

20010418

厚生省科学研究費補助金

ヒゲム・再生医療等研究事業

「ゲノム情報の利用による自殺防止を
目指した向精神薬開発に関する研究」

平成13年度 総括・分担 研究報告書

主任研究者 樋口 輝彦

平成14（2002）年3月

目次

I. 総括研究報告	
「ゲノム情報の利用による自殺防止を目指した向精神薬開発に関する研究」	2
樋口 輝彦	
II. 分担研究報告	
1. ゲノム情報を利用した新規抗うつ薬の開発研究	8
樋口 輝彦	
2. 自殺念慮に関与する神経回路機能障害の神経栄養因子による 修復の分子機構解明と治療・予防薬開発に関する研究	12
染矢 俊幸	
(資料) 研究結果補足 (図1～図4)	
3. モデルマウスQTLゲノム解析によるうつ状態感受性遺伝子の同定	20
吉川 武男	
4. 自殺念慮の生物学的マーカーとなる遺伝子変異の検索	25
前田 潔	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (入手未確定により該当なし)	

総括研究報告書

「ゲノム情報の利用による自殺防止を目指した向精神薬開発に関する研究」

主任研究者 樋口 輝彦 国立精神・神経センター 国府台病院

研究要旨：自殺の原因としてうつ病あるいはストレス感受性が重要である。うつ病あるいは抑うつ状態の治療には薬物療法として抗うつ薬が用いられている。我々は、抗うつ薬を慢性投与した実験動物の脳から抗うつ薬関連遺伝子/EST を探索しこれらをスポットした独自の cDNA microarray を作成することに成功した。現在はこれらの候補分子群の生理機能や新規向精神薬の標的としての可能性について検討している。また、ストレスと脳内サイトカインとの関連について調査したところ、種々のサイトカインは発達段階の早期に実験動物の行動変化を惹き起こすことが明らかとなった。さらに、うつ状態およびストレス脆弱性に関係する強制水泳テスト(FST)と尾懸垂テスト(TST)における無動時間を規定している遺伝子座位を感受性遺伝子として決定するために QTL 解析手法を行ったところ、FST の無動時間を規定する主要座位として 5 箇所、TST の無動時間を支配する座位として 4 箇所検出した。また遺伝子間相互作用の検討では、TST の無動時間を支配する座位として染色体 6 番と 11 番、11 番と X染色体のエピスタシスの存在が明らかとなった。一方、5HT 神経系機能に重要な機能分子 (トリプトファン水酸化酵素、セロトニントランスポーター、5HT1A 受容体、A型モノアミン酸化酵素) の遺伝子多型に着目しこれら遺伝子多型と自殺との相関研究を行ったが、自殺既遂者と健常対照群自殺者群の間で有意な出現頻度の差はなくこれらが自殺に関与している可能性は低いと考えられた。本研究により、自殺危険度の予測法や自殺念慮発現抑制薬の開発に直結する成果が得られることが期待された。

分担研究者氏名	所属施設名及び職名
樋口 輝彦	国立精神・神経センター 国府台病院・院長
染矢 俊幸	新潟大学医学部 精神医学教室・教授
吉川 武男	理化学研究所 脳科学総合研究センター・チームリーダー
前田 潔	神戸大学医学部 精神医学教室・教授

に起因していることが知られるが、これまでの社会心理学的アプローチや既成の向精神薬での対応では十分な予防は行えていない。そこで本研究ではゲノム情報を利用した分子生物学的な研究により、自殺の生物学的マーカーの候補遺伝子の検索と抗ストレス・抗うつ効果を示す新しい向精神薬の標的候補遺伝子の検索を行うことを目的とした。

A. 研究目的

自殺は、最近、経済不況、社会状況の複雑化等の影響もあって、中高年を筆頭に各年代で急増する傾向にあり、貴重な人材の損失と周囲への様々な負担が社会問題になっている。このため、自殺を未然に防ぐ新しい予防薬の研究は急務である。大部分の自殺が強度のストレスや精神疾患によって引き起こされるうつ状態

B. 研究方法

本研究は、研究班を組織して以下の4つの研究課題に分担して研究を進めた。

○うつ状態を改善する新規自殺予防薬の標的分子検索

抗うつ薬慢性投与後にラット脳内で発現が増減する

1 次候補遺伝子/EST を抗うつ薬関連遺伝子として検

出した。得られた cDNA 断片は、サブクローニングした後にジデオキシ法により塩基配列を決定した。次に、GeneBank/ENBL のデータベースに登録されている塩基配列と FASTA 法を用いて相同性解析を行い発現プロフィールおよび機能別に分類した。

一方、これまで我々は得られた ADRG 遺伝子について、1 クローンごとに RT-PCR 法を用いて再現性の確認及び定量 (2 次スクリーニング) を行ってきたが、この過程は膨大な労力と時間を要する作業であった。そこで我々は、この過程のさらなる効率化と迅速化を図るため、選ばれた 200 個の ADRG 遺伝子、ポジティブコントロール (house keeping gene など) 及びネガティブコントロール (プラスミド DNA など) をスポットした独自の ADRG microarray を自主開発した。我々は、コントロール群及び様々な処置群 (向精神薬投与、ECT 処置、ストレス負荷など) のサンプルより mRNA を抽出し、それぞれ、Cy5、Cy3-dUTP 存在下逆転写反応を行い cDNA 蛍光プローブを作製し、解析を進めている。具体的には、作製した cDNA を混合し、ADRG microarray に競合的にハイブリダイズした後に、Cy3 と Cy5 の蛍光シグナルを 635 nm、532 nm の各検出波長でそれぞれ検出し、各スポット上の蛍光強度の比 (Cy3/Cy5) をコンピューター解析することにより検討している。

○自殺念慮に関与する神経回路機能障害の神経栄養因子による修復の分子機構解明

ラットに強制水泳、拘束、痙攣、電気ショック、虚血のストレス負荷を行い、海馬、視床下部における、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1ra)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、IFN γ 、トランスフォーミング成長因子 (TGF- β 3)、ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子 (HB-EGF)、ニューレグリン (NRG)、EGF の mRNA 量およびタンパク発現の変

化を測定した。

○うつ状態モデルマウスの QTL 解析による自殺念慮の生物学的マーカーの検索

4 種の近交系マウスで強制水泳テスト (FST) の無動時間を測定した。次に、どちらのテストでも無動時間の 1 番長かった B6 の雌と 1 番短かった C3 の雄を用いて F1 世代を作成した。F1 個体の random mating により、F2 個体を作成した。すべての F1 および F2 マウスについて FST と TST を施行し無動時間を測定した。次に、これらの実験動物を用いて以下の通り QTL 解析を行った。

(QTL 解析 : single locus analysis) B6 と C3 マウス間で多型を示すマイクロサテライトマーカーをデータベースから選出し、プライマー配列および PCR 条件を決定し、最終的に 120 個のマーカーを使用した。マーカー間の距離は平均 11 cM であり、最大のところで 23 cM であった。これらマーカーを用いて F2 個体 560 匹すべての genotyping を行った。Suggestive linkage の閾値としては、Lander & Kruglyak の基準であるロッドスコア 2.8 を採用した。

(QTL 解析 : epistatic interaction analysis) Two-locus interaction は、B6/B6:B6/B6、C3/C3:C3/C3、B6/B6:C3/C3 の遺伝子型の組み合わせを調べた。最後の組み合わせは、B6 のマウスが無動時間を減らす遺伝子を持っている可能性、逆に C3 のマウスゲノムの中に無動時間を延ばす遺伝子が潜んでいる可能性を考えてのことである。FST、TST でシュミレーションにより閾値ロッドスコアを決定し、それらの基準を満たした染色体部位の組み合わせを検出した。

○自殺念慮の生物学的マーカーとなる遺伝子変異の自殺者死後脳における検索

神戸大学医学部法医学教室において行った法医学剖検例での自殺既遂者 163 例 (男性 113 例、女性 50 例、

平均年齢±SD、47.9±17.6 歳)を対象とした。健康対照群は、383 例から、自殺既遂者と性別・年齢を対照させた 163 例(男性 113 例、女性 50 例:44.7±14.9 歳)を無作為抽出した。自殺既遂者および健康対照者の血液から DNA を抽出し、5HT 神経系遺伝子多型については既報に従い変異の有無を同定した。

C. 研究結果と考察

研究班を組織して4つの研究課題に分担して研究を進めたところ、以下のような結果が得られた。

〇うつ状態を改善する新規自殺予防薬の標的分子検索

我々は、抗うつ薬慢性投与後にラット脳内で発現が増減する 300 の 1 次候補遺伝子/EST を抗うつ薬関連遺伝子として検出することに成功した。我々が同定した cDNA 断片には、神経情報伝達、細胞内情報伝達系に関するクローン、タンパク質折り畳み、細胞内輸送に関するクローン、細胞障害、酸化還元系に関するクローンなどの既知遺伝子群とともに、熱ショック蛋白の 1 つである HSC70 の新規スプライシングバリエントや、既知の分子と相同性の低い未知の機能的分子クローンが多数含まれていた。さらに、これらの候補分子群の中には神経突起・軸索の伸展や退縮、神経伝達物質の開口放出機構といった神経可塑的变化に機能的に関わるものが複数存在していた。我々は、これらの遺伝子/EST を Antidepressant Related Genes (ADRG) と命名して詳細に検討を続けている。

今回我々は、抗うつ薬関連遺伝子をスポットした独自の cDNA microarray を作成することに成功した。この cDNA microarray は、抗うつ薬、他のうつ病治療法、種々の情動障害モデル動物における遺伝子発現変化を効率良くスクリーニングすることのできる強力なツールになると考えられた。実際、ADRG microarray を用いて ECT を模した処置を负荷したラットのサン

プルを解析した結果、抗うつ薬および ECT という異なる 2 種の治療法施行後に共通して発現変化する遺伝子を多数発見することに成功した。これら ADRG 遺伝子群はうつ病治療過程に共通する分子メカニズムに関与する可能性が考えられ今後の詳細な検討が待たる。

〇自殺念慮に関与する神経回路機能障害の神経栄養因子による修復の分子機構解明

前頭葉では痙攣ストレス負荷により、IL-1 β mRNA 量が 3 倍、BDNF mRNA は 2 倍に増加した。また、拘束と虚血ストレス負荷により IFN γ mRNA は各々 1.9 および 2 倍に増加した。脳幹では痙攣ストレス負荷により IL-1 β mRNA が 3 倍に増加した。また、海馬において IL-1 β ンパク量の変化は各ストレス負荷による一定の傾向を認めず、視床下部では各ストレス負荷により減少していた。IL-1ra タンパク量は海馬において各ストレス負荷により変化しなかったが、視床下部では各ストレス負荷により増加しており、特に拘束と電気ショックストレス負荷では負荷後 24 時間経過しても増加が持続していた。

新生児期に IL-2 を投与したラットでは、投与終了後 10 日目の 3 週齢で自発運動量が対照群と比較して 199%と有意に ($p=0.040$) 増加し、IFN γ 投与群では 42%と有意に ($p=0.037$) 減少していた。8 週齢では各サイトカイン投与群ともに対照群と比較して有意差を認めなかった。このことから新生児期の IL-2 あるいは IFN γ の投与は発達段階の早期に行動変化を惹き起こすことが明らかとなったが、そのメカニズムについては不明である。今回、サイトカインが発達段階の早期に行動変化を惹き起こすことが明らかとなったことより、今後は新生児期にサイトカインを投与された成体ラットにおけるストレス感受性について研究を行う予定である。脳内サイトカインの役割を解明することにより、新規の抗うつ薬または抗ストレス薬の開発

につながる可能性が高い。

〇うつ状態モデルマウスの QTL 解析による自殺念慮の生物学的マーカーの検索

4 種の近交系マウスで強制水泳テスト(FST)の無動時間を測定したところ、B6 > BALB/c > DBA2 > C3 の順であった。尾懸垂テスト(TST)では、B6 > DBA/2 > BALB/c > C3 の順であった。これらには性差はなかった。そこで、どちらのテストでも無動時間の1番長かった B6 の雌と1番短かった C3 の雄を用いて 126 匹の F1 世代を作成した。F1 個体の random mating により、F2 個体を 560 匹作成した (雄 260、雌 300)。すべての F1 および F2 マウスについて FST と TST を施行し無動時間を測定した。また、F2 個体の無動時間の分布は FST, TST とともに正規分布を示しこれらの形質が多遺伝子によって規定されていることを裏付けた。

(QTL 解析 : single locus analysis)

B6 と C3 マウス間で多型を示すマイクロサテライトマーカーをデータベースから選び出し、プライマー配列および PCR 条件を決定し、最終的に 120 個のマーカーを使用した。マーカー間の距離は平均 11 cM であり、最大のところで 23 cM であった。これらマーカーを用いて F2 個体 560 匹すべての genotyping を行った。シュミレーションによって、今回のゲノムスクランの significant linkage は、FST でロッドスコア 3.65、TST で 3.60 必要であることが分かった。Suggestive linkage の閾値としては、Lander & Kruglyak の基準であるロッドスコア 2.8 を採用した。これらの水準をパスした染色体部位は、FST: D6Mit289 (2.8), D8Mit242 (4.2), D8Mit93 (3.0), D11Mit271 (3.7), D17Mit 185 (2.9)、TST: D4Mit203 (3.5), D8Mit242 (2.9), D11Mit271 (3.6), D14Mit257 (3.0) であった。

(QTL 解析 : epistatic interaction analysis)

Two-locus interaction は、B6/B6.B6/B6, C3/C3:C3/C3,

B6/B6:C3/C3 の遺伝子型の組み合わせを調べた。最後の組み合わせは、B6 のマウスが無動時間を減らす遺伝子を持っている可能性、逆に C3 のマウスゲノムの中に無動時間を延ばす遺伝子が潜んでいる可能性を考えてのことである。FST, TST でシュミレーションにより閾値ロッドスコアを決定し、それらの基準を満たした染色体部位の組み合わせは FST では検出されず、TST では D11Mit271 (B6/B6) \times DXMit172 (B6/B6) (lod score = 5.9) と D6Mit183 (B6/B6) \times D11Mit271 (B6/B6) (lod score = 5.0) の 2 つの組み合わせが検出された。

我々が注目したマウス染色体 11 番の領域はヒトでは染色体 5 番長腕遠位部に相当し、躁うつ病と不安障害の連鎖解析で連鎖が報告されている部位でもある。抗うつ薬の治療標的はうつ病のほか不安障害も含んでいることと、マウス FST, TST の無動時間が抗うつ薬で短縮する事実を考え合わせると、マウス 11 番染色体上の QTL はとくに興味を持たれる。また、TST で染色体 11 番と相互作用する染色体 X の領域も、ヒトで躁うつ病と不安障害の連鎖が報告されている。以上の結果は、今後これら染色体座位にコードされている責任遺伝子を特定し、ヒトでの相同遺伝子を解析する重要な材料を提供すると考えられる。今回の研究で明らかになったうつ状態感受性 QTL の真の責任遺伝子を同定していくために、我々はコンソミックマウスの作成にとりかかっている。その先には、ヒトでの対応遺伝子を調査しうつ状態感受性、自殺感受性との関連を調べ創薬につなげていく作業がある。

〇自殺念慮の生物学的マーカーとなる遺伝子変異の自殺者死後脳における検索

神戸大学医学部法医学教室において行った法医学剖検例での自殺既遂者および健常対照群において、今回の遺伝子解析の対象となったトリプトファン水酸化酵素 (A-6526G : promoter, A218C : intron7)、セロトニ

ントランスポーター (5HTT-LPR : promoter, 5HTT-VNTR : intron2)、5HT1A 受容体 (Pro16Leu, Gly272Asp)、モノアミン酸化酵素A (uVNTR : promoter) の遺伝子多型、遺伝子頻度は各群間で有意差は認められなかった。そのため、今回の解析の対象となった遺伝子が自殺に関与している可能性は低いと考えられた。今後はさらに多数の症例で、ハプロタイプや他の5HT 関連遺伝子多型の解析に加え、性差、年齢複数の機能的遺伝子多型の組合せを考慮にいれた解析を予定している。

D. 結論

我々の研究成果により、感情障害やストレス性障害に対する治療ターゲット遺伝子を発見し知的所有権を獲得することが具体的成果として期待される。また、病態に密接に関わる脳内機能分子を発見することにより、個人の病態にあわせた「自殺防止のための最適薬物療法開発」の可能性が期待される。本研究により自殺危険度の予測法や自殺念慮発現抑制薬の開発に直結する成果が得られることが期待された。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) **Yoshikawa, T.**, Kikuchi, M., Saito, K., Watanabe, A., Yamada, K., Shibuya, H., Nankai, M., Kurumaji, A., Hattori, A., Ishiguro, H., Shimizu, H., Okubo, Y., Toru, M. and Detera-Wadleigh, S.D.: Evidence for association of the myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2) gene with schizophrenia in Japanese samples. *Mol. Psychiatry* 6: 202-210, 2001.

(2) Kurumaji, A., Nomoto, H., Yamada, K., **Yoshikawa, T.** and Michio Toru, M.: No association of two missense variations of the benzodiazepine receptor (peripheral) gene and mood disorders in a Japanese sample. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet.* 105: 172-175, 2001.

(3) Kurumaji, A., Kuroda, T., Yamada, K., **Yoshikawa, T.**, Toru, T.: An association of the polymorphic repeat of tetranucleotide (TCAT) in the first Intron of the human tyrosine hydroxylase gene with schizophrenia in a Japanese sample. *J*

Neural Trans 108: 489-495, 2001.

(4) Arinami, T., Ohtsuki, T., Takase, K., Shimizu, H., **Yoshikawa, T.**, Horigome, H., Nakayama, J., Toru, M.: Screening for 22q11 deletions in a schizophrenia population. *Schizophr. Res.* 52: 167-170, 2001.

(5) Toyota, T., Shimizu, H., Yamada, K., Yoshitsugu, K., Meerabux, J., Hattori, E., Ichimiya, T., **Yoshikawa, T.**: Karyotype analysis of 161 unrelated schizophrenics: no increased rates of X chromosome mosaicism or inv(9), using ethnically matched and age-stratified controls. *Schizophr. Res.* 52: 171-179, 2001.

(6) Hattori, E., Ebihara, M., Yamada, K., Ohba, H., Shibuya, H., **Yoshikawa, T.**: Identification of a compound short tandem repeat stretch in the 5'-upstream region of the cholecystokinin gene, and its association with panic disorder but not with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 6: 465-470, 2001.

(7) Yamada, K., Hattori, E., Shimizu, M., Sugaya, A., Shibuya, H., **Yoshikawa, T.**: Association studies of the cholecystokinin B receptor and A2a adenosine receptor genes in panic disorder. *J. Neural Trans* 108: 837-848, 2001.

(8) Hattori, E., Yamada, K., Toyota, T., Yoshitsugu, K., Toru, M., Shibuya, H., **Yoshikawa, T.**: Association studies of the CT repeat polymorphism in the 5' upstream region of the cholecystokinin B receptor gene with panic disorder and schizophrenia in Japanese subjects. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet.* 105: 779-782, 2001

(9) Toyota, T., Hattori, E., Meerabux, J., Yamada, K., Saito, K., Shibuya, H., Nankai, M., **Yoshikawa, T.**: Molecular analysis, mutation screening, and association study of adenylate cyclase type 9 gene (ADCY9) in mood disorders. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet.* 114: 84-92, 2002.

(10) Yamada M, Yamada M, Yamazaki S, Takahashi K, Nara K, Ozawa H, Yamada S, Kiuchi Y, Oguchi K, Kamijima K, **Higuchi T.**, Momose K, Induction of cysteine string protein after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex. *Neuroscience Letters*, 2001, 301:183-186

(11) Ono H, Shirakawa O, Nishiguchi N, Nishimura A, Nushida H, Ueno Y, **Maeda K.** Serotonin 2A receptor gene polymorphism is not associated with completed suicide. *J Psychiatr Res.* 35, 173-176, 2001

(12) Nishiguchi N, Shirakawa O, Ono H, Nishimura A, Nushida H, Ueno Y, **Maeda K.** No evidence of an association between 5HT1B receptor gene polymorphism and suicide victims in a Japanese population. *Am J Med Genet.* 105, 343-355, 2001

(13) Ono H, Shirakawa O, Nishiguchi N, Nishimura A, Nushida H, Ueno Y, **Maeda K.** No evidence of an association between a functional monoamine oxidase a gene polymorphism and completed suicides. *Am J Med Genet.* 114, 340-342, 2002

(14) Akanuma, N., Saitoh, O., **Yoshikawa, T.**, Matsuda, H.,

Ishikura, N., Kato, M., Adachi, N., T. Onuma, T.: Interictal schizophrenia-like psychosis in a patient with double cortex syndrome. The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences (in press)

(15) Reyes, G. D., Esterling, L. E., Corona, W., Ferraren, D., Rollins, D. Y., Padigaru, M., **Yoshikawa, T.**, Monje, V., D., Detera-Wadleigh, S. D.: Map of candidate genes and STSs on 18p11.2, a bipolar disorder and schizophrenia susceptibility region. Mol. Psychiatry (in press)

(16) Toyota, T., Yamada, K., Saito, K., Detera-Wadleigh, S. D., **Yoshikawa, T.**: Association analysis of adenylate cyclase type 9 gene using pedigree disequilibrium test in bipolar disorder. Mol. Psychiatry (in press)

(17) **Yoshikawa, T.**, Watanabe, A., Ishitsuka, Y., Nakaya, A., Nakatani, N.: Identification of multiple genetic loci linked to the propensity for "behavioral despair" in mice. Genome Research (in press)

(18) Hattori, E., Yamada, K., Ebihara, M., Toyota, T., Masahiro M., Shibuya, H., Takeo **Yoshikawa, T.**: An association study of the short tandem repeat in the 5' upstream region of the cholecystokinin gene with mood disorders in the Japanese population. Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet. (in press)

(19) Yamada M, **Higuchi T.** Functional genomics and antidepressant research. European Neuropsychopharmacology (in press), 2002

(20) Yamada M, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kudo K, Ohata H, Kamijima K, **Higuchi T.**, Momose K, Yamada M, Differential expression of VAMP2/ synaptobrevin-2 after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. (submitted for publication), 2002

(21) Yamada M, Iwabuchi T, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kudo K, Ohata H, Momose K, **Higuchi T.**, Yamada M, A frizzled protein and its signal transduction cascade as a novel molecular target for antidepressant and lithium treatment in rat frontal cortex. (submitted for publication), 2002

2. 学会発表

(1) Kudo K, Yamada M, Yamada M, Yamazaki S, Takahashi K, Nishioka G, **Hashiguchi T.**, Fukuzako H, Takigawa M, Higuchi T, Momose K, Kamijima K, Chronic rTMS treatment

induces an antidepressant related gene, ADRG34, in the rat frontal cortex. CINP Regional Meeting, Hiroshima, 2001

(2) Yamada M, Kudo K, akahashi K, Kaihotsu M, Sakurai E, Nishioka G, Hirano M, Yamada M, Momose K, Kamijima K, **Higuchi T.** Functional genomics in search of a novel human genetic polymorphism responsible for treatment-resistant depression -ADRG34 as a novel target molecule for investigation, CINP Regional Meeting, Hiroshima, 2001

(3) Ono, H, Shirakawa, O, Kitamura, N, Hashimoto, T, Nishiguchi, N, Nishimura, A, Nushida, H, Ueno, Y, **Maeda, K.** 5-HT_{2a} receptor densities are not altered in prefrontal cortex of suicide victims, and 5-HT_{2a} receptor gene polymorphism not affect 5-HT_{2a} receptor densities. Neuroscience Meeting, San Diego, 2001

(4) Takahashi K, Yamada M, **Higuchi T.**, Yamada M, Momose K, Identification of a novel gene, ADRG#123, regulating neurite outgrowth in PC12 cells., 日本薬理学会、横浜、2001

(5) 西岡玄太郎、山田光彦、山田美佐、山崎諭、工藤謙太郎、高橋弘、橋口知、福迫博、滝川守国、樋口輝彦、百瀬和享、上島国利、抗うつ薬長期投与、ECT および rTMS 処置後のラット脳内における ADRG34 の発現変化、日本生物学的精神医学会、長崎、2001

(6) 西岡玄太郎、山田光彦、山田美佐、山崎諭、工藤謙太郎、高橋弘、橋口知、福迫博、滝川守国、樋口輝彦、百瀬和享、上島国利、ECT および rTMS 処置後のラット脳内における ADRG34 の発現変化、第 20 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、小樽、2001

G. 知的財産権の出願・登録状況

- (1) 特許取得
なし
- (2) 実用新案
なし
- (3) その他
なし

厚生省科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

-ゲノム情報の利用による自殺防止を目指した向精神薬開発に関する研究-

「ゲノム情報を利用した新規抗うつ薬の開発研究」

分担研究者 樋口 輝彦 国立精神・神経センター国府台病院 院長

研究要旨：自殺の生物学的背景として重要な感情障害の発症に遺伝要因が関与することは、これまでの分子遺伝学的研究より強く示唆されてきた。しかし、感情障害の病態を明確に説明できるような候補遺伝子は現在明らかとなっておらず、その治療薬開発も偶然に発見されたシード化合物を出発点とする創薬に頼らざるを得なかった。そこで、我々はこうした現状を打開すべく、感情障害の治癒機転に関与する候補遺伝子を Antidepressant Related Genes (ADRG) として戦略的に探索し、その機能と発現を解析することを試みた。現在急速に蓄積されている膨大なゲノム情報を有効利用し候補遺伝子を効率よく探索するため differential cloning 法およびオリジナルの cDNA microarray を活用した。得られた候補分子については、先端的生物情報技術と分子生物学的手法を用いてその機能と発現を詳細に検討し、真の治療ターゲット分子となり得るかを検証している。よって、本研究は感情障害の病態理解のための独創的アプローチであり、新しい作用機序をもつ自殺防止を目指した医薬品の戦略的開発の基盤となるものである。

研究協力者 所属施設名及び職名
山田 光彦 昭和大学附属烏山病院・専任講師
角田 美果 国立精神・神経センター
国府台病院、研究支援者

A. 研究目的

自殺は、我が国において働き盛りの男性の死因の第1位となっている。感情障害は特に自殺率が高く、また患者の経済的生産性が低下するなど社会的損失や患者家族の長期にわたる負担が大きい疾患である。さらに、慢性

的経過や再発を繰り返す等、国家財政における医療経済的負担も大きい。そのため、感情障害の病態を理解し有効な治療法を開発することは我々精神医学研究者にとって急務の課題となっている。感情障害の成因として重要な高次精神機能は脳システムの緻密な連携により成るが、その素過程は神経情報伝達に帰することができる。そして、伝達情報が神経細胞外から細胞内へと変換される過程は複雑な機能分子群の連携により調整されている。

さらに、これら生体分子の発現は遺伝子情報の厳密な制御により調節されているが、ゲノム科学の進展により、分子生物学的研究手法を用いることでその病態における役割を解明することが可能となってきた。また、向精神薬の奏効機転には神経の可塑的变化の関与が強く示唆されており、感情障害の病態治癒過程において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、本研究では感情障害の発症脆弱性と治癒機転に関与する候補遺伝子をゲノム科学的手法 (reverse pharmacology) を用いて戦略的に探索することを目的とした。

B. 研究方法

平成13年度は、ステップ1として感情障害の治癒機転に関与する候補遺伝子をゲノム科学的手法を用いて効率よく探索した。具体的には、抗うつ薬慢性投与後にラット脳内で発現が増減する1次候補遺伝子/ESTを抗うつ薬関連遺伝子として検出した。得られたcDNA断片は、サブクローニングした後にジデオキシ法により塩基配列を決定した。次に、GeneBank/ENBLのデータベースに登録されている塩基配列とFASTA法を用いて相同性解析を行い発現プロフィールおよび機能別に分類した。

一方、これまで我々は得られたADRG遺伝子について、1クローンごとにRT-PCR法等を用いて再現性の確認及び定量(2次スクリーニング)を行ってきたが、この過程は膨大な労力と時間を要する作業であった。そこで我々は、この過程のさらなる効率化と迅速化を図るため、選ばれた200個のADRG遺伝子、ポジティブコントロール (house keeping gene など) 及びネガティブコントロール (プラズミドDNA など) をスポットした独自の

ADRG microarray を自主開発した。我々は、コントロール群及び様々な処置群 (向精神薬投与、ECT 処置、ストレス負荷など) のサンプルより mRNA を抽出し、それぞれ、Cy5、Cy3-dUTP 存在下逆転写反応を行い cDNA 蛍光プローブを作製し解析を進めている。具体的には、作製した cDNA を混合し ADRG microarray に競合的にハイブリダイズした後に、Cy3 と Cy5 の蛍光シグナルを 635 nm、532 nm の各検出波長でそれぞれ検出し各スポット上の蛍光強度の比 (Cy3/Cy5) をコンピュータ解析することにより検討した。

(倫理面への配慮) 全ての動物実験は、動物愛護上十分な配慮をし、National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に準拠した実験プロトコールに基づき、各施設内審査委員会の規定に則り、倫理性と科学性に十分配慮して実施した。

C. 研究結果

我々は、抗うつ薬慢性投与後にラット脳内で発現が増減する300の1次候補遺伝子/ESTを抗うつ薬関連遺伝子として検出することに成功した。我々が同定したcDNA断片には、神経情報伝達、細胞内情報伝達系に関する機能分子、タンパク質折り畳み、細胞内輸送に関する機能分子、細胞障害、酸化還元系に関する機能分子などの既知遺伝子群とともに、熱ショック蛋白の1つであるHSC70の新規スプライシングバリエーションや、既知の分子と相同性の低い未知の機能的分子が多数含まれていた。さらに、これらの候補分子群の中には神経突起・軸索の伸展や退縮、神経伝達物質の開口放出機構といった神経可塑的变化に機能的に関わるものが複数存在していた。我々は、これら創薬のためのターゲット候補

遺伝子/EST を Antidepressant Related Genes

(ADRG) と命名し詳細に検討を続けている。

今回我々は、抗うつ薬関連遺伝子をスポットした独自の cDNA microarray を作成することに成功した。この cDNA microarray は、抗うつ薬、他のうつ病治療法、種々の情動障害モデル動物における遺伝子発現変化を効率良くスクリーニングすることのできる強力なツールになると考えられた。実際、ADRG microarray を用いて ECT を模した処置を負荷したラットのサンプルを解析した結果、抗うつ薬および ECT という異なる 2 種の治療法施行後に共通して発現変化する遺伝子を多数発見することに成功した。

D. 考察

本研究において、我々は抗うつ薬を慢性投与した実験動物の脳から各薬物に共通した反応を示す新規遺伝子・EST を約 300 同定し、抗うつ薬関連遺伝子をスポットした独自の cDNA microarray を作成することに成功した。我々が開発した cDNA microarray は、抗うつ薬や他のうつ病治療法、種々の情動障害モデル、ストレスモデルにおける遺伝子発現変化を効率良くスクリーニングするための強力なツールになると考えられた。

一方、我々の発見した候補分子群の中には神経可塑的变化に機能的に関わるものが複数存在していた。これら ADRG 遺伝子群はうつ病治療過程の分子メカニズムに関与する可能性が考えられ今後の詳細な検討が待たれる。本研究によって得られた機能分子を創薬ターゲットとしその機能を阻害したり修飾する化合物を新規抗うつ薬候補として開発することが可能となると考えられた。

E. 結論

我々の研究成果により、感情障害に対する治療ターゲット遺伝子・EST を発見し、知的所有権を獲得することが具体的成果として期待される。また、病態に密接に関わる脳内機能分子を発見することにより、個人の病態にあわせた「自殺防止のための最適薬物療法開発」の可能性が期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yamada M, Yamada M, Yamazaki S, Takahashi K, Nara K, Ozawa H, Yamada S, Kiuchi Y, Oguchi K, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Induction of cysteine string protein after chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex. *Neuroscience Letters*, 2001, 301:183-186
- (2) Yamada M, Higuchi T, Functional genomics and antidepressant research. *European Neuropsychopharmacology* (in press), 2002
- (3) Yamada M, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kudo K, Ohata H, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Yamada M, Differential expression of VAMP2/ synaptobrevin-2 after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. (submitted for publication), 2002
- (4) Yamada M, Iwabuchi T, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kudo K, Ohata H, Momose K, Higuchi T, Yamada M, A frizzled protein and its signal transduction cascade as a novel molecular target for antidepressant and lithium treatment in

rat frontal cortex. (submitted for publication), 2002

2. 学会発表

(1) Kudo K, Yamada M, Yamada M, Yamazaki S, Takahashi K, Nishioka G, Hashiguchi T, Fukuzako H, Takigawa M, Higuchi T, Momose K, Kamijima K, Chronic rTMS treatment induces an antidepressant related gene, ADRG34, in the rat frontal cortex. CINP Regional Meeting, Hiroshima, 2001

(2) Yamada M, Kudo K, akahashi K, Kaihotsu M, Sakurai E, Nishioka G, Hirano M, Yamada M, Momose K, Kamijima K, Higuchi T, Functional genomics in search of a novel human genetic polymorphism responsible for treatment-resistant depression -ADRG34 as a novel target molecule for investigation, CINP Regional Meeting, Hiroshima, 2001

(3) Takahashi K, Yamada M, Higuchi T, Yamada M, Momose K, Identification of a novel gene, ADRG#123, regulating neurite outgrowth in

PC12 cells., 日本薬理学会、横浜、2001

(5) 西岡玄太郎、山田光彦、山田美佐、山崎諭、工藤謙太郎、高橋弘、橋口知、福迫博、滝川守国、樋口輝彦、百瀬和享、上島国利、抗うつ薬長期投与、ECT および rTMS 処置後のラット脳内における ADRG34 の発現変化、日本生物学的精神医学会、長崎、2001

(6) 西岡玄太郎、山田光彦、山田美佐、山崎諭、工藤謙太郎、高橋弘、橋口知、福迫博、滝川守国、樋口輝彦、百瀬和享、上島国利、ECT および rTMS 処置後のラット脳内における ADRG34 の発現変化、第 20 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、小樽、2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得

なし

(2) 実用新案

なし

(3) その他

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

自殺念慮に関与する神経回路機能障害の神経栄養因子による修復の分子機構解明と
治療・予防薬開発に関する研究

分担研究者 染矢俊幸 新潟大学大学院医歯学総合研究科精神医学分野・教授

研究要旨

自殺の原因としてうつ病あるいはストレス感受性が重要であるが、これらの病態に脳内サイトカインが関与していることが示唆されている。脳内サイトカインの役割を解明すべく、ストレス負荷による脳内サイトカイン発現の変化、新生児期サイトカイン末梢投与による行動変化について動物を用いた研究を行った。ストレス負荷実験については新潟大学動物実験委員会の承認を得ている。ストレス負荷による脳内サイトカイン mRNA 発現変化については RT-PCR 法で測定したが、痙攣により IL-1 β は前頭葉と脳幹で 3 倍、BDNF は前頭葉で 2 倍に増加した。また、拘束と虚血により IFN γ は前頭葉で 2 倍に増加した。ストレス負荷による脳内サイトカインのタンパク発現については ELISA 法で測定したが、視床下部では負荷後 3, 12, 24 時間と IL-1 β の漸減傾向および IL-1ra の漸増傾向が認められた。ストレス負荷による IL-1 β の増加は負荷後 3 時間以内に終了し、その後に IL-1ra が増加すると考えられ、負荷後 3 時間以内の測定が必要である。新生児ラットに IL-1 α , IL-2, IL-6, IFN γ を投与したところ、3 週齢では自発運動量が対照群と比較して IL-2 投与群では有意な増加を示し、IFN γ 投与群では有意に減少していたが、8 週齢に成長すると各サイトカイン投与群とも差を認めなかった。このことからサイトカインは発達段階の早期に行動変化を惹き起こすことが明らかとなった。今後は新生児期にサイトカインを投与された成体ラットにおけるストレス感受性について研究を行う予定である。

A. 研究目的

自殺者数は年々増加の一途を辿っており、その予防は社会的急務である。多くの場合自殺の背景として精神疾患の存在が認められ、特にうつ病あるいは心理・社会的ストレス因子によるうつ状態の頻度が高いものと推測される。近年、うつ病あるいはストレスにサイトカインが関与していることが示唆されている。例えば、うつ病患者群のインターロイキン 6(IL-6)、可溶性 IL-6 受容体(sIL-6R)、sIL-2R 血漿濃度は対照群よりも有意に高いことが報告されている。C 型肝炎などの治療として投与されたインターフェロン(IFN)によってうつ病が惹起されることは临床上稀ならず経験される。腫瘍壊死因子 α (TNF- α)の投与により食欲低下や易疲労感などが起こることも知られている。したがって脳内サイトカインの役割を解明することにより、新規の抗うつ薬または抗ストレス薬の開発につながる

可能性が高い。そこで脳内サイトカインに関して以下の 2 点を目的として研究を行った。ストレス負荷マウスの脳内サイトカイン発現レベルを測定することにより、どのサイトカインが脳内のどの部位に作用するかについて解明する。新生児期ラットへのサイトカイン末梢投与が発達段階にどのような行動学的影響を及ぼすについて解明することで、サイトカインによるストレス感受性調節能について評価考察する。

B. 研究方法

1) ストレス負荷によるサイトカイン mRNA 発現の変化

ラットに強制水泳、拘束、痙攣、電気ショック、虚血のストレス負荷を行う。海馬、視床下部を採取し、 -80°C で保存する。各脳部位の RNA を抽出し、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 受容体アンタゴニスト(IL-1ra)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、IFN γ 、トランスフォーミング成長因子(TGF- β 3)、ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子(HB-EGF)、ニューレグリン(NRG)、EGF の mRNA 量を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により測定した。内部標準として β アクチンを用いた。

2) ストレス負荷によるサイトカインタンパク発現の変化

11 週齢の C57BL/6 系雄マウスに強制水泳、拘束、電気ショック、隔離、注射のストレス負荷を行う。各ストレス負荷 3, 12, 24 時間後に海馬と視床下部を採取し、 -80°C で保存する。各脳部位のホモジネートを作製し、IL-1 β および IL-1ra タンパク量を酵素標識抗体測定法 (ELISA 法) により測定した。

ストレス負荷実験については新潟大学動物実験委員会の承認を得ている。

3) 新生児期サイトカイン投与による行動変化

Sprague-Dawley 系雄ラットに IL-1 α (1mg/kg), IL-2(2mg/kg), IL-6(1mg/kg), IFN γ (0.4mg/kg)を生後 2 日から 10 日まで連日皮下注射し、3 および 8 週齢で open field test により自発運動量を測定した。サイトカイン投与群と対照群の比較には Student の T 検定を用い、 $p < 0.05$ で有意とした。

C. 研究結果

1) ストレス負荷によるサイトカイン mRNA 発現の変化

前頭葉では痙攣により IL-1 β mRNA 量が 3 倍、BDNF mRNA は 2 倍に増加した。また、拘束と虚血により IFN γ mRNA は各々 1.9 および 2 倍に増加した (図 1A)。脳幹では痙攣により IL-1 β mRNA が 3 倍に増加した (図 1B)。

2) ストレス負荷によるサイトカインタンパク発現の変化

海馬と視床下部の IL-1 β および IL-1ra タンパク量については図 2, 3 に示すとおりであるが、コントロールをストレス負荷後 0 時間とした。海馬において IL-1 β タンパク量の変化は各ストレス負荷による一定の傾向を認めず (図 2A)、視床下部では各ストレス負荷により減少していた (図 2B)。IL-1ra タンパク量は海馬において各ストレス負荷により変化し

なかったが (図 3A)、視床下部では各ストレス負荷により増加しており、特に拘束と電気ショックでは負荷後 24 時間経過しても増加が持続していた (図 3B)。

3) 新生児期サイトカイン投与による行動変化

3 週齢では、自発運動量が対照群と比較して IL-2 投与群ラットでは 199%と有意に ($p=0.040$)増加し、IFN γ 投与群では 42%と有意に ($p=0.037$)減少していた (図 4A)。8 週齢では各サイトカイン投与群ともに対照群と比較して有意差を認めなかった (図 4B)。

D. 考察

痙攣により前頭葉と脳幹での IL-1 β および前頭葉での BDNF の mRNA 発現の増加が認められたが、これはてんかんのモデルでの現象と考えられる。

ストレス負荷によるサイトカインタンパク発現の変化に関しては、視床下部では負荷後 3, 12, 24 時間と IL-1 β の漸減傾向および IL-1ra の漸増傾向が認められた。特に拘束と電気ショックによる IL-1ra の増加がストレス負荷終了 24 時間後まで持続していた。ストレス負荷による IL-1 β の増加は負荷後 3 時間以内に終了し、その後に IL-1ra が増加すると考えられ、負荷後 3 時間以内の測定が必要である。

新生児期に IL-2 を投与したラットでは投与終了後 10 日目の 3 週齢で自発運動量が有意に増加し、IFN γ 投与群では有意に減少していたが、8 週齢では各サイトカイン投与群とも対照群と差を認めなかった。このことから新生児期の IL-2 あるいは IFN γ の投与は発達段階の早期に行動変化を惹き起こすことが明らかとなったが、そのメカニズムについては不明である。新生児期にサイトカインを投与された成体ラットのストレス感受性について検討することにより、ストレス耐性の生物学的素因を説明できる可能性があり今後の研究が必要である。

E. 結論

痙攣により IL-1 β 、BDNF、IFN γ の mRNA 発現増加が認められ、てんかんのモデルと考えられた。

ストレス負荷による視床下部 IL-1 β タンパク発現は負荷終了後漸減するのに対し、IL-1ra は漸増する。

新生児期の IL-2 あるいは IFN γ の投与は発達段階の早期に慢性的な行動変化を惹き起こす。

F. 健康危険情報

新生児等に対するサイトカイン治療は、ストレス感受性を含め、その後の認知行動学的脳発達に影響を与える可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

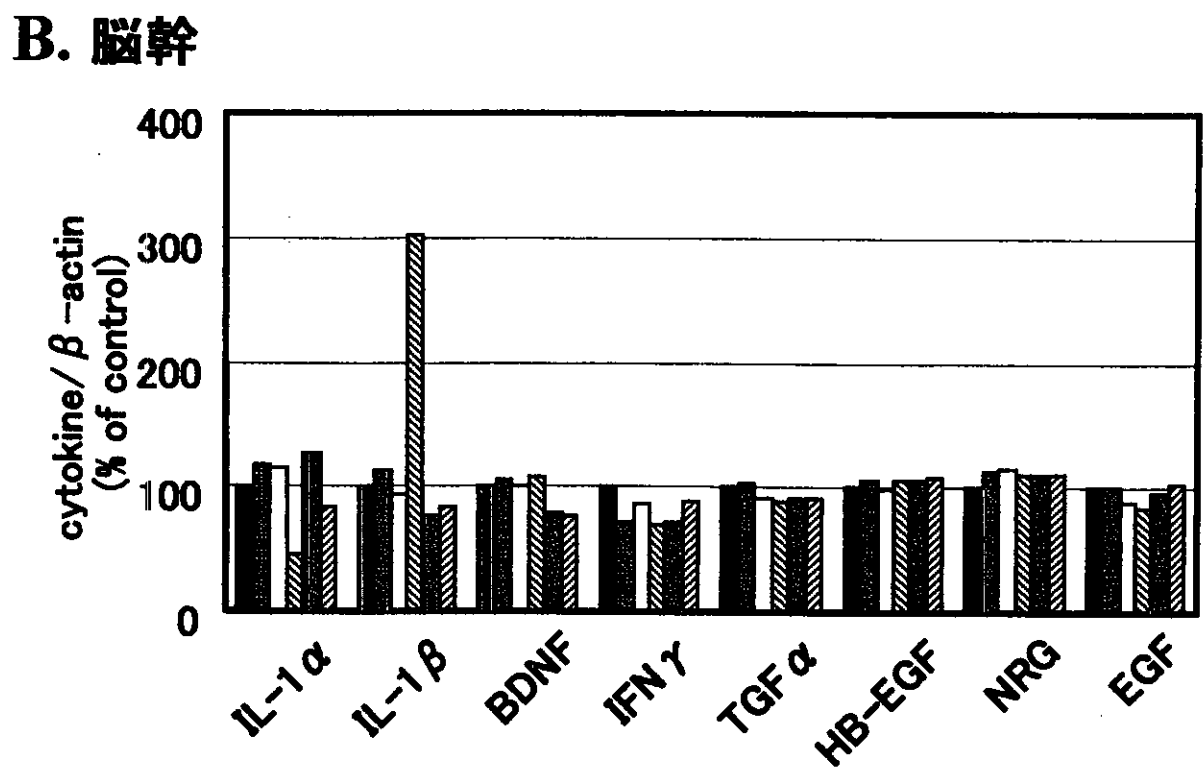
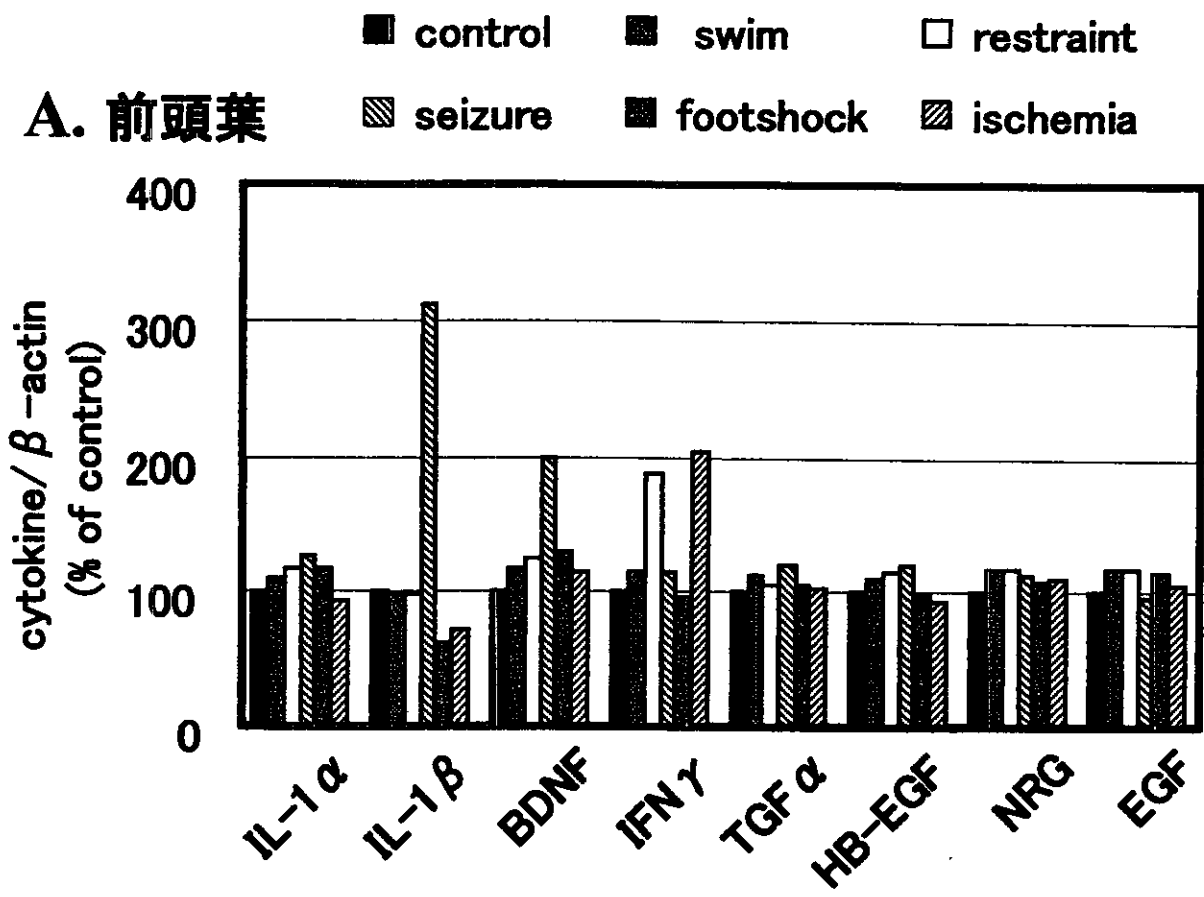
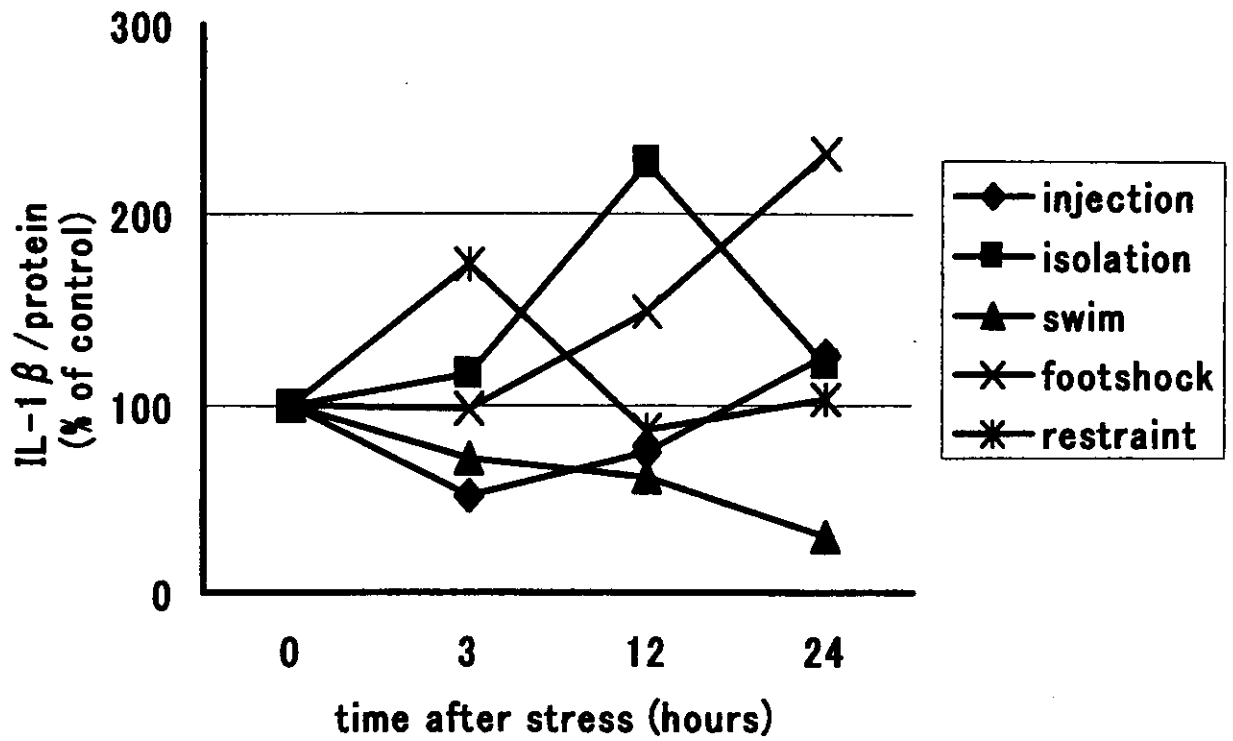


図1 ストレス負荷による脳内サイトカイン発現の変化

IL-1: interleukin, BDNF: brain-derived neurotrophic factor, IFN: interferon, TGF: transforming growth factor, HB-EGF: heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, NRG: neuregulin

A. 海馬



B. 視床下部

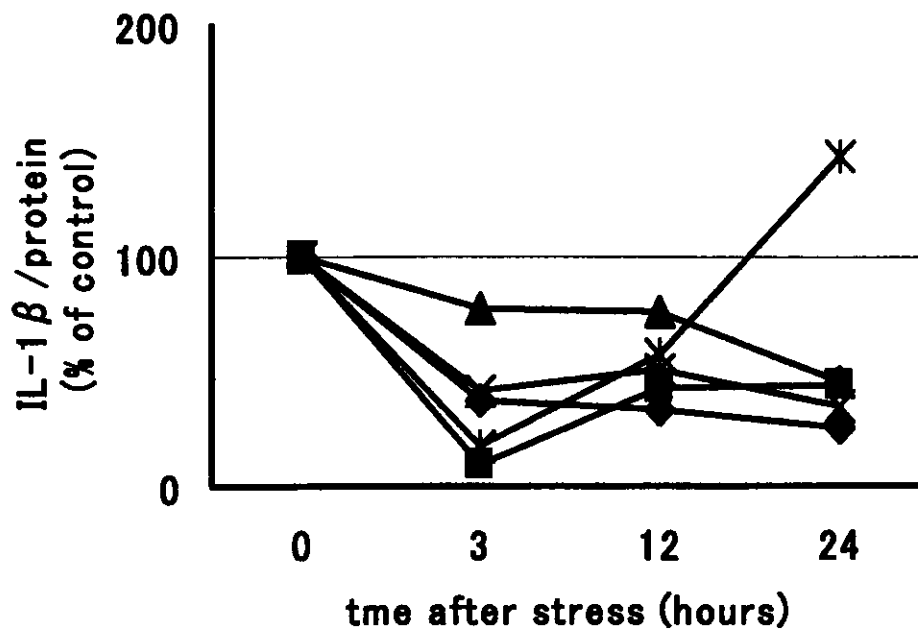
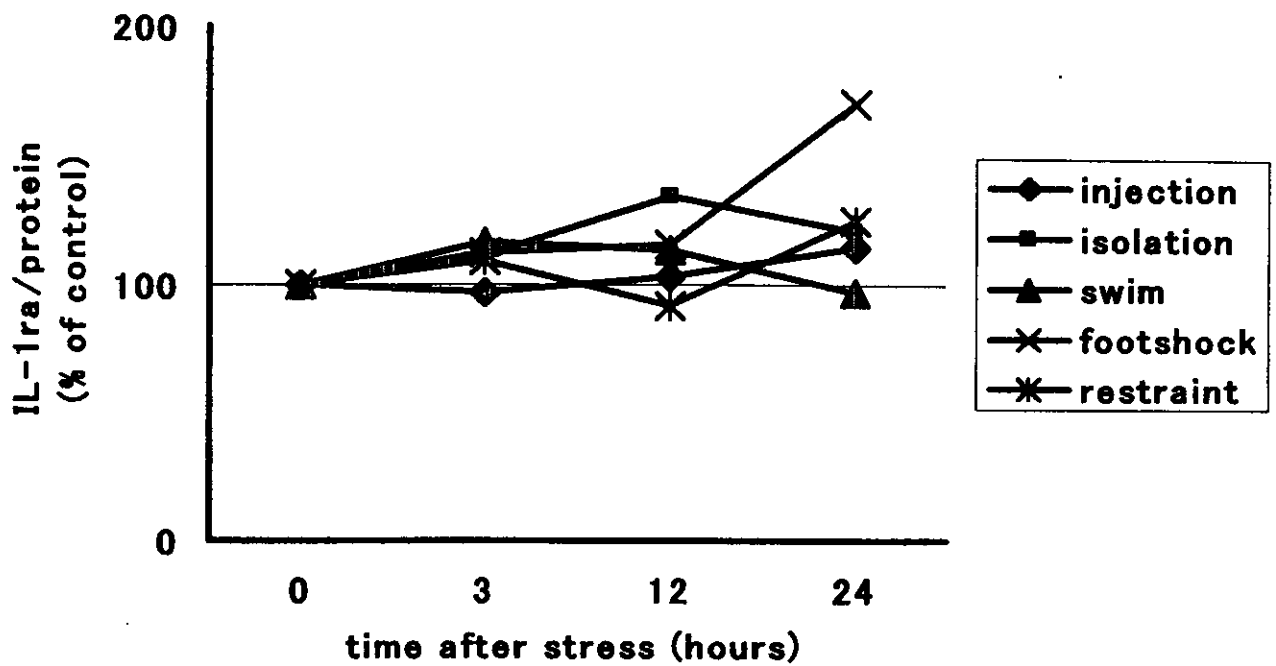


図2 ストレス負荷による脳内IL-1βタンパク発現の変化

A. 海馬



B. 視床下部

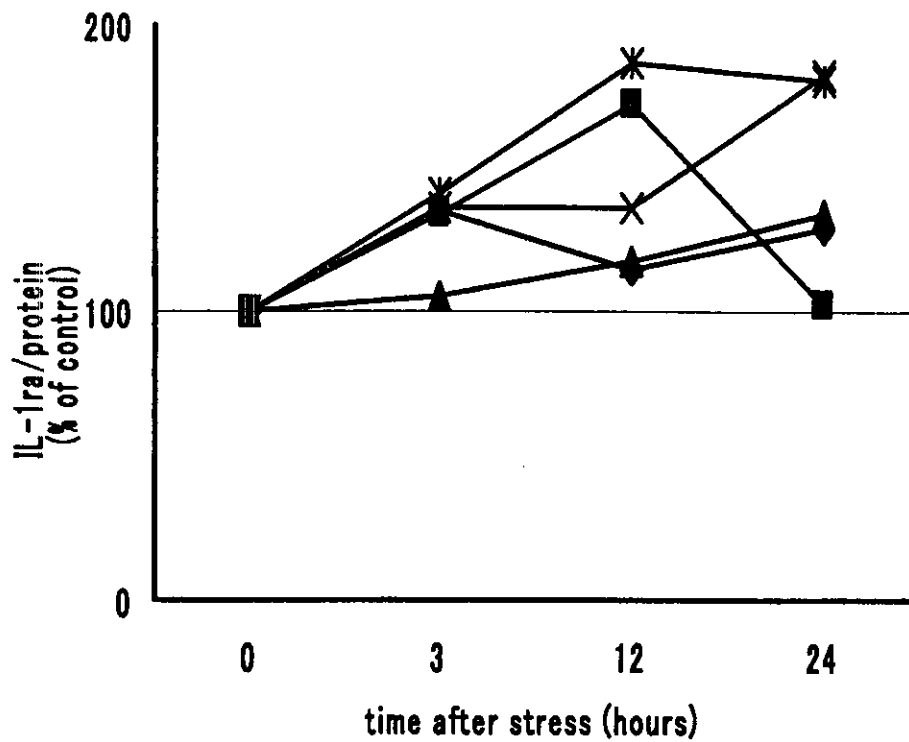
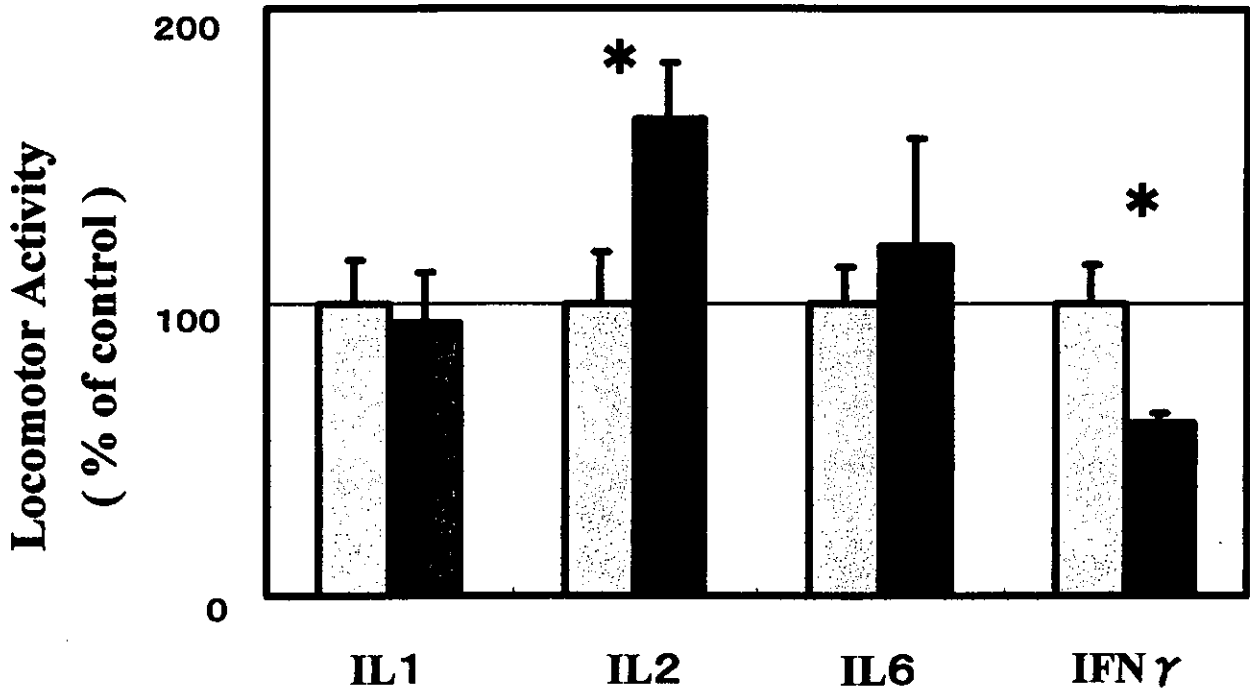


図3 ストレス負荷による脳内IL-1raタンパク発現の変化

□ control ■ cytokine

A. 3 週齡



B. 8 週齡

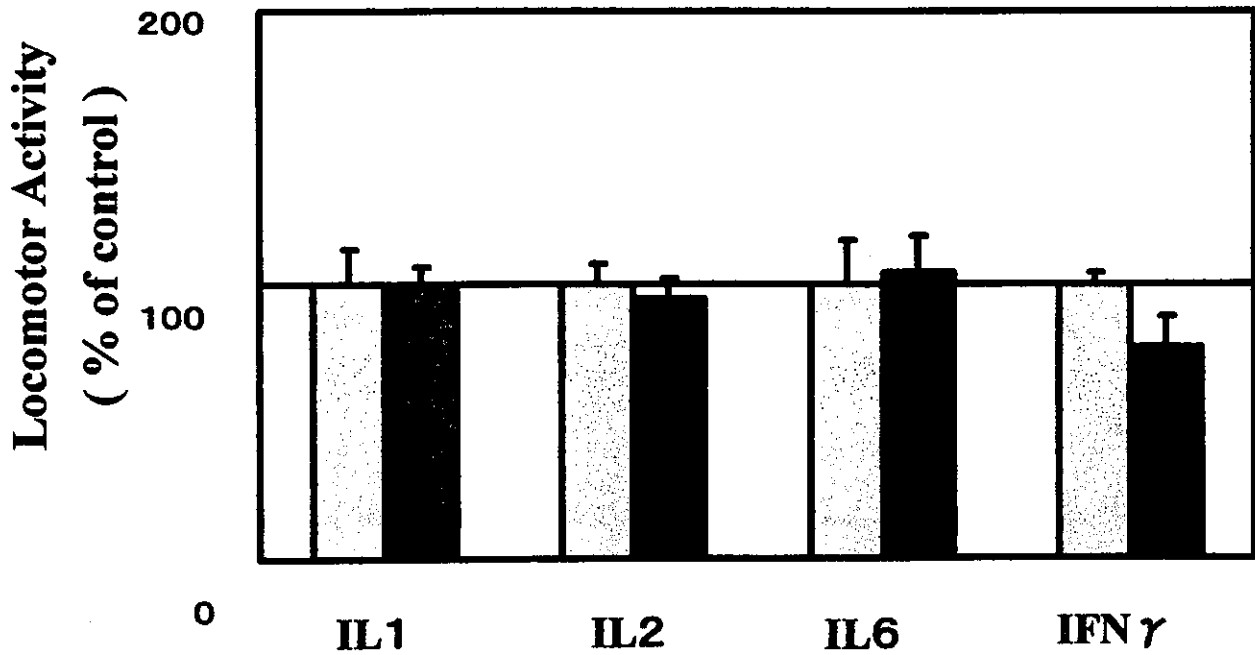


図4 新生児期サイトカイン投与による行動変化

* p < 0.05 with Student's *t*-test