

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡崎 祐士

平成15(2003)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- 双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明に関する研究----- 1
岡崎祐士

II. 分担研究報告

1. 精神疾患不一致一卵性双生児におけるDNAマイクロアレイを用いた
原因遺伝子の同定----- 8
加藤忠史
(資料1枚)
2. 一卵性双生児精神疾患不一致例のゲノム差異同定法の開発と応用----- 11
辻田高宏
(資料3枚)
3. MRI脳画像SPM処理による年齢依存性発達・変化部位の同定-----16
齋藤 治
(資料2枚)
4. 光トポグラフィー装置を用いた脳機能発達の測定----- 20
福田正人
(資料1枚)
5. 脳形態・脳機能発達と関連して発達する心理機能の測定と同定 ----- 26
丹野義彦
6. 精神疾患双生児登録の全国的拡大----- 29
岡崎祐士
7. 健常双生児登録の創設 ----- 31
浅香昭雄・佐々木司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----36

主任研究者 岡崎祐士 三重大学医学部教授

研究要旨

精神疾患の成因として寄与が最も大きい遺伝要因と、精神疾患の病態の座としての脳の形態学的・機能的発達過程の詳細及び精神疾患患者におけるその発達の偏奇を双生児法によって明らかにしようとするものである。疾患関連遺伝子研究は通常、連鎖・関連研究によって行われるが、多因子性 common disease としての精神疾患の遺伝子研究は、民族差や家系差、遺伝的異質性の存在が確実に視されるため、個別性に応える研究方法でなければならない。

その要請に応える研究戦略として主任研究者らが工夫した方法は、遺伝的背景が同一の一卵性双生児を対象に、ゲノム・遺伝子解析技術や精密な脳画像解析技術を適用する方法である。具体的には一卵性双生児精神疾患不一致例において遺伝子発現の差異とゲノムの差異を見出して、精神疾患罹患と非罹患に関連する遺伝子発現と遺伝子発現修飾機構の差異を同定する。また、一卵性双生児(2人の双生児間差異は標準分散の範囲と見なせる)と健常者における小児期から成人前期までの脳形態・機能の発達経過を解明し、同時期の精神疾患患者の脳発達に偏奇があるか否かを解明しようとするものである。この過程を通じてまた独自に精神疾患及び健常双生児登録の拡大・創設を目指す。この双生児登録は精神保健、母子保健、人類遺伝学等幅広い研究支援条件となる。対象疾患は統合失調症、双極性障害、自閉症の他、ナルコレプシー、パニック障害、あるいは摂食障害をも対象としている。従って本研究は、主な精神疾患の成因と病態解明による治療法(薬)開発のヒント、疾患への予防的介入の時期(年齢)、子どもから思春期を経て大人に至る脳とこころの発達過程、精神保健諸施策の研究支援条件などの貴重な情報を提供するものである。

平成14年度は、一卵性双生児精神疾患不一致例の遺伝子発現差異とゲノムの差異の検出において、双極性障害と自閉症で具体的な成果を上げ、一卵性双生児と健常者における脳の形態と機能の発達経過解明の準備を完了し非双生児成人を対象とする予備研究、25大学3研究機関からなる「精神疾患双生児全国共同研究」の立ち上げなどの成果をあげた。従って平成15年度にはさらに大きな成果が期待される

分担研究者

加藤忠史 理化学研究所脳科学総合研究センター・チーム

リーダー

辻田高宏 長崎大学大学院医歯薬総合研究科・講師

斎藤 治 国立精神神経センター・武蔵病院・部長

福田正人 群馬大学医学部・助教授

丹野義弘 東京大学大学院総合文化研究科・助教授

浅香昭雄 慶友会城東病院・院長、日本双生児研究

学会会長

佐々木司 東京大学・保健管理センター

A. 研究目的

本研究は、精神疾患研究における主要な2つの課題、つまり、精神疾患感受性遺伝子の同定、及び神経発達障害仮説の実体的過程の解明を、自然が与えた実験条件である双生児を対象に、新しい分子遺伝学的手法や精密で無侵襲脳画像法を適用して行おうとするものである。さらに精神疾患と健常双生児の登録を確立して精神疾患及び保健研究、あるいは人類遺伝学的研

究リソースの確立を期する。

具体的には、以下の3課題、7研究に具体化した。

課題1. 一卵性双生児表現型不一致例のゲノム解析による疾患感受性遺伝子と遺伝子発現修飾機構の同定

- (1) 精神疾患不一致一卵性双生児におけるDNAマイクロアレイを用いた原因遺伝子の同定
- (2) 一卵性双生児精神疾患不一致例のゲノム差異同定法の開発と応用

課題2. 双生児における精神発達に伴い構造的・機能的に変化・発達する脳局所の同定

- (1) MRI脳画像SPM処理による年齢依存性発達・変化部位の同定
- (2) 光トポグラフィー装置を用いた脳機能発達の測定
- (3) 脳形態・脳機能発達と関連して発達する心理機能の測定と同定

課題3. 研究リソースとしての精神疾患双生児及び健常双生児登録の拡充・創設

- (1) 精神疾患双生児登録の全国的拡大
- (2) 健常双生児登録の創設

課題3は独自の研究課題であるが、登録される双生児の発見によって、課題1及び2の対象となるという相互に促進し合う関係にある。

研究は以下のように組織されている。対象疾患は、統合失調症、双極性障害、自閉症の他、ナルコレプシー、パニック障害、あるいは摂食障害である。課題1では、成因の遺伝的側面について、一卵性双生児精神疾患不一致例の罹患双生児と非罹患双生児間の遺伝子発現差異(研究1)から、罹患または非罹患に関連する遺伝子を同定する、またゲノムの差異(研究2)から遺伝子発現差異に影響を与えるゲノム内メカニズム(メチル化など)を探るというアプローチである。この課題によって関連候補遺伝子及び発現修飾機構が解明できれば、分子病態をターゲットにした新たな治療法や治療薬の開発、及び予防的な介入の方法も創出されるかも知れない。統合失調症、双極性障害など伝統的な主要精神疾患は、自殺率も高く人類に与える損失(障害・期間または経済的損失)がいずれも全疾患中10位以内に数えられている。人類に与える損失で同じく10以内にランクされているうつ病も、双極性障害(うつ病相と躁病相を有する)の成因解明によってその解明も進むと考えられる。自閉症、ナルコレプシーは頻度は前者に比較して1オーダー低い、全汎性発達障害と睡眠障害の代表的疾患であり、その遺伝的側面の解明の社会的意義は大きい。パニック障害と摂食障害は、統合失調症、双極性障害の2倍以上の罹病危険率と推定され、思春期から成年期の若年層を中心に急増している疾患であり、その解明の社会的意義は極めて大きい。

課題2は、統合失調症、双極性障害、パニック障害、自閉症などで判明している脳の構造的(研究1)・機能的(研究2)な異常が、個体発生過程のいつ頃明らかになるのかを同定しようとするものである。この2つの研究は、精神疾患の客観的な診断基準(脳画像による)の開発という副産物が期待できる。また逆にそのような脳の変化に伴って心理機能はどのように展開するのか(研究3)を明らかにする。例えば統合失調症では、発症時には既に脳構造の異常が程度の差こそあれ存在し、発症後軽度進行するらしいことが判明している。しかし個体発生にいつ頃に変化が生じるのかは分かって

いない。これが分かれば、社会心理的介入、あるいは将来の薬物等による安全な介入の時期が分かる可能性がある。また脳の形態学的・機能的発達過程の基礎データが作成出来れば、思春期の「切れる」ところと何らかの脳発達の問題が関与しているのかを検討できるようになる。

課題3は、課題1、2の対象リクルートの役割があるが、独自に研究1(精神疾患双生児登録)では、世界最大サンプル数の統合失調症双生児の発見を目指している。そのような大きなサンプルで、今まで検討されてきた診断一致率、出生順位効果、周産期障害の罹患への影響、胎盤(羊膜・絨毛膜)状態の影響などを検討できる。精神疾患のリスクファクターの同定や予防策、周産期保健、多胎児保健施策等に有益な情報を提供する。健常双生児登録の創設(研究2)は、先進国及びアジア主要国としては双生児登録を持たない唯一の国である日本に人類遺伝学上、母子保健施策、一般保健施策上必須の課題である。大きな双生児登録があると、あらゆる疾患の双生児診断一致率を算出でき、その疾患の遺伝因と非遺伝因の関与の相対的大きさが分かる。また健常一卵性双生児間の発達の差異は、ヒトの個体発達における固有分散に近似できるかも知れない。このように課題3は、保健施策や保健行政上の有益な情報を生み出す可能性がある。

B. 研究方法

各課題・各研究は以下のような独自開発及び既存の方法を双生児という人類に与えられた実験的機會に適用して、精神疾患の発症に至る仕組みを解明して、治療と予防法の開発、保健施策情報を得ようとするものである。

課題1

研究1: Affimetrix社製マイクロアレイに株化樹立した末梢血リンパ芽球のtotal mRNAを適用し、対照双生児よりも発現が亢進または低下している遺伝子を同定する。このパラダイムが独自開発である。

研究2: 採用するDifferential display法は、原法のRLGSを改良しスポットに含まれるDNA量を2桁増やしクローニングを容易にしたものである。このFRGP(fluorescence representational genomic profiling)は、主に研究協力者山下によって開発されたものである。

課題2.

研究1: 脳のマクロ形態学的変化を見るために3次元脳構造画像(3D-MRI)を年齢群間でSPM(statistical parametric mapping)処理を行い、変化部位を同定する。加えて拡散テンソルイメージングDTI(Diffusion Tensor Imaging)を行い、神経線維路の発達過程も解析する予定である。DTIには独自に開発された画像化ソフトウェア(増谷佳孝、東大病院放射線科)、及び

研究2: 頭部用の多チャンネル近赤外線スペクトロスコープnear-infrared spectroscopy(NIRS)を用いるが、この技術や装置はもっぱらわが国で開発され、世界をリードしている極めて安全で、時間解像度にすぐれた画像装置である。本研究では、主に前頭葉・側頭葉に焦点を当てその機能発達を測定する。

研究3: 特別の技術は用いないが、個体の発達を脳の形態・機能の発達に関連づけた心理機能発達の変化は意外に解析されていない。

課題3.

研究1: 統合失調症をはじめとする精神疾患双生児登録を、全国共同研究組織によって発見し、予め定めた共同研究テーマのみを全国的合算し、その結果を発表公表する手続きを行う。発見の方法は精神科医療・保健施設ベースである。

研究2: 健常双生児登録の創設は、その意義に関する啓発と理解が必要であるので、双生児をもつ母親や父親の会、及び双生児を教育研究の目的で毎年入学させている東京大学付属中高校卒業生組織等の協力を得ながら進めていく。

(倫理面への配慮)

課題1は通常の診療で行われるのと同程度の量の末梢血採血という資料提供、遺伝子発現やゲノム差異解析から遺伝子多型の特定や相関研究にわたる場合があり、課題2は無侵襲ではあるがMRIとNIRS検査に協力をいただく。課題3も含めて健常者及び精神疾患に罹患している方の個人情報に医学的診断情報あるいは上記検査情報と共に研究者によって把握される。従って、その情報の漏洩による心理的社会的不利益を引き起こす可能性があり、厳重なプライバシーの保護が必要である。本研究は上記のように遺伝子解析研究に及ぶ可能性がある研究であり、全経過を通じて、厚生労働省、文部科学省、経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年3月29日)に従って、各研究者の所属する施設の倫理審査委員会において承認を受けて進める。研究協力者・資料提供者の「参加は自発的なものに限る、協力はいつでもどの段階でも撤回が出来、断っても何ら差別や不利益がない」原則にのっとり、文書による説明と同意により進める。個人情報はと資料及び検査結果は連結可能保存されるが、個人情報管理責任者のもとで厳重に管理される。

C. 研究結果

各課題・研究毎の平成14年度の研究結果は以下の如くである。課題1は具体的な成果を上げ、課題2は技術的準備とパイロット研究を終了し、課題3が研究1が共同研究組織を立ち上げ、研究2は国際的現状を徹底的にレビューした。

課題1. 一卵性双生児表現型不一致例のゲノム解析による疾患感受性遺伝子と遺伝子発現修飾機構の同定

研究1: マイクロアレイによる遺伝子発現差異の解析による感受性遺伝子のクローニング

<研究結果>

双極性障害に関して不一致な一卵性双生児2ペアにおいて、培養リンパ芽球の遺伝子発現解析を行った。不一致例では、健常一卵性双生児に比して、遺伝子発現量の異なる遺伝子が多く見られた。その中から22番染色体に属する神経伝達関連と思われる遺伝子が双極性障害との関連が想定された。現在詳しく解析中であり、次年度には公表できる予定である。

研究2: Differential display法によるゲノム差異の探索、とくに後成的修飾機構の関与の検討

<研究結果>

一卵性双生児自閉症不一致例のゲノム差異を検出する目的で、FRGP法を適用した。双生児

間でシグナル強度の強弱に差異のある4スポットを検出した。変異スポットのうち2スポットについてDNA断片をゲルより回収し塩基配列を決定したところ、それぞれ4番染色体短腕(4p14)と12番染色体長腕(12q24.1)のBACクローンと完全に一致した。変異断片周辺には既知の遺伝子が存在するので、それらの遺伝子発現と遺伝子周辺のメチル化状態について双生児間で差異が認められるか否かを検討が必要である。RLGS法を改良したFRGP法は、一卵性双生児のゲノム差異の解析に非常に有用性が高いことが判明した。

課題2. 双生児における精神発達に伴い構造的・機能的に変化・発達する脳局所の同定

研究1: MRI脳画像SPM処理による年齢依存性発達・変化部位の同定

<研究結果>

今年度は、DTI画像法の本研究における応用可能性を検討した。具体的には、①tractographyによる大脳および小脳の主要な神経連絡路を可視化を通じた形態解剖学的評価、②fractional anisotropy(FA)値に関するSPM処理を用いた定量的画像解析のための正常データベースの構築、の両面から研究を進めた。健常対象者60人の協力を得た。その結果、DTIは、脳の発達変化とその病理を形態学的に検討するうえで有用性の高い最新のMRI脳構造画像法であるという結論を得ると共に、その実用化に向けた基盤整備を完了した。

研究2: 光トポグラフィー装置を用いた脳機能発達の測定

<研究結果>

小児期・思春期の児童・生徒における前頭葉機能データ解析の基礎資料を確立するために、成人を対象に、①近赤外線分光法検査のための課題の決定、②健常者における標準データの整備、③精神疾患患者における所見の解明、④双生児についての検査、を実施した。

その結果、①NIRS装置により前頭葉機能が測定可能である、②そうして測定できる前頭葉機能には年齢・性別による変化が認められる、③うつ病・双極性障害・統合失調症などの精神疾患においては前頭葉機能の障害が認められ、その詳細な特徴をNIRS装置を用いた測定により捉えることができる、④双生児においては、そうした前頭葉機能がかなりの程度一致している、という成果が得られた。

研究3: 脳形態・脳機能発達と関連して発達する心理機能の測定と同定

<研究結果>

本年度は、心理機能の発達測定のための心理テストバッテリーを作成し、データ解析の方法論を確立し標準資料を収集した。双生児を対象に心理学的課題を用いている最新の研究論文を検索し、その結果をもとにして、(1)認知心理学的課題、(2)パーソナリティや社会性をはかる課題、(3)精神病理の症状をはかる課題の3つに分けた。小児期・思春期の児童・生徒における心理機能データ解析の基礎資料を確立するために、これら3つの課題から代表的なものを選んで、健常大学生を対象として実施した。その結果、これらの課題の基本統計量を得ることができ、実施に当たっての実用性を確認することができた。また、今後の研究においては、さらに神経心理学的課題を加えたバッテリーを作るべきであると考えられた。

課題3. 研究リソースとしての精神疾患双生児及び

健常双生児登録の拡充・創設

研究1: 精神疾患双生児登録の全国的拡大 ＜研究結果＞

わが国では統合失調症に関して井上英二が1950年代から60年代にかけて発見した一卵性58組、二卵性20組が最大の精神疾患双生児である。岡崎は1990年代に長崎県(人口157万人)で統合失調症双生児一卵性25組、二卵性14組を発見した。本研究はその成果を全国的に拡大しようとするものである。以下の全国にわたる25大学、3研究組織の参加による「精神疾患双生児全国共同研究」組織を創設し、発見を開始したところである。

北海道大学・講師・久住一郎
札幌医科大学・助手・吉田 拓
弘前医科大学・講師・栗林理人
東北大学大学・教授・曾良一郎
獨協医科大学・教授・秋山一文
群馬大学・助教授・福田正人
自治医科大学・教授・加藤 敏
理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー・加藤忠史
国立精神神経センター武蔵病院・部長・斎藤 治
東京医科歯科大学・助教授・松島英介
東邦大学・助教授・中村道子
慶應義塾大学・助手・水野雅文
帝京大学・教授・南光進一郎
東京大学・助教授・佐々木司
パニック障害研究センター・所長・貝谷久直
山梨医科大学・教授・神庭重信
浜松医科大学・助教授・武井教使
名古屋大学・助教授・福田俊也
三重大学・講師・三好 修
奈良県立医科大学・教授・岸本年史
大阪大学大学・教授・武田雅俊
岡山大学・助教授・氏家 寛
山口大学・教授・渡辺義文
香川医科大学・助手・宮武良輔
島根医科大学・助手・宮岡 剛
大分医科大学・助教授・穂吉條太郎
長崎大学・講師・今村 明
琉球大学・助教授・平松謙一

研究2: 健常双生児登録の創設

＜研究結果＞

文献上確認し得た現在稼働中の双生児登録は諸外国全体で50件以上であった。欧米先進国のみでなくアジア諸国においても国や地方を代表する大規模な双生児登録の存在が確認された。登録の目的は人類遺伝学的研究から母子保健活動を含めて広範な領域であった。わが国は遺伝疫学研究、母子保健分野の重要な研究資源としての双生児登録を持ち合わせていない例外的な国であると言える。こうした立ち遅れは、ポストゲノム時代における遺伝疫学研究の急進展、不妊治療による先進国の世界的な多胎児出産急増を考えた場合に早急な検討課題である。次年度以降にわが国における双生児登録創設の具体的な段取りを始める予定である。

D. 考察

課題1: 一卵性双生児精神疾患不一致例の表現型(罹患と非罹患)の差異に対応する遺伝子発現やゲノム内機構の差異を見出そうとする主任研究者らの新し

いアプローチは、国際的に多くの研究があるわけではないが、我々の発表に刺激された追試研究も出始めており、今回の結果を見ても精神疾患感受性遺伝子検索の新しい方法と見なしうるのではないかと考えられる。遺伝子発現の差異は多くが免疫グロブリン関係であり、EBウイルスにより芽球化された細胞における遺伝子再構成の段階を反映していると考えられるが、それ以外の神経伝達関連遺伝子も少なからず見出されており、今後それらの遺伝子の機能や多型検索、関連研究等によってその機能的意義が判明していくであろう。ゲノムの差異の意義は、メチル化の差異、遺伝子発現への影響の可能性の推論に留まるが、今後成因的意義を検討するためには、今回の研究で候補とされた領域のゲノムメチル化状態が双生児間で異なることを確認する必要がある。しかし、このような差異は微妙な量的差異である可能性が高く、過去の経験からもサザンハイブリダイゼーションによる確認は困難が予想される。そのため、関心領域内に複数のPCRプライマーを設計し、メチル化感受性制限酵素で消化した後にPCRを施行することで差異を検出するという方法を考案している。

課題2: 形態学的脳発達研究については60名の健常者から全脳のfractional anisotropy (FA) 画像に関する正常データベースを作成した。これを用いることで、今後健常双生児のペア内およびペア間比較、ならびに統合失調症をはじめとする精神障害を有する対象例に対する定量的画像解析を実施する基盤が整備された。機能的発達過程の研究においては、脳とこころの発達過程および精神疾患成因を解明していくうえで、光トポグラフィ装置を用いた脳機能発達の測定が可能でしかも有用であること、それらの素因規定性と環境依存性を明らかにするうえで双生児法が重要な情報をもたらすことが明らかにされた。また、研究結果に記載したような課題を用いて、脳の心理機能の発達とMRIや光トポグラフィの結果との相関を解析すれば、脳の発達と関連する心理機能と関連しない心理機能を同定することができると考えられる。一卵性と二卵性の双生児を比較することにより、遺伝規定的な部分と環境依存的部分とを検討することも可能になる。それによって、将来は、精神疾患の予防の精度が上がるのが期待される。

課題3: 精神疾患双生児の全国的な登録を目指す研究はわが国では初めてのものである。短期間に上記のような大きな研究組織が立ち上がったことは、貴重な成果であり、研究期間に国際的にも最も大きな標本を確立できる可能性が強くなった。参加施設の代表者はすでに少数例ながら精神疾患双生児を見出している者が少なからずおり、次年度には長崎の標本と併せて統合失調症については、井上の標本に比肩しうる規模の標本が確立できる可能性がある。健常双生児登録の創出は困難も幾つかあるが、既存組織の理解を多面的に促進し、登録確立の意義を浸透させたいと考えている。

E. 結論

以上のように、研究計画に沿って順調に研究は進捗しており、初年度においてすでに課題1では大きな成果が得られた(投稿中)。課題2は技術的準備が完了し、成人対象の予備的結果が得られた(投稿中)。課題3も共同研究組織の立ち上げや技術的準備が整い既に対象発見を開始している。このように、精神疾患の成立に向かう遺伝的要因・脳発達過程について斬新な方法により明らかにできる準備が整った。次年度は、具体的な成果がさらに増加するはずである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

初年度のため研究成果については投稿中の論文が多い。

1. 論文発表(下線は主任・分担研究者及び研究協力者)

加藤忠史、岡崎祐士(2002) 統合失調症(精神分裂病)へのポストゲノム的アプローチ. 実験医学 21: 42-46

加藤忠史(2002)DNAマイクロアレイの精神疾患の臨床検査法への応用可能性 1:5:424-426

辻田高宏:統合失調症のエピジェネティクス、キーワード精神第3版、先端医学社、pp202-203、2003

Matsumoto S., Sasaki T., Imamura A., Matsuo K., Kayashima T., Hashida A., Ono S., Tsujita T., Matsumoto S., Nakane Y., Tokunaga K., Okazaki Y.: HLA class I distribution in Japanese patients with schizophrenia. Am J Med Genet. 114: 42-45, 2002

Fujimaru K., Imamura A., Tsujita T., Uruguchi M., Hashida A., Mori T., Matsumoto S., Matsumoto S., Okazaki Y., Nakane Y.: Minor Physical Anomalies in Japanese Patients with Schizophrenia. Acta Med. Nagasaki 47: 133-137, 2002

藤丸浩輔、辻田高宏:一卵性双生児のゲノムの不一致について、分子精神医学、2、260-261、2002

臺 弘、斎藤 治:統合失調症患者診療の目標—自由と病気と生活。新世紀の精神科治療 第1巻 統合失調症の診療学。岡崎祐士編、中山書店、東京、2002; pp 3-14

・Saitoh O., Yumoto M, Anami K, Ikeda A, Utena H: Momentary color vision test of schizophrenic patients. presented at the 12th World Congress of Psychiatry-Yokohama. 2002

増谷佳孝, 阿部修, 青木茂樹, 森壘, 増本智彦, 吉川健啓, 大友邦, 林直人, 花沢宏之.

MR 拡散テンソル画像の解析による脳白質神経線維追跡: 追跡の信頼性を考慮した選択的 Tractography 日本医用画像工学会誌, 20:5, 584-592, 2002

Masutani Y, Aoki S., Abe O, Hayashi N, and Otomo K MR Diffusion Tensor Imaging: Recent Advance and New Techniques for Diffusion Tensor Visualization European J. of Radiology, 46(1):53-66, April, 2003

Yoshikawa T, Abe O, Tsuchiya K, Okubo T, Tobe K, Masumoto T, Hayashi N, Mori H, Yamada H, Aoki S., Ohtomo K. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of dural sinus thrombosis. Neuroradiology. 2002 44: 481-488

Abe O, Aoki S., Hayashi N, Yamada H, Kunimatsu A, Mori H, Yoshikawa T, Okubo T, Ohtomo K. Normal aging in the central nervous system: quantitative MR diffusion-tensor analysis. Neurobiology of aging. 2002 23: 433-441

森壘, 柳下章, 青木茂樹, 大友邦 低髄圧症候群の脊髄画像—特に、T2 強調像での高信号領域の病態生理の考察。画像診断 2002 22: 414-419

青木茂樹, 阿部修 これわかる拡散 MRI(単行本, 秀潤社)2002. 9:1-359

青木茂樹, 増谷佳孝, 阿部修, 吉川健啓, 森壘, 増本智彦, 林直人, 石亀慶一. MRI最新技術展望: 中枢神経

系の MRI (DTI tractography color 掲載)新医療 2002 29: 72-75

福田正人, 上原徹, 井田逸朗, 三國雅彦(2003)うつ病の新しい診断法の開発—NIRS と PET を中心として。日本臨牀, 印刷中.

福田正人, 三國雅彦(2003)光で見る心. 心と社会, 印刷中.

福田正人, 伊藤誠, 須藤友博, 亀山正樹, 山岸裕, 上原徹, 三國雅彦(2003)精神医学領域における近赤外線スペクトロスコピー-NIRS の意義—何が測定できるのか? 脳と精神の医学, 印刷中

佐々木淳・星野崇宏・丹野義彦: 精神病理の症状と性格5因子モデルとの関係. 教育心理学研究, 50, 65-72. 2002.

森脇愛子・坂本真士・丹野義彦: 大学生における自己開示方法および被開示者の反応の尺度作成の試み. 性格心理学研究, 11, 12-23. 2002.

丹野義彦ほか: 双生児の心理的機能の発達に関する最近の研究: 文献検索. Cognitive and Behavioral Science Research Report, #02-J01. 2003.

Mohri, I. & Tanno, Y. Subtype Classification of Social Anxiety in Japanese Undergraduates. In H. Yanai, A. Okada, K. Shigemasu, Y. Kano, & J.J.Meulman(Eds.), New Developments in Psychometrics. Springer-Verlag. Pp. 609- 616. 2002.

Moriwaki, A., Sakamoto, S., & Tanno, Y. Effects of self-disclosure and self-preoccupation on depression. In H. Yanai, A. Okada, K. Shigemasu, Y. Kano, & J.J.Meulman (Eds.), New Developments in Psychometrics. Tokyo: Springer-Verlag. Pp.173-180. 2002.

河村直樹、加藤千枝子、佐々木司: ヒトゲノム研究からみた遺伝環境相関・臨床精神医学 31: 544-548, 2002

Petronis A, Pependikyte V Kan P, Sasaki T.: Major psychosis and chr22: Genetics meets epigenetics. CNS Spectrum 7:1-4, 2002

大木秀一: 学童期における身体発育縦断データの統計遺伝学的解析・人類学雑誌 109(2):119-132・2002

大木秀一: 小児期 BMI の遺伝規定性に関する研究 — 遺伝/環境モデルによる BMI 縦断データの検討・肥満研究 8(1):61-68・2002

大木秀一: 日本人成人の BMI にかかわる諸要因の統計的検討 — 双生児家系研究法による遺伝要因、家族歴、健康習慣の寄与の推定・肥満研究 8(1):69-74・2002

大木秀一: 中学・高校時代の運動習慣が成人後の運動習慣に及ぼす遺伝的影響 — 行動遺伝学モデルによる2変数遺伝/環境要因の解析 — 行動医学研究 8(1):23-30・2002

大木秀一: 健康習慣に対する遺伝要因・環境要因の影響 — 行動遺伝学モデルによる1変数遺伝解析 — 行動医学研究 8(1):31-37・2002

大木秀一: 多重リスクファクター症候群に関与する遺伝要因・環境要因の統計遺伝学的解析・民族衛生 68(4):123-132・2002

Umekage T, Tochigi M, Marui T, Kato C, Hibino H, Otani T, Kohda K, Kato N, Sasaki T. Serotonin transporter-linked promoter region polymorphism and personality traits in a Japanese population. Neurosci Lett (in press).

佐々木司、岡崎祐士. 分裂病成因の多様性と疾患過程のダイナミズム. 新世紀の精神科治療第一巻.

Pp17-29. 中山書店、東京.

Kusumi I, Suzuki K, Sasaki Y, Kameda K, Sasaki T, Koyama T (2002) Serotonin 5-HT_{2A} receptor gene polymorphism, 5-HT_{2A} receptor function and personality traits in healthy subjects: A negative study. *J Affect Disord* 68:235-41.

Tochigi M, Ohashi J, Umekage T, Kohda K, Hibino H, Otowa T, Marui T, Masui K, Sugahara Y, Kanamori R, Juji T, Kato N, Tokunaga K, Sasaki T (2002). HLA-A specificities and its relation with season of birth in Japanese patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* 329:201.

Kato C, Petronis A, Okazaki Y, Tochigi M, Umekage T, Sasaki T (2002) Molecular genetic studies of schizophrenia: challenges and insights. *Neurosci Res* 43:295-304.

西山潤、神尾聡、渡辺慶一郎、河村直樹、綱島浩一、佐々木司、加藤進昌 (2002) 22q11.2 欠失症候群 (CATCH22)に精神障害を合併した 1 症例. *精神科* 1: 79-83.

Tatsumi M, Sasaki T, Iwanami A, Kosuga A, Tanabe Y, Kamijima K (2002). Season of birth in Japanese patients with schizophrenia. *Schizophrenia Res* 54:213-218.

Matsumoto S, Sasaki T, Imamura A, Matsuo K, Kayashima T, Hashida A, Ono S, Tsujita T, Matsumoto S, Nakane Y, Tokunaga K, Okazaki Y (2002). HLA-class I distribution in Japanese patients with schizophrenia. *Am J Med Genet* 114: 42-45.

2. 学会発表 (下線は主任・分担研究者及び研究協力者)
垣内千尋、岩本和也、石渡みずほ、久住一郎、辻田高宏、岡崎祐土、加藤忠史 (2002) GeneChip を用いた一卵性双生児双極性障害不一致例における遺伝子発現の差異の検討 第 24 回日本生物学的精神医学会 埼玉 2002 年 4 月

垣内千尋、岩本和也、石渡みずほ、久住一郎、辻田高宏、岡崎祐土、加藤忠史: Gene Chip を用いた一卵性双生児双極性障害不一致例における遺伝子発現の差異の検討、第 24 回日本生物学的精神医学会、2002.4.10-4.12、さいたま

Takahiro Tsujita: Genomic Methylation Discordance between Monozygotic Twins Discordant for Psychosis., XII World Congress of Psychiatry, 2002.8.24.-8.29., Yokohama

辻田高宏、山下秀次、今村 明、小田利香、茅島智彦、藤丸浩輔、橋田あおい、松尾勝久、与那城竹亮、菊池妙子、小野慎治、森 貴俊、林田雅希、三好 修、加藤忠史、陣野吉広、中根允文、新川詔夫、大石道夫、岡崎祐土: 精神疾患の発症に関する epigenetics の解明～一卵性双生児精神疾患不一致例を対象として～、平成 14 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費精神疾患関連研究班研究報告会、2002.12.16-12.18、東京
松田博史、大西隆、今林悦子、金高秀和、田中富美子、穴見公隆、斎藤治、瀧澤修: Fractional anisotropy の画像統計解析の予備的検討 2003. 3.11.

青木茂樹、増谷佳孝、阿部修、吉川健啓、森壘、増本智彦、林直人、大友邦. 拡散テンソル画像の臨床応用. 神経放射線学会 秋田 2002.2 大会長賞受賞

青木茂樹、増谷佳孝、阿部修、吉川健啓、森壘、増本智彦、林直人、大友邦、森田明夫、桐野高明・ MR 拡散テンソルによる 3D tractography の外科手術への応用の可能性. 脳外科手術と機器学会、甲府、2002.4.13

青木茂樹、石亀慶一、阿部修、吉川健啓、増谷佳孝、林直人、大友邦、堀正明、大久保敏之、荒木力: 脳梗塞の Diffusion Tensor Imaging: FA, eigenvalues による分析. 日本脳卒中学会、仙台、2002.4.25

Aoki S, Masutani Y, Abe O, Yoshikawa T, Masumoto T, Kunimatsu A, Yamada H, Mori H, Ohtomo K, et al. Diffusion tensor imaging: normal anatomy and pitfall. ASNR 展示 Vancouver 2002.5.11

Aoki S, Masutani Y, Abe O, Yoshikawa T, Masumoto T, Kunimatsu A, Yamada H, Mori H, Ohtomo K, et al. Diffusion Tensor Imaging: from Scalar (FA) to 3D(Tractography) Certificate of Merit 賞受賞

RSNA 展示発表 2002.12.1

青木茂樹 拡散テンソル tractography: 基礎と臨床応用 CI 学会、名古屋 シンポジウム、2003.2.7

青木茂樹、山田晴耕、増谷佳孝、阿部修、増本智彦、森壘、國松 聡、吉川健啓、林 直人、大友邦 錐体路近傍腫瘍の拡散テンソル tractography. 脳神経 CI 学会名古屋 一般発表 講演、2003.2.7

青木茂樹、國松 聡、増谷佳孝、阿部修、山田晴耕、増本智彦、森壘、國松 聡、吉川健啓、林 直人、大友邦錐体路近傍梗塞の拡散テンソル tractography. 日本脳卒中学会、東京、2003/3/13

伊藤誠、須藤友博、亀山正樹、上原徹、井田逸朗、福田正人、三國雅彦: 精神分裂病患者における課題遂行中の局所脳血液量変化の時間的・空間的特徴—多チャンネル近赤外線スペクトロスコーピー装置を用いた検討. 第 24 回日本生物学的精神医学会、さいたま、2002.4.10-12.

亀山正樹、伊藤誠、須藤友博、上原徹、井田逸朗、福田正人、三國雅彦: 精神疾患患者における認知・運動課題遂行時の局所脳血液量変化と診断—多チャンネル近赤外線スペクトロスコーピー装置を用いた検討. 第 24 回日本生物学的精神医学会、さいたま、2002.4.10-12.

須藤友博、伊藤誠、亀山正樹、上原徹、井田逸朗、福田正人、三國雅彦: うつ病患者と健常者における課題遂行時の脳血液量変化の比較—多チャンネル近赤外線スペクトロスコーピー装置を用いた検討. 第 24 回日本生物学的精神医学会、さいたま、2002.4.10-12.

Kameyama M, Suto T, Ito M, Uehara T, Ida I, Fukuda M, Mikuni M : Noninvasive Measurement of Cerebral Blood Volume Changes in Depression and Schizophrenia: A Multi-channel Near-Infrared Spectroscopy Study. The 8th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain, Sendai, 2002.6.2-6

Suto T, Ito M, Kameyama M, Uehara T, Ida I, Fukuda M, Mikuni M : The temporal and topographical characteristics of cerebral blood volume change during a motor task: a 24-channel near-infrared spectroscopy study. The 8th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain, Sendai, 2002.6.2-6

Ito M, Suto T, Kameyama M, Uehara T, Ida I, Fukuda M, Mikuni M : Cerebral Blood Volume Activation Pattern as Biological Substrate of Personality: A Multi-Channel Near-Infrared Spectroscopy Study in Healthy Subjects. The 8th International Conference on Functional Mapping of the Human Brain, Sendai, 2002. 6.2-6.

Morimoto, S., Yamasaki, S., Tanno, Y. & Ishigaki, T. Measurement of Delusional Thoughts in College Students. Abstract of World congress of psychiatry, 155. 2002.

Morimoto, S. & Tanno, Y. Paranoid Ideation in College Students -The Prediction of Development-. ,World Federation for Mental Health Biennial Congress, 82. 2003.

Yamasaki, S., Tanaka, S., Morimoto, S., Iwanami, A., Tsujii, K. and Tanno, Y. Development of the Japanese version of PDI (Peters et al. Delusions Inventory) Multidimensionality of delusional ideation in the normal population and in schizophrenic patients. XII World Congress of Psychiatry, 2002.

Yamasaki, S., Morimoto, S., Tanno, Y., Tsujii, K. and Iwanami, A. Clinical validity of the Japanese version of PDI (Peters et al. Delusions Inventory). XXV International Congress of Applied Psychology, 2002.

大木秀一・佐々木司・浅香昭雄: 多胎児登録制度の国際比較. 第 17 回日本双生児研究学会 (2003.1.25 大阪)

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. 3.その他 なし

厚生労働科学研究費補助金
「こころの健康科学」研究事業
「双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明(H14-こころ-011)」班
分担研究報告書

精神疾患不一致一卵性双生児における DNA マイクロアレイを用いた原因遺伝子の同定

分担研究者 加藤忠史 理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム

研究要旨 本研究の目的は、双極性障害関連遺伝子を同定するため、一卵性双生児双極性障害不一致例より培養リンパ芽球株を樹立し、これら間で遺伝子発現解析を行い、発現量に差のある遺伝子を同定することにより、双極性障害関連遺伝子を同定することである。双極性障害不一致例 2 組および健常双生児 1 組より採血を行い、末梢血より培養リンパ芽球を株化し、遺伝子発現解析を行った。不一致例では、健常双生児よりも、遺伝子発現の差異が大きかった。

A 研究目的

双極性障害では、一卵性双生児における一致率が 60~80%と高いことから、遺伝要因の強い関与が考えられるが、連鎖解析や病態に関連する遺伝子の検索にもかかわらず、決定的な病因遺伝子は見出されていない。一方、一卵性双生児における一致率は高率であるが、100%ではなく、その理由としてこれまで環境要因の関与が想定されてきたが、近年エピジェネティクス研究の進展に伴い、一卵性双生児においても、DNA メチル化の違い、レトロウイルスによるゲノム構造の変化、胎生早期の新規遺伝子変異など、親から伝えられる DNA 塩基配列以外の遺伝情報により、疾患の罹患状態が不一致となる場合があることがわかってきた。

本研究では、GeneChip 法を用いた一卵性双生児双極性障害不一致例における遺伝子発現の差異から、候補遺伝子を同定するため、検討を行った。

B.研究方法

対象は、研究内容につき書面にて説明の上同意が得られた一卵性双生児双極性障害不一致例 2 組(49 歳男性 I 型、40 歳代 男性 II 型)、及び健常双生児 1 組である。不一致例 2 組は協力施設において DSM-IV により診断され、健常双生児については M.I.N.I.(精神疾患簡易構造化面接法)及び病歴聴取により精神医学的診断を行った。

被験者の末梢血よりリンパ球を分取し、B95-8 細胞株由来 EB ウイルスろ液を加え、20%ウシ胎児血清(FBS)含有 RPMI 1640 培地にて、ペニシリン、ストレプトマイシン、シクロスポリンを加えて培養開始した。株化確認後、シクロスポリン非含有培地に変更、10%FBS 培地に変え継代し、採血後 8 週間の時点で細胞より total RNA を Trizol(Gibco BRL)を用いて抽出した。なお細胞回収前には細胞周期をランダムにするため、3日

間連続で培地交換を行った。

抽出した total RNA から、Superscript Choice system(Gibco BRL)にて cDNA を作製し、ビオチン化 cRNA を合成し DNA マイクロアレイ実験に供した。DNA マイクロアレイは、Affymetrix 社の GeneChip protocol に従って行った。Test2chip にて RNA の品質を検定後、Hu95A チップを用いハイブリダイゼーションを行った。得られたデータは、Genespring ソフトウェア(Silicon Genetics 社)により解析した。Raw データをチップごとに補正し、それぞれの双生児について二実験間比較を行った。

双生児では、リンパ球より DNA を抽出し、卵性診断キット(Applied Biosystems)を用いて卵性診断を行った。(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては、理化学研究所脳科学総合研究センターの倫理委員会の承認を得た。

C.研究結果

約 12000 個の遺伝子について各双生児間の遺伝子発現を比較したところ、双生児間で 2 倍以上の差異がみられた遺伝子は、不一致例では 57 個、163 個と、健常例(31 個)に比して多い傾向がみられた。その中では免疫グロブリン関係が多くを占めたが、不一致例で発現に差異の見られた遺伝子には、ミトコンドリア関連遺伝子、神経発達関連遺伝子なども含まれていた。

卵性診断では全遺伝子マーカーが一致しており一卵性の可能性が高いと判断された。

D.考察

本研究の結果、発現量に変化の見られた遺伝子としては、免疫グロブリン関係が多くを占めたが、これらは EB ウイルスにより芽球化された細胞における、遺伝子再構成の段階を反映していると考えられる。その他の

興味深い遺伝子については、今後それぞれについて関連研究を含め検討を行っていく予定である。

E. 結論

双極性障害に関して不一致な一卵性双生児 2 ペアにおいて、培養リンパ芽球の遺伝子発現解析を行った。不一致例では、健常一卵性双生児に比して、遺伝子発現量の異なる遺伝子が多く見られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

加藤忠史、岡崎祐士(2002) 統合失調症(精神分裂病)へのポストゲノム的アプローチ. 実験医学 21: 42-46

加藤忠史(2002) DNA マイクロアレイの精神疾患の臨床検査法への応用可能性 1:5:424-426

2. 学会発表

垣内千尋、岩本和也、石渡みずほ、久住一郎、辻田高宏、岡崎祐士、加藤忠史(2002) GeneChip を用いた一卵性双生児双極性障害不一致例における遺伝子発現の差異の検討 2002.4.10.-4.12、さいたま

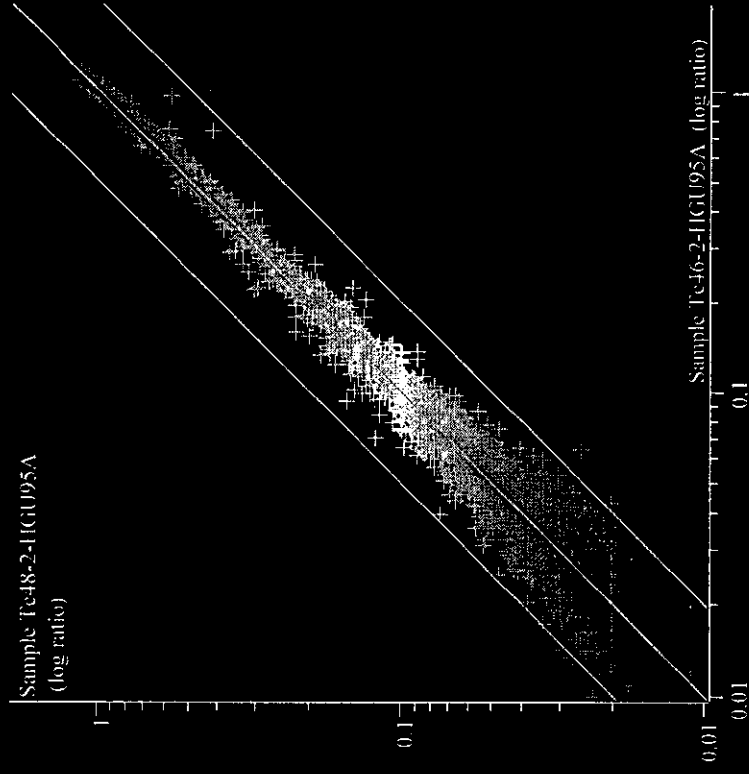
垣内千尋、岩本和也、石渡みずほ、久住一郎、辻田高宏、岡崎祐士、加藤忠史: Gene Chip を用いた一卵性双生児双極性障害不一致例における遺伝発現の差異の検討、第 24 回日本生物学的精神医学会、2002.4.10.-4.12、さいたま

H 知的財産権の出願・登録状況

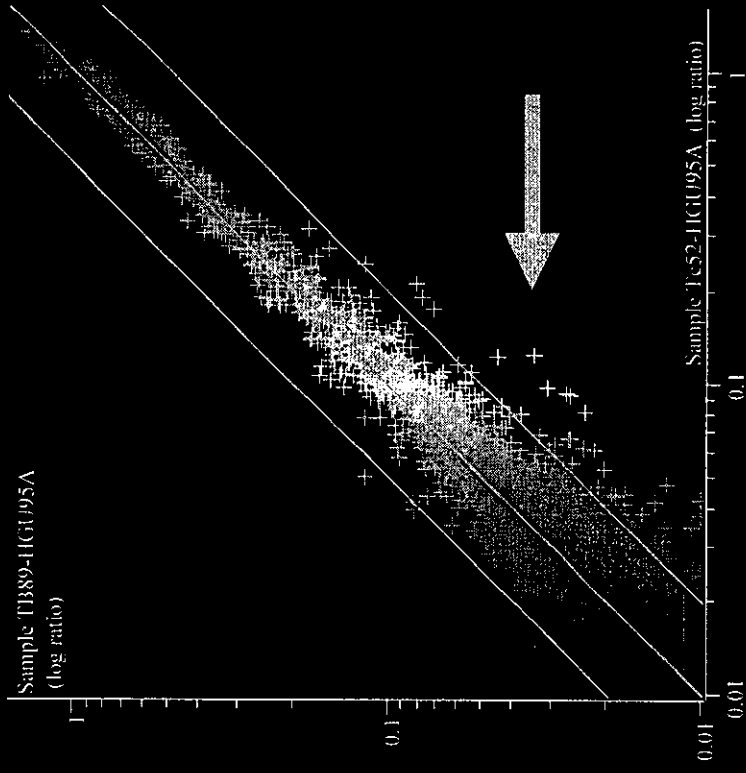
なし

GeneChip (Affymetrix:12651遺伝子の発現量同時測定)

(Kato et al, 2002)



健全双生児



双極性障害不一致双生児

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)
「双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明」(H14-こころ-011)
分担 研究報告書

一卵性双生児精神疾患不一致例のゲノム差異同定法の開発と応用

分担研究者 辻田高宏
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析制御学講座講師

研究要旨

一卵性双生児自閉症不一致例のゲノム差異を検出する目的で、FRGP 法を適用した。ランドマーク制限酵素に *EagI*、二次元展開制限酵素に *MbdI* を用いて解析を行ったところ、双生児間でシグナル強度の強弱に差異のある4スポットを検出した。変異スポットのうち2スポットについて DNA 断片をゲルより回収し塩基配列を決定したところ、それぞれ4番染色体短腕(4p14)と 12 番染色体長腕(12q24.1)の BAC クローンと完全に一致した。変異断片周辺には既知の遺伝子が存在するので、今後はそれらの遺伝子発現と遺伝子周辺のメチル化状態について双生児間で差異が認められるか否かを検討が必要である。RLGS 法を改良した FRGP 法は、一卵性双生児のゲノム差異の解析に非常に有用性が高いと考えられる。

A. 研究目的

われわれは、一卵性双生児精神疾患不一致例のゲノム差異を検出することで、疾患の発症メカニズム、特に epigenetics の関与の解明が可能ではないかと考えている。今回、共同研究者の山下が開発した FRGP (Fluorescent Representational Genomic Profiling) 法を適用して、一卵性双生児自閉症不一致例のゲノム DNA 解析し、比較検討した。

B. 研究方法

対象は、女性の一卵性双生児自閉症不一致例である。一方(twinA)は DSM-IV299.00 自閉性障害の診断基準を満たすが、もう一方(twinB)は心身共に健康である。

双生児の末梢血リンパ球からフェノール法で高分子ゲノム DNA を抽出し、FRGP 法を施行した。FRGP 法は大まかに、①ランドマーク制限酵素(制限酵素1)消化、②制限酵素2による再断片化、③制限酵素切断部位への特異的アダプターの連結、④FITC 標識プライマーによる PCR、⑤一次元アガロースディスクゲル電気泳動、⑥制限酵素3によるゲル中消化、⑦二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動、⑧蛍光イメージアナライザーによるスポット検出、の8ステップからなる。今回は、ランドマーク制限酵素に *EagI*、二次元展開制限酵素に *MbdI* を用いた。なお、この研究は、長崎大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

上記条件の FRGP 展開で、約 600 のスポットが検出された。双生児間でゲノムプロファイルを詳細に比較検討したところ、ほとんど全ての検出スポットは座標位置およびシグナル強度が同一で

あるものと考えられたが、4 スポットにおいてシグナル強度の強弱に差異(いずれも twinA > twinB)が認められた。この4スポットのうち2スポット(Y16とY17)について DNA 断片をゲルより回収し、ファジミドベクターにクローニング後、塩基配列を決定した。

1)Y16 について

Y16 を形成するスポットは全長 559 塩基で、既知の BAC クローン RP11-539G18 の一部であることがわかった。さらにこのクローンは 4p14 に位置し、HIP2 (Huntingtin interacting protein 2) 遺伝子の一部と、推定上の遺伝子 Hypothetical protein MGC12679 gene (LOC201895) の一部を含んでいることがわかった。

2)Y17 について

Y17 を形成するスポットは全長 531 塩基で、既知の BAC クローン RP11-7G5 の一部であることがわかった。さらにこのクローンは 12q24.11 に位置し、TRPV4 (Transient receptor potential cation channel, subfamily 4) 遺伝子と、GLTP (Glycolipid transfer protein) 遺伝子、および推定上の遺伝子 Hypothetical protein XP_101201 gene (LOC160754) の一部を含んでいることがわかった。

D. 考察

今回われわれは、Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法にかわり、共同研究者の山下らが開発した Fluorescence Representational Genomic Profiling (FRGP) 法を用いた。この方法は、DNA 断片をラジオアイソトープのかわりに蛍光で標識するようにしたものであるが、1回のゲノムプロファイリングに必要な DNA 量やスポットを形成する DNA をクローニン

グするときに必要な DNA 量を格段に少なくすることが可能となり、プロファイリングにかかる時間も格段に短くなった。われわれは、予備実験でウズラの肺で特異的に発現し CpG 配列のメチル化によって転写調節がなされるヒトの転写因子フォークヘッドファミリーのひとつである *FOXF1* 遺伝子のウズラオースログの一部を検出することに成功し、FRGP の有用性を確認している(投稿中)。

今後の課題は、今回の研究で候補とされた領域のゲノムメチル化状態が双生児間で異なることを確認することである。しかし、このような差異は微妙な量的差異である可能性が高く、過去の経験からもサザンハイブリダイゼーションによる確認は困難が予想される。そのため、われわれは、関心領域内に複数の PCR プライマーを設計し、メチル化感受性制限酵素で消化した後に PCR を施行することで差異を検出したいと考えている。

E. 結論

一卵性双生児自閉症不一致例を FRGP 法を用いて解析することで、ゲノムメチル化状態が 4p14 と 12q24.1 の領域で異なっている可能性が示唆された。今後、より詳細な解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

辻田高宏: 統合失調症のエピジェネティクス、キーワード精神第3版、先端医学社、pp202-203、2003

Matsumoto S., Sasaki T., Imamura A., Matsuo K., Kayashima T., Hashida A., Ono S., Tsujita T., Matsumoto S., Nakane Y., Tokunaga K., Okazaki Y.: HLA class I distribution in Japanese patients with schizophrenia. *Am J Med Genet.* 114: 42-45, 2002

Fujimaru K., Imamura A., Tsujita T., Uruguchi M., Hashida A., Mori T., Matsumoto S., Matsumoto S., Okazaki Y., Nakane Y.: Minor Physical Anomalies in Japanese Patients with Schizophrenia. *Acta Med. Nagasaki* 47: 133-137, 2002

藤丸浩輔、辻田高宏: 一卵性双生児のゲノムの不一致について、分子精神医学、2、260-261、2002

2. 学会発表

Takahiro Tsujita: Genomic Methylation Discordance between Monozygotic Twins Discordant for Psychosis., XII World Congress of Psychiatry, 2002.8.24.-8.29., Yokohama

加藤忠史、石渡みずほ、垣内千尋、田島 治、秋山 剛、辻田高宏、岡崎祐士、久住一郎: 双極性障害患者の培養リンパ芽球細胞内 Ca²⁺反応 ~一卵性双生児不一致例における検討~、第 24 回日本生物学的精神医学会、2002.4.10.-4.12、さいたま

垣内千尋、岩本和也、石渡みずほ、久住一郎、辻田高宏、岡崎祐士、加藤忠史: Gene Chip を用いた一卵性双生児双極性障害不一致例における遺伝発現の差異の検討、第 24 回日本生物学的精神医学会、2002.4.10.-4.12、さいたま

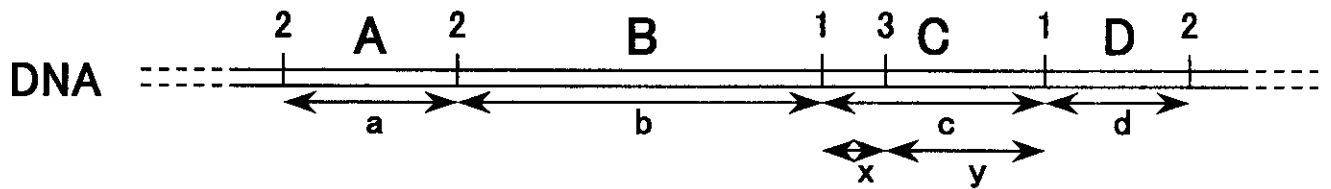
辻田高宏、山下秀次、今村 明、小田利香、茅島智彦、藤丸浩輔、橋田あおい、松尾勝久、与那城竹亮、菊池妙子、小野慎治、森 貴俊、林田雅希、三好 修、加藤忠史、陣野吉広、中根允文、新川詔夫、大石道夫、岡崎祐士: 精神疾患の発症に関する epigenetics の解明 ~一卵性双生児精神疾患不一致例を対象として~、平成 14 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費精神疾患関連研究班研究報告会、2002.12.16-12.18、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

	RLGS	FRGP
ゲノムDNAの必要量	1 μ g (5×10^{-19} mole)	0.1 μ g (5×10^{-20} mole)
PAGのゲルサイズ	約 50 \times 40 cm	約 20 \times 30 cm
DNA断片の種類	制限酵素切断片	PCR産物
DNA断片の標識物質	RI (P^{32})	蛍光物質 (FITC)
1Dの分画サイズ	0.5 ~ 23 kb	0.5 ~ 1.5 kb
2Dの分画サイズ	50bp ~ 2 kb	0.1 ~ 1.5 kb
シグナル検出の所要時間	~2週間	約15分間
検出スポット数	2000 ~ 3000 (<i>Not I</i> site)	500 ~ 600 (<i>Eag I</i> site)
検出スポットのDNA量	5×10^{-19} mole	5×10^{-15} mole
クローニング時のDNA量	4×10^{-16} mole (0.8mgDNA, trapper)	5×10^{-15} mole

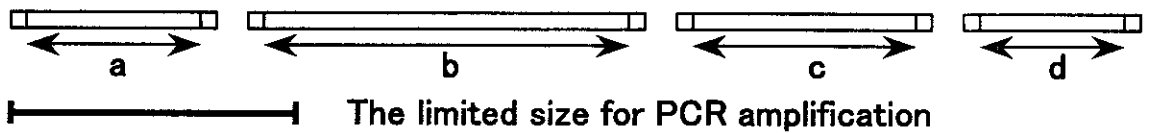
↓ Extraction of genomic DNA



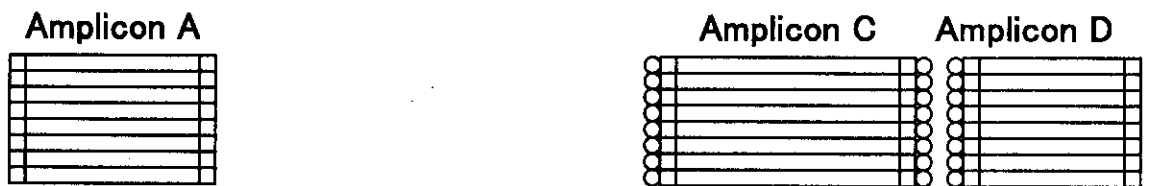
↓ Landmark cleavage with restriction enzyme 1

↓ Fragmentation with restriction enzyme 2

↓ Ligation with restriction site specific adaptors



↓ PCR-amplification with FITC-labeled primers

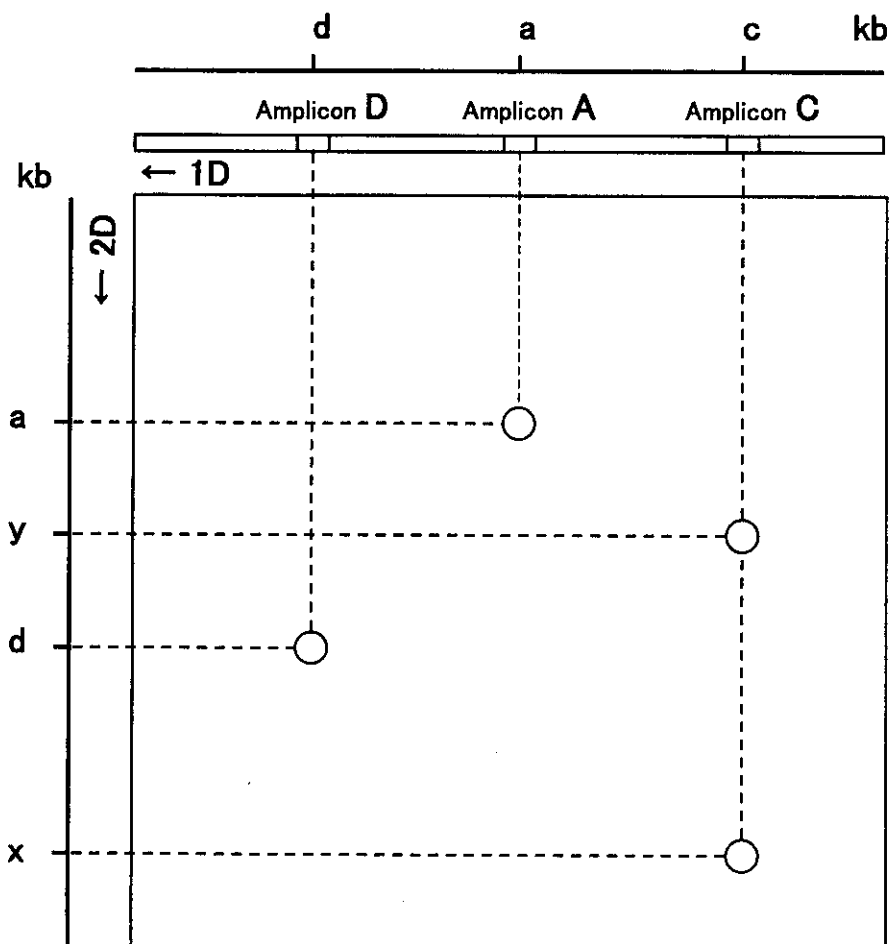


↓ 1st fractionation by agarose disk gel electrophoresis (1D)

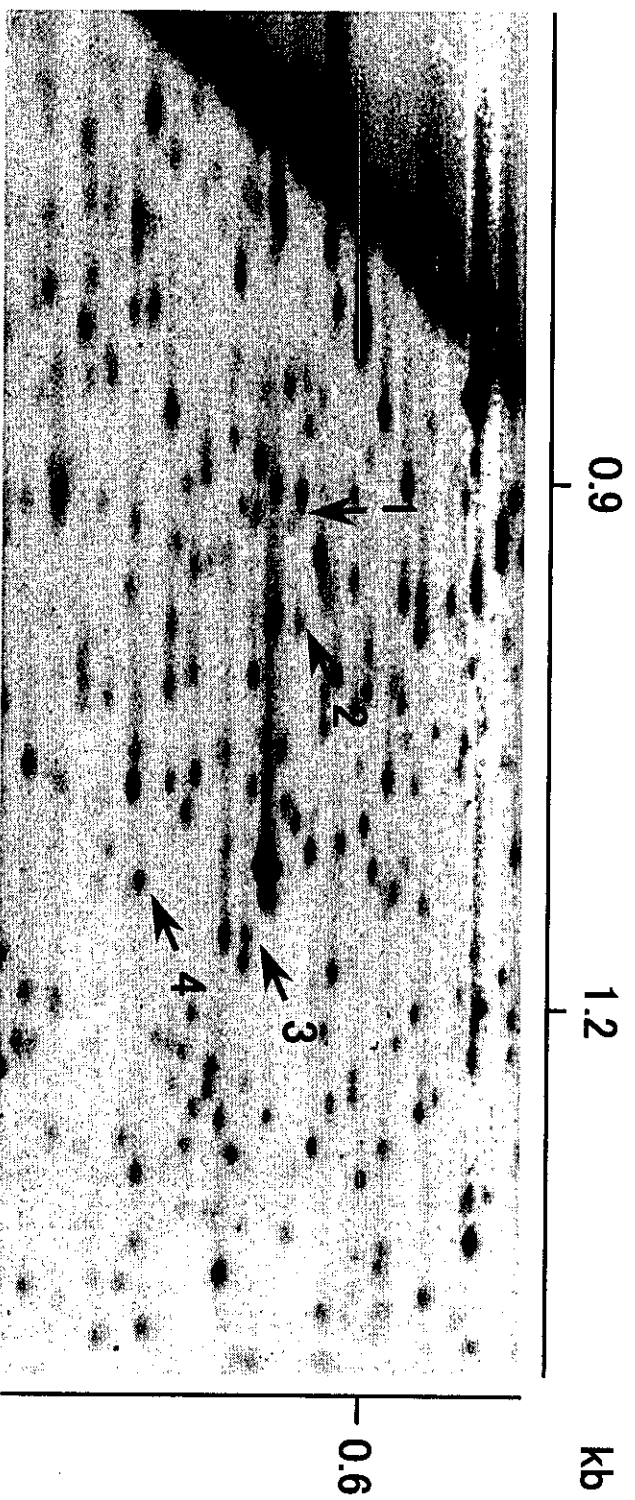
↓ Fragmentation of 'amplicons' with restriction enzyme 3

↓ 2nd fractionation by PAGE (2D)

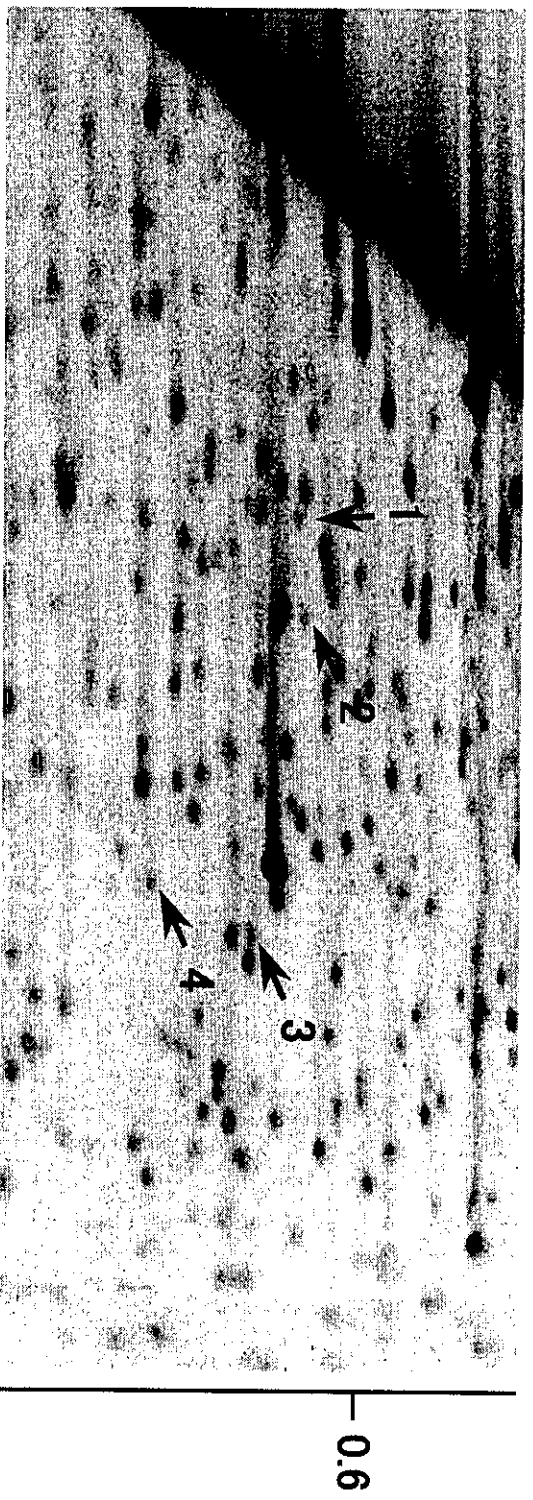
↓ Detection of FITC-labeled DNA fragments



双生児A



双生児B



自閉症不一致例におけるゲノム差異 (ランブナーク: *Eag*I, 二次元展開: *Mbo*I)

双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明

[分担研究課題]MRI 脳画像 SPM 処理による発達脳部位の同定

分担研究者 斎藤 治 国立精神・神経センター武蔵病院・部長

研究要旨

本研究の目的は、双生児法と MRI 脳画像法を組み合わせ、ヒト脳のマクロ構造の発達の变化に及ぼす遺伝的要因と非遺伝的要因の効果を評価することである。脳の構造(形態)は、検査状況に依存しない安定した表現型であり、MRI 検査の非侵襲性は、小児期をはじめ発達期にある個人の協力を得やすく、長期にわたる同一個人の反復検査が実現するならば、その縦断的発達の变化も安定して評価できる有利な指標である。

本研究では MRI 脳構造画像法として、3次元脳構造画像(3D-MRI)に加えて拡散テンソル画像(diffusion tensor imaging, DTI)を採用する。DTI は、脳の形態学的発達指標である神経線維の髄鞘化(myelination)に対する高感度な脳画像法として近年発展しつつある最新の画像法である。今年度は、DTI 画像法の本研究における応用可能性を検討した。具体的には、①tractography による大脳および小脳の主要な神経連絡路を可視化を通じた形態解剖学的評価、②fractional anisotropy (FA) 値に関する SPM 処理を用いた定量的画像解析のための正常データベースの構築、の両面から研究を進めた結果、DTI は、脳の発達変化とその病理を形態学的に検討するうえで有用性の高い最新の MRI 脳構造画像法であるという結論を得ると共に、その実用化に向けた基盤整備を完了した。

○研究全体の目的

本研究の目的は、双生児法と MRI 脳画像法を組み合わせ、ヒト脳のマクロ構造の発達の变化に及ぼす遺伝的要因と非遺伝的要因の効果を評価することである。脳の構造(形態)は、検査状況に依存しない安定した表現型であり、MRI 検査の非侵襲性は、小児期をはじめ発達期にある個人の協力を得やすく、加えて長期にわたる同一個人の反復検査が実現するならば、その縦断的発達の变化も安定して評価できる有利な指標である。

本研究では MRI 脳構造画像法として、3次元脳構造画像(3D-MRI)に加えて拡散テンソル画像(diffusion tensor imaging, DTI)を採用する。DTI は、脳の形態学的発達指標である神経線維の髄鞘化(myelination)に対する高感度な脳画像法として近年発展しつつある最新の画像法である。

今年度は、最新の DTI 画像法の本研究における応用可能性を検討した。具体的には① Tractography による解剖学的解像度の検討(研究1)、②Fractional anisotropy (FA)マップによる

定量的解析の検討(研究2)、を行った。

【研究1】Tractography による解剖学的解像度の検討

研究協力者:青木茂樹(東大病院放射線科)、穴見公隆(国立精神・神経センター武蔵病院精神科)

目的

DTI の有用性を解剖学的解像度の側面から評価する目的で、DTI 画像データに基づき大脳および小脳の主要な神経連絡路を可視化する tractography を作成し、その解剖学的妥当性を評価した。

方法

20歳女性の健常一卵性ペアを対象に、GE社製 1.5T Signa 並びに Siemens 社製 1.5T Magnetom Vision を用いて2通りの DTI 撮像を行った。DTI 撮像の所要時間は5分間以内であった。得られた DTI データから、独自に開発された画像化ソフトウェア(増谷佳孝、東大病院放射線

科)により PC 上で主要な神経線維連絡路 (tract)を描出した(tractography)。神経線維連絡路の選択・描画は、seed 法による半自動的方法を以て実行された。

結果

健常一卵性ペアの DTI のうち、ここでは GE 社製 1.5T Signa を用いて撮像した DTI データによる解析結果を示す。主要な神経線維連絡路のうち、①脳梁、②内包後脚を通る錐体路系、③視床大脳皮質神経線維束、④中小脳脚について tractography の描出結果を図に示した。図では双生児ペア (A.O.と N.O.)を左右に配置し、各々について右側方、前方からの透視画を例示した。

考察

tractography の結果は従来の神経解剖学的に明らかにされてきた神経線維走行を再現するものであった。これらの結果は、ヒト生体脳に関する形態学的三次元情報が数分間の撮像で非侵襲的に得られることを示しており、DTIとこれに続く tractography による処理の優れた有用性を端的に示すものである。今後は、従来の神経解剖学的知見との照合により、解剖学的精度に関する信頼性と妥当性についての評価を進めることが課題となる。

他方、これらの形態学的情報に関する脳発達とその病理に関する個体差を評価するには定量的画像解析が必要である。次に、DTI の画像統計解析について、以下の研究 2 で報告する。

【研究2】Fractional anisotropy (FA)の定量的画像解析の検討

研究協力者: 松田博史(国立精神・神経センター 武蔵病院放射線診療部)

目的

拡散テンソル画像 (diffusion tensor imaging, DTI) データから得られる拡散の異方性 (anisotropy)の指標である FA は、神経線維軸索における髄鞘化を定量的に反映する指標である。

本研究では DTI データから全脳の FA を算出し、このパラメトリック像を標準脳に形態変換することにより正常 FA データベースを作成することを目的とする。得られるデータベースは関心対象の FA データに対する統計学的解析を可能とする。

方法

健常ボランティア 60 名 (男性 27 名、23-70 歳、平均 45 歳; 女性 33 名、21-86 歳、平均 44 歳)を対象とした。

Siemens 社製 Magnetom Vision を用いて、全脳 20 スライスからなる DTI 撮像を行った。撮像時間は 1 分 44 秒であった。

得られたデータから Matlab を用いて FA 画像を作成した。さらにこの画像を Analyze フォーマット

に変換した後、SPM99 を用いて標準脳に変換し、正常データベースを作成した。

結果

正常例の平均 FA 値は、大脳皮質 0.2、視床 0.3、被殻 0.3、脳梁 0.8 で、従来の方向と一致した。図には、①60 例の FA の平均画像、②性別比較、③年齢との相関の結果を示した。

その結果、性別および年齢による有意な差異を認めた (有意水準 $p=0.001$)。

考察

60 名の健常者から全脳の FA 画像に関する正常データベースを作成した。これを用いることで、今後健常双生児のペア内およびペア間比較、ならびに統合失調症をはじめとする精神障害を有する対象例に対する定量的画像解析を実施する基盤が整備された。

○研究全体の結論

脳の形態学的発達指標である神経線維の髄鞘化 (myelination) に対する高感度な脳画像法として近年発展しつつある拡散テンソル画像 (diffusion tensor imaging, DTI) について、DTI 画像法の本研究における応用可能性を検討した。具体的には、①tractography による大脳および小脳の主要な神経連絡路を可視化を通じた形態解剖学的評価、②fractional anisotropy (FA) 値に関する SPM 処理を用いた定量的画像解析のための正常データベースの構築、の両面から研究を進めた結果、DTI は、脳の発達変化とその病理を形態学的に検討するうえで有用性の高い最新の MRI 脳構造画像法であるという結論を得ると共に、その実用化に向けた基盤整備を完了した。

今年度の研究成果から、次年度以降、3 次元脳構造画像 (3D-MRI) の voxel-based な定量的比較ならびに拡散テンソル画像 (DTI) による FA 値の定量的比較を採用した、双生児法による MRI 脳構造画像研究を本格的に進めることが可能となった。

なお、本研究は、国立精神・神経センター倫理委員会武蔵地区部会での承認申請中であり、本年度中に承認が得られる予定である。

○健康危険情報 なし

○研究発表

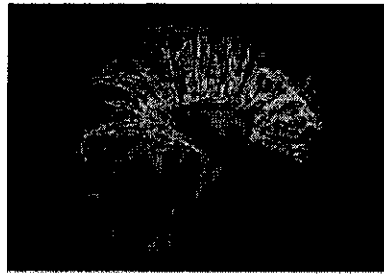
松田博史, 大西隆, 今林悦子, 金高秀和, 田中富美子, 穴見公隆, 斎藤治, 瀧澤修: Fractional anisotropy の画像統計解析の予備的検討 2003. 3.11.

A.O.

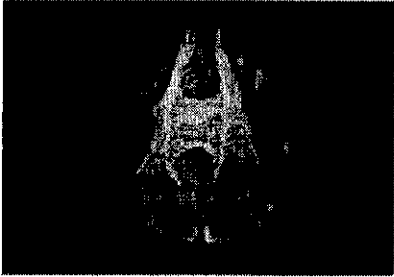
N.O.



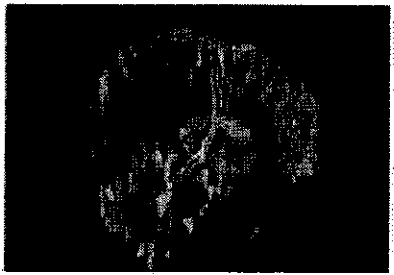
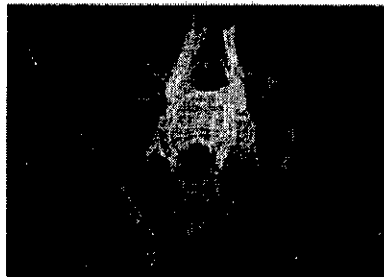
right



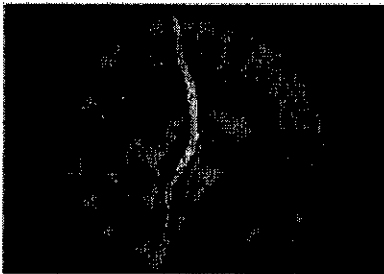
脳梁を通過する線維



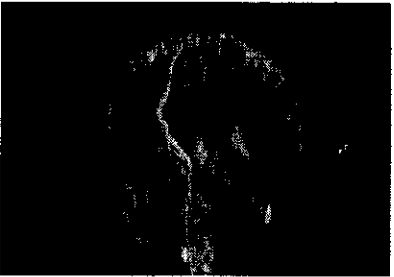
front



right



内包後脚を通過する線維



front

