

厚生労働科学研究費補助金

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15年度 総括・分担 研究報告書

主任研究者 樋口 輝彦

平成16年3月

目 次

I. 総括研究報告

「ゲノム情報の利用による自殺防止を目指した向精神薬開発に関する研究」 --- 2

国立精神・神経センター国府台病院 樋口 輝彦

II. 分担研究報告書

1. 「ゲノム情報を利用した新規抗うつ薬の開発研究」 ----- 13

国立精神・神経センター国府台病院 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」 ----- 20

新潟大学医学部精神医学教室 染矢 俊幸

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」 --- 24

理化学研究所脳科学総合研究センター 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」 ----- 31

神戸大学医学部精神医学教室 前田 潔

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 36

IV. 研究成果の刊行物・別刷 (入手未確定により該当なし)

「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る。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15年度は、初年度および平成14年度に得られた知見をさらに発展的に継続した。はじめに、自殺者死後脳・扁桃体における遺伝子発現プロファイル解析を行い、5-HT₆ 受容体遺伝子を同定した。5-HT₆ 遺伝子多型と自殺との相関研究を行ったところ、267C/T ならびに(GCC)_{2/3} 多型の遺伝子型、遺伝子頻度、両多型のハプロタイプの分布について、自殺群、コントロール群においても有意差はなかった。動物モデルを用いた研究では、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700個を超える候補遺伝子を単離した。これら候補遺伝子群の一部が軸索の伸展・退縮、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示された。加えて、幼若期LIF投与ラットは神経発達において神経回路機能が障害され成長過程における行動異常を呈するものと推察され、今後、自殺研究を進める上で統合失調症のモデル動物となる可能性が示唆された。加えて、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における無動時間と、尾懸垂テストにおける無動時間を規定している遺伝子座位の各QTL領域から責任遺伝子を同定するために、コンソミックマウスの作成を継続し、常染色体に関してはN4世代、X染色体はN3世代まで到達した。また、B6とC3マウスの前頭葉で発現量が2倍以上異なる遺伝子を探索し、それらの中でQTL領域に載っている遺伝群を選別した。さらに、今年度はラットでうつ病のモデルである学習性無力を作成し、GeneChipを用いてうつ状態に関与する可能性のある遺伝子を調べた。その結果から、うつ病の病態生理としてアクチン細胞骨格遺伝子の代謝変調が基盤の1つにある可能性が示唆された。

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・フェロー
前田 潔	神戸大学医学部 精神医学教室・教授

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対応では十分な予防は行っていない。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

A. 研究目的

自殺は、最近、経済不況、社会状況の複雑化等の

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検索

(1) 候補遺伝子の探索：感情障害の治癒機転に関与する候補遺伝子を網羅的に探索した。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、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) うつ病治療法負荷による ADRG 遺伝子の発現変化の検討

ADRG 遺伝子に特異的なプライマーを設計し、RT-PCR 法によりうつ病治療法を負荷したラットサンプルにおける候補遺伝子の発現を検討した。最終年度は、ADRG#55 をモデルとして研究を行った。PCR 産物を Cyber green を含む 1% アガロースゲルで電気泳動後 FM-BioII でスキャンし、発現量は、house keeping gene である GAPDH の発現量により補正した。また、タンパクレベルでの発現変化は、Western Blot 法により検討した。

(3) 培養神経細胞の形態変化を指標としたアッセイ系を用いた検討：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。本年度は、ADRG#55 をモデルとして研究を行った。

(4) ADRG タンパクの強制発現による細胞内分布の検討：本年度は、ADRG#55 をモデルとして研究を行った。

○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) 白血病阻止因子 (LIF) 投与実験：雄性 Sprague-Dawley 系ラットに、LIF (0.3mg/kg あるいは対照として同 phosphat-buffered saline (PBS) を生後 2 から 10 日まで連日皮下注射した。幼若期 (生後 3 あるいは 8 日) あるいは成長後 (9 週齢) の

前頭皮質、線条体、海馬を採取した。リン酸化 STAT3、ニューロン特異的エノラーゼ (NSE)、グリア繊維酸性タンパク質 (GFAP)、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ドパミン D1 および D2 受容体は Western blotting 法により測定した。ドパミン (DA) とその代謝産物 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) および homovanillic acid (HVA) は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。また、幼若期あるいは成長後に還流固定した脳を GFAP あるいはヘマトキシリンにより染色した。

(2) 行動実験：3 週齢でオープン・フィールド試験 (OF) とプレパルス・インヒビション測定 (PPI)、4 週齢で PPI、6 週齢で PPI と能動回避試験 (AA)、8 週齢で OF と PPI を施行した。OF は 30 分間の自発運動量を自動計測した。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 PPI を測定した。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。 $PPI = 100 - (B - C) / (A - C) \times 100$ 。学習機能を評価するための能動回避試験には 2 つの区画を有するシャトル・ボックスを用いた。10 秒間の音刺激 (条件刺激) を提示している間に隣の区画に移動すると、それに続く 2 秒間の痛み刺激 (無条件刺激) を回避することができる。10 試行を 1 セッションとし、10 セッション行った。

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

(1) コンソミックマウスの作成：我々は、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 染色体について昨年度より作成を開始した。

(2) ゲノムワイド遺伝子発現解析：各 QTL 領域から候補責任遺伝子を同定する別のアプローチとして、我々は B6 と C3 マウスの前頭葉で発現量が 2 倍以上異なっている遺伝子を Affymetrix 社の GeneChip を用いて調べ、それら遺伝子のうち QTL 領域に載っている遺伝群を選別した。マウス前頭葉から total RNA を抽出し cDNA に変換して蛍光ラベルしたあと GeneChip にハイブリダイズした。B6、C3 マウス系統とも各 6 匹分の RNA をプールして解析した。

(3) ラット学習性無力モデルのゲノムワイド遺伝子発現：ラット学習性無力 (learned helplessness: LH) モデルは反応性うつ病のモデルとして考えられている。我々は LH ラットを作成し、その後生理食塩水投与群 (LH-S)、fluoxetine 投与群 (LH-F)、imipramine 投与群 (LH-I) の 3 つのグループに分け、前頭葉から RNA を抽出し、GeneChip を用いた遺伝子発現プロファイル解析を行った。

○自殺念慮の生物学的マーカーとなる遺伝子変異の自殺者死後脳における検索

(1) GeneChip 解析：神戸大学医学部法医学教室において法医学剖検が行われた自殺既遂者死後脳・扁桃体 (4 例) と精神疾患の既往のない対照者死後脳・扁桃体 (2 例) およびクロンテック社対照脳・扁桃体を比較とした。自殺既遂者 (4 例) × 対照脳 (2 例) との組み合わせにおいて、自殺既遂者が 50% 以下の減少を示す遺伝子を探索・同定した。

(2) 5-HT₆ 受容体遺伝子と自殺の関連研究：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 166 例（男性 114 例：45.3±15.5 歳；女性 52 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。既報告よりエクソン領域に位置する 267C/T ならびに翻訳開始上流域に位置する (GCC)2/3 リピート多型に着目し、自殺者群、対照群で多型頻度を比較検討した。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 χ^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倫理審査委員会の承認のもとに行われ、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検索

(1) 候補遺伝子の探索：我々は Differential display 法を用いて、ラット前頭葉皮質、海馬、視床下部より対照群に比べ 2 種の抗うつ薬 3 週間投与群において特異的に発現が増減する cDNA 断片 (ADRG#1-707) を ESTs (expressed sequence tags) として同定した。さらに、ADRG#1-707、ポジティブコントロール (house keeping genes) 及びネガティブコントロールをスポットした改良型 cDNA microarray (ADRG microarray) を作製した。ADRG microarray 解析の結果、ラット脳内において、抗うつ薬の長期投与後に多岐にわたる遺伝子群の発現の変化が示された。次に、この ADRG microarray を用いて物理的うつ病治療法である電気けいれん療法 (ECT)、経頭蓋的磁気刺激負荷 (rTMS) を模し

た処置を負荷したラットのサンプルを解析した。その結果、抗うつ薬、ECT、rTMS という全く異なる治療後に共通して発現変化する遺伝子を多数発見した。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、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。

(2) 抗うつ薬長期投与による ADRG#55 の発現変化についての検討：ADRG microarray の解析の結果、抗うつ薬投与、rTMS により発現増加が認められた ADRG#55 の発現変化を検討した。ADRG#55 に特異的なプライマーを用いて mRNA レベルでの発現変化を RT-PCR 法により検討したところ、イミプラミン、サートラリンの長期投与により有意な発現の増加が認められた。一方、単回投与では発現増加が認められなかった。さらに、ADRG#55 タンパクの発現変化を Western blot 法により確認したところ、抗うつ薬長期投与でのみ発現の増加が認められ、単回投与では変化していなかった。

(3) 培養神経細胞の形態変化を指標としたアッセイ系を用いた検討：ADRG#55 の翻訳領域を組み込んだ pIRES ベクターを PC12 細胞にトランスフェクションし、神経突起に及ぼす影響を検討した。GFP 画像をベクター導入の指標に、phalloidin 画像により突起の観察を行った結果、対照群に比べ ADRG#55 トランスフェクション群では神経突起長及び数が減少していることが確認された。さらにこれを数値化するため、一つの細胞の突起長の総和、突起の数をパラメーターとして解析を行った。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 37.9 μm 、トランスフェクタント群では

27.1 μm であり、神経突起数は、対照群で 2.5、トランスフェクタント群では 1.8 であり有意に減少していた。

(4) ADRG タンパクの強制発現による細胞内分布の検討：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、ADRG#55 の翻訳領域を組み込んだ発現ベクターを PC12 細胞にトランスフェクションし、細胞内分布について検討した。ベクターのみをトランスフェクションした対照群では、細胞質内での均一な分布が観察された。これに対して、ADRG#55 トランスフェクション群では、細胞膜及び神経突起での発現が強く観察された。

○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) 白血病阻止因子 (LIF) 投与実験：生後 3 日のラットに LIF (0.3mg/kg) あるいは同量の PBS を皮下注射し、30 分後に前頭皮質、線条体、海馬を採取した。LIF の細胞内シグナル伝達物質の 1 つであるリン酸化 STAT3 は前頭皮質、線条体、海馬いずれの部位でも LIF 投与群が対照群よりも有意に増加していた。アストロサイトのマーカーである GFAP は幼若期 (生後 8 日) の前頭皮質では有意に増加していたが、成長後 (9 週齢) の前頭皮質では有意差を認めなかった。これと一致して、組織染色でも GFAP 陽性細胞は幼若期の前頭皮質で増加していた。一方、線条体と海馬では、幼若期および成長後ともに GFAP に有意差を認めなかった。前頭皮質ではニューロンのマーカーである NSE、オリゴデンドロサイトのマーカーである MBP、D1 および D2 受容体を測定したが、いずれも変化がなかった。また、成長後の前頭皮質、線条体、海馬で DA、DOPAC、HVA を HPLC により測定したが、変化を認めなかった。LIF が LIF 受容体に結合すると、LIF 受容体と gp130 が二量体化

し、JAK-STAT 経路を通じて細胞内のシグナル伝達が行われる。幼若期に末梢投与された LIF により脳内のリン酸化 STAT3 が誘導されることから、末梢投与された LIF が中枢に作用していることが確認された。幼若期に末梢投与された LIF は前頭皮質のアストロサイトを増殖させたが、ニューロンのマーカーやオリゴデンドロサイトのマーカーには変化がなく、顕微鏡的に観察された成長後の脳組織構造にも粗大な影響は与えなかった。

(2) 行動実験：3 週齢では幼若期 LIF 投与ラットは対照群よりも水平および垂直方向の運動量が有意に低下していたが、8 週齢では両群間の運動量に有意差を認めなかった。120dB の音刺激に対する驚愕反応は 3, 4, 6, 8 週齢のいずれも両群間に有意差がなかった。PPI は 3 週齢では両群間に有意差を認めなかったが、4, 6, 8 週齢では LIF 投与群で有意に低下していた。6 週齢の AA では両群間の回避反応率に有意差を認めなかった。PPI の異常は統合失調症などの精神・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、統合失調病態モデル動物の評価法として使用されている。LIF を幼若期に慢性投与したラットは成長過程において PPI の低下を示したが、幼若期に投与された LIF がアストロサイトの増殖を介して神経発達に障害を引き起こし、その結果として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。本研究の結果から、幼若期 LIF 投与ラットは統合失調症のモデル動物となりうることを示された。今後は抗精神病薬による PPI 異常の改善効果を調べるなどモデル動物としての妥当性をさらに検討する、統合失調症患者における LIF の異常について検索を行うなどの研究を推進す

る必要がある。

○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) コンソミックマウスの作成：本年度は、N3世代個体を親系統に戻し交配して各染色体につき以下の数の雄を確保した（「表」+「裏」）：染色体2番- 51匹、4番- 82匹、6番- 92匹、8番- 95匹、11番- 107匹、14番- 109匹、17番- 70匹。全個体をゲノムワイドマーカー（80個のマイクロサテライト）を用いてタイピングして、best male（N4世代）を各染色体あたり2匹ずつ選択した。X染色体に関しては、N2世代を307匹（「表」+「裏」）作成し、やはり80個のゲノムワイドマイクロサテライトマーカーを用いてタイピングし、best female個体を「表」と「裏」につき各2匹ずつ選択した。マウスのQTL解析から、系統的にかつポジション的に責任遺伝子まで絞り込んでいくのはコンソミックマウスが有用である。我々は常染色体のコンソミックマウスを作成するのにN2、N4世代でbest maleを選択するという“スピードコンソミックマウス”の手法を用いているので、N5世代でhemisomic miceが完成する予定である。その後、hemisomic miceどうしをかけあわせてコンソミックとする。本年度で、常染色体コンソミックに関してはN4世代まで到達した。今後も可能な限りコンソミックマウス系統の作成を継続していくが、完成すれば精神疾患のみならず多くの多因子疾患の感受性遺伝子同定に役立つ重要なバイオリソースとなるため、本厚生労働科学研究費補助金で取り組んだ意義は大きいといえる。

(2) ゲノムワイド遺伝子発現解析：B6に比べてC3で発現が上昇しているQTL領域遺伝子群の発現レベル変化を確かめるため、ABI TaqMan法による

RT-PCRでさらに検討した。マウス系統間比較にはB6、C3各24匹ずつ解析した。lipoprotein lipaseとtransmembrane 7 superfamily member 3遺伝子についてはTaqMan probeがなく検討出来なかったが、それ以外の検討した遺伝子のうち、5つの遺伝子に関しては、発現レベルの差異の有意性が確かめられた。B6に比べてC3で発現が低下しているQTL領域遺伝子群のうち、RIKEN cDNA 2310022M17 geneとcysteine-rich motor neuron 1遺伝子についてはTaqMan probeがなく検討出来なかったが、それ以外の検討した遺伝子に関しては、発現レベルの差異の有意性が確かめられた。(1) B6とC3の前頭葉で発現レベルが2倍以上違う、(2) QTL領域にコードされている、(3) RT-PCRで発現量の差の有意性が再現される、という3つの条件を設定したことにより、候補遺伝子が36,000個の中から6個に絞られた。この中にCap1という遺伝子が含まれていた。

(3) ラット学習性無力モデルのゲノムワイド遺伝子発現:GeneChipを用いた遺伝子発現プロファイル解析を行った。ESTを含む34遺伝子がLH-S群でコントロール群に比べ有意に変化していた。それらの中で、脳の発達や細胞骨格に関与するといわれているLimk1遺伝子がLH-Sラットでコントロール群に比べ有意に減少(9.5倍)しており、統計的に有意ではなかったものの、imipramine投与によりコントロールレベルにまで回復する傾向が見られた。Limk1は細胞骨格タンパクであるアクチンの動的な重合・脱重合を調整する遺伝子である。QTL領域にコードはされていないものの、ベータアクチン遺伝子そのものの発現量をマウス前頭葉で測定したところ、B6に比較してC3で有意に発現が低下していた。アクチン代謝を直接調節するもう1つの重要な遺伝子としてcofilin1があるが、この遺伝子の発

現をラット学習性無力で検討したところ有意に上昇していた。

○自殺念慮の生物学的マーカーとなる遺伝子変異の自殺者死後脳における検索

自殺者死後脳・扁桃体における GeneChip を用いた遺伝子発現プロファイル解析により、対照者と比べ発現が低下しているもののうち、5-HT 神経系に関するものとして、5-HT₆ 受容体を同定した。5-HT₆ 受容体遺伝子における 267C/T ならびに(GCC)_{2/3} 多型の遺伝子型、遺伝子頻度は自殺群、コントロール群において有意差はなかった。両多型のハプロタイプの分布についても、両群間で有意差は認められなかった。

5-HT₆ 受容体は、脳内で辺縁系、大脳皮質を中心に発現している。また、自殺予防効果が示唆されているクロザピン、オランザピンといった非定型抗精神病薬、あるいは一部の抗うつ薬が高親和性を示し、これらの薬剤の作用点である可能性がある。遺伝子発現プロファイル解析結果からは、自殺者における 5-HT₆ 受容体の変化が示唆されるが、少なくとも今回検討した遺伝子多型による相関研究からは遺伝子レベルでの関与は否定的と考えられた。

自殺者死後脳・扁桃体における遺伝子発現プロファイル解析により、対照者と比べ発現が低下しているもののうち、5-HT 神経系に関する以外の遺伝子も約 20 種同定されており、現在自殺との関連を解析が待たれる。

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. Kudo, K., Yamada, M., Takahashi, K., Nishioka, G., Tanaka, S., Hashiguchi, T., Fukuzako, H., Takigawa, M., Higuchi, T., Momose, K., Kamijima, K. and Yamada, M.: Differential expression of kf-1 after repetitive transcranial magnetic stimulation in rat frontal cortex and hippocampus. (manuscript submitted for publication)
2. Yamada, M., Iwabuchi, T., Takahashi, K., Kurahashi, K., Ohata, H., Momose, K., Kamijima, K., Higuchi, T. and Yamada, M.: Identification and characterization of frizzled-3 protein: decrease in rat frontal cortex after antidepressant or electroconvulsive treatment. (manuscript submitted for publication)
3. Takahashi, K., Yamada, M., Ohata, H., Higuchi, T., Yamada, M. and Momose, K.: Differential expression of NDRG2-S and NDRG2-L after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. (manuscript submitted for publication)
4. 山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享: 神経回路網の再編成に注目した新規抗うつ薬ターゲット分子の機能評価, 精神薬療研究年報, in press, 2004
5. Yamada M, Yamada M, Higuchi T: Antidepressant-elicited changes in gene expression -Remodeling of neuronal circuits as a new hypothesis for drug efficacy. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, in press, 2004
6. Yamada, M., Takahashi, K., Tsunoda, M.,

- Iwabuchi, T., Kobayashi, S., Tsukahara, N., Nakagawa, T., Awatsu, M., Yamazaki, S., Hirano, M., Ohata, H., Nishioka, G., Kudo, K., Tanaka, S., Kamijima, K., Higuchi, T., Yamada, M. and Momose, K., : Antidepressant research in the era of functional genomics. Farewell to the monoamine hypothesis. Biogenic Amines, in press, 2004
7. Watanabe, Y., Hashimoto, S., Kakita, A., Takahashi, H., Ko, J., Mizuno, M., Someya, T., Patterson, P. H. and Nawa, H. : Neonatal impact of leukemia inhibitory factor on neurobehavioral development in rats. *Neurosci Res* in press, 2004
 8. 糸川昌成, 吉川武男 : 臨床遺伝と病態理解 (医学のあゆみ) in press, 2004
 9. 中谷紀章, 吉川武男 : うつ病の病態動物モデル *CLINICAL NEUROSCIENCE*, 22, 170-172, 2004
 10. Toyooka, K., Watanabe, Y., Iritani, S., Shimizu, E., Iyo, M., Nakamura, R., Asama, K., Makifuchi, T., Kakita, A., Takahashi, H., Someya, T. and Nawa, H. : A decrease in interleukin-1 receptor antagonist expression in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Neurosci Res* 46: 299-307, 2003.
 11. Nishioka, G., Yamada, M., Kudo, K., Takahashi, K., Kiuchi, Y., Higuchi, T. Momose, K., Kamijima, K. and Yamada, M., : Induction of *kf-1* after repeated electro-convulsive treatment and chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex and hippocampus. *J Neural Transm* 110, 277-285, 2003
 12. 山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享 : 神経可塑的变化に注目した新規抗うつ薬ターゲット分子の探索と機能評価, *精神薬療研究年報*, 34, 45-51, 2003
 13. Yoshitsugu K, Meerabux JMA, Asai K, Yoshikawa T. Fine mapping of an isodicentric Y chromosomal breakpoint from a schizophrenic patient. *Am J Med Genet Neuropsychiatric Genet* 116B: 27-31, 2003
 14. 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 SD, Yoshikawa T. Distribution of haplotypes derived from three common variants of the *NR4A2* gene in Japanese schizophrenic patients. *Am J Med Genet Neuro-psychiatric Genet* 118B: 20-24, 2003
 15. Ebihara M, Ohba H, Hattori E, Yamada K, Yoshikawa T. Transcriptional activities of cholecysto-kinin promoter haplotypes and their relevance to panic disorder susceptibility. *Am J Med Genet Neuropsychiatric Genet* 118B: 32-35, 2003
 16. 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* 8: 467-469, 2003
 17. 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* 339: 5-8, 2003
 18. Arinami T, Ishiguro H, Minowa Y, Ohtsuki T, Tsujita T, Imamura A, Yoshikawa T, Toyota T, Yamada K, Shimizu H, K Yoshitsugu K, Shibata H, Fujii Y, Fukumaki Y, Tashiro N, Inada T, Iijima Y, Kitao Y, Furuno T, Someya T, T Muratake T, Kaneko N, Tsuji S, Mineta M, Takeichi M, Ujike H, Takehisa Y, Tanaka Y, Nakata K, Kitajima T, Nishiyama T, Yamanouchi Y, Iwata N, Ozaki N, Ohara K, Ohara K, Suzuki Y, Shibuya H, Ohmori O, Shinkai T, Hori H, Nakamura J, Kojima T, Takahashi S, Tanabe E, Yara K, Nanko S, Yoneda H, Kusumi I, Kameda K, Koyama T, Fukuzako H, Hashiguchi T, Tanabe K, Okazaki Y. Initial genome-wide scan for linkage with schizophrenia in the Japanese Schizophrenia Sib-pair Linkage Group (JSSLG) families. *Am J Med Genet Neuropsychiatric Genet* 120B: 22-28, 2003
 19. Itokawa M, Yamada K, Yoshitsugu K, Toyota T, Suga T, Ohba H, Watanabe A, Hattori E, Shimizu H, Kumakura T, Ebihara M, Meerabux JMA, 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* 13: 271-278, 2003
 20. Segurado R, Detera-Wadleigh SD, Levinson DF, Lewis CM, Gill M, Nurnberger JIJr., Craddock N, Raymond DePaulo J, Baron M,

- Gershon ES, Ekholm J, Cichon S, Tureck G, Claes S, Kelsoe JR, Schofield PR, Badenhop RF, Morissette J, Coon H, Blackwood D, Curtis D, McInnes LA, Foroud T, Edenberg HJ, Reich T, Rice JP, Goate A, McInnis MG, McMahon FJ, Badner JA, Goldin LR, Bennett P, Willour VL, Zand PP, Jianjun Liu J, Gilliam C, Juo S-H, Berrettini WH, Yoshikawa T, Peltonen L, Lonndnqvist J, Nothen MM, Schumacher J, Windemuth C, Rietschel M, Propping P, Maier W, Alda M, Grof P, Rouleau G.A, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, Mendlewicz J, Adolfsson R, Spence MA, Luebbert H, Adams LJ, Donald JA, Mitchell PB, Barden N, Shink E, Byerley W, Muir W, Visscher PM, Macgregor S, Gurling H, Kalsi G, McQuillan A, Escamilla MA, Reus VI, Leon P, Freimer NB, Ewald H, Kruse TA, Mors O, Radhakrishna U, Blouin J-L, Antonarakis SE, Akarsu N. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder part III: bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 73: 49-62, 2003
21. Itokawa M, Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Ishitsuka Y, Detera-Wadleigh SD, Yoshikawa T. Genetic analysis of a functional GRIN2A promoter (GT)_n repeat in bipolar disorder pedigrees in humans. *Neurosci Lett* 345: 53-56, 2003
 22. Yamada K, Watanabe A, Iwayama-Shigeno Y, Yoshikawa T. Evidence of association between gamma-aminobutyric acid type A receptor genes located on 5q34 and female patients with mood disorders. *Neurosci Lett* 349: 9-12, 2003
 23. Kikuchi M, Yamada K, Toyota T, Yoshikawa T. C18orf located on chromosome 18p11.2 may confer susceptibility to schizophrenia. *J Med Dent Sci* 50: 225-229, 2003
 24. Ebihara T, Ohba H, Kikuchi M, Yoshikawa T. Structural characterization and promoter analysis of human potassium channel Kv8.1 (*KCNV1*) gene. *Gene* 325: 89-96, 2004
 25. Arai M, Itokawa M, Yamada K, Toyota T, Arai M, Haga S, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T. Association of neural cell adhesion molecule 1 gene polymorphisms with bipolar affective disorder in Japanese. *Biol Psychiatry* (in press).
 26. Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Yoshida Y, Toyota T, Itokawa M, Hattori E, Shimizu H, Yoshikawa T. Family-based association study of schizophrenia with 444 markers and analysis of a new susceptibility locus mapped to 11q13.3. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* (in press).
 27. Toyota T, Yoshitsugu K, Ebihara M, Yamada K, Ohba H, Fukasawa M, Minabe Y, Nakamura K, Sekine Y, Takei N, Suzuki K, Itokawa M, Meerabux JMA, Iwayama-Shigeno Y, Tomaru Y, Shimizu H, Hattori E, Mori N, Yoshikawa T. Association between schizophrenia with ocular misalignment and polyalanine length variation in *PMX2B*. *Hum Mol Genet* (in press).
 28. Itokawa M, Kasuga T, Yoshikawa T, Matsushita M Identification of a male schizophrenic patient carrying a de novo balanced translocation, t(4;13) (p16.1; q21.31). *Psychiatry Clin Neurosci* (in press).
 29. Nakatani N, Aburatani H, Nishimura K, Semba J, Yoshikawa T. Comprehensive expression analysis of a rat depression model. *Pharmacogenomics J* (in press).
 30. 吉川武男、石塚祐一、中谷紀章、渡辺明子：気分障害（うつ病）の遺伝的基盤—動物モデルのQTL解析。 *Molecular Medicine*, Vol. 40, No. 3, 280-287、中山書店、東京、2003。
 31. 服部栄治、吉川武男：統合失調症の候補遺伝子および連鎖領域の多型解析。 *Schizophrenia Frontier*, Vol. 4, No. 1, 12-17、メディカルレビュー社、東京、2003。
 32. 中谷紀章、吉川武男：動物モデルを用いたうつ病感受性遺伝子群同定のアプローチ。 *日本神経精神薬理学雑誌*, Vol. 23, 161-169, 2003。
 33. 糸川昌成、吉川武男：遺伝子研究からみた統合失調症のグルタミン酸仮説。 *精神神経学雑誌*, Vol. 105, No. 11, 1349-1362, 2003。
 34. Aoyama, S., Shirakawa, O., Ono, H., Hashimoto, T., Kajimoto, Y., Maeda, K.: A novel polymorphism in the coding region of the DAP-1 gene (hDLG and PSD-95 associated protein-1 gene): analysis of association with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 57, 545-7, 2003
 35. Kajimoto, Y., Shirakawa, O., Lin, X-H., Hashimoto, T., Kitamura, N., Murakami, N., Takumi, T., Maeda, K. Synapse-associated protein 90/

postsynaptic-density-95-associated protein (SAPAP) is expressed differentially in the nucleus accumbens of phencyclidine-treated rats and is increased in the nucleus accumbens of patients with schizophrenia *Neuropsychopharmacology* 28, 1831-1839, 2003

36. 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、主田英之、上野易弘、前田潔：自殺と気質規定遺伝子との相関研究 *精神薬療年報* 35, 88-92, 2003
37. 白川 治：自殺の生物学的側面 *ストレス科学* 17, 238-244, 2003

2. 学会発表

1. Yamada, M. and Higuchi, T.: Pharmacogenomics, neuroplasticity and antidepressant research - beyond the monoamine hypothesis. 2nd Annual Meeting of the International Society of Pharmacogenomics (ISP) joint meeting with the Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics (PRACPG), 2003
2. Watanabe, Y., Tohmi, M., Someya, T. and Nawa, H.: Stress vulnerability of the rats receiving neonatal administration of interleukin-1. 9th International Congress on Schizophrenia Research, 2003
3. Takahashi, K., Yamada M. Yamada M, Kamijima K. Higuchi T, Momose K, Characterization of a novel anti-depressant related gene 123 in rat frontal cortex. *Neurosci Meeting*, 2003
4. 山田光彦, 樋口輝彦：抗うつ薬奏効機転の解明による新規治療ターゲットの探索, 日本精神神経学会, シンポジウム, ポストゲノム時代の精神疾患の遺伝子研究, 2003
5. 山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享：神経回路網の再編成に注目した新規抗うつ薬ターゲット分子の機能評価, 発表要旨集, 精神神経系薬物治療研究報告会, 2004
6. 山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 岩渕知子, 小林真也, 塚原奈津子, 中川知之, 粟津万里, 工藤謙太郎, 西岡玄太郎, 田中聡史, 樋口輝彦, 山田光彦, 百瀬和享：抗うつ薬の奏効機転に関与するラット脳内遺伝子の検討, 第14回高次脳機能障害シンポジウム, 2003
7. 角田美果, 高橋弘, 山田美佐, 岩渕知子, 塚原奈津子, 西岡玄太郎, 工藤謙太郎, 田中聡史, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享, 山田光彦：ラット前頭葉皮質における抗うつ薬と電気けいれん療法による ADRG#14 の発現変化, 第22回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2003
8. 塚原奈津子, 山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 岩渕知子, 工藤謙太郎, 西岡玄太郎, 田中聡史, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享, 山田光彦：抗うつ薬関連遺伝子 ADRG#102 の同定及び発現変化, 第22回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2003
9. 高橋弘, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享：ラット前頭葉皮質での新規抗うつ薬件連遺伝子#123 の同定, 学会抄録集, 第76回日本薬理学会, 2003
10. 平野美保, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享：リチウム及び高頻度経頭蓋的磁気刺激長期負荷後の cysteine string protein の発現変化, 学会抄録集, 第76回日本薬理学会, 2003
11. 角田美果, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享：ラット前頭葉皮質における抗うつ薬と電気けいれん療法による VAMP2/synaptobrevin2 の発現変化, 学会抄録集, 第76回日本薬理学会, 2003
12. 青山慎介, 白川 治, 小野久江, 橋本健志, 梶本康雄, 前田 潔：統合失調症における DAP-1 遺伝子の変異・多型解析 第25回日本生物学的精神医学会, 2003
13. 柳 雅也, 林 賢浩, 白川 治, 北村 登, 橋本健志, 梶本康雄, 村上直也, 前田 潔：統合失調症の上側頭回における shank protein の変化 第25回日本生物学的精神医学会, 2003
14. 梶本康雄, 白川 治, 橋本健志, 北村 登, 村上直也, 前田 潔：ファンサイクリジン投与ラットおよび統合失調症死後脳における SAPAP (SAP90/PSD-95-associated protein) の変化 第25回日本生物学的精神医学会, 2003
15. 山本康二, 白川 治, 小野久江, 主田英之, 上野易之, 前田 潔：自殺者におけるウロコルチン遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型 第25回日本生物学的精神医学会, 2003
16. 菱本明豊, 白川 治, 主田英之, 上野易之, 前田 潔：自殺とAEC遺伝子多型との相関研究 第25回日本生物学的精神医学会, 2003
17. 岡村健二, 白川 治, 小野久江, 主田英之, 上野易之, 前田 潔：自殺者におけるアポリポ蛋白E遺伝子多型 第25回日本生物学的精神医学会, 2003
18. 服部晴起, 小野久江, 白川 治, 主田英之,

上野易之、前田 潔：自殺とチロシン水酸化酵素遺伝子多型との相関研究 第25回日本生物学的精神医学会, 2003

潔：自殺者と ACE 遺伝子多型、GNB3 遺伝子多型の相関研究 第 22 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2003

19. 小野久江、白川 治、主田英之、上野易之、前田 潔：自殺者における Catechol-O-methyltransferase (COMT) 158Val/Met 遺伝子多型 第 25 回日本生物学的精神医学会, 2003
20. 服部晴起、青山慎介、小野久江、西口直希、白川 治、山本康二、岡村健二、橋本健志、主田英之、上野易之、前田 潔：自殺既遂者におけるカテコラミン関連遺伝子多型の相関研究 第22回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2003
21. 菱本明豊、白川 治、西口直希、柳 雅也、大下 隆、福武将映、主田英之、上野易之、前田

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

-ゲノム情報の利用による自殺防止を目指した向精神薬開発に関する研究-

「ゲノム情報を利用した新規抗うつ薬の開発研究」

分担研究者 樋口 輝彦 国立精神・神経センター国府台病院 院長

研究要旨：自殺の生物学的背景として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。具体的には、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初年度に約 204 個、平成 14 年度は海馬より約 503 個同定した。最終年度には、これらの 700 個を超える候補遺伝子および我々が特に注目する他の既知の候補遺伝子を搭載した cDNA microarray を作成した。さらに、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た結果、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具体的に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、本年度は ADRG#55 をモデルとして培養神経細胞を用いて研究を行った。ADRG#55 を含めて、本研究により得られた候補分子群は、真の治療ターゲット分子となり得る可能性を強く示すものであった。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

山田 美佐 昭和大学薬学部・研究助手

角田 美果 国立精神・神経センター

国府台病院、研究支援者

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

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

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 15 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用いて具体的に検討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 15 年度は、初年度、平成 14 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 サンプルをもとに 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) うつ病治療法負荷による ADRG 遺伝子の発現変化の検討

ADRG 遺伝子に特異的なプライマーを設計し、RT-PCR 法によりうつ病治療法を負荷したラットサンプルにおける候補遺伝子の発現を検討した。最終年度は、ADRG#55 をモデルとして研究を行った。PCR 産物を Cyber green を含む 1% アガロースゲルで電気泳動後 FM-BioII でスキャンし、発現量は、house keeping gene である GAPDH の発現量により補正した。また、タンパクレベルでの発現変化は、Western Blot 法により検討した。

(3) 培養神経細胞の形態変化を指標としたアッセイ系を用いた検討

神経回路網再編成といった神経可塑的変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。

本年度は、ADRG#55 をモデルとして研究を行った。PC12 細胞 (2×10^5 細胞/3.5 cm dish) を播種し 24 時間後に目的遺伝子(ADRG#55) /pIRES/Lipofect amine \pm 2000 Reagent を添

加し、3時間後、NGFを50 ng/mLとなるように加えた。48時間後、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488 nmと568 nmでの画像を取得した。GFP画像(488 nm)をvector導入の指標に、phalloidin画像(568 nm)を用いてADRG#55のトランスフェクションによる神経突起長及び数を計測した。

(4) ADRGタンパクの強制発現による細胞内分布の検討

本年度は、ADRG#55をモデルとして研究を行った。PC12細胞(2×10⁵細胞/3.5 cm dish)を播種し、24時間後、V5タグを付加した目的遺伝子(ADRG#55)をLipofect amine + 2000 Reagentを用いてトランスフェクションし、3時間後、Nerve Growth Factor (NGF)を50 ng/mLとなるように加えた。48時間後、抗V5抗体、FITCでラベルした2次抗体を処置し、多光子レーザー走査型顕微鏡RTS 2000で観察した。

C. 研究結果

(1) 候補遺伝子の探索

これまでに我々はDifferential display法を用いて、ラット前頭葉皮質及び視床下部より対照群に比べ2種の抗うつ薬(イミプラミン、サートラリン)3週間投与群において特異的に発現が増減する204のcDNA断片(ADRG#1-204)をESTs (expressed sequence tags)として同定してきた(Yamada et al., 1999, 2000)。本研究では海馬サンプルを用いて継続してDifferential display法を行

い、合計707種の抗うつ薬関連候補遺伝子(ADRG#1-707)を同定した。さらに、ADRG#1-707、ポジティブコントロール(house keeping genes)及びネガティブコントロールをスポットした改良型cDNA microarray (ADRG microarray)を作製した。ADRG microarray解析の結果、ラット前頭葉皮質において、抗うつ薬の長期投与後に多岐にわたる遺伝子群の発現の変化が示された。次に、このADRG microarrayを用いて物理的うつ病治療法である電気けいれん療法(ECT)、経頭蓋的磁気刺激負荷(rTMS)を模した処置を負荷したラットのサンプルを解析した。その結果、抗うつ薬、ECT、rTMSという全く異なる治療後に共通して発現変化する遺伝子を多数発見した。

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、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) 抗うつ薬長期投与によるADRG#55の発現変化についての検討

ADRG microarrayの解析の結果、抗うつ薬投与、rTMSにより発現増加が認められたADRG#55の発現変化を検討した。ADRG#55に特異的なプライマーを用いてmRNAレベル

での発現変化を RT-PCR 法により検討したところ、イミプラミン、サートラリンの長期投与により有意な発現の増加が認められた。一方、単回投与では発現増加が認められなかった。さらに、ADRG#55 タンパクの発現変化を Western blot 法により確認したところ、抗うつ薬長期投与でのみ発現の増加が認められ、単回投与では変化していなかった。

(3) 培養神経細胞の形態変化を指標としたアッセイ系を用いた検討

ADRG#55 の翻訳領域を組み込んだ pIRES ベクターを PC12 細胞にトランスフェクションし、神経突起に及ぼす影響を検討した。GFP 画像をベクター導入の指標に、phalloidin 画像により突起の観察を行った結果、対照群に比べ ADRG#55 トランスフェクション群では神経突起長及び数が減少していることが確認された。さらにこれを数値化するため、一つの細胞の突起長の総和、突起の数をパラメーターとして解析を行った。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 37.9 μm 、トランスフェクタント群では 27.1 μm であり、神経突起数は、対照群で 2.5、トランスフェクタント群では 1.8 であり有意に減少していた。

(4) ADRG タンパクの強制発現による細胞内分布の検討

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、ADRG#55 の翻訳領域を組み込んだ発現ベクターを PC12 細胞にトランスフェクションし、細胞内分布について検討した。ベクターのみをトランス

フェクションした対照群では、細胞質内での均一な分布が観察された。これに対して、ADRG#55 トランスフェクション群では、細胞膜及び神経突起での発現が強く観察された。

D. 考察

現在、新規抗うつ薬の開発は神経伝達物質の薬理学に基づいて行われており、選択的セロトニン再取り込み阻害薬などの開発が進み一定の成果を上げている。しかしながら、これらの抗うつ薬も、シナプス間隙におけるモノアミン濃度を増加させることにより抗うつ作用を発揮するという「モノアミン仮説」に基づく抗うつ薬の限界を超えるものではない。実際、こうした急性薬理作用が脳内において直ちに起こるのに対して、臨床場面では治療効果の発現に数週間かかることが経験的にわかっており、何らかの遺伝子発現機構を介する神経可塑的变化が大きく関与していると考えられる。そのため、うつ病治療機転の基盤となる神経化学的メカニズムを既存の仮説にとらわれることなく解明することは急務の課題である。これまでに、我々は Differential display 法を用いて、対照群に比べ 2 種の抗うつ薬 (イミプラミン、サートラリン) 3 週間投与において特異的に発現が増減する 204 の cDNA 断片を同定し (ADRG#1-204)、塩基配列を決定してきた (Yamada et al., 1999, 2000)。本研究では海馬サンプルを用いて継続して Differential Display 法を行い、合計 707 種の抗うつ薬関連候補遺伝子 (ADRG#1-707) を同定した。さらに、ADRG#1-707、ポジティ

ブコントロール (house keeping genes) 及びネガティブコントロールをスポットした改良型 cDNA microarray (ADRG microarray) を作製した。次に、この ADRG microarray を用いて物理的うつ病治療法である ECT および rTMS を模した処置を負荷したラットサンプルを解析した (Yamada et al., 2002a, 2002b, 2004a)。その結果、抗うつ薬、ECT、rTMS という全く異なるうつ病治療法負荷後に共通して発現が変化する遺伝子を多数発見した。これらの遺伝子はうつ病の治癒機転に密接に関わるものと考えられた。これらの候補遺伝子のうち、既知遺伝子と相同性が高いものについて機能別クラスタリングを行った結果、ADRG 遺伝子の一部が、神経突起・軸索の伸長・退縮調節に関与する遺伝子群に属することが明らかとなり、うつ病の治癒過程に密接に関わる可能性が考えられた (Yamada et al., 2002a, 2004a, 2004b)。そこで本研究では、Differential display 法、ADRG microarray から得られた候補遺伝子の中から、機能の不明な未知遺伝子についてもこうした機能を有すると考え、細胞内分布及び神経突起の伸長・退縮の計測を行った。最初に、ADRG#55 の翻訳領域を組み込んだ発現ベクターをトランスフェクションし、細胞内分布について検討した。ベクターのみをトランスフェクションした対照群では、細胞質内での均一な分布が観察された。これに対して、ADRG#55 トランスフェクション群では、細胞膜及び神経突起での発現が強く観察された。神経突起の伸長・退縮に関与するタンパクの場合、神経突起や成長円錐、細胞膜に

局在することが多い。そこで次に、ADRG#55 の強制発現による神経突起長及び神経突起数の計測を行った。GFP 画像をベクター導入の指標に、phalloidin 画像により突起長の測定を行った結果、対照群に比べ ADRG#55 トランスフェクション群では神経突起長及び数が減少していることが確認された。

Differential display 法、ADRG microarray 法により得られた機能既知の候補遺伝子のみならず、未知遺伝子についても神経突起の伸長・退縮に関与するものが得られたことより、うつ病の治癒機転に神経回路網の再編成が重要であると考えられた。今後は、他の ADRG 遺伝子群について本研究と同様のアッセイ系を用いて、うつ病治癒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癒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る。我々の一連の研究は、偶然の発見に頼ることのない新規中枢神経系治療薬の戦略的、合理的創薬へとつながると期待される。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究成果発表

1. 論文発表

1. Kudo, K., Yamada, M., Takahashi, K., Nishioka, G., Tanaka, S., Hashiguchi, T., Fukuzako, H., Takigawa, M., Higuchi, T., Momose, K., Kamijima, K. and Yamada, M.: Differential expression of kf-1 after repetitive transcranial magnetic stimulation in rat frontal cortex and hippocampus. (manuscript submitted for publication)
2. Yamada, M., Iwabuchi, T., Takahashi, K., Kurahashi, K., Ohata, H., Momose, K., Kamijima, K., Higuchi, T. and Yamada, M. : Identification and characterization of frizzled-3 protein: decrease in rat frontal cortex after antidepressant or electroconvulsive treatment. (manuscript submitted for publication)
3. Takahashi, K., Yamada, M., Ohata, H., Higuchi, T., Yamada, M. and Momose, K.: Differential expression of NDRG2-S and NDRG2-L after anti-depressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. (manuscript submitted for publication)
4. 山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享: 神経回路網の再編成に注目した新規抗うつ薬ターゲット分子の機能評価, 精神薬療研究年報, in press, 2004
5. Yamada M, Yamada M, Higuchi T: Antidepressant-elicited changes in gene expression -Remodeling of neuronal circuits as a new hypothesis for drug efficacy. Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry, in press, 2004
6. Yamada, M., Takahashi, K., Tsunoda, M., Iwabuchi, T., Kobayashi, S., Tsukahara, N., Nakagawa, T., Awatsu, M., Yamazaki, S., Hirano, M., Ohata,

H., Nishioka, G., Kudo, K., Tanaka, S., Kamijima, K., Higuchi, T., Yamada, M. and Momose, K., : Antidepressant research in the era of functional genomics. Farewell to the monoamine hypothesis. Biogenic Amines, in press, 2004

7. Nishioka, G., Yamada, M., Kudo, K., Takahashi, K., Kiuchi, Y., 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. J Neural Transm 110, 277-285, 2003
8. 山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享: 神経可塑的变化に注目した新規抗うつ薬ターゲット分子の探索と機能評価, 精神薬療研究年報, 34, 45-51, 2003

2. 学会発表

1. Yamada, M. and Higuchi, T.: Pharmacogenomics, neuroplasticity and antidepressant research - beyond the monoamine hypothesis. 2nd Annual Meeting of the International Society of Pharmacogenomics joint meeting with the Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics, 2003
2. Takahashi, K., Yamada M, Yamada M, Kamijima K, Higuchi T, Momose K, Characterization of a novel anti-depressant related gene 123 in rat frontal cortex. Neurosci Meeting, 2003
3. 山田光彦: 神経可塑性変化に注目した抗うつ薬ターゲット分子の探索と機能評価. 昭和大学医学部同窓会学術講演会, 2004
4. 山田光彦: 治癒機転の解明による抗うつ薬の新規ターゲット分子探索戦略, 創薬薬理フォーラム, 2003
5. 山田光彦: 抗うつ薬奏効機転の解明による新規治療ターゲットの探索, 日本精神神経学会, シンポジウム, ポストゲノム時代の精神疾患の遺伝子研究, 2003
6. 山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享: 神経回路網の再編成に注目した新

- 規抗うつ薬ターゲット分子の機能評価、
発表要旨集、精神神経系薬物治療研究
報告会、2004
7. 山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 岩渕知子, 小林真也, 塚原奈津子, 中川知之, 栗津万里, 工藤謙太郎, 西岡玄太郎, 田中聡史, 樋口輝彦, 山田光彦, 百瀬和享: 抗うつ薬の奏効機転に関するラット脳内遺伝子の検討, 第14回高次脳機能障害シンポジウム, 2003
 8. 角田美果, 高橋弘, 山田美佐, 岩渕知子, 塚原奈津子, 西岡玄太郎, 工藤謙太郎, 田中聡史, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享, 山田光彦: ラット前頭葉皮質における抗うつ薬と電気けいれん療法によるADRG#14の発現変化, 第22回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2003
 9. 塚原奈津子, 山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 岩渕知子, 工藤謙太郎, 西岡玄太郎, 田中聡史, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享, 山田光彦: 抗うつ薬関連遺伝子ADRG#102の同定及び発現変化, 第22回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2003
 10. 高橋弘, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享: ラット前頭葉皮質での新規抗うつ薬関連遺伝子#123の同定, 学会抄録集, 第76回日本薬理学会, 2003
 11. 平野美保, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享: リチウム及び高頻度経頭蓋的磁気刺激長期負荷後のcysteine string proteinの発現変化, 学会抄録集, 第76回日本薬理学会, 2003
 12. 角田美果, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享: ラット前頭葉皮質における抗うつ薬と電気けいれん療法によるVAMP2/synaptobrevin2の発現変化, 学会抄録集, 第76回日本薬理学会, 2003

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