

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

「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14年度 総括・分担 研究報告書

主任研究者 樋口 輝彦

平成15年3月31日

# 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 10

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 14

染矢 俊幸

(資料) 研究結果補足 (図1～図5)

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 19

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 23

前田 潔

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 28

## 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:** 自殺の背景には様々な要因が存在するが、その大半は精神疾患や強度のストレスに伴ううつ状態が原因と考えられ、従来から行われている社会心理学的予防策を発展させるだけでなく、生物学的な予防方法を開発することが重要である。また、自殺には「衝動性」や「抑うつ状態」といった、精神障害の疾患単位を越えた共通の生物学的機序が考えられる。そこで本研究では、自殺の生物学的マーカー分子と予防薬・治療薬開発の標的分子を明らかにする目的で、ゲノム情報を利用した分子生物学的研究を行った。平成14年度は初年度に得られた知見をさらに発展的に継続し、はじめに、衝動性の障害やストレス耐性低下との関連するとされる5HT神経およびDA神経伝達系に関わる遺伝子多型と自殺との相関研究を行ったところ、男性では高COMT活性が自殺に抑制的に働いていることが示唆された。さらに、多型間の相互作用を検討したところ5HTT-LPRとMAOA-uVNTRおよび5HTT-LPRとCOMT:158Val/Met多型で、男性においてのみ、遺伝子型の組合せの分布に有意差を認めた。動物モデルを用いた研究では、differential cloning法を用いて種々の抗うつ薬を慢性投与したラットから各薬物に共通した反応を示す新規遺伝子を複数単離した。加えて、神経栄養因子、サイトカインおよびそれらの受容体について、ストレスや向精神薬を負荷した動物の脳や、精神神経疾患患者の死後脳における変化を検討中である。尾懸垂テスト及び強制水泳負荷マウスでQTL解析の結果、無動時間を支配する遺伝子座を、マウス染色体上に同定した。我々が注目した11番染色体には、候補遺伝子としてGABA A受容体の4つのサブユニットがコードされているため、それら遺伝子をうつ病患者サンプルを用いて調査した結果、GABA-A受容体のα1サブユニット遺伝子多型が女性のうつ病に相関していることが見いだされた。さらに、コンソミック動物を作成するため、各染色体についてF3個体をそれぞれ約60匹作成し、すべての個体について表現型を測定し全ゲノムスキャンを行った。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

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策の研究は急務である。大部分の自殺が強度のストレスやうつ病などの精神疾患によって引き起こされるうつ状態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

A. 研究目的

対応では十分な予防は行えていない。一方、うつ病の発症メカニズムとして心理社会的要因とともに脳の脆弱性因子が重要である。こうしたうつ病感受性ないしストレス脆弱性の素因は単一遺伝子ではなく多遺伝子およびそれらの相互作用で影響されている。我々は、自殺者死後脳における遺伝子発現プロファイルの特徴を詳細に検討する作業を開始しているが、このような多遺伝子の複合要因を解明するにあたっては自殺者死後脳などのヒトサンプルだけの解析では限界がある。そのため、うつ病感受性ないしストレス脆弱性の個々の遺伝的要因(感受性遺伝子)を明らかにするためには、コンソミックマウスなどの先端的な動物モデルを有効に利用しゲノムレベルで網羅的に研究を進めていく必要がある。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。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

## 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

(1) 候補遺伝子の探索:平成14年度は、初年度に引き続き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。新規遺伝子を含めた探索には、蛍光試薬を用いた独自の differential cloning 法を用い mRNA レベルで調査した。候補遺伝子・EST の2次スクリーニングには、我々が独自に開発した ADRG microarray プロトタイプに改良を加えながら随時検討した。得られた cDNA 断片は

塩基配列を決定し、相同性解析の後に発現プロフィールおよび機能別に分類した。

(2) 培養神経細胞の形態変化を指標としたアッセイ系の確立:神経回路網再編成といった神経可塑的变化の関与を検討するため、神経突起・軸索の伸展・退縮調節機構に注目し可視化によるアッセイ系の構築を試みた。実際には、培養神経系細胞および神経成長因子により神経細胞用に分化させた PC12 細胞に候補 ADRG 遺伝子と GFP 遺伝子を共発現させたモデル(機能強化モデル)を用いて蛍光顕微鏡画像解析を行い、突起長及び神経突起数生じる影響を検討した。さらに、抗 ADRG 抗体をトランスフェクションしたモデル(機能抑制モデル)を用いて同様の検討を行った。

(3) 神経伝達物質開口放出メカニズムの変化を指標としたアッセイ系の確立:神経細胞の機能的変化としての神経可塑的变化の関与を検討するため、シナプスにおける神経伝達物質の開口放出機構に注目したアッセイ系の確立を試みた。予備的実験として、神経成長因子により神経細胞様に分化させた PC12 細胞に[3H] Noradrenaline を取り込ませ、高濃度カリウム刺激による[3H] Noradrenaline の開口放出レベルの検討を行った。実際の検討は、培養細胞に抗 ADRG 抗体をトランスフェクションしたモデル(機能抑制モデル)を用いて解析を行った。

### ○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

(1) 成体期ラットへの IL-1 $\alpha$  投与実験:8 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系ラットに IL-1 $\alpha$  (100  $\mu$ g/個体)を腹腔内注射し、1 時間後及び24 時間後に音刺激驚愕反応を測定した。音刺激驚愕反応は、120dB のパルス、パルスの100 ミリ秒前に3種類(75, 80, 85dB)のプレパルスのいずれか、70dB のバックグラウンド・ノイズ、これら5種類の試行を8回ずつ順不同で施行す

ることにより測定した。

(2) 幼若期ラットへの IL-1 $\alpha$  投与実験: SD 系ラットに IL-1 $\alpha$  (1mg/kg) を生後 2 から 10 日まで連日皮下注射し、8 週齢で音刺激驚愕反応を測定した。また、8 週齢で断頭し前頭前皮質を採取するとともに、体幹部からは血液を採取した。血清 CORT はラジオイムノアッセイにより測定した。前頭前皮質の DA、DOPAC、5-HT、5-HIAA は高速液体クロマトグラフィーにより測定した。内部標準にはイソプロテノールを用い、湿重量により補正を行った。

#### 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

(1) QTL 上の候補遺伝子の解析: 強制水泳テストにおける無動時間の QTL の 1 つがマウス染色体 17 番にあったが、その部位はヒトでは染色体 18 番短腕に相当し、これまでの躁うつ病の連鎖解析で繰り返し連鎖が報告されてきた部位でもある。マウス染色体 17 番 QTL には多数の遺伝子が存在するが、我々は NADH dehydrogenase と Rab-13 を解析の対象に取り上げた。理由は、別の動物実験 (学習性無力ラットの DNA microarray 解析) から示唆された感受性候補遺伝子の中で、遺伝子座位が 17 番 QTL と重なったのがこれら 2 つの遺伝子であったためである。B6 と C3 マウスからゲノム DNA を抽出し、2 つの遺伝子のタンパクをコードしているエクソン配列を、PCR-direct sequencing 法により調べた。

(2) ヒト遺伝子の解析: マウスの QTL 解析で、染色体 11 番は強制水泳テストおよび尾懸垂テストの両方でオーバーラップするピークが得られた部位である。ヒトでは染色体 5 番長腕に相当し、躁うつ病および不安障害でも連鎖が報告されている領域である。そこには GABA (g-amino butyric acid) A 受容体のサブユニット遺伝子群がコードされている。そこで、すでに知

られている GABA A receptor 遺伝子の  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$  subunit 上の多型を用いて、気分障害サンプルで case-control association study を行った。対象は、DSM-IV に基づいて診断された気分障害 (単極性障害+双極性障害) 203 名と対照群 202 名で、理化学研究所の倫理委員会承認されたプロトコールに基づき、書面による同意の得られた者である。 $\alpha 1$  のイントロン 1 に存在する 15413G>A、および  $\alpha 6$  のエクソン 11 に存在する 603814T>C を PCR-direct sequencing 法でタイプした。

(3) コンソミックラインの作成: C57BL/6 (B6) と C3H/He (C3) マウス近交系間でそれぞれを受容系統、供与系統とした「表」・「裏」のコンソミックラインを、無動時間の QTL が認められた染色体 2 番、4 番、6 番、8 番、11 番、14 番、17 番、X 染色体について作成を開始した。平成 14 年度は、まず B6、C3 間の F1 雄を 21 匹用いて、2 つの親系統に戻し交配し雄 378 匹を得た (N2 世代)。この 378 匹を 77 個のゲノムワイドマーカーを用いて、上記対象染色体に関して best male (対象染色体上のマーカーはすべてヘテロとして残り、それ以外の染色体が受容系統のマーカーでなるべく置き換わった個体) を各 2 匹ずつ選択した。それら best male 個体を再び親系統に戻し交配して、染色体 2 番については 69 匹の雄、染色体 4 番- 63 匹、6 番- 78 匹、8 番-76 匹、11 番- 102 匹、14 番- 77 匹、17 番- 65 匹の雄個体をそれぞれ得た (N3 世代)。N3 世代の選択にあたっては、対象染色体のヘテロ性が保たれているか見るために、各染色体につき 6- 9 個のマイクロサテライトマーカーを用いて調べた。常染色体に関しては、現在 N3 世代個体を親系統に戻し交配して各染色体につき相当数の雄を確保して、再びすべての個体をゲノムワイドマーカーを用いてタイピングして、best male (N4 世代) を選択する予定である。

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 163 例 (男性 112 例、平均年齢±標準偏差: 48.7±17.0 歳; 女性 51 例: 47.13±20.0 歳) を対象とした。健常対照群 169 例 (男性 114 例: 45.3±15.5 歳; 女性 55 例: 48.9±18.7 歳) は、自殺既遂者と性別・年齢を対照させるため無作為抽出した。本研究では、自殺に関連する気質を規定する遺伝的要因として、モノアミン神経伝達に影響を与えるとされる機能的遺伝子多型に着目した。5HT 神経系では、5HTT-LPR (1/s 多型) ならびに MAOA-uVNTR (3/4 多型)、DA 神経系では、DRD4:-521C/T 多型ならびに COMT: 158Val/Met 多型を解析の対象とした。自殺既遂者および健常対照者の血液から DNA を抽出し、各遺伝子多型については既報に従い関心領域を PCR 法により増幅した後、電気泳動により変異の有無を同定した。自殺既遂者群、健常対照群の遺伝子型ならびに遺伝子頻度を  $\chi^2$  検定にて比較検討した。本研究は、神戸大学大学院医学系研究科遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得ている。検体の採取にあたっては、ご遺族に研究の趣旨を説明し文書による同意を得た。

## 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

(1) 候補遺伝子の探索: 種々の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 を初年度は前頭葉皮質より約 300 個、2 年度は海馬より約 450 個同定した。我々が同定した cDNA 断片には、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。

(2) 培養神経細胞の形態変化を指標としたアッセイ系の確立: ADRG#14 をモデルとした実験では、ADRG#14 強制発現群では、神経突起の長さは退縮し、神経突起数も減少していることが確認された。

(3) 神経伝達物質開口放出メカニズムの変化を指標としたアッセイ系の確立: 神経成長因子により神経細胞様に分化させた PC12 細胞に抗 ADRG14 抗体をトランスフェクションした条件下 (機能抑制モデル) において、High K 刺激後 10 秒では無刺激と有意な変化は認められず、さらに max に到達するまでの時間に遅れが認められた。ADRG14 はプレシナプスにおける SNARE-complex に関与する可能性が高く興味を持たれる。

### 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

(1) 成体期ラットへの IL-1 $\alpha$  投与実験: 投与 1 時間後では PPI が IL-1 $\alpha$  投与群で有意に低下していたが、24 時間後では対照群と IL-1 $\alpha$  投与群の間に有意差を認めなかった。

(2) 幼若期ラットへの IL-1 $\alpha$  投与実験: IL-1 $\alpha$  投与群では、PPI が有意に低下していた。血清 CORT 濃度の平均値は IL-1 $\alpha$  投与群で有意に低下していた。前頭前皮質 DA 濃度は、両群の間に有意差を認めなかった。DA 代謝産物である DOPAC 濃度の平均値は IL-1 $\alpha$  投与群で有意に増加していた。また、DOPAC/DA の平均値も IL-1 $\alpha$  投与群で有意に増加していた。前頭前皮質 5-HT 濃度の平均値は両群の間に有意差を認めなかった。5-HT 代謝産物である 5-HIAA 濃度の平均値は IL-1 $\alpha$  投与群で有意に低下していた。5-HIAA/5-HT の平均値も IL-1 $\alpha$  投与群で有意に低下していた。

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。

○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

(1) QTL上の候補遺伝子の解析：解析の対象に取り上げたNADH dehydrogenaseとRab-13のアミノ酸配列に影響を与える塩基置換は見いだせなかった。

(2) ヒト遺伝子の解析：GABA-A receptor 遺伝子のa1のイントロン1に存在する15413G>A、およびa6のエクソン11に存在する603814T>CをPCR-direct sequencing法でタイプした。両多型とも男性では対立遺伝子、遺伝子型頻度ともに有意差は認められなかったが、女性ではa1Δ15413G>Aで、対立遺伝子頻度P=0.0176、a6Δ603814T>Cで対立遺伝子頻度P=0.0118、遺伝子型頻度P=0.0335と有意差が認められた。2つのSNPからなるハプロタイプ解析ではP=0.0031であった。

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。

○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

5HTT-LPR、MAOA-uVNTR、DRD4:-521C/T多型では、自殺既遂者群(全例・男・女)と健常対照群(全例・男・女)における遺伝子型ならび遺伝子頻度の分布に有意な差を認めなかった。一方、COMT:158Val/Met多型では、男性自殺既遂者群と男性対照群において遺伝子型の分布に有意差がみられ、遺伝子頻度でも男性自殺既遂者群でG(Val)アレルが少ない傾向を認めた。このことから、男性では高COMT活性が自殺に抑制的に働いて

いることが示唆された。5HTT-LPR、MAOA-uVNTR、DRD4:-521C/T多型、及びCOMT:158Val/Met多型間の相互作用を検討したところ、男性自殺既遂者群と男性対照群においては、5HTT-LPRとMAOA-uVNTR、および5HTT-LPRとCOMT:158Val/Met多型において遺伝子型の組合せの分布に有意差を認めた。

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。また、自殺者死後脳を用いた遺伝子発現プロファイルの予備的検討に着手しており、いくつかの候補遺伝子を同定している。

#### 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. Nishioka G, Yamada M, Kudo K, Takahashi K, Kiuchi K, Higuchi T, Momose K, Kamijima K and Yamada M, Induction of *kf-1* after repeated electroconvulsive treatment and chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex and hippocampus. *Journal of Neural Transmission*, 2003 (in press)
2. 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. *The Pharmacogenomics Journal*, 2, 377-382, 2002
3. Yamada M, Higuchi T, Functional genomics and antidepressant research. *European Journal of Neuropsychopharmacol*, 12, 235-244, 2002
  4. Toyooka, K., Asama, K., Watanabe, Y., Muratake, T., Takahashi, M., Someya, T. and Nawa, H.: Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 110(3): 249-257, 2002.
  5. Futamura, T., Toyooka, K., Iritani, S., Niizato, K., Nakamura, R., Tsuchiya, K., Someya, T., Kakita, A., Takahashi, H. and Nawa, H.: Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 7(7): 673-682, 2002.
  6. Toyooka, K., Iritani, S., Makifuchi, T., Shirakawa, O., Kitamura, N., Maeda, K., Nakamura, R., Niizato, K., Watanabe, M., Kakita, A., Takahashi, H., Someya, T. and Nawa, H.: Selective reduction of a PDZ protein, SAP-97, in the prefrontal cortex of patients with chronic schizophrenia. *J Neurochem* 83(4): 797-806, 2002.
  7. 渡部雄一郎, 染矢俊幸: 統合失調症の発達障害仮説. KEY WORD 精神第3版(樋口輝彦, 神庭重信, 染矢俊幸, 宮岡等編). 先端医学社 東京. (印刷中).
  8. 豊岡和彦, 染矢俊幸: DNA マイクロアレイ. KEY WORD 精神第3版(樋口輝彦, 神庭重信, 染矢俊幸, 宮岡等編). 先端医学社 東京. (印刷中).
  9. 那波宏之, 二村隆史, 高橋誠, 豊岡和彦, 染矢俊幸: 精神分裂病における神経栄養因子の機能異常. 日本臨床 (印刷中).
  10. Toyota, T., Hattori, E., Meerabux, J., Yamada, K., Saito, K., Shibuya, H., Nankai, M., Yoshikawa, T.: Molecular analysis, mutation screening, and association study of adenylyl cyclase type 9 gene (ADCY9) in mood disorders. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet.* 114: 84-92, 2002.
  11. 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* 12: 357-366, 2002.
  12. 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* 14: 210, 213, 2002.
  13. 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* 7: 337-339, 2002.
  14. 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.* 114: 523-526, 2002.
  15. Toyota, T., Yamada, K., Saito, K., Detera-Wadleigh, S. D., Yoshikawa, T.: Association analysis of adenylyl cyclase type 9 gene using pedigree disequilibrium test in bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* 7: 450-452, 2002.
  16. Ebihara, M., Ohba, H., Ohno, S., Yoshikawa, T.: Genomic organization and promoter analysis of the human nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 6$  subunit (CHNRA6) gene: Alu and other elements direct transcriptional repression. *Gene* 298: 101-108, 2002.
  17. Ohtsuki, H., Ishiguro, H., Detera-Wadleigh, S.D., Toyota, T., Shimizu, H., Yamada, K., Yoshitsugu, K., Hattori, E., Yoshikawa, T., Arinami, T.: Association between serotonin 4 receptor gene polymorphisms and bipolar disorder in Japanese case-control samples and the NIMH Genetics Initiative Bipolar Pedigrees. *Mol. Psychiatry* 7: 954-961, 2002.
  18. Yoshitsugu, K., Meerabux, J.M.A., Asai, K., Yoshikawa, T.: Fine mapping of an isodicentric Y chromosomal breakpoint from a schizophrenic patient. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet.* (in press)
  19. Iwayama-Shigeno, Y., Yamada, K., Toyota, T., Shimizu, H., Hattori, E., Yoshitsugu, K., Fujisawa, T., Yoshida, Y., Kobayashi, T., Toru, M., Kurumaji, A., Detera-Wadleigh, S.,



- Yoshikawa, T.: Distribution of haplotypes derived from three common variants of the NR4A2 gene in Japanese schizophrenic patients. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet.* (in press)
20. Ebihara, M., Ohba, H., Hattori, E., Yamada, K., Takeo Yoshikawa, T. Transcriptional activities of cholecystokinin promoter haplotypes and their relevance to panic disorder susceptibility. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatric Genet.* (in press)
  21. Kikuchi, M., Yamada, K., Toyota, T., Itokawa, M., Hattori, E., Yoshitsugu, K., Shimizu, H., Yoshikawa, T. Two-step association analyses of the chromosome 18p11.2 region in schizophrenia detect a locus encompassing C18orf1. *Mol. Psychiatry* (in press)
  22. Toyota, T., Yamada, K., Detera-Wadleigh, SD, Yoshikawa, T. Analysis of a cluster of polymorphisms in AKT1 gene in bipolar pedigrees: a family-based association study. *Neurosci. Lett.* (in press)
  23. Itokawa M., Yamada K., Yoshitsugu K., Toyota T., Suga T., Ohba H., Watanabe A., Hattori E., Shimizu H., Tetsuo Kumakura T., Ebihara M., Meerabux J. M. A., Michio Toru M., Yoshikawa T. A microsatellite repeat in the promoter of the NMDA receptor 2A subunit (GRIN2A) gene suppresses transcriptional activity and correlates with chronic outcome in schizophrenia. *Pharmacogenetics*, (in press)
  24. Nishiguchi, N., Shirakawa, O., Ono, H., Nishimura, A., Nushida, H., Ueno, Y., Maeda, K. Lack of an association between 5HT1A receptor gene structural polymorphisms and suicide victims. *Am J Med Genet* 114 : 423-425 2002.
  25. 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 : 340-2 2002.
  26. Ono, H., Shirakawa, O., Nishiguchi, N., Kitamura, N., Hashimoto, T., Nishimura, A., Nushida, H., Ueno, Y., Maeda, K. Tryptophan hydroxylase immunoreactivity is altered by the genetic variation in postmortem brain samples of both suicide victims and controls. *Mol. Psychiatry* 7 : 1127-1132 2002.
  27. 小野久江, 白川治, 西村明儒, 主田英之, 上野易弘, 前田潔 自殺者におけるセロトニン神経伝達系遺伝子多型精神薬療基金研究年報 34 : 242-247, 2002.
  2. 学会発表
    1. Takahashi K, Yamada M, Yamada M, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Expression of ndr2 after antidepressant treatment and ECT in rat brain. Neuroscience Meeting, Orlando, 2002
    2. Kudo K, Yamada M, Hirano M, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kamijima K, Momose K, Higuchi T, Yamada M, Induction of cysteine string protein after chronic antidepressant and lithium treatment in rat frontal cortex. CINP, Montreal, 2001
    3. 山田光彦, 山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 平野美保, 岩渕知子, 西岡玄太郎, 工藤謙太郎, 大幡久之, 上島国利, 百瀬和享, 樋口輝彦, 抗うつ薬奏効機転関連分子としてのVAMP2/ synapto-brevin-2の同定とSNARE complexについて, 日本神経精神薬理学会, 前橋, 2002
    4. 山田光彦, 山田美佐, 高橋弘, 西岡玄太郎, 工藤謙太郎, 櫻井恵里子, 上島国利, 百瀬和享, 樋口輝彦, 抗うつ薬長期投与による cysteine string proteinの発現変化, 日本生物学的精神医学会, さいたま, 2002
    5. 工藤謙太郎, 開発めぐみ, 高橋弘, 西岡玄太郎, 平野美保, 角田美果, 山田美佐, 百瀬和享, 上島国利, 樋口輝彦, 山田光彦, ヒトADRG34 遺伝子をモデルとした治療抵抗性うつ病責任遺伝子多型の探索, 日本精神行動遺伝学会, 横浜, 2002
    6. 山田光彦, 開発めぐみ, 高橋弘, 平野美保, 角田美果, 西岡玄太郎, 工藤謙太郎, 山田美佐, 百瀬和享, 上島国利, 樋口輝彦, ADRG34/kf-1をモデルとしたうつ病治療反応性に関わる遺伝子多型の探索, 日本臨床薬理学会, 大阪, 2002
    7. 山田光彦, 山田美佐, 岩渕知子, 高橋弘, 角田美果, 平野美保, 西岡玄太郎, 工藤謙太郎, 大幡久之, 百瀬和享, 上島国利, 樋口輝彦, 抗うつ薬奏効機転関連分子としてのfrizzled-3 proteinの同定とFrz/Wnt シグナリングの役割について
    8. ○ Nawa, H., Iritani, S., Takahashi, H., Shirakawa, O., Someya, T. and Sugai, T.: Prefrontal abnormality of schizophrenia revealed by DNA macroarray. <2002 World Congress of Psychiatry 2002. 8. 28. Yokohama>
    9. ○ Toyooka, K., Watanabe, Y., Iritani, S., Nakamura, R., Shimizu, E., Asama, K., Makifuchi, T., Kakita, A., Iyo, M., Takahashi, H., Someya, T. and Nawa, H.: Opposite changes in interleukin-1 receptor antagonist levels in the

forebrain and serum of schizophrenic patients.  
<32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience  
2002. 11. 6. Orlando>

10. 小野久江、白川治、橋本健志、林賢浩、服部晴起、北村登、西村明儒、主田英之、上野易之、前田潔 自殺者死後脳におけるトリプトファン水酸化酵素免疫活性と遺伝子多型 第24回日本生物学的精神医学会 さいたま、2002
11. 岡村健二、菱本明豊、小野久江、林賢浩、橋本健志、北村登、松石邦隆、西村明儒、主田英之、上野易弘、白川治、前田潔 自殺者におけるセロトニン6受容体遺伝子多型 第24回日本生物学的精神医学会 さいたま、2002
12. 菱本明豊、小野久江、林賢浩、橋本健志、北村登、松石邦隆、西村明儒、主田英之、上野易弘、白川治、前田潔 自殺者死後脳におけるセロトニン2A受容体遺伝子多型 第24回日本生物学的精神医学会

さいたま、2002

13. (4) 青山慎介、小野久江、西口直希、西村明儒、主田英之、上野易之、白川治、前田潔 自殺者におけるFYNおよびNMDA受容体2B遺伝子多型 第24回日本生物学的精神医学会 さいたま、2002
14. (5) 白川治、小野久江、青山慎介、菱本明豊、岡村健二、柳雅也、服部晴起、山本康二、前田潔 自殺と気質規定遺伝子との相関研究 第35回精神神経系薬物治療研究報告会 大阪 2002

#### 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

「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感情障害の発症が重要である。そこで、我々は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。平成 14 年度は、初年度に引き続き differential cloning 法を用いてラット脳から抗うつ薬関連遺伝子・EST を初年度は前頭葉皮質より約 300 個、2 年度は海馬より約 450 個同定した。次に、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。具体的には、これらの候補遺伝子群の一部が軸索の伸展・退縮の調節、神経伝達物質の開口放出に関与する分子クラスターに分類されることがホモロジー解析と定量的遺伝子発現解析により明らかとすることができた。さらに、これらの候補遺伝子群が神経回路網の再編といった神経可塑的变化に重要な役割を果たしていることを培養神経細胞をモデルに用いて証明した。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	昭和大学医学部・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

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精神障害である。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。近年、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感情障害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。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。

平成 14 年度は、探索作業を継続するとともに、初年度までに得られた候補分子について、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するためのアッセイ系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 候補遺伝子の探索

平成 14 年度は、初年度に引き続き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。新規遺伝子を含めた探索には、蛍光 試薬を用いた独自の differential cloning 法を用い mRNA レベルで調査した。候補遺伝子・EST の 2 次スクリーニングには、我々が独自に開発した ADRG microarray プロトタイプに改良を加えながら随時検討した。スライドガラス上へのスポットティングは、GMS417 Arrayer 用い、各処置群から抽出した mRNA サン

ブルをもとにGMS418 Scanner を用いてシグナルを検出し画像解析した。得られた cDNA 断片はジデオキシ法により塩基配列を決定し、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。

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。

(2) 培養神経細胞の形態変化を指標としたアッセイ系の確立

神経回路網再編成といった神経可塑的变化の関与を検討するため、神経突起・軸索の伸展・退縮調節機構に注目し可視化によるアッセイ系の構築を試みた。実際には、培養神経系細胞および神経成長因子により神経細胞用に分化させた PC12 細胞に候補 ADRG 遺伝子と GFP 遺伝子を共発現させたモデル (機能強化モデル) を用いて蛍光顕微鏡画像解析を行い、突起長及び神経突起数生じる影響を検討した。さらに、抗 ADRG 抗体をトランスフェクションしたモデル (機能抑制モデル) を用いて同様の検討を行った。

本年度は、まずはじめに ADRG#14 をモデルとして研究を行った。ADRG#14 抗 ADRG#14 抗体 (1:500) を導入し、Nerve Growth Factor (NGF) を 50ng/ml となるように添加した。3日後、FITC ラベル抗ウサギ Ig G 抗体、Alexa Fluor 568 phalloidin を処置し、共焦点レーザー顕微鏡 MRC 500 で観察し、励起波長 488nm と 568nm の画像を取得した。神経突起長及び数は、NIH image 1.62 を用いて計測した。

(3) 神経伝達物質開口放出メカニズムの変化を指標としたアッセイ系の確立

神経細胞の機能的変化としての神経可塑的变化の関与を検討するため、シナプスにおける神経伝達物質の開口放出機構に注目したアッセイ系の確立を試みた。予備的実験として、神経成長因子により神経細胞様に分化させた PC12 細胞に [3H] Noradrenaline を取り込ませ、高濃度カリウム刺激による [3H] Noradrenaline の開口放出レベルの検討を行った。実際の検討は培養細胞に抗 ADRG 抗体をトランスフェクションしたモデル (機能抑制モデル) を用いて解析を行った。

本年度は、まずはじめに ADRG#14 をモデルとして研究を行った。抗 ADRG#14 抗体及び NGF を添加 3日後、[3H] Noradrenaline を取り込ませた後、コントロールまたは High K バッファーに置換し、各時間経過後バッファーを回収した。さらに、細胞に lysis buffer を添加し細胞を破碎し、回収した。シンチレーションカウンターにより細胞より放出された、または残存する [3H]

Noradrenaline 量を測定した。

## C. 研究結果

### (1) 候補遺伝子の探索

種々の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 を初年度は前頭葉皮質より約 300 個、2年度は海馬より約 450 個同定した。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分子群、タンパク質折り畳み、細胞内輸送に関する分子群、細胞障害、酸化還元系に関する分子群などの既知遺伝子群とともに、熱ショック蛋白である 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群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。

(2) 培養神経細胞の形態変化を指標としたアッセイ系の確立

我々がこれまでに明らかとしてきた ADRG 遺伝子の一部が神経可塑性の変化 (神経突起・軸索の伸展・退縮調節等) に関与する遺伝子群に属することが明らかとなった。そこで、候補遺伝子と GFP を培養神経系細胞にトランスフェクションし強制発現させ、神経可塑的变化の可視化により、神経突起長、神経突起数を計測した。

ADRG#14 をモデルとした実験では、PC12 細胞へのタンパク導入試薬による抗 ADRG#14 抗体のトランスフェクション効率は、導入 3日後で 70~80%であった。共焦点レーザー顕微鏡下で比較観察したところ、トランスフェクタントでは、神経突起の長さは退縮し、神経突起数も減少していることが確認された。続いてこれを数値化するために、各群、120~150 の細胞について神経突起長および数を計測した。その結果、1 個の細胞における神経突起の合計の長さの平均は、対照群で  $95.7 \pm 5.0 \mu\text{m}$ 、強制発現群では  $56.1 \pm 3.7 \mu\text{m}$  であり、神経突起数は、対照群で  $3.3 \pm 0.3$ 、強制発現群では  $2.4 \pm 0.5$  であり有意に減少していた。

(3) 神経伝達物質開口放出メカニズムの変化を指標としたアッセイ系の確立

神経細胞の機能的変化としての神経可塑的变化の関与を検討するため、シナプスにおける神経伝達物質の開口放出機構に注目したアッセイ系の確立を試みた。神経成長因子により神経細胞様に分化させた PC12 細胞に抗 ADRG#14 抗体をトランスフェクションした条件下 (機能抑制モデル) において、抗 ADRG#14 抗体導入 3日後、[3H] Noradrenaline を取り込ませ、High K 刺激により放出された [3H] Noradrenaline 量を測定した。最初に対照群における High K 刺激による経時変化を検討した結果、刺激後 10 秒で無刺激の約 1.5

倍となり、30秒で2倍、その後10分まで一定であった。一方、抗ADRG#14抗体を導入したPC12細胞では、10秒では無刺激と有意な変化は認められず、30秒で1.5倍、3分で2倍となり、maxに到達するまでの時間に遅れが認められた。ADRG14はプレシナプスにおけるSNARE-complexに関与する可能性が高く興味を持たれる。

#### D. 考察

我々は、種々の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を初年度は前頭葉皮質より約300個、2年度は海馬より約450個同定することに成功した。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。神経伝達物質開口放出や他の神経可塑的变化に関わる基礎研究は盛んに行われているが、ストレスやうつ病などの高次精神機能障害との関連についての報告は未だ少ない。我々のADRG#14をモデルとした研究の結果においては、PC12細胞にタンパク導入試薬を用いて抗ADRG#14抗体を導入し、内在性のADRG#14の機能を抑制したところ、神経突起長及び神経突起数の減少、神経伝達物質の開口放出の抑制が認められた。これらのことより、ADRG#14は神経回路網の編成や神経伝達物質開口放出といった機能を有することが考えられた。今後は、Differential Cloning法により同定した他のADRG遺伝子群について本研究により確立したアッセイ系を用いて、うつ病治療に関わる真のターゲット分子となり得るかを選別していく計画である。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

##### 1. 論文発表

- (1) Nishioka G, Yamada M, Kudo K, Takahashi K, Kiuchi K, Higuchi T, Momose K, Kamijima K and Yamada M, Induction of kf-1 after repeated electroconvulsive treatment and

chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex and hippocampus. *Journal of Neural Transmission*, 2003 (in press)

- (2) 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. *The Pharmacogenomics Journal*, 2, 377-382, 2002
  - (3) Yamada M, Higuchi T, Functional genomics and antidepressant research. *European Journal of Neuropsychopharmacol*, 12, 235-244, 2002
- ##### 2. 学会発表
- (1) Takahashi K, Yamada M, Yamada M, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Expression of ndr2 after antidepressant treatment and ECT in rat brain. *Neuroscience Meeting, Orlando*, 2002
  - (2) Kudo K, Yamada M, Hirano M, Takahashi K, Tsunoda M, Nishioka G, Kamijima K, Momose K, Higuchi T, Yamada M, Induction of cysteine string protein after chronic antidepressant and lithium treatment in rat frontal cortex. *CINP, Montreal*, 2001
  - (3) 山田光彦、山田美佐、高橋弘、角田美果、平野美保、岩渕知子、西岡玄太郎、工藤謙太郎、大幡久之、上島国利、百瀬和享、樋口輝彦、抗うつ薬奏効機転関連分子としてのVAMP2/synapto-brevin-2の同定とSNARE complexについて、*日本神経精神薬理学会、前橋*、2002
  - (4) 山田光彦、山田美佐、高橋弘、西岡玄太郎、工藤謙太郎、櫻井恵里子、上島国利、百瀬和享、樋口輝彦、抗うつ薬長期投与によるcysteine string proteinの発現変化、*日本生物学的精神医学会、東京*、2002
  - (5) 工藤謙太郎、開発めぐみ、高橋弘、西岡玄太郎、平野美保、角田美果、山田美佐、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦、山田光彦、ヒトADRG34遺伝子をモデルとした治療抵抗性うつ病責任遺伝子多型の探索、*日本精神行動遺伝学会、横浜*、2002
  - (6) 山田光彦、開発めぐみ、高橋弘、平野美保、角田美果、西岡玄太郎、工藤謙太郎、山田美佐、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦、ADRG34/kf-1をモデルとしたうつ病治療反応性に関わる遺伝子多型の探索、*日本臨床薬理学会、大阪*、2002
  - (7) 山田光彦、山田美佐、岩渕知子、高橋弘、角田美果、平野美保、西岡玄太郎、工藤謙太郎、大幡久之、百瀬和享、上島国利、樋口輝彦、抗うつ薬奏効機転関連分子としての

frizzled-3 protein の同定と Frz/Wnt シグ  
ナリングの役割について

F. 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

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-

「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：自殺の背景にはうつ病や統合失調症などの存在が高率に認められ、その病態解明は自殺予防に重要である。統合失調症の死後脳研究ではサイトカイン・神経栄養因子やその受容体タンパクの発現異常が報告されており、脳内サイトカインは神経発達に重要な役割を果たすことから、神経発達過程におけるサイトカイン異常は統合失調症の病態に関与している可能性がある。本研究では、成体期あるいは幼若期にインターロイキン (IL)-1 $\alpha$  を投与したラットの行動学的、生化学的な解析を行った。IL-1 $\alpha$  を単回投与した成体ラットでは、prepulse inhibition (PPI) が投与 1 時間後では低下していたが、24 時間後では対照群との間に差はなかった。幼若期に IL-1 $\alpha$  を慢性投与したラットでは、成体期に PPI が低下し、血清コルチコステロン (CORT) も低下していた。前頭前皮質のドパミン (DA) は変化なく、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) は上昇していた。一方、同部位のセロトニン (5-HT) は変化なく、5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) は低下していた。PPI の異常は統合失調症などの精神・神経疾患で認められ、脳内情報処理回路の障害を反映していると考えられている。成体期では IL-1 $\alpha$  投与による PPI 低下は一時的であるのに対し、幼若期投与では成長後に PPI 低下が認められており、このことは幼若期投与により神経発達障害をきたしたことを強く示唆している。幼若期 IL-1 $\alpha$  投与動物における血清 CORT 低下や前頭前皮質 DA 代謝亢進及び 5-HT 代謝低下は神経発達障害の結果と考えられるが、今後更なる検討が必要である。

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る。特にうつ病や統合失調症の頻度が高いとされは、これらの疾患の病態解明は自殺予防に大

きく寄与すると考えられる。うつ病や統合失調症の病態にはサイトカイン・神経栄養因子が関与していることが示唆されている。例えば、これらの患者の末梢血を用いた研究では、血清 IL-6 など炎症性サイトカインの増加が報告されている。一方、インターフェロンに

よるうつ病や IL-2 による妄想など、身体疾患の治療のためサイトカインを投与された患者で種々の精神症状が惹起されることも知られている。我々も統合失調症患者の死後脳を用いた研究により、海馬における脳由来神経栄養因子とその受容体 (Takahashi et al, 2000)、前頭前皮質における上皮成長因子とその受容体 (Futamura et al, 2002)、前頭前皮質における IL-1 受容体アンタゴニスト (Toyooka et al, 投稿中) などのタンパク発現異常を報告してきた。脳内サイトカインは神経発達に重要な役割を果たしていることから、神経発達過程におけるサイトカイン異常が統合失調症の病態に関与している可能性がある。本研究では、統合失調症の病態解明の一助とするため、成体期あるいは幼若期に代表的な炎症性サイトカインである IL-1 $\alpha$  を投与した実験動物の行動学的、生化学的な解析を行った。

## B. 研究方法

### (1) 成体期ラットへの IL-1 $\alpha$ 投与実験

8 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系ラットに IL-1 $\alpha$  (100  $\mu$ g/個体) を腹腔内注射し、1 時間後 (対照群 n = 11、IL-1 $\alpha$  群 n = 11) 及び 24 時間後 (対照群 n = 6、IL-1 $\alpha$  群 n = 7) に音刺激驚愕反応を測定した。音刺激驚愕反応は、120dB のパルス、パルスの 100 ミリ秒前に 3 種類 (75, 80, 85dB) のプレパルスのいずれか、70dB のバックグラウンド・ノイズ、これら 5 種類の試行を 8 回ずつ順不同で施行することにより測定した。パルスでの驚愕反応を A、プレパルス-パルスでの驚愕反応を B、バックグラウンド・ノイズのみでの驚愕反応を C とするとき、PPI は以下の式により算出される。PPI = 100 - (B - C) / (A - C)  $\times$  100。

### (2) 幼若期ラットへの IL-1 $\alpha$ 投与実験

SD 系ラットに IL-1 $\alpha$  (1mg/kg) を生後 2 から 10 日まで連日皮下注射し、8 週齢で音刺激驚愕反応を測定した (対照群 n = 10、IL-1 $\alpha$  群 n = 10)。また、8 週齢で断頭し前頭前皮質を採取するとともに、体幹部からは血液を採取した。血清 CORT はラジオイムノアッセイにより測定した (対照群 n = 15、IL-1 $\alpha$  群 n = 14)。前頭前皮質の DA、DOPAC、5-HT、5-HIAA は高速液体クロマトグラフィーにより測定した (対照群 n = 10、IL-1 $\alpha$  群 n = 10)。内部標準にはイソプロテノールを用い、湿重量により補正を行った。

統計検定には重複測定-分散分析あるいは Student の T 検定を必要に応じて用い、p < 0.05 を有意とみなした。図はすべて平均 + 標準誤差で表示した。

## C. 研究結果

### (1) 成体期ラットへの IL-1 $\alpha$ 投与実験

投与 1 時間後では PPI が IL-1 $\alpha$  投与群で有意に [F(1, 65) = 6.96; p < 0.05] 低下していたが (図 1A)、24 時間後では対照群と IL-1 $\alpha$  投与群の間に有意差を認めなかった (図 1B)。

### (2) 幼若期ラットへの IL-1 $\alpha$ 投与実験

IL-1 $\alpha$  投与群では、PPI が有意に [F(1, 59) = 6.33; p < 0.05] 低下していた (図 2)。血清 CORT 濃度の平均値は対照群の 304ng/ml に対して IL-1 $\alpha$  投与群は 209ng/ml と、IL-1 $\alpha$  投与群で有意に (p < 0.01) 低下していた (図 3)。前頭前皮質 DA 濃度の平均値は対照群が 0.56nmol/g、IL-1 $\alpha$  投与群が 0.52nmol/g と両群の間に有意差を認めなかった (図 4A)。DA 代謝産物である DOPAC 濃度の平均値は対照群の 0.10nmol/g に対して IL-1 $\alpha$  投与群は 0.13nmol/g と、IL-1 $\alpha$  投与群で有意に (p <



0.01) 増加していた (図 4B)。また、DOPAC/DA の平均値も対照群の 0.18 に対して IL-1 $\alpha$  投与群は 0.24 と、IL-1 $\alpha$  投与群で有意に ( $p < 0.01$ ) 増加していた (図 4C)。前頭前皮質 5-HT 濃度の平均値は対照群が 1.01nmol/g、IL-1 $\alpha$  投与群が 0.95nmol/g と両群の間に有意差を認めなかった (図 5A)。一方、5-HT 代謝産物である 5-HIAA 濃度の平均値は対照群の 0.33nmol/g に対して IL-1 $\alpha$  投与群は 0.27nmol/g と、IL-1 $\alpha$  投与群で有意に ( $p < 0.05$ ) 低下していた (図 5B)。5-HIAA/5-HT の平均値も対照群の 0.34 に対して IL-1 $\alpha$  投与群は 0.30 と、IL-1 $\alpha$  投与群で有意に ( $p < 0.05$ ) 低下していた (図 5C)。

#### D. 考察

PPI の異常は統合失調症や外傷後ストレス障害 (PTSD) などの精神疾患やハンチントン舞踏病などの神経疾患で報告されており、脳内情報処理回路の障害を反映していると考えられている。PPI はヒトと動物でほぼ同じ試験デザインが適応できるという利点があり、精神疾患病態モデルの評価法として使用されている。本研究では、IL-1 $\alpha$  を成体期に単回投与したラットでは PPI の低下が一時的であったのに対し、幼若期に慢性投与したラットでは成長後に PPI 低下が認められた。すなわち、幼若期の IL-1 $\alpha$  慢性投与が神経発達に障害を引き起こし、その結果として成長後に脳内情報処理回路の障害が顕在化したものと解釈できる。このことは、統合失調症の発症が青年後期に多いことに合致している。

いくつかの精神疾患において視床下部-下垂体-副腎系における機能異常が指摘されている。例えば、うつ病や統合失調症患者では基礎コルチゾール値が高く、デキサメサゾン非

抑制者の割合が高いとされている。反対に、PTSD 患者では基礎コルチゾール値は低く、デキサメサゾン投与により過剰抑制されるといふ。本研究では、幼若期に IL-1 $\alpha$  を慢性投与したラットの血清 CORT 濃度は低下しており、視床下部-下垂体-副腎系の機能異常が示唆されるものの、ストレス負荷による CORT 反応性の確認などは今後の課題である。

前頭前皮質は統合失調症の認知機能障害といった陰性症状に重要な役割を果たすと考えられている。アンフェタミンなどの DA 刺激薬は PPI の異常を引き起こすことが知られている。これらのことから、幼若期 IL-1 $\alpha$  慢性投与ラットにおける前頭前皮質の DA 代謝亢進及び 5-HT 代謝低下は PPI 異常という認知機能障害と関連していることが推察される。

#### E. 結論

成体期の IL-1 $\alpha$  単回投与は一時的な PPI 低下を惹起した。幼若期の IL-1 $\alpha$  慢性投与は成長後の PPI 低下、血清 CORT 低下、前頭前皮質 DA 代謝亢進及び 5-HT 代謝低下を惹起し、幼若期 IL-1 $\alpha$  慢性投与による神経発達障害の可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

幼若期など実験動物に対するサイトカイン投与は、その後の神経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

- 1) Toyooka, K., Asama, K., Watanabe, Y., Muratake, T., Takahashi, M., Someya, T. and Nawa, H.: Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in

- serum of chronic schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 110(3): 249-257, 2002.
- 2) Futamura, T., Toyooka, K., Iritani, S., Niizato, K., Nakamura, R., Tsuchiya, K., Someya, T., Kakita, A., Takahashi, H. and Nawa, H.: Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 7(7): 673-682, 2002.
- 3) Toyooka, K., Iritani, S., Makifuchi, T., Shirakawa, O., Kitamura, N., Maeda, K., Nakamura, R., Niizato, K., Watanabe, M., Kakita, A., Takahashi, H., Someya, T. and Nawa, H.: Selective reduction of a PDZ protein, SAP-97, in the prefrontal cortex of patients with chronic schizophrenia. *J Neurochem* 83(4): 797-806, 2002.
- 4) 渡部雄一郎, 染矢俊幸: 統合失調症の発達障害仮説. KEY WORD 精神第3版(樋口輝彦, 神庭重信, 染矢俊幸, 宮岡等編). 先端医学社. 東京. (印刷中).
- 5) 豊岡和彦, 染矢俊幸: DNA マイクロアレイ. KEY WORD 精神第3版(樋口輝彦, 神庭重信, 染矢俊幸, 宮岡等編). 先端医学社. 東京. (印刷中).
- 6) 那波宏之, 二村隆史, 高橋誠, 豊岡和彦, 染矢俊幸: 精神分裂病における神経栄養因子の機能異常. 日本臨床 (印刷中).
2. 学会発表
- (8) ○Nawa, H., Iritani, S., Takahashi, H., Shirakawa, O., Someya, T. and Sugai, T.: Prefrontal abnormality of schizophrenia revealed by DNA microarray. <2002 World Congress of Psychiatry 2002. 8. 28. Yokohama>
- (9) ○Toyooka, K., Watanabe, Y., Iritani, S., Nakamura, R., Shimizu, E., Asama, K., Makifuchi, T., Kakita, A., Iyo, M., Takahashi, H., Someya, T. and Nawa, H.: Opposite changes in interleukin-1 receptor antagonist levels in the forebrain and serum of schizophrenic patients. <32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience 2002. 11. 6. Orlando>
- F. 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

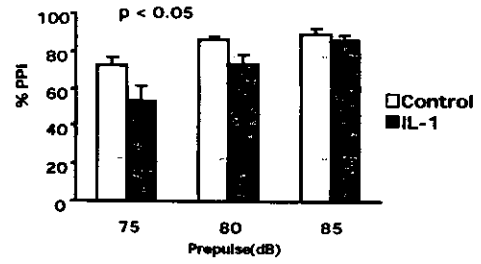
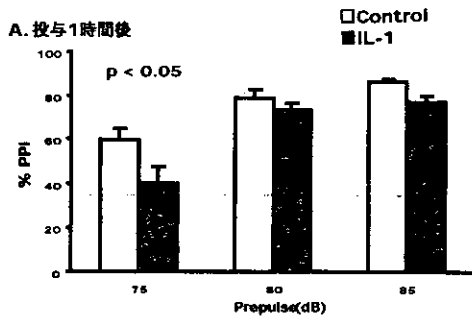


図2 幼若期IL-1慢性投与ラットのprepulseinhibition

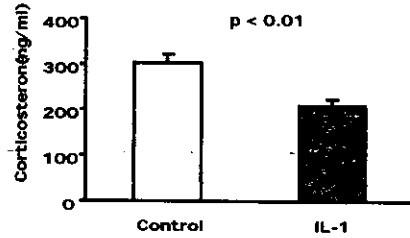
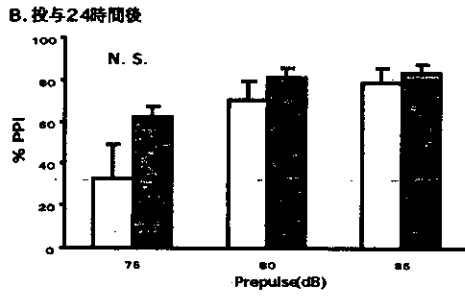


図3 幼若期IL-1投与ラットの血清コルチコステロン濃度

図1 成体期IL-1単回投与後のprepulse inhibition

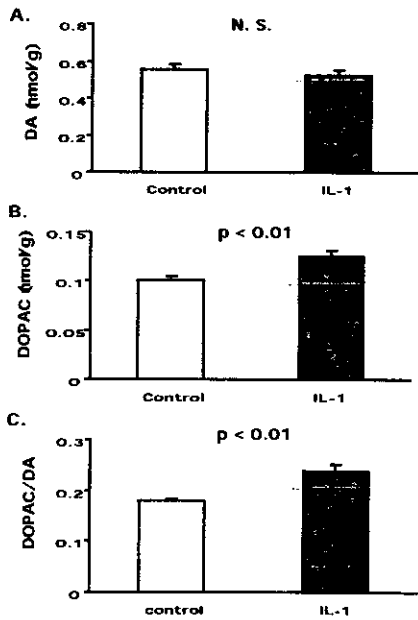


図4 幼若期IL-1投与ラットの前頭前野ドパミン代謝

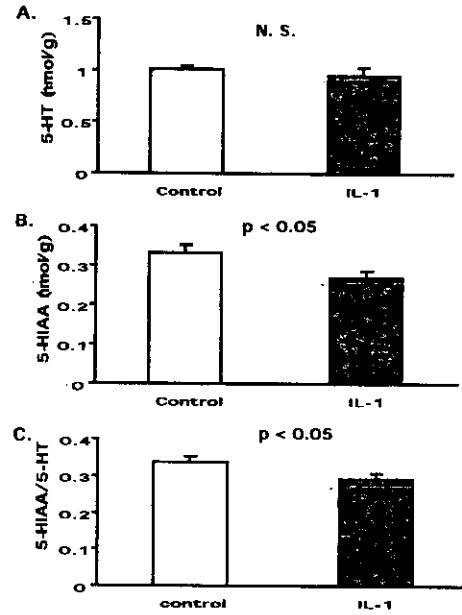


図5 幼若期IL-1投与ラットの前頭前野セロトニン代謝

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

ゲノム情報の利用による自殺防止を目指した抗精神病薬開発に関する研究

### 「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」

分担研究者 吉川 武男 理化学研究所脳科学総合研究センター

研究要旨：昨年度は、マウスでうつ脆弱性に関係すると考えられている強制水泳テスト (FST) における無動時間と尾懸垂テスト (TST) における無動時間を規定している遺伝子座位を決定するために QTL 解析を行い、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 箇所明らかにした。今年度は、各 QTL から責任遺伝子を同定するために以下の 3 つのアプローチをとった。(1) コンソミックマウスの作成開始—QTL が載っているマウス染色体 4 番、6 番、8 番、11 番、14 番、17 番、X 染色体を対象に、C57/BL6, C3H/He 間で「表」と「裏」合計 14 系統の作成に取りかかり、常染色体に関しては N3 世代まで到達した。(2) 各 QTL の候補遺伝子の解析—マウス染色体 17 番 (ヒトで 18p に相当) の QTL 内にある NADH dehydrogenase と Rab-13 のシーケンズ解析を行ったが、C57/BL6, C3H/He 間でエクソン内に配列の違いはなかった。(3) ヒトサンプルを用いた候補遺伝子の解析—マウス染色体 11 番 (ヒトで 5q に相当) の QTL 内にある GABA A receptor 遺伝子の解析を行い、 $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$  subunit 遺伝子が女性での気分障害に関連している知見を得た。

#### A. 研究目的

自殺にいたる原因として、うつ病あるいはうつ状態を背景にもった希死念慮、自殺企図は大きな要因である。うつ病脆弱性、ストレス脆弱性に関係する遺伝子が見い出され、それに対する薬物が開発されれば、自殺を未然に防ぎ社会の損失を大幅に抑制するのに大いに貢献するものと期待される。そこで我々は、うつ病脆弱性、ストレス脆弱性に関係する遺伝子をマウスモデルを援用することによって同定することを目指している。

昨年度は、強制水泳テストと尾懸垂テストにおける「無動時間」を制御している遺伝子群をヒトでのうつ病感受性遺伝子の重

要なヒントと考え、マウスで QTL (quantitative trait loci) 解析を行い、無動時間を支配している遺伝子座を検出した。今年度は、各 QTL 上にある責任遺伝子に到達すべく複数のアプローチを試みた。

#### B. C. 研究方法および研究結果

##### [コンソミックマウスの作成]

コンソミックマウスとは、受容系統のある染色体丸ごと 1 本を供与系統の染色体で置き換えたマウスで、コンソミック系統はこれまで一般的だったコンジェニック系統、リコンビナント・インブリード系統の弱点を克服し利点を合わせ持ったものと言える。コンソミック系統が樹立されると、精神疾患を含めて多因子疾患の原因遺伝子の絞り