

解までに時間を要した群では、副作用の生じやすい例や、幾つかの抗うつ薬に対して抵抗性である例があった。双極性障害でも病相予防のために難渋した症例が含まれていた。治療法の開発のために、精神疾患の分子生物学的、遺伝生化学的、分子病理学的研究の進展が重要であり、精神疾患 DNA バンクが必要であると考えられた。DNA バンク確立のためには、ゲノム解析に関する明確な倫理指針およびそれにもとづく倫理委員会の早急の整備が望まれる。

E. 結論

治療法の開発のために、精神疾患の分子生物学的、遺伝生化学的、分子病理学的研究の進展が重要であり、精神疾患 DNA バンクが必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 歯槽痛を伴った抑うつ症状にフルボキサミンが有効であった一例、ACCESS 15 (2) 31-32, 2000
- 2) プライマリ・ケア医に必要な精神症状の知識-慢性疼痛-, カレントセラピー 18 (7), 1253-1256, 2000

2. 学会発表

- 1) 国立呉病院中国地方がんセンター精神科における電気けいれん療法施行状況、第 13 回日本総合病院精神医学会総会、東京、2000 年 11 月

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

双極性感情障害発症脆弱性関連遺伝子についての研究

分担研究者 三國雅彦 群馬大学医学部神経精神医学講座

研究協力者 川本孝憲 井田逸朗 （群馬大学医学部神経精神医学講座）

武田 純 （群馬大学医学部生体調節研究所遺伝情報分野）

研究要旨：Wolfram 症候群は糖尿病や視神経萎縮を来す常染色体劣性の遺伝性疾患であるが、この疾患には高率に精神疾患を合併することが知られている。1998 年に、我々は共同研究者らと共にこの症候群の原因遺伝子 *WFS1* を同定したが、その存在部位は今までに報告されてきた双極性障害の連鎖領域の一つである 4 番染色体短腕 16 であった。このため、我々は *WFS1* 遺伝子を双極性障害の発症脆弱性に関わる候補遺伝子と考え、双極性障害患者 43 名と対照群 96 名とで関連研究を行った。患者群において 12 の SNPs が見出され、このうち 4 つは新規のものであった。これらの SNPs を用いて対立遺伝子頻度の比較を行ったが、有意差は認められなかった。また、3 つの SNPs を用いてハプロタイプを構築し頻度差を検討したが有意差はみられなかった。

A. 研究目的

Wolfram 症候群は、DIDMOAD(diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, deafness)とも呼ばれるように、若年発症糖尿病、視神経萎縮、尿崩症、聾などを来す遺伝性疾患で、常染色体劣性遺伝形式を取ると言われている。この疾患は高率に精神疾患を合併することが知られており、ホモ接合体の発症者の 25%は自殺企図や精神病院入院に至る重篤な精神症状を呈し、また非発症のヘテロ接合体、いわゆる carrier では non-carrier の 2.6 倍も精神病院入院率が高いという報告がある。我々は以前、気分障

害を併発した Wolfram 症候群の兄弟例について報告したが、その後共同研究者らと共に、この症候群の原因遺伝子である *WFS1* を同定することに成功し、別の研究グループも少し遅れて同様の結果を得た。この遺伝子は 890 のアミノ酸からなる約 100 kD のタンパク質をコードしており、4 番染色体の短腕 16 (4p16) にマップされた。Hydrophobicity analysis の結果から、このタンパクは 9 箇所の疎水性の膜貫通ドメインと、C 末端・N 末端の親水性の細胞内・細胞外ドメインにより構成されているものと想定されているが機能はまだ不明である。と

ところで、双極性障害の遺伝学的研究は古典的な大家系を用いた連鎖解析や罹患同胞対解析を用いて多くの施設で行われてきており、いくつかの領域(18p, 18q, 21q22, 4p16)では再現性のある結果が得られてきている。中でも4p16はdopamine D₅ receptor や GABA_A receptor beta1などの神経伝達物質受容体をコードする遺伝子があるいは近傍に存在するなど興味深い部位である。これらのことをあわせて考えると、双極性障害の発症にWFS1遺伝子の変異が関与しているか、あるいは直接関与はしていなくてもこの遺伝子のある多型が双極性障害において有意に見いだされる可能性があり、この遺伝子が双極性障害の発症脆弱性に関わる候補遺伝子であると考えられる。そこで今回我々は双極性障害の患者群においてWFS1遺伝子のスクリーニングを行い変異の有無を検討し、また検出された一塩基多型の頻度を対照群との間で統計学的に検討した。さらに一塩基多型を用いてハプロタイプを構築し、患者群に有意に見いだされる型が存在するかどうか検討した。さらに、本研究を実施するにあたり、精神疾患DNAバンクの意義についても検討した。

B. 研究方法

患者と対照

双極性障害の患者は群馬大学医学部付属病院ならびにその関連施設において入院患者と外来患者から集めた。患者の前

腕の肘静脈より採血を行い、血液からDNAを抽出してこれをsampleとした。研究に際し、群馬大学医学部倫理委員会において承認された方法に基づき、患者に対して文書による十分な説明を行い同意を得た。患者は熟練の臨床医によってDSM- に基づいて診断された。患者43名の内、bipolar 16名(男性9人、女性7人)、bipolar 27名(男性14名、女性13名)、である。対照群96名(男性39人、女性57人)は住民集団のものである。

Sequence Analysis of WFS1 gene

WFS1 geneは8 exonsで構成され、exon 1-7のサイズは81~237bpと比較的小さいため、それぞれtableに示すprimer pairでPCRにて増幅した。exon 8は2607bpと大きく、coding regionだけでも1812bpあるため、8つのオーバーラップする領域に分割し(E8-0~7)それぞれをtableに示すprimer pairで増幅した。PCRにはPE BiosystemsのGeneAmp PCR Systemを用いた。PCR productsをtemplateとしてキットを用いたsequence reactionを行い、その生成物を精製し、ABI 377 sequencerを用いてそれぞれの領域の配列をスクリーニングした。

Statistical Analysis

次に患者群と対照群とで検出された多型の頻度についてフィッシャーの直接検定法によって統計学的に検討した。また、比較的高頻度に認められる3つの多型を

用いてハプロタイプを構築し、患者群に有意に見いだされるハプロタイプが存在するかどうか検討した。

C. 研究結果

43人の双極性障害患者において12の一塩基多型 (SNPs) が見出された。このうち8つ(1355T→C; 1537G→A; 2002A→G; 2603A→G; 2735G→A; 1896G→A; 2328A→G; 2379G→A)は既報^{8,12}のものであったが、残り4つ (572G→A; 1670T→C; 1678T→G; 2639C→T)は新規に見出されたものであった。これらのSNPsのうち、6つはアミノ酸の置換を伴わない静的置換であり、残りはミスセンスであった。欠失や挿入、ナンセンス変異は見出されなかった。見出された多型のほとんどは exon 8 に存在していた。また、intron のスプライシング関連領域 (供与部位、受容部位、枝分かれ部位) には多型を見出すことはできなかった。次に対照群についても患者群に見出された12SNPsの検出を行った。5つの多型 (1355T→C; 1670T→C; 1678T→G; 2603A→G; 2735G→A)は対照群には見出されなかったが、患者群においてもその多型の頻度が低かったため統計学的有意差は認められなかった。患者群で見出された6つのミスセンスのうち非保存的置換を起こすものが1つあった(2379G→A; E737K)が、allele 頻度を対照群とで比較したところ、有意差はなかった。また、その他の多型について

も対照群との間に頻度差は認められなかった。

次に比較的高頻度に認められる3つのSNPs (1896 G→A, 2002 A→G, 2328 A→G)を用いてハプロタイプを構築したところ、5つの型が存在した。これらのハプロタイプの頻度について χ^2 検定やフィッシャーの直接検定法で統計学的に検討してみたがやはり有意差は認められなかった。

D. 考察

今回の研究では双極性障害の患者DNAにおいて蛋白の機能変化を起こす変異 (欠失・挿入、ナンセンス変異) はWFS1遺伝子には見出すことができなかった。従って、WFS1遺伝子の機能障害が直接的に双極性障害の原因になっているとは考えにくい。また、患者群において12のSNPsを見出したが対照群との比較においていずれのSNPsもその頻度に有意差は認められなかった。5つのSNPsは対照群には見出されず患者群のみにそれぞれ1名ずつヘテロ接合体としてその多型を保有しているものがあったが、4つは静的置換で残り一つも保存的置換であったため、まれなvariantであろうと推測される。また、ハプロタイプ解析においても有意差を見出すことはできなかった。従って、WFS1遺伝子のcommon variantが双極性障害に関連があることを支持する所見を得ることはできなかった。

双極性障害に遺伝因子が関与していることは、この疾患が家族集積性を示すことや過去の双生児研究・養子研究から明かであるが、一卵性双生児での発症一致率が100%でなく、浸透率も低いことから環境因子も強く関与していると考えられる。双極性障害はいわゆる multifactorial-polygenic disease であり、過去の linkage analysis によって様々な染色体部位にピークが見出されていることから複数の遺伝因子が関与していると思われる。今回はこれまでの連鎖解析によって示された候補部位のうち、再現性の認められる部位の一つである 4p16 に的を絞り、この領域にマップされている遺伝子の中から精神疾患を合併しやすいと言われる希な遺伝性疾患 Wolfram 症候群の原因遺伝子 WFS1 を双極性障害の候補遺伝子としてスクリーニングを行った。残念ながら今回の研究では陽性所見を得ることができなかったが、連鎖解析や罹患同胞対解析などで得られた位置情報を考慮しつつ、精神疾患を合併しやすい希な遺伝性疾患の原因遺伝子をスクリーニングする、といった今回用いた方法は今後も有用であると思われる。今後は 4p16 に存在する WFS1 遺伝子以外の候補遺伝

子を決めてスクリーニングしていくと同時に、現在集積しつつある SNPs 情報を元にして候補領域をより広くスクリーニングしていく予定である。

今後、更に大規模なスクリーニングを進めていくには、精神疾患 DNA バンクのように各研究者が共通して利用可能な献体をストックしておける機関の存在が必要と思われる。ただ、それらの献体を有効利用するには、統一された診断基準に基づく診断名や臨床データなどの情報を献体コードからいつでも引き出せるようなデータベースの完備が不可欠と思われる。

E. 結論

WFS1 遺伝子は双極性障害の発症脆弱性に関連があるとは考えにくい。

F. 研究発表

1. 第 22 回生物学的精神医学会
「WFS1 遺伝子は気分障害の発症
関連遺伝子か？」

2000.3. 東京

G. 知的所有権の取得状況

なし

双極性障害の連鎖領域 21q22.3 における候補遺伝子の探索

分担研究者 神庭重信 山梨医科大学医学部精神神経医学講座 教授
研究協力者 塩江邦彦 2), 篠原 学 1), 平野雅己 3), 工藤 純 4), 養島伸生 4),
清水信義 4) 1) 山梨医科大学医学部精神神経医学講座
2) 山梨医科大学医学部附属病院精神科神経科 3) 山梨医科大学
精神保健管理センター 4) 慶應義塾大学医学部分子生物学教室

研究要旨：連鎖研究による双極性障害の最も有望な染色体領域は 21 番長腕 22.3 にあるマーカー PFKL から D21S171 である。我々はこの PFKL 近傍に新たにクローニングされたカルシウムチャンネル蛋白遺伝子 TRPC7 に着目した。TRPC7 遺伝子は感受性領域に存在し、患者での異常が想定されるカルシウムチャンネルに関連して脳に発現することから双極性障害の位置的候補遺伝子となりうる。病因遺伝子である可能性について検討する最初の段階として変異・多型スクリーニングを行い翻訳領域に 1 塩基置換多型を 5 つの部位で発見した。

緒言

躁うつ病（気分障害）の成因、とりわけ双極性気分障害に関しては遺伝要因の関与が強く示唆されてきた。しかし、その病態生理を説明できるような候補遺伝子は明確ではないため疾患感受性遺伝子を同定するためには家系を用いた系統的連鎖解析が必要であった。実際の双極性障害の連鎖研究からは、躁うつ病が複雑遺伝形質疾患であることから、結果の一致した染色体領域は極めて少なく、かつ有効とされるノンパラメトリック法ではポジショナルクローニングの可能範囲まで染色体領域の絞り込みは困難であった。

現在までの連鎖研究により、躁うつ病において複数のグループから一致した報告のある染色体領域は 18 番染色体の動原体周辺部と 21 番の長腕 22.3 にあるマーカー PFKL から D21S171 である。そこで我々はこの染色体 21 番の PFKL 近傍に新たにクローニングされたカルシウムチャンネル蛋白遺伝子 TRPC7 (Transient Receptor Potential related Channels) (Nagamine K et al, 1998) に注目した。

A. 研究目的

TRPC7 遺伝子は躁うつ病での連鎖が報告された感受性領域に存在すること、機能的にも脳に発現し、躁うつ病患者で異常がわかっているカルシウムチャンネルに関連していることから疾患の候補遺伝子としては有望であると考えている。我々は TRPC7 遺伝子の変異・多型解析を行い、得られた多型について双極性障害患者と正常対照者における頻度を比較することより、躁うつ病との関連を検討する。

B. 研究方法

双極性患者 40 名と精神疾患のない健康照者 40 名の血液より得た DNA を鋳型として TRPC7 遺伝子の 32 エキソンすべてについて定型的な PCR 法により、翻訳領域の増幅を行う。プライマーは増幅塩基配列が 400 塩基対以下になるように設定する。PCR 産物を SSCP (single strand conformation polymorphism analysis) にて変異スクリーニングを行った。PCR は GenAmp 9600/2400 (Perkin Elmer) を、SSCP には DNA フラグメント解析用電気泳動装置 (Amersham Pharmacia Biotech)、シークエンスには ABI 310 (ABI) を使用した。なお、研究参加者には文書にて説明し、署名による同意を得ている。本研究については山梨医科大学倫理委員会による承認を事前に受けている。

C. 結果および考察

SSCP 法を用いて TRPC7 遺伝子の変異を検索し、現在までに翻訳領域に 5 カ所の 1 塩基置換を確認した。

TRPC7 遺伝子は 90kb にわたり 32 のエキソンがあり、1503 アミノ酸残基により構成される。相同性検索から transient receptor potential 蛋白 (trp) ファミリーに属すると考えられる。TRPC7 には 7 回の膜貫通領域が存在することから、trp として Ca²⁺チャンネルを形成していると考えられる。躁うつ病患者にカルシウム動員の異常が認められ、その治療薬がカルシウム動員に調整的に働くことは多くの研究から明らかにされている。TRPC7 にも躁うつ病の候補遺伝子として注目に値する機能を持つことが推測される。今後は新たな多型の発見をすすめるとともに、これらの多型と躁うつ病の発症との関連研究を進める。