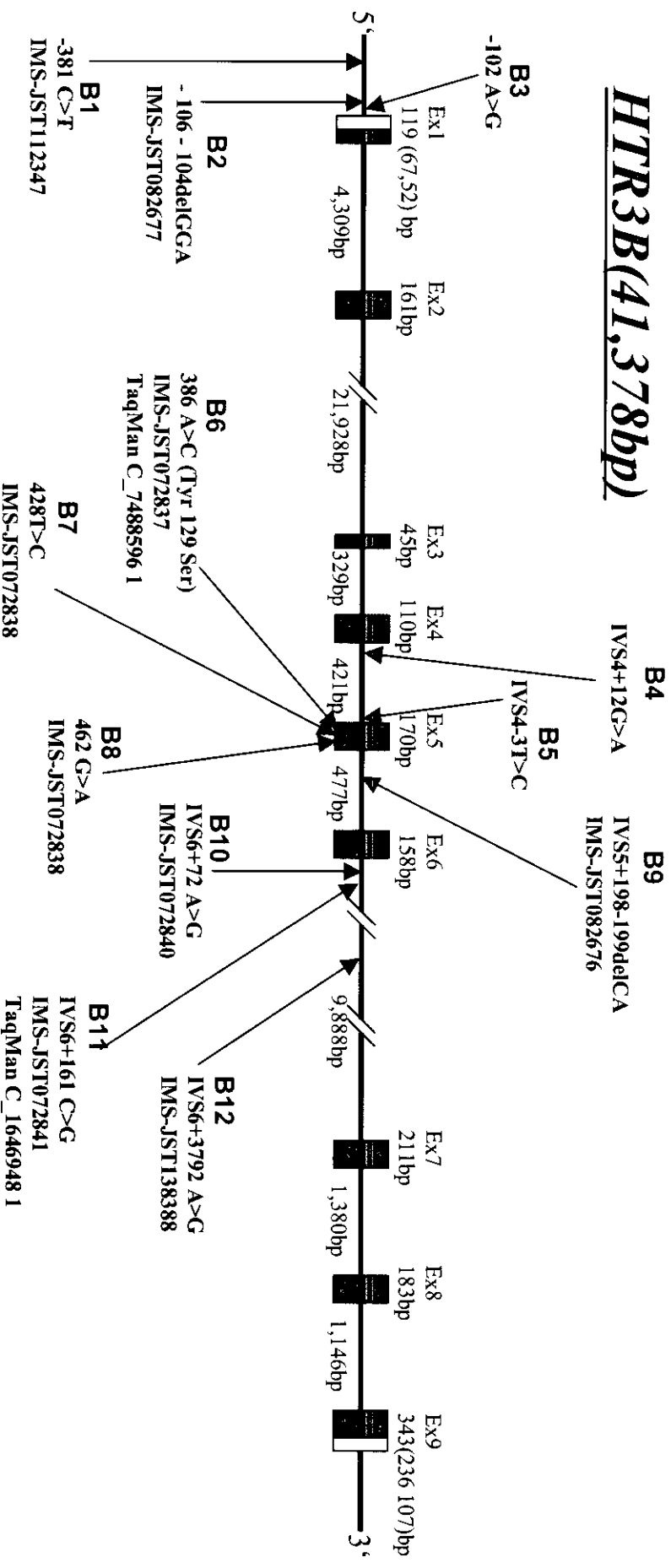


参考資料5-4

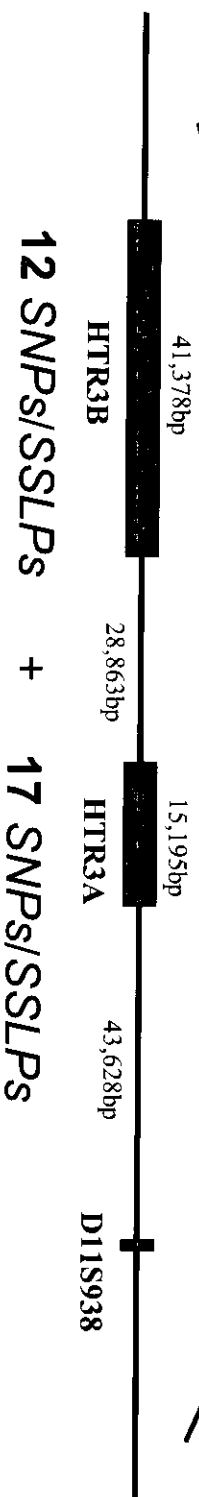
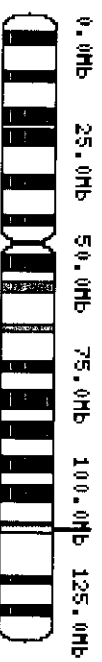
HTR3B(41,378bp)



12 polymorphisms → All polymorphisms genotyping

参考資料5-5: 解析したSNP数

11q23.1



$$12 \text{ SNPs/SSLPs} + 17 \text{ SNPs/SSLPs} = 29 \text{ SNPs/SSLPs}$$

SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms

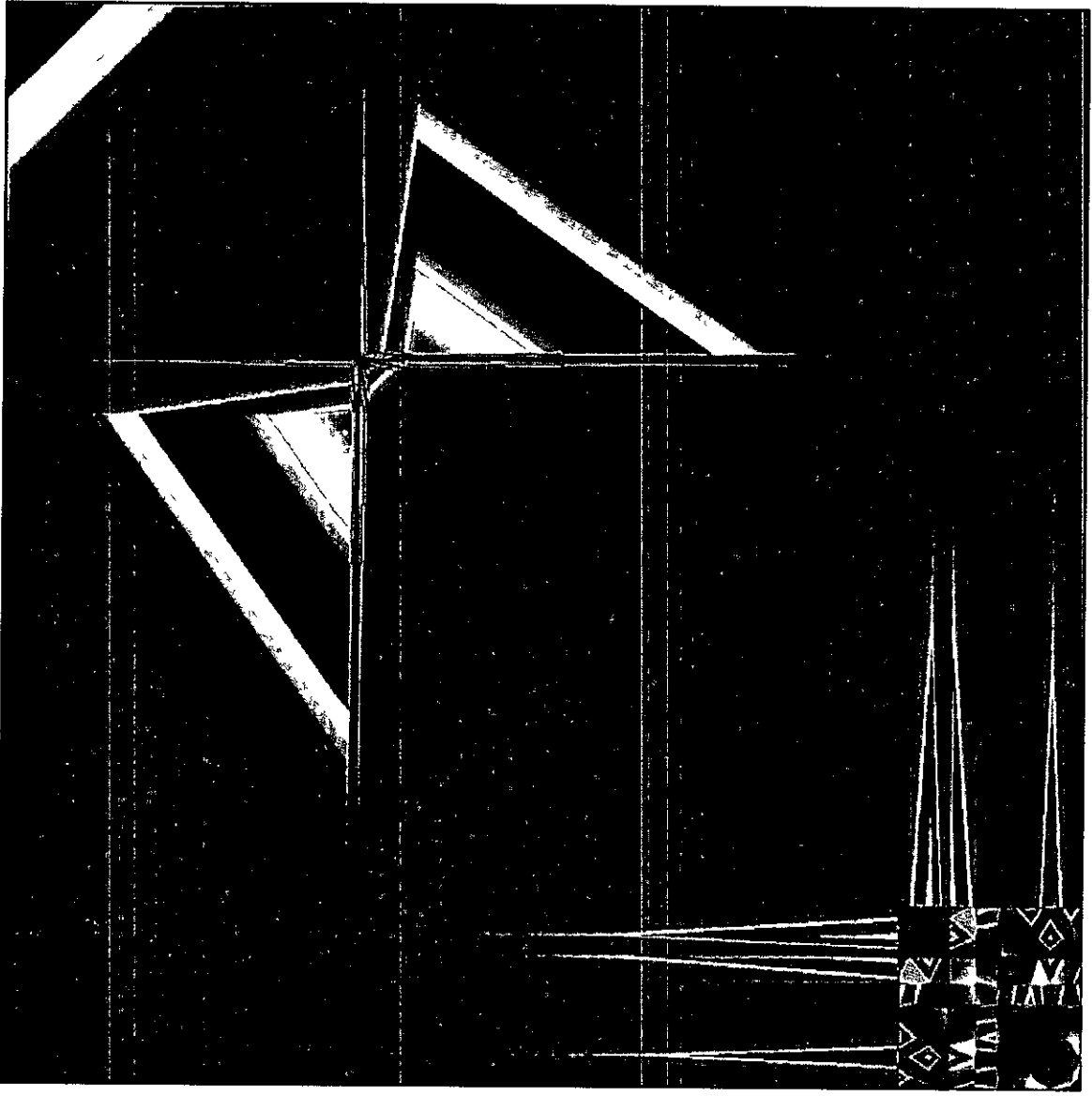
SSLPs, Simple Sequence Length Polymorphisms

341 341.5
 341.2
 341.1
 340.8 341.0
 340.7 340.9
 340.6
 340.5
 340.4
 340.3 340.2

340.8 340.9 341.0
 340.9 340.8 340.7 340.6

341.1

340.7 340.8 340.9



参考資料5-6
 5HTR3A&B領域
 のLD構造



100
 100
 100

参考資料 5 - 7 単極性障害と5HTR3A & 5HTR3B

UP vsCT (Male + Female)

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16	
3SNPs		0 61001					0 19203						0 25689		0 56100					0 46194		0 23689		
			0 04033						0 18520						0 42167								0 41964	
				0 20490						0 10705		0 12920				0 44033								
				0 41144						0 40617		0 27754				0 91590								
							0 37857						0 40605							0 77980				

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16	
2SNPs		0 99767				0 26576					0 27262				0 21665							0 39338		
			0 40230				0 19995					0 43564				0 83544							0 36186	
				0 16718					0 95889				0 25689				0 87436							
				0 21810						0 19270				0 27809						0 87529				
					0 86453					0 03547					0 51613							0 41865		

UP vsCT (Male)

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16	
3SNPs		0 11212					0 27315						0 26168		0 61887							0 27575		
			0 05681						0 27315						0 55266								0 37383	
				0 70981						0 03485		0 18461				0 33942								0 30974
				0 22993						0 22800		0 17403					0 86169							
							0 22800						0 28739							0 89249				

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16	
2SNPs		0 31914				0 19717					0 15388				0 26986							0 23906		
			0 16182				0 27315				0 21195					0 72065							0 35520	
				0 84319				0 09434				0 26168					0 76254							
				0 31783					0 27315				0 26475							0 82563				
					0 09394					0 09024					0 39827							0 19832		

参考資料 5 - 8 単極性障害とSHTR3A & SHTR3B

UP vsCT (Female)

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16	
	0.54133						0.01286		0.00867					0.77968						0.90616				
		0.14420							0.08142					0.64489							0.67179			
3SNPs				0.04693						0.08142					0.31775							0.93474		
					0.01975						0.17682					0.86889								
						0.01755						0.59102					0.90539							
							0.01514						0.85640						0.42297					

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16	
	0.42291					0.02168					0.86528					0.66534					0.94141			
		1.00000					0.01339					0.92436					0.81659						0.83201	
2SNPs				0.22023				0.15126						0.77968										
					0.02508				0.01126					0.77968								0.83803		
						0.03726				0.23831					0.46025							0.87828		

參考資料 5 - 9 双極性障害と5HTR3A & 5HTR3B

BP vsCT (Male + Female)

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16
		0 10920					0 42692						0 79020							0 30085			
			0 28263					0 47601							0 58791						0 86239		
3SNPs				0 04526					0 09249						0 32121								0 70158
	BP vsCT				0 56625									0 53174									
						0 55695																	
							0 53292						0 91654										

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16
		0 13155					0 51517				0 47347												
			0 08096					0 34621				0 59774											
2SNPs				0 37607					0 25862				0 68042										
					0 37909					0 56751				0 67249						0 15413			
						0 46523					0 08973					0 79893							

BP vsCT (Male)

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16
		0 10101						0 29301						0 70090									
			0 17004						0 29301						0 58404								
3SNPs				0 07403						0 32117													
					0 43295						0 11185												
						0 42148						0 25926											
							0 43537						0 61994										

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16
		0 09147					0 32260				0 22514												
			0 08769					0 29301				0 27735											
2SNPs				0 14222					0 26864														
					0 31352					0 28102				0 73482									
						0 35751					0 20059												

参考資料 5 - 1 0 双極性障害と5HTTR3A & 5HTTR3B

BP vsCT (Female)

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16	
	0.40929						0.43253						0.69870						0.79770					
		0.53107						0.43579						0.88383						0.97961				
3SNPs			0.43546						0.35618		0.80227					0.68738		0.05798				0.91332		
					0.69908							0.61787						0.04468						
						0.67831							0.61787											
							0.67431						0.72759						0.63308					

	3B01	3B02	3B03	3B04	3B06	3B08	3B09	3B10	3B11	3B12	3A01	3A02	3A03	3A04	3A05	3A06	3A07	3A08	3A10	3A11	3A12	3A13	3A16	
	0.85898					0.52254					0.71704					0.57065						0.90789		
		0.24541					0.67937					0.81564					0.02836						0.89419	
2SNPs			0.95109					0.29264					0.67124					0.59031						
				0.78797					0.87513				0.62410						0.63308					
					0.52589					0.40905					0.96849						0.95716			

気分障害の高精度候補領域解析および精神疾患ゲノムバンクの構築

〔分担研究課題〕 家系の収集

分担研究者 岡崎 祐士（三重大学医学部精神神経科学・教授）

研究要旨

中高年の自殺の主要な原因であるうつ病を含む気分障害は、数%という生涯発症頻度が高く、数ヶ月（時に数年）の就業・就学を不可能にするエピソードが反復しやすいため、患者個人や家族だけでなく社会全体にとっても大きな損失と負担を強いるものである。したがって、気分障害の原因究明、それに基づく薬剤の開発、合理的な治療法や予防法確立への努力は、厚生労働行政の重要な課題と言える。

複雑疾患である気分障害の成因として感受性遺伝子群の寄与が明らかとなっているか、本研究はこれまで結論が不明確になりかちてあった気分障害の遺伝子探索研究を、気分障害遺伝研究で実績を持つ施設の共同により、水準の高いサンプリンクと解析を目指している。具体的には、（１）対象の表現型を絞り遺伝的異質性を改善する、（２）サンプル数を大規模なものにする、（３）連鎖不平衡高密度タイピング、ハプロタイプ解析など精緻な遺伝解析の併用、（４）証拠が得られた遺伝子多型の機能的裏付け解析、の４項目を研究の基軸に据えている。

分担研究者は、本研究の中核的研究組織である全国共同研究組織 JGIMD の組織化と家系集積を分担している。本年度はこの JGIMD の組織強化を主任研究者に協力する形で取り組んだ。また、本年度は分担研究としての家系集積を大規模にすすめるために、三重県内の精神科医療施設の大規模な協力を得るために、気分安定薬の共同治験研究体制を主要５病院で立ち上げ、双極性障害の登録を開始した。この取り組みと併せて双極性障害のサンプリンクを進める計画である。

A 本研究の目的

本研究は、複雑疾患である気分障害の発症に関わる感受性遺伝子群を高密度多型マーカー（SNPs など）による連鎖不平衡解析を機軸に候補遺伝子 候補変異をマノピクし、その変異の機能解析によって、気分障害の分子機構を解明しようとする研究である。

分担研究者は この研究において、気分障害の日本人患者を全国的に集積し、感受性遺伝子マノピクを目指す気分障害遺伝子全国共同研究組織 JGIMD の組織化と家

系集積を分担している。

この課題の遂行の前提条件となる機能的な精神疾患の連鎖及び相関研究による感受性遺伝子解明のための研究計画については、平成 14 年 5 月に所属する三重大学医学部研究倫理委員会において、研究計画の承認を受けている。主任研究者の施設においてもそれに先行して所属施設における承認が得られており、これらを参考にした JGIMD 参加施設における倫理委員会での研究計画の承認が進んでいる。現在、ほぼすへの施設が研究計画を倫理委員会に承認を受

けている。JGIMD は約 40 施設が参加しており、この組織が十分に機能するならば、大きな標本の集積が可能になる。本年度の第一の課題は、JGIMD の機能を活性化する課題であった。第二に独自の分担課題として、気分障害、とくに双極性障害のサンプリングを行うことであった。

B 方法

(1) 全国的なサンプリング

JGIMD は当初相極性障害の罹患同胞対家系集積を主に目指したか、罹患同胞対の発見数か少なくサンプリング家系か少ないこと、膨大な数の SNPs 多型の集積や Chp の開発などの技術的進歩によって、ケースコントロールのケノムワイトな連鎖不平衡解析によって候補遺伝子や多型のマッピングが可能になった。そのような状況に対応して、JGIMD の重点も、大きなケース（双極性障害）コントロールのサンプル収集に移行した。また、トリオサンプルによる伝達不平衡解析も確認のために併用することか望ましいので 両親と患者である子どものトリオ家系サンプルも集積することにした。倫理委員会承認された文書による説明と同意をによって、自発的に協力を得た対象者の末梢血を採血し、血液の一部は匿名化 コート化して、主任研究者に送付し、株化（不死化）を行う。DNA 抽出は各施設で行い、いずれも研究期間は、サンプル収集施設では連結可能匿名化して保存する。各研究施設から主任研究者の施設を含む多施設に出る場合には、検体授受の覚書を交わし、管理と責任を明確にして、行う。

(2) 三重県におけるサンプル収集

JGIMD 参加施設である三重大学医学部附

属病院ではサンプリング可能であるか、倫理委員会かない外部の施設におけるサンプル収集については、研究計画書に記載したように、「つまり、「施設管理責任者（院長等）に対して研究者は研究計画を文書で説明し理解を得る。施設管理責任者（院長等）からの説明に賛同する主治医からの説明により研究者と会うことを承諾した対象者（患者 家族）に研究者か会い、インフォームトコンセントの手続きを行う。」というルールに従って行うものである。今年度は大きなサンプルにつなかるように、三重県における主要な病院 5 施設で双極性障害の登録も 1 つの目的とすべく、気分障害薬の治験を立ち上げている。IRB の承認を得次第、サンプリングを開始する予定である。

C 結果

1 全国サンプリング

JGIMD は参加施設か 40 施設に及んでいるかすへての施設か活発にサンプリングを行っているわけではない。実績かある施設によって COSMO という内部組織か組織され、JGIMD 全体の牽引車的役割を担っている。しかし、JGIMD はわか国唯一の気分障害遺伝子共同研究組織であり、国際的にも数少ない組織である。年間 2 回の会議を設け、また随時の連絡網を確立してサンプリングを促進している。本研究課題の採用によって活性化しつつあり、サンプル数か 16 年度には急速に増大することか見込まれる。2 三重県におけるサンプリング
15 年度には、前記のようにサンプリングの母体となる気分障害薬の薬効治験を軸とする双極性障害登録体制を立ち上げた。これは県内の国立療養所榊原病院 県立こ

ころの医療センター、中核的民間病院2つ及び三重大学医学部附属病院の5施設である。

気分障害への反応性の評価が加わった資料は、表現型定義上も重要であり、北欧や欧米の一部では気分障害サンプリンクの有力な方法となっている。現在、この気分障害薬の治験のIRBへの申請を行っており、承認され次第、登録を開始する。

E 結論

現在、複雑疾患である主要な精神疾患の遺伝子探索研究は、1施設で実施できる時代は終了し、多施設による共同研究の時代を迎えている。気分障害についてもそれに対応して形成されたJGIMDもあり、分担研究者は主任研究者とともにその運営に当たっていること、15年度はその活性化を図った。また、三重県における双極性障害からの末梢血サンプリンクを大規模に進めることも企図した、気分障害薬の臨床治験体制を確立した。気分障害への反応性の評価は、その表現型定義にも有用な情報であり、サンプルの質を高めることが期待される。

F 健康危険情報 なし

G 研究発表

直接の結果はない。

H 知的財産権の出願・登録状況

なし。

I 参考論文

Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M, Bundo M, Kasahara T, Kusumi I, Tsujita T, Okazaki Y,

Nanko S, Kunugi H, Sasaki T & Kato T Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder | Nature Genet 35 171-175, 2003

岡崎祐士、三好 修、佐々木司 精神病(統合失調症、双極性気分障害) 図説 分子病態学(一瀬白帝 鈴木宏治編) 中外医学社、pp372-377、2003

厚生労働省科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

気分障害の高精度候補領域解析および精神疾患ケノムバンクの構築

分担研究者 尾崎紀夫 名古屋大学大学院医学系研究科精神医学分野

研究要旨 5-HT_{2c} 受容体遺伝子のアミノ酸置換(Cys23Ser)を用いた様々な関連研究がなされ、クロサピン反応性との関連や双極性気分障害との関連が報告された。しかし、本多型が遺伝子産物の機能に与える影響を検討されていない。そこで、我々は Cys23Ser を種々の細胞に発現させ、受容体結合能、G 蛋白、細胞内 Ca²⁺応答に与える影響を検討し、その上で、日本人サンプルで気分障害および統合失調症との関連を検討した。1 Cys23Ser が 5-HT_{2c} 受容体機能である結合能、G 蛋白活性、細胞内 Ca²⁺濃度反応に与える影響を検討した。・結合能 Ser23 型受容体は、Cys23 型と比較して、アコニストへの親和性が有意に低下していた。・G 蛋白活性 Cys23 型と比較して、Ser23 型受容体は constitutive activity が有意に高かった。・細胞内 Ca²⁺濃度反応 5-HT 刺激による Ca²⁺ピークの最大値は Cys23 型と Ser23 型の間で有意な差は認められなかったか、同じ反応を得るためには、Ser23 型の方が高濃度の 5-HT が必要だった。2 気分障害および統合失調症患者、および健常者の DNA を鋳型として、PCR-RFLP 法を用いて Cys23Ser の遺伝子型を判定した。・Cys23Ser と気分障害および統合失調症との関連は示されなかった。Cys23Ser 多型は受容体の活性化を増加させ、その結果脱感作が起りやすくなっていると考えられる。日本人サンプルの結果では allele frequency が低く、多くのサンプル数が必要と考えられる

A 研究目的

セロトニン(5-HT)は気分障害、統合失調症双方の病態生理と関係しているのではないかと考えられてきた代表的生体物質である。この 5-HT の受容体の中でも、5-HT_{2c} 受容体は視床下部、黒質、脈絡叢といった中枢神経系にのみ発現し、情動、認知、運動、内分泌、体温といった様々な生理機能に関与していることが明らかにされている。さらに、以下のような理由から、本受容体が気分障害、統合失調症を初めとする様々な精神疾患の病態生理に関与している

のではないかと推測されている。①5-HT_{2c} 受容体の非選択的アコニストである m-chlorophenylpiperazine (m-CPP) 投与後に引き起こされる内分泌、体温、行動上の反応か、気分障害、統合失調症を含む種々の精神疾患患者において健常者と異なる。②クロサピンなどの非定型抗精神病薬が本受容体に高い親和性を持っている。

したがって 5-HT_{2c} 受容体遺伝子は精神疾患の関連研究を行う際の有力な候補遺伝子である。そこで、我々は人 5-HT_{2c} 受容体遺伝子領域における多型性の有無を検索

し、アミノ酸置換(Cys23Ser)を発見し報告した。その後、Cys23Ser を用いた様々な関連研究がなされ、クロサピン反応性、気分障害、抗精神病薬引き起こされる遅発性シスキネシア、さらに人格傾向である reward dependence との関連が報告されており、我々もヒト髄液中 MHPG 濃度との関連を報告した。しかし、この Cys23Ser 多型はアミノ酸置換を引き起こすとは言え、真の意味で表現型を決定している因子のひとつであるのか、他のアレルが重要であり Cys23Ser はそのアレルと連鎖不平衡にあるに過ぎないのか、ということを確認するには、本多型かその遺伝子産物である 5-HT_{2c} 受容体の機能に与える影響を検討し、遺伝子型と表現型の関連を生理学的に確認する作業が必要であるか、今のところ詳細な検討はなされていない。また、本多型を用いた関連研究の多くは Caucasian によるもので、日本人でなされたものは我々の知る限りない。

そこで、本研究においては、Cys23Ser を種々の細胞に発現させ、受容体結合能、G 蛋白、細胞内 Ca²⁺応答に与える影響を検討し、確かに Cys23Ser が 5-HT_{2c} 受容体機能に変化をもたらすことを明らかにした。その上で、日本人の気分障害および統合失調症との関連を検討した。

B 研究方法

① Cys23Ser と 5-HT_{2c} 受容体機能

5-HT_{2c} 受容体のシグナル伝達系のうち、5-HT_{2c} 受容体結合能、G 蛋白活性、PIP₂ を介しておこる細胞内 Ca²⁺濃度反応の三点を指標として用いた。

(1) 5-HT_{2c} 受容体結合能 プラスミドで

ある pcDNA3 に Cys23 型または Ser23 型 5-HT_{2c} 受容体遺伝子を組み込み、lipofectamine によって各々の多型を COS-7 細胞上に発現させた。その後 48-60hr 培養を行った後に、培養細胞を採取し、[125I]DOI を用いた結合実験を行った。その際、通常の Scatchard analysis と、5-HT_{2c} 受容体の agonist である m-CPP を 1x10⁻¹⁰ から 1x10⁻⁵M 用いて competition analysis を行った。

(2) G 蛋白活性 BacPAK9 プラスミドに組み込んだ Cys23 型または Ser23 型 5-HT_{2c} 受容体遺伝子を Sf9 細胞に baculovirus を用いて発現させた。その後、G 蛋白サブユニットとの *in situ* reconstitution を行った。G 蛋白の活性化の指標として、受容体刺激かとれただけ 35S-GTP γ S (GTPase によって水解されないのて長時間保持される)の蓄積を来すかを測定することとした。基礎値に比して、5-HT によって刺激して G 蛋白の活性化した場合と、逆に inverse agonist である mianserin によって G 蛋白の活性化かとれただけ抑制されるかを検討した。

(3) 細胞内 Ca²⁺濃度反応 5-HT_{2c} 受容体結合能に使用したのと同じ方法で Cys23 型または Ser23 型 5-HT_{2c} 受容体遺伝子を発現させた COS-7 細胞を用意した。各々の細胞内 Ca²⁺濃度を Fura-2 により Ca²⁺イメージング装置を用いて測定し、1nM から 10 μ M までの 5-HT 刺激によって細胞内 Ca²⁺濃度上昇を測定した。

② Cys23Ser と気分障害および統合失調症との関連

双極性ならびに単極性気分障害患者、統合失調症患者および健常者に本研究の主旨を説明し、文書で同意を得た後、末梢血を採取し、DNA を抽出、PCR-RFLP 法を用いて

Cys23Ser の遺伝子型を判定した。なお、本研究は三省庁合同によって発表されたケノム研究の倫理指針によって発足した名古屋大学医学部倫理委員会、藤田保健衛生大学倫理審査委員会にて審査かなされ承認を得ている。

C 研究結果

①Cys23Ser と 5-HT_{2c} 受容体機能

(1) 5-HT_{2c} 受容体結合能

- ・通常の Scatchard analysis による K_d, B_{max} は特に差が見られなかった。
- ・m-CPP を用いて行った competition analysis によると、Ser23 型受容体は Cys23 型と比較して、m-CPP に対する親和性が低く、K_{1H} を求めたところ、Ser23 型受容体は有意に高い値 (p<0.05) を示した。

(2) G 蛋白活性 Sf9 細胞を用いた *in situ* reconstitution assay では、G 蛋白活性は基礎値においては、Cys23 型と Ser23 型との間に差は認められなかった。しかし、5-HT で刺激した際の活性化の上昇は、Cys23 型と比較して Ser23 型受容体はより低く、一方、mianserin による活性化の低下は Ser23 型受容体においてより強く生じた。

(3) 細胞内 Ca²⁺ 濃度反応 5-HT 刺激による Ca²⁺ ピークの最大値は Cys23 型と Ser23 型の間で有意な差は認められなかったか、同じ反応を得るためには、Ser23 型の方が高濃度の 5-HT が必要だった。

②Cys23Ser と精神分裂病および気分障害との関連

Caucasian では Ser23 の allele

frequency は一般人口およびコントロールで 7-15% であるか、日本人コントロールでは 1% 以下と非常に低い値を示した。コントロールと統合失調症、双極性気分障害、単極性気分障害との allele frequency の差は統計的有意差には至らなかった。

D 考察と結論

5-HT_{2c} 受容体に我々が見出した Cys23Ser 多型は、5-HT_{2c} 受容体が精神疾患の病態生理仮説や向精神薬の薬理的基盤との関係性が深いという点、さらにアミノ酸置換を来たし受容体機能に影響を与える遺伝子多型である、という理由で着目されてきた。しかしながら、本多型が実際に受容体機能に影響を与えることを確認したのは、本研究が初めてである。本研究では 5-HT_{2c} 受容体機能を結合能、G-蛋白活性、PIP₂ を介しておこる細胞内 Ca²⁺ 濃度反応の三点を指標として総合的に検討することとした。

その結果、m-CPP を用いた competition analysis の結果によると Ser 体は wild type である Cys 体に比べて、m-CPP に対する親和性を検討すると、高親和性部位の指標である K_{1H} は、有意差を持って減弱していた。この高親和性部位は 5-HT_{2c} 受容体においては G 蛋白結合部位であり、本受容体の効力 (efficacy) に直接関与していると考えられている。そこで、この現象を明確化するため G 蛋白活性の検討を行った。

その結果、Ser 体は Cys 体に比して G 蛋白活性は、inverse agonist である mianserin によってより不活性化されるか、agonist による活性化はあまり受けない。これは、非刺激時に Ser 体が活性化型 (active conformation) を取っているものが多いと

いうことを示唆している。他の受容体遺伝子上のアミノ酸置換か活性型への変換を促すことか報告されており、活性型変換への機構は解き明かされていないか、同様の事象か起こっている可能性が高い。一方、この活性型への変換は脱感作機構を誘発することも明らかにされている。さらに、5-HT_{2c}受容体遺伝子を導入した Cos7 細胞は、血清を含む培養液中で培養されるか、この血清には 5-HT か含まれており、培養中に脱感作を受ける可能性が高い。この脱感作か Ser 体では起こりやすくその結果、K_{1H} の減弱に繋がったと考えられる。さらにこの脱感作の結果は、受容体のより下流にあたる細胞内 Ca²⁺濃度反応の用量反応曲線に影響を与えたと考えられる。

以上の理由から Cys23Ser 多型は、5-HT_{2c}受容体の活性型を増加させ、脱感作を受けやすい状態にすることを明らかに、様々な精神疾患や治療薬反応性に関連しうる遺伝子多型であることか示唆された。

これまでの Cys23Ser 多型を用いた関連解析は Caucasian てしか行われておらず、日本人を対象にした関連解析か行われていなかった。そこで、日本人の統合失調症患者および双極性気分障害、単極性気分障害患者を対照とした関連解析を行ったか、との疾患とも関連は見いたせなかった。

2 Caucasian に比較すると日本人での allele frequency は約 10 倍低いということか明らかにされた。関連解析において、allele frequency か低い場合、その allele か疾患発症に寄与する危険率か同しとすると、より多くのサンプル数を必要とする。従来の報告ても、本多型は双極性気分障害との関連か Caucasian て確認されており、

今回有意差には至らなかったか、双極性気分障害で Ser 体か多い傾向か見られた点は、症例数を増やし検討するに値すると考える。

G 研究発表

1 論文発表

1 Okada M, Northup J, Ozaki N, Russell J, Linnoila M, Goldman D
Modification of Human 5-HT_{2C} Receptor Function by Cys23Ser, an Abundant, Naturally Occurring Amino Acid Substitution Mol Psychiatry 9 (1) 55-64, 2004

2 Iwata N, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Ozaki N
No Association With the Neuregulin 1 Haplotype to Japanese Schizophrenia Mol Psychiatry 9 (2) 126-127, 2004

3 Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H
Association analysis of the G308A promoter polymorphism of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene in Japanese patients with schizophrenia Journal of Neural Transmission 111 (2) 217-222, 2004

4 Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M, Ozaki N
Effect of DRD2, 5-HT_{2A}, and COMT genes on antipsychotic response to risperidone Pharmacogenomics J 3 (6) 356-361, 2003

5 The Japanese Schizophrenia Sib-pairLinkageGroup (JSSLG) (Arinami T, IH,

- 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, Iijima Y, Kitao Y, Furuno T, Someya T, Mumtaz 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, Suzuki Y, Shibuya H, Ohmori O, Shinkai T, Horii 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 (Neuropsychiatr Genet)* 120B (1) 22-28, 2003
- 6 Suzuki T, Iwata N, Kitamura Y, Kitajima T, Yamanouchi Y, Ikeda M, Kamatani N, Ozaki N Association of a haplotype in the serotonin 5-HT4 receptor gene (HTR4) with Japanese schizophrenia *Am J Med Genet* 121B (1) 7-13, 2003
- 7 Ozaki N, Goldman D, Kaye WH, Plotnikov K, Greenberg BD, Lappalainen J, Rudnick G, Murphy DL Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype *Mol Psychiatry* 8 (11) 933-936, 2003
- 8 Okada M, Irie S, Sawada M, Urae R, Urae A, Iwata N, Ozaki N, Akazawa K, Nakanishi H Pepstatin A induces extracellular acidification distinct from aspartic protease inhibition in microglial cell lines *Glia* 43 (2) 167-74, 2003
- 9 Noda M, Yasuda S, Okada M, Higashida H, Shimada A, Iwata N, Ozaki N, Nishikawa K, Shirasawa S, Uchida M, Aoki S, Wada K Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways *J Neurochem* 84 (2) 222-232, 2003
- 10 Ujike H, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Sekine Y, Sora I, Iyo M, Katsu T, Nomura A, Nakata K, Ozaki N Nine- or fewer repeat alleles in VNTR polymorphism of the dopamine transporter gene is a strong risk factor for prolonged methamphetamine psychosis *Pharmacogenomics J* 3 (4) 242-247, 2003
- 2 学会発表
- 1 Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M Effect of Dopaminergic and Serotonergic Gene Polymorphisms on Antipsychotic Response to Risperidone, in 11th INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE PACIFIC RIM ASSOCIATION FOR CLINICAL PHARMACOGENETICS, Applications of Pharmacogenomics to Psychiatry LA, 2003
- 2 鈴木竜世, 西山毅, 山之内芳雄, 北島剛司, 他田匡史, 前野信久, 岩田仲生, 尾崎紀夫 5-HT2A 受容体遺伝子の多型検索と統合失調症との関連研究, in 第 25 回日

- 本生物学的精神医学会 , 2003
- 3 Okada M, Goldman D, Linnoila M, Iwata N, Ozaki N, Northup J COMPARISON OF G-PROTEIN PROMISCUITY TOWARD HUMAN 5-HT_{2C} AND 5-HT_{1A} RECEPTORS, in Satellite Meeting of the International Society of Neurochemistry Kyoto, 2003
- 4 Kitajima T, Suzuki T, Iwata N, Ikeda M, Yamanouchi Y, Ozaki N Pharmacogenetic Study of Fluvoxamine Response in Major Depression using 5-HTT, HTR2A and HTR3A Gene Polymorphisms, in 11th INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE PACIFIC RIM ASSOCIATION FOR CLINICAL PHARMACOGENETICS LA, 2003
- 5 尾崎紀夫, 岩田仲生, 北島剛司, 山之内芳雄, 鈴木竜世, 他田匡志, 前野信久 SSRI 反応性とセロトニン(5-HT)系遺伝子多型, in 第13回日本臨床精神神経薬理学会 シンポジウム遺伝子多型と臨床応用 弘前, 2003
- 6 尾崎紀夫, 岩田仲生 統合失調症の神経発達障害・神経変性仮説とゲノム研究の統合, in 第35回脳の医学・生物学研究会 名古屋, 2003
- 7 尾崎紀夫, 岩田仲生, 内藤宏, 鈴木竜世, 野畑綾子 うつ病の発症・経過において環境が果たす役割, in 第10回日本産業精神保健学会・シンポジウム「生活習慣病とメンタルヘルス」 東京, 2003
- 8 他田匡史, 太田龍朗, 鈴木竜世, 山之内芳雄, 西山毅, 北島剛司, 前野信久, 岩田仲生, 尾崎紀夫 GABAA 受容体 $\alpha 1$ サブユニット遺伝子多型検索と関連解析, in 第25回日本生物学的精神医学会 , 2003
- 9 Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Ikeda M, Inada T, Ozaki N MUTATION SCREENING OF THE HUMAN CANNABINOID RECEPTOR 1 (CNR1) IN JAPANESE SCHIZOPHRENI, in 11th World Congress on Psychiatric Genetics Quebec, 2003
- 10 Iwata N, Ozaki N, Yamanouchi Y, Suzuki S, Kitajima T, Ikeda M, Maeno H, Ujike H, Sekine Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Sora I, Abuse) JGIMD Candidate Gene Analysis of Amphetamine-related Disorders, in Satellite Meeting of the International Society of Neurochemistry Symposium (Molecular Genetics of Substance-related Disorders) Kyoto, 2003
- 11 前野信久, 楠 和憲, 小野雄一郎, 今井真, 李 嵐, 粥川祐平, 尾崎紀夫, 太田龍朗 三次元人格評価尺度 (TPQ) を用いた季節性感情障害 (SAD) の人格特性の解析, in 第25回日本生物学的精神医学

会 , 2003

12 新田 真理, 阿部 徳一郎, 尾崎
紀夫 パニック障害の人格特性と、薬剤反
応性が TCI 得点に及ぼす影響, in 第 13 回

日本臨床精神神経薬理学会 新潟, 2003

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

気分障害の高精度候補領域解析および精神疾患ケノムバンクの構築
一家系の収集、遺伝子解析

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、気分障害の原因を明らかにし、診断法、治療法を開発するため、説明の上同意を得て気分障害患者より採血を行い、DNAを抽出し、その遺伝子解析を行うことである。本年度は、双極性障害患者 12 名および健常者 11 名の DNA を収集した。また、ミトコンドリア Complex I 遺伝子 NDUFV2、小胞体ストレス関連遺伝子 XBP1、ミトコンドリア遺伝子などの解析を行った。

A 研究目的

双極性障害（躁うつ病）においては、多くの遺伝子解析が行われてきたにも関わらず、未だその原因は解明されていない。本研究の目的は、双極性障害の原因を明らかにし、診断法、治療法を開発するため、説明の上同意を得て双極性障害患者より採血を行い、DNAを抽出し、その遺伝子解析を行うことである。

B 研究方法

患者に対し、研究の目的、方法等を説明の上、同意を得て、採血を行った。診断は、可能な限り構成面接(SCID または MINI)を用いた。

得られた血液より、白血球を分離し、通常の方法により DNA を抽出した。

NDUFV2 遺伝子については、患者で変異検索を行い、見出された多型に関して症例対象研究を行った。

XBP1 遺伝子については、プロモーター領域の機能的多型について、症例対象研究を行った。

また、ミトコンドリア遺伝子全周配列の解析を行い、見出された変異に関して 症例対象研究を行った。

その他、5 個の候補遺伝子 (ALOX5AP、FYN、NDUFS8、C21orf2、FAAH) についても検討を行った。

(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研究倫理第一委員会の承認を得た。

C 研究結果

NDUFV2 遺伝子については、プロモーターのハプロタイプが双極性障害と有意に関連していた。

また、XBP1 プロモーターの機能的多型についても、双極性障害との有意な関連は見られた。

ミトコンドリア遺伝子については、新規変異を見出し、これが双極性障害と関連していることを見出した。

その他の候補遺伝子についても同様の検討を行ったが、双極性障害との関連は見られなかった。

D 考察

これまで検討した遺伝子のうち、NDUFV2、XBP1、およびミトコンドリア遺伝子に関して、双極性障害との有意な関連は見られた。

E 結論

双極性障害患者の DNA サンプルを収集すると共に、候補遺伝子についての検討を行った。

F 健康危険情報 なし

G 研究発表

I 論文発表

Kato T, Ishiwata M, Mori K, Washizuka S, Tajima O, Akiyama T, Kato N (2003) Mechanisms of altered intracellular calcium signaling in transformed lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder International Journal of Neuropsychopharmacology 6 379-89
Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M,

Bundo M, Kasahara T, Kusumi I, Tsujita T, Okazaki Y, Nanko S, Kunugi H, Sasaki T, Kato T (2003) Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder *Nature Genetics* 35 171-175

Washizuka S, Ikeda A, Kato N, Kato T (2003) Possible relationship between mitochondrial DNA polymorphisms and lithium response in bipolar disorder *International Journal of Neuropsychopharmacology* 6 421-4

Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, Kunugi H, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kato T (2003) Association of decreased expression and promoter polymorphisms of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 with bipolar disorder *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 120B 72-78

2 学会発表

Kato T (2003) Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder revealed by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy, ACNP 42nd Annual Meeting, San Juan, Dec 9, 2003

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

気分障害の高精度候補領域解析および精神疾患ゲノムバンクの構築

双極性障害における Chromogranin B 遺伝子の大規模関連解析

（分担研究者 稲田俊也 名古屋大学大学院医学系研究科精神生物学分野助教授）

研究要旨 臨床遺伝学的研究の結果から、機能的な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との間に有意な関連がみられた Chromogranin B 遺伝子について、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ところ、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出すことはできなかった。本年は、多施設共同研究グループ COSMO(Collaborative Study of Mood Disorder)において収集された試料の遺伝子解析データを加え、対象数を双極性障害 579 名と健常対照者 704 名まで増やして解析を行ったところ、いずれの SNPs においても双極性障害との間に有意な関連は見られなかったが、双極性障害 II 型(n=188)に限ると 695G/A において関連が見られた。

研究協力者 飯嶋良味¹⁾、坂元 薫²⁾、福永貴子³⁾、中平 進⁴⁾、大槻露華⁵⁾、吉川武男⁶⁾、山田和夫⁶⁾、功刀 浩⁷⁾、加藤忠史⁸⁾、尾崎紀夫⁹⁾、岩田仲生¹⁰⁾、巽 雅彦¹¹⁾、樋口輝彦¹²⁾、有皮忠雄⁵⁾

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) 理化学研究所脳科学総合研究センター分子精神科学研究チーム 7) 国立精神 神経センター神経研究所 疾病研究第三部 8) 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 9) 名古屋大学 大学院医学系研究科精神医学分野 10) 藤田保健衛生大学医学部精神医学教室 11) 昭和大学医学部 精神医学教室 12) 国立精神・神経センター国府台病院

照間に有意な差を見出した(p=0.000005, Kitao *et al.*, 2000)。この D20S95 の最も近傍に位置する遺伝子か 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出した。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ロト値 1 以上が示された領域である(Detera-Wadleigh *et al.*, 1997)。前年度までにわれわれは、双極性障害 178 名と健常対照者 192 名を対象として Chromogranin B 遺伝子の Exon4 内にある 11 個の変異型について遺伝子解析を行ったところ、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出すことはできなかった。本年は、多施設共同研究グループ COSMO (Collaborative Study of Mood Disorder)において収集された試料の遺伝子解析データを加え、対象数を双極性障害 579 名と健常対照者 704 名まで増やした解析結果を報告する。

B 研究方法

対象は研究協力者らの所属する多施設共同研究グループ COSMO (Collaborative Study of Mood Disorder)において収集された双極性障害 (I, II 型) 患者 579 名と、各施設で収集された健常対照者 704 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

A 研究目的

双極性障害の診断一致率は一卵性双生児においては約 70%であるのに対し、第 1 度親族では約 10%と低くなることから、双極性障害の発症に遺伝的要因の関与すること広く知られており、その発症脆弱性に関連する遺伝子検索が積極的に進められている。本研究の目的は代表的な機能的な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大規模な解析データを用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