

7. Suzuki E, Kitao Y, Ono Y, Iijima Y, Inada T: Cytochrome P450 2D6 Polymorphism and Character Traits. *Psychiatr Genet*, in press.
8. Inada T, Senoo H, Iijima Y, Yamauchi T, Yagi G: Cytochrome P450IID6 gene polymorphism and the neuroleptic-induced extrapyramidal symptoms in schizophrenic patients. *Psychiatr Genet*, in press.
9. 堀宏治, 千貫 悟, 稲田俊也, 竹下裕行, 平井慎二, 池田正行, 山崎 慶, 富永 格, 織田辰郎, 女屋光基, 堀 一郎, 浅岡俊泰, 金 廣一, 寺元弘, 鹿島晴雄: 塩酸ドネペジルの日常臨床における課題. 周辺症状の観点から. *老年精神医学雑誌* 13(増刊号): 44-48, 2002.
10. Inada T, Nakamura A, Iijima Y: Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Polymorphism and Schizophrenia: Possible relation with the treatment-resistant subgroup. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*, in press.
11. The Japanese Schizophrenia Sib-pair Linkage Group (JSSLG)(Arimami T, Ishiguro H, Minowa Y, Ohtsuki T, Tsujita T, Imamura A, Yoshikawa T, Toyota T, Yamada K, Shimizu H, Yoshitsugu K, Shibata H, Fujii Y, Fukumaki Y, Tashiro N, Inada T, et al.): Initial genome-wide scan for linkage with schizophrenia in the Japanese Schizophrenia Sib-pair Linkage Group (JSSLG) families. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*, in press.
12. Hori K, Inada T, Sengan S, Ikeda M: Is Charles Bonnet syndrome an early manifestation of dementia? *Acta Neuropsychiatr*, in press.
13. Hori K, Oda T, Tominaga I, Inada T: "Awakenings" in demented patients. *Psychiatr Clin Neurosci*, in press.

表 1. 双極性気分障害とクロモグラニンB遺伝子多型との関連

1058G/C		GG	GC	CC	n	Gratio	Cratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control		54	89	49	192	51.3%	48.7%	(vs Cont)		0.801	(vs Cont)	
Schizophrenia		87	82	21	190	67.4%	32.6%	0.381 - 0.684	0.510	0.973	0.000	0.000
Bipolar (I+II)		51	84	43	178	52.2%	47.8%	0.721 - 1.285	0.963	0.892	0.797	0.955
Bipolar I		37	55	31	123	52.4%	47.6%	0.694 - 1.316	0.955	0.745	0.781	0.929
Bipolar II		14	29	12	55	51.8%	48.2%	0.641 - 1.497	0.980	0.930	0.924	0.701
1104G/A		GG	GA	AA	n	Gratio	Aratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control		54	89	49	192	51.3%	48.7%	(vs Cont)		0.801	(vs Cont)	
Schizophrenia		91	76	20	187	69.0%	31.0%	0.352 - 0.637	0.474	0.891	0.000	0.000
Bipolar (I+II)		51	84	43	178	52.2%	47.8%	0.721 - 1.285	0.963	0.892	0.797	0.955
Bipolar I		37	55	31	123	52.4%	47.6%	0.694 - 1.316	0.955	0.745	0.781	0.929
Bipolar II		14	29	12	55	51.8%	48.2%	0.641 - 1.497	0.980	0.930	0.924	0.701
1238C/T		CC	CT	TT	n	Cratio	Tratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control		155	36	1	192	90.1%	9.9%	(vs Cont)		0.821	(vs Cont)	
Schizophrenia		147	38	2	187	88.8%	11.2%	0.724 - 1.832	1.152	0.995	0.550	0.766
Bipolar (I+II)		142	35	1	178	89.6%	10.4%	0.655 - 1.703	1.056	0.821	0.823	0.974
Bipolar I		93	29	1	123	87.4%	12.6%	0.793 - 2.173	1.313	0.815	0.289	0.550
Bipolar II		49	6	0	55	94.5%	5.5%	0.216 - 1.277	0.525	1.000	0.149	0.334
1250G/A		GG	GA	AA	n	Gratio	Aratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control		71	84	37	192	58.9%	41.1%	(vs Cont)		0.670	(vs Cont)	
Schizophrenia		42	98	47	187	48.7%	51.3%	1.132 - 2.011	1.509	0.897	0.005	0.008
Bipolar (I+II)		60	88	29	177	58.8%	41.2%	0.749 - 1.346	1.004	0.976	0.979	0.502
Bipolar I		43	64	16	123	61.0%	39.0%	0.660 - 1.270	0.915	0.757	0.596	0.231
Bipolar II		17	24	13	54	53.7%	46.3%	0.803 - 1.894	1.233	0.888	0.338	0.657
1499G/A		GG	GA	AA	n	Gratio	Aratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control		160	29	2	191	91.4%	8.6%	(vs Cont)		0.839	(vs Cont)	
Schizophrenia		166	18	2	186	94.1%	5.9%	0.380 - 1.163	0.665	0.754	0.150	0.270
Bipolar (I+II)		141	25	1	167	91.9%	8.1%	0.547 - 1.582	0.930	1.000	0.789	0.895
Bipolar I		96	20	1	117	90.6%	9.4%	0.623 - 1.933	1.097	1.000	0.747	0.896
Bipolar II		45	5	0	50	95.0%	5.0%	0.212 - 1.465	0.557	1.000	0.229	0.482

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

機能性精神疾患の系統的遺伝子解析に関する研究：
双極性障害の連鎖領域 21q22.3 における候補遺伝子研究

分担研究者 神庭 重信 山梨大学医学部精神神経医学・臨床倫理学講座教授

研究要旨

現在までの連鎖研究により双極性障害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 21 番の長腕 22.3 にあるマーカー-PFKL から D21S171 である。我々はこの PFKL 近傍にあるカルシウムチャネルタンパク遺伝子 TRPC7 (LTRPC2, TRPM2) について、双極性障害患者 40 名において SSCP 法による変異スクリーニングを行なった。その結果、複数の 1 塩基多型を同定した。1 つは翻訳領域の多型 (Exon 11) はアスパラギン酸からグルタミン酸にアミノ酸の変化を伴うミスセンス変異であった。発見した多型について双極性患者群)92 名と年齢と性を一致させた対照群 92 名での頻度を比較したが、双極性障害との関連は認められなかった。

A. 研究目的

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家族内集積傾向、双生児研究、養子研究から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、双極性障害の連鎖研究が試みられているが、躁うつ病が単遺伝子疾患ではなく遺伝と環境が複雑に関与する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が可能な範囲まで染色体領域を絞り込むのが困難であった。

現在までの連鎖研究により、双極性障害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²⁾と 21 番の長腕 22.3 にあるマーカー-PFKL から D21S171 1,3,4,8,12,13) である (Table1)。そこで我々はこの染色体 21 番の PFKL 近傍にある D21S400 と D21S171 の間に新たにクローニングされたカルシウムチャネルタンパク遺伝子 TRPC7 (Transient Receptor Potential related Channels) に注目した。

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 (Fig. 1)。相同性検索からは線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の transient receptor potential タンパク (trp) に近似しており、ショウジョウバエ (*Drosophila*) trp タンパクや trp-like タンパクならびにヒト trp タンパクとは弱い相同性しか認められない。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⁺チャネルを形成しており、trp 遺伝子のスーパーファミリーに属すると考えられる¹⁰⁾。

ノーザンブロット法にて TRPC7 遺伝子の mRNA は 6.5kb のバンドとして成人や胎生期の脳に発現することがわかった。脳の部位では cerebral cortex, occipital lobe, frontal lobe, amygdala, caudate nucleus, hippocampus に mRNA が強く認められ、弱いながら

胎盤にも検出される以外には脳にほぼ局在して発現していた。

このように 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、気分障害患者での比較的良好一致した所見である細胞内カルシウム動員の異常と関連するカルシウムチャネルとしても機能していると思われることから双極性障害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、双極性障害との関連を検討したので報告する。

B. 研究方法

双極性患者 40 名と精神疾患のない健康対照者 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 法により増幅を行った。プライマーは SSCP (single strand conformation polymorphism analysis) での感度が高くなるように、増幅塩基配列が原則として 400 塩基対以

下に設定した。得られた PCR 産物を SSCP 法によって変異スクリーニングを行い、direct PCR sequencing により多型を同定した。確認された多型については、双極性患者群 (DSM-IV 診断による) 92 名 (男性 43 名、女性 49 名、平均年齢: 45.8±12.4) と年齢と性を一致させた対照群 92 名 (平均年齢: 47.3±14.1) での頻度を比較した。

PCR amplification of genomic DNA

被験者の抹消血より QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、それを鋳型として標準的な PCR 法 (1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μM of each primer and 0.5 IU Taq DNA polymerase) にて標的とする遺伝子領域の増幅を行なった。PCR 産物の電気泳動は、アガロースあるいはポリアクリルアミドゲル上で行い、エチジウムブロマイドまたは銀染色法にてバンドを可視化することで遺伝子型および対立遺伝子の同定を行った。

Single-strand conformation analysis

SSCP のために、1 μl の PCR 産物を 4 μl の denaturing solution (the total volume of 25 ml containing 23.75 ml of 99% formamide, 1.25 ml of 1% xylene cyanol solution and 10 mg of bromophenol blue) に加え 95°C 5 分間で変成させる。reannealing を防ぐため氷上で急冷する。ポリアクリルアミドゲル (GeneGel Excel 12.5/24 Kit: Pharmacia Biotech) にて 5°C, 10°C, 15°C, 20°C の各温度で泳動する (GenePhor: Pharmacia Biotech)。バンドは銀染色 (Automated Gel Stainer: Pharmacia Biotech) にて同定した (Fig 2 A; left)。

Direct sequence of PCR products

SSCP にてスクリーニングされた一塩基置換多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) は direct PCR sequence によって確認する。サンプルは Microcon (Amicon) 処理後 Dye Terminator method using Autosequencer (ABI 377S) を使用して解析した (Fig 2 B)。

Restriction enzyme analysis

得られた多型について、遺伝子型の同定と allele 頻度を定めるためには PCR-based 制限酵素断片長多型解析 (restriction fragment length polymorphism analysis; RFLP) を施行する。PCR 産物 1 μl に制限

酵素 2U (DAIICHI PURE CHEMICALS) を 37°C で 1 晩反応させる。得られた多型に使用した制限酵素はそれぞれ、Exon 11; BamHI, Int 12; Nci I, Int 14; Aci I, Int 16; Fau I, Int 20; SfaNI である (Fig 2 A; right)。

PCR には 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)、シーグエンスには ABI 377S (ABI) を使用した。統計学的解析には、カイニ乗法を用いた。

(倫理面への配慮)

なお、本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守することとし、研究参加者には文書にて説明し、署名による同意を得た。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. 研究結果

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の 1 カ所および介在領域に 4 カ所のあわせて 5 部位において 1 塩基置換を確認した。そのうちエキソン 11 にある多型 (Exon 11) はアスパラギン酸からグルタミン酸にアミノ酸の変化を伴うミスセンス変異であった (Table 2)。他の Int 12, Int 14, Int 16, Int 20 はいずれも介在領域に存在した (Table 3)。

双極性障害患者 92 名と、それぞれの多型の関連をみたが、有意差は認めなかった。

D. 考察

気分障害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。例えば、以下のようなことが報告されている。

- ① うつ病および双極性障害患者の血小板のセロトニン 2A 受容体刺激細胞内 Ca²⁺ 動員は亢進している。
- ② 双極性障害患者の血小板においてはトロンビン刺激性の細胞内 Ca²⁺ 動員が亢進している。刺激のない静止時でも細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇がみられる。
- ③ 抗うつ薬はラット前大脳皮質初代培養細胞における細胞内 Ca²⁺ 濃度の変動を抑制する。
- ④ 三環系抗うつ薬は脱分極性の細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇、受容体刺激性の細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を抑制する。逆に高濃度では濃度を上昇させる。
- ⑤ リチウムがラット海馬スライス標品におけるノルアドレナリン刺激性細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇に続く後期相を抑制する。

⑥ カルバマゼピンやバルプロ酸もC6培養細胞において同じく後期相を抑制する。

⑦ 電位依存性Ca²⁺チャンネル・ブロッカーのverapamilには抗躁効果が期待される。

このように、気分障害、なかでも遺伝的要素の関与が大きい双極性障害においては細胞内Ca²⁺動員の異常があり、その治療薬が細胞内Ca²⁺濃度に影響を与えていることについては、比較的一致した研究成果が集積されている。

従来はその機能がよくわかっていなかったTRPC(TRP)タンパクであるが、最近になってようやく命名法も統一されつつあり6)、trpファミリーの多彩な作用についての研究報告も相次いでいる (Table4)。最もよく解明されているのはS(short)TRPC群であり、これは受容体活性化チャンネル (receptor activated Ca²⁺ Channel; RACC)のうちの小胞体のCa²⁺ストアの枯渇にともなって形質膜から入ってくる容量性Ca²⁺流入 (capacitative Ca²⁺ entry)の分子の実体であると論じられている9)。この群のアナログであるTRPC3とTRPC6にはDAG(diacylglycerol)から直接的にカルシウム動員系に作用することが報告された7)。O(osm)TRPCはカプサイシンの受容体として注目されているvanilloid receptor type 1(VR1)の群で、痛みの伝達や浸透圧の調整を担当している。そして、最後までその機能がわからなかったのが、L(long)TRPC群である。TRPC7は、このLTRPCに分類され、LTRPC2と呼称された。そして、最新のHGNC (HUGO gene nomenclature committee)による命名法によりTRPM2(transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2)と呼ばれるようになった。LTRPCではmelastatinが知られていた程度であったが、ごく最近になってTRPC7 (LTRPC2, TRPM2)がADP-ribose 11)やH₂O₂などの酸化ストレス5)で開く全く新しいカチオンチャンネルであることが解明された。このことは虚血などでの神経細胞死をもたらす、神経系の可塑性にも関与していると考えられ、きわめて本質的な機能を有する新たなカルシウムチャンネルと思われる。今後もこのLTRPCや他のTRPCファミリーについての機能解析は詳しく研究されていくことと思うが、気分障害との関連でもB lymphoblastの細胞系に導入した双極I型障害の患者の細胞において、Ca²⁺濃度が高い群はTRPC7のmRNAの発現レベルが優位に低下していたという報告がなされた14)。

E. 結論

我々が今回見いだした多型については双極性障害との関連は認められなかった。しかし、TRPC7は特異的な

ルシウムチャンネルという注目に値する機能を持つことがわかってきたことから、候補遺伝子としての可能性は未だに有望である。可能ならば連鎖研究の結果が得られた家系のサンプルを直接検索し、新たな多型・変異の発見をすすめていきたい。同定したこれらの多型と気分障害の発症との関連を実証していきたい。

Table 1 Reported susceptibility region on chromosome 21 for bipolar disorder by linkage analysis

research	pedigree	marker	lod
Statham ¹⁵	10220-48	PFKL	lod -14
Ara ¹⁶	4040-01	PFSL/D21S171	p=10 ⁻⁴ p=0.4
	3040-05	D21S136	lod -15
	10220-01	10p11.23	
	10220-02	D21S26	lod -15
	10220-03	10p11.23	
Chen ¹⁷	10220-04	PFSL/D21S171/TH	lod -15
Shah ¹⁸	3040-01	PFKL/D21S171/TH	lod -10.23
	3040-02	D21S17	p=10 ⁻⁴ p=0.1
Deves ¹⁹	10220-05	10p11.23	
	10220-06	10p11.23	p=10 ⁻⁴ p=0.1

Table 2 Genetic distribution of allelic frequency in bipolar disorder

Gene	Allele	Control			Bipolar		
		G/G	G/T	T/T	G	T	F
Ctrol(N=90)		1	29	60	31	149	
Bipolar(N=91)		3	24	64	30	152	

Table 3 Genotype frequencies of SNPs within the region

Gene	Allele	Control			Bipolar		
		G/G	G/A	A/A	G	A	F
TRP2 (C→A)	control (n=91)	80	1	0	181	1	
	bipolar (82)	85	0	0	128	0	
TRP4 (C→T)	control (81)	87	4	0	178	4	
	bipolar (81)	87	4	0	178	4	
TRP8 (A→G)	control (82)	81	1	0	162	1	
	bipolar (81)	81	0	0	162	0	
TRP20 (T→G)	control (81)	5	41	45	51	131	
	bipolar (82)	9	33	50	51	133	

Table 4 TRP channel (TRPC) subfamilies

•S(short)TRPC
<i>C. elegans</i> : TRPC1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
<i>Drosophila melanogaster</i> : DmTRP, DmTRL
•O(osm)TRPC
<i>C. elegans</i> : OTRPCOSM9, 2, 3, 4, 5
Mammals: OTRPC1 (VR1), 2 (VRL1), 3, 4
•L(long)TRPC
<i>C. elegans</i> : LTRPC1, 2, 3, 4
Mammals: LTRPC1 (Melastatin), 2 (TRPC7), 3, 4, 5, 6, 7

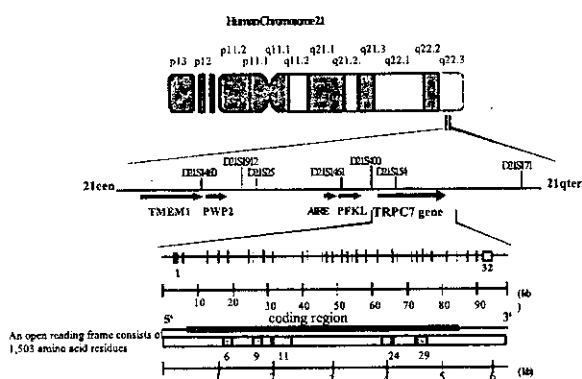


Figure 1 Genomic structure and chromosomal localization of the TRPC7 gene. The genes located in this region are shown by the arrows. TRPC7 (Transient Receptor Potential related Channels) that consists of 1,503 amino acid residues from the fetal brain and caudate nucleus cDNA libraries. The TRPC7 gene was mapped between D21S400 and D21S171 on human chromosome 21q22.3 neighboring PFKL. Genomic sequence analysis shows that the TRPC7 gene is imposed of thirty-two exons and spans approximately 90 kb.

参考文献

- 1) Aita VM, Liu J, Knowles JA, Terwilliger JD, Baltazar R, Grunn A, Loth JE, Kanyas K, Lerer B, Endicott J, Wang Z, Penchaszadeh G, Gilliam TC, Baron M. A comprehensive linkage analysis of chromosome 21q22 supports prior evidence for a putative bipolar affective disorder locus. *Am J Hum Genet*, 1999; 64: 210-217.
- 2) Berrettini WH, Ferraro TN, Goldin LR, Weeks DE, Detera-Wadleigh S, Nurnberger JI, Gershon ES.

Chromosome 18 DNA markers and manic-depressive illness: evidence for a susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 5918-5921.

- 3) Detera-Wadleigh SD, Badner JA, Goldin LR, Berrettini WH, Sanders AR, Rollins DY, Turner G, Moses T, Haerian H, Muniec D, Nurnberger JI Jr, Gershon ES. Affected-sib-pair analyses reveal support of prior evidence for a susceptibility locus for bipolar disorder, on 21q. *Am J Hum Genet*, 1996; 58: 1279-1285.
- 4) Gurling H, Smyth C, Kalsi G, Moloney E, Rifkin L, O'Neill J, Murphy P, Curtis D, Petursson H, Brynjolfsson J. Linkage findings in bipolar disorder. *Nat Genet*, 1995; 10: 8-9.
- 5) Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*, 2002; 9: 163-173.
- 6) Harteneck C, Plant TD, Schultz G. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci*, 2000; 23: 159-166.
- 7) Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 1999; 397: 259-263.
- 8) Liu J, Joo SH, Terwilliger JD, Grunn A, Tong X, Brito M, Loth JE, Kanyas K, Lerer B, Endicott J, Penchaszadeh G, Gilliam TC, Baron M. A follow-up linkage study supports evidence for a bipolar affective disorder locus on chromosome 21q22. *Am J Med Genet*, 2001; 105: 189-194.
- 9) 森 泰生, 井本敬二. 受容体活性化される Ca^{2+} 流入機構—容量性 Ca^{2+} 流入と TRP 蛋白質—蛋白質 核酸 酵素, 1998; 43: 1567-1576.
- 10) Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. Genomic organization and complete nucleotide sequence of the human PWP2 gene on chromosome 21. *Genomics*, 1997; 42: 528-531.
- 11) Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by

Nudix motif homology Nature. 2001, 411: 595~599.

- 12) Smyth C, Kalsi G, Curtis D, Brynjolfsson J, O'Neill J, Rifkin L, Moloney E, Murphy P, Petursson H, Gurling H. Two-locus admixture linkage analysis of bipolar and unipolar affective disorder supports the presence of susceptibility loci on chromosomes 11p15 and 21q22. *Genomics*, 1997; 39: 271~278.
- 13) Straub RE, Lehner T, Luo Y, Loth JE, Shao W, Sharpe L, Alexander JR, Das K, Simon R, Fieve RR. A possible vulnerability locus for bipolar affective disorder on chromosome 21q22.3. *Nat Genet*, 1994; 8: 291~296.
- 14) Yoon IS, Li PP, Siu KP, Kennedy JL, Macciardi F, Cooke RG, Parikh SV, Warsh JJ. Altered TRPC7 gene expression in bipolar-I disorder. *Biol Psychiatry*, 2001; 15: 620-626.

E. 研究発表

1. 論文発表

Yutaka Ono, Juko Ando, Naoko Onoda, Kimio Yoshimura, Tomoo Momose, Masami Hirano, and Shigenobu Kanba. Dimensions of temperament as vulnerability factors in depression. *Molecular Psychiatry* 7: 948-953, 2002.

Ando, J., Ono, Y., Yoshimura, K., Onoda N., Shinohara, M., Kanba, S., and Asai, M.: Genetic structure of Cloninger's seven-factor model of temperament and character in the Japanese population. *Journal of Personality* 70: 583-609, 2002.

Higuchi, S., Usui, A., Murasaki, M., Matsushita S., Nishioka N., Yoshino A., Muraoka H., Ishizuka Y., Kanba S., and Sakurai T. Plasma orexin A is lower in patients with narcolepsy. *Neurosci Lett* 318: 61-64, 2002.

Kawashima, K., Yamakawa, K., Takahashi, W., Takizawa, S., Yin, P., Sugiyama N., Kanba, S., and Arita, J.: The estrogen-occupied estrogen receptor is functionally switched from a positive regulator to a negative regulator of cell proliferation by Insulin/Insulin-like growth factor-1: A cell

context-specific antimitogenic action of estradiol on rat lactotrophs in culture. *Endocrinology* 143: 2750-8, 2002.

Ono Y, Ando J, Onoda N, Yoshimura K, Momose T, Hirano M, Shigenobu Kanba S: Dimensions of temperament as vulnerability factors in depression. *Molecular Psychiatry*, 7: 948-953, 2002.

Suzuki, E., Nakaki, T., Shintani, F., Kanba, S., Miyaoka, H.: Antipsychotic, Antidepressant, Anxiolytic, and Anticonvulsant Drugs Induce Type II Nitric Oxide Synthase mRNA in Rat Brain. *Neuroscience Letters* 333: 217-219, 2002.

Horiuchi, J., Saigusab, T., Sugiyama, N., Kanba, S., Nishida, Y., Sato, Y., Hinumad, S., and Arita, J.: Effects of prolactin-releasing peptide microinjection into the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity in rats. *Brain Research* 958: 201-209, 2002.

研究要旨

統合失調症の系統的分子遺伝研究を推進するために、統合失調症大家系の症状評価およびサンプル収集を行った。また、従来のケースコントロール研究の欠点を補うことを目的とする伝達不平衡検査(TDT)を行うために、統合失調症患者とその両親のトリオ 84 組を収集し保存した。これらのサンプルは今後の統合失調症分子遺伝研究に貴重なものとなってこよう。これらのサンプルを用いて、セロトントランスポーターと Notch 4 遺伝子の多型によるケースコントロール研究と TDT 研究を行ったが、この 2 つの遺伝子はいずれも統合失調症の病因遺伝子でないことが確認された。

A. 研究目的

機能性精神疾患のなかで、統合失調症は有病率が約 1%と高く、多くの罹患者は長期的な社会的機能の低下を余儀なくされるため、本疾患による社会的・経済的損失および医療福祉コストは極めて大きい。薬物療法の発展により、全体の予後は改善しているものの、現在の治療に反応しない難治例がいまだに数多く存在する。これは発症の原因が明らかでないこと、従って新薬の開発の多くが従来薬の延長線上にあることなどが遠因となっている。統合失調症の生物学的要因が特定されれば、新たな治療法の開発が大きく進展するはずである。

臨床遺伝学研究により統合失調症発症への遺伝的要因の関与が明らかとなっている。しかし統合失調症発症脆弱性遺伝子は未だ特定されていない。疾患多発家系を対象とした連鎖研究は、複数の家系に共通であり、かつ発症に強い影響を及ぼす原因遺伝子の特定に寄与するはずである。しかし、これまでの連鎖研究は、このような遺伝子は存在しそうなことを示している。これは家系により原因遺伝子が異なっている(遺伝的異質性)可能性が高いことを意味し、これを克服する一つの方法として単一の大家系を連鎖解析の対象とすることが考えられる。

連鎖研究の他に、疾患候補遺伝子の多型を利用したケースコントロール研究が盛んに行われているが、結果が一致しないことが多い。その理由としてサ

ンプル数や集団の階層化の問題が指摘されている。そこで集団の階層化を克服する一つ的手段として伝達不平衡テスト(TDT)が開発された。これは罹患者とその両親の遺伝子型を解析し、アレルの伝達に偏りがあるかどうかを調べ検定する方法である。また、この TDT は、連鎖と連鎖不平衡を同時に検定するという特徴を持っている。

そこで本分担研究者は、系統的な遺伝子多型解析を行うために必要な 1a) 統合失調症大家系の構成員の症状評価と血液サンプル収集、および 1b) TDT 用の家系サンプル収集を行った。またこれとは別に 1c) ケースコントロール研究のため、統合失調症のサンプルおよび同地域に居住する日本人の対照サンプルを収集した。次に、2) これらサンプルを使用し候補遺伝子の多型解析を行ったのでここに報告する。

B. 研究方法

新潟大学医学部附属病院およびその関連施設に通院もしくは入院中のもので DSM-IV により統合失調症と診断されたものとその家族を対象とした。

1a) 統合失調症大家系

統合失調症大家系について、生存者には SCID を施行し診断した。死亡者は診療録および家族への面接により診断を特定した。対象者の末梢血からゲノム DNA を抽出し保存した。また、末梢血のリンパ球

を EB ウイルスにより芽球化し凍結保存した。

1b) TDT 用のサンプル収集

DSM-IV により統合失調症と診断された患者およびその両親のトリオ 84 組を対象に採血を行った。それぞれの末梢血からゲノム DNA を抽出し保存した。

1c) ケースコントロール研究用のサンプル収集

1b)と同様に、DSM-IV により統合失調症と診断された患者および新潟地区に居住し精神疾患の既往のないものから末梢血ゲノム DNA を収集した。

2) 候補遺伝子による多型解析

2a) セロトントランスポーター (17q11.1-12)

統合失調症とセロトニン機能との関連は以前から指摘されている。統合失調症の治療薬にはセロトニン拮抗作用を有するものが多い。そこでセロトントランスポーターのプロモーター領域にある 5-HTTLPR 多型を利用し、ケースコントロール研究および TDT を行った。ケースコントロール研究は 235 名(男 122 名、女 113 名)の統合失調症患者(平均年齢 46.0 ± 13.3)および性と年齢を一致させた対照群(同 42.8 ± 10.8)で行った。また TDT は 81 家系で行った。統計解析は、ケースコントロール研究では Clump プログラムを使用し、TDT では ETDT プログラムを使用した。

2b) Notch 4 (6p21.3)

染色体 6 番短腕はいくつかの連鎖研究で統合失調症との連鎖の可能性が示されている。Wei and Hemmings はこの領域をマイクロサテライトマーカーなどを用いて解析したところ、Notch 4 遺伝子多型で関連を発見し報告している。そこで Notch 4 遺伝子多型である(TAA)_n, SNP1, SNP2, (CTG)_n, (TTAT)_n の 5 つのマーカーを使用し、ケースコントロール研究および TDT を行った。統計解析は 2a)と同様に行った。(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会にて承認されており、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守している。

C. 研究結果

1) 大家系および TDT 用サンプル収集

27 人の家系構成員のうち生存者は 18 人であった。DSM-IV により統合失調症と診断できた症例は 10 人で、うち 6 人が生存しており、この 6 人全員から DNA を採取できた。他の構成員では精神遅滞が 1 名、アルコール依存が 1 名いた。人格障害の存在は確認できなかった。この家系の計 16 人から DNA を採取し、さらにリンパ球を芽球化保存した。

TDT 用のサンプルは 84 家系(発端者の性は男 45 名、女 39 名)から収集した。

2) 候補遺伝子多型による解析

2a) セロトントランスポーター

結果を表 1 に示す。ケースコントロール研究および TDT のどちらも有意な差を認めなかった。

表 1. セロトントランスポーター-5-HTTLPR の解析

A. ケースコントロール研究

アレル	患者群(頻度)	対照群(頻度)
s	0.77	0.79
l	0.21	0.19
xl	0.02	0.02

B. TDT

		Transmitted		
		s	l	xl
Not Transmitted	s	96	24	1
	l	34	5	0
	xl	2	0	0

Allele-wise TDT=2.07, 2 df, p=0.35

Genotype-wise TDT=2.07, 2df, p=0.35

2b) Notch 4

SNP1 および SNP2 ではケースコントロール研究と TDT のどちらも有意差を認めなかった。3 個のマイクロサテライトマーカーでは、(CTG)_n でケースコントロール研究において、 $p = 0.013$ であったが、多重検定の補正を行うと、 p 値は 5%有意水準を越える値となった ($0.013 \times 5 = 0.065$)。TDT においては、(TTAT)_n で、補正前の p 値は allele-wise で 0.023, genotype-wise で 0.012 であったが、補正後の p 値は

5%有意水準を越える結果となった(表 2)。

表 2. Notch 4 遺伝子(TTAT)_n 多型の TDT の結果

Repeat	Transmitted	Not Transmitted
10	0	3
11	38	24
12	21	35
13	1	5
14	0	1

Allele-wise $p = 0.023$

Genotype-wise $p = 0.012$

D. 考察

本研究における候補遺伝子の多型を利用した統合失調症の分子遺伝学解析では、セロトントランスポーターおよび Notch 4 遺伝子の両者共に有意な差はなく、病因遺伝子である可能性は否定的であった。しかし、今回の Notch 4 の結果は 6p 領域と統合失調症の連鎖を否定するものではない。これまでに複数の連鎖研究の結果、6p は候補領域として注目されており、今後この領域に多数のマーカーを設定し多型解析を行っていく必要がある。

一方今回我々が収集したサンプルは非常に貴重なものである。単一の大家系での解析は、この家系において強い影響を有する原因遺伝子が存在するならば、その同定が可能となるだろう。現在、この家系を対象とした全染色体領域を解析するゲノムスクャンが進行中である。また、TDT 用のサンプルは、ケースコントロール研究で有意差がみられた多型を再確認するうえで極めて有用となってこよう。具体的には、ケースコントロール研究で、これまでの連鎖研究等から注目されている特定の領域を多数のマーカー (SNP もしくはマイクロサテライトマーカー) を用いてスクリーニングし、そこで有意差が認められたマーカーに対して、TDT サンプルで確認し、真の候補領域を特定し狭めるといった戦略が可能となってくる。

今回の研究では、統合失調症の発症要因の特定には至らなかったが、今後の研究を推進する上で、貴重なサンプルを収集した。

E. 結論

セロトントランスポーター遺伝子および Notch 4 遺伝子はどちらも統合失調症の病因遺伝子ではない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaneko N, Muratake T, Amagane H, Tsuji S and Someya T. A case-control study and TDT analysis of Notch 4 gene in Japanese patients with schizophrenia. (in preparation for submission)

2. 学会発表

Kaneko N, Muratake T, Amagane H, Tsuji S and Someya T. Case-control study and TDT analysis of Notch 4 gene in Japanese patients with schizophrenia. 2002 World Congress of Psychiatry

Muratake T, Kaneko N, Sakado M, Sakado K, Tsuji S and Someya T. Case-control study and TDT analysis of serotonin transporter gene polymorphism in Japanese patients with schizophrenia. 2002 World Congress of Psychiatry

金子尚史、村竹辰之、桜井観喜、鈴木隆、小林央、辻省次、染矢俊幸. 精神分裂病と Notch 4 遺伝子多型との関連研究および伝達不平衡の検討. 第 24 回日本生物学的精神医学会

村竹辰之、金子尚史、坂戸美和子、坂戸薫、桜井観喜、鈴木隆、小林央、辻省次、染矢俊幸. 精神分裂病とセロトントランスポーター遺伝子多型との関連研究および伝達不平衡の検討. 第 24 回日本生物学的精神医学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書

機能性精神疾患の系統的遺伝子解析に関する研究：
一卵性双生児統合失調症不一致例における CA リピートマーカ－の差異の検討
～第 2 報～

分担研究者 辻田高宏 長崎大学医学部精神神経科

研究要旨

一卵性双生児統合失調症不一致組 5 組のゲノム DNA について、これまでのところ 227 の CA リピートマーカ－を用いて双生児間のゲノム差異の検出を試みたが、差異は検出されなかった。今後、隣接するマーカ－間の距離をさらに密にして解析を続ける予定である。

A. 研究目的

この研究の目的は、蛍光標識 CA リピートマーカ－を用いて、一卵性双生児精神分裂病不一致例のゲノムに、疾患への罹患・非罹患に影響する差異を検出しようとするものである。

B. 研究方法

対象は一卵性双生児統合失調症不一致組 5 組（すべて男性、平均年齢 42.6 歳）と健常一卵性双生児 6 組（男性 4 組、女性 2 組、平均年齢 36.0 歳）である。卵性診断は、Togersen ら（1979）による質問紙法（浅香訳、1983）赤血球抗原・酵素型、血清型、計 7 種および DNA フィンガープリント法による。診断は ICD-10 と DSM-IV も用いて行われた。一卵性双生児の統合失調症不一致の期間は、すべての組で 10 年以上であった。

ゲノム DNA は、末梢血リンパ球からフェノール法で抽出した。これまでのところ、1 番染色体で 27、6 番染色体で 22、7 番染色体で 17、8 番染色体で 19、9 番染色体で 13、10 番染色体で 16、11 番染色体で 6、12 番染色体で 14、13 番染色体で 9、14 番染色体で 10、15 番染色体で 11、16 番染色体で 10、17 番染色体で 12、18 番染色体で 9、19 番染色体で 8、20 番染色体で 9、21 番染色体で 6、22 番染色体で 6、X および Y 染色体で 3 の合計 227 の CA リピートマーカ－を用いた。PCR の条件は、annealing 55°C 30sec、extension 72°C 30sec、denaturation 95°C 30sec、30cycles で行った。蛍光色素により標識された PCR 産物を Pharmacia ALF DNA sequencer によりフラグメント解析を行った。

なお、本研究は長崎大学医学部倫理委員会での倫理審査・承認を経て、対象者に研究の趣旨を説明し、文書による同意を得て実施した。

C. 研究結果

一卵性双生児統合失調症不一致組 5 組において、すべての CA リピートマーカ－で PCR 産物のサイズの差異は認められなかった。2 つのマーカ－のみがすべてのマーカ－で homozygous であった。すべて homozygous であったマーカ－は、片親性アイソダイソミーの可能性を考える際に、元々 homozygous であるのか、受精後の乗り換えによりアイソダイソミーが生じたのか識別できないため、対象から除外した。結果として少なくとも 225 のマーカ－で統合失調症不一致組内での差異はないことが確認された。また、健常一卵性双生児 6 組の双生児間でも差異は認められず、統合失調症不一致組との明らかな相違もなかった。

D. 考察

理論的には今回の方法により、受精後の乗り換えにより生じる片親性アイソダイソミーや、染色体の欠失などの染色体異常によるゲノム不一致の一部が検出可能である。特に、片親性アイソダイソミーは、ゲノム刷り込み機構の崩壊による疾患の発症メカニズムのひとつとして知られており、精神疾患の発症に何らかの epigenetic な機構が関与する可能性が提唱されている現在、その検索は意義のあるものと考えている。

E. 結論

今回使用した CA リピートマーカ－では、一卵性双生児統合失調症不一致例のゲノムに差異は発見されなかった。今後も引き続き全ゲノムを対象に、隣接するマーカ－間の距離をさらに密にして解析を続ける予定である。

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 classI
distribution in Japanese patients with
schizophrenia. Am J Med Genet. 114: 42-45,
2002

Fujimaru K., Imamura A., Tsujita T.,
Uraguchi 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

双極性障害における Chromogranin B 遺伝子の関連解析

—主として中国人統合失調症において有意な関連がみられた部位についての検討—

(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：臨床遺伝学的研究の結果から、機能性精神疾患のなかでも双極性障害の発症には遺伝的要因の深く関わっていることが示されている。われわれは、統合失調症を対象とした DNA マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムスキャンにおいて、有意な差がみられた 20 番染色体上のマーカー D20S95 の最も近傍に存在する Chromogranin B 遺伝子の変異検索を行い、Exon4 内に見出した変異型のうち、中国人統合失調症患者を対象とした研究で有意な関連が報告された 433G/A 変異、533G/A 変異を含む前半 6 個の遺伝子変異型クラスターについて、双極性障害 178 名と健常対照者 192 名を対象として症例群間比較を行った。その結果、いずれの遺伝子多型においても症例対照間に有意な関連は見いだせなかったが、今後さらに症例数をふやし、検討する予定である。

研究協力者：

飯嶋良味¹⁾、坂元 薫²⁾、福永貴子³⁾、中平 進⁴⁾、有波忠雄⁵⁾、大槻露華⁵⁾、稲田俊也⁶⁾

研究協力者所属施設：

- 1) 国立精神・神経センター精神保健研究所
- 2) 東京女子医科大学神経精神科
- 3) 東京女子医科大学第二病院心の医療科
- 4) 東京高尾病院
- 5) 筑波大学基礎医学系遺伝医学
- 6) 名古屋大学大学院医学系研究科

A. 研究目的

家系研究、養子研究、双生児研究などの臨床遺伝学的研究の結果から、双極性障害などの機能性精神疾患の発症には遺伝的要因の関与することが広く知られており、その発症脆弱性に関連する遺伝子検索が精力的に行われている。本研究の目的は代表的な機能性精神疾患の一つである双極性気分障害とクロモグラニン B 遺伝子との間に関連がみられるかどうかについて検討することである。これまでにわれわれは、統合失調症の発症脆弱性に関連する遺伝子座位の系統的なスクリーニング解析を行ってきており、第 20 番染色体上のマーカー D20S95 において症例・対照間に有意な差を見いだした ($p=0.000005$, Kitao *et al.*, 2000)。この D20S95 の最も近傍に位置する遺伝子が Chromogranin B 遺伝子であることから、引き続き統合失調症患者を

対象に Chromogranin B 遺伝子の変異検索および関連解析を行ったところ、Exon4 に位置する 4 つの変異において、有意な関連があることを見いだした。同様の所見はその後、中国人グループからも Chromogranin B 遺伝子 Exon4 中の別の変異において、統合失調症との間に有意な関連が報告されている (Zhang *et al.*, 2002)。この Chromogranin B 遺伝子の位置する染色体 20pter から 20p12 にかけての領域は、双極性障害においても、米国国立精神保健研究所の家系を用いた研究で、パラメトリック連鎖解析によって LOD 値 1 以上が示された領域である (Detera-Wadleigh *et al.*, 1997)。今回われわれは、Chromogranin B 遺伝子が双極性障害と関連するかどうかについて、主として中国人統合失調症との間に有意な関連が報告された多型を含む 6 個の遺伝子変異型について検討した。

B. 研究方法

対象は、2001 年に出された 3 省合同の遺伝子解析研究における倫理指針に基づき、文書及び口頭で本研究の目的および意義についての説明を行い、書面での同意の得られた東京都内の精神科治療施設に通院または入院中の患者で、DSM-IV 診断基準で双極 I 型障害または双極 II 型障害と診断された 178 名と、精神疾患に関する遺伝子解析研究に自発的意志により参加を表明した者でこれまでに精神科受診歴のない健常対照者のうち、年齢・性別のマッチした 192 名である。各対象者から採血した血液より DNA を抽出し、Chromogranin B 遺伝子の各変異部位を PCR-Direct Sequence 法にて増

幅, ABI 3100 genetic analyzer にて遺伝子型の解析を行った。両群の遺伝子型出現頻度をそれぞれ集計し, 2X2, 2X3 のカイ二乗検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。なお, 本研究は, 名古屋大学医学部, 東京女子医科大学および国立精神・神経センター国府台地区における倫理委員会の審査で承認を得て行っている。

C. 研究結果

Chromogranin B 遺伝子 Exon4 は全長 1766bp で 9 個のミスセンス変異と 1 個のサイレント変異が存在する。これら 10 個の変異に Exon4-11bp に位置する変異を加え, 計 11 個の変異は前半 6 個のクラスターと後半 5 個のクラスターに分けられる。今回われわれは, 中国人統合失調症患者を対象とした研究で有意な関連が報告された 433G/A 変異, 533G/A 変異を含む前半 6 個の遺伝子変異型クラスターについて, 双極性障害との関連を検討した。全ての変異において遺伝子型の出現頻度は Hardy-Weinberg 平衡に矛盾しなかった。今回検討したいずれの変異型についても, 双極性障害との間に有意な関連は認められなかった。

D. 考察

Chromogranin family(A, B, C)は種々の神経細胞に分布しており, 脳脊髄液中にも含まれる可溶性分泌タンパクであり, 褐色細胞種や神経内分泌腫瘍においては, カテコールアミン等と共に過剰に分泌されるため, それらの有用な診断マーカーであると考えられているが, Chromogranin がカテコールアミンの調節に及ぼす生理的意義についてはまだ不明な点も多く, 今後の研究課題となっている。また, 精神科領域における検討では脳脊髄液中における Chromogranin A および B が, 統合失調症患者において有意に減少していること (CHGA: $p < 0.004$, CHGB: $p < 0.02$, Landen *et al.*, 1999)や, 海馬歯状回における Chromogranin A 陽性細胞数の有意な減少 (Shibata *et al.*, 2001)が報告されており, Chromogranin は精神疾患の機能的候補遺伝子として重要な役割を担っている可能性が考えられる。今回検討した中国人統合失調症患者において有意な関連が報告された 433G/A 変異, 533G/A 変異を含む前半 6 個の遺伝子変異型の解析結果では, 双極性気分障害との間に有意な関連はみられず, Chromogranin B 遺伝子変異型の双極性障害の発症脆弱性に及ぼす影響については確認できなかったが, 今後さらに症例数を増やして検討を重ね, あわせてハプロタイプ解析による検討を行う予定である。

E. 参考文献

- 1) Kitao Y, Inada T, Arinami T, Hirotsu C, Aoki S, Iijima Y, Yamauchi T, Yagi G.: A contribution to genome-wide association studies: search for susceptibility loci for schizophrenia using DNA microsatellite markers on chromosomes 19, 20, 21 and 22. *Psychiatr Genet.* 2000; 10(3): 139-143.
 - 2) Zhang B, Tan Z, Zhang C, Shi Y, Lin Z, Gu N, Feng G, He L.: Polymorphisms of chromogranin B gene associated with schizophrenia in Chinese Han population. *Neurosci Lett.* 2002; 323(3): 229-233.
 - 3) Landen M, Grénfeldt B, Davidsson P, Stridsberg M, Regland B, Gottfries CG, Blennow K.: Reduction of chromogranin A and B but not C in the cerebrospinal fluid in subjects with schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1999; 9(4): 311-315.
 - 4) Detera-Wadleigh SD, Badner JA, Yoshikawa T, Sanders AR, Goldin LR, Turner G, Rollins DY, Moses T, Guroff JJ, Kazuba D. *et al.*: Initial genome scan of the NIMH genetics initiative bipolar pedigrees: chromosomes 4, 7, 9, 18, 19, 20, and 21q. *Am J Med Genet.* 1997; 74(3): 254-262.
 - 5) Shibata I, Ito M, Iwasaki T, Matsumoto I, Niwa S: Neuronal orientation variability in the hippocampal subfield CA4 and reduction of chromogranin A immunoreactivities in the dentate gyrus in schizophrenia. *International Congress On Schizophrenia Research, 2001*
- ### G. 研究発表
1. 稲田俊也, 樋口輝彦, 上島国利, 中込和幸, 岡島由佳, 三村 将, 磯野 浩, 大坪天平, 山田光彦, 稲本淳子, 岩波 明, 平島奈津子, 篠田淳子, 松尾幸治, 大溪俊幸, 三宮正久, 中川種栄, 西岡玄太郎, 加藤忠史, 山田和夫, 田島 治, 神庭重信, 岡崎祐士, 長沼英俊: Young Mania Rating Scale 日本語版の信頼性についての予備的検討. *臨床精神薬理* 5(4): 425-431, 2002.
 2. 稲田俊也, 樋口輝彦, 上島国利, 中込和幸ら: Young Mania Rating Scale 日本語版の信頼性についての予備的検討. *臨床精神薬理* 5:425-431, 2002
 3. Yamada M, Higuchi T: Functional genomics and depression research beyond the monoamine hypothesis. *European Neuropsychopharmacology* 12:235-244, 2002
 4. T. Higuchi, Iwanami A, Oshima A, Shioe K, Kanba S: Algorithm for treatment of mood disorders in Japan. *Recent Advances in the*

Research of Affective Disorder in Japan (ed. By Okuma T, Kanba S, Inoue Y), pp163-171, Elsevier Science B.V., 2002

5. M Yamada, M Takahashi, M Tsunoda, G Nishioka, K Kudo, H Ohata, K Kamijima, T Higuchi, K

Momose, M Yamada: Differential expression of VAMP2/synaptobrevin-2 after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. *The Pharmacogenomics J* 2:377-382, 2002

表 1. 双極性気分障害とクロモグラニンB遺伝子多型との関連

IVS3-11T/C	TT	TC	CC	n	Tratio	Cratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control	154	32	1	187	90.9%	9.1%	(vs Cont)		0.840	(vs Cont)	
Schizophrenia	164	21	1	186	93.8%	6.2%	0.380 - 1.142	0.659	0.990	0.135	0.273
Bipolar (I+II)	150	21	1	172	93.3%	6.7%	0.413 - 1.243	0.717	1.000	0.234	0.425
Bipolar I	101	16	1	118	92.4%	7.6%	0.455 - 1.499	0.826	0.987	0.528	0.677
Bipolar II	49	5	0	54	95.4%	4.6%	0.185 - 1.273	0.485	1.000	0.134	0.313
277T/A	TT	TA	AA	n	Tratio	Aratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control	73	86	30	189	61.4%	38.6%	(vs Cont)		0.910	(vs Cont)	
Schizophrenia	73	89	25	187	62.8%	37.2%	0.700 - 1.262	0.940	0.976	0.680	0.781
Bipolar (I+II)	61	88	28	177	59.3%	40.7%	0.810 - 1.466	1.090	0.963	0.570	0.679
Bipolar I	44	63	15	122	61.9%	38.1%	0.703 - 1.363	0.979	0.750	0.898	0.505
Bipolar II	17	25	13	55	53.6%	46.4%	0.895 - 2.108	1.374	0.929	0.145	0.342
433G/A	GG	GA	AA	n	Gratio	Aratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control (Chinese)	71	70	29	170	62.0%	38.0%	(vs Cont)		0.110	(vs Cont)	
(Japanese)	73	90	24	187	63.1%	36.9%			0.963		
Schizo (Chinese)	103	74	16	193	73.0%	27.0%	1.170 - 2.180	1.600	0.600	0.0044	0.016
(Japanese)	77	83	27	187	63.4%	36.6%	0.734 - 1.331	0.989	0.906	0.940	0.753
Bipolar (I+II)	74	86	17	177	66.1%	33.9%	0.647 - 1.189	0.877	0.742	0.398	0.601
Bipolar I	50	60	12	122	65.6%	34.4%	0.641 - 1.258	0.898	0.816	0.531	0.720
Bipolar II	24	26	5	55	67.3%	32.7%	0.530 - 1.305	0.832	0.909	0.423	0.695
533A/G	AA	AG	GG	n	Aratio	Gratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control (Chinese)	51	85	34	170	55.0%	45.0%	(vs Cont)		0.900	(vs Cont)	
(Japanese)	51	90	47	188	51.1%	48.9%			0.918		
Schizo (Chinese)	94	74	25	193	68.0%	32.0%	1.280 - 2.340	1.730	0.093	0.0017	0.005
(Japanese)	42	94	51	187	47.6%	52.4%	0.654 - 1.159	0.870	0.999	0.342	0.572
Bipolar (I+II)	51	83	43	177	52.3%	47.7%	0.785 - 1.403	1.049	0.843	0.747	0.937
Bipolar I	38	53	31	122	52.9%	47.1%	0.779 - 1.484	1.075	0.589	0.660	0.692
Bipolar II	13	30	12	55	50.9%	49.1%	0.650 - 1.520	0.994	0.893	0.977	0.685
598A/C	AA	AC	CC	n	Aratio	Cratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control	149	39	1	189	89.2%	10.8%	(vs Cont)		0.823	(vs Cont)	
Schizophrenia	143	43	1	187	88.0%	12.0%	0.717 - 1.762	1.124	0.571	0.610	0.857
Bipolar (I+II)	117	26	0	143	90.9%	9.1%	0.490 - 1.379	0.822	0.582	0.457	0.578
Bipolar I	71	21	0	92	88.6%	11.4%	0.606 - 1.851	1.059	0.575	0.841	0.723
Bipolar II	46	5	0	51	95.1%	4.9%	0.163 - 1.102	0.424	1.000	0.070	0.176
695G/A	GG	GA	AA	n	Gratio	Aratio	95% CI	Odds ratio	GTvsHW	AF freq	GT freq
Control	157	28	1	186	91.9%	8.1%	(vs Cont)		1.000	(vs Cont)	
Schizophrenia	161	20	3	184	92.9%	7.1%	0.502 - 1.496	0.867	0.503	0.607	0.305
Bipolar (I+II)	121	21	1	143	92.0%	8.0%	0.566 - 1.757	0.997	1.000	0.992	0.979
Bipolar I	75	16	1	92	90.2%	9.8%	0.670 - 2.282	1.236	1.000	0.497	0.766
Bipolar II	46	5	0	51	95.1%	4.9%	0.222 - 1.550	0.588	1.000	0.279	0.543

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

機能性精神疾患の系統的遺伝子解析に関する研究：

1 5歳以下発症の統合失調症例における dopamine 関連遺伝子多型解析

分担研究者 三辺義雄 浜松医科大学精神神経科講師

研究要旨 15歳以下の早期発症統合失調症は稀な疾患であるが、より遺伝要因が大きく、遺伝研究には適した群であると推測される。本研究は4つのドーパミン関連酵素、Tyrosine hydroxylase (TH), Dopamine- β -hydroxylase(DBH), Catechol-O-methyl transferase (COMT), Monoamine oxidase-A(MAOA) と、4つのドーパミン受容体 D1,D2,D3,D4 の遺伝子多型と、15歳以下の早期発症統合失調症との関連について検討した。対象は DSM-IVに基づき15歳以下で統合失調症と診断された日本人患者51人と、関連のない日本人健常者146人である。gDNAは末梢血を採取し、全血から QIAamp Blood kit で抽出した。各遺伝子多型は PCR-RFLP法を用いて同定した。アリル頻度、遺伝子型において15歳以下の早期発症統合失調症と健常者間において分布に差異はみられなかった。

A. 研究目的

15歳以下の早期発症統合失調症は稀な疾患であり、成人期発症例と比較すると重篤な症状を呈することが多い。統合失調症とドーパミンとの関連は以前から示唆されてきたが、成人発症例を対象とした研究では遺伝子との関連が未だ明らかとなっていない。低年齢の発症は統合失調症やアルツハイマー病を含む多くの疾患において、より遺伝要因が大きく、遺伝研究には適した群であると推測される。15歳以下の早期発症統合失調症を対象とした研究はわずかしか報告がなく、遺伝研究において大変意義があるといえる。本研究は4つのドーパミン関連酵素、Tyrosine hydroxylase (TH), Dopamine- β -hydroxylase(DBH), Catechol-O-methyl transferase (COMT), Monoamine oxidase-A(MAOA) と、4つのドーパミン受容体 D1,D2,D3,D4 の遺伝子多型と、15歳以下の早期発症統合失調症との関連について検討した。

B. 研究方法

対象は DSM-IVに基づき15歳以下で統合失調症と診断された患者51人（男性22人、女性29人）と、関連のない健常者146人である。健常者は本人および一親等の家族に精神科治療歴のないものである。

Polymorphism はドーパミン関連酵素では TH (Val81Met), DBH(Ala304Ser), COMT(Met108/158Val), MAOA (T941G, 30-bp VNTR)、ドーパミン受容体では D1(A48G), D2(Ser311Cys), D3(Ser9Gly, Msp I RELP), D4(48-bp VNTR)について検討した。

gDNAは末梢血を採取し、全血から QIAamp Blood kit で抽出した。各遺伝子多型は PCR-RFLP法を用いて同定した。これらから、統合失調症、正常対象群の各遺伝子多型、アリル頻度について差異を検討した。統計解析には χ^2 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計的有意差の基準とした。

(倫理面への配慮)

研究遂行にあたり、すべての被験者に対し、研究の目的・方法・危険性等について文書を用いて十分説明し、文書による同意を得た。なお、本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に基づき組織された「浜松医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会」の承認を受けている。

C. 研究結果

アリル頻度、遺伝子型において15歳以下の早期発症統合失調症と健常者間において分布に差異はみられなかった。

D. 考察

このことは患者数が少なかったこと、詳細な症状の検討なしに患者群をまとめたことも考慮しなければならない。今回15歳以下の早期発症統合失調症において、ドーパミン関連酵素、受容体の遺伝子的影響は日本人対象では認められなかった。しかし、15歳以下の早期発症統合失調症例は魅力的な検討対象であるので、今後の更なる検討が期待される。

E. 結論

15歳以下の早期発症統合失調症において、ドーパミン関連遺伝子の明らかな異常は見られなかった。

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

Iwata Y, Matsumoto H, Minabe Y, Osada N, Nakamura K, Sekizawa T, Takei N, Mori N:

Early-onset schizophrenia and dopamine-related gene polymorphism.

American Journal of Medical Genetics, 116B: 23-26, 2003

2. 学会発表

長田菜穂子、三辺義雄、岩田泰秀、松本秀夫、中村和彦、武井教使、森則夫

15歳以下発症の精神分裂病のドーパミン関連遺伝子多型

第24回日本生物学的精神医学会、2002.4.10, さいたま

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

特記すべきことなし。