

0030725

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子の解明

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 ^{クヌギ} 功刀 浩

平成16(2004)年4月

目 次

I.	総括研究報告	
	自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子の解明-----	3
	功刀 浩	
II.	分担研究報告	
1.	ニュートロフィン低親和性受容体 p75NTR 遺伝子変異とうつ病・自殺行動との関連-----	15
	功刀 浩	
2.	Dysbindin の統合失調症におけるハプロタイプ解析と細胞生物学的機能解析-----	19
	功刀 浩	
3.	Rho GTPase 活性化タンパク chimerin 2 遺伝子と統合失調症との関連-----	25
	功刀 浩	
4.	セロトニントランスポーター遺伝子の変異検索と精神疾患との関連-----	31
	尾崎 紀夫	
5.	自殺を惹起する精神疾患における dihydroprimidinase-like 2 および frizzled-3 遺伝子相関研究-----	36
	氏家 寛	
6.	統合失調症の臨床症状における chromogranin B 遺伝子多型の影響--	48
	稲田俊也	
7.	不一致一卵性双生児の遺伝子発現差異解析による統合失調症感受性遺伝子の研究-----	54
	岡崎 祐士	
8.	神経発達障害仮説による遺伝解析-----	57
	今村 明	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	60

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子の解明

主任研究者 功刀 浩

研究要旨

近年、自殺が増加している。そこで本研究は、自殺を惹起する精神疾患として統合失調症、躁うつ病、薬物依存症などをとりあげ、これらの疾患感受性遺伝子を見出すことを目的とする。方法論的には、患者のゲノム DNA を多数収集し、神経発達に関与する遺伝子、セロトニン(5-HT)系遺伝子などを候補遺伝子として、遺伝子変異と疾患やその臨床症状との関連を検討している。感受性遺伝子であることが示唆されたものの一部については、細胞生物学的手法を用いて機能解析を行っている。また、一卵性双生児不一致例の遺伝子発現解析からの候補遺伝子の検索も行われた。

その結果、本年度は以下のような成果が得られた。

- 1) ニューロトロフィン共通の低親和性受容体 p75NTR 遺伝子のミスセンス変異 (S205L) が、大うつ病や自殺行動と有意に関連することを見出した。L205 アリルが大うつ病や自殺行動に対して予防効果をもつ可能性が示唆された。
- 2) 既報の統合失調症のポジショナルクローニングにおいて感受性遺伝子であることが示唆されている dysbindin について、ハプロタイプ解析を行い、日本人のサンプルでも統合失調症と有意に関連することを示した。また、ラット初代培養ニューロンを用いて、この遺伝子の過剰発現が中枢ニューロンのプレシナプスタンパクを増加させ、グルタミン酸放出量を増加させることなどを見出した。
- 3) Rho GTPase 活性化タンパクの1つである chimerin 2 遺伝子のミスセンス変異 (H204R) が男性において統合失調症と有意に関連することを見出した。
- 4) SSRI など抗うつ薬の標的タンパクである 5HTT 遺伝子 (SLC6A4) の変異検索を行い、機能的変化をもたらす稀なアミノ酸置換 Ile425Val を同定した。Val を有する個体は難治性・家族性強迫性障害があった。一方、SLC6A4 遺伝子の連鎖不平衡マッピングを行い、

ハプロタイプ解析を行ったが、統合失調症との有意な関連は認められなかった。

5) 神経突起の伸長や軸索のガイダンスに関わる **dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRPO-2)** の 3'非翻訳部分の*2236T>Cおよび1506T-*2236Cハプロタイプが統合失調症発症の防禦因子であることを見出した。一方、この遺伝子は双極性障害や覚醒剤精神病においては影響しないことも明らかにした。

6) 神経突起の伸長や軸索のガイダンスに関わる Wnt シグナル受容体の 1 つ **frizzled-3** 遺伝子について解析し、イントロン 3 の IVS3+258T>C および IVS3+258T-435G のハプロタイプが統合失調症の発症危険因子であることを明らかにした。

7) 昨年度に統合失調症との関連が見出された **chromogranin B** 遺伝子の変異について、本年度は統合失調症の臨床症状との関連について検討し、**chromogranin B** が錐体外路症状の発現危険性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

8) 統合失調症不一致一卵性双生児の遺伝子発現解析を行い、**profilin 1** 遺伝子 (染色体 17p13.3) 発現低下と **APOL1** (22q.12.3) 発現増強が認められた。

9) 統合失調症の身体小奇形と神経栄養因子 (**BDNF, NT-3, CNTF**) 遺伝子変異との関連を検討したが、有意な関連を認めなかった。

上記に記載した成果のうち、1)、3)、4)、5)、6)、8)は、それぞれ、**p75^{NTR}**、**chimerin 2**、**SLC6A4**、**DRPO-2**、**frizzled-3**、**profilin 1**、**APOL1**などの遺伝子が、うつ病、統合失調症、強迫性障害などの感受性遺伝子である可能性を示唆している。しかし、これを確かめるためには、さらに独立のサンプルで確認される必要がある。結果が確認されれば、遺伝子変異が遺伝子産物の機能にどのような影響を与えるかについて解析を行うことで、病態メカニズムを解明する上で極めて重要な知見が得られる可能性がある。2)は、**dysbindin**が統合失調症の感受性遺伝子であることを確認し、ニューロンにおける機能も明らかになりつつある。さらに詳細な機能解析を行うことで、統合失調症の病態発生メカニズムの解明、創薬標的分子の同定などに発展することが期待できる。

7)の知見は、**chromogranin B** 遺伝子型を決定することによって抗精神病薬の合理的な選択を行うことができる可能性を示唆し、やはり他のサンプルで結果が再現されれば、いわゆるオーダーメイド医療として臨床に応用可能である。

なお、全分担研究施設において、ゲノム DNA が順調に集まっている。これは、今後、遺伝子解析研究をさらに発展させる上で貴重なリサーチ・リソースとなる

分担研究者

功刀 浩	国立精神・神経センター・部長
岡崎祐士	三重大学医学部・教授
尾崎紀夫	名古屋大学大学院医学系研究科・教授
氏家 寛	岡山大学大学院医歯学総合研究科・助教授
稲田俊也	名古屋大学大学院医学系研究科・助教授
今村 明	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師

A. 研究目的

近年、自殺者数が急増している。人口動態統計（厚生労働省）によれば、1980年、1990年、1995年、2000年の自殺者数は20542人、20088人、21420人、30251人であり、1980～90年代前半までは概ね横ばいであったものが、1995年頃より急増し、年間3万人台に達している。これによって失われる寿命、経済への影響などは甚大であり、自殺によって親を失った子供への経済的・精神的影響なども社会問題となっている。従って、自殺や自殺を生じやすい精神疾患への対応策を探ることは、厚生労働行政において緊急な重要課題である。

自殺においては心理社会的要因が強く

関連することは明らかであり、家族や職場から得られるソーシャル・サポートが自殺予防に重要であることは言うまでもない。他方、自殺を生じやすい遺伝的素因が存在することも明らかにされており、それにストレスが加わることによって特有の脳の生物学的変化を生じ、自殺に至ると考えられている。事実、家系研究、双生児研究、養子研究によって自殺には遺伝的要因が強く働いていることが示されている。自殺の心理社会的側面に注目した対応策に関してはわが国でもいくつかの研究がなされつつあるが、遺伝的素因などの生物学的側面に関する研究は不十分である。

本研究は、分子遺伝学的手法を用いて、自殺行動ならびに自殺を生じやすい精神疾患の遺伝的素因を明らかにすることを目的とする。本研究では自殺を生じやすい精神疾患として、躁うつ病、精神分裂病と薬物依存症を中心にとりあげた。自殺者の2/3以上が躁うつ病（単極型ないし双極型）であるとされ、躁うつ病患者のおよそ1 / 5は自殺するとされる。また、統合失調症は、生涯罹患率がおよそ1%であり、常時およそ70万人の患者がいるとされるが（厚生労働省推計）、そのうち10～15%が自殺という不幸な転帰をたどることが知られている。欧米による統

計によれば、薬物依存症では概して一般人口より自殺の危険性が4倍以上高まることが知られている。

本研究によって、自殺行動や自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子が明らかになれば、自殺に至る脳の生物学的変化に関する重要な手がかりとなり、自殺の予防薬の開発などにおいて重要な知見を提供することが期待される。

B. 研究方法

1. サンプル収集 (担当: 全員)

自殺を惹起し易い精神疾患の患者のDNAサンプルを多数収集し、各症例について自殺未遂歴に関する情報を得ている。

サンプル収集に際しては倫理的側面に十分配慮した。すなわち、本研究は精神疾患患者、健常対照群を対象とした遺伝子解析研究であり、試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第1号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、研究施設での倫理委員会において承認に基づいて上で研究を行った。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報

の厳重な管理(匿名化)などを徹底した。

2. ニューロトロフィン低親和性受容体 p75^{NTR}遺伝子変異とうつ病・自殺行動との関連 (主たる担当: 功刀)

神経発達や神経可塑性において重要な働きをする神経栄養因子やその受容体は、近年統合失調症や躁うつ病などの機能性精神病の病態発生やその治療において重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで、功刀らは、ニューロトロフィン・ファミリー (NGF、BDNF、NT-3など) の共通の低親和性受容体である p75^{NTR} におけるミスセンス変異 (S205L) と大うつ病との関連について症例-対照研究によって統計的に検証した。さらに、うつ病患者の自殺企図歴を調査し、自殺行動との関連についても検討した。

3. Dysbindin の統合失調症におけるハプロタイプ解析と細胞生物学的機能解析 (主たる担当: 功刀)

欧米の先行研究によって統合失調症の感受性遺伝子である可能性が示唆されていた *dysbindin* について、日本人のサンプルを用いて検討した。5つの SNPs について TaqMan 法によって遺伝子型を決定し、ハプロタイプ解析をおこなったところ、有意な関連が見出され、リスクハ

プロタイプを同定した。ところが、**dysbindin** が神経系においてどのような機能をもっているかについては明らかではなかった。そこで、ラット初代培養による大脳皮質ニューロン系において **dysbindin** を過剰発現させ、プレシナプス分子への影響、グルタミン酸放出量の変化、神経細胞死への影響などをみた。その結果、**dysbindin** はこれらの神経細胞機能において重要な働きをしている可能性が示唆された。

4. Rho GTPase 活性化タンパク **chimerin**

2 遺伝子と統合失調症との関連 (主たる担当：功刀)

GTP 結合タンパクである Rho ファミリーは、神経突起の成長などを制御しており、神経ネットワーク形成において重要な働きをしている。そこで、このファミリーに属し、脳で豊富に発現している **chimerin 2** 遺伝子について、SNP のデータベース上登録されているミスセンス変異 **H204R** と統合失調症との関連について検討した。

5. セロトニントランスポーター遺伝子の変異検索と精神疾患との関連 (主たる担当：尾崎)

自殺の病因としてはセロトニン(5-HT)

系の異常が重要視されている。そこで、分担研究者の尾崎はセロトニン神経系を制御する遺伝子について変異検索を行い、精神疾患との関連を検討している。今年度は、SSRIなど抗うつ薬の標的タンパクであるセロトニントランスポーター (5HTT、または、**SLC6A4**) 遺伝子の変異検索を行い、稀な変異が見出された家系について詳細に検討した。また、**SLC6A4** 遺伝子の連鎖不平衡マッピングを行い、日本人統合失調症を対象としてハプロタイプ解析を行った。

6. 自殺を惹起する精神疾患における **dihydropyrimidinase-like 2** および **frizzled-3** 遺伝子相関研究 (主たる担当：氏家)

平成 14 年に行った覚醒剤精神病および統合失調症の動物モデルでの研究で、これら疾患の発症にはシナプス新生や神経発芽など長期可塑性にかかわる分子が関与していることが明らかになった。この動物実験の知見から、本年度では、神経突起の伸長や軸索のガイダンスに関わる分子、**dihydropyrimidinase-related protein 2** と **frizzled-3** 遺伝子の SNPs について、統合失調症、双極性障害、覚醒剤精神病との関連について解析した。

7. 統合失調症の臨床症状における chromogranin B 遺伝子多型の影響 (主たる担当: 稲田)

稲田らは、昨年度、本研究によって chromogranin B 遺伝子と統合失調症との関連を報告した。本年度は、統合失調症の臨床症状との関連について薬理遺伝学的に検討した。検討した臨床症状は、遅発性ジスキネジア、急性錐体外路症状、特定の精神症状を呈する4つの統合失調症患者部分群(幻覚・妄想、奇異な行動、解体、陰性症状)、若年発症群(22歳未満発症)、喫煙習慣の有無、などである。

8. 不一致一卵性双生児の遺伝子発現差異解析による統合失調症感受性遺伝子の研究 (主たる担当: 岡崎)

岡崎は、一卵性双生児発症不一致例の遺伝子発現差異を検討することで、発症に関与する候補遺伝子を絞り込む画期的な方法を採用している。実際は、32歳健康男性一卵性双生児1組及び統合失調症不一致男性双生児1組の培養リンパ芽球からRNAを精製し、DNAマイクロビーズを用いた遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現の異なるものを同定した。

9. 神経栄養因子遺伝子変異と身体小奇形との関連 (主たる担当: 今村)

今村は、統合失調症の神経発達障害仮

説に基づき、神経発達の指標となり、統合失調症に多いことが指摘されている身体小奇形についてWaldropスケールを用いて評価し、神経栄養因子遺伝子(BDNF、NT-3、CNTF)のマイクロサテライト多型との関連について検証した。

C. 研究結果

1. サンプル収集

各施設において、自殺を惹起する精神疾患のゲノム収集が順調に行われている。たとえば、主任研究者の功刀は、国立武蔵病院においてゲノム収集を行い、平成15年度に、機能性精神疾患患者とコントロールサンプル計およそ180例のゲノムとその臨床情報を収集した。氏家らは、覚醒剤依存症の遺伝子研究の全国組織(JGIDA)にて、ゲノムサンプルを収集しているが、現在まで、218名の患者サンプルの収集に成功し、国内外でも最大のジーンバンクとなった。他の分担研究施設でも非常に多数のゲノムDNAサンプルが集められている。

2. ニューロトロフィン低親和性受容体 p75^{NTR} 遺伝子変異とうつ病・自殺行動との関連 (主たる担当: 功刀)

ニューロトロフィン・ファミリーの共通の低親和性受容体である p75^{NTR} におけるミスセンス変異(S205L)と大うつ病と

の関連について症例—対照研究によって統計的に検討した。その結果、このミスセンス変異が大うつ病や自殺行動と有意に関連することを見出した($p<0.05$)。L205 アリルは、コントロール群と比較して、うつ病患者、中でも自殺企図歴を有する者には少なく、このアリルがうつ病発症や自殺行動に対して防禦効果をもつ可能性が示唆された。

3. Dysbindinの統合失調症におけるハプロタイプ解析と細胞生物学的機能解析 (主たる担当：功刀)

Dysbindin について、日本人の統合失調症サンプルを用いて検討した。5つのSNPsについて TaqMan 法によって遺伝子型を決定したところ、1つのSNPについて、有意な関連 ($p=0.022$) を認めた。さらに permutation 法によるハプロタイプ解析をおこなったところ、有意な関連が見出され($p=0.0004$)、リスクハプロタイプを同定した。

そこで、ラット初代培養による大脳皮質ニューロン系において dysbindin を強制発現させ、プレシナプス分子への影響、グルタミン酸放出量の変化、神経細胞死への影響などをみた。その結果、dysbindin の強制発現によりグルタミン酸の放出の増加と、SNAP25 やシナプシ

ン1などのプレシナプス分子の発現の増加が認められた。また、神経細胞の基本的な機能である生存度において検討したところ、dysbindin の強制発現は血清除去による神経細胞死を減少させ、その効果は、PI3 kinase の阻害剤である LY294002 によって抑制された。また dysbindin の強制発現により Akt のリン酸化が増加することから dysbindin は PI3K-Akt シグナルを介して神経細胞保護作用を持つ可能性が示唆された。

4. Rho GTPase 活性化タンパク chimerin 2 遺伝子と統合失調症との関連 (主たる担当：功刀)

Rho GTPase 活性化タンパクである chimerin 2 をコードする遺伝子の H204R ミスセンス多型について、統合失調症との関連解析を行ったところ、男性において遺伝子多型分布が、患者群とコントロール群の間で有意に異なるが ($p<0.05$)、女性ではその違いは認められなかった。すなわち、男性において R204 アリルは、コントロール(16.9%)と比較して、統合失調症患者(23.8%)により多く認められた($p<0.05$, odds ratio 1.53, 95%CI 1.07-2.20)。以上から、chimerin 2 遺伝子の R204 アリルは、男性の統合失調症の脆弱性を高める可能性が示唆された。

5. セロトニントランスポーター遺伝子の変異検索と精神疾患との関連
(主たる担当：尾崎)

SSRIなど抗うつ薬の標的タンパクである5HTT遺伝子(SLC6A4)の変異検索を行い、精神障害との関連を検討した。その結果、機能的変化をもたらす稀なアミノ酸置換Ile425Valを同定した(白人家系)。Valを有する個体は難治性・家族性強迫性障害があり、同時にこの遺伝子のプロモーター領域にあり、転写活性に影響を与えるとされる5HTTLPRにおいてはLL型であった。

一方、SLC6A4遺伝子の連鎖不平衡マッピングを行い、ハプロタイプ解析を行ったが、日本人統合失調症との有意な関連は認められなかった。

6. 自殺を惹起する精神疾患におけるdihydropyrimidinase-like 2 およびfrizzled-3 遺伝子相関研究(主たる担当：氏家)

氏家らは、神経突起の伸長や軸索のガイダンスに関わる、dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRPO-2)とfrizzled-3 遺伝子について、それぞれ複数のSNPsをマーカーとして、統合失調症、双極性障害、覚醒剤精神病

を対象に解析した。その結果、DRPO-2の3'非翻訳部分の*2236 T>C および1506T-*2236C ハプロタイプが統合失調症発症の防禦因子であることを発見した。一方、この遺伝子は双極性障害や覚醒剤精神病においては影響しない事も明らかにした。また、frizzled-3 遺伝子では、イントロン3のIVS3+258T>C およびIVS3+258T-435Gのハプロタイプが発症危険因子であることを明らかにした。

7. 統合失調症の臨床症状におけるchromogranin B 遺伝子多型の影響(主たる担当：稲田)

稲田らは、chromogranin B遺伝子と統合失調症の臨床症状との関連について薬理遺伝学的に検討した。その結果、抗精神病薬投与初期における錐体外路症状発症の有無の確認できた患者65名(有30 vs 無35)については、1058G/C、1104G/A、1250G/Aの3つのSNPsにおいて有意差が認められた。また、若年発症群48名についてもこれら3つのSNPs全てにおいて有意差が認められた。以上から、chromogranin B遺伝子の変異は、統合失調症において錐体外路系副作用の出現などに関する脆弱性を規定する要因である可能性などが示唆された。

8. 不一致一卵性双生児の遺伝子発現差

異解析による統合失調症感受性遺伝子の研究（主たる担当：岡崎）

一卵性双生児発症不一致例を対象とした遺伝子発現差異の解析では、健常双生児、統合失調症不一致一卵性双生児共に、相手と比較して発現が増加または低下している遺伝子をソートしたところ、約300個程度のクローンが得られた。このうち3クローン以上の出現を再現性ありとし、健常MZで発現増強や低下がない遺伝子を抽出した。発現低下4遺伝子、増強14遺伝子が得られ、ノイズや不確実な物を除外したところ、**profilin 1** 遺伝子発現低下と**APOL1**発現増強が認められた。

9. 神経栄養因子遺伝子変異と身体小奇形との関連（主たる担当：今村）

今村は、統合失調症における身体小奇形と神経栄養因子遺伝子(**BDNF**、**NT-3**、**CNTF**)のマイクロサテライト多型との関連について検証したが、いずれの遺伝子についても統計学的に有意な関連は認められなかった。

D. E. 考察および結論

以上のうち、遺伝子関連研究によって、自殺を惹起する感受性遺伝子として、**p75^{NTR}** 遺伝子（うつ病・自殺行動）、**dysbindin**（統合失調症）、**chimerin 2**（男

性統合失調症）、**SLC6A4**（強迫性障害）、**DRPO-2**（統合失調症）、**frizzled-3**（統合失調症）が同定された。しかし、これを確かめるためには、さらに独立のサンプルで関連が確認される必要がある。結果が確認されれば、今後、遺伝子変異が遺伝子産物の機能にどのような影響を与えるかについて解析を行い、病態メカニズムを解明につながる知見となる。なお、自殺との関連をみるには、自殺既遂者のゲノムサンプルなどを用いて、自殺との関連を行うことが必要である（H16年度に予定している）。

Dysbindinについては、欧米だけでなく、わが国のが統合失調症でも関連が確認されたことから、感受性遺伝子である可能性が強く示唆される。培養細胞に過剰発現させることによる機能解析においても、グルタミン酸の放出の増加や、**PI3K-Akt** シグナルを介して神経細胞保護作用を持つ可能性が示唆された。これは、**dysbindin** 遺伝子の機能的変異によって **loss of function** が生じ、グルタミン酸系の機能低下および細胞保護作用の低下が生じている可能性を示唆する。今後さらに詳細な機能解析を行うことで、統合失調症の病態発生メカニズムの解明、創薬標的分子の同定などに発展することが期待できる。

Chromogranin B遺伝子型は、錐体外路系副作用の出現などと関連していることが明らかになった。この知見が他のサンプルでも確認されれば、この遺伝子の遺伝子型を決定することによって抗精神病薬の合理的な選択を行うことができる可能性を示唆し、いわゆるオーダーメイド医療として臨床に応用可能である。

統合失調症に関する一卵性双生児不一致例の遺伝子発現解析において、profilin 1 遺伝子 (染色体 17p13.3) 発現低下と APOL1 (22q.12.3) 遺伝子の発現増強が認められた。これらの遺伝子については、変異が発病危険性と関連するか否か、メチレーションなどのエピジェネティックな要因と関連するか否かなどについて、検討していく価値がある。

統合失調症における身体小奇形と神経栄養因子などの神経発達障害関連遺伝子との関連については、今回、統計的に有意な関連は見出されなかったが、次年度以降、症例を増やすと共に、他の候補遺伝子について検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 (主要なものを選択)

Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H: A missense polymorphism (H204R) of a Rho GTPase-activating protein, the chimerin 2 gene, is associated with schizophrenia in men. Schizophr Res (in press)

Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H: Association analysis of the -308G > A promoter polymorphism of the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene in Japanese patients with schizophrenia. J Neural Transm 111: 217-221, 2004.

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)

Inada T, Nakamura A, Iijima Y: Relationship between catechol-O-methyltransferase polymorphism and treatment-resistant schizophrenia. Am J Med Genet 120B: 35-39, 2003.

Inada T, Senoo H, Iijima Y, Yamauchi T, Yagi G: Cytochrome P450 II D6 gene polymorphisms and the neuroleptic-induced extrapyramidal symptoms in Japanese schizophrenic patients. Psychiatr Genet 13: 163-168, 2003.

Japanese schizophrenia sib-pair linkage

- group (JSSLG): Initial genome-wide scan for linkage with schizophrenia in the Japanese schizophrenia sib-pair linkage group (JSSLG) families. *Am J Med Genet* 120: 22-28, 2003.
- 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. *Nat Genet* 35: 171-175, 2003.
- 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)
- Nakata K, Ujike H, Sakai A, Takaki M, Imamura T, Tanaka Y, Kuroda S: The human dihydropyrimidinase-related protein 2 gene on chromosome 8p21 is associated with paranoid-type schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53: 571-576, 2003.
- Nakata K, Ujike H, Tanaka Y, Takaki M, Sakai A, Nomura A, Katsu T, Uchida N, Imamura T, Fujiwara Y, Hamamura T, Kuroda S: No association between the dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene and bipolar disorder in humans. *Neurosci Lett* 353: 53-56, 2003.
- 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.
- Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T, Katsu T, Tanaka Y, Hamamura T, Kuroda S: Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. *Neurosci Lett* 337: 17-20, 2003.
- 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: 55-64, 2004.
- Ozaki N, Goldman D, Kaye WH, Plotnicov K, Greenberg BD, Lappalainen J, Rudnick G, Murphy DL: Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype. *Mol Psychiatry* 8: 933-936, 2003.
- Suzuki E, Kitao Y, Ono Y, Iijima Y, Inada T. Cytochrome P450 2D6 polymorphism and character traits. *Psychiatr Genet* 13: 111-113, 2003.
- 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: 242-247,

2003.

(学会発表：省略)

H. 知的財産権の出願・登録状況

橋本亮太、功刀 浩：躁うつ病の発病しやすさに影響する遺伝的素因を有するか否かを検査するための方法。（国立精神・神経センター職務発明委員会承認済、ヒューマンサイエンス振興財団より特許出願予定）

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

ニューロトロフィン低親和性受容体 p75^{NTR} 遺伝子変異と うつ病・自殺行動との関連

主任研究者 功刀 浩*

共同研究者：橋本亮太*、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。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、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いる。本研究では、BDNF や NGF などのニューロトロフィン・ファミリーに共通の低親和性受容体 p75^{NTR} をコードする遺伝子のミスセンス変異と大うつ病との関連解析を行った。

対象は、164 名の大うつ病患者群 (DSM-IV) (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。SNPs のデータベース上、p75^{NTR} 遺伝子に関して登録されているミスセンス変異(S205L : rs207244)について、PCR と制限酵素による RFLP によって遺伝子型を決定した。その結果、遺伝子型分布の比較では、L205 アリルをもつ者の割合は、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 アリルは、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)。さらに、この傾向は自殺企図歴をもつ群で顕著であった。以上より、L205 アリルは、うつ病発症や自殺行動に対する予防効果がある、あるいは、S205 アリルはうつ病発症や自殺行動の危険性を高める可能性が示唆された。

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^{8,9)}、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^{4,6)}。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^{3,5,7)}。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 などのニューロトロフィン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うつ病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) のデータ・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。

対象と方法

対象は、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。また、患者

群の診療記録を調査し、自殺企図歴の有無に関する情報を得た。

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。文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、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。

SNPs のデータベース上のミスセンス変異 (S205L) を含むフラグメントをプライマー 5'-gctaaaaggaggaggagtgggggaag-3' と 5'-ttcaggtcaaggtcacagcaaagtct-3' を用いて PCR で増幅し、制限酵素 BanII で消化した。PCR 産物の切断後のバンドを電気泳動とエチジウムブロマイド染色で可視化して遺伝子型を決定した。

結果

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表 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)。

このような傾向は、患者群の中でも自殺企図歴をもつ群で特に強かった (表 1)。

考察

P75^{NTR} のミスセンス変異 S205L と大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 対立遺伝子は大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、大うつ病発症の脆弱性を与える可能性が示唆された。この関連は、特に自殺企図歴をもつ群で強かったことから、この変異は、自殺行動と関連する可能性も示唆された。

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。

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) 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.

表 1 p75^{NTR} 遺伝子 S205L 多型に関する患者群と健常者群での遺伝子型分布と対立遺伝子頻度

	遺伝子型分布				対立遺伝子頻度		
	N	S/S	S/L	L/L	N	S	L
患者群							
合計	164	143 (87%)	21 (13%)	0 (0%)	328	307 (94%)	21 (6%)
自殺企図 有	46	42 (91%)	4 (9%)	0 (0%)	92	88 (96%)	4 (4%)
自殺企図 無	118	101 (86%)	17 (14%)	0 (0%)	236	219 (93%)	17 (7%)
健常者							
	164	129 (79%)	33 (20%)	2 (1%)	328	291 (89%)	37 (11%)

健康危険情報

depressive disorder and attempted suicide.

特になし

Am J Med Genet (in press)

論文発表

知的財産の出願・登録状況

Kunugi H, Hashimoto R, Yoshida M, Tatsumi

特になし

M, Kamijima K: A missense polymorphism

(S205L) of the low-affinity neurotrophin

receptor p75^{NTR} gene is associated with

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

Dysbindin の統合失調症におけるハプロタイプ解析と 細胞生物学的機能解析

主任研究者 功刀 浩*

共同研究者：橋本亮太*、沼川忠広*、矢ヶ崎有希*、尾崎紀夫**、岩田仲生***、
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

**名古屋大学大学院医学研究科精神医学講座

***藤田保健衛生大学医学部精神医学教室

****昭和大学医学部精神医学教室

研究要旨

Dysbindin (Dystrobrevin binding protein 1; DTNBP1)は、2002年に統合失調症の遺伝子解析によってその脆弱性遺伝子である可能性が指摘された遺伝子である。今回われわれは、dysbindin の5つの SNPs について、日本の統合失調症サンプル（患者群 296 例、コントロール 317 例）による関連研究を行い、そのうちの一つの SNP において有意な関連 ($p=0.022$) を認めた。さらに permutation 法によるハプロタイプ解析においても有意な関連 ($p=0.0004$) を認めた。以上から、dysbindin は日本人においても統合失調症と関連していることが支持された。しかし、dysbindin の神経細胞における機能については、未だ報告がまったくない。そこで、ラット大脳皮質ニューロンの初代培養系にてウィルスベクターを用いた強制発現を行い、神経細胞機能を検討した。

Dysbindin は、プレシナプスに発現していることから、グルタミン酸系への影響を検討すると、Dysbindin の強制発現によりグルタミン酸の放出の増加と、SNAP25 や シナプシン 1 などのプレシナプス分子の発現の増加が認められた。また、神経細胞の基本的な機能である生存度において検討したところ、dysbindin の強制発現は血清除去による神経細胞死を減少させ、その効果は、PI3Kinase の阻害剤である LY294002 によって抑制された。dysbindin の強制発現により Akt のリン酸化が増加することから dysbindin は PI3K-Akt シグナルを介して神経細胞保護作用を持つことが示唆された。

以上により、dysbindin は、1) 統合失調症の脆弱性遺伝子であり、2) グルタミン酸の放出を促進する機能を持ち、3) PI3K-Akt シグナル伝達系を介して神経細胞死を抑制することが示唆された。

目的

染色体6p領域は、統合失調症に関する多くの連鎖研究において連鎖が示唆されており、疾患感受性遺伝子が存在する可能性が指摘されている(1)。最近、アイルランドのサンプルを用いた研究により、この領域上にある **dysbindin (DTNBP1: dystrobrevin binding protein 1)** という遺伝子が統合失調症と関連することが報告された(2)。その後、5つの研究でDTNBP1遺伝子の変異と統合失調症との関連が支持されている(3-7)。そこで、本研究では、この関連が日本人のサンプルでも再現するか否かについて検証した。

さらに、**dysbindin**が神経細胞に対してどのような機能をもっているかについては、今のところ殆どわかっていない。そこで、本研究ではラット初代培養ニューロンを用いて、**dysbindin**を過剰発現させ、シナプス機能、グルタミン酸放出機能、シグナル伝達、神経細胞死などに対する影響をみた。

対象と方法

関連研究に用いた対象は、統合失調症患者296名と年齢・性についてマッチした317名のコントロール群である。診断はDSM-IVに基づいて行った。コントロール群は精神科受診歴がないことを確認した。

全ての対象に対して、研究について十分説明した上で、研究参加について書面で同意を得た。また、検体は匿名化された状態で実験を行った。文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第1号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、各共同研究施設での倫理委員会において承認に基づいて上で研究を行った。

Straubら(2)による先行研究で用いられた SNPs (single nucleotide polymorphisms) のうち、肯定的結果が得られてた5つのSNPs (P1763, P1320, P1325, P1635, P1655)を選んで、遺伝子型を決定した。遺伝子型の決定は、TaqMan 法で行った。

ラットの初代培養系は、2～3日令のラットの脳を用いた。**Dysbindin** のcDNAをプラスミド(pSinEGdsp)に組み込み、シンドビスウイルスで感染させ、可視化するためにGFP (green fluorescent protein) と共に発現させた。培養細胞のライゼートについて前シナプスの膜タンパクやシナプス小胞と関連する抗SNAP25抗体、抗synapsin I抗体、抗synaptotagmin 抗体、抗syntaxin抗体、さらに抗GFP抗体、抗**dysbindin**抗体、抗TUJ1抗体、抗Akt抗体、抗リン酸化Akt抗体を用いてウェスタン・ブロッティングを行い、タンパク量の