C.A. Murphy, G.J. Wright, R. Goddard, S.M. Zurawski, B. Blom, M.E. Homola, W.J. Streit, M.H. Brown, A.N. Barclay, and J.D. Sedgwick, *Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200)*. Science, **290**(5497): 1768-1771. 2000.
69. Biber, K., H. Neumann, K. Inoue, and H.W. Boddeke, *Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia*. Trends Neurosci, **30**(11): 596-602. 2007.
70. Lawson, L.J., V.H. Perry, P. Dri, and S. Gordon, *Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain*. Neuroscience, **39**(1): 151-170. 1990.
71. Bessis, A., C. Bechade, D. Bernard, and A. Roumier, *Microglial control of neuronal death and synaptic properties*. Glia, **55**(3): 233-238. 2007.
72. Vivekanantham, S., S. Shah, R. Dewji, A. Dewji, C. Khatri, and R. Ologunde, *Neuroinflammation in Parkinson's disease: role in neurodegeneration and tissue repair*. Int J Neurosci: 1-17. 2014.
73. Block, M.L. and J.S. Hong, *Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism*. Prog Neurobiol, **76**(2): 77-98. 2005.

74. Nawa, H., M. Takahashi, and P.H. Patterson, *Cytokine and growth factor involvement in schizophrenia--support for the developmental model*. Mol Psychiatry, **5**(6): 594-603. 2000.
75. Soderlund, J., J. Schroder, C. Nordin, M. Samuelsson, L. Walther-Jallow, H. Karlsson, S. Erhardt, and G. Engberg, *Activation of brain interleukin-1beta in schizophrenia*. Mol Psychiatry, **14**(12): 1069-1071. 2009.
76. Bian, Q., T. Kato, A. Monji, S. Hashioka, Y. Mizoguchi, H. Horikawa, and S. Kanba, *The effect of atypical antipsychotics, perospirone, ziprasidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon-gamma*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, **32**(1): 42-48. 2008.
77. Kato, T., Y. Mizoguchi, A. Monji, H. Horikawa, S.O. Suzuki, Y. Seki, T. Iwaki, S. Hashioka, and S. Kanba, *Inhibitory effects of aripiprazole on interferon-gamma-induced microglial activation via intracellular Ca²⁺ regulation in vitro*. J Neurochem, **106**(2): 815-825. 2008.
78. Kato, T., A. Monji, S. Hashioka, and S. Kanba, *Risperidone significantly inhibits interferon-gamma-induced microglial activation in vitro*. Schizophr Res, **92**(1-3): 108-115. 2007.
79. Ren, Y., B. Yang, Y. Yin, X. Leng, Y. Jiang, L. Zhang, Y. Li, X. Li, F. Zhang, W.

- He, X. Zhang, and X. Cao, *Aberrant CD200/CD200R1 expression and its potential role in Th17 cell differentiation, chemotaxis and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford). 2014.
80. Kato, T., M. Ishiwata, and T. Nagai, *Mitochondrial calcium response in human transformed lymphoblastoid cells*. Life Sci, **71**(5): 581-590. 2002.
81. Raudenbush, S.W. and A.S. Bryk, *Hierarchical linear models: Applications and data analysis methods*. Vol. 1. Sage. 2002,
82. Rollins, B., M.V. Martin, L. Morgan, and M.P. Vawter, *Analysis of whole genome biomarker expression in blood and brain*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, **153B**(4): 919-936. 2010.
83. Meziani, R., R. Yamada, M. Takahashi, K. Ohigashi, A. Morinobu, C. Terao, H. Hiratani, K. Ohmura, M. Yamaguchi, T. Nomura, A. Vasilescu, M. Kokubo, V. Renault, K. Hirose, C. Ratanajaraya, S. Heath, T. Mimori, S. Sakaguchi, M. Lathrop, I. Melchers, S. Kumagai, and F. Matsuda, *A trans-ethnic genetic study of rheumatoid arthritis identified FCGR2A as a candidate common risk factor in Japanese and European populations*. Mod Rheumatol, **22**(1): 52-58. 2012.
84. Van Kuilenburg, A.B., P. Vreken, N.G. Abeling, H.D. Bakker, R. Meinsma, H. Van Lenthe, R.A. De Abreu, J.A. Smeitink, H. Kayserili, M.Y. Apak, E.

- Christensen, I. Holopainen, K. Pulkki, D. Riva, G. Botteon, E. Holme, M. Tulinius, W.J. Kleijer, F.A. Beemer, M. Duran, K.E. Niezen-Koning, G.P. Smit, C. Jakobs, L.M. Smit, A.H. Van Gennip, and et al., *Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency*. Hum Genet, **104**(1): 1-9. 1999.
85. Ezzeldin, H. and R. Diasio, *Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, a pharmacogenetic syndrome associated with potentially life-threatening toxicity following 5-fluorouracil administration*. Clin Colorectal Cancer, **4**(3): 181-189. 2004.
86. Shen, W., S. Mennerick, D.F. Covey, and C.F. Zorumski, *Pregnenolone sulfate modulates inhibitory synaptic transmission by enhancing GABA(A) receptor desensitization*. J Neurosci, **20**(10): 3571-3579. 2000.
87. Ogita, K., T. Suzuki, and Y. Yoneda, *Strychnine-insensitive binding of [3H]glycine to synaptic membranes in rat brain, treated with Triton X-100*. Neuropharmacology, **28**(11): 1263-1270. 1989.
88. Tiedje, K.E., K. Stevens, S. Barnes, and D.F. Weaver, *Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter*. Neurochem Int, **57**(3): 177-188. 2010.
89. Shaul, Y.D., E. Freinkman, W.C. Comb, J.R. Cantor, W.L. Tam, P. Thiru, D. Kim,

- N. Kanarek, M.E. Pacold, W.W. Chen, B. Bierie, R. Possemato, F. Reinhardt, R.A. Weinberg, M.B. Yaffe, and D.M. Sabatini, *Dihydropyrimidine accumulation is required for the epithelial-mesenchymal transition*. *Cell*, **158**(5): 1094-1109. 2014.
90. Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y. Huang, and M.A. Nieto, *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell*, **139**(5): 871-890. 2009.
91. Scambler, P.J., *The 22q11 deletion syndromes*. *Hum Mol Genet*, **9**(16): 2421-2426. 2000.
92. Levin, Y., L. Wang, E. Schwarz, D. Koethe, F.M. Leweke, and S. Bahn, *Global proteomic profiling reveals altered proteomic signature in schizophrenia serum*. *Mol Psychiatry*, **15**(11): 1088-1100. 2010.
93. Song, F., A. Poljak, N.A. Kochan, M. Raftery, H. Brodaty, G.A. Smythe, and P.S. Sachdev, *Plasma protein profiling of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease using iTRAQ quantitative proteomics*. *Proteome Sci*, **12**(1): 5. 2014.