



# Haplotypes in the expression quantitative trait locus of interleukin-1 $\beta$ gene are associated with schizophrenia

吉田, 正邦

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5861

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005861>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

Haplotypes in the expression quantitative trait locus of interleukin-1 $\beta$  gene  
are associated with schizophrenia  
インターロイキン 1 $\beta$  遺伝子の eQTL におけるハプロタイプは統合失調症と関連する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
精神医学  
(指導教員：戸田 達史 教授)

吉田 正邦

## [概要]

統合失調症は全世界で有病率が 1% である精神障害であり、遺伝因子と環境要因によって起こるといわれているがその原因はまだ解明されておらず、明らかに原因があると断定された遺伝子や遺伝子変異はまだ見つかっていない。

これまでの臨床的知見から、妊娠中のウイルス感染や産科の合併症により、胎児が成長したときの統合失調症の発症リスクが上がるといわれている。このことから遺伝的に免疫反応が強く出る個体では、妊娠期のウイルス感染や産科合併症により統合失調症を発症するリスクがより高まる可能性がある。炎症性サイトカインと統合失調症の関連について多くの報告があるが、結果は一致していない。

インターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) は脳内にも発現する炎症性サイトカインであり、神経細胞の発達や可塑性に関与する。IL-1 $\beta$  遺伝子は染色体 2q.14 上の 400kb にわたる IL-1 gene cluster に位置し、遺伝子関連研究において IL-1 gene cluster と統合失調症の関連について報告があるが、結果は一致していない。

最近の GWAS やマイクロアレイによる脳や細胞株における発現実験の結果から、統合失調症のような遺伝的に複雑な疾患は、GWAS で検出される SNP よりも発現量的形質遺伝子座(eQTL)との関連が強いといわれている。今回、我々は IL-1 $\beta$  のプロモーター領域に位置する eQTL SNP に着目し、日本人の統合失調症について関連研究を行った。また、統合失調症患者群、健常対照群の全血標本を PAXgene Blood RNA System を用いて解析し、eQTL

SNP と IL-1B の mRNA 発現量の関連について比較検討を行った。

#### [対象および方法]

##### (対象)

対象は全て日本人とした。第一患者群として統合失調症患者 528 例 (男性 279 例; 平均年齢±標準偏差 56.4±11.7 歳、女性 249 例; 53.7±13.9 歳)、第二患者群として統合失調症患者 576 例 (男性 322 例; 平均年齢±標準偏差 50.9±14.6 歳、女性 254 例; 52.5±16.5 歳)、第一健常対照群として 709 例 (男性 334 例; 平均年齢±標準偏差 52.5±16.0 歳、女性 375 例; 54.7±15.4 歳)、第二健常対照群として 768 例 (男性 459 例; 平均年齢±標準偏差 47.3±11.8 歳、女性 308 例; 46.5±13.0 歳) を用いた。

##### (SNP 解析)

mRNA by SNP Browser を用いて IL-1B の cis-acting SNP がプロモーター領域に集積していることを確認し、Haploview Software により同領域における 5 つの tagSNP (rs6745746, rs4369864, rs4848306, rs1143623, rs16944) を選定し、解析を行った。患者と健常者の末梢血から DNA を抽出し、TaqMan 法を用いて遺伝子型を決定した。

##### (IL-1B mRNA 発現解析)

第一患者群から寛解期の統合失調症患者 40 名、第一健常対照群から健常対照者 40 名の全血を用い、PAXgene Blood RNA System により RNA を抽出、cDNA に変換しリアルタ

イム PCR により相対定量を行った。

##### (統計)

遺伝子型をコ克蘭・アーミテージ検定、アレル頻度、ハプロタイプ頻度をカイ二乗検定により患者群、健常対照群間で関連の有無を検討した。IL-1B mRNA 発現解析では疾患群と健常対照群の発現量を ANCOVA により比較検討し、遺伝子多型と発現量の関連について重回帰分析により解析を行った。

#### [結果]

##### (eQTL SNP と統合失調症の関連)

5 つの tagSNP において全ての群で Hardy-Weinberg 平衡に適合していた。5 つの tagSNP はいずれも強い連鎖不平衡にあり、これらの SNP の位置する領域に一つの LD ブロックが確認できた。第一群、第二群それぞれの解析では個々の SNP で遺伝子型、アレル頻度に有意差は認めなかった。両群をあわせた解析では、rs4848306、rs1143623、rs16944 の遺伝子型は統合失調症と名目上有意に関連していた ( $p=0.025, 0.041, 0.050$ )。また、アレル頻度においても rs4848306、rs1143623 で名目上有意に関連していた ( $p=0.019, 0.029$ )。しかし並べ替え検定の補正により、いずれも有意差はなくなった。

ハプロタイプ解析では、両群をあわせた解析で CGTCC、TGTC、CGCGT ハプロタイプにおいて統合失調症との関連を認めた (nominally  $p=0.0033, 0.0012, 0.000099$ , corrected  $p=0.029, 0.010, 0.0014$ )。CGTCC ハプロタイプは日本人で最も頻度の高いハプ

ロタイプであり、健常対照群(0.483)の方が疾患群(0.441)よりも頻度が高いことから統合失調症の発症に防御的に働いているものと思われた。TGTC、CGCGT ハプロタイプは疾患群(0.021,0.017)の方が健常対照群(0.010,0.006)よりも頻度が高いことから、統合失調症の発症リスクとなるハプロタイプであると考えられた。

#### (IL1B mRNA 発現解析)

患者群と健常対照群の発現量に有意差はみられなかった。重回帰分析による解析では、IL1B mRNA の発現量と rs4848306 の T アレルに負の相関を認めた。

先行研究では in vitro において rs4848306,rs1143623,rs16944 の 3SNP における TCC ハプロタイプでは CGT,CCT ハプロタイプより IL-1B の mRNA 発現が減少するとの報告がある。このため TCC ハプロタイプを一つ以上持つ群と、CGT と CCT それぞれのホモもしくは両者のヘテロである群に分けて発現量を比較したところ TCC 群では発現量が有意に減少していた( $p=0.048$ )。

#### [考察]

これまでに IL-1B の遺伝子多型と統合失調症について多くの報告があり、メタ解析を含むいくつかの報告で rs16944 と統合失調症の関連がいわれている。しかし、今回解析した 5つのうち4つの SNP で名目上の有意差もしくは有意傾向を認めたものの、補正を行うと有意差はなくなった。この理由としては、統合失調症のような多因子疾患との関連を調べるにはサンプルサイズが小さすぎたことが挙げられる。また、IL-1B 遺伝子の位置する領域

の連鎖不平衡パターンは白人とアジア人では異なっている。このことから、IL-1B 遺伝子における人種間での対立遺伝子異質性が研究間での結果の相違に影響している可能性がある。

先行研究で IL-1B 遺伝子のプロモーター領域の 4 つの SNP が転写活性に影響する機能的 SNP であるが、個々の SNP の転写活性への影響はプロモーター領域の他の SNP のアレルに影響されるとの報告がある。したがって、少なくとも IL-1B 遺伝子においては疾患の原因となり得るのは個々の SNP ではなくハプロタイプである可能性が高い。rs4848306、rs1143623、rs16944 における TCC ハプロタイプでは CCT ハプロタイプに比べて転写活性が減少するとの報告があり、今回の研究で統合失調症の発症に防御的に働くと考えられた CG-TCC ハプロタイプは TCC ハプロタイプを含んでいる。また、TA-CCT ハプロタイプは CCT ハプロタイプを含んでいるが統合失調症との関連はみられなかった。リスクハプロタイプと考えられた CG-CGT ハプロタイプは CGT ハプロタイプを含んでおり、これは CG-TCC ハプロタイプよりも高い転写活性を持つものと考えられる。これらのことから、遺伝的に IL-1B の高い転写活性を持つ個体では、転写活性が平均的もしくは低下している個体と比べて統合失調症の発症リスクが高まる可能性が示唆された。

初発の精神病において血清と脳脊髄液で IL-1B が上昇し、抗精神病薬による治療で正常化するとの報告がある。また、高齢の慢性期統合失調症では健常対照者より血清中の IL-1B が上昇しているとの報告や、統合失調症患者およびその同胞では健常対照者よりも IL-1B mRNA が上昇しているとの報告がある。これらのことから、末梢血での IL-1B mRNA 発

現は遺伝学的に決定されている部分があるものと思われる。これまでの GWAS とヒトリンパ芽球細胞株を用いたマイクロアレイの研究から、eQTL と呼ばれる遺伝子の発現量に関わる遺伝子座が多く報告されており、IL-1B のプロモーター領域もまた eQTL である。今回の結果では統合失調症群と健常対照群に IL-1B mRNA の発現量に有意差は認めなかったが、rs4848306 が IL-1B mRNA 発現量の予測因子になるという点で従来の見解に沿うものであった。

今回の研究の限界点として、サンプルサイズが十分でなかったこと、疾患との関連において、CGTCC の弱い関連は TGTCC と CGCGT の強い関連の影響を受けているかもしれないこと、IL-1B mRNA 発現のデータはサンプルサイズが小さく、発現量に影響し得る喫煙歴を聴取していないという問題があること、IL-1B を蛋白質レベルで測定しておらず、TNF- $\alpha$  などの他のサイトカインも調べていないことなどが挙げられる。

結論として、IL-1B 遺伝子のプロモーター領域におけるハプロタイプは統合失調症の発症に影響する可能性が示唆された。他の人種でも同様の研究がなされることが期待される。

IL-1B 遺伝子の統合失調症への関与についてのさらなる解明は、疾患への治療戦略に寄与するものと思われる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2310号	氏 名	吉田 正邦
論文題目 Title of Dissertation	Haplotypes in the expression quantitative trait locus of interleukin-1 $\beta$ gene are associated with schizophrenia  インターロイキン1 $\beta$ 遺伝子のeQTLにおけるハプロタイプは統合失調症と関連する		
審査委員 Examiner	主 査 西尾久英 Chief Examiner 副 査 平井みどり Vice-examiner 副 査 文田 博生 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

統合失調症は全世界で有病率が1%である精神障害であり、遺伝因子と環境要因によって起こるといわれているがその原因はまだ解明されておらず、明らかに原因があると断定された遺伝子や遺伝子変異はまだ見つかっていない。

これまでの臨床的知見から、妊娠中のウイルス感染や産科的合併症により、胎児が成長したときの統合失調症の発症リスクが上がるといわれている。このことから遺伝的に免疫反応が強く出る個体では、妊娠期のウイルス感染や産科合併症により統合失調症を発症するリスクがより高まる可能性がある。炎症性サイトカインと統合失調症の関連について多くの報告があるが、結果は一致していない。

インターロイキン1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )は脳内にも発現する炎症性サイトカインであり、神経細胞の発達や可塑性に関与する。IL-1 $\beta$ 遺伝子は染色体2q.14.上の400kbにわたるIL-1 gene clusterに位置し、遺伝子関連研究においてIL-1 gene clusterと統合失調症の関連について報告があるが、結果は一致していない。

最近のGWASやマイクロアレイによる脳や細胞株における発現実験の結果から、統合失調症のような遺伝的に複雑な疾患は、GWASで検出されるSNPよりも発現量的形質遺伝子座(eQTL)との関連が強いといわれている。今回、研究者らはIL-1 $\beta$ のプロモーター領域に位置するeQTL SNPに着目し、日本人の統合失調症について関連研究を行った。また、統合失調症患者群、健常対照群の全血標本をPAXgene Blood RNA Systemを用いて解析し、eQTL SNPとIL-1 $\beta$ のmRNA発現量の関連について比較検討を行った。

## 【対象および方法】

## (対象)

対象は全て日本人とした。第一患者群として統合失調症患者528例（男性279例；平均年齢±標準偏差 56.4±11.7歳、女性249例；53.7±13.9歳）、第二患者群として統合失調症患者576例（男性322例；平均年齢±標準偏差 50.9±14.6歳、女性254例；52.5±16.5歳）、第一健常対照群として709例（男性334例；平均年齢±標準偏差 52.5±16.0歳、女性375例；54.7±15.4歳）、第二健常対照群として768例（男性459例；平均年齢±標準偏差 47.3±11.8歳、女性308例；46.5±13.0歳）を用いた。

## (SNP解析)

mRNA by SNP Browserを用いてIL-1 $\beta$ のcis-acting SNPがプロモーター領域に集積していることを確認し、Haploview Softwareにより同領域における5つのtagSNP (rs6745746, rs4369864, rs4848306, rs1143623, rs16944)を選定し、解析を行った。患者と健常者の末梢血からDNAを抽出し、TaqMan法を用いて遺伝子型を決定した。

(IL-1 $\beta$  mRNA発現解析)

第一患者群から寛解期の統合失調症患者40名、第一健常対照群から健常対照者40名の全血を用い、PAXgene Blood RNA SystemによりRNAを抽出、cDNAに変換しリアルタイムPCRにより相対定量を行った。

#### (統計)

遺伝子型をコクラン・アーミテージ検定、アレル頻度、ハプロタイプ頻度をカイ二乗検定により患者群、健常対照群間で関連の有無を検討した。IL-1B mRNA 発現解析では疾患群と健常対照群の発現量を ANCOVA により比較検討し、遺伝子多型と発現量の関連について重回帰分析により解析を行った。

#### [結果]

##### (eQTL SNP と統合失調症の関連)

5つの tagSNP において全ての群で Hardy-Weinberg 平衡に適合していた。5つの tagSNP はいずれも強い連鎖不平衡にあり、これらの SNP の位置する領域に一つの LD ブロックが確認できた。第一群、第二群それぞれの解析では個々の SNP で遺伝子型、アレル頻度に有意差は認めなかった。両群をあわせた解析では、rs4848306、rs1143623、rs16944 の遺伝子型は統合失調症と名目上有意に関連していた( $p=0.025, 0.041, 0.050$ )。また、アレル頻度においても rs4848306、rs1143623 で名目上有意に関連していた( $p=0.019, 0.029$ )。しかし並べ替え検定の補正により、いずれも有意差はなくなった。

ハプロタイプ解析では、両群をあわせた解析で CGTCC、TGTCC、CGCGT ハプロタイプにおいて統合失調症との関連を認めた(nominally  $p=0.0033, 0.0012, 0.000099$ , corrected  $p=0.029, 0.010, 0.0014$ )。CGTCC ハプロタイプは日本人で最も頻度の高いハプロタイプであり、健常対照群(0.483)の方が疾患群(0.441)よりも頻度が高いことから統合失調症の発症に防御的に働いているものと思われた。TGTCC、CGCGT ハプロタイプは疾患

群(0.021, 0.017)の方が健常対照群(0.010, 0.006)よりも頻度が高いことから、統合失調症の発症リスクとなるハプロタイプであると考えられた。

##### (IL1B mRNA 発現解析)

患者群と健常対照群の発現量に有意差はみられなかった。重回帰分析による解析では、IL1B mRNA の発現量と rs4848306 の T アレルに負の相関を認めた。

先行研究では in vitro において rs4848306, rs1143623, rs16944 の 3SNP における TCC ハプロタイプでは CGT, CCT ハプロタイプより IL-1B の mRNA 発現が減少するとの報告がある。このため TCC ハプロタイプを一つ以上持つ群と、CGT と CCT それぞれのホモもしくは両者のヘテロである群に分けて発現量を比較したところ TCC 群では発現量が有意に減少していた( $p=0.048$ )。

#### [考察]

これまでに IL-1B の遺伝子多型と統合失調症について多くの報告があり、メタ解析を含むいくつかの報告で rs16944 と統合失調症の関連がいわれている。しかし、今回解析した5つのうち4つの SNP で名目上の有意差もしくは有意傾向を認めたものの、補正を行うと有意差はなくなった。この理由としては、統合失調症のような多因子疾患との関連を調べるにはサンプルサイズが小さすぎたことが挙げられる。また、IL-1B 遺伝子の位置する領域の連鎖不平衡パターンは白人とアジア人では異なっている。

このことから、IL-1B 遺伝子における人種間での対立遺伝子異質性が研究間での結果の相違に影響している可能性がある。

先行研究で IL-1B 遺伝子のプロモーター領域の4つの SNP が転写活性に影響する機能的 SNP であるが、個々の SNP の転写活性への影響はプロモーター領域の他の SNP のアレルに影響されるとの報告がある。したがって、少なくとも IL-1B 遺伝子においては疾患の原因となり得るのは個々の SNP ではなくハプロタイプである可能性が高い。rs4848306、rs1143623、rs16944 における TCC ハプロタイプでは CCT ハプロタイプに比べて転写活性が減少するとの報告があり、今回の研究で統合失調症の発症に防御的に働くと考えられた CG-TCC ハプロタイプは TCC ハプロタイプを含んでいる。また、TA-CCT ハプロタイプは CCT ハプロタイプを含んでいるが統合失調症との関連はみられなかった。リスクハプロタイプと考えられた CG-CGT ハプロタイプは CGT ハプロタイプを含んでおり、これは CG-TCC ハプロタイプよりも高い転写活性を持つものと考えられる。これらのことから、遺伝的に IL-1B の高い転写活性を持つ個体では、転写活性が平均的もしくは低下している個体と比べて統合失調症の発症リスクが高まる可能性が示唆された。

初発の精神病において血清と脳脊髄液で IL-1B が上昇し、抗精神病薬による治療で正常化するとの報告がある。また、高齢の慢性期統合失調症では健常対照者より血清中の IL-1B が上昇しているとの報告や、統合失調症患者およびその同胞では健常対照者よりも IL-1B mRNA が上昇しているとの報告がある。これらのことから、末梢血での IL-1B mRNA 発現は遺伝学的に決定されている部分があるものと思われる。これまでの GWAS とヒトリンパ芽球細胞株を用いたマイクロアレイの研究から、eQTL と呼ばれる遺伝子の発現量に関わる遺伝子座が多く報告されており、IL-1B のプロモーター領域もまた eQTL である。今回の結果では統合失調症群と健常対照群に IL-1B mRNA の発現量に有意差は認めなかったが、rs4848306 が IL-1B mRNA 発現量の予測因子になるという点で従来の見解に沿うものであった。

本研究の結論として、IL-1B 遺伝子のプロモーター領域におけるハプロタイプは統合失調症の発症に影響する可能性が示唆された。他の人種でも同様の研究がなされることが期待される。IL-1B 遺伝子の統合失調症への関与についてのさらなる解明は、疾患への治療戦略に寄与するものと思われる。

本研究は、統合失調症について、その遺伝学的背景を研究したものであるが、従来ほとんど知られていなかった IL-1B のプロモーター領域に位置する発現量の形質遺伝子座多型とその組み合わせであるハプロタイプについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。