

約70%に比べると少ない。

連鎖解析では、81家系の解析で女性患者のみで2q33-35に有意な連鎖(lod>6)を認め、この領域の遺伝子CREB1が女性でうつ病と連鎖したという報告がある²⁾。しかし、その家系図を見ると、確実な所見とはいえないようである。

関連研究では、セロトントランスポーターのプロモーター活性に影響する多型(5-HTTLPR)との関連が最もよく研究されている。結果は一致していないが、メタ分析によると、オッズ比1.23で活性の低いSアリルとうつ病が関連していたという。その他、いくつかのモノアミン関連遺伝子(COMT, 5HT2A-R, TPH, NET)について研究されているが、多くは否定的である³⁾。

遺伝子と環境の相互作用

セロトントランスポーター遺伝子多型により、ストレスによるうつ病の発症率が異なることが最近Science誌に報告され、注目された⁴⁾。彼らは、5-HTTLPRとうつ病、ストレスの関係を調べ、ストレスのない状態では、S/S型、S/L型、L/L型の間にうつ病の発症率には差がないが、ストレスフルな生活上の出来事が多い場合、あるいは親から虐待を受けた経験がある場合には、S/S型を持っている者はL/L型の者よりうつ病の発症率が高かった。このデータは、800人以上という多数の被験者における前向き研究による信頼できる結果と考えられ、セロトントランスポーター遺伝子とうつ病に関するこれまでのはっきりしない所見に終止符をうったといってもよからう。ただし、コーカソイドとは逆に、日本人ではS型が多数派であり、抗うつ薬反応性と5-HTTLPRの関係に関してコーカソイドとアジア人で逆の結果がでていることから、この結果が日本人でも同じかどうかは不明である。

性格関連遺伝子

性格と遺伝子の関係について調べた46の研究のメタ分析⁵⁾では、1)5-HTTLPRと回避、攻撃性、2)DRD3A1/A2と接近、3)DRD4と回避、の3つが有意に関連していたという。これらのことから、セロトニン、ドーパミンの機能的多型は性格と関連しているといってもよからう。

ストレスを招く遺伝的素因

双生児研究から、意外な結果が発表されている。一卵性双生児で、一人だけがうつ病に罹患している双生児(不一致

双生児)では、健康なもう一人の双生児でも、ライフイベント(暴行・離婚・失職・経済問題・友人の問題など)が一般よりも有意に多く、社会的援助(ソーシャルサポート)が少ないという。これらの所見は、うつ病の遺伝的素因は、環境要因を招くことで発症を促している可能性を示している。これは、「ストレス」自体がドーキンスのいう「延長された表現型」に該当するものであることを示すものであり、遺伝因-環境因という二分法に疑問が投げかけられる結果となっている³⁾。

身体因にかかわる遺伝子

アルツハイマー病の危険因子(アポリポ蛋白E, prenilin-1など)と老年期うつ病の関連が調べられたが、いずれも否定的な結果となっている。心血管系の危険因子としては、アンジオテンシン変換酵素の遺伝子多型との関連が報告されたが、その後否定された³⁾。

エピジェネティクス

これまでに述べた研究は全て、親から伝えられたDNA塩基配列についてのものである。一方近年、遺伝子配列の変化を伴わずに、遺伝子発現を制御する機構として、DNAメチル化、ヒストンアセチル化などが注目されている。これらは相互に関係しながら遺伝子発現を調節するが、DNAメチル化は、母親由来と父親由来のアレルのどちらかのみが発現する現象(ゲノムインプリンティング)の分子基盤と考えられており、遺伝子配列以外にも、DNAメチル化の状態という遺伝情報が親より伝達されて、遺伝子発現に影響していることになる。こうした現象およびこれを研究する学問領域をエピジェネティクスと呼ぶ。精神疾患においては、遺伝子研究ではなかなか再現性のある所見が得られなかったことから、DNA配列以外に、エピジェネティックな機構もその発症に関与するのではないかとの考えが生まれてきた。

母子分離による遺伝子発現変化

虐待などの不適切な養育を受けたことがうつ病の危険因子となることから、その分子機序についても研究が進められ、生後すぐに一定時間母親と分離して飼育する処置を行うことで、その後ストレスに対し脆弱になることが見出されている。

我々も、ラットにおいて母子分離を行い、海馬よりRNAを抽出しDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、cAMP系遺伝子や成長因子関連遺伝子など、うつ病の病態

仮説に合致する遺伝子群の変化が見られた(幸田ら, 未発表データ)。こうした遺伝子発現変化の原因は未だ不明であるが, 神経発達過程で, DNA のメチル化が変化することが知られており, DNA メチル化の変化を介して生涯遺伝子発現に影響する可能性も考えられている。

RNA 編集

DNA は mRNA に転写され, 蛋白となるが, 転写された mRNA の塩基配列が転写後に変更されることで, ゲノムにコードされた配列とは異なった蛋白が作られる, RNA 編集という現象が知られている。セロトニン 2C 受容体と AMPA/KA 型グルタミン酸受容体が RNA 編集を受けることから, 精神疾患との関連が疑われてきた。

特にセロトニン 2C 受容体(HTR 2C)は, その機能と染色体上の位置(Xq 24)から双極性障害の候補遺伝子と考えられ, 多くの研究がなされてきたが, RNA 編集についても, 精神疾患の原因となる可能性が考えられる。

セロトニン 2C 受容体の mRNA は, 5カ所で編集を受け, 10 種類のアイソフォームが作られるが, その亜型により, 細胞内情報伝達系への作用は 10 倍以上異なる。既に, 自殺者で HTR 2C の A サイトと呼ばれる部位が自殺者死後脳で編集が増加していることなどが報告されている。我々も, 精神疾患患者の死後脳でセロトニン 2C 受容体の RNA 編集を測定し, 自殺者で A サイトの編集が増加し, うつ病患者で D サイトの編集が増加していることを見出した⁹⁾。我々はラットの学習性無力と呼ばれる行動学的なうつ病モデルで, E サイトの編集が増加し, これが抗うつ薬で回復することも見出しており(岩本ら, 未発表データ), RNA 編集は, うつ状態や自殺と結びつく精神症状(衝動性, 希死念慮)と関連している可能性が考えられる。我々の検討では, コカイン・レセルピンというセロトニンを増加または減少させる薬理的負荷では変化がなかったことから, RNA 編集の変化は, セロトニン活性による二次的変化ではないと考えられた。しかし, セロトニンのアゴニストで RNA 編集が変化したという報告もあり, 更なる検討が必要である。もし, RNA 編集の変化が精神状態による二次的な変化ではなく, 精神状態変化の原因としたら, うつ病や自殺に対する新たな治療薬の標的となるかもしれない。

育児放棄・虐待の生物学的基盤

臨床的に, 「虐待の連鎖」と呼ばれる現象, すなわち, 虐待されて育った子どもは, 大人になると虐待するようにな

ることが知られている。前述の, ラットでは養育行動は遺伝よりも母親の養育行動によって規定されるとの報告は, まさにこうした現象に対応するものである。Meaney らのグループは, 十分な養育をするラットと, あまり養育しないラットを使って, 子どもを養育する行動パターンは, 遺伝ではなく, どのような養育を受けたかという環境因により決定されることを見出した⁷⁾。マウスの系統による行動の差も, 一見すべて遺伝的要因で決定されると思われがちであるが, 母親の養育によっても規定されていることが養育子実験により明らかにされた⁸⁾。養育がその後の行動に与える影響については, セロトニン系, BDNF, HPA 系などの遺伝子発現について, 幅広く調べられており⁷⁾, そのメカニズムとして, 母親の養育によって, DNA メチル化状態が変化する現象が関与すると考えられている。

一方, ある種のノックアウトマウスは生まれた子どもを養育しないことが報告されており, こうした動物を手がかりに母子行動の分子基盤を明らかにすることで, 虐待の脳内メカニズムを明らかにすることも, うつ病の予防という観点では重要と思われる。

■ むすび

うつ病は, 遺伝・養育・ストレス・性格・身体疾患・薬剤等の複合要因により発症する疾患であり, セロトニン系・HPA 系・BDNF などの関与が考えられている。その分子機序の解明には, 遺伝素因だけでなく, 多方面からの遺伝子研究, エピジェネティクス研究が必要である。

文 献

- 1) Malberg JE, Duman RS. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversed by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1562-71.
- 2) Zubenko GS, Hughes HB 3rd, Stiffler JS, et al. Sequence variations in CREB1 cosegregate with depressive disorders in women. *Mol Psychiatry* 2003; 8: 611-8.
- 3) 加藤忠史. うつ病の遺伝子研究の現状. *医学のあゆみ* 2001; 197: 453-6.
- 4) Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, et al. Related articles, links abstract influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003; 301: 386-9.
- 5) Munafo MR, Clark TG, Moore LR, et al. Related articles, links abstract genetic polymorphisms and personality in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2003; 8: 471-84.
- 6) Iwamoto K, Kato T. RNA editing of serotonin 2C receptor in human postmortem brains of major mental disorders. *Neurosci Lett* 2003; 346: 169-72.
- 7) Champagne FA, Francis DD, Mar A, et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav* 2003; 79: 359-71.
- 8) Francis DD, Szegda K, Campbell G, et al. No abstract epigenetic sources of behavioral differences in mice. *Nat Neurosci* 2003; 6: 445-6.

12 病 気

一卵性双生児不一致例による病因遺伝子同定

加藤 忠史

双生児研究の流れ

これまでの複雑疾患における双生児研究は、主として一卵性双生児と二卵性双生児を比較し、一卵性双生児で二卵性より疾患の一致率が高い場合に、遺伝因子の関与が証明される、という方法で行われてきた。

一方、こうした古典的な一ここでは第1世代の双生児研究と呼ぶことにする一双生児研究に対し、1980年代頃から行われるようになった第2世代の双生児研究では、不一致な一卵性双生児に着目し、不一致を起こす環境因や、不一致に伴う中間表現型が探索された。例えば、一卵性双生児で一人だけが統合失調症を発症した不一致例15ペアでMRIを調べた結果、患者側では健常双生児に比して海馬が小さかった、との報告がある¹⁾。海馬の体積には個人差があり、こうした画像研究では知能、教育年数など多数の攪乱因子を統制しなければならず、確実な結果を得ることは容易ではない。しかしながら、不一致双生児を調べることで確実な結果が得られ、この研究により、統合失調症における海馬体積減少という所見が確立した。また同様に、統合失調症の不一致例23ペアで周産期障害の程度を調べた結果、患者側で周産期障害が重症であることがわかり、この研究も統合失調症の危険因子としての周産期障害の確立および統合失調症の神経発達障害説の確立に大きく寄与した²⁾。PTSD(外傷後ストレス障害)患者でも、海馬体積が小さいことが知られており、これはストレスにより分泌されたコルチゾールが海馬に作用し、海馬萎縮を招いたと考えられていた。ところが、戦争によりPTSDを発症した17ペアの一

卵性双生児不一致例における研究では、戦争に参加していない双生児でも海馬が小さかった。このことから、海馬の体積減少はストレスによる萎縮ではなく、遺伝的に、あるいは発達の中で形成された危険因子であることが初めて明らかにされた³⁾。

このように、不一致例の解析が病因の特定において強力な方法論であることが明らかになるにつれて、遺伝子研究にもこうした方法が可能ではないか、との考え方も現れてきた。

岡崎らのグループは、世界で初めて「一卵性双生児不一致例における不一致の原因はゲノムの配列にあるのではないかと考え、一卵性双生児においてゲノム差異の検出を試み、restriction length genome scanning (RLGS)法により、一卵性双生児統合失調症不一致例間で、ゲノムの制限酵素切断パターンの差異を検出した⁴⁾。これが、第3世代の双生児研究の始まりといえよう。これが契機となって、類似のアプローチが海外でも行われている⁵⁾。

一卵性双生児間のゲノムの違い

しかしながら、一卵性双生児間で遺伝子配列に差異がある可能性がどの程度あるかは不明である。筆者の知る限りでは、一卵性双生児不一致例でゲノム塩基配列が異なっていたために遺伝性疾患が発症したというケースは、わずかに二つの報告があるのみである。

うち1ペアは、優性遺伝する皮膚疾患、Darier病の一卵性双生児不一致例である。この症例では、Darier病の原因遺伝子である小胞体Ca²⁺-ATPaseに、患者側のみでG23E変異が見られ

た⁶⁾。

もう1ペアは, Van der Woude 症候群である⁷⁾。この口蓋裂を来す症候群の原因は不明であったが, この論文では, Interferon regulatory factor 6 (IRF6) の変異に関する関連研究の結果, および一卵性双生児不一致例で罹患者のみにストップコドン変異が見られたことから, この遺伝子が原因遺伝子であると結論している。

一卵性双生児で卵割直後に変異が生じるという偶然が, それほど多く存在するとは考えにくい, 一卵性双生児不一致例においては, 卵割時に変異が生じたこと自体が双生児化(twinning)を引き起こした, という可能性も指摘されており⁸⁾, もしそれが本当なら, こうしたケースは単なる偶然というより半ば必然ということになる。

このような点変異以外にも, 一卵性双生児間におけるゲノムの差異が不一致を起こしたケースとして, 染色体異常のモザイク, X染色体の不均等な不活化, ミトコンドリア遺伝子(mtDNA)のヘテロプラスミー変異, インプリンティング遺伝子のDNAメチル化の異常などが報告されている。

前述のRLGS法により見出されたゲノムの差異も, メチル化感受性の制限酵素を用いていることから, 実はDNA塩基配列そのものではなく, DNAメチル化の差異である可能性が高いと考えられている。

一卵性双生児間のゲノム不一致から 原因遺伝子へ

このように, 一卵性双生児間で何らかのゲノムの不一致が存在し, これが疾患の原因になっているというケースは少なからず見受けられるが, これらは全て, 既知の原因遺伝子に双生児間で不一致を見出したというケースである。

そこで逆に, 原因遺伝子が不明な疾患において, 一卵性双生児間のゲノムの不一致を手がかりとして原因遺伝子を解明しようというのが, 前述の

Tsujitaら⁴⁾の研究だったわけである。残念ながら, 彼らの研究では, 原因となる遺伝子の同定は未だなされていないが, 研究の方向性としては間違っていないと思われる。

われわれは, 一卵性双生児双極性障害不一致例2ペアで, DNAマイクロアレイを用いて, 培養リンパ芽球における遺伝子発現差異を網羅的に検討し, 2ペア共通に, 罹患者側で小胞体ストレス経路に重要な役割をもつ二つの遺伝子, GRP78とXBP1が低下していることを見出し, この系が双極性障害において病態生理学的に重要な意味をもつことを明らかにした⁹⁾。しかしながら, ここまではまだ第2世代の双生児研究の範疇であり, その先の, 各ペアで不一致を起こしているゲノム要因は謎のままである。

一卵性双生児間でゲノムの違いを同定することで原因遺伝子を探る試みは, 複雑疾患において, まれな遺伝性の家系を探し, その原因遺伝子を同定するというアプローチに似ている。まれな家系の遺伝子解析が, アルツハイマー病やパーキンソン病の研究では大きなブレイクスルーとなったが, 精神疾患のように頻度が高く表現型定義が困難な複雑疾患では, 表現模写などのため単一家系での連鎖解析には限界がある。不一致双生児の解析がブレイクスルーにつながることに期待しつつ, 研究を進めているところである。

文 献

- 1) Suddath RL et al: *N Engl J Med* 322: 789-794, 1990
- 2) Torrey EF et al: *Schizophr Bull* 20: 423-432, 1994
- 3) Gilbertson MW et al: *Nat Neurosci* 5: 1242-1247, 2002
- 4) Tsujita T et al: *Am J Psychiatry* 155: 422-424, 1998
- 5) Nguyen GH et al: *Am J Med Genet* 120 B: 1-10, 2003
- 6) Sakuntabhai A et al: *Nat Genet* 21: 271-277, 1999
- 7) Kondo S et al: *Nat Genet* 32: 285-289, 2002
- 8) Machin GA: *Am J Med Genet* 61: 216-228, 1996
- 9) Kakiuchi C et al: *Nat Genet* 35: 171-175, 2003

精神疾患におけるDNAメチル化の意義*

加藤 忠 史**

Key Words : bipolar disorder, schizophrenia, DNA methylation, epigenetics, genomic imprinting

CpGアイランドのシトシンはメチル化されていない。

DNAメチル化とは何か

DNA(デオキシリボ核酸)がアデニン(A), グアニン(G), シトシン(C), チミン(T)の4つの塩基を含み, これら塩基三つの組み合わせが一つのアミノ酸に対応することで, DNAの塩基配列に蛋白質に関する情報が蓄えられていることは周知の通りである。

このうちシトシンは, CGという配列の部分では多くがメチル化され, 「メチル化シトシン」となっている。シトシンはメチル化されていなくても, コードするアミノ酸に変化はないし, DNA複製時にグアニンと対合することも変わりはないが, DNAと蛋白質との相互作用においては, シトシンとメチル化シトシンは異なった働きを持つ。

メチル化について言及する場合は, CGという「遺伝暗号」としての塩基配列ではなく, 物質としてのDNAを示すために, シトシンとグアニンの間に結合しているリン酸基を表記して「CpG」と呼ぶことが多い。塩基配列中にCGがたくさん並んでいる部分を「CpGアイランド」と呼ぶ。CpGアイランドは遺伝子の上流配列からエクソン1にしばしばみられる。その細胞でよく発現している遺伝子では, ゲノムの他の場所と異なり,

DNAメチル化の遺伝子 発現における意義

DNAメチル化はヒストンとの結合を介して染色体構造を変化させたり, 転写因子との結合を変化させる。

Maspinという遺伝子を発現している細胞は, 上流配列のプロモーター領域にあるCpGアイランドがメチル化されておらず, プロモーター領域にはアセチル化ヒストンが結合し, 転写制御因子が届く構造になっている。一方, この遺伝子を発現していない細胞ではプロモーター領域が完全にメチル化されており, 低アセチル化状態のヒストンが結合しているため転写制御因子が近づけない構造となり, 転写が抑制されている(Futscherら, 2002)⁸⁾。

また, プロラクチン遺伝子では, 上流配列の転写因子結合部位のメチル化が転写因子との結合を阻害し, 転写活性を低下させると考えられている(Ngoら, 1996)⁷⁾。

DNAメチル化の関与する 生物学的現象

DNAメチル化は, さまざまな遺伝子発現制御に利用されている。

1) 女性の2本あるX染色体の1本について遺伝子発現を阻害する(X染色体不活化)。

* Brain Science ⑱—Role of DNA methylation in mental disorders.

** Tadafumi KATO, M.D., Ph.D.: 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(〒351-0198 和光市広沢 2-1) ; Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, Saitama, JAPAN.

2) 父親由来と母親由来のアリルのどちらかだけを特異的にメチル化して発現を抑制し、片方のアリルだけを発現させている現象(ゲノムインプリンティング)。

3) 受精卵から発生までの間にDNAメチル化が行われ、細胞ごとの遺伝子発現パターンを決める。

4) 内因性レトロウイルスの不活化。

また、DNAメチル化が癌に関与していることがよく研究されている。癌細胞は、遺伝子の点変異、染色体異常などが偶然に起きて、これが細胞の成長を抑制する遺伝子であった場合、わずかに1個の、突然変異が生じた細胞が果てしなく増殖してしまうために起きるが、同様のことがメチル化の異常によって起きることが明らかにされており、癌抑制遺伝子のメチル化によるサイレンシングが癌をひき起こすことがわかっていく。

また、受精卵が卵割した後に、片方の細胞でメチル化の異常が起きたために、一卵性双生児にもかかわらず、一方だけが病気になる場合が知られている(Weksbergら, 2002)⁹⁾。

これらに加え最近、以下の現象が発見され、注目されている。

1) DNAメチル化が神経活動依存的に変化し、遺伝子発現を動的に調節している。

2) 発達の環境がDNAメチル化という形で記憶される場合がある。

DNAメチル化とBDNF遺伝子

最近Science誌に同時に掲載された2本の(Martinowich, 2003, Chen, 2003)論文により、BDNF(脳由来神経成長因子)遺伝子発現の動的な制御に、DNAメチル化が関与していることが明らかにされた。

BDNFは、神経成長、神経可塑性などに大きな役割をもつ栄養因子である。抗うつ薬がモノアミン取り込み阻害作用を介してうつ病に奏効するのは周知の事実である。モノアミンは細胞内でリン酸化を亢進させ、最終的に種々の遺伝子の発現を増やすが、BDNFが抗うつ薬の最終標的分子であると考えられている。また、pro-BDNFのアミノ酸配列を変化させる機能的多型は記憶

や海馬機能と関連し、双極性障害の危険因子となると考えられている。

BDNF遺伝子は二つのエクソンからなるが、一つ目のエクソンには4種類あり、それぞれの上流にプロモーターがある。神経活動依存的に増加するBDNFは、プロモーターIIIにより発現が誘導されるバリエーションである。

MartinowichらとChenらはそれぞれ独立に、このBDNFのプロモーターIIIのDNAメチル化が神経細胞の活動により変化することを明らかにした。BDNFのプロモーターIIIの特定の部位(これは両者の論文で微妙に異なる)は、通常はメチル化されており、ここにメチル化シトシン結合蛋白(MBD)の一種である、MeCP2が結合し、クロマチン構造を形成している。神経細胞に脱分極刺激を加えると、MeCP2が一時的にリン酸化され、プロモーターIIIから解離する。おそらくその結果、この部位のメチル化が減少し、MeCP2が脱リン酸化された後も結合できなくなり、その結果、プロモーターIIIにはリン酸化CREBが結合できるようになり、発現が誘導されるのである。

養育の記憶

最近、DNAメチル化がかかわるさらに興味深い現象が報告されている。

Meaneyらのグループは、長くラットの養育行動についての研究を行い、よく養育されたラットの子供はよく子供を養育するという、臨床的に知られている「虐待の連鎖」に対応する所見、すなわち「養育行動の非遺伝的な伝達」について報告し、高養育ラットと低養育ラットの仔の間でみられる養育行動やストレス脆弱性差異の分子基盤を探求してきた。

ストレス脆弱性の基盤は、グルココルチコイド受容体の発現量低下による、視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系のフィードバック障害であると考えられている。彼らは最近、グルココルチコイド受容体遺伝子上流配列のメチル化が親の養育により変化することを見出した。これらのラットの仔における、海馬のグルココルチコイド受容体(GR)遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化を調べたところ、脳特異的な機能

を持つ第7プロモーターにおいて、growth factor-inducible factor A(NGFI-A)という転写因子の結合部位のメチル化が、養育を十分受けていないラットでは高かった。十分な養育を受けるとセロトニンが放出され、セロトニン7受容体を介してNGFI-Aが誘導され、これを介してGR遺伝子の発現が増加し、その結果、HPA系が十分に抑制される。一方、養育不足だと、セロトニンが放出されず、NGFI-Aも誘導されないため、GR遺伝子のこの部位がDNAメチル化を受け、長期にGRの発現が低下した結果、HPA系の非抑制に至り、これがストレス耐性の分子基盤となると考えられた(Szyfら, 2003)⁹⁾。この研究は、「DNAメチル化が過去の環境との相互作用と記憶している」という仮説(Bird, 2002)の初めての具体例になると思われる。

幼児期に虐待を受けた経験のあるうつ病患者などで、GR遺伝子のメチル化がどうなっているのかが、今後重要な課題である。

ゲノムインプリンティング

ゲノムインプリンティングとは、2本ある染色体の対立遺伝子のうち、父方から、ないしは母方からきた遺伝子だけが、DNAメチル化を受けて発現しなくなる現象である。

双極性障害では、罹患母親が罹患父親よりも多いこと、母方親族では父方親族よりも感情障害の罹患率が高いこと、母親だけから遺伝する家系の方が、父方だけから遺伝する家系よりも多いこと、父方に罹患をもつ双極性障害患者は、母方に罹患を持つ患者よりも有意に発症年齢が低いことなどから、ゲノムインプリンティングが発症に関与していることが推定されてきた(Katoら, 1996)¹⁾。連鎖解析でも、18番染色体の連鎖が、父方からの遺伝に限りみられるとの所見が複数の研究で一致している。

インプリンティング遺伝子の異常で起きる疾患の一つに、Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)がある。BWSは、臓器の過成長、巨舌症、腫瘍への易罹患性、その他の先天異常を持つ疾患である。表現型がそれほど重症ではないため、臨床的に大きな問題にはならないが、その発症メカニズムは示唆に富むものである。BWSは、11p15

の染色体異常などによっても起こるが、この領域にある遺伝子のインプリンティング異常(epimutations)によって生じる場合が多い。

女性の一卵性双生児ではBWSの頻度が高く、不一致例が多くみられる。11p15のインプリンティング領域にあるKCNQはアンチセンスRNA遺伝子KCNQ10T1により制御されているが、KCNQ10T1もやはりインプリンティングを受ける。5ペアの一卵性双生児BWS不一致例における繊維芽細胞では、罹患側双生児側のみでKCNQ10T1のインプリンティング欠如という異常がみられた。

リンパ球でも、KCNQ10T1のインプリンティング異常がみられたが、リンパ球では、健常側にもインプリンティングの異常を持つ場合が多くみられた。これは、胎内における双生児間の血管吻合による血液の交換、メチル化異常を持つリンパ球の方が生存面でアドバンテージを持つこと、の2点が原因と思われた。

一卵性双生児BWS不一致例における不一致の原因としては、twinningにおいて、細胞内容の分離が不均等であったために、インプリンティングの維持が障害された可能性がある。あるいは、KCNQ10T1はとくにインプリンティングを失いやすく、着床前の発達における臨界期にDNAメチル化の維持が不十分となり、インプリンティングを失ったことによりtwinningが起き、不一致なBWSが起きるのではないかという。

BWS患者のうち、生殖補助医療(顕微受精、体外受精)を受けた者の割合は4%(6/149)と、一般人口(1.2%以下)より有意に多い(Maher, 2003)¹⁰⁾ことから、受精から着床までの細胞内環境がDNAのメチル化に影響すると推定され、生殖補助医療は出生児のDNAメチル化異常の危険因子になると考えられる。

日本で最初の体外受精(IVF: *in vitro* fertilization)は1982年に行われ、IVFにより生まれた赤ちゃんは、1996年までの累計で27,261名に上る。この数は世界的にみてもかなり多い。体外受精は、脳性麻痺などの危険因子であると報告されている。しかしながら、これは主として多胎妊娠の増加によるものと思われ、非IVF双生児の対照群を設定し、IVF児を6歳まで追跡したコホー

ト研究によると、双胎は種々の神経障害のリスクとなるが、IVF自体が脳性麻痺、自閉症などのリスクとなることについては否定的である(Pinborg, 2003)¹¹⁾。とはいえ、昨年、1978年に世界初の「試験管ベビー」(体外受精児)として生まれた英国のルーズ・ブラウンさんの25歳の誕生日パーティーについて報道されたばかりであり、生殖補助医療が精神疾患の危険因子になるかどうかは、今後検討すべき課題であろう。

一卵性双生児不一致例における メチル化異常の可能性

精神疾患の一卵性双生児不一致例において、DNAメチル化異常の可能性を初めて指摘したのは、Tsujiitaら(1998)²⁾である。彼らは、ゲノムDNAをDNAメチル化に感受性のある制限酵素で切断し、二次元電気泳動する方法(RLGS: restriction landmark genome scanning)を用いて、一卵性双生児統合失調症不一致例におけるゲノム差異を探索した。その結果、不一致例2名の間で、異なるスポットを見出した。これは、双生児間で、DNAメチル化に違いがあるためと考えられた。

Deb-Rinkerら(2002)³⁾は、一卵性双生児の白血球を用いて、RDA法(representational difference analysis)を用いて、双生児間で発現量に差のある遺伝子を調べ、新規レトロウイルスを発見し、schizophrenia-related retrovirus-1 (SZRV-1)、SZRV-2と命名した。統合失調症患者の中に、SZRV-2のメチル化に異常のみられた者がいたという。

Petronisら(2003)⁶⁾は、一卵性双生児統合失調症不一致例1ペア、一致例1ペアで、リンパ球より抽出したDNAを用い、D2受容体遺伝子上流配列のDNAメチル化を調べた。一卵性双生児間のDNAメチル化CpGのパターンの差異を「epigenetic distance」として計算したところ、不一致例では一致例よりもepigenetic distanceが遠かったという。しかしながら、リンパ球では発現していないDRD2のDNAメチル化の細かな違いを調べることにどのような意義があるかは、今のところ不明である。

われわれは、一卵性双生児双極性障害不一致

例2ペアで、培養リンパ芽球の遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより検討し、不一致例の罹患者では共通にXBP1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、この系が双極性障害において病態生理学的意味をもつと報告した(Kakiuchiら, 2003)⁴⁾。しかしながら、XBP1遺伝子上流配列のCpGアイランドは、両双生児ともにメチル化されておらず、XBP1遺伝子のDNAメチル化は不一致の原因ではないことがわかった。

おわりに

DNAメチル化が精神疾患に関与していることに矛盾しない事実は、いろいろ存在する。たとえば、ヒストン脱アセチル化阻害作用を介してDNAメチル化を減少させる作用を持つバルプロ酸が躁状態に有効である一方、DNAメチル化反応においてメチル基供与体となるS-アデノシルメチオニンが双極性うつ病に有効であることなどである。

しかしながら、DNAメチル化が精神疾患の病態に関与しているとの直接的証拠は、今のところ乏しい。今後の重要な研究課題であろう。

文 献

- 1) Kato T, Winokur G, Coryell W, et al. Parent-of-origin effect in the transmission of bipolar disorder. *Am J Med Genet* 1996; 67: 546-50.
- 2) Tsujiita T, Niikawa N, Yamashita H, et al. Genomic discordance between monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1998; 155: 422-4.
- 3) Deb-Rinker P, O'Reilly RL, Torrey EF, et al. Molecular characterization of a 2.7-kb, 12q13-specific, retroviral-related sequence isolated by RDA from monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia. *Genome* 2002; 45: 381-90.
- 4) Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M, et al. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet* 2003; 35: 171-5.
- 5) Szyf M, Weaver IC, Cervoni N, et al. Trans-generational epigenetic imprinting by maternal behavior through DNA methylation and its rever-

- sal by histone deacetylase inhibitors. *Am J Med Genet* 122B : 13.
- 6) Petronis A, Gottesman II, Kan P, et al. Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences : clues to twin discordance? *Schizophr Bull* 2003 ; 29 : 169-78.
- 7) Ngo V, Gourdj D, Laverriere JN. Site-specific methylation of the rat prolactin and growth hormone promoters correlates with gene expression. *Mol Cell Biol* 1996 ; 16 : 3245-54.
- 8) Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 2002 ; 31 : 175-9.
- 9) Weksberg R, Shuman C, Caluseriu O, et al. Discordant KCNQ10T1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 2002 ; 11 : 1317-25.
- 10) Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 2003 ; 40 : 62-4.
- 11) Pinborg A, Loft A, Schmidt L, et al. Morbidity in a Danish national cohort of 472 IVF/ICSI twins, 1132 non-IVF/ICSI twins and 634 IVF/ICSI singletons : health-related and social implications for the children and their families. *Hum Reprod* 2003 ; 18 : 1234-43.

* * *

小胞体ストレス反応の異常と躁うつ病

加藤忠史・垣内千尋

◎はじめに

躁うつ病(双極性障害)は、躁状態、うつ状態という2つの病相を繰り返す、気分安定薬(リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン)による生涯にわたる予防療法が必要となる疾患である。双生児研究、家族研究から、遺伝要因が関与することが明らかにされ、複数の主要な関連遺伝子が存在すると考えられたが、連鎖解析では多数の連鎖部位が指摘されているものの、連鎖部位は絞り込まれていない¹⁾。

うつ状態、躁状態に奏効する抗うつ薬と抗精神病薬がいずれもモノアミン神経伝達に影響することから、モノアミン関連遺伝子がくまなく調べられているが、双極性障害との関連が確認された遺伝子はない。

こうしたなか、リチウムがイノシトールリン脂質系に作用することから、双極性障害において細胞内情報伝達系の異常が存在する可能性が考えられるようになり、培養リンパ芽球様細胞の研究でも種々の細胞内情報伝達系の異常が報告され、これは遺伝子と精神疾患という表現型をつなぐ、「中間表現型」と考えられている。しかしながら、細胞内情報伝達系関連遺伝子は多岐にわたり、遺伝的危険因子の同定には至っていなかった。

1 今回の研究

このような状況のなか、筆者らは方法論的なブレークスルーが必要であると考え、まったく別の手法で疾患関連遺伝子を同定しようと考えた。従来、一卵性双生児は、遺伝子が100%同じと考えられ、環境と遺伝の影響を比較する研究の対象となってきたが、近年では、一卵性双生児間でDNA塩基配列に違いがみられる例や、DNAメチル化に違いがある可能性が報告されるなど、遺伝子研究の対象としても魅力的であるとの機運が高まってきた。そこで筆者らは、一卵性双生児で、1人だけが躁うつ病を発症した不一致例2組を対象として、DNAマイクロアレイにより、遺伝子発現量に差のある遺伝子を網羅的に探索した²⁾。その結果、両双生児で共通の発現変化がみられた17遺伝子に、2つのERストレス反応関連遺伝子、*XBPI*および*HSPA5*(GRP78またはBiP)が含まれることに着目した。*XBPI*が躁うつ病の連鎖研究のホットスポットである22q12に存在し、*HSPA5*は*XBPI*の下流の遺伝子であること(第Ⅲ部 永田の稿参照)、*HSPA5*の発現量を気分安定薬の一つである

バルプロ酸が上昇させることが報告されていたことから、*XBPI*が躁うつ病に関係していると考えた。

一卵性双生児の間では、*XBPI*の遺伝子配列、ゲノムのコピー数、DNAメチル化に差はみられなかった。そこで、一般の躁うつ病患者のリンパ芽球様細胞にタブシガルゲンでERストレスを惹起し、反応を調べたところ、患者の細胞では*XBPI*、*HSPA5*の反応が低下していた。そこで、多数の日本人患者、健常者で上流配列をシーケンスしたところ、*XBPI*遺伝子の5'上流に、ERSE(小胞体ストレス反応エレメント)とは別に*XBPI*結合配列が存在し、この結合配列のACGTコアを失わせる-116C/G多型が存在することを見いだした。この多型は、日本人の症例対照研究(オッズ比4.6)、米国人の罹患者と両親の伝達不平衡テストの両者で有意な関連がみられたことから、この多型が躁うつ病のリスクを高めると結論した。なお、-116Gは日本人では多数派だが米国人では少数派であるため、日本人ではC/C型が防御因子、米国人ではGアリルが危険因子となっているようである。

リンパ芽球様細胞およびリンパ球において、G/G型ではタブシガルゲンによるERストレスに対する*XBPI*反応が低いことから、この多型が機能変化を生じることが確認された。-116Gまたは-116CおよびERSEを含むコンストラクトを作製し、転写活性を調べたところ、通常では両者に差はないが、活性型*XBPI*を共発現させたときのみ、C型のほうが活性が高いことがわかり、この「*XBPI*結合配列」に実際に活性型*XBPI*が結合し、この結合能が-116G多型により失われることがわかった。

G/G型の細胞におけるERストレス反応の低下は、バルプロ酸7日間処理により回復したが、これは、ERストレス系において*XBPI*の上流に位置する、ATF6(第Ⅲ部 森和俊の稿参照)のmRNAを増加させるためであることが判明した²⁾。

これらの結果は、*XBPI*多型が気分安定薬の反応予測の検査として利用可能かもしれないことを示している。また、ATF6は新たな創薬の標的分子となりうる。それに加え、脳における*XBPI*ループの機能を明らかにすることは、気分の分子メカニズムの解明につながるかもしれない。

2 今後の方向性

今回、一卵性双生児不一致例2組で、共通に発現量差異のみられた遺伝子がすべてERストレス経路にかかわる遺伝子というわけではなく、cAMP系やミトコンドリアなど、躁うつ病との関連が指摘されてきた他の経路にかかわる遺伝子も含まれており、他の経路が躁うつ病に関係している可能性が否定されたわけではない。本増刊号で取り上げられている他の疾患は、ほとんどが「フォールディング異常をきたした蛋白質が、何らかのメカニズムで機能障害をひき起こす」疾患であろう。しかしながら、躁うつ病では神経変性の証拠はなく、躁状態、うつ状態という可逆性の症状を呈する疾患であることから、異常蛋白質の蓄積によって神経変性が生じる他のERストレス関連疾患とは、そのメカニズムが異なると考えられる。

では、なぜXBPIループが躁うつ病と関係しているのだろうか。これはまさに今後の研究課題であり、現時点では何の情報もない。これまで筆者らが検討してきた可能性の一つは、神経伝達に必要な蛋白質、たとえばセロトニントランスポーターの成熟に影響するという可能性である。もう一つは、ERシャペロンの別の作用である。HSPA5は、Ca²⁺結合作用をもち、小胞体のCa²⁺シグナリングに影響することから、XBPIループの障害によりIP₃を介したCa²⁺シグナリングが異常をきたす可能性も考えられる。

もう一つは、XBPIに神経系特有の機能が存在する可能性である。XBPIはもともと一般的な転写因子であり、リンパ球の分化、肝臓の形成など、多くの作用をもっており、決してERストレス専門の転写因子というわけではない。また、ERストレスについては、主として細胞レベルでの研究が進んできたため、*in vivo*、とくに脳での生理的意義についてはまだ十分にわかっているとはいえない。糖尿病

でERストレスが問題になるのは、膵臓で分泌蛋白質を大量に合成するためであるが、神経でも神経内分泌細胞など、分泌蛋白質・ペプチドの合成を行う細胞では、ERストレス反応の効率が、機能的に大きな意義をもつかもしいない。あるいは、神経可塑的变化に伴う蛋白質合成の亢進時、この経路が重要になる可能性もある。神経細胞では、細胞核から遠く離れた樹状突起、軸索でもmRNAからの蛋白質合成が行われており、そのため軸索伸長に伴ってmRNAが必要となると思われるが、ひょっとするとXBPIは、軸索の伸長やシナプス形成のための蛋白質合成、小胞体でのフォールディングが盛んになったとき、これを感知して、こうした神経可塑的变化に必要なmRNA合成を促進するはたらきをもつのかもしいない。

2002年に、3種の気分安定薬のいずれもが、神経細胞の成長円錐を増大させる作用をもつことが*Nature*誌に報告され注目されたが³⁾、その病態生理学的意義はまったく明らかにされていない。今回のXBPIループの所見と、こうした神経細胞に対する気分安定薬の共通作用の間の、失われた環が結ばれる日が来るかも知れない。

●文献

- 1) 加藤忠史・加藤進昌：蛋白質 核酸 酵素, 44, 1975-1981 (1999)
- 2) Kakiuchi, C., Iwamoto, K., Ishiwata, M., Bundo, M., Kasahara, T., Kusumi, I., Tsujita, T., Okazaki, Y., Nanko, S., Kato, T. *et al*: *Nature Genet.* 35, 171-175 (2003)
- 3) Williams, R. S., Cheng, L., Mudge, A. W., Harwood, A. J.: *Nature*, 417, 292-295 (2002)

Tadafumi Kato, Chihiro Kakiuchi, 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 E-mail: kato@brain.riken.go.jp

ER stress response and bipolar disorder

特集 双極性障害の病態・診断・治療

双極性障害の分子遺伝学的メカニズム*

● 垣内千尋** / 加藤忠史**

Key Words: bipolar disorder, genetics, ER stress response

はじめに

双極性障害の一般集団における発症率は、正確な数値は不明であるが、日本ではおよそ0.5%前後と考えられている。双極性障害において遺伝的負因が存在することは古くから報告されており、遺伝学的なアプローチは病態を解明するための一つ的手段として有効な手段の一つであろう。

臨床遺伝学的に遺伝負因の有無を調べる方法としては、主に家系研究、双生児研究、養子研究、の三つがあげられる。双極性障害においては家族内集積が高い。家族に患者がいる場合に第一度親族の発症率は10%弱となり、一般集団における発症危険率に比べて著しく高くなる。したがって、家系研究からは遺伝学的に相似であると発症しやすくなることが推定される。しかし、家系研究のみでは“家族”という環境要因を否定しきれない。そこで、双生児研究、養子研究が用いられる。双生児研究は一卵性双生児および二卵性双生児において疾患の一致率を調べるもので、環境因、遺伝負因をもっとも強力に区別しようと考えられる。一卵性双生児、二卵性双生児はいずれもほぼ同じ環境下で育ち、違

いは一卵性双生児の遺伝的構成が100%同じであるのに対し、二卵性双生児では50%しか共有しないという点である。したがって、もし一卵性双生児で疾患一致率が高く、二卵性双生児で低ければ遺伝要因が大きく寄与することが想定される。双極性障害の一卵性双生児の一致率は40~60%程度と高いのに対し、二卵性双生児では5~10%と低い。このことは、双極性障害において環境因よりも遺伝要因が大きいことを意味する。養子研究は、発症した養子に対して、養父母と実父母の発症率を比較する方法で、少数ではあるが双極性障害において環境因よりも遺伝負因を示唆する報告がある。いずれの研究からも双極性障害において遺伝的な要因が大きいことが示されている¹⁾²⁾。

遺伝要因が存在することが判明すると、次にその遺伝形式が問題となる。双極性障害においては、一つの遺伝子異常が原因となって疾患の原因となり遺伝するというメンデル式遺伝では説明できない。一卵性双生児においても100%一致するわけではなく、二卵性双生児における一致率は一卵性双生児に比して大幅に低い。これらの事実は、ゲノム上に存在する複数の遺伝的リスクが重なって発症に至る多因子病であることを示唆する。双極性障害の病態を解明するためにはこのゲノム上に存在する遺伝学的危険因子を同定していく必要がある。

* Molecular mechanism of bipolar disorder.

** Chihiro KAKIUCHI, M.D. & Tadafumi KATO, M.D.: 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〔☎351-0198 和光市広沢2-1〕; Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, Saitama, JAPAN.

遺伝的リスクファクターを同定する手法としては大きく分けて二つの方法がある。一つは連鎖解析と呼ばれる方法で、患者の多発する家系を用いて、ゲノム上のマーカーを用いて染色体のどのあたりに疾患と関係する遺伝子が含まれているかを調べる方法である。これまで多数のゲノムスキャンが終了し、2002年から2003年まででも10本を越える報告があるが、1q, 4p16, 10q21-26, 11p15, 12q23-24, 13q11-32, 18p11, 18q21, 21q21, 22q11-12, Xq26…と非常に多数の連鎖部位が指摘されており再現性に乏しい。現在のところ染色体上の位置はまだ絞り込まれていない³⁾。

もう一つは仮説に基づいたアプローチである。双極性障害における薬理的あるいは生理学的な所見を細胞生物学的に説明しうる遺伝子、あるいは双極性障害を高頻度で合併する他の疾患の原因遺伝子などを疾患関連候補遺伝子として想定し、その遺伝子と疾患の相関を検定するものである。検定の方法は、主に患者一対照研究(case-control study)と伝達不平衡テスト(Transmission Disequilibrium Test: TDT test)などが用いられている。前者は、ある遺伝子が候補として想定された場合、その遺伝子配列における多型を患者群および対照健常者群でジェノタイプし、その頻度が両者で異なれば疾患との相関が判明する、といったものである。後者はトリオサンプル(患者およびその両親)を用いて検討する方法で、ある遺伝子の多型が患者に伝達される際に、もし疾患と相関していなければどちらも均等に伝達されるが、疾患との相関があるものならば偏って多く伝達され疾患との相関が判明する、というものである。

抗うつ薬と抗精神病薬がいずれもモノアミン神経伝達に影響することなどから、多くのモノアミン関連遺伝子群が調べられてきた。中でもモノアミン酸化酵素A(MAO-A)、セロトニントランスポーター(5-HTT)、セロトニン2C受容体(HTR2C)、脳由来神経栄養因子(BDNF)などは有力な候補遺伝子である。しかし、同じ遺伝子であっても研究によって、関連があつたりなかったりと一致せず、疾患との関連が確認された遺伝子は現在のところほとんどない³⁾。また、リチ

ウムがイノシトールリン脂質系に作用することから、細胞内情報伝達系の異常が関与する可能性が考えられ、躁うつ病患者由来の培養リンパ芽球様細胞の研究では種々の細胞内情報伝達系の異常が報告されている^{4)~6)}。これらの事実はなんらかの遺伝的な違いを反映していると考えられ、疾患関連遺伝子を同定するための突破口となる可能性を秘めていると思われるが、細胞内情報伝達系関連遺伝子は多岐にわたりその同定には至っていない。現在さまざまな研究者がそれぞれの仮説をもとに遺伝学的危険因子の同定を試みている状況にある。

小胞体ストレス反応と双極性障害

多数ある仮説の一つであり、まだ双極性障害の遺伝的危険因子として確認されたわけではないが、最近われわれが見出した所見について少し紹介させていただきたい⁷⁾。今回われわれは、前述した従来の手法と異なる、DNAマイクロアレイを用いたmRNAの発現量の網羅的探索からのアプローチによる疾患関連遺伝子の同定を試みた。手法を考案する際に留意したのは、①個人間差異を可能な限り少なくする、②向精神薬によるmRNA発現量に対する影響を除外する、の2点である。これらを解消するために、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を用いるという方法をとった。一卵性双生児であれば、個人間差異を限りなく少なくし、細胞を培養することにより薬物の影響を除外できると想定される。一卵性双生児不一致例において、DNA配列が100%同じものを比べて意味があるのか、双極性障害は脳の疾患でありリンパ球系組織を調べて意味があるのかといった問題があげられたが、前者については近年、一卵性双生児DNA塩基配列に違いがみられる例や⁸⁾、DNAメチル化に違いがある可能性が報告されている⁹⁾。また後者については、前述したように双極性障害のリンパ芽球様細胞において健常者と異なる所見が報告されており、対象として検討するに値すると思われる。

一卵性双生児躁うつ病不一致例2組および対照として健常双生児1組のリンパ芽球様細胞において、DNAマイクロアレイを用い、12000遺伝

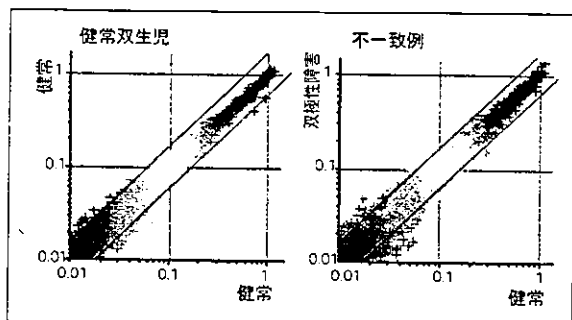


図1 一卵生双生児双極性障害不一致例のDNAマイクロアレイ解析(例)

遺伝子発現量をGAPDHをコントロールとして補正し双生児間で比較した。一つのポイントが一つの遺伝子を示す。緑線：1.6倍。不一致例(左)では、健常双生児どうしを比較した場合よりもばらつきがみられ、発現量の低下している遺伝子が多くみられた。

子についての発現量を網羅的に探索した。それぞれの双生児において遺伝子発現量を比較したところ、不一致例では発現量に差のある遺伝子が多くみられた(図1)。健常双生児では差がなく、かつ両双生児不一致例で共通の発現変化がみられた遺伝子の中には、小胞体ストレス反応関連遺伝子、すなわちXBP1およびHSPA5(GRP78またはBiP)が含まれていた。

小胞体ストレス反応とは、折りたたみのうまくいかなかった蛋白質(unfolded protein)の蓄積に対する処理反応と考えられている。Unfolded proteinが小胞体に蓄積すると折りたたみ(folding)を行うために、HSPA5などの小胞体シャペロンと呼ばれるfoldingをすすめる蛋白質が消費される。この小胞体シャペロンの減少を感知して、小胞体膜上にあるATF6の切断が起き、これがER stress response element(ERSE)と呼ばれるDNA配列をもつ小胞体シャペロン遺伝子の転写を促す。ERSEはXBP1にも存在し、XBP1の転写も促されるが、この転写されたXBP1は小胞体膜上にあるシャペロンの減少を感知したIRE1によりスプライシングを受ける。このspliced formがコードする活性型XBP1は、ERSEをもつ小胞体シャペロンの転写を促進するとともに自分自身の転写を促し、さらにこの反応を進めるとされている。XBP1はポジティブフィードバック機構(以下、XBP1ループと呼ぶ)により結果として効率的に小胞体ストレス反応を進めているようである。この反応は*in vitro*ではタプシガルギンヤツ

ニカマイシンといった薬剤で惹起できることが知られている^{10)~12)}。

小胞体ストレス応答のカスケードおよび関連遺伝子と双極性障害の関連についてさらに検討をすすめたところ、双極性障害患者のリンパ芽球様細胞においてタプシガルギンによる小胞体ストレス反応が低下していること、XBP1ループの機能低下を生じさせるXBP1遺伝子の上流配列の多型(-116C/G)が日本人サンプルのケースコントロールスタディーおよび米国人サンプルのTDT testにより双極性障害の遺伝的リスクを高めることが判明した。さらにバルプロ酸が小胞体ストレス反応の最初のセンサーであるATF6の発現量を上昇させ、このことによって小胞体ストレス反応を亢進させていることが判明した。バルプロ酸の双極性障害に対する作用機序は、小胞体ストレスに対する潜在能力を上げることである可能性がある(図2)。

小胞体ストレス応答およびXBP1ループの機能低下は双極性障害ひいては感情の制御機構にどのような関与をしているのであろうか。一つの可能性は小胞体シャペロンである。うつ病による自殺者の脳においてHSPA5の発現量が変化しており¹³⁾、セロトニントランスポーターが機能的に働くためには小胞体シャペロンが必須であるという報告がなされている¹⁴⁾。またHSPA5は、小胞体のCa²⁺シグナリングに影響することから、小胞体ストレス応答の異常がCa²⁺シグナリングの異常を生じさせ、Ca²⁺シグナリングとかわる神経細胞の活動に影響を及ぼし感情制御の不安定化をひき起こすのかもしれない。XBP1に神経系特有の標的遺伝子がある可能性なども考えられる。XBP1は小胞体ストレス反応のみならず、多彩な働きをする転写因子であり、感情の制御にかかわるような遺伝子がある下流にある可能性もある。脳内における小胞体ストレス応答の役割を解明することが双極性障害の分子メカニズムを解明する手がかりとなるかもしれない。

おわりに

双極性障害の分子遺伝学的メカニズムについては未だ確定したものはなく研究はその途上にある。多因子病であるため、個人個人で疾患を

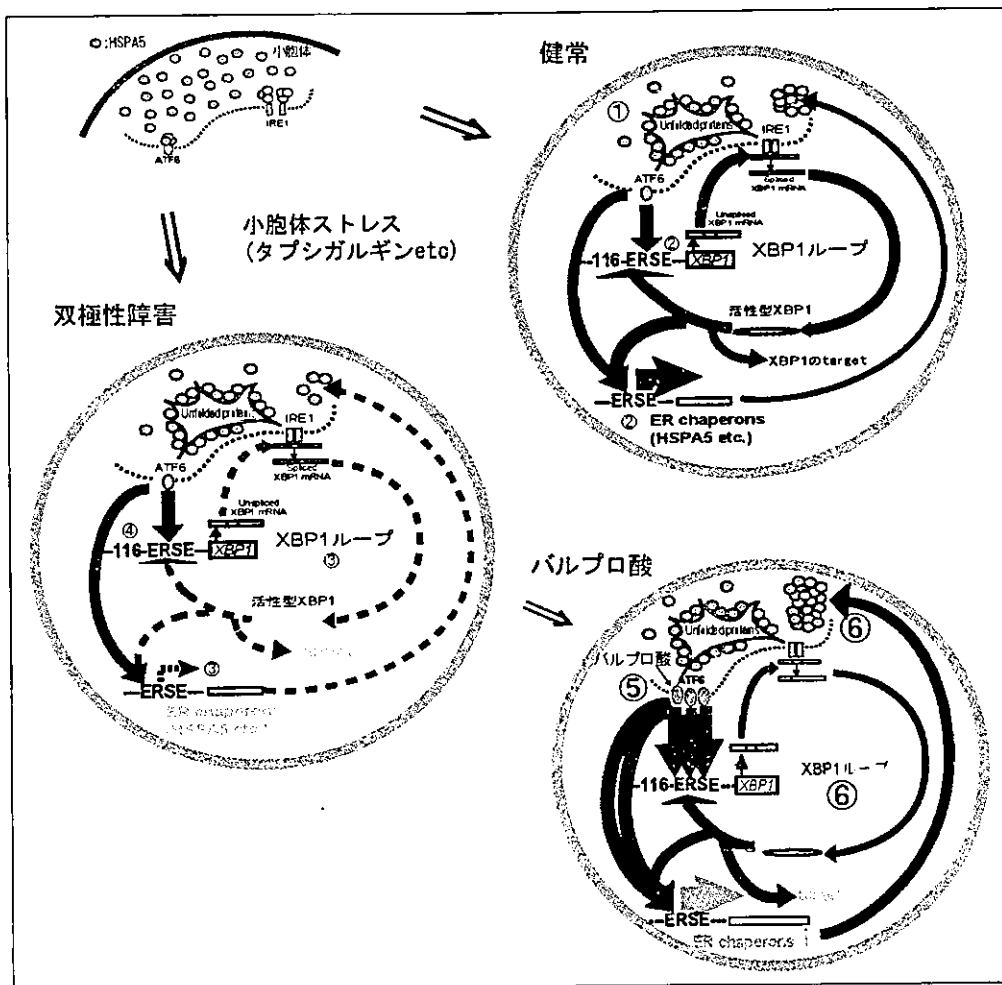


図2 小胞体ストレス反応と双極性障害

タブシガルギンなどの小胞体ストレスラーによって小胞体内におりたたみのうまくいかなかった蛋白質がふえると、シャペロンであるHSPA5がおりたたみをすすめるために消費される①。その結果、減少したHSPA5を補うために一連の反応が開始する。ATF6からHSPA5が離れることにより、ATF6が切断され核へ移行、ERSEをもつ遺伝子群の転写を促す②。この際、XBP1ループにより効率的な転写が行われている。双極性障害患者由来のリンパ芽球では、XBP1ループおよびHSPA5のmRNAの上昇③が低下しており、その一部を説明するものとしてXBP1の上流多型(-116C/G)がある④。バルプロ酸はATF6の量を増やす⑤ことによって、小胞体ストレスが生じた際のATF6の反応を増強し、XBP1およびHSPA5のmRNAの上昇を良くする⑥。

構成している原因遺伝子群の組み合わせはさまざまなバリエーションがあるのであろう。それぞれの遺伝的因子を確定していくことには多くの困難が予想されるが、それぞれ一つ一つを明らかにしていくことにより、その組み合わせで生じる細胞内での現象をゲノムと疾患をつなぐ中間表現型として理解できるはずである。この過程を通して双極性障害の病態が明らかになり、分子的基盤から治療法への発展へとつながると期待される。

文 献

- 1) Smoller JW, Finn CT. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *Am J Med Genet* 2003; 123C : 48.
- 2) 岡崎祐士, 米田 博. 臨床精神医学講座—精神疾患と遺伝—. 東京: 中山書店; 2000. p. 3-12.
- 3) Kato T. Molecular genetics of bipolar disorder. *Neurosci Res* 2001; 40 : 105.
- 4) Wright AF, Crichton DN, Loudon JB, et al. Beta-adrenoceptor binding defects in cell lines from fami-

- lies with manic-depressive disorder. *Ann Hum Genet* 1984 ; 48 : 201.
- 5) Banks RE, Aiton JF, Cramb G, et al. Incorporation of inositol into the phosphoinositides of lymphoblastoid cell lines established from bipolar manic-depressive patients. *J Affect Disord* 1990 ; 19 : 1.
 - 6) Kato T, Ishiwata M, Mori K, et al. Mechanisms of altered Ca²⁺ signalling in transformed lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2003 ; 6 : 379.
 - 7) Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M, et al. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet* 2003 ; 35 : 171.
 - 8) Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 2002 ; 32 : 285.
 - 9) Petronis A. Human morbid genetics revisited : relevance of epigenetics. *Trends Genet* 2001 ; 17 : 142.
 - 10) Shen J, Chen X, Hendershot L, et al. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 2002 ; 3 : 99.
 - 11) Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 ; 3 : 411.
 - 12) Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001 ; 107 : 881.
 - 13) Bown C, Wang JF, MacQueen G, et al. Increased temporal cortex ER stress proteins in depressed subjects who died by suicide. *Neuropsychopharmacology* 2000 ; 22 : 327.
 - 14) Tate CG, Whiteley E, Betenbaugh MJ. Molecular chaperones stimulate the functional expression of the cocaine-sensitive serotonin transporter. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 17551.

* * *

躁うつ病と小胞体ストレス反応関連遺伝子 *XBP1*

垣内 千尋・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

躁うつ病は統合失調症と並ぶ2大精神疾患の1つで、遺伝的要因が発症に関与していると考えられてきたが、その病態は不明のままであった。今回われわれは、一卵性双生児躁うつ病不一致例リンパ芽球様細胞のDNAマイクロアレイによる遺伝子発現量解析から研究を開始し、小胞体 (ER) ストレス反応の違いが躁うつ病に関連していることを見出した。ERストレス関連遺伝子 *XBP1* のポジティブフィードバック機構の低下が躁うつ病の危険因子となり、この機能低下は気分安定薬バルプロ酸で回復される。

Key words

躁うつ病、一卵性双生児不一致例、DNAマイクロアレイ、リンパ芽球、小胞体ストレス反応、関連研究、*XBP1*、ATF6、気分安定薬、バルプロ酸

はじめに

躁うつ病 (双極性障害) は、躁状態、うつ状態という2つの病相を繰り返す精神疾患で、人口の約1%弱が罹患しているとされる。近年よく話題にのぼる「うつ病」とは異なり、環境要因よりも遺伝要因の関与が、双生児研究、家族あるいは養子研究などから示唆されてきた。治療としては、うつ病がある程度の期間の抗うつ薬治療で回復するのに対し、躁うつ病は躁状態あるいはうつ状態の症状に対する治療に加え、気分安定薬と呼ばれる治療薬 (リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン) による生涯にわたる予防療法が必要となる。気分安定薬の第一選択

はリチウムであるが、残念なことに3割程度の患者にしか奏効しないとされており難治例も多い。より効果のある気分安定薬の開発が望まれるが、そもそも躁うつ病の病態は不明で、薬物のターゲットもはっきりしなかったため困難であった。

遺伝要因、おそらくは複数の主要な遺伝子の関与が示唆されることから、疾患に関わる遺伝子を同定するべく、連鎖解析、あるいは様々な仮説に基づいた探索など様々な努力がなされてきた。しかし、連鎖解析では多数の連鎖部位が指摘されているものの、連鎖部位は絞り込まれていない。また、仮説に基づいたアプローチとしては、うつ状態、躁状態に奏効する抗うつ薬と抗精神病薬がいずれもモノアミ

Chihiro Kakiuchi・Tadafumi Kato

Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders, Brain Science Institute, RIKEN

Bipolar disorder and *XBP1*, a pivotal gene in ER stress response

E-mail : kato@brain.riken.jp

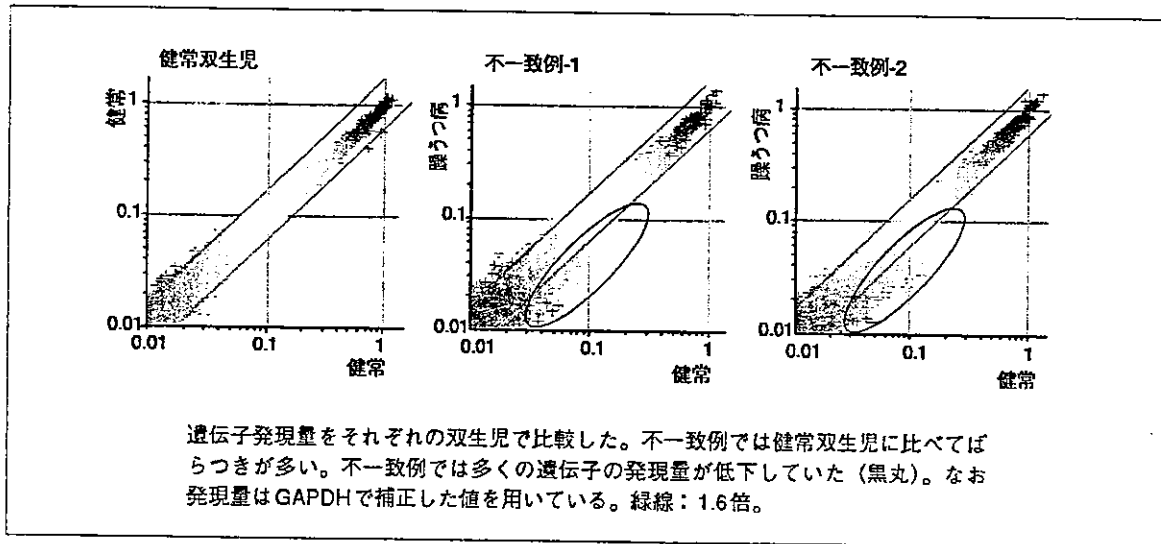


図1 一卵性双生児不一致例のDNAマイクロアレイ解析

ン神経伝達に影響することから、モノアミン関連遺伝子がくまなく調べられているが、双極性障害との関連が確認された遺伝子はほとんどない。最近では、気分安定薬の1つであるリチウムがイノシトールリン脂質系に作用することから、躁うつ病において細胞内情報伝達系の異常が関与する可能性が考えられるようになった。特に躁うつ病患者由来の培養リンバ芽球様細胞の研究では種々の細胞内情報伝達系の異常が報告され、何らかの遺伝的な違いを反映していると考えられる。この所見は疾患関連遺伝子を同定するための突破口となる可能性を秘めていると考えられるが、細胞内情報伝達系関連遺伝子は多岐にわたり、遺伝的危険因子の同定にはいたっていなかった¹⁾。

1. 一卵性双生児躁うつ病不一致例のDNAマイクロアレイ解析

今回われわれは従来と別の手法、すなわち遺伝子発現の違いに基づいて疾患関連遺伝子の同定を試みた²⁾。留意したのは、①躁うつ病のような複雑疾患においては個人間の差異によって疾患による影響がみえにくくなっている可能性がある、②躁うつ病患者は前述のように生涯にわたる気分安定薬による予防が必要なため通常服薬しており、患者サンプルにおける遺伝子発現には薬物が影響しているかもしれ

ない2点である。これらを解消するために、一人だけが躁うつ病を発症した一卵性双生児の培養リンバ芽球様細胞を用いるという方法をとった。従来、一卵性双生児は、遺伝子が100%同じと考えられ、環境と遺伝の影響を比較する研究の対象となってきたが、近年では、一卵性双生児間でDNA塩基配列に違いがみられる例や、DNAメチル化に違いがある可能性が報告されるなど、遺伝子研究の対象となりつつある。また、躁うつ病はもちろん脳の疾患であろうが、幸いリンバ芽球様細胞においても健常者と異なる所見が報告されている。

われわれはまず、一卵性双生児躁うつ病不一致例2組および対照として健常双生児1組のリンバ芽球様細胞において、DNAマイクロアレイを用い、遺伝子発現量を網羅的に探索した。それぞれの双生児において遺伝子発現量を比較したところ、不一致例では発現量に差のある遺伝子が多くみられた(図1)。健常双生児では差がなく、かつ両双生児不一致例で共通の発現変化がみられた遺伝子は17個あったが、このなかに2つの小胞体(ER)ストレス反応関連遺伝子、すなわちXBP1およびHSPA5(GRP78またはBIP)が含まれていた。XBP1が躁うつ病の連鎖研究のホットスポットである22q12に存在し、HSPA5はXBP1の下流の遺伝子であること、HSPA5の発現量を気分安定薬の1つであるバルプロ

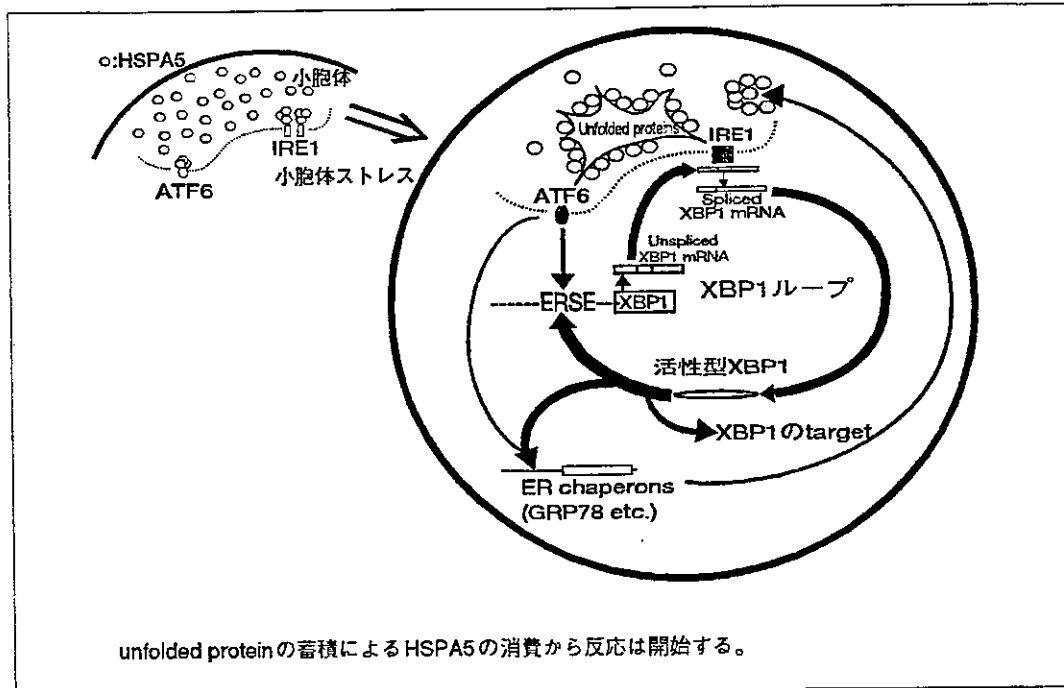


図2 小胞体ストレス反応

酸が上昇させることが報告されていたことから、XBP1を含むERストレス反応のカスケードが躁うつ病の病因と関わっている可能性が考えられた。

II. ERストレス関連遺伝子 XBP1多型と躁うつ病の関連

ERストレス反応とは、折りたたみのうまくいかなかったタンパク質 (unfolded protein) の蓄積に対する処理反応と考えられている。unfolded proteinが小胞体に蓄積すると折りたたみ (folding) を行うために、HSPA5などのシャペロンと呼ばれる folding をすすめるタンパク質が消費される。このシャペロンの減少を感知して、小胞体膜上にある ATF6の切断が起き、これがER stress response element (ERSE) を有するシャペロン遺伝子の転写を促す。ERSEはXBP1にも存在し、XBP1の転写も促されるが、この転写されたXBP1は小胞体膜上にあるシャペロンの減少を感知したIRE1により splicingを受ける。このspliced formがコードする活性型XBP1はERSEをもつシャペロンの転写を促進するとともに自分自身の転写を促し、さらにこの

反応を進めるとされている。XBP1はポジティブフィードバック機構 (以下XBP1ループと呼ぶ) により結果として効率的にERストレス反応を進めているようである。この反応は *in vitro* ではタブシガルギンやツニカマイシンといった薬剤で惹起できることが知られている³⁾ (図2)。

ERストレス反応のカスケードが躁うつ病の病態と関係していると考えられたため、一般の躁うつ病患者および健常対照者のリンパ芽球においてタブシガルギンでERストレスを惹起し、ATF6、XBP1、HSPA5の発現量増加を調べたところ、XBP1およびHSPA5 mRNA量の増加の程度が患者細胞において低下していることが判明した。これらの遺伝子の反応低下は、XBP1遺伝子の発現を制御している上流配列に起因している可能性を考え調べたところ、ERSEとは別にXBP1自身が結合すると予測される配列が存在し、さらにその配列内にコアシークエンス (ACGT) を失わせる多型 (-116C/G, ACGT→AGGT) がみつかった。この多型は、日本人の症例対照研究 (オッズ比4.6)、米国人の罹患者と両親の伝達不平衡テストの両者で有

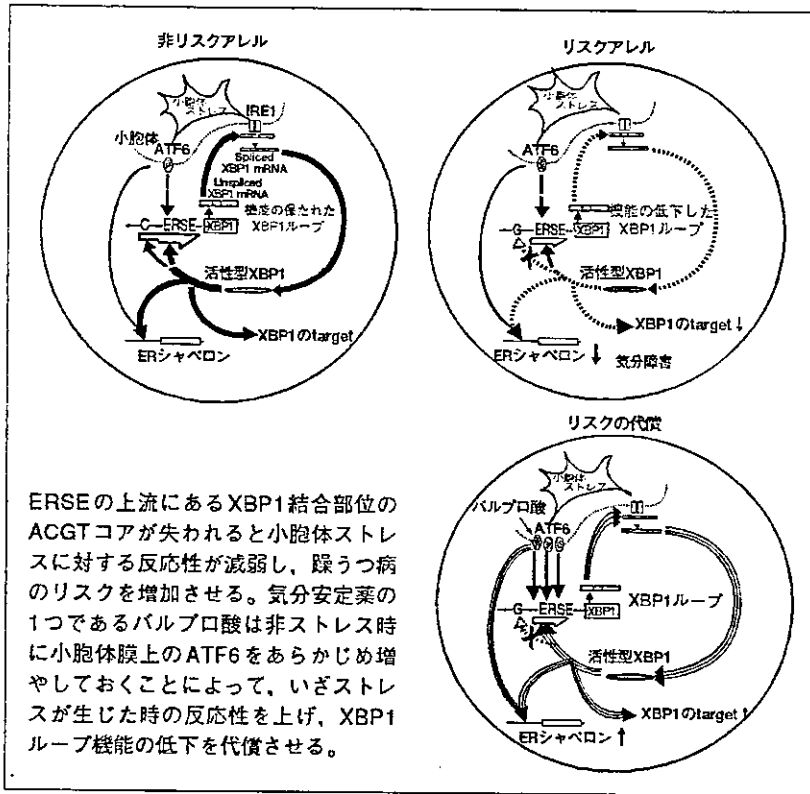


図3 躁うつ病のリスクと代償

XBP1と共発現したときのG型の転写活性がC型より低い。すなわち、-116C/Gを含む配列はXBP1自身の結合配列であり、C→G多型によりこの結合配列が失われる。以上から、-116C→G多型はERストレス反応時におけるXBP1ループの機能低下を生じさせ、このことが躁うつ病のリスクを高めていると考えられた。

IV. 気分安定薬バルプロ酸はERストレス応答を良くする

前述したように気分安定薬の躁うつ病に対する作用機序は不明であった。気分安定薬はERストレス反応のカスケードに作用してい

るのではないかと考え、気分安定薬のリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピンを治療で用いられる血中濃度と同じ濃度の培地で培養した細胞でATF6、XBP1、HSPA5の発現量をみたところ、バルプロ酸のみがATF6の発現量を上昇させることが判明した。バルプロ酸はERストレスラーとしては働いていないことから、ATF6の発現量増加は非ERストレス時のER膜上ATF6タンパク質の増加、ひいてはERストレス時の切断されるATF6タンパク質の増加を生じさせ、これがERストレス反応を亢進させている可能性が考えられた。そこで1週間バルプロ酸存在下で培養した細胞でERストレス反応を調べたところ、XBP1およびシャペロン群の遺伝子発現量の上昇程度は高く、さらに、G/G型の細胞の反応をもC/C型と同じレベルには達しないが、有意に回復させることが判明した。したがって、バルプロ酸の躁うつ病に対する作用機序としては、ERストレスに対する潜在能力を上げることによ

Ⅲ. XBP1-116C→G多型によるERストレス反応の違い

意な関連がみられたことから、この多型が躁うつ病のリスクを高めると考えた。なお、-116Gは日本人では多数派だが米国人では少数派であるため、日本人ではC/C型が防御因子、米国人ではGアリルが危険因子となっているようである。

この多型 (C→G) はコアシークエンスを失わせることにより、XBP1自身の結合が悪くなり、ひいてはERストレス時のXBP1発現に影響を与えると予測されたため、ERストレス反応の違いをタブシガルギンで細胞を処理して調べたところ、C/C、C/G、G/Gの順、すなわち結合配列の数に比例してXBP1の発現量の上昇程度が低くなっていた。したがって、この多型はERストレス反応に影響を与えている。さらに-116Cないし-116Gを含むコンストラクトを用い転写活性を調べたところ、活性型