

## 論文の内容の要旨

論文題目 日本人統合失調症患者における NMDA 受容体機能低下仮説に基づく候補遺伝子解析

氏名 吉川 茜

### [序文]

統合失調症は、主に思春期から青年期にかけて発症し、幻覚妄想状態などの陽性症状や、感情の平板化、引きこもりなどの陰性症状、認知機能障害、を呈し慢性に経過する、罹患率の高い精神疾患である。

病態仮説として、N-methyl-D-aspartate 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) の非競合性拮抗薬フェンサイクリジンが、疾患と酷似した精神症状を引き起こすことから、NMDA 受容体機能低下仮説が支持されてきた。しかし、本受容体に機能低下をもたらすメカニズムや思春期発症の分子基盤は、未だ解明されていない。臨床疫学的研究からは、本疾患の発症への遺伝要因の関与が示され、近年では頻度の高い多型に加え、疾患発症への寄与度の高い可能性のある稀な変異の関与も注目されている。

そこで本研究では、以下の背景から、グリシン開裂系遺伝子群 (研究【1】)、NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群 (研究【2】) を候補とし、統合失調症病態への関与について検討を行った。

### 研究【1】 グリシン開裂系:

グリシン開裂系は、GLDC、AMT、GCSH、DLD より構成されるグリシンの代謝系であるが、脳内では、NMDA 受容体と共局在し、同受容体機能を制御することが示唆された。同系遺伝子の変異あるいは *GLDC* エクソン欠失による機能喪失は常染色体劣性遺伝病であるグリシン脳症を引き起こし、典型例は新生児早期に死亡するが、非典型例は遅発性に精神症状を呈する症例が存在する。

### 研究【2】 NMDA 受容体スイッチング:

統合失調症の好発時期である思春期前から思春期にかけて、本疾患において機能低下が想定されている NMDA 受容体の構造は、NR2B 優位から NR2A 優位へと劇的に変化する。患者死後脳では NR2B mRNA 発現増加及び NR2A mRNA 発現低下が報告され、一部の抗精神病薬が NR2A / NR2B 比を上昇させることから、スイッチング制御不全が病態に関与する可能性を想定した。スイッチングは NR2B の年齢依存性リン酸化により制御され、CK2、EphB2、Cdk5 が関与する。

## [目的]

### **研究【1】: 統合失調症病態におけるグリシン開裂系関与の検討**

グリシン開裂系遺伝子群 (*GLDC*, *AMT*, *GCSH*, *DLD*) について、**1.** 全コーディング領域の配列解析及び *GLDC* のエクソン欠失解析を行い、**1-1.** 精神症状を呈する症例も存在する非典型グリシン脳症が統合失調症と診断されている症例に含まれている可能性、**1-2.** 稀な変異及び多型と疾患との遺伝学的関連、を検討し、**2.** 稀な変異については、メタボローム解析を行い、代謝産物と臨床指標との関連を検討する。

### **研究【2】: NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群と統合失調症の遺伝学的検討**

NMDA 受容体スイッチング遺伝子群 (*CSNK2A1*, *EphB2*, *Cdk5*) について稀な変異及び多型と疾患との遺伝学的関連を検討する。

## [対象と方法]

**研究【1】:** 遺伝学的解析は、東京大学医学部附属病院精神神経科及び関連施設で収集された日本人統合失調症患者 474 名、及び健常対照者 475 名を対象とし、全コーディング領域及びスプライス部位の配列解析、MLPA 法による *GLDC* エクソン欠失解析を行った。配列解析は、次世代シーケンサーMiSeq (Illumina) により、TruSeq Custom Amplicon を用いて行った。アンプリコン設計困難領域/低カバレッジ領域の配列解析、及び次世代シーケンサーによる配列解析結果の確認はサンガー法で行った。メタボローム解析は血漿が採取可能であったグリシン開裂系遺伝子群の変異保持患者 5 名及び健常者 5 名を対象とし、CE-TOFMS 法により行った。また、代謝産物相対値と、PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale : 陽性・陰性症状評価尺度) による臨床症状との相関を検討した。

**研究【2】:** *CSNK2A1*, *EphB2*, *Cdk5* の全コーディング領域及びスプライス部位について、研究【1】と同様の対象及び方法により、配列解析を行い、稀な変異及び多型と疾患との遺伝学的関連を検討した。

## [結果]

**研究【1】:** DNA の Quality 不良と判断された患者 8 検体及び健常者 12 検体を除外し、患者 466 名及び健常者 463 名を解析した。

**1-1.** 配列解析結果及び *GLDC* エクソン欠失解析結果から、非典型グリシン脳症が統合失調症と診断されている症例に含まれている可能性を検討した。グリシン脳症の既報の原因変異と照合したところ、患者及び健常者 1 名ずつに R410K をヘテロ接合体で認めたが、*GLDC* エクソン欠失は認めず、本研究の対象患者群では可能性は否定的であった。

- 1-2. 稀な非同義置換及びスプライス部位の変異と疾患との関連について、健常者群で MAF0.5% 未満の変異総数を患者群と健常群間で比較したが、いずれの遺伝子においても有意差は認められなかった (*GLDC* :  $p = 1.000$ 、*AMT* :  $p = 0.419$ 、*GCSH* :  $p = 0.624$ 、*DLG* :  $p = 0.725$ )。また、その他の変異及び多型解析は次世代シーケンサーの出力結果を用いたが、疾患との関連は明らかではなかった。なお、次世代シーケンサーの出力データについては、サンガー法で再現性を確認した 1,078 個の結果から作成した ROC 曲線に基づき設定した PASS / LowGQ を満たしかつ Depth>21 のものを用いた。
- 1-3. 見出された稀な変異を詳細に検討したところ、患者群では非典型グリシン脳症の原因変異の隣のアミノ酸置換を伴う変異 (*GLDC* A203V 1名、*GLDC* S801N 2名)、ヘテロ接合体で神経管欠損症の原因の可能性が示唆されている変異 (*GLDC* G825D 2名)、ナンセンス変異 (*AMT* R253X 1名)、を認めた。
2. メタボローム解析では、稀な非同義置換 (*GLDC* : T119I、A203V、V685M、S801N、*DLG* P39L) をヘテロ接合体で保持する患者血漿で、170 の候補代謝産物中 3 代謝産物の有意な上昇が認められた (5-オキソプロリン: 患者  $0.0065 \pm 0.0013$  (平均値 $\pm$ 標準偏差)、健常者  $0.0014 \pm 0.00032$ 、 $p = 9.4 \times 10^{-5}$ 、アスパラギン酸: 患者  $0.0033 \pm 0.00044$ 、健常者  $0.00095 \pm 0.00039$ 、 $p = 4.3 \times 10^{-5}$ 、L-グルタミン酸: 患者  $0.097 \pm 0.0050$ 、健常者  $0.0120 \pm 0.024$ 、 $p = 1.3 \times 10^{-4}$ 、多重検定補正後有意水準  $p < 0.05 / 170 = 2.9 \times 10^{-4}$ )。また、各代謝産物と PANSS による臨床症状評価との相関を調べたところ、アスパラギン酸では、陰性症状との間に有意な負の相関が認められた ( $r = -0.942$ 、 $p = 0.0166$ )。

**研究【2】:** *CSNK2A1*、*EphB2*、*Cdk5* の稀な変異総数及び多型の解析では疾患との明らかな関連は認められなかったが、*Cdk5* では、患者のみで 4 つの稀な変異 (R200Q、P253S、P273T、Exon12 5' splice +4) を認めた。

#### [考察]

**研究【1】:** グリシン開裂系遺伝子群と統合失調症との遺伝学的解析では、非典型グリシン脳症が統合失調症と診断されている症例に含まれている可能性は本研究の対象患者では否定的であったが、患者群では、非典型グリシン脳症の原因変異近傍の変異や、本症と疫学的関連が示唆され、病態基盤を一部共有する可能性のある神経管欠損症の原因変異の可能性が示唆される変異、ナンセンス変異という機能的影響の可能性のある変異が認められたことは興味深い。また、メタボローム解析から、変異保持患者で上昇が見出された L-グルタミン酸及びアスパラギン酸、グルタミン酸の前駆物質 5-オキソプロリンは、いずれも NMDA 受容体機能に関わる可能性がある。また、陰性症状との間に相関が認めら

れたアスパラギン酸は先行研究においても治療抵抗性統合失調症治療薬クロザピンによる陰性症状改善との相関が報告されており、変異保持患者では、アスパラギン酸の濃度上昇が、陰性症状の軽減に影響していた可能性が考えられた。

**研究【2】:** NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群と統合失調症との遺伝学的解析では、有意ではなかったが、海外の全エクソン解析結果と同様、*Cdk5* で患者群のみに稀な変異を見出し、興味深い候補遺伝子と考えられ、大規模検体における検証が必要と考えられた。

## [結語]

本研究は NMDA 受容体機能低下仮説に基づき、グリシン開裂系遺伝子群と NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群の病態への関与を検討した。グリシン開裂系遺伝子群の検討において、遺伝学的解析では、非典型グリシン脳症が統合失調症と診断されている症例に含まれている可能性は本研究の対象患者では否定的で、稀な変異及び多型と疾患との関連は明らかではなかったが、患者群では非典型グリシン脳症の原因変異の隣のアミノ酸置換を伴う変異など 6 名で興味深い変異が認められた。また、メタボローム解析では変異保持患者の血漿で NMDA 受容体機能に関わりうる 3 代謝産物の上昇を認め、アスパラギン酸と陰性症状の間に負の相関を見出した。NMDA 受容体スイッチング制御遺伝子群の遺伝学的解析では、海外の統合失調症患者における全エクソン解析結果と同様、*Cdk5* で患者のみに稀な新規変異を認めた。これらの結果は、NMDA 受容体機能低下仮説に基づく検討を今後もすすめていくことが病態解明に資する可能性を支持すると考えられた。