

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡崎 祐士

平成16(2004)年 4月

目 次

I 総括研究報告

- 双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明に関する研究----- 1
岡崎祐士

II 分担研究報告

- 1 精神疾患不一致一卵性双生児におけるDNAマイクロアレイを用いた
原因遺伝子の同定----- 9
加藤忠史
(資料1枚)
- 2 一卵性双生児精神疾患不一致例のゲノム差異同定法の開発と応用----- 11
辻田高宏
(資料3枚)
- 3 MRI脳画像SPM処理による発達脳部位の同定-----22
齋藤 治
(資料2枚)
- 4 光トポグラフィー装置を用いた脳機能発達の測定----- 32
福田正人
(資料1枚)
- 5 脳形態 脳機能発達と関連して発達する心理機能の測定と同定 ----- 39
丹野義彦
- 6 精神疾患双生児登録の全国的拡大----- 44
岡崎祐士
- 7 健常双生児登録の創設に関する研究----- 46
浅香昭雄・佐々木司

III 研究成果の刊行に関する一覧表

- 研究成果の刊行に関する一覧表-----49

IV 研究成果の刊行物 別刷 -----53

- 原著
総説
著書
マスコミ報道

I. 総括研究報告

双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明

主任研究者 岡崎祐士 三重大学医学部教授

研究要旨

精神疾患の成因として寄与が最も大きい遺伝要因と、精神疾患の病態の座としての脳の形態学的・機能的発達過程の詳細及び精神疾患患者におけるその発達の偏奇を双生児法によって明らかにしようとするものである。疾患関連遺伝子研究は通常、連鎖関連研究によって行われるが、多因子性 common disease としての精神疾患の遺伝子研究は、民族差や家系差、遺伝的異質性の存在が確実にされるため、個別性に応える研究方法でなければならない。

その要請に応える研究戦略として主任研究者らが工夫した方法は、遺伝的背景が同一の一卵性双生児を対象に、ゲノム・遺伝子解析技術や精密な脳画像解析技術を適用する方法である。具体的には一卵性双生児精神疾患不一致例において遺伝子発現の差異とゲノムの差異を見出して、精神疾患罹患と非罹患に関連する遺伝子発現と遺伝子発現修飾機構の差異を同定する。また、一卵性双生児(2人の双生児間差異は標準分散の範囲と見なせる)と健常者における小児期から成人前期までの脳形態(MRI)機能(NIRS)の発達経過を解明し、同時期の精神疾患患者の脳発達に偏奇があるか否かを解明しようとするものである。この過程を通じてまた独自に精神疾患及び健常双生児登録の拡大・創設を目指す。この双生児登録は精神保健、母子保健、人類遺伝学等幅広い研究支援条件となる。対象疾患は統合失調症、双極性障害、自閉症の他、パニック障害、あるいは摂食障害、ナルコレプシーをも視野においている。従って本研究は、主な精神疾患の成因と病態解明による治療法(薬)開発のヒント、疾患への予防的介入の時期(年齢)、子どもから思春期を経て大人に至る脳とこころの発達過程、精神保健諸施策の研究支援条件などの貴重な情報を提供するものである。

平成15年度は、一卵性双生児精神疾患不一致例の遺伝子発現差異とゲノムの差異の検出において、双極性障害で XBP1 遺伝子に今までの報告で最大オッズ比を示す多型を発見し、報告した(Kakiuchi et al Nature Genetics 2003)。また、自閉症で候補遺伝子を見出した。自閉症、統合失調症の一卵性双生児罹患者と非罹患者の遺伝子プロモータ領域のメチル化に差異を認めた。また、脳の形態と機能の発達経過解明の準備を完了し、双生児成人を対象とする予備研究で脳の部位による遺伝と環境の影響の差異を確認した。「精神疾患双生児全国共同研究」は27大学3研究機関に拡大し、59組の双生児を発見した。健常双生児登録立ち上げの準備も完了した。16年度の大きな成果が期待される。躁うつ病関連遺伝子 XBP1 と NIRS による脳血流と精神科診断への応用可能性のニュースは、テレビ、新聞等で報道された。

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 チームリーダー
止田高宏 長崎大学大学院医歯薬総合研究科 講師
斎藤 治 国立精神神経センター 武蔵病院 部長
福田正人 群馬大学医学部 助教授
丹野義弘 東京大学大学院総合文化研究科 助教授
浅香昭雄 慶友会城東病院 院長 日本双生児研究会会長
佐々木司 東京大学 保健管理センター

A 研究目的

本研究は精神疾患研究における主要な2つの課題つまり精神疾患感受性遺伝子の同定、及び神経発達障害仮説の実体的過程の解明を、自然か与えた実験条件である双生児を対象に、新しい分子遺伝学的手法や精密で無侵襲脳画像法を適用して行おうとするものである。さらに精神疾患と健常双生児の登録を確立して精神疾患及び保健研

究、あるいは人類遺伝学的研究リソースの確立を期する。

具体的には、以下の3課題、7研究に具体化した。

課題1 一卵性双生児表現型不一致例のゲノム解析による

疾患感受性遺伝子と遺伝子発現修飾機構の同定

- (1) 精神疾患不一致一卵性双生児におけるDNAマイクロアレイを用いた原因遺伝子の同定
- (2) 一卵性双生児精神疾患不一致例のゲノム差異同定法の開発と応用

課題2 双生児における精神発達に伴い構造的 機能的に変化 発達する脳局所の同定

- (1) MRI脳画像SPM処理による発達脳部位の同定
- (2) 光トポグラフィー装置を用いた脳機能発達の測定
- (3) 脳形態 脳機能発達と関連して発達する心理機能の測定と同定

課題3 研究リソースとしての精神疾患双生児及び健常双生児登録の拡充 創設

- (1) 精神疾患双生児登録の全国的拡大
- (2) 健常双生児登録の創設に関する研究

課題3は独自の研究課題であるが、登録される双生児の発見によって、課題1及び2の対象となるという相互に促進し合う関係にある。

研究は以下のように組織されている。対象疾患は、統合失調症、双極性障害、自閉症、パニック障害の他、ナルコレプシー、あるいは摂食障害である。課題1では、成因の遺伝的側面について、一卵性双生児精神疾患不一致例の罹患双生児と非罹患双生児間の遺伝子発現差異(研究1)から、罹患または非罹患に関連する遺伝子を同定する、またゲノムの差異(研究2)から遺伝子発現差異に影響を与えるゲノム内メカニズム(メチル化など)を探るというアプローチである。この課題によって関連候補遺伝子及び発現修飾機構が解明できれば、分子病態をターゲットにした新たな治療法や治療薬の開発、及び予防的な介入の方法も創出されるかも知れない。統合失調症、双極性障害など伝統的な主要精神疾患は、自殺率も高く人類に与える損失(障害 期間または経済的損失)がいずれも全疾患中 10 位以内に数えられている。人類に与える損失で同じく 10 位以内にランクされているうつ病も、双極性障害(うつ病相と躁病相を有する)の成因解明によってその解明も進むと考えられる。パニック障害と摂食障害は、統合失調症、双極性障害の2倍以上の罹病危険率と推定され、思春期から成年期の若年層を中心に急増している疾患であり、その解明の社会的意義は極めて大きい。自閉症、ナルコレプシーは頻度は前者に比較して1オクター低いが、全汎性発達障害と睡眠障害の代表的疾患であり、その遺伝的側面の解明の社会的意義は大きい。

課題2は、統合失調症、双極性障害、パニック障害、自閉症などで判明している脳の構造的(研究1) 機能的(研究2)な異常か、個体発生過程のいつ頃明らかになるのかを同定しようとするものである。この2つの研究は、精神疾患の客観的な診断基準(脳画像による)の開発という副産物が期待できる。また逆にそのような脳の変化に伴って心理機能はどのように展開するのか(研究3)を明らかにする。例えば統合失調症では、発症時には既に脳構造の異常か程度の差こそあれ存在し、発症後軽度進行するらしいことが判明している。しかし個体発生にいつ頃に変化が生じるのかは分かっていない。これが分かれば、社会心理的介入、あるいは行来の薬物等による安全な介入の時期が明らかに出来る可能性がある。また脳の形態学的 機能的発達過程の基礎データが作成出来れば、思春期の「切れる」ところと脳発達の何らかの問題が関連しているのかを検討して

きるようになる。

課題3は、課題1 2の対象リクルートの役割があるか、独自に研究1(精神疾患双生児登録)では、世界最大サンプル数の統合失調症双生児の発見を目指している。そのような大きなサンプルで、今まで検討されてきた診断一致率、出生順位効果、周産期障害の罹患への影響、胎盤(羊膜 絨毛膜)状態の影響などを検討できる。精神疾患のリスクファクターの同定や予防策、周産期保健、多胎児保健施策等に有益な情報を提供する。健常双生児登録の創設(研究2)は、先進国及びアジア主要国としては双生児登録を持たない唯一の国である日本に人類遺伝学上、母子保健施策、一般保健施策上必須の課題である。大きな双生児登録があると、あらゆる疾患の双生児診断一致率を算出でき、その疾患の遺伝因と非遺伝因の関与の相対的大きさが分かる。また健常一卵性双生児間の発達の差異は、ヒトの個体発達における固有分散に近似できるかも知れない。このように課題3は、保健施策や保健行政上の有益な情報を生み出す可能性がある。

B 研究方法

各課題 各研究は以下のような独自開発及び既存の方法を双生児という人類に与えられた実験的機会に適用して、精神疾患の発症に至る仕組みを解明して、治療と予防法の開発、保健施策情報を得ようとするものである。

課題1

研究1 Affimetnx社製マイクロアレイまたはTAKARA BIOのビーズマイクロアレイに、株化樹立した末梢血リンパ芽球のtotal mRNAを適用し、対照双生児よりも発現が亢進または低下している遺伝子を同定する。このパラダイムが独自開発である。

研究2 採用するDifferential display 法は、原法のRLGSを改良しスポットに含まれるDNA量を2桁増やしクローニングを容易にしたものである。このFRGP (fluorescence representational genomic profiling)は、研究協力者山下によって開発されたものである。

課題2

研究1 脳のマクロ形態学的変化を見るために3次元脳構造画像(3D-MRI)を年齢群間でSPM (statistical parametric mapping)処理を行い、変化部位を同定する。加えて拡散テンソルイメージングDTI(Diffusion Tensor Imaging)を行い、神経線維路の発達過程も解析する予定である。DTIには独自に開発された画像化ソフトウェア(増谷佳孝、東大病院放射線科)、及び昨年確立したfractional anisotropy(FA)値に関するSPM処理を用いた定量的画像解析のための正常データベースか力を発揮する。

研究2 頭部用の多チャンネル近赤外線スペクトロスコピーnear infrared spectroscopy(NIRS)を用いるか、この技術や装置はもっはらわが国で開発され、世界をリードしている極めて安全で、時間解像度にすぐれた画像装置である。本研究では、主に前頭葉 側頭葉に焦点を当てその機能発達を測定する。

研究3 特別の技術は用いないか、個体の発達を脳の形態 機能の発達に関連つけた心理機能発達の変化は意外に解析されていない。

課題3

研究1 統合失調症をはじめとする精神疾患双生児登録を、全国共同研究組織によって発見し、予め定めた共同研究テーマのみを全国的合算し、その結果を発表公表する手続きを行う。発見の方法は精神科医療 保健施設へである。

研究2 健常双生児登録の創設は、その意義に関する啓

発と理解が必要であるので、双生児をもつ母親や父親の会、及び双生児を教育研究の目的で毎年入学させている東京大学付属中高校卒業生組織等の協力を得ながら進めていく。

(倫理面への配慮)

課題1は通常の診療で行われるのと同程度の量の末梢血採血という資料提供、遺伝子発現やゲノム差異解析から遺伝子多型の特定や相関研究にわたる場合があり、課題2は無侵襲ではあるがMRIとNIRS検査に協力をいただく。課題3も含めて健常者及び精神疾患に罹患している方の個人情報や医学的診断情報あるいは上記検査情報と共に研究者によって把握される。従って、その情報の漏洩による心理的社会的不利益を引き起こす可能性があり、厳重なプライバシーの保護が必要である。本研究は上記のように遺伝子解析研究に及ぶ可能性がある研究であり、全経過を通して、厚生労働省、文部科学省、経済産業省の「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)に従って、各研究者の所属する施設の倫理審査委員会において承認を受けて進める。研究協力者 資料提供者の「参加は自発的なもの」に限り、協力はいつでもどの段階でも撤回か出来、断つても何ら差別や不利益がない」原則にのっとり、文書による説明と同意により進める。個人情報はと資料及び検査結果は連結可能保存されるか、個人情報管理責任者のもとで厳重に管理される。すでに前研究計画について、主任研究者の所属施設(三重大学医学部研究倫理委員会平成15年6月6日付け)での承認を受けており、分担研究者、研究協力者の施設においても15年度承認の手続きを行った。

C 研究結果

各課題 研究毎の平成15年度の研究結果は以下の如くである。課題1は極めて大きな成果を上げ、課題2は技術的準備を完了し双生児対象のパイロット研究において極めて重要な知見を得た。課題3は研究1が共同研究組織を更に大きく59組の精神疾患双生児を発見、研究2は健常双生児登録創設の具体的手かかりを得た。

課題1 一卵性双生児表現型不一致例のゲノム解析による疾患感受性遺伝子と遺伝子発現修飾機構の同定

<研究結果>

研究1 マイクロアレイによる遺伝子発現差異の解析による感受性遺伝子のクローニング

一卵性双生児双極性障害不一致例の培養リンパ芽球様細胞における遺伝子発現解析により、双極性障害患者でXBP1およびGRP78という、小胞体ストレス経路の遺伝子の発現が低下していることを見出した。症例対照研究でも、小胞体ストレスに対するXBP1およびGRP78の反応が低下していた。XBP1遺伝子の上流には、XBP1自身の結合配列を失わせる-116G多型が存在するか、-116Gは、XBP1依存性のプロモーター活性を低下させ、-116Gを持つ培養リンパ芽球様細胞および末梢Bリンパ球では、小胞体ストレスに対するXBP1上昇反応が低下していた。この多型に関して遺伝子関連研究を行ったところ、双極性障害と有意に関連していた。日本人におけるオッズ比は4.6であり、これは双極性障害相関研究で報告されたものの値よりも大きいもので、Nature Genetics誌上にKakiuchi et alとして掲載された(2003年10月号)。気分安定薬ハルプロ酸がGRP78の発現を増大させることもあり、小胞体ストレス反応回路とXBP1 GRP78等は新しい躁うつ病創薬ターゲットであると期待される。

研究2 Differential display 法によるゲノム差異の探索、とくに後成的修飾機構の関与の検討

<研究結果>

一卵性双生児自閉症不一致例のゲノム差異を検出する目的で、FRGP法を適用した。双生児間でシグナル強度の強弱に差異のある4スポットを検出した。変異スポットのうち2スポットについてDNA断片をゲルより回収し塩基配列を決定したところ、それぞれ4番染色体短腕(4p14)と12番染色体長腕(12q24.1)のBACクローンと完全に一致した。これらの配列はHIP2(Huntingtin interacting protein 2)遺伝子など4遺伝子と一致していることがわかった。メチル化感受性制限酵素であるHpaIIと、同じ認識部位を持つメチル化感受性の異なるMspIを用いて、Iの変異スポットから得られた塩基配列と一致した遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を一卵性双生児自閉症不一致例で比較した。健常双生児に比べて自閉症罹患双生児の方が同領域のメチル化の程度が大きいことを示唆する結果となった。また、一卵性双生児統合失調症不一致例で、dopamine D2 receptor gene (DRD2)のプロモーター領域のHpaII/MspI領域を同様の方法で検討したところ、統合失調症罹患双生児の方がメチル化の程度が大きい傾向がみられた。FRGP法は、一卵性双生児のゲノム差異解析に非常に有用性が高いことが判明した。

課題2 双生児における精神発達に伴い構造的・機能的に変化 発達する脳局所の同定

研究1 MRI脳画像SPM処理による年齢依存性発達 変化部位の同定

<研究結果>

今年度は、本研究ではMRI脳構造画像法(structural MRI sMRI と略す)として、3次元脳構造画像(3D-MRI)と近年実用化が可能となった拡散テンソル画像(diffusion tensor imaging, DTI)を採用した。DTIは、脳の形態学的発達指標である神経線維の髄鞘化(myelination)に対して高感度な画像法である。昨年度は、DTI画像から得たfractional anisotropy(FA)値に関するSPM処理を用いた定量的画像解析のための正常データベースを構築した。今年度は①正常FAデータベースに対して個人脳のFA値の偏倚を定量評価するソフトウェアを開発、②①を用いた健常一卵性双生児ペア共通な偏倚(遺伝要因)と相異なる偏倚(環境要因)の脳部位を確認した。さらに技術面では、③高解像度3D-MRIの短時間撮像の実用化を図った。今年度の研究を通して、ヒト脳各構造の個体発生過程に遺伝と環境の各要因が優位に関与する脳部位を抽出する研究の実用化を完了すると共に、5歳の低年齢正常ボランティアを含むデータ収集が可能であるとの確証が得られた。

研究2 光トポグラフィー装置を用いた脳機能発達の測定 <研究結果>

脳とこころの発達過程を解明し、その成果を精神疾患の予防へと生かすための臨床検査を確立することを目的として、頭部用の多チャンネル近赤外線スペクトロスコーピーnear-infrared spectroscopy(NIRS)装置である光トポグラフィ装置を用いた検討を行なった。NIRSによる前頭葉機能検査を利用することで、①双生児のNIRS検査の実施[研究1] ②年齢とNIRS所見の関連の検討[研究2] ③性格とNIRS所見の関連の検討[研究3]、の3研究を実施した。方法的には、Suto T Fukuda M et al Biol Psychiatry 55 501-511 2004により国際的に承認された。

その結果、①脳機能か遺伝的素因により規定される度合いには脳部位により差があること、②前頭葉機能には、性別や課題遂行成績を考慮にいれても若年>壮年という年齢にともなう変化があり、発達にともなう脳機能の変化を反映すると考えられること、③個人ごとの性格特徴、とくに新奇性追求や固執という性格の背景には脳機能の特徴があり、それは課題遂行初期の脳血液量変化に反映されること、が示唆された。

これらのことから、脳とこころの発達過程および精神疾患の成因を解明していくうえで、光トポグラフィ装置を用いた脳機能発達の測定が可能かつ有用であること、それらの素因規定性と環境依存性を明らかにするうえで双生児法が重要な情報をもたらすことが明らかになってきた。

研究3 脳形態・脳機能発達と関連して発達する心理機能の測定と同定

<研究結果>

平成15年度は、測定バッテリーを確立し、実際に双生児を対象として測定をおこなった。とくに妄想的観念を調べる質問紙であるPDIを中心に、健常者群と統合失調症患者群に実施し、その信頼性と妥当性を検討し、さらに、双生児ペアを対象として施行し、その有用性を検討した。その結果、PDIの内的整合性と再検査信頼性は高い値を示し、PANSSとの相関を用いた併存的妥当性も比較的高いことが確認された。健常な双生児ペアの結果をみると、抑うつはその時の状態によって左右されるのに対し、妄想的観念はその時の状態に左右されにくい人格特性的な面が強いことが推測された。双生児ペアにおけるPDIの一致度は高く、PDIを双生児に実施するに当たっての実用性を確認することができた。こうした課題を用いて研究することにより、脳とこころの発達過程および精神疾患の成因を解明していくうえで、脳の構造と機能の発達を測定していくことが可能かつ有用であることが明らかになってきた。

課題3 研究リソースとしての精神疾患双生児及び健常双生児登録の拡充・創設

研究1 精神疾患双生児登録の全国的拡大

<研究結果>

わが国では統合失調症に関して井上英二が1950年代から60年代にかけて発見した一卵性58組、二卵性20組が最大の精神疾患双生児である。岡崎は1990年代に長崎県(人口157万人)で統合失調症双生児一卵性25組、二卵性14組を発見した。本研究はその成果を全国的に拡大しようとするものである。全国的に精神疾患双生児を発見し、疾患診断一致率の他、疾患のリスクファクターや神経心理・脳画像研究などの共同研究の実施も視野に入れて、平成14年度に「精神疾患双生児全国共同研究」組織を提唱し発足させた。14年度に28施設の参加を得たが、平成15年度(平成16年3月末日現在)には、下記の30研究施設(27大学、3研究施設)の参加を得るに至った。全般的な研究計画について、研究代表者の所属施設(三重大学医学部)研究倫理委員会の承認を得た(平成15年6月6日付)。参加施設において倫理委員会の承認を得た施設から順に、対象発見を開始し、登録を拡大している。平成16年1月末日現在、59組の各種精神疾患双生児が発見された。

北海道大学 講師 久住一郎
札幌医科大学 助手 吉田 拓
弘前医科大学 講師 栗林理人
東北大学 教授 曾良一郎
福島県立医大 教授 丹羽真一〇

獨協医科大学 教授 秋山一文
群馬大学 助教授 福田正人
自治医科大学 教授 加藤 敏
理化学研究所 チームリーダー 加藤忠史
国立精神神経センター武蔵病院 部長 斎藤 治
東京医科歯科大学 助教授 松島英介
東邦大学 助教授 中村道子
慶應義塾大学 助手 水野雅文
帝京大学 教授 南光進一郎
東京大学 助教授 佐々木司
ハニッパ障害研究センター 所長 貝谷久宣
山梨医科大学 教授 神庭重信
浜松医科大学 助教授 武井教授
名古屋大学 助教授 稲田俊也
三重大学 講師 谷井久志
奈良県立医科大学 教授 岸本年史
京都府立医科大学 教授 福居顕二〇
大阪大学 教授 武田雅俊
岡山大学 助教授 氏家 寛
香川医科大学 助手 宮武良輔
島根医科大学 助手 宮岡 剛
山口大学 教授 渡辺義文
大分医科大学 助教授 穂吉條太郎
長崎大学 講師 今村 明
琉球大学 助教授 平松謙一
研究2 健常双生児登録の創設

<研究結果>

昨年度、文献レビューで確認し得た現在稼働中の双生児登録は諸外国全体で50件以上であった。欧米先進国のみでなくアジア諸国においても国や地方を代表する大規模な双生児登録の存在が確認された。登録の目的は人類遺伝学的研究から母子保健活動を含めて広範な領域であった。わが国は遺伝疫学研究、母子保健分野の重要な研究資源としての双生児登録を持ち合わせていない例外的な国であると言える。こうした立ち遅れは、ポストゲノム時代における遺伝疫学研究の急進展、不妊治療による先進国の世界的な多胎児出産急増を考えた場合に早急な検討課題である。小児期双生児コホート構築後の重要課題の一つである卵性診断法の精度向上を試みた。従来使用してきた双生児母親用卵性診断質問紙票に身体的類似に関する項目を追加することで、感度 特異度 精度ともに95%程度の実用上問題のない卵性診断法を確立した。成人双生児コホートに関しては東大附属高校卒業生双生児コホートの現状把握を行い、次年度の追跡調査の実施の準備を整えた。

D 考察

課題1 一卵性双生児精神疾患不一致例の表現型(罹患と非罹患)の差異に対応する遺伝子発現やゲノム内機構の差異を見出そうとする主任研究者らの新しいアプローチは、国際的に多くの研究があるわけではないが、我々の発表に刺激された追試研究も出始めており(Petronis et al 2003)、今回のXBP1遺伝子発見の結果を見ても精神疾患感受性遺伝子検索の新しい方法と見なすのではないかと考えられる。先に述べたように、さらに統合失調症における2つの候補遺伝子をビーズマイクロアレイ法で抽出した。遺伝子発現の差異は多くが免疫グロブリン関係であり、EBウイルスにより芽球化された細胞における遺伝子再構成の段階を反映していると考えられるが、それ以外の神経伝達関連遺伝子も少なからず見出されており、今後それらの遺伝子の機能や多型検索、関連研究等によってその機能的意義が判明していくであろう。

一卵性双生児罹患、非罹患双生児間で、発現に差異があった XBP1 遺伝子のメチル化には差異が認められなかったか、FRGP 法で見出した自閉症候補遺伝子 HIP1I や統合失調症不一致例の DRD2 にはプロモータ領域のメチル化に差異を見出した。これは重要な知見であり、その他の方法も採用して多角的に確認していく必要がある。この微妙なメチル化の差異を確認したのは、昨年今村らが考案した、関心領域内に複数の PCR プライマーを設計し、メチル化感受性制限酵素で消化した後に PCR を施行することで差異を検出するという方法によったものである。

課題2 昨年、形態学的脳発達研究については 60 名の健常者から全脳の fractional anisotropy (FA) 画像に関する正常データベースを作成した。これを用いることで、今後健常双生児のペア内およびペア間比較、ならびに統合失調症をはじめとする精神障害を有する対象例に対する定量的画像解析を実施する基盤が整備された。機能的発達過程の研究においては、脳とこころの発達過程および精神疾患成因を解明していくうえで、尤トポグラフィ装置を用いた脳機能発達の測定が可能で加齢による変化を反映すること、それらの素因規定性と環境依存性を明らかにするうえで双生児法が重要な情報をもたらすことが明らかにされた。また、研究結果に記載したような課題を用いて、脳の心理機能の発達と MRI や尤トポグラフィの結果との相関を解析すれば、脳の発達と関連する心理機能と関連しない心理機能を同定することができると考えられる。一卵性と二卵性の双生児を比較することにより、遺伝規定的な部分と環境依存的な部分とを検査することか可能であることを本年度は確認できた。また脳部位により遺伝と環境の影響が異なることも明らかになった。また15年度は、催眠 鎮静処置を行うことなく被験者本人の理解と同意に基づく協力による MRI 撮像が可能となる年齢の下限を約 5 歳と想定した。今回、4 歳 10 か月の双生児ペアの両名は mpr シーケンスを用いた 3D-MRI に続いて、所要時間 1 分 44 秒の拡散テンソル画像 (DTI) の撮像にも成功した。今回の結果から、倫理面を十分に配慮した手続きに従って、約 5 歳の健康ボランティアから、3D-MRI と DTI の構造的磁気共鳴画像 (structural MRI, sMRI と略す) データの収集が可能であるとの確証を得ることかできた。

課題3 精神疾患双生児の全国的な登録を目指す研究はわが国では初めてのものである。短期間に上記のような大きな研究組織が立ち上がったことは、貴重な成果であり、研究期間に国際的にも最も大きな標本を確立できる可能性が強くなった。

わが国では精神疾患双生児の登録は、井上英二が 1950-60 年代に全国の入院患者から見出した統合失調症双生児一卵性 58 組、二卵性 20 組が最高である。分担研究者が長崎で見出した一卵性 25 組、二卵性 14 組がそれに次ぐ。今回確立した共同研究組織は世界的にも例かない多数の施設からなる施設であり、背景人口は数千万人に及ぶので、長崎県 (157 万人) から推算すると極めて大きな標本を発見できる条件がある。共同研究組織がいよいよ稼働し始めたので、平成 16 年度には発見が加速され、大きな標本となる可能性が極めて高い。

健常双生児登録の創出は困難も幾つかあるが、既存組織の理解を多面的に促進し、登録確立の意義を浸透させたいと考えている。次年度はより具体的な形で双生児コホートが確立する予定である。その準備状況は順調に進んでいると結論できる。

E 結論

以上のように、研究計画に沿って順調に研究は進捗して

おり、本年度、課題 1 では極めて大きな成果が得られ、主任研究者らから提唱する一卵性双生児不一致法の有効性が証明されたと言えよう。メチル化などエピジェネティックスの関与の可能性も強まった。統合失調症と自閉症についてもブレークスルーが期待される。課題 2 は技術的準備が完了し (Suto Fukuda et al 2004)、成人対象の予備的結果が得られた。双生児による脳領域の遺伝要因と非遺伝要因の関与が異なることが判明したことは極めて興味深い。課題 3 も共同研究組織の立ち上げや技術的準備が整い既に対象発見を開始している。このように、精神疾患の成立に向かう遺伝的要因 脳発達過程について双生児法の斬新な方法としての有効性が確認された。次年度は、さらに具体的成果が増大するはずである。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

初年度のため研究成果については投稿中の論文が多い。

1 論文発表(下線は主任 分担研究者及び研究協力者)

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

垣内千尋、加藤忠史 XBP1 ループの機能低下が躁うつ病のリスクとなる *実験医学* 18 2549-2552 2003

加藤忠史、垣内千尋(印刷中) 躁うつ病関連遺伝子 医学のあゆみ 207 1010-1011 2003

加藤忠史、垣内千尋(印刷中) 小胞体ストレス反応の異常と躁うつ病 蛋白質核酸酵素

Yotsutsuji T, Saitoh O, Suzuki M, Hagino H, Mon K, Takahashi T, Kurokawa K, Matsui M, Seto H, Kurachi M. Quantification of lateral ventricular subdivisions in schizophrenia by high-resolution three-dimensional magnetic resonance imaging *Psychiatry Research Neuroimaging* 2003 122 1-12

福田正人 三國雅彦 (2003) 光て見る心 心と社会 111 49-58

福田正人 伊藤誠 須藤友博 亀山正樹 山岸裕 上原徹 井田逸朗 三國雅彦 (2003) 精神医学における近赤外線スペクトロスコピー-NIRS 測定の意義—精神疾患の臨床検査としての可能性 脳と精神の医学 14 155-171

福田正人 上原徹 井田逸朗 三國雅彦 (2003) うつ病の新しい診断法の開発—NIRS と PET を中心として *日本臨牀* 61 1667-1682

福田正人 (2003) 精神疾患の診断 治療のための臨床検査としての NIRS 測定 *MEDIX* 39 4-10

福田正人 須藤友博 伊藤誠 亀山正樹 山岸裕 上原徹 井田逸朗 三國雅彦 (2003) 近赤外線スペクトロスコピー-NIRS の臨床応用 *分子精神医学* 3 295-308

福田正人 伊藤誠 須藤友博 亀山正樹 山岸裕 上原徹 井田逸朗 三國雅彦 (2003) 新しい脳画像診断法の精神疾患への臨床応用—近赤外線スペクトロスコピー-NIRS *精神科* 3 478-487

福田正人 上原徹 井田逸朗 三國雅彦 (2004) うつ病の脳画像 近赤外線検査 *Clinical Neuroscience* 22 161-165

Suto T, Fukuda M, Ito M, Uehara T, Mikuni M (2004) Multichannel near-infrared spectroscopy in depression and schizophrenia cognitive brain activation study *Biol*

Kameyama M, Fukuda M, Uehara T, Mikuni M (in press) Sex and Age Dependencies of Cerebral Blood Volume Changes during Cognitive Activation: A Multichannel Near-Infrared Spectroscopy Study *NeuroImage*

森本幸子, 丹野義彦 健康者の妄想的観念への多次元のアプローチ—被害妄想的観念と庇護妄想的観念の比較を通して— *心理学研究*, 74 552-555 2004

丹野義彦・森脇愛子 心理学からみた妄想 *臨床心理学* 3 758-760 2003

佐々木卓, 丹野義彦 自我漏洩感を体験する状況の構造 *性格心理学研究* 11 99-109 2003

伊藤由美・丹野義彦 対人不安についての素因ストレスモデルの検証 公的自己意識は対人不安の発生にどう関与するのか *性格心理学研究* 12 32-33 2003

岡崎祐士・辻田高宏 加藤忠史 双生児 同胞研究が明らかにした統合失調症の成因 *臨床精神医学* 32 1315-1321 2003

岡崎祐士 浅香昭雄・大野 裕 加藤忠史 阿部和彦 座談会「精神疾患の双生児 同胞例・家族内多発例」 *臨床精神医学* 32 1269-1287, 2003

Yokota H, Tsujita T, Okazaki Y, Kikuya E, Oishi M Polymorphic 33-bp repeats with promoter-like activity in synaptotagmin 11 gene DNA *Res* 10 287-289 2003

C Fuke, M Shimabukuro A, Petronis J Sugimoto T Oda K Miura T Miyazaki C, Ogura Y Okazaki Y Jinno Age related changes of the 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study *Annals of Human Genetics* (2004, in press)

Nakamura A, Okazaki Y Sugimoto J, Oda T, Jinno Y Human endogenous retroviruses with transcriptional potential in the brain *J Hum Genet* 48 575-581 2003

The 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* 120B 22-28 2003

今村明, 秋月誠一, 橋田あおい, 藤丸浩輔, 辻田高宏, 林田雅希, 岡崎祐士 双生児 家系(同胞)研究によるパニック障害の成因についての検討 *臨床精神医学* 32, 1349-1352, 2003

辻田高宏 統合失調症のエピジェネティクス、キーワード *精神第3版*, 先端医学社, pp202-203, 2003

Matsumoto S, Sasaki T, Imamura A, Matsuo K, Kayashima T, Hashida A, Ono S, Tsujita T, Matsumoto S, Nakane Y, Tokunaga K, Okazaki Y HLA class I distribution in Japanese patients with schizophrenia *Am J Med Genet* 114 42-45 2002

Fujimaru K, Imamura A, Tsujita T, Uruguchi M, Hashida A, Mori T, Matsumoto S, Matsumoto S, Okazaki Y, Nakane Y Minor Physical Anomalies in Japanese Patients with Schizophrenia *Acta Med Nagasaki* 47 133-137 2002

藤丸浩輔, 辻田高宏 一卵性双生児のケノムの不一致について、分子精神医学、2、260-261、2002

S Ooki and A. Asaka Zygosity Diagnosis in Young Twins by Questionnaire for Twins Mothers and Twins Self-reports *Twin Research* 7(1) 5-12 2004

Kato C, Petronis A, Okazaki Y, Tochigi M, Umekage T, Sasaki T Molecular genetic studies of schizophrenia: challenges and insights *Neurosci Res* 43 295-304 2002

Tochigi M, Okazaki Y, Kato N, Sasaki T What causes seasonality of birth in schizophrenia? *Neurosci Res* 48

2 学会発表 (下線は主任・分担研究者及び研究協力者)

田崎真也, 古賀利香, 橋田あおい, 菊池妙子, 与那城竹亮, 藤丸浩輔, 今村明, 辻田高宏, 岡崎祐士 CA リポートマーカーを用いた一卵性双生児統合失調症不一致例の差異の検討—第2報—第56回九州精神神経学会, 2003年11月6日-7日, 久留米

松田博史, 大西隆, 今林悦子, 田中富美子, 森健之, 根本清貴, 平尾健太郎, 瀧澤修 MRI 拡散テンソル画像の画像統計解析手法の開発 2004 39

齋藤治 自閉症の神経画像研究と発達神経解剖学 シンポジウム「発達障害は認知神経科学的にどこまで解明されたか」第15回日本発達心理学会 東京 2004 3 22

岡本長久, 齋藤治, 松田博史, 穴見公隆, 森健之, 阿部修, 増谷佳孝, 青木茂樹, 湯本真人, 原田誠一, 清水康夫, 岡崎祐士 MRI 脳画像 SPM 処理による発達脳部位の同定 第11回日本精神行動遺伝学会 長崎 2003 10 25

福田正人 ヒトの脳の特徴と脳が獲得したところの特徴 第26回日本医学会総会のシンポジウム, 福岡 2003 4 5

亀山正樹, 山岸裕, 須藤友博, 伊藤誠, 滝沢龍, 川上礼子, 上原徹, 井田逸朗, 福田正人, 三國雅彦 統合失調症における認知 運行課題遂行時の局所脳血液量変化—多チャンネル近赤外線スペクトロスコピー装置を用いた検討 第25回日本生物学的精神医学会, 全沢 2003 4 16-18

伊藤誠, 須藤友博, 亀山正樹, 山岸裕, 川上礼子, 滝沢龍, 上原徹, 井田逸朗, 福田正人, 三國雅彦 双極性障害患者における課題遂行中の局所脳血液量変化の動的特徴—多チャンネル近赤外線スペクトロスコピー装置を用いた検討 第25回日本生物学的精神医学会, 全沢 2003 4 16-18

山岸裕, 亀山正樹, 伊藤誠, 須藤友博, 川上礼子, 滝沢龍, 上原徹, 井田逸朗, 福田正人, 三國雅彦 うつ病患者の認知課題遂行時の脳血液量変化—近赤外線スペクトロスコピーを用いた検討 第25回日本生物学的精神医学会 全沢 2003 4 16-18

須藤友博, 伊藤誠, 亀山正樹, 山岸裕, 滝沢龍, 川上礼子, 上原徹, 井田逸朗, 福田正人, 三國雅彦 性別 年齢の局所脳血液量変化に対する影響—近赤外線スペクトロスコピー装置による精神疾患発病の背景についての予備的検討 第25回日本生物学的精神医学会 全沢 2003 4 16-18

滝沢龍, 川上礼子, 伊藤誠, 須藤友博, 亀山正樹, 山岸裕, 上原徹, 井田逸朗, 福田正人, 三國雅彦 前頭葉の脳活動の時間経過の特徴についての検討—近赤外線スペクトロスコピーによる健康者の working memory 測定 第25回日本生物学的精神医学会 全沢 2003 4 16-18

福田正人 精神疾患の診断 治療のための臨床検査を目指して 第26回群馬精神医学会 特別講演 前橋 2003 6 21
福田正人 統合失調症の認知機能障害と脳機能の特徴 第2回西中国精神医学懇話会, 招待講演, 山口 2003 7 5

福田正人 NIRS の精神疾患への応用 慶應義塾大学21世紀COEプログラム—第2回 九トポクラ フィ シンポジウム 招待講演 東京 2003 7 25

福田正人 初発統合失調症と非定型抗精神病薬メンタルクリニック全国研究会, 招待講演, 東京 2003 7 27
山岸裕, 亀山正樹, 伊藤誠, 須藤友博, 上原徹, 井田逸朗, 福田正人, 三國雅彦 うつ病患者の認知課題遂行時の局所脳血液量—多チャンネル近赤外線スペクトロスコピーによる検討 第33回日本臨床神経生理学会学術大会 旭川 2003 10 1-3

伊藤誠, 須藤友博, 亀山正樹, 山岸裕, 上原徹, 井田逸朗

福田正人 三國雅彦 双極性障害における課題遂行時の局所脳血流量一多チャンネル近赤外線スペクトロスコピを用いた検討 第 33 回日本臨床神経生理学会学術大会 旭川 2003 10 1-3

亀山正樹 山岸裕 伊藤誠 須藤友博 上原徹 井田逸朗 福田正人 三國雅彦 認知課題遂行時の脳血流量変化に対する性差 加齢の影響一多チャンネル近赤外線スペクトロスコピ装置による検討 第 33 回日本臨床神経生理学会学術大会 旭川 2003 10 1-3

中本啓治 笠井清登 松尾幸治 上原徹 伊藤誠 須藤友博 亀山正樹 山岸裕 福田正人 桑原斉 加藤進昌 近赤外線スペクトロスコピを用いた語流暢課題における前頭葉ヘモクロヒン変化 第 33 回日本臨床神経生理学会学術大会 旭川 2003 10 1-3

須藤友博 伊藤誠 亀山正樹 山岸裕 上原徹 井田逸朗 福田正人 三國雅彦 統合失調症患者における認知 運動課題遂行時の局所脳血流量変化一多チャンネル近赤外線スペクトロスコピを用いた検討 第 33 回日本臨床神経生理学会学術大会 旭川 2003 10 1-3

山岸裕 亀山正樹 伊藤誠 須藤友博 上原徹 井田逸朗 福田正人 三國雅彦 統合失調症患者における局所脳血流量の変化一多チャンネル近赤外線スペクトロスコピによる検討 第 23 回日本精神科診断学会 宇都宮 2003 10 30-31

亀山正樹 山岸裕 伊藤誠 須藤友博 上原徹 井田逸朗 福田正人 三國雅彦 単極性うつ病と双極性障害の脳血流量変化と診断一多チャンネル近赤外線スペクトロスコピを用いた検討 第 23 回日本精神科診断学会 宇都宮 2003 10 30-31

福田正人 近赤外分光法による精神疾患の診療支援技術 文部科学省科学技術振興調整費産学官共同研究の効果的推進事業 公開シンポジウム「こころを映し出す DNA チップの開発と実用化」招待講演徳島 2003 11 7

福田正人 近赤外線スペクトロスコピ-NIRS による脳機能計測 第 24 回 日本レーザー医学会総会にて教育講演 岐阜 2003 11 15

福田正人 NIRS による精神疾患診療支援システムの構築 光トポグラフィ ユーザー研究会 招待講演 東京 2003 12 19

福田正人 統合失調症における薬物治療と認知機能 第 2 回北関東甲信越精神医学懇話会 招待講演 東京 2004 1 24

Fukuda M Ito M Suto T Kameyama M Yamagishi Y Uehara T Ida I Mikuni M A Multichannel Near-Infrared Spectroscopy Study of Frontal Lobe Function in Schizophrenia and Mood Disorders International Congress of Biological Psychiatry Official Pre Congress Meeting 招待講演 Cairns 2004 2 6

福田正人 精神疾患における光脳機能イメージングの可能性 第 1 回 光脳機能イメージング研究会 招待講演 東京 2004 3 20

伊藤誠 須藤友博 亀山正樹 山岸裕 上原徹 福田正人 三國雅彦 認知課題遂行時の脳血流量変化に対する性年齢の影響一多チャンネル NIRS 装置による検討 第 6 回日本ヒト脳機能マッピング学会大会 東京 2004 3 21-22

山岸裕 亀山正樹 伊藤誠 須藤友博 上原徹 井田逸朗 福田正人 三國雅彦 うつ病患者の認知課題遂行時の脳血流量変化一近赤外線スペクトロスコピを用いた検討 第 6 回日本ヒト脳機能マッピング学会大会 東京 2004 3 21-22

須藤友博 伊藤誠 亀山正樹 山岸裕 上原徹 井田逸朗 福田正人 三國雅彦 統合失調症における課題遂行時の局所脳血流量変化一多チャンネル近赤外線スペクトロスコピでの検討 第 6 回日本ヒト脳機能マッピング学会大会 東京 2004 3 21-22

亀山正樹 山岸裕 須藤友博 伊藤誠 上原徹 井田逸朗 福田正人 三國雅彦 双極性障害の局所脳血流量変化一多チャンネル近赤外線スペクトロスコピによる検討 第 6 回日本ヒト脳機能マッピング学会大会 東京 2004 3 21-22

Monmoto S & Tanno Y Paranoid Ideation in College Students -The Prediction of Development- World Federation for Mental Health Biennial Congress 82 2003

Yamasaki S Takahashi Y Kobon O Kijima N Ando J Yamagata, Y Maekawa H Hakamada Y Matsuura M and Tanno Y 2003 The relationship between delusional ideation and temperament and character in college students The 31st British Association for Behavioral and Cognitive Psychotherapies Annual Conference York UK

Ito Y & Tanno Y 2003 The dimensional structure of fears hierarchic factor analysis of Fear Survey Schedule-III XXX III Annual Congress of the European Association for Behavioral and Cognitive Therapies Book of abstracts 91 September Prague

Sato, K. & Tanno Y 2003 Self-focused attention and social anxiety in Japanese college students 33rd Annual Congress of the EABCT Prague

Sasaki J and Tanno Y 2004 Development of the egorrhea symptoms scale corresponding to eliciting situations. International Conference on Schizophrenia (ICONS of SCARF), INDIA

Yamasaki S Arakawa H and Tanno Y 2004 Jumping to Conclusion bias in patients with schizophrenia and in delusion-prone college students International Conference on Schizophrenia Chennai India

Sasaki J Sugawara K. and Tanno Y 2004 The motivation of self-presentation on social anxiety International Workshop of 21st century COE Program

Arakawa H Yamasaki S & Tanno Y 2004 Delusional Ideation and Reasoning. 5th Tsukuba International Conference on Memory

森本幸子 丹野義彦 大学生における被害妄想観念に関する研究一素因ストレスモデルを用いて一 日本心理学会第 67 回大会論文集 262 2003

荒川裕美 山崎修道 丹野義彦 妄想様観念に関連する心理的要因の検討 日本心理学会第 67 回大会論文集 616 2003

坂東奈緒子 毛利伊吹 下山真希 高祖歩美 丹野義彦 健常者における Schizotypal Personality Questionnaire の因子構造 統合失調症と統合失調症型人格障害の連続性 日本性格心理学会第 12 回大会論文集 98-99 2003

森本幸子 丹野義彦 大学生における被害妄想的観念の発生 日本健康心理学会第 16 回大会発表論文集 10 2003

岡崎祐士 池村寛之 西村幸香 谷井久志
今村 明 秋月誠一 藤丸浩輔 梅景 正 佐々木司 パニック障害の脳画像とケノム研究 第 4 回パニック障害研究会 2003 年 9 月 7 日 東京

田崎真也、古賀利香、橋田あおい、菊池妙子、与那城竹亮、藤丸浩輔、今村明、辻田高宏、岡崎祐士 CA リポートマーカーを用いた一卵性双生児統合失調症不一致例の差異の検討一第 2 報一 第 56 回九州精神神経学会、2003 年 11 月 6 日-7 日、久留木

岡本長久 斎藤治 松田博史 穴見公隆 森健之 阿部修 増谷佳孝 青木茂樹 湯本真人 原田誠一 清水康夫 岡崎祐士 MRI 脳画像 SPM 処理による発達脳部位の同定 第 11 回日本精神 行動遺伝医学会 長崎 2003 10 25

岡崎祐士 池村寛之 西村幸香 谷井久志 今村 明 秋月誠一 藤丸浩輔 梅景 正 佐々木司 パニック障害の生物学的

研究の現状 第19回日本ストレス学会 2003年11月28日 東京 日)

大木秀一 佐々木司・岡崎祐士・浅香昭雄 過去3回の東大
附属高校卒業生追跡調査から見た双生児の研究参加にか
かわる要因の分析 第18回日本双生児研究学会、2004年
1月24日、東京

3 著書

丹野義彦(共編著)統合失調症の臨床心理学 p175-193 東
京大学出版会 2003

丹野義彦(編)臨床心理学全書 5 臨床心理学研究法 誠
信書房 2004

丹野義彦 性格の心理 ヒックファイブと臨床からみたパー
ソナリティ サイエンス社 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、東京、2003 pp372-377

辻田高宏 統合失調症のエピシエネティクス KEY WORD
精神 第3版(樋口輝彦 神庭重信・染谷俊幸

宮岡 等編)、先端医学社、東京、2003、pp202-203

岡崎祐士 先天性脆弱性素因と獲得性脆弱性素因 KEY
WORD 精神 第3版(樋口輝彦 神庭重信 染谷俊幸

宮岡 等編)、先端医学社、東京、2003、pp110-111

4 マスメディア報道

本研究と関連した成果か、以下のように報道された。

(1)テレビ

NHK 総合放送(2004年3月31日)番組 ためしてガッテン
「脳を元気に①ーゆううつ最新対策 脳の活動低下の有無」

(2)新聞

化学工業新聞 2003/9/1

産経新聞 2003/9/1

東京新聞 2003/9/1

讀賣新聞 2003/9/1

日刊工業新聞 2003/9/1

日本経済新聞 2003/9/1

日本工業新聞 2003/9/1

毎日新聞 2003/9/1

5 その他

実用化に向けた医工連携研究の実施

NIRS を推進するために、群馬大学と日立製作所基礎研
究所 日立メディコ社技術研究所との間で、以下にあげた医
工連携の共同研究契約を締結し実施した。

福田正人 三國雅彦 上原徹「光トポグラフィー装置を用
いた脳機能計測による精神疾患の診断支援方法の開発」
(2003年度)

岡崎祐士も同しく日立メディコと契約

H 知的財産権の出願・登録状況

1 加特許取得

福田正人 本研究により直接得られたものではないが 本
研究課題と関連する研究から、以下の特許を出願した。生
体光計測装置を用いた疾患判定装置(特願 2003-319502 号
2003.9.11 出願)

2 実用新案登録 なし

3 その他 なし

加藤忠史 気分安定薬の評価方法およびスクリーニング方
法を工業所有権(特願 2003-205349)申請(平成 15 年 8 月 1

II. 分担研究報告

双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明 (H14-こころ-011)
[分担研究課題] 精神疾患不一致一卵性双生児における DNA マイクロアレイを用いた
原因遺伝子の同定

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

我々は、一卵性双生児双極性障害不一致例の培養リンパ芽球様細胞における遺伝子発現解析により、双極性障害患者で XBP1 および GRP78 という、小胞体ストレス経路の遺伝子の発現が低下していることを見出した。症例対照研究でも、小胞体ストレスに対する XBP1 および GRP78 の反応が低下していた。XBP1 遺伝子の上流には、XBP1 自身の結合配列を失わせる-116G 多型が存在するか、-116G は、XBP1 依存性のプロモーター活性を低下させ、-116G を持つ培養リンパ芽球様細胞および末梢 B リンパ球では、小胞体ストレスに対する XBP1 上昇反応が低下していた。この多型に関して遺伝子関連研究を行ったところ、双極性障害と有意に関連していた。

A 研究目的

双極性障害では、一卵性双生児における一致率が 60~80%と高いことから、遺伝要因の強い関与が考えられるが、連鎖解析や病態に関連する遺伝子の検索にもかかわらず、決定的な病因遺伝子は見出されていなかった。一卵性双生児における一致率は高率であるか、100%ではなく、その理由としてゲノムの不一致が存在する場合があることがわかってきた。

本研究では、GeneChip 法を用いた一卵性双生児双極性障害不一致例における遺伝子発現の差異から、候補遺伝子を同定した。

B 研究方法

対象は、研究内容につき書面にて説明の上同意が得られた一卵性双生児双極性障害不一致例 2 組 (49 歳 男性 I 型、40 歳代 男性 II 型)、及び健常双生児 1 組である。被験者の末梢血よりリンパ球を分取し、EB ウイルスによりトランスフォームした。採血後 8 週間の時点で細胞より total RNA を抽出し、cDNA を作製した。ヒオチン化 cRNA を合成し、Affymetrix 社 Hu95A チップを用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。卵性診断キット (Applied Biosystems) を用いて卵性診断を行った。(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の倫理委員会の承認を得た。

C 研究結果

約 12000 個の遺伝子について各双生児間の遺伝子発現を比較したところ、両不一致双生児間で 2 倍以上の差異がみられた遺伝子は、18 個で、うち 17 個は低下していた。このうち、小胞体ストレス経路にかかわる遺伝子、XBP1 と GRP78 に着目した。双極性障害患者と健常者の培養リンパ芽球に、小胞体ストレスを惹起させ、これらの発現量を測定したところ、反応が低下していた。XBP1 遺伝子の上流には、XBP1 自身の結合配列を失わせる-116G 多型が存在するか、-116G は、XBP1 依存性のプロモーター活性を低下させ、-116G を持つ培養リンパ芽球様細胞および末梢 B リンパ球では、小胞体ストレスに対する XBP1 上昇反応が低下していた。この多型に関して遺伝子関連研究を行ったところ、双極性障害と有意に関連していた。GRP78 は気分安定薬ハルプロ酸で増加した。

D 考察

本研究の結果から、XBP1 遺伝子多型による小胞体ストレス反応の低下が双極性障害の危険因子になることが判明した。また、気分安定薬の新しい創薬標的である。

E 結論

双極性障害に関して不一致な一卵性双生児 2 ペアにおける遺伝子発現解析から、双極性障害関連遺伝子として XBP1 を同定した。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

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

垣内千尋、加藤忠史 XBP1 ループの機能低下が躁うつ病のリスクとなる *実験医学* 18: 2549-2552, 2003

加藤忠史、垣内千尋 (印刷中) 躁うつ病関連遺伝子 *医学のあゆみ* 207: 1010-1011, 2003

加藤忠史、垣内千尋 (印刷中) 小胞体ストレス反応の異常と躁うつ病 *蛋白質核酸酵素*

2 学会発表

なし

H 知的財産権の出願・登録状況

気分安定薬の評価方法およびスクリーニング方法を工業所有権 (特願 2003-205349) 申請 (平成 15 年 8 月 1 日)

双生児法による脳とこころの発達過程及び精神疾患成因の解明

〔分担研究課題〕一卵性双生児精神疾患不一致例の

ゲノム差異同定法の開発と応用

分担研究者 辻田高宏¹ 今村 明² (¹廣中病院、²長崎大学
大学院医歯薬学総合研究科病態解析制御学講座講師)

研究要旨

I 一卵性双生児自閉症不一致例のゲノム差異を検出する目的で、FRGP (Fluorescent Representational Genomic Profiling) 法を適用した。双生児間でシグナル強度の強弱に差異のある 4 スポットを検出した。変異スポットのうち 2 スポットについて DNA 断片をケルより回収し塩基配列を決定したところ、それぞれ 4 番染色体短腕 (4p14) と 12 番染色体長腕 (12q24.1) の BAC クローンと完全に一致した。これらの配列は HIP2 (Huntingtin interacting protein 2) 遺伝子など 4 遺伝子と一致していることかわかった。現在、詳細は解析中である。

II 一卵性双生児統合失調症不一致例 5 組と健常一卵性双生児 6 組を対象として、蛍光標識 CA リピートマーカーを遺伝子マーカーとしてゲノムスキャンを行った。計 305 の CA リピートマーカーを用い、マーカー間の距離をおよそ 15cM として解析を行った。結果として双生児間において全てのマーカーで PCR 産物のサイズの差異は認められなかった。

III メチル化感受性制限酵素である HapII と、同じ認識部位を持つメチル化感受性の異なる MspI を用いて、I の変異スポットから得られた塩基配列と一致した遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を一卵性双生児自閉症不一致例で比較した。健常双生児に比べて自閉症罹患双生児の方が同領域のメチル化の程度が大きいことを示唆する結果となった。また、一卵性双生児統合失調症不一致例で、dopamine D2 receptor gene (DRD2) のプロモーター領域の HapII/MspI 領域を同様の方法で検討したところ、統合失調症罹患双生児の方がメチル化の程度が大きい傾向がみられた。

A 研究目的

一卵性双生児の表現型の不一致は、これまで一卵性双生児の遺伝子構成が全く同一と想定されていたため、環境因によるものと考えられてきた。しかし近年、一卵性双生児において、片方だけに染色体異常が見られる症例、疾患遺伝子中の 3 塩基反復配列が伸張した症例など、ゲノム間の差異に起因した表現型不一致の一卵性双生児が

次々と報告されている。統合失調症においても一卵性双生児の不一致かゲノム間の差異によるものではないかという仮説の元に行われた研究が散見される (Tsujita ら, Polymeropoulos ら)。われわれは、一卵性双生児精神疾患不一致例のゲノム差異を検出することで、疾患の発症メカニズム、特にエピジェネティクスの関与の解明が可能ではないかと考えている。

今回次のような検討を行った

I FRGP (Fluorescent Representational Genomic Profiling) 法

共同研究者の山下が開発した FRGP 法を適用して、一卵性双生児自閉症不一致例のケノム DNA を解析し、比較検討した。

II CA リピートマーカを用いたケノムスキャン

一卵性双生児統合失調症不一致例に対して、蛍光標識 CA リピートマーカを遺伝子マーカとして、ケノムスキャンを行った。

III HapII/MspI 領域のメチル化の検討

I の検討で得られた塩基配列と一致した遺伝子や dopamine D2 receptor gene (DRD2) のプロモーター領域について HapII/MspI 領域のメチル化を調べた。

B 研究方法

I 対象は、女性の一卵性双生児自閉症不一致例である。一方 (twinA) は DSM-IV299.00 自閉性障害の診断基準を満たすか、もう一方 (twinB) は心身共に健康である。

双生児の末梢血リンパ球からフェノール法で高分子ケノム DNA を抽出し、FRGP 法を施行した。FRGP 法は大まかに、①ラントマーク制限酵素 (制限酵素 1) 消化、②制限酵素 2 による再断片化、③制限酵素切断部位への特異的アダプターの連結、④ FITC 標識プライマーによる PCR、⑤一次元アカロースティスケル電気泳動、⑥制限酵素 3 によるゲル中消化、⑦二次元ホリアクリルアミトケル電気泳動、⑧蛍光イメージアナライザーによるスポット検出、の 8 ステップからなる。今回は、ラントマーク制限酵素に *EagI*、二次元展開制限酵素に

MboI を用いた。

II 対象は一卵性双生児統合失調症不一致例 5 組 (すべて男性、平均年齢 42.6 歳) と健康一卵性双生児 6 組 (男性 4 組、女性 2 組平均年齢 36.0 歳) である。卵性診断は Togerson ら (1979) による質問紙法 (浅香訳、1983)、赤血球抗原・酵素型、血清型、計 7 種及び DNA フィンカープリント法による。診断は DSM IV を用いて行われた。一卵性双生児の統合失調症不一致の期間は、すべての組で 10 年以上であった。末梢血より採血しフェノール法にてケノム DNA を抽出した。計 305 の CA リピートマーカを用いた。PCR の条件は、annealing 55°C 30sec, extension 72°C 30sec, denaturation 95°C 30sec, 30cycles で行った。蛍光色素により標識された PCR 産物を Pharmacia ALF DNA sequencer によりフラグメント解析を行った。

III メチル化感受性制限酵素 (HapII) とコントロールとして同じ配列 CCGG を認識するかメチル化感受性の異なる制限酵素 (MspI) を用いて、特定の領域の DNA メチル化を比較する検討を行った。

I の方法で得られたスポットの配列と一致した遺伝子である HIP2 や統合失調症の候補遺伝子である DRD2 のプロモーター領域にある HapII/MspI 領域を対象として実験を行った。一卵性双生児自閉症不一致例の DNA を制限酵素で消化し、ポリアクリルアミトケルで電気泳動を行った。また統合失調症不一致例 5 組に対して DRD2 について同様の検討を行った。

プロモーター領域にある HapII/MspI 領域に対して、以下のようにプライマーを設計した。

HIP2

5' GAGGTGATTCGACACTGAGG-3'

5'-GGAGTTCATTGCTGACCTCC 3'

TRPV4

5' GTAAGCACTGAGTGAAGACC 3'

5'-CTCTAGTTCGAATCGGCTCC-3'

・DRD2

5'-GGAAGAACGGCTGTTTTTGG 3'

5'-GTCACCCTCAGCTACTGC 3'

対象者のリンパ球よりフェノール法を用いてDNAを抽出。MspIとHapIIの2つの制限酵素を用いて、37°C、over nightで制限酵素処理を行った。PCRの条件はInitial Denature 98°C 10 secondsとし、その後98°C 10 seconds、68°C 60 secondsを30cycles、Final Extension 72°C 7 minutesで行った。PCR産物をポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、バンドを確認した。

なお、これらの研究は、長崎大学倫理委員会の承認を得ている。

C 研究結果

I 上記条件のFRGP展開で、約600のスポットが検出された。双生児間でケノムプロファイルの詳細に比較検討したところ、ほとんど全ての検出スポットは座標位置およびシグナル強度が同一であるものと考えられたか、4スポットにおいてシグナル強度の強弱に差異(いずれもtwinA>twinB)が認められた(図1)。この4スポットのうち2スポット(Y16とY17)についてDNA断片をゲルより回収し、フェンミトヘクターにクローニング後、塩基配列を決定した。

1)Y16について

Y16を形成するスポットは全長559塩基で、既知のBACクローンの一部であることがわかった。さらにこのクローンは4p14

に位置し、HIP2遺伝子の一部と、推定上の遺伝子の一部を含んでいることがわかった。

2)Y17について

Y17を形成するスポットは全長531塩基で、既知のBACクローンの一部であることがわかった。さらにこのクローンは12q24.11に位置し、3つの遺伝子と、および推定上の遺伝子の一部を含んでいることがわかった。詳細は解析中である。

II 一卵性双生児統合失調症不一致例5組と健常一卵性双生児6組の双生児間において全てのマーカー(計305)でPCR産物のサイズの差異は認められなかった。すべてホモ接合であったマーカーが6、少なくとも一つはヘテロ接合であったマーカーが299であった(表1)。

III 2つの制限酵素を用いて一卵性双生児自閉症不一致例のメチル化を比較したところ、表2のような結果となった。HIP2では双生児A(健常)と双生児B(自閉症)の間に差が見られ、Bの方がメチル化の程度は大きいという結果であった。他の1遺伝子に関しては差は認められなかった。

一卵性双生児統合失調症不一致例に関しては5例中4例はDRD2のメチル化が罹患双生児の方が程度が大きく、残りの一例はほぼ同等であるという結果となった(表3)。

D 考察

I 今回われわれは、Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法にかわり、共同研究者の山下らが開発したFluorescence Representational Genomic Profiling (FRGP) 法を用いた。この方法は、DNA断片をラジオアイソトープのかわりに蛍光で標識するようにしたものであるが、1回のケノムプロファイリングに必要

なDNA量やスポットを形成するDNAをクローニングするときに必要なDNA量を格段に少なくすることか可能となり、プロファイリングにかかる時間も格段に短くなった。

今回の研究で、FRGP解析でY16とY17という興味あるスポットを検出することかできた。この結果は、これらのスポットを形成するケノム周辺のメチル化の状態か双生児間で異なっている可能性か高いことを示している。哺乳類ケノム中では、ントシン塩基(Cと表記する)とグアニン塩基(Gと表記する)か連続して並んだ部位(CpGと表記する)のントシンのうち、約7~8割かメチル化されている。残りのメチル化されていないCpG配列のほとんどは、遺伝子の上流にあるプロモーター領域内のCpGアイランド(CpG island)とよばれる部位に存在する。一般に、この部位のントシンかメチル化されると遺伝子の転写か抑制される。ケノムのメチル化状態は、同じ個体内でも、組織、細胞で異なり、発生過程でも劇的に変化することか知られている。すなわち、哺乳類では、受精後、胚盤胞期までにメチル化ントシンのほとんどか脱メチル化され、着床後、徐々にメチル化レベルは回復し、固体の形態形成か完成するころには成体とほぼ同じ組織特異的なメチル化パターンか完成される。ただし、このメチル化の再構築プロセスを経ても、ほとんどの部分は世代を超えて変化せずに伝達される。ケノム刷り込み現象やX染色体の不活化といった現象はDNAメチル化かその分子学的本態であるか、そのメカニズムの途中に異常か生じるとさまざまな疾患か引き起こされることか知られている。もし、疾患について不一致な一卵性双生児間で、

ある遺伝子の周囲のメチル化状態か異なっていることか確認されれば、その遺伝子は疾患の発症に何らかの形で関与している可能性か高い。

Y16 スポットを形成するDNAを含むBACクローンは4p14に位置することか分かったか、この領域近傍には過去の連鎖研究でmultipoint lod score (MLS) 10を越える値か報告されたことかある。また、このクローンか神経筋疾患であるHuntington病に関連するHIP2遺伝子の一部を含むことか興味深い。Y17 スポットを形成するDNAを含むBACクローンも神経疾患の候補遺伝子となり得る。また、推定上の遺伝子についても、タンパクは同定されていないものm-RNAは同定されており、遺伝子予測プログラムでも遺伝子として働いているのは確実と考えられているものであり、今後検討するに値する。

近年、遺伝医学の世界ではエピジェネティクスという概念か注目されている。これは各細胞内で必要な時に必要な遺伝子のみを発現させる仕組みのことか、DNAの塩基配列以降の遺伝子発現のすへての調節過程を意味している。言い換えれば、エピジェネティクスとは、「DNAの塩基配列の変化を伴わずに生じる遺伝子発現の遺伝的変化」と定義することかできる。エピジェネティクスの分子メカニズムはまたほとんど解明されていないか、DNAメチル化かそれに関与していることは確実といわれている。その意味で、われわれの研究結果は自閉症の発症にDNAメチル化、ひいてはエピジェネティクスのメカニズムか関与している可能性を示したことか画期的であると思われる。

II Polymeropoulosら(1993)は94のマイ

クロサテライトリポートマーカを用いて PCR を行い、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行ったか、一卵性双生児統合失調症不一致例で差異は認められなかったと報告している。我々はさらに精度の高い解析を行うために Pharmacia ALF DNA sequencer を用い、マーカー間の距離をおよそ 15cM として解析を行った。

Polymeropoulos らは、受精後早期の体細胞分裂における乗換えにより、部分的な片親性タイソミーやヘテロ接合性の喪失などの変異が生じ、一卵性双生児の不一致の原因になるという仮説を述べている。今回の検討は、このようなエピジェネティックな変化によってマーカー近傍の遺伝子のアレルがホモ接合型からヘテロ接合型に変化していることを検出することを第一の目的としている。そのため、すべての対象者でホモ接合的である 5 つのマーカーは除外され、結局 299 のマーカーについては、上記のような仮説が成立しないことが確かめられた。今回はすべての双生児間に差異は認められなかったか、今後 SNP を用いて更なる比較を行う予定である。

III HapII は CCGG を認識部位としてもつか、CG methylase によってこのうちの CG 配列のシトシンがメチル化を受けた場合、この配列は切断されなくなる。一方 MspI は、同じく CCGG を認識部位としてもつか、この配列がメチル化を受けた場合でも切断される。

このような性質を持つ 2 つの制限酵素を用いて一卵性双生児自閉症不一致例のメチル化を比較したところ、表 2 のような結果となった。HIP2 では HapII で消化した後に双生児 A (健常) と双生児 B (自閉症) の間に PCR 産物の差がみられ、B の方がメ

チル化の程度は大きいという結果であった。TRPV4 に関しては差は認められなかった。このように、今回自閉症罹患双生児の方が上記の部位のシトシンのメチル化の程度が、大きいということを示唆する結果となった。プロモーター領域の DNA メチル化により、その遺伝子の発現が阻害されることか知られており、HIP2 が自閉症の発症に何らかの役割を果たしている可能性はあるものと思われる。

また、一卵性双生児統合失調症不一致例に関しては HapII で処理した結果、5 例中 4 例は罹患双生児の方が PCR 産物かはつきりと見られ、残りの一例は双生児間で差がないという結果となった。このことは DRD2 のプロモーター領域のメチル化が双生児の不一致となんらかの関係があるという仮説と矛盾しない。

ただし今回の実験では、HapII だけではなく、MspI で処理した結果にも若干の差異がみられている。MspI は、GGCCGG (2 つめの C がメチル化) の場合、切断が非常に時間かかるという報告もあり、またそのほかにもメチル化によって影響をうける配列があるため (Nelson ら、1993)、このような差異が生じたのではないかと推測される。

E 結論

I 一卵性双生児自閉症不一致例を FRGP 法を用いて解析することで、ケノムメチル化状態が 4p14 と 12q24.1 の領域で異なっている可能性が示唆された。今後、より詳細な解析が必要である。

II CA リポートマーカを用いて一卵性双生児統合失調症不一致例のケノムの比較を行ったか、差異は認められなかった。

III 自閉症と統合失調症の一卵性双生児
不一致例で候補遺伝子プロモーター領域の
HapII/MspI 領域のメチル化を調べたか、と
もに罹患双生児の方が同領域のメチル化の
程度が大きいことを示唆する結果となった。
参考

Tsujita T, Nukawa N, Yamashita H,
Imamura A, Hamada A, Nakane Y,
Okazaki Y Genomic discordance between
monozygotic twins discordant for
schizophrenia *Am J Psychiatry* 1998
Mar,155(3) 422-4

Polymeropoulos MH, Xiao H, Torrey EF,
DeLisi LE, Crow T, Merrill CR Search for
a genetic event in monozygotic twins
discordant for schizophrenia *Psychiatry
Res* 1993 Jul,48(1) 27-36

Nelson M, Raschke E, McClelland M
Effect of site-specific methylation on
restriction endonucleases and DNA
modification methyltransferases *Nucleic
Acids Res* 1993 Jul 1,21(13) 3139-54

Yamashita H, Shibata T, Tsujita T,
Imamura A, Chourkina I, Mitsuhashi T,
Okazaki Y Fluorescent Representational
Genomic Profiling (FRGP) a new
technique for genomic differential
display and cloning (投稿中)

F 健康危険情報
なし

G 研究発表

1 論文発表

Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M,
Bundo M, Kasahara T, Kusumi I, Tsujita
T, Okazaki Y, Nanko S, Kunugi H, Sasaki

T, Kato T Related Articles, Links
Impaired feedback regulation of XBP1 as
a genetic risk factor for bipolar disorder
Nat Genet 2003 Oct,35(2) 171-5 Epub
2003 Aug 31

Yokota H, Tsujita T, Okazaki Y, Kikuya E,
Oishi M Polymorphic 33 bp repeats with
promoter-like activity in synaptotagmin
11 gene *DNA Res* 10, 287-289

今村明、秋月誠一、橋田あおい、藤丸浩輔、
辻田高宏、林田雅希、岡崎祐士 双生児・家
系（同胞）研究によるパニック障害の成因
についての検討 *臨床精神医学*
32,1349-1352

The 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*
120B 22-28, 2003

今村明、秋月誠一、橋田あおい、藤丸浩輔、
辻田高宏、林田雅希、岡崎祐士 双生児
家系（同胞）研究によるパニック障害の成
因についての検討 *臨床精神医学* 32、
1349-1352、2003

辻田高宏 統合失調症のエピジェネティク
ス、キーワード精神第3版、先端医学社、
pp202-203、2003

Matsumoto S, Sasaki T, Imamura A,
Matsuo K, Kayashima T, Hashida A,
Ono S, Tsujita T, Matsumoto S, Nakane
Y, Tokunaga K, Okazaki Y HLA class I
distribution in Japanese patients with
schizophrenia *Am J Med Genet* 114
42-45, 2002

Fujimaru K, Imamura A, Tsujita T,