

FKBP5 はうつ病との関連は認められなかった。CRHR1 のハプロタイプとうつ病との間に有意な関連を認めた ($p=0.008$) このハプロタイプは rs7209436 と rs242941 によるもので各 SNPs をみた場合 rs242941 の minor allele frequency は患者群で 9.6%、対照群で 13.6% と低くなっていた ($p=0.014$, $OR=0.67$ [0.490-0.92])。

D. 考察と結論

今回の結果、CRHR1 のハプロタイプとうつ病との関連が認められた。しかし、結果の解釈には慎重さを必要とする。

第一にサンプル数が十分ではない。近年の関連解析においてはサンプル数が 1000:1000 程度以上で行うことが奨励されており、かつ一次サンプルとは別の二次サンプルで再確認を行うべきだと考えられている。これは遺伝子多型による関連解析の多くが α エラーであった反省による。従って、今回の結果もより多数の二次サンプルによって追試された時点で始めて意義あるものとする。

第二に、今回の対象は構造化診断面接を行ったわけではない。気分障害の遺伝学的研究では双極性障害か大うつ病性障害かは相当慎重に評価しても明確にならないことが多い。多くの双極性障害は大うつ病エピソードから発症していることから、今回のサンプルに双極性障害が混在している可能性は否定できない。敢えて言えば大うつ病エピソードを経験し一度は大うつ病性障害の診断基準を満たしたサンプルという事になる。

今後、上記の点を踏まえ、サンプル数を増やすこと、構造化面接による診断の確認を行うことが当面必要と考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

-Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N: No association of haplotype-tagging SNPs in TRAR4 with schizophrenia in Japanese patients. *Schizophr Res* 2005

-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 GABAA receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder. *Pharmacogenomics J* 5 (2):89-95, 2005

-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

-Hakamata Y, Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Ozaki N, Honjo S, Ono Y, Inada T: No association between monoamine oxidase A promoter polymorphism and personality traits in Japanese females. *Neurosci Lett* 389 (3):121-3, 2005

-Ikeda M, Iwata N, Kitajima T, Suzuki T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: Positive Association of the Serotonin 5-HT(7) Receptor Gene with Schizophrenia in a Japanese Population. *Neuropsychopharmacology* 2005

-Iidaka T, Ozaki N, Matsumoto A, Nogawa J, Kinoshita Y, Suzuki T, Iwata N, Yamamoto Y, Okada T, Sadato N: A variant C178T in the regulatory region of the serotonin receptor gene HTR3A modulates neural activation in the human amygdala. *J Neurosci* 25 (27):6460-6, 2005

-Kinoshita Y, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Yoneda H, Iwata N, Ozaki N: No association with the calcineurin A gamma subunit gene (PPP3CC) haplotype to Japanese schizophrenia. *J Neural Transm* 2005

-Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshiya Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N: Positive association of AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 1-5, 2005

-Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ujike H, Ozaki N: Association Analysis of Chromosome 5 GABA(A) Receptor Cluster in Japanese Schizophrenia Patients. *Biol Psychiatry* 58 (6):440-5, 2005

-Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: No association of GSK3beta gene (GSK3B) with Japanese schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005

H. 知的財産権の出願。登録状況

双極性感情障害、統合失調症等の精神病性障害の予防・治療剤、そのスクリーン具方法、及び該疾患の発症リスクの判定方法：特願 2005-150215、出願中

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領域解析および精神疾患ゲノムバンクの構築
一家系の収集、遺伝子解析

分担研究者 加藤忠史 理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム

研究要旨：本研究の目的は、気分障害の原因を明らかにし、診断法、治療法を開発するため、説明の上同意を得て気分障害患者より採血を行い、DNA を抽出し、その遺伝子解析を行うことである。本年度は、気分障害患者とその家族 6 名の DNA を収集した。また、ミトコンドリア遺伝子の合成に関わる遺伝子群および小胞体ストレス関連遺伝子群の解析を行った。

A. 研究目的

双極性障害（躁うつ病）においては、遺伝的素因の関与が明らかとなっている。多くの遺伝子解析研究により候補遺伝子が調べられているが、いまだに確実な遺伝的危険因子は同定されていない。

本研究の目的は、双極性障害の原因を明らかにし、診断法、治療法を開発するため、説明の上同意を得て双極性障害患者より採血を行い、DNA を抽出し、その遺伝子解析を行うことである。我々は主として、脳画像法および遺伝子発現解析により得られた、ミトコンドリア関連遺伝子および小胞体ストレス関連遺伝子を解析する。

B. 研究方法

患者に対し、研究の目的、方法等を説明の上、同意を得て、採血を行った。診断には、構成面接 (SCID または MINI) を用いた。得られた血液より、白血球を分離し、通常の方法により DNA を抽出した。

ミトコンドリア遺伝子の合成に関わる遺伝子としては、ミトコンドリア DNA 合成酵素であるポリメラーゼ γ (POLG) を中心に、アデニンヌクレオチドトランスロケター-1 (ANT1)、およびミトコンドリア DNA ヘリケース (Twinkle) についても一部の患者で予備的な検討を行った。

我々が前年度双極性障害との関連を報告した NDUFV2 遺伝子については、統合失調症との共通の連鎖部位にあることから、統合失調症との関連を検討した。

また、ミトコンドリア遺伝子全周配列の解析を行い、見出された変異に関して、症例対象研究を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては、理化学研究所脳科学総合研究センター研究倫理第一委員会の承認を得た。

C. 研究結果

POLG については、多数例の患者で全エクソンを調べている。その結果、数名の患者で、ミスセンス変異が同定された。

NDUFV2 遺伝子については、双極性障害と関連するプロモーター多型が統合失調症とも関連していることを明らかにした。

ミトコンドリア遺伝子については、器質性精神障害様の特異な病状を呈する症例を中心に検索を行い、Flb1a という希なハプロタイプを 2 名の患者で見出し、双極性障害および統合失調症との関連を検討したが、明らかな関連は見られなかった。

D. 考察

これまで双極性障害との関連を報告した遺伝子のうち、NDUFV2 について統合失調症との関連を報告した。

ミトコンドリア遺伝子に関しては、新たに Flb1a との関連が疑われたが、有意な関連は見られなかった。

E. 結論

双極性障害患者の DNA サンプルを収集すると共に、候補遺伝子についての検討を行った。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Washizuka S, Kametani M, Sasaki T, Tochigi M, Umekage T, Kohda K, Kato T (in press). Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with schizophrenia in the Japanese population. American Journal of Medical Genetics

(Neuropsychiatric Genetics)

Kazuno A, Munakata K, Mori K, Tanaka M, Nanko S, Kunugi H, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Akiyama T, Kato N, Kato T (2005)

Mitochondrial DNA sequence analysis of patients with "atypical psychosis". Psychiatry and Clinical Neurosciences 59:497-503

Munakata K, Bundo M, Kato T, Ono H, Sakura N, Oosaki M, Waki C, Tanaka M (2005) Co-existing point mutations of mitochondrial DNA in a patient with a heart abnormality and pearson syndrome-like symptoms. American Journal of Medical Genetics 139A: 162-164

Horiuchi Y, Arai M, Niizato K, Iritani S, Noguchi E, Ohtsuki T, Koga M, Kato T, Itokawa M, Arinami T (2005) A polymorphism in the PDLIM5 gene associated with gene expression and schizophrenia. Biological Psychiatry :1-6

Kato T, Iwayama Y, Kakiuchi C, Iwamoto K, Yamada K, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Yoshikawa T, Nanko S (2005) Gene expression and association of LIM (PDLIM5) in bipolar disorder and schizophrenia. Molecular Psychiatry 10:1045-1055

Kato T, Kuratomi G, Kato N (2005) Genetics of bipolar disorder. Drugs of Today 41:5:335-344

2. 学会発表

加藤忠史、垣内千尋、岩本和也、岩山佳美、山田和男、三辺義雄、中村和彦、森則夫、藤井久彌子、南光進一郎、功刀浩、吉川武男 (2005) 双極性障害におけるLIMの遺伝子発現および関連解析 第27回日本生物学的精神医学会／第35回日本神経精神薬理学会 大阪 2005年7月6日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

精神疾患ゲノムバンク対象疾患における Chromogranin A 遺伝子の大規模追加解析

(分担研究者 稲田俊也 帝京大学医学部附属市原病院メンタルヘルス科)

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。これまでにわれわれは、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さらに、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を認め、haplotype 解析でも強い関連を認めた。本年度はこの Chromogranin A 遺伝子多型と統合失調症の関連について、さらにサンプルを追加して大規模なサンプルでの解析を行い、結果的に有意な rs9658635 との有意な関連を確認した。

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

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 β 系, MAP kinase カスケード, IP3-Ca²⁺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-Ca²⁺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 Ca²⁺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 β -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)。

我々は昨年度までに、Chromogranin A 遺伝子について、覚醒剤依存症患者 213 名と、統合失調症患者 381 名、健常対照者 382 名について遺伝子関連研究を行い、統合失調症と rs9658635, rs729940 多型部位の間に有意な関連が認め (allele frequency の p 値はそれぞれ 0.0531, 0.0278), haplotype 解析でも強い関連を認めた (p=0.000114)。

本年は、統合失調症患者についてさらにサンプルを追加し、これらの知見を確認した。

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、統合失調症患者

260 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 200 名であり、この結果、最終的にサンプル数は統合失調症患者 641 名、健常対照者 582 名となった。さらに、second sample set として、藤田保健衛生大学より、統合失調症患者 377 名、健常対照者 338 名のサンプル提供を受け、first set での有意な関連の確認を行った。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。

昨年度までに 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い、各ブロックにおける haplotype を EM アルゴリズムにより Haploview ver.3.1 を用いて推定、haplotype の約 90% をカバーし得る haplotype tag SNP (htSNP) として rs9658635, rs729940 を選出している。各 SNP および haplotype 頻度の比較を SPSS および cocaphase 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藤田保健衛生大学における倫理委員会の審査で承認を得ている。

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。

統合失調症と rs9658635 の間に有意な関連が認められた (allele frequency の p 値はそれぞれ 0.010) rs729940 多型部位については有意な関連は見られなかった (p 値は 0.066)。haplotype 解析で強い関連が認められた (p=0.0016)。

また、second set を用いた rs9658635 の解析では有意な関連が認められた (p 値は 0.007)。

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, IP_3 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られている。

本研究は Chromogranin A 遺伝子が, 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。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。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

Agneter, E., Sitte, H.H., Stockl-Hiesleitner, S., Fischer-Colbrie, 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-Colbrie, 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-naïve 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. *Psychiat. 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 α -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. 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.
2. 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: 182–187, 2005.
3. 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.
 4. 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)n polymorphism in the GRIN2A promoter with Japanese schizophrenia. *Neurosci Lett* 378: 102-105, 2005.
 5. 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_A receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder. *Pharmacogenomics J* 5(2): 89-95, 2005.
 6. Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Otani K, Kishimoto M, Morio A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N: The X-box binding protein 1 (XBP1) gene is not associated with methamphetamine dependence. *Neurosci Lett.* 383(1-2): 194-198, 2005.
 7. Hori K, Funaba Y, Konishi K, Moriyasu M, Hirata K, Oyamada R, Tominaga I, Inada T: Assessment of pharmacological toxicity using serum anticholinergic activity in a patient with dementia. *Psychiatr Clin Neurosci* 59(4): 508-510, 2005.
 8. Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N: No association of haplotype-tagging SNPs in TRAR4 with Schizophrenia in Japanese patients. *Schizophr Res*, Published online in June 20, 2005.
 9. 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. *J Neural Transm*, Published online in April 22, 2005.
 10. 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 B Neuropsychiatr Genet* 135(1):5-9, 2005.
 11. 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.
 12. Hakamata Y, Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Ozaki N, Honjo S, Ono Y, Inada T: No association between monoamine oxidase A promoter polymorphism and personality traits in Japanese females. *Neurosci Lett* 389, 121-123, 2005.
 13. Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshiya Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N: Positive association of AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 8, 1-5, 2005.
 14. Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ujike H, Ozaki N: Association Analysis of Chromosome 5 GABA(A) Receptor Cluster in Japanese Schizophrenia Patients. *Biol Psychiatry* 58: 440-445, 2005.
 15. Ohgake S, Hashimoto K, Shimizu E, Koizumi H, Okamura N, Koike K, Matsuzawa D, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Shirayama Y, Iyo M. Functional polymorphism of the NQO2 gene is associated with methamphetamine psychosis. *Addict Biol* 10(2): 145-148, 2005.
 16. Arinami T, Ohtsuki T, Ishiguro H, Ujike H, Tanaka Y, Morita Y, Mineta M, Takeichi M, Yamada S, Imamura A, Ohara Ko, Shibuya H, Ohara Ke, Suzuki Y, Muratake T, Kaneko N, Someya T, Inada T, Yoshikawa T, Toyota T, Yamada K, Kojima T, Takahashi S, Ohmori O, Shinkai T, Nakamura M, Fukuzako H, Hashiguchi T, Niwa S, Ueno T, Tachikawa H, Hori T, Asada T, Nanko S, Kunugi H, Hashimoto R, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Arai H, Ohnuma T, Kusumi I, Koyama T, Yoneda H, Fukumaki Y, Shibata H, Kaneko S, Higuchi H, Yasui-Furukori N, Numachi Y, Itokawa M, Okazaki Y; Japanese Schizophrenia Sib-Pair Linkage Group: Genome-wide high-density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of

- schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 1p, 14q, and 20p. *Am J Hum Genet* 77: 937-944, 2005.
17. Hakamata Y, Iwase M, Iwata H, Kobayashi T, Tamaki T, Nishio M, Kawahara K, Matsuda H, Ozaki N, Honjo S, Inada T: Regional brain cerebral glucose metabolism and temperament: a positron emission tomography study. *Neurosci Lett* 396: 33-37, 2006.
 18. Hori K, Oda T, Asaoka T, Yoshida M, Watanabe S, Oyamada R, Tominaga I, Inada T: First episodes of behavioral symptoms in Alzheimer's disease patients at age 90 and over, and early-onset Alzheimer's disease: Comparison with senile dementia of Alzheimer's type. *Psychiatry Clin Neurosci*. 59(6): 730-735, 2005
 19. Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Maeno N, Aoyama N, Ji X, Miura H, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N, Inada T: Association between chromogranin A gene polymorphism and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res*, **in press**, 2006.
 20. Ide S, Kobayashi H, Ujike H, Ozaki N, Sekine Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Iwata N, Tanaka K, Shen H, Iwahashi K, Itokawa M, Minami M, Satoh M, Ikeda K, Sora I: Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mopioid receptor gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J*, **in press**, 2006.
 21. Aoyama N, Takahashi N, Saito S, Maemo N, Ishihara R, Ji X, Miura H, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Yoshida K, Iwata N, Inada T, Ozaki N: Association study between kynurenine 3-monooxygenase gene (*KMO*) and schizophrenia in the Japanese population. *Genes, Brain and Behavior*, **in press**.
 22. Morio A, Ujike H, Nomura A, Tanaka Y, Morita Y, Otani K, Kishimoto M, Harano M, Inada T, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S: No Association between CART (Cocaine- and Amphetamine-regulated Transcript) Gene and Methamphetamine Dependence. *Ann NY Acad Sci*, **in press**.
 23. Ujike H, Sakai A, Nakata K, Tanaka Y, Kodaka T, Okahisa Y, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Hori T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S: Association Study Between The Dihydropyrimidinase-related Protein 2 Gene And Methamphetamine Psychosis. *Ann NY Acad Sci*, **in press**.
 24. Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Otani K, Kishimoto M, Morio A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S: The glycine transporter 1(*GlyT-1*) gene is associated with methamphetamine-induced psychosis. *Ann NY Acad Sci*, **in press**.
 25. Nomura A, Ujike H, Tanaka Y, Kishimoto M, Otani K, Morita Y, Morio A, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S: Association studies of the tumor necrosis factor-alpha gene and its receptor gene in methamphetamine dependence. *Ann NY Acad Sci*, **in press**.
 26. Otani K, Ujike H, Sakai A, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Kishimoto M, Morio A, Morita Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S: Association study between cytochrome P450 2D6 genotype and patients with methamphetamine Dependence / Psychosis. *Ann NY Acad Sci*, **in press**.
 27. Kishimoto M, Ujike H, Tanaka Y, Nomura A, Otani K, Morita Y, Morio A, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S: Association study between the *FZD3* gene and methamphetamine psychosis. *Ann NY Acad Sci*, **in press**.

気分障害におけるレトロポゾン Alu 挿入のメチル化状態について

分担研究者 南光進一郎

帝京大学医学部精神神経科・教授

研究要旨 1. DNA 試料収集：帝京大学医学部附属病院精神神経科患者から、すでに DNA 試料の得られた気分障害患者 28 名に加えて今年度は 3 名の試料を新たに得た。

2. レトロポゾン Alu 解析：近年、数々の遺伝子のメチル化異常が報告されている気分障害患者において、メチル化によって制御されているレトロポゾンの病因的役割について検討するために、代表的なヒトレトロポゾン Alu の動態を調査した。気分障害患者 30 検体におけるレトロポゾン Alu 領域特異的挿入 4 箇所について、PCR 法および MSR 法によって Alu 挿入の有無とそのメチル化状態を調べた。その結果、挿入多型と疾患との関連はみられなかったが、健常対照群および患者群ともに AluYa5/342 挿入は低メチル化状態であることが明らかとなった。本 Alu 挿入は、二次的挿入を引き起こす内在性変異原となる可能性が明らかとなり、今後の疾患研究において重要な役割を担うことが示唆された。

A. 研究目的

DNA 試料収集：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。

レトロポゾン Alu 解析：ヒトゲノムのおよそ 40% を占めるレトロポゾンは、そのコピーをゲノム中へ挿入し、遺伝子の構造変異を引き起こすことから、系統進化に大きく寄与してきたと考えられてきた。通常、レトロポゾンの動態はメチル化によって強く抑制されているが、新規挿入例も数多く報告され、さらに数々の症例において、直接的な病因としての遺伝子内新規挿入が報告されていることから、近年、レトロポゾンの動態は疾患研究においても注目されている。われわれは「統合失調症や気分障害の遺伝的基盤は、メチル化の緩みによって、

転移因子が疾患関連遺伝子に入りこんだために遺伝子等が機能変化を起こしたことがある」とのエピジェネティクスとゲノム不安定性を融合した仮説を提唱した。この仮説にしたがって、転移因子の挿入領域を網羅的に探索し、挿入領域およびその近傍にある遺伝子を選抜することによって、疾患関連遺伝子の同定を試みている。本研究では、近年、数々の遺伝子のメチル化異常が報告されている気分障害患者において、レトロポゾン Alu の挿入およびそのメチル化について調査し、Alu の病因的役割について検討することを目的とした。

B. 研究方法

DNA 試料収集：帝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対象患者から末梢血 20ml 採血し、キアゲン社の EZ1 DNA Blood 350 μ l Kit を用いた BioRobot EZ1 ワークステーションにて DNA を抽出した。本年度は、新規に 3 名から採血し、DNA 試料を得た。

レトロポゾン Alu 解析：領域特異的 AluYa5 および AluYb8 多型のうち、連鎖研究で気分障害候補領域とされている部位、6p22.1-22.3、6q23.2-24.3、12q24.2 に座上し、これまでのわれわれの研究において健常対照群 144 名で Hardy-Weinberg の法則を満たした 4 箇所の Alu 多型 (Ya5/342、Yb8/49、Yb8/67 および Yb8/225) の Alu 多型検出プライマー¹⁾を用いて、気分障害患者 30 例の PCR 増幅を行った。得られた増幅産物は、アガロースゲル電気泳動によって解析し、それぞれの遺伝子型を決定した。得られた遺伝子型の分布と Alu 頻度について、健常対照群と患者群で比較し、カイ二乗検定おこない、気分障害との関連を検討した。

さらに、AluYa5/342 挿入が見られた気分障害患者 13 例および健常者 7 名について、Alu 挿入のメチル化の有無を Methylation-specific PCR (MSP) 法によって調査した。ゲノム DNA 試料を EZ DNA Methylation Kit (ZYMO RESEARCH 社) を用いて Bisulfite 処理を行い、CpG 領域を含まないように設計した 2 組の AluYa5/342 挿入検出プライマー

(Ya5/342me1F:5'-TTGATAGATTGAATATGAGAGAG-3' および Ya5/342me1R:5'-CAATCCTTTATCACCTCTATAC-3'、Ya5/342me2F:5'-ATAAATGGTATTGAGATAATTAGATA-3' および Ya5/342me2R:5'-ATATTTTCTACCTATCTATAACTC-3') を用いて nest PCR による増幅を行った。得られた増幅産物を用いて、MSP 法用のプライマー検索ソフト CpGWare™ (<http://apps.serologicals.com/cpgware/>) にて設計した Alu Ya5/342 CpG 領域のメチル化検出用プライマー (342MF:5'-CAACACTTTAAAAAACCGAACGAACGAACGA-3' および 342MR:5'-GGATTATAGGCGTTTCGTTATTACGTTTC-3') および非メチル化検出用プライマー (342UF:5'-CCCAACACTTTAAAAAACCAAAACAAACAA-3' および 342UR:5'-TTGGGATTATAGGTGTTTGTATTATGTTT-3') を用いて MSP 法を行い、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動によって解析し、メチル化の有無を調査した。

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. 研究結果

気分障害患者 30 例における領域特異的 Alu PCR 法によって、AluYa5 および AluYb8 の挿入 (+) および非挿入 (-) による多型が確認された。Ya5/342 では、+/+型が 28 例、非増幅が 2 例で確認された。Yb8/49 では、+/-型が 2 例、-/-型が 27 例、非増幅が 1 例で確認された。Yb8/67 では、+/+型が 11 例、+/-型が 14 例、-/-型が 5 例で確認された。Yb8/225 では、

+/+型が2例、+/-型が13例、-/-型が15例で確認された。得られた挿入型、非挿入型およびヘテロ型の3種類の遺伝子型の分布とAlu頻度について、健常対照群144名と比較し、カイ二乗検定おこない、気分障害との関連を検討したところ、いずれのAlu多型においても、健常対照群と患者群との間に優位な差は確認されなかった。

次に、健常対照群および気分障害患者ともに高頻度で挿入が確認されたYa5/342挿入を対象に、MSP法によってAlu挿入のメチル化の有無を調査したところ、供試したYa5/342挿入を持つ健常者7例および気分障害患者13例全例において、メチル化Aluおよび非メチル化AluのPCR増幅が共に確認された。

D. 考察

レトロポゾンAluは、霊長類の進化やヒトの系統分化に寄与してきた代表的なヒト転移因子のひとつである。Aluサブファミリーのうち、比較的新しく成立したAluYファミリーは現在もなお転移活性を有し、32のヒト疾患の病因となっていることで注目を集めている。

本研究では、領域特異的Alu挿入多型について、統合失調症との関連を検討するため、症例-対照法による関連研究を行ったが、いずれのAlu挿入多型も疾患との関連はみられなかった。

通常、Alu挿入はメチル化による修飾を受けて転移活性を抑制されているため、そのメチル化Aluの効果は、挿入領域における構造変異のみに止まる。しかし、転移活性を維持している非メチル化Aluは、その二次挿入のための鋳型となって近傍領域の

構造や遺伝子発現にも影響を及ぼす変異原となる可能性がある。したがって、Aluの病因的役割を検討するためには、Alu挿入スクリーニングに加えてAlu挿入のメチル化解析も重要な課題である。

本研究では、高頻度で挿入しているAluYa5/342を対象に、MSP法による解析を行ったところ、AluYa5/342のメチル化は完全なものではなく、非メチル化すなわち転移活性を持つことが明らかとなった。本解析は、MSP用プライマーの認識部位に含まれる6箇所のCpGのみを対象としており、AluYa5/342全域のCpGを解析・判定しているものではない。よって今後は、解析サンプル数の増加とともに、AluYa5/342全域のCpGを対象としたメチル化解析や、定量的PCRによるメチル化レベルの詳細な検討を行うとともに、その近傍遺伝子の構造や発現との関連について検討し、患者ゲノムにおける非メチル化Alu挿入の内在性変異原としての詳細な評価を行っていく予定である。

E. 結論

本研究結果から、進化学的研究の発展に寄与してきた領域特異的Alu挿入は、低メチル化状態によって二次的挿入を引き起こす内在性変異原となる可能性が示唆された。したがってAlu挿入は今後の疾患研究において重要な役割を担うことが推察された。

参考文献

- 1) Carroll ML, Roy-Engel AM, Nguyen SV, Salem AH, Vogel E, Vincent B, Myers J, Ahmad Z, Nguyen L, Sammarco M, Watkins WS, Henke J, Makalowski W, Jorde LB, Deininger PL, Batzer MA. Large-scale analysis of the

Alu Ya5 and Yb8 subfamilies and their contribution to human genomic diversity. J Mol Biol. 311:17-40,2001

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

論文発表・学会発表ともになし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得・実用新案登録ともになし

神経栄養因子遺伝子多型と気分障害

分担研究者 功刀 浩¹

共同研究者：岡田武也¹，橋本亮太¹，沼川忠広¹，飯嶋良味¹，小菅麻子²，
巽雅彦^{2,3}，上島国利²，加藤忠史⁴，

¹国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部、

²昭和大学医学部精神医学教室、³横浜診療クリニック、

⁴理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム

研究要旨

近年、脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子の多型が双極性障害を含む複数の精神・神経疾患発症リスクと関連するという報告が多数なされている。本研究において我々は、BDNF 遺伝子多型の中でも繰り返し解析されている翻訳開始点上流 1.0kb に位置する (GT)_n マイクロサテライト多型に注目してその詳細な解析を行い、新しい多型/変異の探索とともに双極性障害との関連解析を行った。解析の結果このマイクロサテライト多型は従来報告されていたより複雑な構造とバリエーションを持っていることが明らかとなり、これを BDNF-linked complex polymorphic region [BDNF-LCPR] と名付けた。この詳細な BDNF-LCPR 型をもとに対立遺伝子頻度を解析したところ、患者群と対照健常者群との間に統計学的に有意な差が認められた。また、BDNF-LCPR 配列が BDNF 遺伝子の転写活性に及ぼす影響についてルシフェラーゼ・アッセイを用いた解析・評価を行ったところ、患者群で有意に多い A1 型アレルを挿入したルシフェラーゼ発現ベクターでは他の主要なアレル型 A2~A4 を挿入した場合と比較してルシフェラーゼの発現がより強く抑制されることが判明した。以上の結果から BDNF 遺伝子の特定の多型が転写調節を介して、双極性障害の発症リスクを高めている可能性が示唆された。

A. 研究目的

神経栄養因子ファミリーである BDNF は、中枢神経系における神経細胞の発達、分化、生存、可塑性、新生にかかわる重要な分子であり、その遺伝子変異や多型は多くの精神・神経疾患発症の遺伝的リスク候補とし

て注目・研究されている。なかでも以下の 3 つの多型については繰り返し、精神・神経疾患やその病態と関連する興味深い報告がなされている。

1) Val66Met (G196A)

アミノ酸置換を伴う SNP であり、高次脳機能への関与⁽¹⁾ とともに脳の形態形成への

影響も示唆される⁽²⁾。統合失調症⁽³⁾、⁽⁴⁾や強迫性障害⁽⁵⁾との関連を報告した研究があり、精神疾患のリスクを担う遺伝子多型として注目されている。双極性障害との関連は、日本人における Kunugi らの詳細な解析の結果否定されており⁽⁶⁾。この結果はイギリスにおける最新の大規模な追試でも支持されている⁽⁷⁾。

2) (GT)_n リピート

Pröschel らが 1992 年に報告したマイクロサテライト多型で⁽⁸⁾、BDNF の転写方から読めば (CA)_n リピートである。近年、Krebs らが晩発性統合失調症との関連を報告したのに続き⁽⁹⁾、Neves-Pereira らは Val66Met 多型との特定のハプロタイプが双極性障害発症に強く関連すると報告している⁽¹⁰⁾。

3) C270T

2001 年、Kunugi らによって初めて報告された非翻訳領域の SNP。マイナーアレル“T”を持つことが晩発性アルツハイマー病のリスクを高めると報告されており⁽¹¹⁾、これを支持する追試結果もある⁽¹²⁾。近年では、家族性パーキンソン病との関連も報告されている⁽¹³⁾。

以上から、BDNF 遺伝子多型が疾患発症リスクを高める機序を明らかにすることは、気分障害や統合失調症などの機能性精神疾患におけるゲノム創薬・病態解明における重要な研究テーマである。

そこで本研究では、いままで頻繁に報告されながら精神・神経疾患との関連についての評価が分かっている 2 塩基繰返し配列多型“(GT)_n リピート”について詳細な構造解析を行うとともに、最近報告された双極性障害との関連解析を試みた。また度々

論文で議論されつつも⁽¹⁴⁾、⁽¹⁵⁾実験的検証がなされていなかった (GT)_n リピート多型の転写制御機能についても世界で初めて解析を行った。

B. 研究方法

対象

BDNF 遺伝子多型と双極性障害との関連解析に用いた対象は、DSM-IV によって双極性障害と診断された患者 153 名（男 71 名、平均年齢 47.8 (SD15.3) 歳、双極性障害 I 型 94 名、II 型 59 名）と年齢・性分布に関して統制された健常者 153 名（男 71 名、平均年齢 47.1 (SD11.0) 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 日文部科学省・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、昭和大学医学部の倫理委員会の承認を得て行われた。

方法

1) BDNF-LCPR 多型の判定

平成 16 (2003) 年の本報告で、BDNF (GT)_n リピートが単なる 2 塩基繰返し配列ではなく、3 つの反復配列 (CG)_n、(CA)_n、(GA)_n が重複した複雑な構造を持つこと示した(Fig. 1a)。我々は、この遺伝子多型を正確に判定するために各対立遺伝子を pBluescriptIIISK(+) (TOYOBO) ベクター

にクローニングし、自動シーケンサー (CEQ8000, ベックマン・コールター) によって直接塩基配列を決定した(Fig. 2)。また反復配列の PCR 増幅過程でおきる stuttering 産物を排除するために、同一のゲノム DNA をパイロシーケンス法 (Pyrosequence 社) でも解析し(Fig. 3)、これらの結果を総合して最終的な BDNF-LCPR 型を決定した(Fig. 4)。Table. 1 には解析に用いたすべてのプライマーを示しており、Primer No の数字は Fig. 1a において各プライマーの 5'-端に一致する。

2) 双極性障害との関連解析

判定した BDNF-LCPR の遺伝子型頻度および対立遺伝子頻度について、患者群と健常者群との間で χ^2 検定を行い疾患との関連を評価した。また下流にある Val66Met 多型と BDNF-LCPR の連鎖不平衡解析には Kunugi らが先行して行った Val66Met タイピングのデータ⁶⁾を用いた。 χ^2 検定には SPSS v11、連鎖不平衡解析には COCAPHASE v2.403 program を用いた。

3) ルシフェラーゼ・アッセイ

BDNF-LCPR 配列が BDNF 遺伝子発現に与える影響を評価するために 1) における判定の結果、日本人集団で大多数を占める 4 種類のアレル型 A1 (Del-12-3)、A2 (4-12-3)、A2 (5-12-2)、A4 (5-13-3) を対象に、多型部位とその周辺を含むおよそ 400bp の DNA 断片をホタル・ルシフェラーゼベクター pGL3-Promoter (Promega) の SV40 プロモーター上流に挿入したプラスミドを構築(Fig. 6a)、培養 5 日目のラット大脳皮質初代培養ニューロ

ンに一過性にトランスフェクトした。24 時間後に細胞を回収、発光度をルミノメーターで測定した。トランスフェクション効率率は、ウミシイタケ・ルシフェラーゼを発現するベクター phRL-TK を同時にトランスフェクトして補正した。BDNF-LCPR 挿入効果は DNA 断片の挿入がない pGL3-Promoter ベクターの活性を基準に評価した。すべてのプラスミドについて、トランスフェクションは毎回トリプリケートして行い、これを独立して 3 回行った結果から平均値と標準偏差値とを算出した。

C. 研究結果

1) BDNF-LCPR 多型の判定

詳細な解析の結果、1992 年当初 Pröschel らが (GT) n リピートと報告していた配列は BDNF 遺伝子の 5' \square 3' の方向で読むと、GT でなく CA リピートであること、そしてこの (CA) n リピートが 5'-上流を (CG) n 、3'-下流を (GA) n 多型で挟まれた 5' \square 3' : (CA) $_{del/2}$ (CG) $_{del/4/5}$ 、(CA) $_{9-15}$ 、(GA) $_{2/3}$ という複雑な構造を持つことが明らかとなった (Fig. 1b)。我々は改めてこのマイクロサテライト多型を BDNF-linked complex polymorphic region [BDNF-LCPR] と名付けた。今回の解析では、上記 3 種類の 2 塩基繰返しと挿入・欠失、および稀な塩基配列置換の組み合わせによって生じた 23 種類のアレル型を確認した (Table. 2)。

2) 双極性障害との関連解析

患者群 153 名と年齢・性をマッチさせた同数の健常者対照群との間で遺伝子型頻度および対立遺伝子頻度を比較した結果を

(Table. 3)に示す。遺伝子型分布は、両群とも Hardy-Weinberg の法則からの有意な偏りを認めなかったが、対立遺伝子頻度を比較すると、A1 型対立遺伝子が健常者群と比較して患者群で有意に多いことがわかった ($p=0.001$, オッズ比 2.8, 95% CI 1.5-5.3) (Fig. 5)。また BDNF-LCPR を構成要素である $(CA)_{del/2}(CG)_{del/4/5}$ 、 $(CA)_{9-15}$ 、 $(GA)_{2/3}$ それぞれに分けて χ^2 検定を行うと 5'-側 $(CA)_{del/2}(CG)_{del/4/5}$ 多型のうち反復配列が完全に欠損する del 型: $(CA)_{del}(CG)_{del}$ のみが強く関連していることがわかった (Table. 4)。また BDNF-LCPR と下流にある有名な多型 Val66Met について連鎖不平衡解析を行った結果、両者にきわめて強い連鎖が認められた ($D'=0.91$ for patients and $D'=0.90$ for controls; $\chi^2=512$, $df=28$, $p=1.6 \times 10^{-90}$ in total subjects)。Val66 アレルは A1, A2, A3 アレルと、一方 Met66 アレルは A4 アレルと連鎖しており、このハプロタイプを用いた関連解析でも統計学的に有意な差が認められた (global $p=0.0069$) (Table. 5)。特に A1 アレルは Val66 アレルと完全に連鎖しており、個別に見ると A1-Val66 ハプロタイプに最も強い関連が認められた ($p=0.001$)。また BDNF-LCPR の 3 つの構成要素 $(CA)_{del/2}(CG)_{del/4/5}$ 、 $(CA)_{9-15}$ 、 $(GA)_{2/3}$ はそれぞれ Val66Met と強い連鎖を示したのに対し、構成要素間の連鎖は比較的弱いものであった (Table. 6)。

5'-側 $(CA)_{del/2}(CG)_{del/4/5}$ 多型の $(CA)_{del}(CG)_{del}$ アレルは Val66 と完全に連鎖していたが、逆に Val66 は $(CA)_{del/2}(CG)_{del/4/5}$ の任意のアレルと連鎖していた。

3) ルシフェラーゼ・アッセイ

ルシフェラーゼ・アッセイの結果、BDNF-LCPR と周辺部からなるおよそ 400bp の DNA 断片を挿入したすべてのベクターにおいて、ルシフェラーゼ発現の抑制が認められた。なかでも双極性障害患者群で有意に多い A1 型アレルを挿入したプラスミドでは他の主たるアレル型 A2~A4 が挿入されている場合に比べて統計学的に有意なルシフェラーゼ発現の減少が確認された。(Fig. 6b)

D. E. 考察と結論

1) BDNF-LCPR 多型の判定

対立遺伝子のクローニングとシーケンス、そして PCR によるアーティファクトを排除するパイロシーケンス法を組み合わせることで、判読困難な BDNF-LCPR 多型の正確なタイピング方法を確認した。この成果によって BDNF-LCPR が 5'→3'の方向に連続した $(CA)_{del/2}(CG)_{del/4/5}$ 、 $(CA)_{9-15}$ 、 $(GA)_{2/3}$ 多型で構成されている複雑なマイクロサテライト多型であることを明らかになった。今まで単純な 2 塩基繰り返しで 5~6 種類のアレル型しかないと認識されていたこの領域が⁽⁸⁾、およそ 80% を占める 4 種類のメジャーアレルと 19 種類のマイナーアレル群から構成されていることが明らかになったことは、過去に行われた $(GT)_n$ リピート多型を仮定したタイピング結果と関連解析の再検証の必要性を示している。

2) 双極性障害との関連解析

先行研究における BDNF-LCPR は長い間 $(GT)_n$ リピート多型として解析されてきた。今回明らかになった BDNF-LCPR

アレル型に従えば、主たるアレル型 A2 と A3 が同じ DNA 断片長 (407bp) を示すことから、今までのゲル電気泳動によるタイピングが不適切であったことは明白である (Table. 2)。これが原因で再現性ある結果が得られなかった可能性は否定できない。近年、ゲル電気泳動によるタイピングで我々同様に双極性障害と BDNF 遺伝子多型の関連を報告した Neves-Pereira らは、(GT)_n リピートの“短いアレル”と Val66 を組み合わせたハプロタイプの関与を報告しているが、これはタイピング方法が不適当であったにもかかわらず、他と比較して突出して短い A1 アレル(12-16bp 短い)を囚らずも捕らえたものと思われる⁽¹⁰⁾。よって今まで報告された BDNF の (GT)_n リピート多型と精神・神経疾患との関連研究は BDNF-LCPR アレル型を用いて再検討されるべきである。この意味で厳密な BDNF-LCPR 型と双極性障害の関連を明らかにした今回の研究は意義深い。また Val66Met 多型と双極性障害の関連研究には Val66 アレルとの関連を示唆する報告と同時に^{(10) (16) (17)}、これを否定する報告も多い^{(6) (15) (18-21)}。我々が行った BDNF-LCPR 多型と Val66Met 多型との連鎖不平衡解析で得られた A1-Val66 の完全連鎖という結果は、この矛盾の一部を説明できるかも知れない。つまり双極性障害の真のリスクを担うのは BDNF-LCPR 多型の A1 アレルであり、強固な連鎖関係にある Val66 アレルはたまたま幾つかのサンプルにおいて過剰に検出されてしまったという仮説である。事実 Val66 は A1 以外 A2、A3 とも連鎖している。(Table. 5, 6)

3) ルシフェラーゼ・アッセイ

ルシフェラーゼ・アッセイの結果から、BDNF-LCPR 配列を含む DNA 断片が、アレル型特異的なサイレンサー活性を持つ機能的多型である可能性が示された。

とりわけ双極性障害に関連するとの結果を得た A1 型アレルにおいて相対的に強い転写抑制効果が認められたことは疾患発症のメカニズムを理解する上で大変示唆に富むものである。しかしながら BDNF 遺伝子には現在報告されているだけでも4つのプロモーターが存在し、さらに未知のプロモーターが存在する可能性もある⁽²²⁾。したがって今後は、BDNF-LCPR 配列のサイレンサー活性がどのプロモーターを調節し、双極性障害発症のリスクにかかわる BDNF 発現の制御をしているのか明らかにしてゆく予定である。

参考文献

- 1) Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A *et al.* The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell.* 2003; 112: 257-69.
- 2) Pezawas L, Verchinski BA, Mattay VS, Callicott JH, Kolachana BS, Straub RE *et al.* The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci.* 2004; 24: 10099-102.

- 3) Rosa A, Cuesta MJ, Fatjo-Vilas M, Peralta V, Zarzuela A, Fananas L. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene is associated with risk for psychosis: evidence from a family-based association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006; 141: 135-8.
- 4) Tan YL, Zhou DF, Cao LY, Zou YZ, Wu GY, Zhang XY. Effect of the BDNF Val66Met genotype on episodic memory in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2005; 77: 355-6.
- 5) Hall D, Dhillia A, Charalambous A, Gogos JA, Karayiorgou M. Sequence variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet.* 2003; 73: 370-6.
- 6) Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M, Hashimoto R, Kato T *et al.* 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* 2004; 56: 376-8.
- 7) Green EK, Raybould R, Macgregor S, Hyde S, Young AH, O'Donovan MC *et al.* Genetic variation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in bipolar disorder: case-control study of over 3000 individuals from the UK. *Br J Psychiatry.* 2006; 188: 21-5.
- 8) Pröschel 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.
- 9) Krebs MO, Guillin O, Bourdell MC, Schwartz JC, Olie JP, Poirier MF *et al.* Brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants association with age at onset and therapeutic response in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2000; 5: 558-562.
- 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) Kunugi H, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N *et al.* A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 2001; 6: 83-6.
- 12) Olin D, MacMurray J, Comings DE. Risk of late-onset Alzheimer's disease associated with BDNF C270T polymorphism. *Neurosci Lett.* 2005; 381: 275-8.
- 13) Parsian A, Sinha R, Racette B, Zhao

- JH, Perlmutter JS.
Association of a variation in the promoter region of the brain-derived neurotrophic factor gene with familial Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2004; 10: 213-9.
- 14) Strauss J, Barr CL, George CJ, King N, Shaikh S, Devlin B et al. Association study of brain-derived neurotrophic factor in adults with a history of childhood onset mood disorder. *Am J Med Genet.* 2004; 131B: 16-19.
- 15) Neves-Pereira M, Cheung JK, Pasdar A, Zhang F, Breen G, Yates P et al. BDNF gene is a risk factor for schizophrenia in a Scottish population. *Mol Psychiatry.* 2005; 10: 208-212.
- 16) Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G et al. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 579-593.
- 17) Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook EH Jr. Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 1698-1700.
- 18) Oswald P, Del-Favero J, Massat I, Souery D, Claes S, Van Broeckhoven C et al. Non-replication of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) association in bipolar affective disorder: a Belgian patient-control study. *Am J Med Genet* 2004; 129B: 34-35.
- 19) Skibinska M, Hauser J, Czerski PM, Leszczynska-Rodziewicz A, Kosmowska M, Kapelski P et al. Association analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism in schizophrenia and bipolar affective disorder. *World J Biol Psychiatry* 2004; 5: 215-220.
- 20) Hong CJ, Huo SJ, Yen FC, Tung CL, Pan GM, Tsai SJ. Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and mood disorders, age of onset and suicidal behavior. *Neuropsychobiology* 2003; 48: 186-189.
- 21) Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T et al. Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. *Neurosci Lett* 2003; 337: 17-20.
- 22) Aoyama M, Asai K, Shishikura T, Kawamoto T, Miyachi T, Yokoi T et al. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its