

関する研究結果について述べる。

## 対象と方法

対象は、153名の双極性障害患者群（男71人、平均年齢47歳）と年齢・性について統制された同数の健常対照群である。

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、理化学研究所の倫理委員会の承認を得て行われた。

BDNFの2塩基繰り返し配列については、Proschelら<sup>7)</sup>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, ベックマン・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繰り返回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が明らかになったため、パイロシーケンス法(Pyrosequencing 社)によるシーケンス、pBluescriptIIISK(+)(TOYOBO)ベクターを用いて個々の対立遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定することにより、遺伝子型を決定した。

また、この多型領域が遺伝子転写活性と関連があるか否かを検証するために4つの主要な対立遺伝子についてラット大脳皮質の初代培養ニューロンによるルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを行った。

## 結果

BDNFの繰り返し配列について検討したところ、Proschelら<sup>7)</sup>の当初の報告ではGTリピートと記載されていたが、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)<sub>n</sub>、(GA)<sub>n</sub>の多型が(CA)<sub>n</sub>の前後に存在していることが明らかになり、20以上の対立遺伝子を同定した(Fig. 1)。そのうち、頻度が比較的高い対立遺伝子は4つ存在した。遺伝子型分布は、Hardy-Weinberg平衡から有意な偏りを認めなかった。4つの頻度が高い対立遺伝子のうちの1つの対立遺伝子(A1とする)は、双極性障害に有意に多かった(p<0.01)。

培養ニューロンによるルシフェラーゼアッセイの結果、この多型領域は若干のサイレンサー活性があり、A1では、最もその活性が強かった(p<0.01)。

## 考察

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、図らずも、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が明らかになった。当初、Proschelら<sup>7)</sup>はGTリピートと記載したが、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)<sub>n</sub>、(GA)<sub>n</sub> の多型が(CA)<sub>n</sub> の前後に存在していることが明らかになった。この多型は双極性障害と有意に関連し、しかも発病危険性を高める対立遺伝子は、ルシフェラーゼアッセイによって遺伝子転写の低活性と関連することが示唆された。以上からこの BDNF の遺伝子多型は、双極性障害の感受性遺伝子であることが明らかとなった。この多型が統合失調症やその臨床特性と関連するという先行研究もあり<sup>3,5)</sup>、統合失調症との関連などについてさらに検討する価値がある。

#### 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) 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.
- 4) Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M, Hashimoto R, Kato T, Sakamoto K, Fukunaga T, Inada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Yamada K, Yoshikawa T: No association between the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar disorder in Japanese: a multi-center study. *Biological Psychiatry*, **2004**; 56: 376-8.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

Fig. 1 BDNF 遺伝子のマイクロサテライト多型の構造

AGCACTAGCTGCCTATTCCAAAATGTGTAAAACACCACTCAGCTTTTTAAAAGTAG  
GATAAACTCAGAGCGCGCGCACA  
<CGCGCGCGCG>①  
<CACACACACACACACACACACACA>②  
<GAGAGA>③  
ACATCTCTAGTAAAAAGAAAAGTTGAGCTTCTTAGCTAGATGTGTGTATTAGCCAGA  
AAAAGCCAAGGAGTGAAGGGTTTTAGAGAACTGGAGGAGATAAAGTGGA

①(CG)n: n=0, 4, or 5

②(CA)n: n=10 ~ 15

③(GA)n: n=2 or 3

健康危険情報

特になし

論文発表

Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M,  
Hashimoto R, Kato T, Sakamoto K,  
Fukunaga T, Inada T, Suzuki T, Iwata N,  
Ozaki N, Yamada K, Yoshikawa T: No  
association between the Val66Met  
polymorphism of the brain-derived  
neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar  
disorder in Japanese: a multi-center study.  
Biological Psychiatry 56 (5): 376-378, 2004.

(学会発表：省略)

知的財産の出願・登録状況

特になし

## Gem interacting protein 遺伝子変異とうつ病との関連

主任研究者 功刀 浩\*

共同研究者：田所和幸\*、橋本亮太\*、小菅麻子\*\*、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

Gem interacting protein (GMIP)は、新しい Rho GTPase 活性化タンパク(RhoGap)であり、神経突起や軸索の伸長に重要な役割を果たしていることが知られている。本研究では、GMIP 遺伝子多型とうつ病との関連を検証した。対象は、164 人の大うつ病患者と年齢・性について統制された同数の健常者である。その結果、GMIP 遺伝子の 5' 上流域に存在する一塩基多型(SNP)である -525G/A について対立遺伝子頻度を調べたところ、有意差を認めた(p=0.039, odds ratio 1.66, 96%CI 1.05-2.69)。さらにハプロタイプ解析を行った結果、より強い関連が認められた(p=0.004)。-525G/A による塩基置換が遺伝子転写活性に影響を与えるか否かについて調べるために 3 種の細胞株を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、うつ病患者に多い-525A 対立遺伝子は低活性と関連することが明らかになった。以上の結果から GMIP の遺伝子変異、特に -525G/A 多型は転写活性に影響を与えることによってうつ病の発病危険性と関連する可能性が示唆された。

### 目的

うつ病の病因には、遺伝的要因と環境要因とが関与する[1]。さらに、近年の画像研究によれば、うつ病では脳構造の可塑性異常が存在することが示唆されている[2]。したがって、脳の可塑性において重要な役割を果たす遺伝子の変異は、うつ病の発病危険性と関連する可能性がある。

Rho ファミリーのGTP 結合タンパクは、神経突起や軸索の伸長など脳の可塑性において重要な役割を果たすことが知られてい

る[3]。これらのタンパクは、GTPに結合した活性型とGDPに結合した非活性型とが存在する。この活性化はGTPase活性化タンパクによって制御されている[4]。Gem interacting protein (GMIP)は、近年同定された新しいGTPase活性化タンパクであり、Ras スーパーファミリーのメンバーであるGem に結合する[5]。GMIP遺伝子は、染色体 19p11-12にあり、21個のエクソンからなる。GMIPのmRNAは3840bpであり、970アミノ酸残基からなるタンパクであり、ユビキタス

に発現している[5]。GMIPはRhoAの機能を阻害することによって生体内で細胞骨格の再構築が生じることが知られている。そこで本研究は、GMIP遺伝子はうつ病の候補遺伝子としてとりあげ、遺伝子解析研究を行った。

#### 対象と方法

対象は、164名の大きいうつ病患者(男59名；平均年齢49.5歳)と年齢・性・人種(日本人)についてマッチした健常者である。診断はDSM-IVに従った。健常者は過去にも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。

データベース上でGMIP遺伝子のSNPsを抽出し、遺伝子の内側に4つのSNPs(SNP1: rs3794996, SNP2: rs2043293, SNP3: rs2304129, SNP4: rs880090)、外側に2つのSNPs(SNP5: rs2288865, SNP6: rs1054685)を選択し、TaqMan法によって遺伝子型を決定した。SNPsのGMIP遺伝子上の位置をFigure 1に示す。

GMIPの5'-上流域については、24人の健常者のゲノムを用いて変異スクリーニングを行った。変異スクリーニングに際しては、以下の3組のプライマーを用いた。

- ① 5'-CATCACAAGGTCAGGAGATCGA-3'  
(F)5'-CAGTGGAATTTTGGGGCTGGAA-3'(R)
- ② 5'-GGAAACCTGGCTTGGCTCTTA-3'(F)

5'-GGCCTGATATTCTGTCCGATTC-3'(R)

③ 5'-CAAACCTCCACTCCCTACCT-3'(F)

5'-GTCCTCCCATTACAGGAACT-3'(R)

これは、翻訳開始点の周囲およそ1200bpをカバーする領域である(-1120から+160)。PCR産物を直接シーケンスして変異を決定した。

-525G/A多型については、デュアルルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)とルミノメータLB 9507 (Berthold, Bad Wildbad, Germany)を用いて転写活性への影響をみた。用いた細胞株は、HeLa細胞、ヒト神経芽細胞腫IMR-32、ヒトグリオーマ細胞Hs683である。

#### 結果

遺伝子型分布は全てのSNPsに関してHardy-Weinberg平衡からの有意な偏りを認めなかった。それぞれのSNPsに関する患者群と健常者群における遺伝子型分布と対立遺伝子頻度をTable 1に示す。SNP1のA型対立遺伝子は、大きいうつ病患者に有意に多かった( $\chi^2=4.25$ ,  $df=1$ ,  $p=0.039$ )。他の3つのSNPsに関しては、変異型アレルが患者群で多い傾向があった(SNP2:  $p=0.075$ , SNP3:  $p=0.058$ , SNP4:  $p=0.075$ )。SNP5やSNP6については、統計的な関連は認められなかった。

5'上流域の変異スクリーニングにより、新しいSNP(-1007C/T)を見出した。しかし、これについて遺伝子型を決定したところ、変異型アレルの頻度は極めて稀であり、患者群と健常者群との間で統計的に比較することは不可能であった。

うつ病患者では、発症率に男女差があることから、男女別に分析したところ、

SNP2、SNP3、SNP4 に関して、男性のみで有意差を認めた(SNP2:  $p=0.0086$ ; corrected  $p=0.034$ , SNP3:  $p=0.0086$ ; corrected  $p=0.034$ , SNP4:  $p=0.015$ ; corrected  $p=0.06$ ) (Table 2)。

次に SNPs 間の連鎖不平衡  $D'$  を permutation 法[6]によって検討した結果 (Table 3)、全ての  $D'$  値は 0.97 以上であり、互いに強い連鎖があることが示唆された。ハプロタイプ解析を行ったところ、ハプロタイプの分布は男性では患者群と健常者群との間で有意に異なっていたが (Table 4;  $p=0.0087$ )、女性では有意な関連を認めなかった。

-525G/A 多型についてのルシフェラーゼアッセイの結果を Figure 2 に示す。全ての細胞株(HeLa, IMR-32, and Hs683)において、相対的ルシフェラーゼ活性はか A 型対立遺伝子で減少していた(HeLa cells  $0.85\pm 0.05$  vs  $1.00\pm 0.03$ ,  $p<0.001$ ; IMR-32 cells  $0.84\pm 0.10$  vs  $1.00\pm 0.07$ ,  $p=0.002$ ; Hs683 cells  $0.86\pm 0.09$  vs  $1.00\pm 0.07$ ,  $p=0.002$ )。この A 型対立遺伝子は、Table 1 に示すごとく、患者群で有意に多い。

#### 考察と結論

本研究結果から、GMIP の遺伝子変異はうつ病の発病危険性と関連することが示唆された。特に、5'上流域にある-525G/A 多型は、ルシフェラーゼアッセイの結果から、転写活性に影響を与える機能的変異であることが示唆された。したがって、今後、独立のサンプルによってさらに検証される必要があるものの、GMIP はうつ病(特に男性)の感受性遺伝子であることが強く示唆された。

#### 文献

1. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301:386-389.
2. Manji HK, Drevets WC, Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7:541-547.
3. Negishi M, Katoh H (2002) Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation. *J Biochem (Tokyo)* 132:157-166.
4. Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.
5. Aresta S, de Tand-Heim MF, Beranger F, de Gunzburg J (2002) A novel Rho GTPase-activating-protein interacts with Gem, a member of the Ras superfamily of GTPases. *Biochem J* 367:57-65.
6. Good P (2000) Permutation tests. A practical guide to resampling methods for testing hypothesis. 2nd edn. Springer-Verlag New York

**Table 1. Genotype and allele distributions for the SNPs in the GMIP gene among the patients with major depressive disorder and controls**

SNP-ID	SNP	Controls				Allele2 frequency	Major depressive disorder				P value	OR (95%CI)
		Genotype frequency			Allele1 frequency		Genotype frequency			Allele2 frequency		
		1/1	1/2	2/2			1/1	1/2	2/2			
SNP1	G/A	134 (81.7%)	30 (18.3%)	0 (0%)	0.091	120 (73.2%)	41 (25.0%)	3 (1.8%)	0.143	0.039	1.66(1.05-2.69)	
SNP2	T/G	119 (72.6%)	44 (26.8%)	1 (0.6%)	0.140	106 (64.6%)	53 (32.3%)	5 (3.1%)	0.192	0.075	1.46(0.93-2.26)	
SNP3	G/C	120 (73.2%)	43 (26.2%)	1 (0.6%)	0.137	106 (64.6%)	53 (32.3%)	5 (3.1%)	0.192	0.058	1.50(0.96-2.27)	
SNP4	C/G	119 (72.6%)	44 (26.8%)	1 (0.6%)	0.140	106 (64.6%)	53 (32.3%)	5 (3.1%)	0.192	0.075	1.46(0.96-2.23)	

Major allele in each SNP represents allele 1.

**Table 2. Allele distributions for the SNPs in the GMIP gene among the patients with MDD and controls in male**

SNP-ID	Controls	MDD	P value	Odds Ratio (95%CI)
SNP1	0.119	0.195	0.11	1.80(0.91-4.02)
SNP2	0.127	0.263	0.0086	2.45(1.29-5.36)
SNP3	0.127	0.263	0.0086	2.45(1.23-5.23)
SNP4	0.136	0.263	0.015	2.27(1.20-4.72)

Minor allele frequencies in controls are shown.

**Table 3. Marker-to-marker LD in the GMIP gene**

	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4
SNP1	-	0.97	0.97	0.97
SNP2	1.00	-	1.00	1.00
SNP3	1.00	1.00	-	1.00
SNP4	1.00	0.97	1.00	-

For each pair of markers, the standardized  $D'$  in controls is shown below the diagonal, and the standardized  $D'$  in cases above the diagonal.

**Table 4. Estimated haplotype frequencies for patients and controls in male**

Haplotype	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	Haplotype frequency		P value
					patients	controls	
1	G	T	G	C	0.728	0.864	0.0044
2	A	G	C	G	0.186	0.119	0.11

Figure 1. Genomic structure and location of SNPs for human GMIP gene.

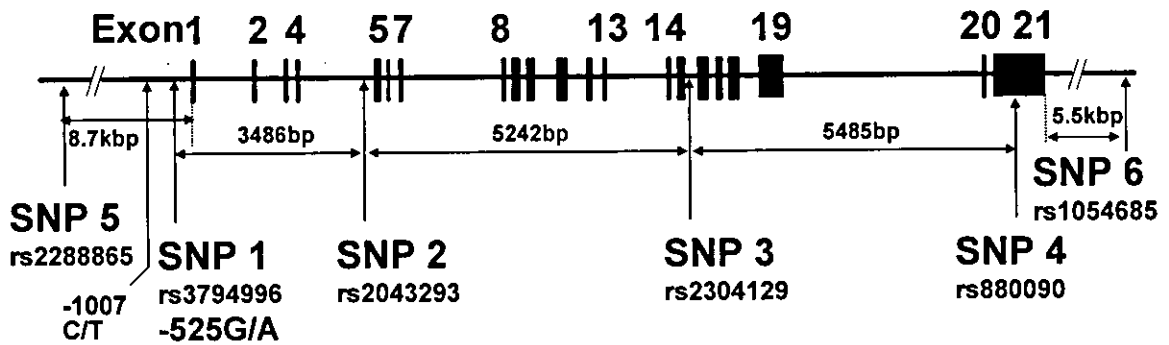
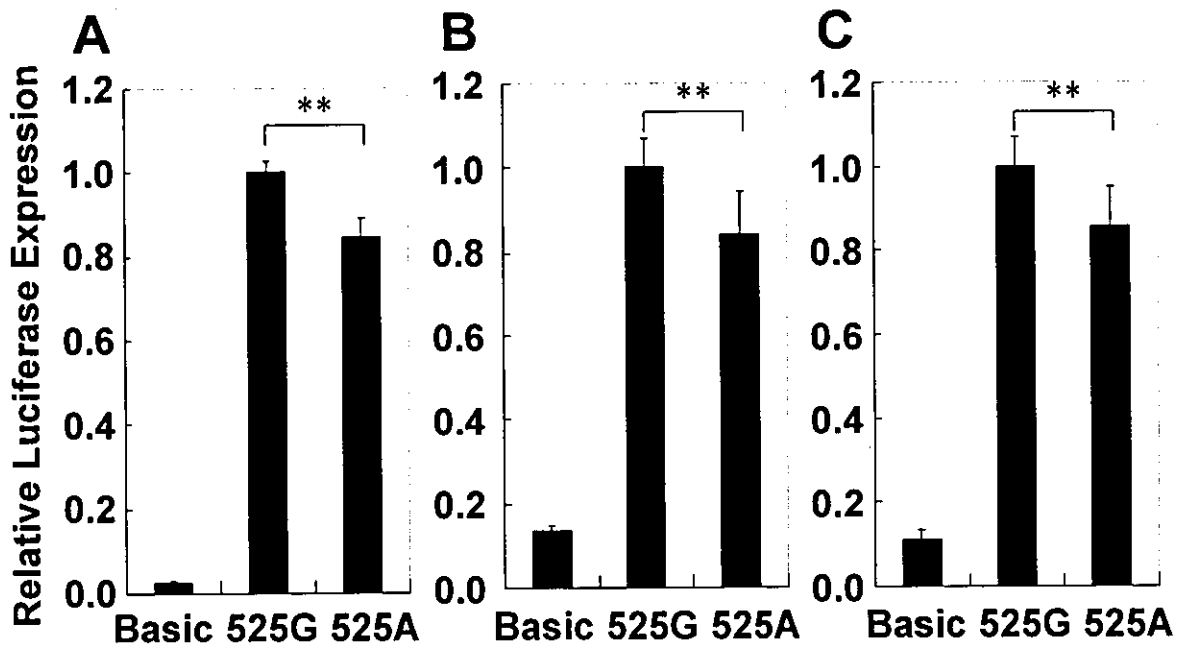


Figure 2. Effects of human GMIP -525G/A SNP on promoter activity measured using H eLa cells (A), IMR-32 cells (B) and Hs683 cells (C). \*\*P<0.005.





健康危険情報

特になし

論文発表

Tadokoro K, Hashimoto R, Tatsumi M, Kosuga A, Kamijima K, Kunugi H: The Gem interacting protein (GMIP) gene is associated with major depressive disorder. Neurogenetics (in press)

(学会発表：省略)

知的財産の出願・登録状況

特になし

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

自殺を惹起する精神疾患の感受性遺伝子の解明

分担研究課題

『AKT1 遺伝子と統合失調症・覚醒剤使用障害との関連研究』

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：モノアミン系受容体は、AKT1-GSK3 $\beta$ シグナルカスケードを介して転写、翻訳、アポトーシスなど、多様な細胞機能の制御を担っており、AKT1は精神障害の病態生理に関係しうると考えられている。近年、AKT1 遺伝子と統合失調症との関連解析において陽性所見が報告され着目された。そこで、日本人統合失調症およびMETH使用障害を対象としてAKT1 遺伝子との関連を検討した。その結果、AKT1 遺伝子は統合失調症ともMETH使用障害とも関連することが判明した。ただし、Caucasian 統合失調症と関連が見いだされた SNP3 との関連は日本人の場合、METH 使用障害と関連が見いだされ、日本人統合失調症ではSNP3より5'側に位置するSNP5との関連が見いだされた。連鎖不平衡 mappingの結果によるとSNP5近傍の連鎖不平衡の状態は複雑である。本研究の結果は、今後、連鎖不平衡 mapping 手法の進展により再検討を要する課題である。

A. 研究目的

Serotonin(5-HT)受容体, dopamine(DA)受容体は、AKT1-GSK3 $\beta$ シグナルカスケードを介して転写、翻訳、アポトーシスなど、細胞機能の制御に重要な役割を果たしていることが判明している。さらに、AKT1-GSK3 $\beta$ シグナルカスケードは神経細胞の極性形成における働き、Liなどの向精神薬の作用、DA-dependent behaviorに関与することが示唆されている。したがって、AKT1-GSK3 $\beta$ シグナルカスケードは自殺危険率の高い統合失調症、気分障害、覚醒剤使用障害といった多くの精神障害の病態生理に関与しうると考えられている。

特にAKT1 遺伝子が統合失調症と関連するとの報告がなされ(Emamian et al. Nat Genet 2004)、本遺伝子は精神障害のゲノム研究において大いに着目されている。

そこで、我々はAKT1 遺伝子を候補遺伝子として日本人統合失調症および

Methamphetamine(METH) 使用障害を対象として関連解析を行った。

B. 研究方法

1. 507人の統合失調症患者、182人のMethamphetamine使用障害患者と437人の正常対照者のDNAを対象に、6個のSNPs(Emamianらが用いた5個のSNPs:SNP1-5と1個のSNPA: dbSNP databaseから選択)をgenotypeした。
2. 関連解析はallele、genotype、haplotype-wiseで行い、haplotypeはEMアルゴリズムを用いて推定した。
3. GenotypingにはPCR-RFLP法、TaqMan法、direct sequencing法を用いた。診断はすべてDSM-IVに基づき行われた。
4. なお、本研究は三省合同のゲノム研究に関する倫理指針に則った名古屋大学倫理審査委員会の承認を得ており、対象者には本研究に関して十分な説明を行い、文書

にて同意を取得した。

### C. 研究結果

#### 1. 統合失調症と AKT1 との関連解析

日本人統合失調症と AKT1 遺伝子上の SNP5 との関連を見いだした。これは、Emamian らが関連を見いだした SNP3 とは異なるものであった。

#### 2. METH 使用障害と AKT1 との関連解析

日本人 METH 使用障害と AKT1 遺伝子上の SNP3 との関連を見いだした。

### D. 考察と結論

Caucasian 統合失調症と AKT1 遺伝子は関連が見いだされたが、今回、日本人統合失調症および METH 使用障害とも関連が見いだされた。

Emamian らが関連を見いだした SNP3 とは METH 覚醒剤使用障害と関連があり、統合失調症とは 5' 側に位置する SNP5 との関連が検出された。

本遺伝子の連鎖不平衡 mapping の結果は、SNP5 の近傍では非常に複雑な連鎖不平衡状態を呈しており、今回の結果に影響を与えていた可能性が推察される。今後、連鎖不平衡 mapping に関するより精妙で統一的な見解が期待されることである。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

・ Saito S, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Takahashi N, Inada T, Ozaki N: No association was found between a functional SNP in ZDHHC8 and schizophrenia in a Japanese case-control population. *Neurosci Lett* 374 (1) :21-24, 2005

・ Miura H, Qiao H, Kitagami T, Ohta T, Ozaki N: Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin levels and dopamine as well as serotonin

turnover in the mesoprefrontal system of mice. *Psychopharmacology (Berl)* 177 (3) :307-14, 2005

・ Hashimoto R, Suzuki T, Iwata N, Yamanouchi Y, Kitajima T, Kosuga A, Tatsumi M, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H: Association study of the frizzled-3 (FZD3) gene with schizophrenia and mood disorders. *J Neural Transm* 112 (2) :303-307, 2005

・ 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* 73 (2-3) :383-385, 2005

・ Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y, Kitajima T, Shibui K, Katoh M, Watanabe T, Hashimoto Y, Ozeki Y, Hori T, Yamada N, Toyoshima R, Ozaki N, Okawa M, Nagai K, Takahashi K, Isojima Y, Yamauchi T, Ebisawa T: A Missense Variation in Human Casein Kinase I Epsilon Gene that Induces Functional Alteration and Shows an Inverse Association with Circadian Rhythm Sleep Disorders. *Neuropsychopharmacology* (4) :1-9, 2004

・ Ozaki N: Pharmacogenetics of antipsychotics. *Nagoya J Med Sci* 67 (1-2) :1-7, 2004

・ Okada M, Goldman D, Linnoila M, Iwata N, Ozaki N, Northup JK: Comparison of G-Protein Selectivity of Human 5-HT<sub>2C</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> Receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1025 570-7, 2004

・ Okada M, Northup J, Ozaki N, Russell J, Linnoila M, Goldman D: Modification of Human 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Function by Cys23Ser, an Abundant, Naturally Occurring Amino Acid Substitution. *Mol Psychiatry* 9 (1) :55-64, 2004

- Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H, Hashimoto R: Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet* 13 (21) :2699-2708, 2004
- Nokura K, Kanbayashi T, Ozeki T, Koga H, Zettsu T, Yamamoto H, Ozaki N, Shimizu T, Kawase T: Hypersomnia, asterixis and cataplexy in association with orexin A-reduced hypothalamic tumor. *J Neurol* 251 (12) :1534-5, 2004
- Munakata K, Tanaka M, Mori K, Washizuka S, Yoneda M, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kunugi H, Tadokoro K, Ozaki N, Inada T, Sakamoto K, Fukunaga T, Iijima Y, Iwata N, Tatsumi M, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T: Mitochondrial DNA 3644T-->C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics* 84 (6) :1041-1050, 2004
- Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M, Hashimoto R, Kato T, Sakamoto K, Fukunaga T, Inada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Yamada K, Yoshikawa T: No association between the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and bipolar disorder in a Japanese population: a multicenter study. *Biol Psychiatry* 56 (5) :376-8, 2004
- 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* 126B (1) :43-45, 2004
- Kobayashi H, Ide S, Hasegawa J, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Shen HW, Ikeda K, Sora I: Study of Association between {alpha}-Synuclein Gene Polymorphism and Methamphetamine Psychosis/Dependence. *Ann N Y Acad Sci* 1025 325-334, 2004
- Iwata N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H, Ozaki N: No Association Is Found between the Candidate Genes of t-PA/Plasminogen System and Japanese Methamphetamine-Related Disorder: A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1025 34-38, 2004
- 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
- Itoh K, Hashimoto K, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Iwata N, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Nakata K, Ujike H, Iyo M: Association study between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and methamphetamine abusers in Japan. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132B (1) :70-73, 2004
- Inada T, Iijima Y, Uchida N, Maeda T, Iwashita S, Ozaki N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H: No Association Found between the Type 1 Sigma Receptor Gene Polymorphisms and Methamphetamine Abuse in the Japanese Population: A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1025 27-33, 2004
- Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N: Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population. *Biol Psychiatry* 56 (9) :698-700, 2004

• Ide S, Kobayashi H, Tanaka K, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Ikeda K, Sora I: Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers. *Ann N Y Acad Sci* 1025 316-324, 2004

• 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- $\alpha$ ) gene in Japanese patients with schizophrenia. *Journal of Neural Transmission* 111 (2) :217-222, 2004

• Harano M, Uchimura N, Abe H, Ishibashi M, Iida N, Yanagimoto K, Tanaka T, Maeda H, Sora I, Iyo M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Ujike H: A Polymorphism of DRD2 Gene and Brain Atrophy in Methamphetamine Psychosis. *Ann N Y Acad Sci* 1025 307-315, 2004

• Deng XX, Shibata HH, Ninomiya HH, Tashiro NN, Iwata NN, Ozaki NN, Fukumaki YY: Association study of polymorphisms in the excitatory amino acid transporter 2 gene (SLC1A2) with schizophrenia. *BMC Psychiatry* 4 (1) :21, 2004

## 2. 学会発表

Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M, Ozaki N: Can a SNP on splicing variant of HTR4 predict post psychotic depression or anxiety?, in 12th World Congress on Psychiatric Genetics. Dublin, 2004

Ujike H, Iwata N, Ozaki N: Central cannabinoid receptor gene (CNR1) and schizophrenia, in International Congress of Biological Psychiatry Symposium: Endocannabinoids: A Novel Signaling System in Schizophrenia Research. Sydney, 2004

鈴木竜世, 山本香代子, 村上裕子, 山之内芳雄, 北島剛司, 池田匡志, 美根和典, 尾崎紀夫, 岩田仲生: 5-HT<sub>2C</sub> 受容体遺伝子 (HTR2C) の多型検索と統合失調症との関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

鈴木敦子, 中村和彦, 関根吉統, 長田奈穂子, 竹林淳和, 三辺義雄, 武井教使, 鈴木勝昭, 岩田泰秀, 河合正好, 伊豫雅臣, 尾崎紀夫, 稲田俊也, 岩田仲生, 原野陸生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 氏家寛, 森 則夫: 覚醒剤精神病における SOD2 の関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

Ozaki N, Iwata N, Inada T: Genomic research of schizophrenia: from candidate gene and pharmacogenetic approach to whole genome study, in WFSBP Asian Pacific Congress: Plenary Lecture. Korea, 2004

野村 晃, 氏家 寛, 中田謙二, 勝 強志, 大谷恭平, 森田幸孝, 田中有史, 黒田重利, 稲田俊也, 原野陸正, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 関根吉統, 曾良一郎, 岩田仲生, 伊豫雅臣, 尾崎紀夫: Prodorphin 遺伝子のプロモーター領域の機能的多型と覚せい剤依存症との関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

木下葉子, 鈴木竜世, 池田匡志, 北島剛司, 山之内芳雄, 岩田仲生, 尾崎紀夫: Calcineurin 遺伝子 (PPP3CC) と統合失調症の関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

尾崎紀夫, 稲田俊也, 岩田仲生: 統合失調症ゲノム研究と臨床薬理学研究との架橋を目指して, in 第 14 回日本臨床精神神経薬理学会 シンポジウム「分子精神医学の進歩と精神科薬物療法」. 神戸, 2004

飯嶋良味, 坂元 薫, 福永貴子, 中平 進, 大槻露華, 吉川武男, 山田和男, 功刀 浩, 岡田武也, 加藤忠史, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 巽 雅彦, 南光進一郎, 樋口輝彦, 有波忠雄, 稲田俊也: 双極性障害における ChromograninB 遺伝子の大規模関連解

析, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

池田匡志, 鈴木竜世, 山之内芳雄, 北島剛司, 西山 毅, 稲田俊也, 岩田仲生, 尾崎紀夫: AKT1 と日本人統合失調症との関連解析, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

Ikeda M, Iwata N, Nishiyama T, Suzuki T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: No Association between GABAA cluster on 5q and Japanese schizophrenia, in 12th World Congress on Psychiatric Genetics. Dublin, 2004

大西哲生, 山田和男, 茂野佳美, 大羽尚子, 鷹雄 瞳, 豊田倫子, 飯嶋良味, 稲田俊也, 坂元 薫, 功刀 浩, 巽 雅彦, 南光進一郎, 岩田仲生, 尾崎紀夫, 加藤忠史, 吉川武男: IMPA2 遺伝子プロモーター領域に存在する気分障害リスクハプロタイプ, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

大掛真太郎, 橋本謙二, 清水栄司, 関根吉統, 稲田俊也, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 中田謙二, 氏家 寛, 伊豫雅臣: NQO 遺伝子多型と覚醒剤乱用との関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

村上裕子, 小林大介, 鈴木竜世, 岩田仲生, 尾崎紀夫, 原口浩一, 家入一郎, 細井昌子, 澤田康文, 久保千春, 美根和典: Paroxetine の副作用発現と CYP2D6 及びセロトニン系遺伝子多型との関連, in 第 14 回日本臨床精神神経薬理学会. 神戸, 2004

千崎康司, 野田幸裕, 永井 拓, 楠 和憲, 岩田仲生, 鍋島俊隆, 尾崎紀夫: 大うつ病患者における治療前後の状態像と血漿神経ステロイドの関係, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

小林秀昭, 井手聡一郎, 長谷川準子, 氏家寛, 尾崎紀夫, 関根吉統, 稲田俊也, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 伊豫雅臣, 岩田仲生, 岩橋和彦, 糸川昌成, 池田和隆,

曾良一郎: メタンファタミン依存とオピオイド関連受容体遺伝子多型に関する相関研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

小泉裕紀, 橋本謙二, 熊切 力, 清水栄司, 関根吉統, 尾崎紀夫, 稲田俊也, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 氏家寛, 武井教使, 伊豫雅臣: グルタチオン S トランスフェラーゼ M1 (GSTM1) 遺伝子欠損と覚醒剤乱用者の関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

高橋長秀, 稲田俊也, 石原良子, 三浦英樹, 斉藤真一, 岡本英治, 樽井俊介, 尾崎紀夫: 統合失調症患者における血中クロモグラニン A 濃度の変動, in 第 14 回日本臨床精神神経薬理学会. 神戸, 2004

橋本亮太, 沼川忠広, 矢ヶ崎有希, 石本哲也, 鈴木竜世, 岩田仲生, 尾崎紀夫, 田口隆久, 巽 雅彦, 上島国利, Straub R, Weinberger D, 功刀 浩: 統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

橋本亮太, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 山之内芳雄, 鈴木竜世, 北島剛司, 巽 雅彦, 上島国利, 功刀 浩: Chimerin2 遺伝子の H204R ミスセンス多型は男性において統合失調症と関連する, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

橋本謙二, 伊藤加奈子, 清水栄司, 関根吉統, 稲田俊也, 尾崎紀夫, 岩田仲生, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 山田光彦, 曾良一郎, 中田謙二, 氏家 寛, 伊豫雅臣: BDNF 遺伝子と覚醒剤乱用者の関連研究, in 第 26 回日本生物学的精神医学会. 東京, 2004

H. 知的財産権の出願。登録状況なし。

## 自殺を惹起する精神疾患における fatty acid amide hydrolase および

### GABA<sub>A</sub>受容体 $\alpha$ 5 サブユニット遺伝子相関研究

分担研究者: 氏家 寛<sup>1,2</sup>

研究協力者: 森田幸孝<sup>1</sup>、大谷恭平<sup>1</sup>、岸本真希子<sup>1</sup>、森尾亜希子<sup>1</sup>、野村 晃<sup>1</sup>、稲田俊也<sup>2</sup>、原野陸正<sup>2</sup>、小宮山徳太郎<sup>2</sup>、山田光彦<sup>2</sup>、関根吉統<sup>2</sup>、曾良一郎<sup>2</sup>、岩田仲生<sup>2</sup>、伊豫雅臣<sup>2</sup>、尾崎紀夫<sup>2</sup>、黒田重利<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学分野、<sup>2</sup> Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse (JGIDA))

#### 【研究要旨】

自殺を高率に生じる精神疾患として統合失調症、双極性障害、薬物依存が挙げられる。これらの疾患脆弱性を生じている可能性のある候補遺伝子を解析している。その候補として、内因性カンナビノイドの分解酵素である fatty acid amide hydroolase (FAAH) と、抑制性神経伝達物質 GABA の A 型受容体  $\alpha$  5 サブユニット (GABRA5) 遺伝子を解析した。FAAH 遺伝子は機能低下を生じる機能性多型である Pro129Thr を統合失調症と覚せい剤依存患者で解析した。その結果、どちらの疾患とも相関はみられなかった。これらのことから、anandamide などの内因性カンナビノイドの増加は危険因子にならないことが推測された。GABRA5 では 5 カ所の多型を双極性障害で解析した。その結果、イントロン 1 の IVS1-21G>A が有意に双極性障害 1 型に相関していた。また、ハプロタイプ解析では IVS1-21A/IVS2-26T ハプロタイプが防禦因子であることがわかった (オッズ比 0.57)。この相関は、双極 2 型、性別、リチウム治療反応性には影響していなかった。以上の結果は、従来の双極性障害における GABA 異常仮説を遺伝学的に支持する結果であり、あるハプロタイプは双極性障害 1 型の発症の予防に働くことがわかった。

#### A. 目的

統合失調症やうつ病などの感情障害では自殺率が非常に高いことは周知の事実であり、その対策はメンタルヘルスでの急務となっている。また、薬物依存症はその薬物が体に悪いことを知りながらも薬物を摂取し続けることから「慢性自殺」とも言われる。これら心の病の発症に遺伝要因が関与していることは、多くの家族研究、双生児研究などから確立されている。これまでに、われわれは、dihydropyrimidinase-related protein 2 や frizzled-3 といった神経可塑に関わる遺伝子が統合失調症の発症危険因子であることを明らかにしてきた<sup>1,2)</sup>。一方で、これらは感情障害や覚せい剤依存の危険因子ではないことも明らかにしてきており<sup>3)</sup>、各疾患で遺伝的発症脆弱性が異なることがわかってきている。これら精神疾患は複雑な多遺伝子遺伝形式をとり、多くの遺伝子リスクファクターが相互作用しながら発症に至ると考えられている。そこで、本年度も、異なる発症候補遺伝子を解析した。

fatty acid amide hydroolase (FAAH) は内因性カン

ナビノイドの分解酵素であり、anandamide やその他の fatty acid amide を代謝する<sup>4)</sup>。外因性カンナビノイドであるマリファナ、大麻は依存物質であり、本邦でも乱用が急増している薬物の一つである。これらは、薬理効果が比較的マイルドであることから、安易な気持ちで乱用に至るケースが多く、そして、その使用経験が、更にコカイン、モルヒネ、覚せい剤といった重度の薬物依存に導く gateway drug として位置づけられている。また、カンナビノイドの使用で幻覚や妄想を生じることがあるが、統合失調症患者が使用した場合、病状の悪化、再発、治療予後の悪化などを引き起こすことが知られている<sup>5)</sup>。また、18 歳以前に 50 回以上マリファナ使用者はその後の統合失調症発症危険率が、一般人より 6 倍以上に跳ね上がるという疫学研究もある<sup>6)</sup>。これらは、カンナビノイド系が薬物依存や統合失調症の発症に関わっていることを示している。

感情障害における GABA 仮説は古くから提唱されている。うつ病の動物モデルの海馬で GABA 量が減少しており<sup>7)</sup>、その行動が GABA アゴニストの muscimol で改善することが報告されている<sup>8)</sup>。また、

実際に、うつ病患者の血漿中と髄液中 GABA 濃度が低下している<sup>9)</sup>、双極性障害患者の死後脳研究で GABA 合成酵素の GAD が大脳皮質と海馬で減少している<sup>10)</sup>、抗うつ薬投与や電気痙攣療法で GABA 受容体が増加する<sup>11)</sup>、気分安定薬のリチウムやバルプロ酸が髄液中の GABA 濃度を増加させる<sup>12)</sup>などが報告されている。GABA 受容体には GABA<sub>A</sub> と GABA<sub>B</sub> があり、さらに多くのサブユニットがあるが、このうち GABA<sub>A</sub> 受容体 $\alpha$  5 サブユニット (GABRA5) は海馬に多く分布している。Debruyne ら<sup>13)</sup> はあるユダヤ人家系の 1 型双極性障害と GABRA5 遺伝子が関連したが、他の家系では関連しないと報告した。Papadimitriou ら<sup>14)</sup> はギリシャ人で双極性障害との関連を報告している。これらのことから、日本人での解析を試みた。

## B. 方法

### 1. 対象

統合失調症患者は 260 名で、男性 159 名、女性 117 名、平均年齢  $44.9 \pm 13.3$  歳である。健常対照群は患者群と年齢・性別・居住地域を一致させた 337 名、男性 194 名、女性 143 名、平均年齢  $47.2 \pm 11.8$  歳である。健常対照群は、精神神経疾患の既往歴及び家族歴のない者とした。診断は ICD-10 の診断基準に基づき判定し、統合失調症の下位分類では、妄想型 127 名、破瓜型 127 名、緊張型 2 名、残遺型 2 名から構成されている。

双極性障害患者は 171 名、男性 86 名、女性 85 名で、平均年齢は  $52.5 \pm 13.7$  歳である。下位分類では I 型双極性障害が 128 名、II 型双極性障害が 43 名である。健常対照者は 298 名で、男性 153 名、女性 145 名で、平均年齢は  $51.8 \pm 14.9$  歳である。

覚せい剤依存症 (F15.2) は 153 名 (男性 124 名、女性 29 名、平均年齢  $37.8 \pm 12.1$  歳)。非使用対照者は 200 名で、男性 162 名、女性 38 名で、平均年齢は  $37.3 \pm 12.1$  歳である。患者の内、141 名は精神病性障害 (F15.5) を合併していた (以下、単に覚せい剤精神病と呼ぶ)。研究に先立ち、岡山大学及び各参加病院、施設で倫理委員会の審査、承認を受け、すべての対象者からは文書によるインフォームドコンセントを得ている。

### 2. ゲノム解析による関連研究

対象者から末梢血 6ml を採血し、スタンダードな方法でゲノム DNA を抽出し、以後の解析に使用した。

FAAH 遺伝子ではミスセンス変異の Pro129Thr 多型を解析した。プライマー (5'-ATG TTG CTG GTT ACC CCT CTC C-3、5'-TCA CAG GGA CGC CAT AGA GCT G-3) で増幅後、Eco0109I で消化後、3% アガロースゲルで電気泳動し、遺伝子型を判定した。GABRA5 遺伝子では 5 つの多型を調べた。そのうち 4 つの SNP はイントロン 1 の rs#140681 (IVS1-21G>A)、イントロン 2 の rs#140683 (IVS2-26T>A)、3' 非翻訳領域の rs#2229943 (\*302C>T)、プロモーター領域の rs#6606854 (-754C>T) で以下のプライマーと制限酵素で遺伝子型を判定した (IVS1-21G>A, 5'-CTCATGTTCTCACCTCCTGCAC-3, 5'-GAGAACGTTT GAAAAGTCAAGGATC-3, BamHI, IVS2-26T>A, 5'-GCCAGCACTGACCCCTGTTCCGTTGT-3, 5'-CGCCGAGA AGACGAAGGCATAG-3, RsaI, \*302C>T, 5'-CAGAA AAAGCGTGAAGTCATAC-3, 5'-AATTATCAATGGGACATCT TGG-3, BsuRI, -754C>T, 5'-ATTGTTATTGTCATGGCT CCAC-3, 5'-TGGCTATAA CCATGTGTAATG-3, EcoRI)。また、12Kb 下流にある CA リピート多型は 5'-GATGACTTACCCACCTTTATTC-3, 5'-GTAGAATTCCT GTAAAGGCAC-3 で増幅後、6% アクリラマインドゲルで解析した。

統計には  $\chi^2$  乗検定、Fisher's exact test およびモンテカルロ法による CLUMP を用いた。連鎖不平衡およびハプロタイプ解析には EH program と SYNPAlyze を用いた。

## C. 結果

### 1.1 FAAH 遺伝子多型と統合失調症

すべての群で、FAAH Pro129Thr 多型分布は Hardy-Weinberg 平衡から逸脱していなかった。統合失調症との関連では統計学的有意な関連は認められなかった (表 1)。また、統合失調症の下位分類での検討でも、妄想型、あるいは破瓜型において有意な相関はなかった。



## 1.2 FAAH 遺伝子多型と覚せい剤依存症

統合失調症と同様に覚せい剤依存症においても、すべての多型分布は Hardy-Weinberg 平衡から逸脱していなかった。疾患との関連では、Pro129Thr は覚せい剤依存症全体、または覚せい剤精神病全体で相関はなかった(表 2)。また、臨床表現系として、覚せい剤初回使用年齢、薬物使用から精神病発現までの潜時、精神病の治療後の予後(遷延性精神病の有無)、自然再燃(いわゆるフラッシュバック)の有無、多剤乱用の有無などについても検討したが、何れも有意な相関はなかった。

## 1.3 GABRA5 遺伝子多型と双極性障害

GABRA5 遺伝子の 5 つの多型のうち \*302C>T は日本人では monomorphic (全部 CC 型) であり、以下の解析から除外した。残り 4 つの多型はいずれも Hardy-Weinberg 平衡から逸脱していなかった。イントロン 1 の IVS1-21G>A 多型は、双極性障害全体では相関がなかったが、1 型双極性障害と遺伝子型、アレル頻度の両方で有意な相関を認めた(表 3、遺伝子型  $p=0.020$ , アレル  $p=0.024$ )。オッズ比は 0.57 (95%CI ; 0.44-0.73) であり、発症防壁因子であることがわかった。この多型は 2 型障害とは相関しなかった。この遺伝子多型の双極 1 型障害における影響では、性差はなく、また、リチウム治療の反応性にも影響していなかった。それ以外の 3 つの多型、-754C>T、IVS2-26T>A、下流の CA repeat 多型は双極性障害全体、もしくは 1 型および 2 型障害に相関していなかった(表 3、4)。

3 つの多型の連鎖不平衡を解析したところ、IVS1-21G>A と IVS2-26T>A 間では強い連鎖(コントロール;  $D'=0.999$ ,  $r^2=0.0401$ ,  $p=0.000$ 、双極 1 型患者;  $D'=1.000$ ,  $r^2=0.0301$ ,  $p=0.0055$ )をみとめたが、-754C>T と IVS1-21G>A 間では連鎖はなかった(コントロール  $D'=0.190$ ,  $r^2=0.00509$ ,  $p=0.104$ 、双極 1 型患者;  $D'=0.363$ ,  $r^2=0.0121$ ,  $p=0.0952$ )(表 5)。そこで、IVS1-21G>A/IVS2-26T>A でハプロタイプ解析をし、各ハプロタイプ頻度を両群で算出した(表 6)。その結果、IVS1-21A/IVS2-26T ハプロタイプは患者

群で有意に少なく( $p=0.039$ )、そのオッズ比は 0.57 (95% CI; 0.44-0.73) であり、このハプロタイプは発症予防因子であることがわかった。

## D. 考察

外因性カンナビノイド、すなわちマリファナなどの喫煙が精神疾患、特に統合失調症における影響については最初に触れたように、陽性症状や予後に悪影響を及ぼすことは多くの臨床事実から明らかである<sup>5)</sup>。一方、カンナビノイド受容体がヒトの脳内にあることが 1988 年に発見され、その遺伝子も同定された。また、anandamide などの内因性アゴニストも発見され、脳内にカンナビノイド神経系が存在することが明らかとなった。このカンナビノイド系が統合失調症患者で変化していることを示唆する報告もある。例えば、中枢型受容体であるカンナビノイド 1 型受容体が統合失調症の死後脳の前頭葉背外側部、基底核、側頭葉で、もしくは帯状回で増加しているという報告がある<sup>15, 16)</sup>。また、この受容体の遺伝子である CNR1 遺伝子が統合失調症と相関したという報告<sup>17)</sup>、髄液中の anandamide と palmitylethanolamine が 2 倍に増加していたという報告<sup>18)</sup>もある。これらのことは、内因性カンナビノイド系の過剰活動が統合失調症の発症脆弱性に関わることを示唆している。また、薬物依存との関係では、動物実験で、オピオイドや覚せい剤の依存形成にオピオイド神経系の関与が示されていたが、最近、Sipe ら<sup>19)</sup>が内因性カンナビノイドアゴニストである anandamide などの代謝酵素 FAAH 遺伝子の活性遺伝子多型を白人薬物乱用者で解析したところ、違法薬物乱用者で有意な相関を報告している。今回のわれわれの日本人での解析では、FAAH 遺伝子多型は統合失調症や覚せい剤依存症・精神病のどちらとも相関は示さなかった。また、統合失調症の下位分類や覚せい剤依存症・精神病の臨床表現型、たとえば、精神病発症潜時や予後の悪さ、自然再燃合併などにも影響していないことが明らかとなった。これらのことは、少なくとも日本人では FAAH 低活性アレル保有による内因性カンナビノイドの過活動がこれら疾患脆弱性や臨床経過に影響しないことが明らかとなった。

双極性障害とGABA<sub>A</sub>受容体遺伝子の研究はいくつか先行研究がある。GABRA5遺伝子については先に触れたが、これ以外に、 $\alpha$ 1サブユニット(GABRA1)遺伝子が気分障害と相関する<sup>20)</sup>、 $\alpha$ 3サブユニット(GABRA3)遺伝子が双極性障害と相関する<sup>21)</sup>、GABRA1とGABRA6が女性の感情障害と相関する<sup>22)</sup>などである。一方、否定する報告も複数ある。この内、GABRA5遺伝子に関してはOrucら<sup>23)</sup>は単極うつ病には相関したが、双極性障害とは相関しないと報告している。また、Duffyら<sup>24)</sup>はGABRA5のCA repeat多型はリチウム反応性双極性障害とは相関しないと報告している。しかし、これらの報告は症例数が少なく、信頼性の低い研究でもあった。今回のわれわれの十分なサンプル数での検討ではGABRA5は有意に双極性障害1型と相関した。また、ハプロタイプ解析ではIVS1-21A/IVS2-26Tが発症防禦因子(オッズ比0.57)であることが明らかになった。この相関は双極2型ではみられず、両型は遺伝的に異なる影響を受けることが示唆された。また、リチウム治療反応性の有無とも相関しないことから、リチウムの効果発現機構にはGABA<sub>A</sub>受容体は重要ではない可能性も示唆された。以上の結果は、双極性障害の発症脆弱性にGABA<sub>A</sub>受容体が関与していることの遺伝学的証拠を提供すると共に、異なる民族ではGABA<sub>A</sub>受容体の異なるサブユニットが影響することを示唆していると考えられた。

### E. 結論

自殺を含むメンタルヘルスに関わる精神疾患発症における感受性遺伝子の検索において、FAAHおよびGABRA5遺伝子多型にて相関解析した。その結果、FAAH遺伝子の活性多型Pro129Thrは統合失調症および覚せい剤依存症・精神病の発症脆弱性には関与していないことが明らかになった。GABRA5遺伝子は双極性障害のうち、1型障害に相関し、IVS1-21A/IVS2-26Tハプロタイプが発症防禦因子(オッズ比0.57)であることを特定した。

### 【参考文献】

1) Nakata K, Ujike H, Sakai A, et al; The human dihydropyrimidinase-related protein 2 gene on chromosome 8p21 is associated with

paranoid-type schizophrenia. Biol Psychiatry.53(2003):571-6.

- 2) Katsu T, Ujike H, Nakano T, et al.; The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is associated with the susceptibility to schizophrenia. Neurosci Lett. 353(2003):53-56.
- 3) Nakata K, Ujike H, Tanaka Y, et al.; No association between the dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene and bipolar disorder in humans. Neurosci Lett. 349(2003): 171-174.
- 4) Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB, Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature 384 (1996) 83-87
- 5) Ujike H, Morita Y. Cannabinoid receptors and schizophrenia. J Pharmacol Sci, 96(2004) 376-381.
- 6) Andreasson, S., Allebeck, P., Engstrom, A., Rydberg, U. Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of Swedish conscripts. Lancet. 2(1987) 1483-1486.
- 7) Lloyd, K.G, Morselli, P.L., Depoortere, H., et al.: The potential use of GABA agonists in psychiatric disorders: evidence from studies with progabide in animal models and clinical trials, Pharmacol Biochem Behav, 18 (1983) 957-966.
- 8) Poncelet, M., Martin, P., Danti, S. et al.: Noradrenergic rather than GABAergic processes as the common mediation of the antidepressant profile of GABA agonists and imipramine-like drugs in animals, Pharmacol Biochem Behav, 28 (1987) 321-326.
- 9) Berrettini, W.H., Nurnberger, J.I., Jr., Hare, T.A., et al: Reduced plasma and CSF gamma-aminobutyric acid in affective illness: effect of lithium carbonate, Biol Psychiatry, 18 (1983) 185-194
- 10) Heckers, S., Stone, D., Walsh, J., et al: Differential hippocampal expression of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 messenger RNA in bipolar disorder and schizophrenia, Arch Gen

- Psychiatry, 59 (2002) 521-529.
- 11) Lloyd, K.G, Thuret, F., Pilc, A., Upregulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) B binding sites in rat frontal cortex: a common action of repeated administration of different classes of antidepressants and electroshock, *J Pharmacol Exp Ther*, 235 (1985) 191-199.
  - 12) Vargas, C., Tannhauser, M., Barros, H.M., Dissimilar effects of lithium and valproic acid on GABA and glutamine concentrations in rat cerebrospinal fluid, *Gen Pharmacol*, 30 (1998) 601-604.
  - 13) De bruyn, A., Souery, D., Mendelbaum, K., Mendlewicz, J. and Van Broeckhoven, C., A linkage study between bipolar disorder and genes involved in dopaminergic and GABAergic neurotransmission, *Psychiatr Genet*, 6 (1996) 67-73.
  - 14) Papadimitriou, G.N., Dikeos, D.G, Karadima, G., et al.: Association between the GABA(A) receptor alpha5 subunit gene locus (GABRA5) and bipolar affective disorder, *Am J Med Genet*, 81 (1998) 73-80.
  - 15) Dean B, Sundram S, Bradbury R, et al.: Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use. *Neuroscience* 103 (2001) 9-15.
  - 16) Zavitsanou K, Garrick T, Huang XF,: Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28 (2004) 355-360
  - 17) Ujike H, Takaki M, Nakata K, et al.: CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7 (2002) 515-518
  - 18) Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D, Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport* 10 (1999) 1665-1669
  - 19) Sipe JC, Chiang K, Gerber AL, et al.: A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 8394-8399
  - 20) Horiuchi, Y., Nakayama, J., Ishiguro, H., et al.: Possible association between a haplotype of the GABA-A receptor alpha 1 subunit gene (GABRA1) and mood disorders, *Biol Psychiatry*, 55 (2004) 40-45.
  - 21) Massat, I., Souery, D., Del-Favero, J., et al.: Excess of allele1 for alpha3 subunit GABA receptor gene (GABRA3) in bipolar patients: a multicentric association study, *Mol Psychiatry*, 7 (2002) 201-207.
  - 22) Yamada, K., Watanabe, A., Iwayama-Shigeno, Y. et al.: Evidence of association between gamma-aminobutyric acid type A receptor genes located on 5q34 and female patients with mood disorders, *Neurosci Lett*, 349 (2003) 9-12.
  - 23) Oruc, L., Verheyen, G.R., Furac, I., et al.: Positive association between the GABRA5 gene and unipolar recurrent major depression, *Neuropsychobiology*, 36 (1997) 62-64.
  - 24) Duffy, A., Turecki, G, Grof, P., et al.: Association and linkage studies of candidate genes involved in GABAergic neurotransmission in lithium-responsive bipolar disorder, *J Psychiatry Neurosci*, 25 (2000) 353-358.

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ujike H, Sato M.; Clinical features of sensitization to methamphetamine observed in patients with methamphetamine dependence and psychosis. *Ann N Y Acad Sc*;1025:279-87, 2004.
- 2) Ujike H and Morita Y: "New Perspectives in the Studies on Endocannabinoid and Cannabis: Cannabinoid Receptors and Schizophrenia". *J*

- Pharmacol Sci Vol. 96 376-381 (2004) .
- 3) Kobayashi H, Ide S, Hasegawa J, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Shen HW, Ikeda K, Sora I.: Study of Association between  $\alpha$  -Synuclein Gene Polymorphism and Methamphetamine Psychosis/Dependence. *Ann N Y Acad Sci.*; 1025: 325-334, 2004.
  - 4) Ide S, Kobayashi H, Tanaka K, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Ikeda K, Sora I.: Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers. *Ann N Y Acad Sci.* 1025:316-24, 2004.
  - 5) Harano M, Uchimura N, Abe H, Ishibashi M, Iida N, Yanagimoto K, Tanaka T, Maeda H, Sora I, Iyo M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Ujike H.: A Polymorphism of DRD2 Gene and Brain Atrophy in Methamphetamine Psychosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1025:307-315, 2004.
  - 6) Iwata N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H, Ozaki N.: No Association Is Found between the Candidate Genes of t-PA/Plasminogen System and Japanese Methamphetamine-Related Disorder: A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann N Y Acad Sci.* 1025:34-38, 2004.
  - 7) Inada T, Iijima Y, Uchida N, Maeda T, Iwashita S, Ozaki N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H.: No Association Found between the Type 1 Sigma Receptor Gene Polymorphisms and Methamphetamine Abuse in the Japanese Population: A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann N Y Acad Sci.* 1025:27-33, 2004.
  - 8) 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.* 126B(1):43-45, 2004.
  - 9) Arai M, Itokawa M, Yamada K, Toyota T, Arai M, Haga S, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T. Association of neural cell adhesion molecule 1 gene polymorphisms with bipolar affective disorder in Japanese individuals. *Biol Psychiatry* 55(8):804-810, 2004.
  - 10) Yokota O, Terada S, Ishihara T, Nakashima H, Kugo A, Ujike H, Tsuchiya K, Ikeda K, Saito Y, Murayama S, Ishizu H, Kuroda S. Neuronal expression of cyclooxygenase-2, a pro-inflammatory protein, in the hippocampus of patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 28(4):715-21. 2004
  - 11) Kockelkorn TT, Arai M, Matsumoto H, Fukuda N, Yamada K, Minabe Y, Toyota T, Ujike H, Sora I, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M. Association study of polymorphisms in the 5' upstream region of human DISC1 gene with schizophrenia. *Neurosci Lett.* 2004;368(1):41-45.
  - 12) Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Ohtani K, Kishimoto M, Morio A, Imamura T, Sakai A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. A nonsynonymous polymorphism in the human fatty acid amide hydrolase gene did not associate with either methamphetamine dependence or schizophrenia. *Neurosci Lett.* ;376(3):182-7. 2005.
  - 13) 氏家 寛、野村 晃、勝 強志、JGIDA: 覚せい剤精神病関連遺伝子。分子精神医学 4、29-35、2004
  - 14) 氏家 寛: 薬物依存をどう捉えるか。日本醫事新報、4183;21-26、2004
  - 15) 氏家 寛、坂井 歩: 薬物依存とドーパミン神経回路。Clinical Neuroscience 22, 656-658, 2004