

## 精神疾患ゲノムバンク対象疾患における Chromogranin A 遺伝子の解析

(分担研究者 稲田俊也 名古屋大学大学院医学系研究科精神生物学分野助教授)

**研究要旨：** 精神疾患ゲノムバンクを構築するにあたっては、統合失調症、覚醒剤使用障害および気分障害（躁うつ病）の試料集積が不可欠である。昨年度までわれわれは、これらの精神疾患患者を対象に Chromogranin B 遺伝子について、5'側調節領域および翻訳領域に存在する SNPs を用いて関連解析を行い、統合失調症との有意な関連を報告した。本年度は、これらの疾患における Chromogranin A 遺伝子多型の変異検索を行い、統合失調症患者では rs9658635, rs729940 多型部位の間に有意な関連が認められ、haplotype 解析で強い関連が認められた。

**研究協力者：**高橋長秀<sup>1)</sup>、石原良子<sup>1)</sup>、齋藤真一<sup>1)</sup>、前野信久<sup>1)</sup>、青山 渚<sup>1)2)</sup>、季 暁飛<sup>1)</sup>、前田貴記<sup>3)</sup>、岩下 覚<sup>4)</sup>、岩田伸生<sup>5)</sup>、伊豫雅臣<sup>6)</sup>、原野睦生<sup>7)</sup>、山田光彦<sup>8)</sup>、関根吉統<sup>9)</sup>、曾良一郎<sup>10)</sup>、小宮山徳太郎<sup>11)</sup>、氏家 寛<sup>12)</sup>、尾崎紀夫<sup>1)</sup>

**研究協力者所属施設：**1) 名古屋大学大学院医学系研究科精神生物学分野 2) 名古屋大学大学院医学系研究科医療技術学専攻・病態解析学分野 3) 慶應義塾大学医学部精神神経科 4) 社会福祉法人桜ヶ丘記念病院 5) 藤田保健衛生大学医学部精神医学教室 6) 千葉大学大学院医学研究院精神医学 7) 久留米大学医学部精神神経科 8) 昭和大学附属烏山病院精神神経科 9) 浜松医科大学精神科 10) 東北大学大学院医学系研究科精神神経生物学分野 11) 国立精神・神経センター武蔵病院 12) 岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学分野

### A. 研究目的

精神疾患ゲノムバンクを構築するにあたっては、統合失調症および気分障害（躁うつ病）の試料集積が不可欠である。本研究の目的は精神疾患ゲノムバンクの構築が行われる際に試料集積の対象となる統合失調症、覚醒剤使用障害、双極性障害などの精神疾患と Chromogranin A 遺伝子との間に関連がみられるかどうかを検討することである。

Chromogranin family (A, B, C)は可溶性分泌タンパクで、種々の神経細胞や脳脊髄液中に分布し、

シナプスからの伝達物質の放出をコントロールしていると考えられている。Chromogranin A および B が、統合失調症患者脳脊髄液中で有意に減少しているとの報告や(Landen M *et al.*, 1999), reserpine, clozapine, haloperidol などの抗精神病薬に反応して、脳内における mRNA の発現増加や発現の局在変化が観察されることから(Mahata SK *et al.*, 1993, Kroesen S *et al.* 1995), 薬物反応性のマーカーとして、さらには精神疾患病態に関与する機能的候補遺伝子として重要な役割を担っていると考えられる。昨年度までわれわれは Chromogranin B 遺伝子に焦点をあて、統合失調症・覚醒剤使用障害・双極性障害の患者と健常者において、その変異検索および関連解析を行い、Exon4 に位置する3つの SNPs (1塩基多型)と統合失調症との強い関連を報告した。本年度は、統合失調症患者および覚醒剤使用障害患者を対象に Chromogranin A 遺伝子の変異検索および関連解析を行った。

Chromogranin A は 14 番染色体に位置し、この領域は統合失調症の発症にかかわる有力な遺伝子座位であることが示されている(Bailer *et al.*, 2000; Chiu *et al.*, 2002; Segurado *et al.*, 2003)。中枢神経系に広く分布し、神経伝達物質と共分泌されるが、その生理学的作用としては trans-Golgi network における分泌タンパクの凝集 (Taupenot *et al.*, 2003)と分泌顆粒の新生に関与している (Kim *et al.*, 2001)ことが知られている。このため、Chromogranin A の機能不全によってシナプスの機能不全を生じ、結果として精神疾患の発症に至る可能性が想定される。この例として、慢性統合失調症患者の脳脊髄液中の Chromogranin A の低下 (Landen *et al.*, 1999), および死後脳における

Chromogranin A 抗体陽性細胞の減少(Iwazaki et al., 2004)が報告されている。

また、近年の分子生物学的研究により、AKT1-GSK3 $\beta$ 系、MAP kinase カスケード、IP3-Ca<sup>2+</sup>系などの細胞内シグナル経路が精神疾患に関与していることが提唱されてきている(Emamian et al., 2004; Manji, 2004)。IP3-Ca<sup>2+</sup>経路はセロトニン受容体からのシグナル伝達において重要な役割を果たしていることが知られているが、近年、この経路がドパミン受容体からのシグナル伝達にかかわっていることが示されてきている(Trantham-Davidson et al., 2004)。さらに、小胞体からのCa<sup>2+</sup>の放出にはChromogranin Aが必要であることが報告され(Yoo et al., 2000)、Chromogranin Aが精神疾患の発症に関与している可能性が考えられる。

さらに、Chromogranin Aはmicrogliaを活性化し、cytotoxinsの放出を促進することでneurotoxicな作用を有することが知られており(Taupenot et al., 1996; Taylor et al., 2002)、Alzheimer's病の老人斑および $\beta$ -amyloid plaques(Lechner T et al., 2003)、Lewy小体症のLewy bodyおよびPick病の風船細胞(Yasuhara et al., 1994)に蓄積されていることが示されている。薬物依存によってprefrontalおよびその他の脳領域の萎縮が生じることが確認されており(Pascual-Leone et al., 1991; Pezawas et al., 1998)、覚醒剤使用障害の脳萎縮にもChromogranin Aの関与している可能性がある。

さらに、覚醒剤使用障害に対する研究では、Phencyclidineの急性投与により、ラットのprefrontal cortexのChromogranin CのmRNAが増加し、secretoneurinが増加することも報告されている(Marksteiner et al., 2001; Hinterhoelzl et al., 2003)。

以上のように、Chromogranin A遺伝子は統合失調症および覚醒剤使用障害などの精神疾患ゲノムバンク対象疾患の有力な候補遺伝子であると考えられる。本研究においては、Chromogranin A遺伝子について詳細な連鎖不平衡解析を行い、その情報をもとに覚醒剤使用障害および統合失調症との関連解析を行った。

## B. 研究方法

対象は、文書および口頭で本研究の目的および意義についての十分な説明を行い、書面での同意の得られた患者で、Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse [JGIDA] (代表：氏家寛)の各サンプル収集施設において収集された覚醒剤依存症患者213名と、統合失調症患者381名、精神疾患に関する遺伝子解析研究に自発的意志により参加を表明した健常対照

者382名である。このうち、2001年4月以降については文部科学省、厚生労働省、通商産業省による「3省合同ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(2001年3月)」に準拠した説明文書および同意文書を用いて試料を収集している。なお、症例対照間の地域格差の問題をなくすため、疾患群と地域・性別・年齢をマッチさせた健常対照者を加えている。

dbSNPに登録されたChromogranin A遺伝子の10個の多型(rs9658628, rs9658629, rs9658630, rs9658631, rs9658634, rs9658635, rs7159323, rs941584, rs729940, rs875395)について、96名の健常者を対象に多型解析を行い、連鎖不平衡解析を行った。各ブロックにおけるhaplotypeの推定はEMアルゴリズムによりHaploview ver.3.1を用いて行い、haplotypeの約90%をカバーし得るSNPをhaplotype tag SNP(htSNP)として選出し、各SNPおよびhaplotype頻度の比較をSPSSおよびcophase ver.2.4を用いて行った。各遺伝子多型の決定はPCR-RFLP法およびPCR-Direct Sequence法を用いて行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。なお、本研究は名古屋大学医学部および各共同研究施設における倫理委員会の審査で承認を得て行っている。

## C. 研究結果

今回検討した多型部位について、症例群および対照群の遺伝子多型の頻度分布は、Hardy-Weinbergの平衡法則から期待される理論分布値と有意な差はみられなかった。10個の多型のうち、6個はminor allele frequencyが10%以下のrare SNPであった。rs9658629, rs9658635, rs729940, rs875395の4SNPは強い連鎖不平衡ブロック内であった。htSNPとしてrs9658635, rs729940を選出した。

統合失調症とrs9658635, rs729940多型部位の間に有意な関連が認められ(allele frequencyのp値はそれぞれ0.0531, 0.0278)、haplotype解析で強い関連が認められた( $p=0.000114$ )。

覚醒剤使用障害と多型部位の間には有意な関連は認められず、使用開始年齢別、フラッシュバック症状の有無、多剤乱用の有無などの臨床症状別に分け詳細に検討を行ったが、有意な関連は認められなかった。治療による精神病症状の消失期間とrs729940との間に有意な関連が見られた(早期消退型vs遷延・持続型のallele frequency比較は $p=0.026$ )。

#### D. 考察

Chromogranin は、内分泌細胞および神経細胞に広く分布する酸性可溶性タンパク質で、その生体内での役割は十分解明されているわけではないが、trans-Golgi network においてホルモンやニューロペプチドの分泌顆粒内への取り込み、さらに濃縮や貯蔵を行っていると考えられている(Ozawa *et al.*, 1995)。最近の報告では、ニューロンの細胞内  $Ca^{2+}$  シグナル伝達において、IP3 受容体と関連して重要な役割を担っているとの報告もある(Thrower *et al.*, 2003)。ヒトの Chromogranin B は 657 個のアミノ酸からなり(Benedum *et al.*, 1987)、神経内分泌細胞に特異的な遺伝子発現プロモーター領域 cyclic adenosine monophosphate response element (CRE) と GC-rich domains を持つことが明らかにされている(Mahata *et al.*, 2002)。Landen ら(1999)は、前述の慢性の統合失調症患者における Chromogranin A および Chromogranin B の脳脊髄液中の減少について、統合失調症の初期には Chromogranin が増加し、病状が慢性化して神経変性のプロセスが進行すると減少する可能性があると考えしている。

本研究は Chromogranin A 遺伝子が覚醒剤使用障害の発症には関与していないが、統合失調症の発症に関与している可能性を示唆している。覚醒剤使用障害の臨床症状による分類では、治療による精神病症状の消失期間と有意な関連が見られており、Chromogranin A 遺伝子は覚醒剤使用障害の予後に関与する因子である可能性がある。有意な関連が見られた SNP はアミノ酸置換を伴う変異であり、統合失調症との強い関連からも Chromogranin A タンパクの機能に変化を起し、その結果精神疾患の病態生理に関与していることが想定される。

また、本研究においては Chromogranin A 遺伝子について、詳細な連鎖不平衡解析の後に関連解析を行うことで、遺伝子全体の検討を行っている。しかし、覚醒剤使用障害は症例数が少なく、今回の解析では十分なパワーが得られたとは言えず、type II error の可能性も否定できない。今後は、さらにサンプル数を増加して Chromogranin A 遺伝子が覚醒剤使用障害患者の病態に及ぼす影響について更に検討を加えていく必要があると考えられる。また、今回は研究対象としなかったが、精神疾患ゲノムバンクの有力な対象疾患の一つである気分障害についても、その病態整理に Chromogranin A 遺伝子がどのように関与しているかについて検討を加えていくべきであると考えられる。

さらに、Chromogranin A, B のサブタイプである Chromogranin C 遺伝子についても、これまでに

得られた生物学的な知見から、新たな候補遺伝子として検討を加えていく必要があるものと考えられる。

#### E. 参考文献

Agnetter, E., Sitte, H.H., Stockl-Hiesleitner, S., Fischer-Colbric, R., Winkler, H., Singer, E.A.: Sustained dopamine release induced by secretoneurin in the striatum of the rat: a microdialysis study. *J Neurochem*, 65: 622-5, 1995.

Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G., Chasserot-Golaz, S., Zwiller, J., Revel, M.O., Aunis, D., Bader, M. F.: Mechanisms underlying neuronal death induced by chromogranin A-activated microglia. *J Biol Chem*, 276: 13113-20, 2001.

Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G., Taupenot, L., Chasserot-Golaz, S., Corti, A., Aunis, D., Bader, M.F.: Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem*, 273: 14339-46, 1998.

Emamian, E. S., Hall, D., Birnbaum, M. J., Karayiorgou, M., Gogos, J. A.:

Gerdes, H.H., Rosa, P., Phillips, E., Baeuerle, P.A., Frank, R., Argos, P., Huttner, W.B.: The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. *J Biol Chem*, 264: 12009-15, 1989.

Gorr, S.U., Shioi, J., Cohn, D.V.: Interaction of calcium with porcine adrenal chromogranin A (secretory protein-I) and chromogranin B (secretogranin I). *Am J Physiol*, 257: E247-54, 1989.

Hakak, Y., Walker, J.R., Li, C., Wong, W.H., Davis, K.L., Buxbaum, J.D., Haroutunian, V., Fienberg, A.A.: Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 4746-51, 2001.

Hinterhoelzl, J.K., Salimi, K., Humpel, C., Singewald, N., Adlassnig, C., Fischer-Colbric, R., Fleischhacker, W.W., Marksteiner, J.: Differential effects of phencyclidine application on secretogranin II expression in organotypic slices of rat prefrontal cortex. *J Neurochem*, 87: 13-21, 2003.

Iijima, Y., Inada, T., Ohtsuki, T., Senoo, H., Nakatani, M., Arinami, T.: Association between chromogranin B gene polymorphisms and schizophrenia in the Japanese population. *Biol Psychiatry*, 56: 10-7, 2004.

Kim, T., Tao-Cheng, J.H., Eiden, L.E., Loh, Y. P.: Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*, 106: 499-509, 2001.

- Kitao, Y., Inada, T., Arinami, T., Hirotsu, C., Aoki, S., Iijima, Y., Yamauchi, T., Yagi, G.: A contribution to genome-wide association studies: search for susceptibility loci for schizophrenia using DNA microsatellite markers on chromosomes 19, 20, 21 and 22. *Psychiatr Genet*, 10: 139-43, 2000.
- Kroesen, S., Marksteiner, J., Mahata, S.K., Mahata, M., Fischer-Colbrie, R., Saria, A., Kapeller, I., Winkler, H.: Effects of haloperidol, clozapine and citalopram on messenger RNA levels of chromogranins A and B and secretogranin II in various regions of rat brain. *Neuroscience*, 69: 881-91, 1995.
- Landen, M., Grenfeldt, B., Davidsson, P., Stridsberg, M., Regland, B., Gottfries, C.G., Blennow, K.: Reduction of chromogranin A and B but not C in the cerebrospinal fluid in subjects with schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*, 9: 311-5, 1999.
- Mahata, S.K., Mahata, M., Wu, H., Parmer, R. J., O'Connor, D.T.: Neurotrophin activation of catecholamine storage vesicle protein gene expression: signaling to chromogranin a biosynthesis. *Neuroscience*, 88: 405-24, 1999.
- Marksteiner, J., Kirchmair, R., Mahata, S.K., Mahata, M., Fischer-Colbrie, R., Hogue-Angeletti, R., Saria, A., Winkler, H.: Distribution of secretoneurin, a peptide derived from secretogranin II, in rat brain: an immunocytochemical and radioimmunological study. *Neuroscience*, 54: 923-44, 1993.
- Marksteiner, J., Weiss, U., Weis, C., Laslop, A., Fischer-Colbrie, R., Humpel, C., Feldon, J., Fleischhacker, W.W.: Differential regulation of chromogranin A, chromogranin B and secretogranin II in rat brain by phencyclidine treatment. *Neuroscience*, 104: 325-33, 2001.
- Miller, C., Kirchmair, R., Troger, J., Saria, A., Fleischhacker, W.W., Fischer-Colbrie, R., Benzer, A., Winkler, H.: CSF of neuroleptic-naive first-episode schizophrenic patients: levels of biogenic amines, substance P, and peptides derived from chromogranin A (GE-25) and secretogranin II (secretoneurin). *Biol Psychiatry*, 39: 911-8, 1996.
- Munoz, D.G.: Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques. *Lab Invest*, 64: 826-32, 1991.
- Nowakowski, C., Kaufmann, W.A., Adlassnig, C., Maier, H., Salimi, K., Jellinger, K.A., Marksteiner, J.: Reduction of chromogranin B-like immunoreactivity in distinct subregions of the hippocampus from individuals with schizophrenia. *Schizophr Res*, 58: 43-53, 2002.
- O'Connor, D.T., Cervenka, J.H., Stone, R.A., Parmer, R. J., Franco-Bourland, R.E., Madrazo, I., Langlais, P.J.: Chromogranin A immunoreactivity in human cerebrospinal fluid: properties, relationship to noradrenergic neuronal activity, and variation in neurologic disease. *Neuroscience*, 56: 999-1007, 1993.
- Pascual-Leone, A.; Dhuna, A.; Anderson, D.C.: Cerebral atrophy in habitual cocaine abusers: a planimetric CT study. *Neurology* Volume 41, Issue 1, January 1991, Pages 34-38
- Pezawas, L., Fisher, G., Diamant, K., Schneider, C., Schindler, S., Thurnher, M., Ploechl, W., Eder, H., Kasper, S.: Cerebral CT findings in male opioid-dependent patients: stereological, planimetric and linear measurements. *Psychiatr. Res.: Neuroimag.* 83 (1998), pp. 139-147.
- Yanaihara, N., Parmer, R.J.: Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension. *J Hypertens*, 20: 1335-45, 2002.
- Rangon, C.M., Haik, S., Faucheux, B.A., Metz-Boutigue, M.H., Fierville, F., Fuchs, J.P., Hauw, J.J., Aunis, D.: Different chromogranin immunoreactivity between prion and a-beta amyloid plaque. *Neuroreport*, 14: 755-8, 2003.
- Rozansky, D.J., Wu, H., Tang, K., Parmer, R. J., O'Connor, D.T.: Glucocorticoid activation of chromogranin A gene expression. Identification and characterization of a novel glucocorticoid response element. *J Clin Invest*, 94: 2357-68, 1994.
- Taupenot, L., Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G., Chasserot-Golaz, S., Aunis, D., Bader, M.F.: Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience*, 72: 377-89, 1996.
- Thrower, E.C., Park, H.Y., So, S.H., Yoo, S. H., Ehrlich, B.E.: Activation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by the calcium storage protein chromogranin A. *J Biol Chem*, 277: 15801-6, 2002.
- van Kammen, D.P., Peters, J., Yao, J., Neylan, T., Beuger, M., Pontius, E., O'Connor, D.T.: CSF chromogranin A-like immunoreactivity in schizophrenia. Assessment of clinical and biochemical relationships. *Schizophr Res*, 6: 31-9, 1991.
- Wen, G., Mahata, S.K., Cadman, P., Mahata, M., Ghosh, S., Mahapatra, N.R., Rao, F., Stridsberg, M., Smith, D.W., Mahboubi, P., Schork, N.J., O'Connor, D.T., Hamilton, B.A.: Both rare and common polymorphisms contribute functional variation at CHGA, a regulator of catecholamine physiology. *Am J Hum Genet*, 74: 197-207, 2004.
- Wiedermann, C.J.: Secretoneurin: a functional neuropeptide in health and disease. *Peptides*, 21: 1289-98, 2000.

Yasuhara, O., Kawamata, T., Aimi, Y., McGeer, E.G., McGeer, P.L.: Expression of chromogranin A in lesions in the central nervous system from patients with neurological diseases. *Neurosci Lett*, 170: 13-6, 1994.

Zhang, B., Tan, Z., Zhang, C., Shi, Y., Lin, Z., Gu, N., Feng, G., He, L.: Polymorphisms of chromogranin B gene associated with schizophrenia in Chinese Han population. *Neurosci Lett*, 323: 229-33, 2002.

#### F. 研究業績

1. Iwata N, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Ozaki N: No association with the neuregulin 1 haplotype to Japanese schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9: 126-127, 2004.
2. Ohtsuki T, Tanaka S, Ishiguro H, Noguchi E, Arinami T, Tanabe E, Yara K, Okubo T, Takahashi S, Matsuura M, Sakai T, Muto M, Kojima T, Matsushima E, Toru M, Inada T: Failure to find association between PRODH deletion and schizophrenia: population screening using simple PCR method. *Schizophr Res* 67: 111-113, 2004
3. Koizumi H, Hashimoto K, Kumakiri C, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Takei N, Iyo M. Association between the glutathione S-transferase M1 gene deletion and female methamphetamine abusers. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 126B(1): 43-45, 2004.
4. Takahashi N, Tomita K, Higuchi T, Inada T: The inter-rater reliability of the Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS) using a Structured Interview Guide for Montgomery-Asberg Depression Scale (SIGMA). *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 19: 187-192, 2004.
5. Iijima Y, Inada T, Ohtsuki T, Senoo H, Nakatani M, Arinami T: Association between chromogranin B gene polymorphisms and schizophrenia in the Japanese population. *Biol Psychiatry* 56(1), 10-17, 2004.
6. 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. *Biol Psychiatry* 56(5): 376-378, 2004.
7. Ohtsuki T, Inada T, Arinami T: Failure to confirm association between AKT1 haplotype and schizophrenia in a Japanese case-control population. *Mol Psychiatry* 9(11): 981-983, 2004
8. 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.
9. 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: A mitochondrial DNA mutation associated with bipolar disorder decreases\* mitochondrial membrane potential. *Genomics* 84(6): 1041-1050, 2004.
10. 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 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 (JGIDA). *Ann NY Acad Sci* 1025: 27-33, 2004.
11. Kobayashi H, Ide S, Hasegawa J, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Shen H-W, Ikeda K, Sora I: Study of association between  $\alpha$ -synuclein gene polymorphism and methamphetamine psychosis/dependence. *Ann NY Acad Sci* 1025: 325-334, 2004.
12. 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 NY Acad Sci* 1025: 34-38, 2004.
13. 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 NY Acad Sci* 1025: 316-324, 2004.
14. 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 NY Acad Sci* 1025: 307-315, 2004.
15. 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, 2004
16. 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 (Neuropsychiatr Genet)* 132B: 70-73, 2005.
  17. Nishiyama T, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Furukawa T, Ozaki N: Haplotype association between GABA<sub>A</sub> receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder. *Pharmacogenomics J*, **in press**.
  18. Kinoshita Y, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Yoneda H, Iwata N, Ozaki N: Association study of the calcineurin A-gamma subunit gene (PPP3CC) haplotype in Japanese schizophrenia. *Journal of Neural Transmission*, **in press**.
  19. Hashimoto T, Hashimoto K, Matsuzawa D, Shimizu E, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iyo M: A functional glutathione-S-transferase P1 polymorphism is associated with methamphetamine-induced psychosis in Japanese population. *Am J Med Genet*, **in press**.
  20. Iwayama-Shigeno Y, Yamada K, Itokawa M, Toyota T, Meerabux JMA, Minabe Y, Mori N, Inada T, Yoshikawa T: Extended analyses support the association of a functional (GT)<sub>n</sub> polymorphism in the GRIN2A promoter with Japanese schizophrenia. *Neurosci Lett*, **in press**.
  21. Suzuki A, Nakamura K, Sekine Y, Minabe Y, Takei N, Suzuki K, Iwata Y, Kawai M, Takebayashi K, Iyo M, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Mori N: An association study between COMT gene polymorphism and methamphetamine psychotic disorder. *Psychiatr Genet*, **in press**

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

分担研究者 南光進一郎  
帝京大学医学部精神科・教授

研究要旨

帝京大学医学部附属病院精神神経科患者のうち気分障害患者10名のDNA試料を得て、研究を統括する主任研究者に送付した。

A. 研究目的

ゲノムスキャンのために気分障害のDNAサンプルを収集する。

B. 研究方法

対象：京大学医学部附属病院精神神経科に入院または通院中の患者の中からアメリカ精神医学会のDSM-IV診断基準によって気分障害と診断された患者を選び出した。このうち帝京大学医学部遺伝子研究倫理委員会の承認した文書を用いて参加の同意の得られた10名を対象とした。

方法：対象患者から末梢血を採血し、キアゲン社 BioRobot EZ1 ワークステーションにて EZ1 DNA Blood 350 $\mu$ l Kit を用いてDNAを抽出した。これをDNA濃度 200ng/ $\mu$ l に調整したのち、患者臨床情報を氏名など個人を同定できる情報を削除して理化学研究所分子精神医学研究チームリーダー吉川武男博士あてに送付した。

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

C. D. E. 研究結果、考察、結論

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

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

## 神経栄養因子遺伝子多型と気分障害

分担研究者 功刀 浩

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部

### 研究要旨

近年、抗うつ薬や通電療法の効果のメカニズムとして、脳由来神経栄養因子(BDNF)などの神経栄養因子が関与している可能性を指摘する報告が増えている。本研究では、ニューロトロフィンの1つである brain-derived neurotrophic factor (BDNF) のアミノ酸置換を伴う多型(Val66Met)が、双極性障害と関連するか否かについて、比較的大きなサンプルで検討した。その結果、先行研究により白人において双極性障害との有意な関連があるとされていた BDNF 遺伝子の Val66Met 多型は、日本人においては関連がみられなかった。この結果から、BDNF と双極性障害との関連は人種差があることが示唆された。

### A. 研究目的

神経栄養因子は、中枢神経系における神経細胞の発達、分化、生存、可塑性などにおいて重要な役割を果たしている。近年、抗うつ薬や通電療法の効果のメカニズムとして、脳由来神経栄養因子(BDNF)などの神経栄養因子が関与している可能性を指摘する報告が増えている<sup>1)</sup>。また、分子遺伝学的研究においては、BDNF の遺伝子多型<sup>10-12)</sup>と双極性障害とが有意に関連するという報告や、BDNF の遺伝子変異が記憶や海馬の機能に影響を与えることも示唆されており<sup>2)</sup>、気分障害の病態発生と関連する可能性が示唆されている。さらに、統合失調症発症危険性やその臨床特性と関連するという報告もある<sup>3,7)</sup>。BDNF と同じニューロ

トロフィン・ファミリーに属する neurotrophin-3 (NT-3) の遺伝子変異に関しても、統合失調症や患者の海馬体積と関連するという報告がある<sup>3,8,9)</sup>。以上から、ニューロトロフィンやそのシグナル伝達に寄与する分子は気分障害や統合失調症などの機能的な精神疾患における病態の解明や創薬の標的として注目される。

昨年度は、BDNF や NT-3 遺伝子の2塩基繰り返し配列多型と気分障害との関連、さらに、ニューロトロフィンに共通の低親和性受容体 p75<sup>NTR</sup> をコードする遺伝子の変異と気分障害との関連について報告した。今年度は BDNF のミスセンス多型 (Val66Met) が双極性障害と有意に関連する<sup>10,12)</sup> という先行結果が、日本のサンプルでも再現されるか否かについて、多施設研究



による比較的大規模なサンプルで検証した。

## B. 研究方法

### 対象

対象は、5研究施設においてリクルートされ、DSM-IVによって双極性障害と診断された患者519名(男244名、平均年齢49歳、双極性障害I型347名、II型172名)と年齢・性分布に関して統制された健常者588名(男287名、平均年齢48歳)である。

倫理面の配慮：ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守して行った。すなわち、被験者からは研究参加に関して十分な説明を行った上で文書による同意を得た。また、検体は匿名化された状態で実験を行った。本研究は国立精神・神経センター武蔵地区倫理審査委員会ほかサンプル供与施設の倫理委員会の承認を得て行われた。

### 方法

BDNFのミスセンス多型Val66Metについては、既報<sup>10)</sup>の方法に準拠して行った。すなわち、標準的な方法でDNAを抽出した後、多型部位をPCRで増幅し、制限酵素Eco72Iで消化し、切断後のバンドを電気泳動とエチジウムブロマイド染色で可視化して遺伝子型を決定した。なお、一部のサンプルは多型領域の直接シーケンスを自動シーケンサー(CEQ8000, バックマン・コールター)によって行い、遺伝子型を決定した。

## C. 研究結果

BDNFの遺伝子型分布と対立遺伝子頻度は表1のようになった。遺伝子型分布はHardy-Weinberg平衡から有意な偏りはなかった。患者群と健常者群における遺伝子型分布、対立遺伝子頻度は、両者とも極めて類似しており、有意差を認めなかった。

## D. E. 考察と結論

BDNFのミスセンス多型について日本の大規模サンプルを用いて検討を行った。その結果、欧米の先行結果と異なり、有意な関連は認められなかった。いっぽう、本研究結果は、わが国やアジア人種の他のサンプルの結果<sup>4,8)</sup>と一致する。従って、BDNFのVal66met多型と双極性障害との関連は人種差がある可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Duman RS. Synaptic plasticity and mood disorders. *Mol. Psychiatry*, 2002; 7 (Suppl 1): S29-S34.
- 2) Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, 2003; 112: 257-69.
- 3) Hattori M, Kunugi H, Akahane A,

- Tanaka H, Ishida S, Hirose T, Morita R, Yamakawa K, Nanko S. Novel polymorphisms in the promoter region of the neurotrophin-3 gene and their associations with schizophrenia. *Am. J. Med. Genet*, **2002**; *114*: 304-9.
- 4) Hong CJ, Huo SJ, Yen FC, Tung CL, Pan GM, Tsai SJ (2003): Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and mood disorders, age of onset and suicidal behavior. *Neuropsychobiology* *48*:186 –189.
- 5) 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.
- 6) Kunugi H, Hattori M, Nanko S, Fujii K, Kato T, Nanko S. Dinucleotide repeat polymorphism in the neurotrophin-3 gene and hippocampal volume in psychoses. *Schizophr. Res*, **1999**; *37*: 271-3.
- 7) 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.
- 8) Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T, et al (2003): Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. *Neurosci Lett* *337*:17–20.
- 9) Nanko S, Hattori M, Kuwata S, Sasaki T, Fukuda R, Dai XY, Yamaguchi K, Shibata Y, Kazamatsuri H. Neurotrophin-3 gene polymorphism associated with schizophrenia. *Acta. Psychiatr. Scand*, **1994**; *89*: 390-2.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, DePaulo JR, Lander ES. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Brain-derived neurotrophic factor. Mol. Psychiatry*, **2002**; *7*: 579-93.

表 1 Genotype and allele frequencies of the Val66Met polymorphism of the BDNF gene among the patients with bipolar disorder and controls

	Genotype distribution				Allele frequency		
	N	V/V	V/M	M/M	N	V	M
Patients	519	0.36	0.46	0.18	1038	0.59	0.41
Controls	588	0.37	0.46	0.17	1176	0.60	0.40

#### 健康危険情報

特になし

#### F. 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.

Tadokoro K, Hashimoto R, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H: Analysis of enhancer activity of a dinucleotide repeat polymorphism in the neurotrophin-3 gene and its association with bipolar disorder. *Neuropsychobiology* 50 (3): 206-210, 2004.

#### G. 知的財産の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書  
気分障害の高精度候補遺伝子・候補領域解析  
および精神疾患ゲノムバンクの構築  
分担研究者 三辺義雄 浜松医科大学精神科神経科講師

**研究要旨** 双極性感情障害や統合失調症の疾患感受性遺伝子は未だ特定されていない。しかし2001年、スコットランドの1家系でDISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) 遺伝子の疾患への関与が報告され、注目されている。この家系では1番染色体に存在するDISC1 遺伝子が、11番染色体との転座により分断されると、双極性感情障害や統合失調症を含む精神疾患を発症することが分かった。最近大阪大学よりDISC1の新しい関連蛋白質としてFEZ1 (fasciculation and elongation protein zeta-1), PCNT2 (pericentrin 2), ZNF365 (zinc finger protein 365) が同定され、DISC1/FEZ1 相互作用などが神経発達に重要な働きをしていることを報告された。今回我々は双極性感情障害患者50人と統合失調症患者50人のDNAサンプルを用いて、転写領域、翻訳領域について変異検索を行い、疾患感受性遺伝子の同定のため、複数サンプルにおいてcase-control studyを行った。これによって関連が得られたマーカーについて、伝達不平衡テスト(TDT)を用いて確認した。さらに、疾患群、健常者の末梢血リンパ球、死後脳における、FEZ1, PCNT2, ZNF365の新規関連遺伝子mRNAについて、タックマンプローベを作成し、ABI PRISM7900を用いて、定量的RT-PCRを行い発現量の比較を行なった。現在までの結果では、統合失調症とFEZ1 およびZNF365 遺伝子変異の相関が見られたが、双極性感情障害ではみられなかった。逆に、PCNT2 遺伝子変異と双極性感情障害で相関がみられたが、統合失調症ではみられなかった。さらに双極性感情障害サンプルにおいて、末梢血リンパ球、死後脳のPCNT2mRNAの上昇がみられた。

#### A. 研究目的

双極性感情障害や統合失調症の疾患感受性遺伝子は未だ特定されていない。しかし2001年、スコットランドの1家系でDISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) 遺伝子の疾患への関与が報告され、注目されている。この家系では1番染色体に存在するDISC1 遺伝子が、11番染色体との転座により分断されると、統合失調症や双極性感情障害を含む精神疾患を発症することが分かった。統合失調症のような細胞死を伴わない精神疾患家系で、単一原因遺伝子が特定された初めての報告である。さらにDISC1 蛋白質は脳に高濃度に発現し、その発現は神経発達と関連し胎児期17-20日に高値となり生後低値になる。これらの事実は統合失調症の神経発達障害仮説とよく合致する。2003, 4年大阪大学のMiyoshi, TohyamaらはDISC1の新しい関連蛋白質としてFEZ1 (fasciculation and elongation protein zeta-1), PCNT2 (pericentrin 2), ZNF365 (zinc finger protein 365) を同定し、

DISC1/FEZ1 相互作用が神経発達に重要な働きをしていることを報告した。さらに、FEZ1 遺伝子は統合失調症連鎖領域である11q24.2に存在することから、functional/positional 両面からの有力な候補遺伝子であると考えられる。またPCNT2は双極性感情障害連鎖領域である21q22.3より同様に有力である。ゆえに本研究では、FEZ1, PCNT2, ZNF365 遺伝子のSNPスクリーニングおよび統合失調症患者、双極性感情障害患者との関連研究を行い、さらに機能解析を行う。DISC1 関連遺伝子の両疾患での遺伝子解析は、これまで試みられたことがなく独創性のある研究である。臨床遺伝研究においては、効率よく遺漏なく推進しそれを実り多いものにするための研究体制として、1、多数例のサンプル収集のための共同体制作り、2、最先端技術を用いた迅速・正確なDATA解析・整理、3生命倫理面での適切・柔軟な対応、が不可欠であることは論を待たない。

#### B. 研究方法

### 1. ヒトにおける FEZ1, PCNT2, ZNF365 遺伝子の変異部位の同定

双極性感情障害患者 50 人、統合失調症患者 50 人の DNA サンプルを用いて、転写領域、翻訳領域について変異検索を行う。PCR-direct sequence には現有の 3700ABI シークエンサーを用いる。さらに、NCBI、TSC、JSNP などの SNP データベースを参照の上、関連解析に使用する SNP を選定する。

### 2. ヒトの FEZ1, PCNT2, ZNF365 遺伝子配列と双極性感情障害、統合失調症との関連解析と、各種臨床症状との比較

双極性感情障害の血液サンプルの 600 例を、母集団の異なる A サンプル 300 例、B サンプル 300 例に分ける。また、Trio サンプル（罹患者とその両親のサンプル）1000 例も別に収集し、これらのサンプルで allele 頻度の高い SNP において解析を行う。まずは疾患感受性遺伝子の同定のため、A サンプル、B サンプルにおいて case-control study を行う。これによって関連が得られたマーカーについて、伝達不平衡テスト (TDT) を用いて確認する。次に神経発達障害の観点から興味もたれる小児発症の統合失調症においても同様の解析を行う。次に発症年齢や各種臨床症状の評価を行い、臨床データとの相関、病型・表現型などとの関連についても検討する。

統合失調症の血液サンプルも同様に、母集団の異なる A サンプル 150 例、B サンプル 150 例に分ける。また、Trio サンプル（罹患者とその両親のサンプル）100 例も別に収集し同様の解析を行なう。

### 3. ヒトの FEZ1, PCNT2, ZNF365 の新規関連遺伝子における機能解析。遺伝子配列

関連があった FEZ1, PCNT2, ZNF365 遺伝子多型について、エキソン内の翻訳領域に変異があったものに対しては発現系構築による機能解析を行う。転写調節領域、近位側のプロモーター領域及び、上流側のエンハンサー領域の変異で関連があったものについてはルシフェラーゼアッセイを行い、エキソン内の 5'-及び 3'-非翻訳領域の変異で関連があったものは、ルシフェラーゼの上流もしくは下流に

変異のある領域を挿入し mRNA の安定性をルシフェラーゼアッセイで調べる。このように同定された疾患感受性変異についての機能解析を行い、変異が機能に関与していることを同定し、発症メカニズムの解明を行う。

### 4. 双極性感情障害、統合失調症の死後脳における、FEZ1, PCNT2, ZNF365 の新規関連遺伝子における機能解析

すでにアメリカのスタンレー・ブライウンダー・ジョンから双極性感情障害、統合失調症の死後脳は入手した。これら疾患群、健常者の死後脳における、FEZ1, PCNT2, ZNF365 の新規関連遺伝子について、タックマンプロベを作成し、ABI PRISM7900 を用いて、定量的 RT-PCR を行い発現量の比較を行なう。

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

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

上記の記載の通りである。

### C. 研究結果

上記 16 病院で、協力が得られなかったのは

1 病院のみであった。総合病院の精神科では院内の倫理委員会が設置され、他科の医師も交えて検討された。単科の精神病院では医局会にて検討された。平成 16 年度はこの協力体制をもとに、研究協力が得られた患者さん、そのご家族からの検体は集積され始めている。現在まで得られている結果は FEZ1 遺伝子において、2 か所の遺伝子変異部位が統合失調症と有意な相関が得られた (IVS2+158G>A, P=0.014, 396T<A or Asp123Glu, p=0.024)。しかし、双極性感情障害においては有意な相関はみられなかった。まだ予備的な結果であるが、ZNF365 遺伝子において統合失調症と有意な相関が得られた。同様に予備的な結果であるが、PCNT2 遺伝子において、6 か所の遺伝子変異部位が双極性感情障害と有意な相関が得られた。しかし統合失調症と有意な相関は得られなかった。

#### D. 考察

FEZ1 は PKC 関連蛋白として知られており、その N 末端に作用する。Protein kinase C (PKC) の調整作用により FEZ1 は細胞膜から細胞質内に移行する。興味深いことに、Wnt シグナル、tumor necrosis factor (TNF) など PKC 関連遺伝子と統合失調症との関連が既に報告されている。さらに DISC1 関連遺伝子がいずれも、neurogenesis や neuromigration に関与する報告があり、双極性感情障害、統合失調症などの神経発達仮説を支持する所見である。難治性疾患について、その偏見を克服する上でも、一日も早く原因究明と新規治療法開発を願う気持ちは医療者、患者さん本人、そのご家族には非常に強く、結果今回の研究についても従来と同様に、静岡県における研究協力体制に大きな支障はないと考えられる。生命倫理指針についても既に整備されており問題はみられない。

#### E 結論

双極性感情障害や統合失調症の疾患感受性遺伝子として、DISC1 の新しい関連蛋白質 FEZ1 (fasciculation and elongation protein zeta-1), PCNT2 (pericentrin 2), ZNF365

(zinc finger protein 365) の可能性を報告した。さらに当該研究につき、主に静岡県における血液サンプルの収集にあたり、収集システムの再構築、生命倫理的対応の整備、さらに今後の検討課題について、引き続き報告した。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

Iwayama-Shigeno Y, Yamada K, Itokawa M, Toyota T, Meerabux JMA, Minabe Y, Mori N, Inada T, Yoshikawa T: Extended analyses support the association of a functional (GT)<sub>n</sub> polymorphism in the GRIN2A promoter with Japanese schizophrenia. *Neuroscience Letters*, in press, 2005

Shirayama Y, Takahashi S, Minabe Y, Ogino T: <sup>1</sup>H NMR spectroscopy shows an increase in the NAAG and glutamate contents in the hippocampus of amygdaloid kindled rat. *Journal of Neurochemistry*, in press, 2005

Suzuki K, Takei N, Iwata Y, Sekine Y, Toyoda T, Nakamura K, Minabe Y, Mori N: Do olfactory reference syndrome and Jiko-shu-kyofu share a common entity? *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 109:150-155, 2004

Sekizawa T, Iwata Y, Nakamura K, Matsumoto H, Suzuki A, Minabe Y, Mori N: Childhood-onset schizophrenia and tryptophan hydroxylase gene polymorphism. *American Journal of Medical Genetics*, 128B:24-26, 2004

Takebayashi K, Sekine Y, Takei N, Minabe Y, Isoda H, Sakahara H, Mori N: Metabolite alterations in basal ganglia associated with psychiatric symptoms of abstinent users: A proton MRS study. *Neuropsychopharmacology*, 29:1019-1026, 2004

○Toyota T, Yoshitsugu K, Ebihara M, Yamada K, Ohba H, Fukasawa M, Minabe Y, Nakamura K, Sekine Y, Takei N, Suzuki K, Itokawa M, Tomaru Y, Shimizu H, Hattori E, Mori N, Yoshikawa T: Association between

schizophrenia with ocular misalignment and polyalanine length variation in PMX2B. *Human Molecular Genetics*, 13: 551-561, 2004

Tani K, Takei N, Kawai M, Suzuki K, Sekine Y, Toyoda T, Minabe Y, Mori N: Augmentation of milnacipran by risperidone in treatment for major depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 7: 55-58, 2004

Minabe Y, Shirayama Y, Hashimoto K, Routledge C, Hagan JJ, Ashby CR: The effect of the acute and chronic administration of the selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-271046 on the activity of midbrain dopamine neurons in rats: An in vivo electrophysiological study. *Synapse*, 52: 20-28, 2004

Kawai M, Minabe Y, Takagai S, Ogai M, Matsumoto H, Mori N, Takei N: Poor maternal care and high maternal body mass index in pregnancy as a risk factor for schizophrenia in offspring. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 110: 257-263, 2004

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. *Neuroscience Letters*, 368: 41-45, 2004.

Ide M, Muratake T, Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Iwamoto K, Takao H, Toyota T, Kaneko N, Minabe Y, Nakamura K, Kato T, Mori N, Asada T, Someya T, Yoshikawa T: Genetic and expression analyses of FDZ3 in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 56:462-465, 2004.

Yamada K#, Nakamura K#, Minabe Y# (#equally contributed to this work), Shigeno Y, Takao H, Toyota T, Hattori E, Takei N, Sekine Y, Suzuki K, Iwata Y, Miyoshi K, Honda A, Baba K, Katayama T, Tohyama M, Mori N, Yoshikawa T: Association of FEZ1 gene variants including Asp123Glu with schizophrenia subset in Japan. *Biological Psychiatry*, 56:683-690, 2004

## 2. 学会発表

吉川武男、豊田倫子、吉次聖志、山田和男、糸川昌成、三辺義雄、中村和彦、森則夫  
精神疾患関連表現型の遺伝子解析、  
第100回日本精神神経学会総会、札幌、

2004

鈴木敦子、中村和彦、関根吉統、長田奈穂子、竹林淳、三辺義雄ら

覚醒剤精神病におけるSODの相関研究  
第31回日本脳科学会、2004.6.11、宮崎

関根吉統、尾内康臣、中村和彦、武井教使、二ツ林昌彦、岡田裕、三辺義雄ら

覚醒剤使用者のセロトニン・トランスポーター脳内密度と精神症状の関連に関する研究  
第31回日本脳科学会、2004.6.11、宮崎

竹林淳、関根吉統、武井教使、三辺義雄ら  
トルエン使用者の大脳基底核における膜障害と精神症状、プロトンMRS研究

第31回日本脳科学会、2004.6.11、宮崎

豊田倫子、吉次聖、海老原、山田和彦、大羽尚、深澤正、三辺義雄ら

PMX2B 遺伝子のポリアラニン鎖長多型と斜視を伴う統合失調症との相関  
第31回日本脳科学会、2004.6.11、宮崎

H知財権の状況・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
気分障害の高精度候補領域解析および精神疾患ゲノムバンクの構築  
分担研究報告書

家系収集ならびに気分障害の再発に関与する遺伝子の探索

分担研究者 西川 徹  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科精神行動医科学・教授  
研究協力者 車地暁生、伊藤 卓、海野麻未、石井澄和、山本直樹、柏 淳、  
金子雄二郎

**研究要旨** 気分障害の高精度候補遺伝子・候補領域解析と精神疾患ゲノムバンクの構築に資するため、家系ゲノムサンプルを収集するとともに、気分障害のストレス性再発に関連する新たな候補遺伝子を探索した。候補遺伝子としては、気分障害が一定の年齢以降に発症することや、ストレス反応も発達に伴って著明に変化することに着目し、ラット大脳新皮質から、薬理学的ストレスラーと考えられる不安惹起薬の GABAA 受容体ベンゾジアゼピン部位逆アゴニスト FG7142 に対して、ストレス性の血中コルチコステロン増加が認められない幼若期には応答が見られず、成熟期に発現が誘導される遺伝子群を、DNA アレイ法を用いてクローニングした。この中から、拘束ストレスや他の不安惹起薬 yohimbine でも共通して発現が増加する 3 種類の遺伝子を検出した。以上の結果は、発達に伴って成熟する新規のストレス応答システムとその分子カスケードの存在を示唆している。検出された遺伝子群は気分障害のストレス性再発に関与する可能性があるため、現在気分障害を含む精神疾患患者における変化を検討中である。

**A. 研究目的**

気分障害におけるゲノム異常の可能性については、連鎖解析および相関解析を中心に精力的に進められているが、現在のところ発症の原因となる遺伝子座または遺伝子の変化は見出されていない。一方、気分障害は再発を繰り返すことが多く、新しい治療・予防法開発のためにも、再発の分子機構の解明も急がれている。

このため、本研究では気分障害における遺伝子異常に新たな観点からアプローチすることをめざしている。すなわち、1) 気分障害は 20 代から 30 代の一定の年齢以降に発症する、2) 気分障害の発症や再発にはストレスが深く関与すると考えられているが、ストレスに対する応答も発達に伴って著しく変化し、齧歯類では、ストレス負荷後の血中コルチコステロン濃度の上昇を指標にすると、生後 2 日から 12 日頃

まではストレスに対する反応が極めて低い、3) 副腎皮質ステロイドとその制御系である、視床下部—下垂体—副腎系は、気分障害における異常が報告されている、等の点に着目した。これらの所見は、気分障害およびその再発に関係する神経回路や分子カスケードは特定の年齢で機能的成熟を遂げることを示唆している、そこで、気分障害のストレス性再発に関連する新たな候補遺伝子として、薬理学的ストレスラーである不安惹起薬に対する応答が、ストレス低応期には目立たないが、成熟期では著明な遺伝子を探した。

**B. 研究方法**

本年度の研究は、東京医科歯科大学の実験動物委員会承認を得た上、ガイドラインを遵守して行った。



### 1. 対象および薬物

動物実験には、生後8および56日令のC57/BL系雄性マウスを用いた。マウスは $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度55%、8時より20時を明期とする明暗条件下で飼育した。試薬は、すべて市販のものを用いた。ストレスラーとしては、強い不安惹起作用をもつGABAA受容体ベンゾジアゼピン部位逆アゴニストFG7142(N-methyl-beta-carboline-3-carboxamide, 10–40mg/kg)を用いた。FG-7142は、0.1%のTween 80に懸濁し皮下注射(s.c.)により投与した。対照群の動物には注射溶媒を投与した。薬物の投与量は、常にfree baseで計算した。

### 2. RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) によるRNA finger printing

生後8日齢または56日齢の動物にFG-7142または0.1%のTweenを投与後1時間で断頭し、大脳新皮質よりtotal RNAを抽出した。それぞれの実験群において、8-10匹の等量をプールし、生後8日齢のFG 7142投与群と対照群、ならびに生後8週齢のFG7142投与群と対照群の合計4群のtotal mRNAサンプルを作製した。これらのサンプルを用いて、8,374クローンに対するDNAチップスクリーニング(IncycyteGenomics, Inc (Genome Systems Inc.))を行った。さらに転写産物の全長を明らかにするため、RAP-PCRクローンにもとづいて、ラット脳cDNAライブラリーのスクリーニング、RACE法(rapid amplification of cDNA ends)、Cap site hunting法等により解析を進めた。

### 3. 遺伝子発現の定量的解析

DNAチップスクリーニングで変化が認められた遺伝子については、より定量性の高いリアルタイムPCR法を用いて、その変化を確認した。標的遺伝子の発現量補正のための内因性コントロールとしてはGAPDHを用いた。標的遺伝子mRNAおよびGAPDH mRNAに特異的なプライマーペアにより、LightCycler (Roche)を用いてリアルタイムPCR (LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green 1 Kit)を行った。得られたPCR増幅曲線からLightCycker Softwareを用いて、GAPDHおよび標的遺伝子のmRNA量の相対値

を算出した。なお、PCR産物の特異性の検討は、PCR後の融解曲線解析およびアガロースゲル電気泳動による単一バンドの確認により行った。さらに、ストレス反応の特徴を明らかにするため、大脳新皮質だけでなく海馬と線条体において、拘束ストレス負荷後や、不安惹起効果をもつyohimbineを投与後における変化と比較した。

### C. 研究結果

本研究のスクリーニング実験において、大脳新皮質を対象としたのは、これまでのc-Fos発現を使った脳の活動性変化の検討から、この部位が不安惹起薬FG7142急性投与への応答が発達に伴って最も著しく変化することが明らかになり、ストレス応答の発達との関連が推測されたためである。

若年成熟期にあたる56日齢と老年期初期に相当する540日齢の間で、FG7142に対する応答に差が認められる遺伝子を大脳新皮質のfinger print上で探索したところ、540日齢の方発現量の増加が大きい転写産物が検出され、anxiogenic-responsive transcript 6(axg6)、axg7、axg8および10(A63A30: axg10)と名付けた。DNAチップスクリーニングにより、該当する遺伝子として、これまでストレスに対する反応が知られていなかった8種類の遺伝子が検出され、anxiogenic-responsive transcript 1(axg1)–8と名付けた。このうち3種類の遺伝子、axg6、axg7、axg8は、成熟マウスの大脳皮質において、拘束ストレス負荷ならびに不安惹起薬であるyohimbine投与によっても発現が増加することがわかった。特に、axg6遺伝子に関しては、海馬や線条体でも、FG7142、yohimbineおよび拘束ストレスの負荷後に発現が誘導された。

### D. 考察

本研究において、FG7142を不安惹起性ストレスラーとして選択したのは、1)ヒトや動物に不安を選択的に引き起こすことが報告されており、2)動物実験では、FG7142投与時に他のストレス負荷時と共通して、血中の副腎皮質ホルモンの上昇、

脳内ノルアドレナリンニューロンの活動上昇、前頭葉のドーパミン伝達亢進等が認められる、3)GABA 受容体ベンゾジアゼピン結合部位の逆作動薬であることが確立され、4)脳への移行が容易で末梢から投与しても脳の GABA 受容体に作用させることが可能、等の所見にもとづいている。

気分障害等のストレスによる再発に関与する新規候補遺伝子の検索は、FG-7142 への応答が生後発達に伴って最も著しく変化する脳部位に、成熟期に作動する特異的なストレス応答系あるいはストレス防御系が存在するという発達学的仮説にもとづいて、大脳新皮質で行った。その結果、ストレスに対して、年齢依存的な反応を示す遺伝子が実在することが初めて明らかになり、以上の発達学的仮説が支持された。

本研究で検出された、FG-7142 投与によりストレス応答の臨界期以降に発現が誘導されるようになる遺伝子は、これまでストレス反応性の報告がなく、大脳新皮質のストレス応答・防御機構の新たな分子カスケードを構成すると考えられる。特に他の不安惹起薬や拘束ストレスでも明らかな発現誘導が生ずる 3 種の遺伝子(axg6-8)は、ストレス負荷時の細胞応答の基本的な分子カスケードを構成している可能性があり注目される。

今後はさらに、これら遺伝子(axg6-8)の局在、機能、気分障害・ストレス性精神障害またはそれらのモデルにおける病態やヒト相同遺伝子の変化を検討する。現在 axg8 について、組織化学的解析およびヒト相同遺伝子の相関解析を進めている。

#### E. 結論

マウス大脳新皮質において、強い不安を惹起するストレスである GABA 受容体逆アゴニスト、FG7412 による発現の増加が、ストレス低反応を示す幼若期には見られず、成熟期に著明になる遺伝子群を初めて検出し、このうち 3 種は成熟期に他の不安惹起薬やストレスでも発現誘導が生ずることを明らかにした。したがって、これら 3 種の遺伝子は成熟期のストレス応答に関与し、気分障害その他の精神疾患のストレス性再発

に関与する可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### (1) 原著

1. Fujii R, Okabe S, Urushido T, Inoue K, Yoshimura A, Tachibana T, Nishikawa T, Hicks GG, Takumi T: The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology. *Curr Biol*, 15: 587-593, 2005.
2. Aoki-Suzuki M, Yamada K, Meerabux J, Iwayama-Shigeno Y, Ohba H, Iwamoto K, Takao H, Toyota T, Suto Y, Nakatani N, Dean B, Nishimura S, Seki K, Kato T, Itoharu S, Nishikawa T, Yoshikawa T: A family-based association study and gene expression analyses of netrin-G1 and -G2 genes in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 57: 382-393, 2005
3. Inoue K, Yamada A, Fujii R, Nakatani J, Matsubara C, Ishii M, Aburatani H, Umino A, Nishikawa T, Takumi T: Fez1 is layer-specifically expressed in the adult mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 20: 2909-2916, 2004.
4. Sakurai S, Ishii S, Umino A, Shimazu D, Yamamoto N, Nishikawa T: Effects of psychotomimetic and antipsychotic agents on neocortical and striatal concentrations of various amino acids in the rat. *J Neurochem* 90: 1378-1388, 2004.
5. Fukasawa M, Aoki M, Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Takao H, Meerabux J, Toyota T, Nishikawa T, Yoshikawa T: Case-control association study of human netrin G1 gene in Japanese schizophrenia. *J Med Dent Sci* 51: 121-8, 2004.

###### (2) 著書

1. 西川 徹: 6. 神経化学から. (風祭元, 山下格

- 編). 心の科学セレクション 統合失調症. pp.541-542. 日本評論社, 東京, 2005.
2. 伊藤 卓, 西川 徹: 3. 最初期遺伝子と核内情報伝達系. 新規抗精神病薬のすべて (加藤進昌, 上島国利, 小山司編), 先端医学社, 東京, pp270-275, 2004.
  3. 大島一成, 西川 徹: 18. 精神科領域の救急. 第7章経験すべき症状・病態. ①緊急を要する疾患・病態. 臨床研修実践マニュアル (奈良信雄編), 南江堂, 東京, pp328-331, 2004.
  4. 西川 徹: 5. 統合失調症. 第8章 Common Diseases. ①精神疾患・心身医学. 臨床研修実践マニュアル (奈良信雄編), 南江堂, 東京, pp541-542, 2004.
- (3) 総説
1. 古田 光, 西川 徹: 統合失調症 標準治療と最新治療—メリットとデメリット. Clin Neurosci 23: 106-107, 2005.
  2. 嶋津 奈, 西川 徹: モノアミン障害・アンフェタミンモデル 統合失調症の仮説とそのモデル検証. 分子精神医学 5: 58-63, 2005.
  3. 西川 徹: 統合失調症の分子薬理学的解析—ドーパミン受容体および NMDA 受容体作用薬を用いたアプローチ—. 特集 1 統合失調症: 分子から治療まで. 脳 21 8: 9-15, 2005.
  4. 西川 徹: Schizophrenia の分子病態—内在性 D-セリンおよび発達依存的発現制御を受ける遺伝子の意義—. 第1回 Schizophrenia 研究会. 臨床精神薬理 7: 87-112, 2004.
  5. 西川 徹: 統合失調症のグルタミン酸仮説. 生体の科学 55: 544-545, 2004.
  6. 西川 徹: mrt1 をめぐって 統合失調症の神経生物学. mrt1; Possible implication in the pathophysiology of schizophrenia. Schizophrenia Frontier 5: 18-24, 2004.
  7. 西川 徹: Special Review 「脳内 D-セリンの代謝と生理作用」. 細胞工学 23: 1180-1185, 2004.
- (4) その他
1. 村岡新一郎, 梶井 靖, 山本直樹, 海野麻未, 柏 淳, 伊藤 卓, 金子雄二郎, 西川 徹. 統合失調症の発症に關与する遺伝子の発達薬理学的研究. 精神薬療研究年報 36: 49-52, 2004.
  2. 内匠 透, 藤井律子, 吉村 淳, 井上 浄, 渡辺康仁, 漆戸智恵, 岡部繁男, 西川 徹. 抗精神病薬標的分子としての RNA 結合蛋白の機能解析. 精神薬療研究年報 36: 90-94, 2004.
  3. 新井 誠, 糸川昌成, 山田和男, 豊田倫子, 羽賀誠一, 氏家 寛, 曾良一郎, 池田和彦, 吉川武男. 統合失調症における神経細胞接着分子関連遺伝子の解析. 精神薬療研究年報 36: 100-113, 2004.
2. 学会発表
- (1)特別講演・シンポジウム
1. 西川 徹: 統合失調症の病態研究の現状と展望. 「脳疾患の病態研究と治療法開発の方向性」. 先端脳・脳科学総合研究センター病因遺伝子研究グループ合同ワークショップ, 和光, 4.3, 2004.
  2. 西川 徹: 統合失調症の分子病態と新しい治療法開発. 第100回日本精神神経学会総会. 札幌, 5.22, 2004.
  3. 西川 徹, 山本直樹, 柏 淳, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 谷口 豪, 金子雄一郎, 竹林裕直: 幻覚・妄想状態の発症・再発モデルとしての長期持続性行動感作現象の分子機構. 「シナプス可塑性の分子機構研究と精神神経疾患研究の接点を探る」. シナプス可塑性研究会, 5.28, 2004.
  4. 西川 徹: グルタミン酸—D-セリンシステムと統合失調症. 神経科学会議. 宮崎, 6.12, 2004.
  5. 西川 徹, 山本直樹, 海野麻未, 櫻井新一郎, 嶋津 奈, 谷口 豪, 石井澄和, 岩間久行: D-セリンと統合失調症. 第47回日本神経化学会大会. 大阪, 9.23, 2004.
  6. 西川 徹: 動物モデルによる統合失調症関連

- 遺伝子への発達薬理学的アプローチ. 第 49 回日本人類遺伝学会大会, 第 4 回東アジア人類遺伝学会連合会大会. 東京, 10.13, 2004.
7. 西川 徹: 統合失調症の分子薬理学的解析: ドーパミン受容体および NMDA 受容体作用薬を用いたアプローチ. 「統合失調症: 分子から治療まで」. 第 17 回ブレインサイエンスシリーズ. 千里, 10.19, 2004.
  8. 西川 徹: メトアンフェタミンに発達依存的応答を示す遺伝子 *mrt1* と統合失調症の逆耐性モデル. 第 27 回日本分子生物学会年会. 神戸, 12.8, 2004.
  9. 西川 徹: 分子生物 - 統合失調症. 東京大学医学部 M1 基礎統合講義 精神疾患の基礎医学. 東京, 2.8, 2005.
  10. Nishikawa T: Glutamate dysregulation in schizophrenia. Recent Progress in Basic and Clinical Research of Neuropsychiatric Diseases, Seoul, 2.25, 2005.
  11. 西川 徹: 「統合失調症治療と NMDA 受容体グリシン結合部位作動薬」, 第 78 回日本薬理学会年会, 横浜, 3.24, 2005.
- (2) 国際学会
1. Sakurai S, Ishii S, Umino A, Yamamoto N, Nishikawa T: Effects of Psychotomimetic And Antipsychotic Agents On Neocortical And Striatal Concentration Of Various Free Amino Acids In The Rat. The International Journal Of Neuropsychopharmacology, XXIV, CINP Congress. Paris, 6.23, 2004
  2. Yamamoto N, Shimazu D, Umino A, Sakurai S, Taniguchi G, Nishikawa T: Regulation Of Endogenous D-Serin In The Cerebral Neocortex. The International Journal Of Neuropsychopharmacology, XXIV, CINP Congress. Paris, 6.23, 2004
  3. Nishikawa T, Kajii Y, Muraoka S, Fujiyama K, Hiraoka S, Umino A, Kashiwa A, Ito T, Kaneko Y, Yamamoto N: MRT1: Possible Involvement In The Molecular Basis Of Behavioral Sensitization, A Model For Stimulant-Induced Psychosis. The International Journal of Neuropsychopharmacology, XXIV, CINP Congress. Paris, 6.23, 2004
  4. Sakurai S, Ishii S, Umino A, Shimazu D, Yamamoto N, Nishikawa T: Effects of psychotropic agents on the net contents of various amino acids in the rat neocortex and striatum. Society for Neuroscience 34<sup>th</sup> Annual Meeting. San Diego, 10.24, 2004.
  5. Ito T, Hiraoka S, Kashiwa A, Kaneko Y, Kurumaji A, Nishikawa T: Developmentally regulated induction of CCN1(CYR61) by NMDA antagonists in the rat neocortex. Society for Neuroscience 34<sup>th</sup> Annual Meeting. San Diego, 10.27, 2004.
- (3) 国内学会  
一般学会
1. 宮崎 美里, 大島 一成, 車地 暁生, 西川 徹. 大学病院精神科開放病棟における抑うつ状態を呈した患者に対する小集団精神療法 - 障害受容の初期過程における攻撃性の表現とグループのコンテイン機能について -. 第 21 回日本集団精神療法学会大会, 静岡, 2004 年 3 月.
  2. 花村誠一, 大島一成, 安宅勝弘, 行実知昭, 岩脇 淳, 西川 徹. 統合失調症疑診群および確診群における基底症状, 陽性症状, 陰性症状間の相関. 第 100 回日本精神神経学会総会, 札幌, 2004 年 5 月.
  3. 行実知昭, 花村誠一, 中村元昭, 岩間久行, 松田博史, 大島一成, 新垣 浩, 西川 徹. 統合失調症の陰性症状と脳血流の関連. 第 100 回日本精神神経学会総会, 札幌, 2004 年 5 月.
  4. 竹内 崇, 古田 光, 平沢俊行, 行実知昭,