

Sequence 法にて増幅し、ABI 3100 genetic analyzer を用い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、Case-control 関連解析では 2×2 , 2×3 の χ^2 検定を行い、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および各共同研究施設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

今回遺伝子解析を行った Chromogranin B 遺伝子 Exon4 内の 11 個の SNPs については、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 II 型気分障害 ($n=188$) に限ると 695G/A との間に関連が見られた (表 1)。

D 考察

Chromogranin (A, B, C) は、内分泌細胞および神経細胞に広く分布する酸性可溶性タンパク質で、その生体内での役割は十分解明されているわけではないが、trans-Golgi network においてホルモンやニューロペプチドの分泌顆粒内への取り込み、さらに濃縮や貯蔵を行っていると考えられている (Ozawa *et al* 1995)。最近の報告では、ニューロンの細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達において、IP3 受容体と関連して重要な役割を担っているとの報告もある (Thrower *et al*, 2003)。ヒトの Chromogranin B は 657 個のアミノ酸からなり (Benedum *et al*, 1987)、神経内分泌細胞に特異的な遺伝子発現プロモーター領域 cyclic adenosine monophosphate response element (CRE) と GC-rich domains を持つことが明らかにされている (Mahata *et al*, 2002)。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、また reserpine, clozapine, haloperidol などの抗精神病薬に反応して、脳内における mRNA の発現増加や発現の局在変化が観察されることから (Mahata SK *et al*, 1993, Kroesen S *et al* 1995)、薬物反応性のマーカーとして、さらには精神疾患の病態生理に関与する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あると考えられる。

これまでにわれわれが行った検討では、統合失調症患者 187 名と健常対照者 192 名を対象として、Chromogranin B 遺伝子の Exon4 領域に存在する 11 個の SNPs についての関連解析を行い、Exon4 内の 3 つの SNPs (1058G/C, 1104G/A, 1250G/A) において、アリル頻度、遺伝子型頻度ともに症例対照間で有意な差が見られ、1058G/C と 1104G/A は完全に連鎖しており、さらにこれら 3 つの SNPs 間では強い連鎖不平衡が見られたことを報告している。また双極性障害 178 名と健常対照者 192 名についても 11 個の

SNPs に対して症例対照群間比較を行っているが、双極性障害との間にはこのサンプルサイズではいずれの SNPs においても有意な関連を見出すことはできなかった。

今回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、双極 II 型気分障害と 695G/A との間に関連が見られたことから、Chromogranin B 遺伝子は統合失調症の病態生理に関与する因子であるのみならず、双極性障害の病態生理にも影響を及ぼす蛋白である可能性が示唆された。以上のように Chromogranin B 遺伝子は統合失調症や気分障害などの機能的な精神疾患に関連する有力な候補遺伝子の一つであると考えられるので、今後さらにハプロタイプ解析や精神症状、薬物反応性、血中濃度との関連など多角的な側面からの検討を加える予定である。

E 参考文献

- 1 Kitao Y, Inada T, Arinami T, *et al* A contribution to genome-wide association studies search for susceptibility loci for schizophrenia using DNA microsatellite marker on chromosomes 19, 20, 21 and 22 *Psychiatr Genet* 10: 139-43, 2000
- 2 Zhang B, Tan Z, Zhang C, *et al* Polymorphisms of chromogranin B gene associated with schizophrenia in Chinese Han population *Neurosci Lett* 323: 229-33, 2002
- 3 Detera-Wadleigh SD, Badner JA, Yoshikawa T, Sander 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* 74: 254-262, 1997
- 4 Ozawa H and Takata K The granin family-its role in sorting and secretory granule formation *Cell Struct Funct* 20: 415-420, 1995
- 5 Thrower EC, Choe CU, So SH, *et al* A functional interaction between chromogranin B and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} channel *J Biol Chem* 278: 49699-49706, 2003
- 6 Benedum UM, Lamouroux A, Konecki DS, *et al* The primary structure of human secretogranin I (chromogranin B) comparison with chromogranin A reveals homologous terminal domains and a large intervening variable region *EMBO J* 6: 1203-1211, 1987
- 7 Mahata SK, Mahapatra NR, Mahata M, *et al* Neuroendocrine cell type-specific and inducible expression of chromogranin/secretogranin genes crucial promoter motifs *Ann NY Acad Sci* 971: 27-38, 2002
- 8 Landen M, Grenfeldt B, Davidsson P, *et al* Reduction of chromogranin A and B but not C in the cerebrospinal fluid in subjects with schizophrenia *Eur Neuropsychopharmacol* 9: 311-315, 1999
- 9 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
- 10 Mahata SK, Mahata M, Fischer-Colbrie R, *et al* Reserpine causes differential changes in the mRNA levels of chromogranin B, secretogranin II, carboxypeptidase H, alpha-amidating monooxygenase, the vesicular amine transporter and of synaptin/synaptophysin in rat brain *Brain Res Mol Brain Res* 19 83-92, 1993
 - 11 Kroesen S, Marksteiner J, Mahata SK, *et al* Effects of haloperidol, clozapine and citalopram on messenger RNA levels of chromogranins A and B and secretogranin II in various regions of rat brain *Neuroscience* 69 881-891, 1995
- F 研究発表**
- 1 Kokai M, Inada T, Ohara K, Shimizu M, Iwado H, Morita Y Inter-rater and test-retest reliability of the Japanese version of the subjective deficit syndrome scale *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 18 145-149, 2003
 - 2 Hori K, Oda T, Tominaga I, Inada T "Awakening" in demented patients *Psychiatr Clin Neurosci* 57 237, 2003
 - 3 Inada T, Beasley C, Tanaka Y, Walker D Extrapyrmidal Symptom Profiles Assessed with DIEPSS Comparison with Western Scales in the Clinical Double-Blind Studies of Schizophrenic Patients Treated with either Olanzapine or Haloperidol *Int Clin Psychopharmacol* 18 39-48, 2003
 - 4 Hori K, Inada T, Sengan S, Ikeda M Is Charles Bonnet syndrome an early manifestation of dementia? *Acta Neuropsychiatr* 15 102, 2003
 - 5 河野稔明, 稲田俊也, 高 国子, 山之内芳雄, 野畑綾子, 栗田 廣, 上島国利, 尾崎紀夫, 伊豫雅臣, 樋口輝彦 DIGS 日本語版信頼性確立のための予備的検討 *脳と精神の医学* 14 51-58, 2003
 - 6 Suzuki E, Kitao Y, Ono Y, Iijima Y, Inada T Cytochrome P450 2D6 Polymorphism and Character Traits *Psychiatr Genet* 13 111-113, 2003
 - 7 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)* 120B 35-39, 2003
 - 8 The Japanese Schizophrenia Sib-pair Linkage Group (JSSLG)(Arinami 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, Iijima Y, Kitao Y, Furuno T, Someya 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, 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 (Neuropsychiatr Genet)* 120B 22-28, 2003
 - 9 Inada T, Nozaki S, Inagaki A, Furukawa T Efficacy of diazepam as an anti-anxiety agent meta-analysis of the double-blind randomized controlled trials in Japan *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 18 483-487, 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 Journal* 3 242-247, 2003
 - 11 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* 13 163-168, 2003
 - 12 Hori K, Tominaga I, Inada T, Oda T, Hirai S, Hori I, Onaya M, Teramoto H Donepezil-responsive alcohol related prolonged delirium *Psychiatr Clin Neurosci* 57 603-604, 2003
 - 13 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* 9 126-127, 2004
 - 14 Ohtsuki T, Tanaka S, Ishiguro H, Tanabe E, Yara K, Okubo T, Takahashi S, Matsuura M, Sakai T, Muto M, Matsushima E, Noguchi E, Toru M, Inada T, Kojima T, Arinami T Failure to find association between PRODH deletion and schizophrenia population screening using simple PCR method *Schizophr Res* 67 111-113, 2004
 - 15 Koizumi H, Hashimoto K, Kumakiri C, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Takei N, Iyo M Association between the glutathione S-transferase M1 gene deletion and female methamphetamine abusers *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 126B 43-45, 2004
 - 16 Takahashi N, Tomita K, Higuchi T, Inada T The inter-rater reliability of the Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS) using a Structured Interview Guide for Montgomery-Asberg Depression Scale (SIGMA) *Hum Psychopharmacol Clin Exp*, in press
 - 17 Iijima Y, Inada T, Ohtsuki T, Senoo H, Nakatani M, Arinami T Association between chromogranin B gene polymorphisms and schizophrenia in the Japanese population *Biol Psychiatry*, in press
 - 18 中村 中, 稲田俊也 Catechol-O-Methyltransferase (COMT) 遺伝子多型と精神科疾患 *分子精神医学* 3 54-58, 2003
 - 19 氏家 寛, 勝 強志, 関根吉統, 稲田俊也 Methamphetamine 精神科の分子遺伝学 *臨床精神薬理* 6 1135-1141, 2003
 - 20 三浦英樹, 稲田俊也 クロモクラニンと精神疾患 *精神科* 3 293-295, 2003
 - 21 高橋長秀, 稲田俊也 トパミン D3 (DRD3) 遺伝子多型と精神科疾患 *分子精神医学* 4 68-76, 2004

22 齊藤信二, 稲田俊也 トパミン D4 (DRD4)遺伝子多型と精神科疾患 分子精神医学, 印刷中

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

	Genotype observed (GT)				Allele frequency (AF)				P value (χ^2 test of 2×2 or 2×3)			
	TT	TC	CC	n	Tratio	Cratio	Odds ratio	95% CI	GT vs HW	AF freq	GT freq	
IVS3-11T/C												
Control	559	94	6	659	92.0%	8.0%	(vs Cont)		0.799	(vs Cont)		
Bipolar	480	68	2	550	93.5%	6.5%	0.801	0.587 - 0.093	0.997	0.160	0.305	
Bipolar	I	312	49	1	362	93.0%	7.0%	0.866	0.612 - 1.226	0.828	0.418	0.470
	II	162	18	0	180	95.0%	5.0%	0.602	0.360 - 1.006	0.872	0.051	0.135
277T/A												
Control	252	324	108	684	60.5%	39.5%	(vs Cont)		0.990	(vs Cont)		
Bipolar	213	254	92	559	60.8%	39.2%	0.988	0.840 - 1.161	0.754	0.880	0.793	
Bipolar	I	139	167	63	369	60.3%	39.7%	1.010	0.841 - 1.212	0.745	0.919	0.772
	II	70	84	28	182	61.5%	38.5%	0.958	0.756 - 1.215	0.976	0.725	0.922
433G/A												
Control	281	309	91	681	64.0%	36.0%	(vs Cont)		0.966	(vs Cont)		
Bipolar	242	241	70	553	65.6%	34.4%	0.932	0.790 - 1.101	0.854	0.408	0.675	
Bipolar	I	162	165	41	368	66.4%	33.6%	0.896	0.742 - 1.082	0.999	0.254	0.501
	II	78	72	28	178	64.0%	36.0%	0.996	0.781 - 1.270	0.521	0.974	0.458
533G/A												
Control	163	318	177	658	48.9%	51.1%	(vs Cont)		0.845	(vs Cont)		
Bipolar	150	262	148	560	50.2%	49.8%	0.952	0.811 - 1.116	0.560	0.541	0.721	
Bipolar	I	96	167	106	369	48.6%	51.4%	1.012	0.845 - 1.212	0.435	0.899	0.637
	II	51	91	40	182	53.0%	47.0%	0.849	0.673 - 1.071	1.000	0.168	0.366
598A/C												
Control	527	121	9	657	89.4%	10.6%	(vs Cont)		0.865	(vs Cont)		
Bipolar	453	91	12	556	89.7%	10.3%	0.975	0.751 - 1.266	0.249	0.850	0.394	
Bipolar	I	294	63	10	367	88.7%	11.3%	1.078	0.808 - 1.438	0.274	0.611	0.282
	II	151	27	2	180	91.4%	8.6%	0.797	0.530 - 1.198	0.839	0.274	0.538
695G/A												
Control	413	69	6	488	91.7%	8.3%	(vs Cont)		0.553	(vs Cont)		
Bipolar	378	57	3	438	92.8%	7.2%	0.856	0.608 - 1.206	0.901	0.374	0.608	
Bipolar	I	240	45	2	287	91.5%	8.5%	1.031	0.712 - 1.494	1.000	0.871	0.667
	II	131	11	0	142	96.1%	3.9%	0.445	0.234 - 0.848	1.000	0.012	0.049

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（続き）

	Genotype observed (GT)				Allele frequency (AF)				P value (χ^2 test of 2×2 or 2×3)			
	GG	GC	CC	n	Gratio	Cratio	Odds ratio	95% CI	GT vs HW	AF freq	GT freq	
1058G/C												
Control	164	299	166	629	49.8%	50.2%		(vs Cont)	0.683		(vs Cont)	
Bipolar	140	255	157	552	48.5%	51.5%	1.057	0.899 - 1.242	0.466	0.503	0.733	
Bipolar	I	98	161	108	367	48.6%	51.4%	1.049	0.875 - 1.259	0.266	0.604	0.476
	II	42	90	46	178	48.9%	51.1%	1.039	0.821 - 1.315	0.987	0.748	0.736
1104G/A												
Control	179	329	179	687	50.0%	50.0%		(vs Cont)	0.736		(vs Cont)	
Bipolar	148	266	152	566	49.6%	50.4%	1.014	0.867 - 1.187	0.618	0.860	0.938	
Bipolar	I	103	172	100	375	50.4%	49.6%	0.984	0.824 - 1.176	0.527	0.860	0.808
	II	43	90	49	182	48.4%	51.6%	1.068	0.848 - 1.346	0.999	0.576	0.800
1238C/T												
Control	567	119	6	692	90.5%	9.5%		(vs Cont)	1.000		(vs Cont)	
Bipolar	464	94	9	567	90.1%	9.9%	1.048	0.804 - 1.367	0.650	0.728	0.490	
Bipolar	I	303	65	7	375	89.5%	10.5%	1.126	0.839 - 1.512	0.578	0.429	0.361
	II	153	28	2	183	91.3%	8.7%	0.916	0.611 - 1.374	0.839	0.672	0.803
1250G/A												
Control	249	329	114	692	59.8%	40.2%		(vs Cont)	0.975		(vs Cont)	
Bipolar	210	262	94	566	60.2%	39.8%	0.980	0.835 - 1.150	0.840	0.802	0.898	
Bipolar	I	139	172	64	375	60.0%	40.0%	0.990	0.826 - 1.187	0.831	0.912	0.871
	II	67	86	29	182	60.4%	39.6%	0.972	0.768 - 1.230	0.986	0.812	0.973
1499G/A												
Control	585	101	6	692	91.8%	8.2%		(vs Cont)	0.935		(vs Cont)	
Bipolar	492	73	2	567	93.2%	6.8%	0.816	0.606 - 1.107	0.902	0.194	0.342	
Bipolar	I	319	53	1	373	92.6%	7.4%	0.895	0.640 - 1.252	0.830	0.518	0.503
	II	166	19	0	185	94.9%	5.1%	0.609	0.369 - 1.004	0.876	0.050	0.131

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

分担研究者 南光 進一郎
帝京大学医学部精神科教授

研究要旨

帝京大学医学部附属病院精神神経科患者のうち気分障害患者17名のDNA試料を得て、研究を統括する主任研究者に送付した。

A 研究目的

ケノムスキャンのために気分障害のDNAサンプルを収集する。

倫理面への配慮 本研究は帝京大学医学部遺伝子研究倫理委員会の承認を得て行われている。

B 研究方法

対象 帝京大学医学部附属病院精神神経科に入院または通院中の患者の中からアメリカ精神医学会のDSM-IV診断基準によって気分障害と診断された患者を選び出した。このうち帝京大学医学部遺伝子研究倫理委員会の承認した文書を用いて参加の同意の得られた17名を対象とした。

C 研究結果および結論と考察

研究の初期のサンプル収集の段階であるため、いまた考察などを行うことはできない状況である。

D 健康危険情報

特になし

方法 対象患者から末梢血20cc採血しフェノール法にてDNAを抽出した。これを精製し濃度を200ng/ulに調整したのち、患者臨床情報を氏名など個人を同定できる情報を削除して理化学研究所分子精神医学研究チームリーダー吉川武男博士あてに送付した。

E 研究発表

なし

F 知的財産権の出願・登録状況

なし

神経栄養因子遺伝子多型と気分障害

分担研究者 功刀 浩*

共同研究者 橋本亮太*、田所和幸*、岡田武也*、巽雅彦**、上島国利**

*国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部

**昭和大学医学部精神医学教室

研究要旨

近年、抗うつ薬や通電療法の効果のメカニズムとして、脳由来神経栄養因子(BDNF)などの神経栄養因子が関与している可能性を指摘する報告が増えている。本研究では、ニューロトロフィンである brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-3 (NT-3)とこれらの低親和性受容体 p75^{NTR} をコードする遺伝子の変異と気分障害との関連解析、機能解析を行った。その結果、1) 従来、統合失調症や双極性障害との有意な関連があるとされていた BDNF 遺伝子の繰返し配列多型は、複数の繰返し配列多型が連続した複雑な多型であることを新たに見出し、それによるハプロタイプを明らかにした。2) NT-3 の2塩基繰返し配列多型と双極性障害との関連解析を行い、さらにこの多型の遺伝子転写活性に与える影響をみるために、ルンフェラーセ・アッセイを行った。その結果、この配列領域はエンハンサー活性をもつことが示唆されたか、活性に与える影響に関して対立遺伝子間で有意差を認めなかった。また、双極性障害との有意な関連を認めなかった。3) p75^{NTR} のミスセンス変異(S205L)に関して大うつ病との関連解析を行ったところ、遺伝子型分布、対立遺伝子頻度において患者群と健常者との間に有意差を認め、病因的関連をもつ可能性が示唆された。

A 研究目的

神経栄養因子は、中枢神経系における神経細胞の発達、分化、生存、可塑性などにおいて重要な役割を果たしている。近年、抗うつ薬や通電療法の効果のメカニズムとして、脳由来神経栄養因子(BDNF)などの

神経栄養因子が関与している可能性を指摘する報告が増えている¹⁾。また、分子遺伝学的研究においては、BDNF の遺伝子多型と双極性障害とが有意に関連するという報告や⁸⁾¹⁰⁾、BDNF の遺伝子変異が記憶や海馬の機能に影響を与えることも示唆されており²⁾、気分障害の病態発生と関連する可

能性が示唆されている。さらに、統合失調症発症危険性やその臨床特性と関連するという報告もある⁴⁶⁾。BDNF と同じニューロトロフィン ファミリーに属する neurotrophin-3 (NT-3)の遺伝子変異に関しても、統合失調症や患者の海馬体積と関連するという報告がある³⁵⁷⁾。以上から、ニューロトロフィンやそのシグナル伝達に寄与する分子は気分障害や統合失調症などの機能性精神疾患における病態の解明や創薬の標的として注目される。

そこで本研究では、BDNF や NT-3 と、これらに共通の低親和性受容体 p75^{NTR} をコードする遺伝子の変異と気分障害との関連解析、機能解析を行った。BDNF に関しては、これまでに2塩基繰返し配列多型 (GT リピート)⁹⁾ やミスセンス多型 (Val66Met)が双極性障害と有意に関連することか報告されているか^{8,10)}、今回は前者の繰返し配列多型と双極性障害との関連⁸⁾について日本のサンプルで検証することを試みた。また、NT-3 遺伝子については、第1イントロンにある2塩基繰返し配列多型と統合失調症との関連が指摘されているものの³⁷⁾、双極性障害との関連の可能性については殆ど検討されていないことから、今回、双極性障害との関連解析を行った。p75^{NTR} は、腫瘍壊死因子スーパーファミリーに属し、近年アポトーシスにおける役割や、軸索再生などにおけるさまざまな機能が報告されており、気分障害との関連が注目される。そこで、一塩基多型(SNP) データ・ベース上に記載されているミスセンス変異(S205L, rs207244)に注目し、大うつ病との関連について解析した。

B 研究方法

対象

BDNF や NT-3 遺伝子多型と双極性障害との関連解析に用いた対象は、DSM-IV によって双極性障害と診断された患者 89 名 (男 39 名、平均年齢 53 歳、双極性障害 I 型 46 名、II 型 43 名) と年齢・性分布に関して統制された健常者 99 名 (男 44 名、平均年齢 51 歳) である。また、P75^{NTR} 遺伝子と大うつ病との関連解析に用いたサンプルは、164 名の大うつ病患者群 (男 59 人、平均年齢 49 歳) と年齢・性について統制された同数の健常対照群 (男 59 人、平均年齢 47 歳) である。

倫理面の配慮 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) を遵守して行った。すなわち、被験者からは研究参加に関して十分な説明を行った上で文書による同意を得た。また、検体は匿名化された状態で実験を行った。本研究は国立精神 神経センター、昭和大学医学部の倫理委員会の承認を得て行われた。

方法

1) BDNF

BDNF の2塩基繰返し配列については、Proschel ら⁹⁾のプライマー配列に従って多型領域を PCR で増幅し、自動シーケンサー (CEQ8000, ヘンクマン コールター) によってフラグメント解析を行った。さらに、フラグメントの長さとし、リピート数との対応をみるために多型領域の塩基配列に関して

PCR 産物の直接シーケンスを行った。その後、この領域は単なる 2 塩基繰り返し配列ではなく、複雑な多型が重複していることか明らかになったため、パイロシーケンス法(Pyrosequence 社)によるシーケンス、pBluescriptIIISK(+) (TOYOBO)ヘクターを用いて個々の対立遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。

2) NT-3

双極性障害患者と健常対照群を対象に、第 1 イントロンの 2 塩基繰り返し配列多型について、プライマー 5'-ccgcgctcactcactttcc-3' (forward)、5'-ccccaccctttccaatcca-3' (reverse)を用いて PCR 増幅し、自動シーケンサー(CEQ8000, ヘクマン コールター)によるフラグメント解析と直接シーケンスによって対立遺伝子頻度を決定した。対立遺伝子頻度について、患者群と健常者群との間で χ^2 検定を行った。

また、この多型は既に統合失調症との有意な関連が報告されていることから、遺伝子転写のエンハンサー活性と関連する可能性について HeLa、Hs683 (グリオーマ)、IMR-32 (神経芽腫)の各培養細胞を用いてルンフェラーゼアッセイを行った。すなわち、この多型領域を含むおよそ 150bp の DNA フラグメントをホタル・ルンフェラーゼレポーター遺伝子とその上流に SV40 プロモーターを含む pGL3-Promoter ヘクター (Promega) に組みこみ、上記の培養細胞に一過性にトランスフェクトし、24 時間培養した後に発光度をルミノメーターで測定した。トランスフェクション効率は、ウミンイタケ・ルンフェラーゼを発現する

ヘクターを同時にトランスフェクトして補正した。今回は、頻度の高い 21 回と 23 回繰り返し配列の対立遺伝子と最短 (16 回)、最長 (29 回) のフラグメントを組みこみ、フラグメントの挿入かない場合と比較した。それぞれの条件で 3 回の独立な実験をトリPLICATEで行い、平均値と標準偏差値とを算出した。

3) P75^{NTR}

SNPs のデータベース上のミスセンス変異(S205L)の大うつ病との関連解析に関しては、この SNP を含むフラグメントをプライマー 5'-gctaaaagggaggagtgggggaag-3' (forward) と 5'-ttcagggtcaagggtcacagcaaagtct-3' (reverse)を用いて PCR で増幅し、制限酵素 BanII で消化した。PCR 産物の切断後のハントを電気泳動とエチノウムプロマイト染色で可視化して遺伝子型を決定した。

C 研究結果

1) BDNF

BDNF の繰り返し配列について検討したところ、Proschel ら⁹⁾の当初の報告では GT リピートと記載されていたか、NCBI のデータベース上では BDNF 遺伝子の 5'→3'の方向で読むと、GT でなく CA リピートであった。直接シーケンス法、対立遺伝子のクローニング、パイロシーケンス法を用いた解析では、この繰り返し配列を含むおよそ 60bp の領域に、従来報告されていない(CG)n、(GA)n の多型か(CA)n の前後に存在していることか明らかになり、これまでに少なくとも 14 のハプロタイプとを同

定した。

2) NT-3

患者群 89 名と年齢・性別をマッチさせた 99 名の健常者群との間に対立遺伝子頻度を比較したところ、両群間に対立遺伝子に関して有意差を認めなかった。

ルンフェラーゼ・アノセイの結果は、いずれの培養細胞系においても、この多型領域が挿入された場合には、挿入されていない場合に比べて有意に発光度が高かった。しかし、対立遺伝子間では、明らかな差を認めなかった。

3) p75^{NTR}

p75^{NTR} 遺伝子の S205L 多型に関する大うつ病患者群と健常者群との遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度を Table 1 に示す。遺伝子型分布は、両群とも Hardy-Weinberg の法則からの有意な偏りを認めなかった。遺伝子型分布の比較では、L205 対立遺伝子をもつ者の割合は、健常者群と比較して患者群で有意に少なかった ($p < 0.05$, オッズ比 0.54, 95% CI 0.30-0.98)。対立遺伝子頻度を比較すると、L205 対立遺伝子は、健常者群と比較して患者群で有意に少なかった ($p < 0.05$, オッズ比 0.54, 95% CI 0.31-0.94)。

D E 考察と結論

1) BDNF

BDNF の繰り返し配列と双極性障害との関連について日本のサンプルを用いて検討することを本研究の出発点としたが、この多型領域を精査していく過程で、因らすも、極めて複雑な変異があり、多数のハプロタ

イプが存在すること明らかになった。当初、Proschei ら⁹⁾は GT リピートと記載したか、NCBI のデータベース上では BDNF 遺伝子の 5'→3'の方向で読むと、CA リピートであり、直接シーケンス法、対立遺伝子のクローニング、パイロシーケンス法を用いた解析では、この繰り返し配列を含むおよそ 60bp の領域に、従来報告されていない(CG)_n、(GA)_n の多型か(CA)_n の前後に存在していることが明らかになった。したがって、従来、この多型か統合失調症やその臨床特性、あるいは躁うつ病と関連するという先行研究もあるか^{4,6,8)}、本研究結果に基づいて新たに遺伝子型を決定し、関連の有無を検討し直す必要かあろう。さらに、これらの多型か BDNF 遺伝子の転写に関連するか否かについては今後、検討すべき興味深い課題であると考えられる。

2) NT-3

NT-3 の第 1 イントロンの 2 塩基繰り返し配列については、上記の BDNF において観察されたような複雑な変異が見出されるようなことはなかった。BDNF の繰り返し配列多型か、上述のとおり、統合失調症や躁うつ病の両者に関連かあるという報告があることから、NT-3 も統合失調症との関連だけでなく、双極性障害との関連かある可能性か考えられた。しかし、本研究の結果、対立遺伝子頻度において双極性障害患者群と健常者群との間で有意差はなく、関連は否定的である。

また、ルンフェラーゼ・アノセイの結果から、この繰り返し配列多型を含む DNA フラクメントは、エンハンサー活性をもつ可能性か示唆されたか、CA の繰り返し数

によってエンハンサー活性に相違がある可能性は支持されなかった。

3) P75^{NTR}

P75^{NTR} のミスセンス変異 S205L とうつ病との関連では、遺伝子型頻度、対立遺伝子頻度ともに有意差を認めた。変異型対立遺伝子である L205 は、健常者群と比較して患者群に有意に多いため、L205 対立遺伝子はうつ病発症に対する予防効果がある、あるいは、S205 対立遺伝子は、うつ病発症の脆弱性を与える可能性が示唆された。しかし、有意水準は5%と弱い関連であったので、今後独立なサンプルで関連の有無を確認する必要がある。また、このミスセンス多型が、遺伝子産物の機能に影響を与えるか否かについては、今後検討していく予定である。

参考文献

- 1) Duman RS Synaptic plasticity and mood disorders *Mol Psychiatry*, **2002**, 7 (Suppl 1) S29-S34
- 2) Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function *Cell*, **2003**, 112 257-69
- 3) Hattori M, Kunugi H Akahane A, Tanaka H, Ishida S, Hirose T Morita R Yamakawa K, Nanko S Novel polymorphisms in the promoter region of the neurotrophin-3 gene and their associations with schizophrenia *Am J Med Genet*, **2002**, 114 304-9
- 4) Krebs MO, Guillin O, Bourdell MC, Schwartz JC, Olie JP, Poirier MF, Sokoloff P Brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants association with age at onset and therapeutic response in schizophrenia *Mol Psychiatry*, **2000**, 5 558-62
- 5) Kunugi H, Hattori M, Nanko S, Fujii K, Kato T, Nanko S Dinucleotide repeat polymorphism in the neurotrophin-3 gene and hippocampal volume in psychoses *Schizophr Res*, **1999**, 37 271-3
- 6) Muglia P, Vicente AM, Verga M, King N, Macciardi F, Kennedy JL Association between the BDNF gene and schizophrenia *Mol Psychiatry* **2003**, 8 146-7
- 7) Nanko S, Hattori M, Kuwata S, Sasaki T, Fukuda R, Dai XY, Yamaguchi K, Shibata Y, Kazamatsuri H Neurotrophin-3 gene polymorphism associated with schizophrenia *Acta Psychiatr Scand*, **1994**, 89 390-2
- 8) Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder evidence from a family-

- based association study *Am J Hum Genet*, **2002**, 71 651-655
- 9) Proschel M, Saunders A, Roses AD, Muller CR Dinucleotide repeat polymorphism at the human gene for the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) *Hum Mol Genet*, **1992**, 1 353
- 10) Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, DePaulo JR, Lander ES Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder BDNF is a potential risk locus Brain-derived neurotrophic factor *Mol Psychiatry*, **2002**, 7 579-93

Table 1 Genotype and allele frequencies of the S205L polymorphism of the p75^{NTR} gene among the patients with major depressive disorder and controls

	Genotype distribution				Allele frequency		
	N	S/S	S/L	L/L	N	S	L
Patients	164	0.87	0.13	0.00	328	0.94	0.06
Controls	164	0.79	0.20	0.01	328	0.89	0.11

健康危険情報

特になし

F 論文発表

Kunugi H, Hashimoto R, Yoshida M, Tatsumi M, Kamijima K A missense polymorphism (S205L) of the low-affinity neurotrophin receptor p75^{NTR} gene is associated with depressive disorder and attempted suicide *Am J Med Genet* (in press)

Tadokoro K, Hashimoto R, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H Analysis on enhancer activity of a dinucleotide repeat polymorphism in the neurotrophin-3 gene and its association with bipolar disorder *Neuropsychobiology* (in press)

G 知的財産の出願・登録状況

特になし

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遺伝子・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 三辺義雄 浜松医科大学精神科神経科講師

研究要旨 本年度から開始された当該研究につき、主に静岡県における血液サンプルの収集にあたり、収集システムの再構築、生命倫理的対応の整備、さらに今後の検査課題について報告した。今回の研究で最も重要な対象疾患は双極性障害である。本疾患はその遺伝的要因の強さから着目されたが、統合失調症、反復性うつ病から比べると発症頻度（低い）。そのため全国で1000例（浜松医大では50例以上）の症例の集積には、各地域における効率的な協力体制の整備が必要である。さらにゲノム研究における生命倫理の問題は重要であることは論を待たないが、我々が提唱するポストケノムノプトミクスの概念をふまえ、今後もさらに研究の余地があると考えられる。

A 研究目的

臨床遺伝研究においては、効率よく遺漏なく推進しそれを実り多いものにするための研究体制として、1、多数例のサンプル収集のための共同体制作り、2、最先端技術を用いた迅速・正確なDATA解析・整理、3生命倫理面での適切・柔軟な対応、か不可欠であることは論を待たない。平成15年度は本研究の開始年度であり、1の項目について、主に研究体制の再検討を図った。

B 研究方法

当該研究、特に双極性障害の末梢血サンプルを集積するために、静岡県下の病院（浜松医大附属病院、沼津中央病院、清水駿河病院、県立こころの医療センター、静岡済生会病院、藤枝駿河病院、島田市民病院、磐田市立病院、服部病院、福田西病院、服部病院、聖隷三方原病院、浜松防災病院、神経科浜松病院、浜北病院、朝山病院）における協力体制について検討した。さらに生命倫理の観点からの問題点を改めて検討した。

双極性障害の患者さんにおける遺伝子研究用末梢血採血（DNA抽出用2本、計15ml、理研における培養用1本、計8ml）につき上記各病院について協力をお願いした。その条件として、1、ヒトケノム・遺伝子解析研究に関する3省合同倫理指針に基づき、浜松医科大学「精神疾患の分子遺伝学的研究」により、各病院に浜松医大から医師が出向き、構造化面談による診断の確認、研究の説明、および同意書取得、採血を行う、2、患者さんご本人の同意能力が不十分である時は、保護者の同意を頂く、3、各病院での倫理委員会にて承認して頂く（倫理委員会の設置がない病院では医局会にて承認して頂く）を付記した。

（倫理面への配慮）

上記の記載の通りである。

C 研究結果

上記16病院で、協力が得られなかったのは1病院のみであった。総合病院の精神科では院内の倫理委員会が設置され、他科の医師も交えて検討された。単科の精神病院では医局会にて検討された。平成15年度はこの協

力体制をもとに、研究協力が得られた患者さん、そのご家族からの検体は集積され始めている。

D 考察

難治性疾患について、その偏見を克服する上でも、一日も早く原因究明と新規治療法開発を願う気持ちは医療者、患者さん本人、そのご家族は非常に強く、結果今回の研究についても従来と同様に、静岡県における研究協力体制に大きな支障はないと考えられる。生命倫理指針についても既に整備されており問題はみられない。既に他のPROJECTで研究成果が出ており、それを研究発表項目に掲載した。多因子精神疾患の原因に迫るには、今後新しい研究方法が求められている。たとえば患者さんについての情報をより総合的・広範囲に収集し、遺伝子異常からその表現型として疾病を見るのではなく、個々の症状・付帯所見と遺伝子、非遺伝要因をみていく“ホスルケノムノプトミクス”の方向が必要であるとされる。これに伴い生命倫理の点からも、医学の進歩に応じた柔軟な対応が求められる。

E 結論

本年度から開始された当該研究につき、主に静岡県における血液サンプルの収集にあたり、収集システムの再構築、生命倫理的対応の整備、さらに今後の検査課題について報告した。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

1 論文発表

1) Toyota T, Yoshitsugu K, Ebihara M, Yamada K, Ohba H, Fukasawa M, Minabe Y, Nakamura K, Sekine Y, Takei N, Suzuki K, Itokawa M, Tomaru Y, Shimizu H, Hatton E, Mon N, Yoshikawa T Association between schizophrenia with ocular msalignment and polyalanine length variation in PMX2B

Human Molecular Genetics, 13 551-561, 2004

2) Sekizawa T, Iwata Y, Nakamura K, Matsumoto H, Suzuki A, Mirabe Y, Mon N Childhood-onset schizophrenia and tryptophan hydroxylase gene polymorphism.

American Journal of Medical Genetics, in press, 2004

2 学会発表

1) 岩田泰秀、三辺義雄、武井教使、森川夫、山田和男、吉川武男 統合失調症におけるニコチン受容体 $\alpha 7$ サブユニットの遺伝子解析

第11回精神行動遺伝学会、2003.10.25, 長崎

2) Nakamura K, Sekine Y, Suzuki A, Mirabe Y and JGIDA group An association study of SOD2 gene polymorphism in methamphetamine psychosis.

33rd Annual Meeting of Society For Neuroscience, New Orleans/USA, 2003

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

分担研究者 西川 徹
東京医科歯科大学医学部精神神経科教授

研究要旨

東京医科歯科大学医学部付属病院精神神経科外来および入院患者のうち、気分障害患者15名のDNA試料を得て、臨床情報と共に研究を統括する主任研究者に送付した。

A 研究目的

ケノムスキャンのために気分障害のDNAサンプルを収集する。

チームリーダー吉川武男博士あてに送付した。

B 研究方法

対象 東京医科歯科大学医学部付属病院精神神経科に入院または通院中の患者の中からアメリカ精神医学会のDSM-(IV)診断基準によって気分障害と診断された患者を選び出した。このうち東京医科歯科大学医学部研究倫理委員会の承認した文書を用いて、参加の同意の得られた15名を対象とした。

倫理面への配慮 本研究は、東京医科歯科大学医学部研究倫理委員会の承認を得て行われている。

C 研究結果および結論と考察

研究の初期のサンプル収集の段階であるため、いまだ考察などを行うことはできない状況である。

D 健康危険情報

特になし

方法 対象患者から末梢血20cc採血しフェノール法にてDNAを抽出した。これを精製し濃度を200ng/ulに調整したのち、患者臨床情報（氏名など個人を同定できる情報は削除）を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、

E 研究発表

なし

F 知的財産権の出願・登録状況

なし

ラット海馬における網羅的な遺伝子発現解析に関する研究

分担研究者 三國 雅彦

群馬大学大学院医学系研究科 脳神経精神行動学分野 教授

研究要旨

感情障害を中心としたストレス関連疾患のモデル動物における海馬機能の分子機構を研究するためのツールを開発するため、ラット海馬の cDNA ライブラリーからランダムに選択した大量クローンの部分塩基配列の決定を行い、海馬における発現遺伝子のカタログ化を試みた。本研究で得られたこれらの ESTs は、ストレス関連疾患における海馬の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析するための有用なゲノム資源である。

A 研究目的

身体的あるいは心理的なストレス性刺激か、生体のホメオスタシスを崩壊し、感情障害などのストレス関連性疾患を誘発することか知られている。また、海馬は記憶や学習に重要な役割を果たすのみならず、ストレスの影響を受け易いことか明らかになっている。海馬は、HPA 系を抑制的に支配する上位中枢であるとともに、グルココルチコイドを介した慢性ストレスの影響を受け易い部位であるため、ストレス関連疾患の病態生理に関与していると考えられる。一方、海馬では神経細胞萎縮や細胞死と共に生涯にわたり神経細胞の新生が起こっていることか確認されている。そのため、海馬におけるストレスに対する適応反応の分子機構を明らかにすることかストレス関連疾患の病態生理を理解する上で重要であると考えられる。ところか、ストレス応答に関与する遺伝子群の多くは同定されておらず、ストレス関連性疾患における海馬

の分子機構や病態生理学的意義については今た不明な点か多い。そのため、海馬で発現している遺伝子 (Expressed Sequence Tags ESTs) を包括的に解析することは、ストレス関連疾患の発症機構の解明において重要であると考えられる。そこで本研究では、ストレス関連疾患モデルにおける海馬機能の分子機構を研究するためのツールを開発するため、ラット海馬の cDNA ライブラリーからランダムに選択した大量クローンの部分塩基配列の決定を行い、海馬における発現遺伝子のカタログ化を試みた。

B 研究方法

(1) ESTs獲得および部分塩基配列決定

実験には成獣ラットの正常海馬組織から作製された両方向性cDNA ライブラリーを用いた。まず、プラスミドDNAを ExAssist ヘルパーファーンを用いた in

vivo excision 法により、ファーンミトからプラスミトに直接変換した。このプラスミトDNAをSOLR E coliに導入し、IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactoside)、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) を含んだLB/Ampアカロースプレート上に発育させた。形成されたコロニーをプレートから無作為に選択しプラスミトDNAを抽出した。プラスミトに挿入されたcDNAクローンの3'もしくは5'端から200-500 bp の部分塩基配列を、PCR法を利用したCycle sequencing法により、T7もしくはT3プライマーを用い決定した。獲得された各々の塩基配列の評価と塩基のトリミングを行った後、ヘクター配列を取り除き、200bp以上で、判別不能の塩基が1%以下のものを良好な塩基配列として選択した。

(2) データベース解析

ラット海馬から得られた13,660個の重複しないESTsの塩基配列とペプチド配列を、全米ハイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の GenBank データベースから検索した。

まず繰り返し配列を除去した後、得られた塩基配列について日々更新される GenBank のラット塩基配列に対し種々の BLAST サーチを行った。先ずヌクレオチドレベルでの配列の比較を BLASTN プログラムにより行った。リピート部分と判別不能な塩基を除いた EST の塩基配列が、他の塩基配列と比較し 95%以上一致しスコアが 400 以上であった場合、同一のものとしてグループ化した。共通す

る塩基配列が少なくとも1つ見いだされた場合は、グループは1つのクラスターとした。他のどのクラスターにも属していなかった EST 塩基配列は、シングルトンとした。ヌクレオチドのデータベースに登録されている既知の遺伝子と一致をみなかった EST クローンは、全ての6つの読み枠で塩基配列を翻訳し NCBI のペプチドデータベースに対して BLASTX プログラムにより検索した。既知遺伝子と高度に配列の一致を認めた ESTs は、その遺伝子がコードするタンパク質の主な機能に基づき7つのカテゴリに分類した後、特殊な機能に従って更に詳しく亜分類した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては、群馬大学医学部附属動物実験施設の倫理規定に従った。

C 研究結果

(1) ESTs獲得および部分塩基配列決定

実験には成獣ラットの正常海馬組織から作製された両方向性cDNA ライブラリーを用いた。まず、プラスミトDNAを ExAssist ヘルパーファーンを用いた in vivo excision 法により、ファーンミトからプラスミトに直接変換した。このプラスミトDNAをSOLR E coliに導入し、IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactoside)、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) を含んだLB/Ampアカロースプレート上に発育させた。形成されたコ

ロニーをプレートから無作為に選択しプラスミドDNAを抽出した。プラスミドに挿入されたcDNAクローンの3'もしくは5'端から200-500 bp の部分塩基配列を、PCR法を利用したCycle sequencing法により、T7もしくはT3プライマーを用い決定した。獲得された各々の塩基配列の評価と塩基のトリミングを行った後、ヘクター配列を取り除き、200bp以上で、判別不能の塩基が1%以下のものを良好な塩基配列として選択した。

(2) データベース解析

ラット海馬から得られた13,660個の重複しないESTsの塩基配列とペプチド配列を、全米ハイオテクノロニー情報センター (National Center for Biotechnology Information

NCBI)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)のGenBankデータベースから検索した。

まず繰り返し配列を除去した後、得られた塩基配列について日々更新されるGenBankのラット塩基配列に対し種々のBLASTサーチを行った。先ずヌクレオチドレベルでの配列の比較をBLASTNプログラムにより行った。リピート部分と判別不能な塩基を除いたESTの塩基配列か、他の塩基配列と比較し95%以上一致しスコアが400以上であった場合、同一のものとしてグループ化した。共通する塩基配列が少なくとも1つ見いだされた場合は、グループは1つのクラスターとした。他のどのクラスターにも属していなかったEST塩基配列は、シングルトンとした。ヌクレオチドのデータベースに登録されている既知の遺伝子と一致をみななかったESTクローンは、全ての6つの読み枠で塩

基配列を翻訳しNCBIのペプチドデータベースに対してBLASTXプログラムにより検索した。既知遺伝子と高度に配列の一致を認めたESTsは、その遺伝子がコードするタンパク質の主な機能に基づき7つのカテゴリーに分類した後、特殊な機能に従って更に詳しく亜分類した。

D 考察

本研究で用いたESTsによるアプローチは、組織における既知遺伝子および新規遺伝子を同定し、特徴付けるための有用な手段である。過去数年の間、多くの組織や培養細胞系から構築されたcDNAライブラリーから多くのESTsが収集され研究されてきた。しかしながら、ラットの海馬から大規模にESTsを収集した報告は少ない。本研究において、海馬に関連した13,660個のESTsを収集し、解析したところそのうち7,173個は重複しないESTsであった。既知遺伝子と一致したESTsの機能的な分布から考察すると、本研究で得られた結果は、他の脳以外の組織から得られた結果と多少異なっていた。膵臓や心血管系などの海馬以外の組織を用いた過去の研究では、最も多く発現を認めた遺伝子は「遺伝子/タンパク質発現」に関与するものであったのに対し、ラット海馬のcDNAライブラリーを用いた本研究においては「細胞内シグナル伝達」に関与する遺伝子群が最も多く認められた。

発現遺伝子の分子カタログを確立することは、組織特異的なcDNAマイクロアレイの開発を発展させると考えられる。

すなわち、これらのクローンを用いることにより低費用で多数のcDNAマイクロアレイを作製することかできる。また、アレイの作製に際し現在市販されているアレイに含まれていないcDNAを多く含めることかできるため、海馬研究のための独自のツールを提供することか可能である。このアプローチを介して同定される新規の遺伝子の機能を解析することは、ストレス関連疾患の病態の根底にある分子機構を明らかにし、治療に有用な新しい分子標的の発見を導くのに有用であると考えられる。海馬特異的な機能に関する情報を集積し、本研究で得られたESTsをヒトの染色体上に配置することにより、連鎖解析による記憶や学習あるいはストレスに関連した疾患の候補遺伝子座でのポシショナルクローニングを容易にすることか可能になったと考えられる。

E 結論

本研究では、ESTsを用いたラットの海馬で発現している遺伝子のカタログ化を試みた。その結果、2,594種類の既知遺伝子と4,579種類の未知遺伝子を同定した。既知遺伝子群には「細胞内シグナル伝達」における「タンパク質の修飾」に関する遺伝子が最も多く認められた。また、未知遺伝子群のうち599種類は、他の種の既知遺伝子のマウスホモログあるいはスーパーファミリーの新規メンバーであった。本研究で得られたこれらのESTsは、感情障害を中心としたストレス関連疾患における海馬の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析するための有用

なゲノム資源である。

F 健康危険情報

特記事項なし

G 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

なし

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

分担研究報告書

双極性障害の連鎖領域における候補遺伝子の解析に関する研究

分担研究者 塩江 邦彦 山梨大学大学院 精医学工学総合研究部 神経神経医学 臨床倫理学 講師

研究要旨

連鎖研究による双極性障害の候補領域は 21 番長腕 22.3 にあるマーカーPFKL から 10cM 動原体よりの範囲である。我々はこの連鎖領域の TRPM2, PDE9A, SYNJ1 遺伝子に着目した。変異 多型スクリーニングにて、これらの遺伝子について新たな多型を同定したが、双極性障害患者 100 名の関連研究では有意な結果は得られなかった。

A 研究の背景および目的

気分障害は、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り、遺伝効果の高い双極性障害は遺伝効果が約 50%と考えられる。発症に関係する遺伝子(感受性遺伝子)は複数存在し、1つ1つの遺伝子の効果は大きくないと予想される(オッズ比はせいぜい 1.5~2 程度)。このような複雑遺伝機構により結果の一致した染色体領域は極めて少なく、現在までの連鎖研究により、躁うつ病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と 21 番の長腕 22.3 にあるマーカーPFKL から 10cM 動原体よりの範囲である。我々はこの染色体 21 番の PFKL 近傍のカルノウムチャンネル蛋白遺伝子 TRPM2 (LTRPC2, TRPC7 (Transient Receptor Potential related Channels)) を躁うつ病の候補遺伝子と考え、多型 変異スクリーニングを行った。同時に、この遺伝子が躁うつ病の感受性遺伝子であるか否かを、得られた多型についての関連研究で検証した。更に、同領域の候補遺伝子として PDE9A (phosphodiesterase) 遺伝子 (TFF1~D21S360), 1inositol5-phosphatase の SYNJ1 (synaptotjanin) 遺伝子 (D21S391~D21S1860) について同様の検討を行った。

B 対象と方法

双極性患者 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 PCR 法により 翻訳領域の増幅を行う PCR 産物を SSCP(single strand conformation polymorphism analysis)にて変異スクリーニングを行った。PCR 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)、シークエンスには ABI 310 (ABI) を使用した。

(倫理面への配慮)

研究参加者には文書にて説明し、署名による同意を得た。本研究は山梨医科大学倫理委員会による承認を受けている。

C 研究結果

TRPM2 をはじめとした PDE9A, SYNJ1 遺伝子について複数の新たな多型を見つけたか、双極性障害患者 100 名と精神障害のない健康成人 100 名で行った関連研究では有意な結果は得られなかった。

D 考察

これらの遺伝子は①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、②機能的にも脳に発現し、③躁うつ病患者で異常があるカルノウムチャンネルやイノトール系、cAMP などのセカントメノセンサーに関連していることから、候補遺伝子としてはそれぞれ有望である。気分障害などの複雑遺伝疾患における感受性遺伝子の同定には統計的検出力を考慮した十分な数のサンプルによる case-control あるいは家系での関連解析による証明が必要である。

E 結論

我々の双極性障害患者 100 名における関連解析では有意差は得られなかった。今後は十分な検出力が得るために、気分障害研究者による日本人を対象とした遺伝子解析グループである JGIMD にて共有サンプルを蓄積し解析を進める。

F 研究発表

1 論文発表

Kunihiko Shioe, Tetsuya Ichimya, Tetsuya Suhara, Akhiro Takano, Yasuhiko Sudo, Fumihiko Yasuno, Masami Hirano, Manabu Shinohara, Masato Kagami, Yoshiro Okubo, Masahiro Nankai, and Shigenobu Kanba No association between genotype of the promoter region of serotonin transporter gene and serotonin transporter binding in human brain measured by PET SYNAPSE48 184-188, 2003

2 学会発表

塩江邦彦, 平野雅己, 中澤美恵, 神庭重信 21q22.3 における双極性障害の候補遺伝子の研究 第 14 回日本 DNA アカデミー研究報告会, 2003

研究成果の刊行 山梨大学 平成15年度

Kunihiko Shioe, Tetsuya Ichimiya, Tetsuya Suhara,
Akihiro Takano, Yasuhiko Sudo, Fumihiko Yasuno,
Masami Hirano, Manabu Shinohara, Masato Kagami,
Yoshiro Okubo, Masahiro Nankai, and Shigenobu
Kanba No association between genotype of the
promoter region of serotonin transporter gene and
serotonin transporter binding in human brain measured
by PET SYNAPSE48 184-188, 2003