

- [25] Y.I. Sheline, P.W. Wang, M.H. Gado, J.G. Csernansky, M.W. Vannier, Hippocampal atrophy in recurrent major depression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 3908–3913.
- [26] A.C. Silva, C. Stevens, S. Tonegawa, Y. Wang, Deficient hippocampal long-term potentiation in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice, *Science* 257 (1992) 201–206.
- [27] J.D. Sweatt, The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory, *J. Neurochem.* 76 (2001) 1–10.
- [28] J. Takeda, H. Yano, S. Eng, G.I. Bell, A molecular inventory of human pancreatic islets: sequence analysis of 1000 cDNA clones, *Hum. Mol. Genet.* 2 (1993) 1793–1798.
- [29] H. van Praag, G. Kempermann, F.H. Gage, E. Gould, P. Tanapat, Running increase cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus, *Nat. Neurosci.* 2 (1999) 266–270.
- [30] E.A. Young, R.F. Haskett, V. Murphy-Weinberg, S.J. Watson, H. Akil, Loss of glucocorticoid fast feedback in depression, *Arch. Gen. Psychiatry* 48 (1991) 693–699.

マイクロアレイを用いた疾患感受性遺伝子の同定

山田和男¹⁾/岩山佳美¹⁾/吉川武男¹⁾

[SUMMARY] 疾患感受性遺伝子の同定においては、連鎖解析から高密度マーカーを用いた関連解析、または機能的候補遺伝子解析へと進む戦略がとられてきた。しかし複雑遺伝疾患の解析では、この方法には限界があり、全染色体領域について網羅的に関連解析(whole-genome association study; WGA)を行う必要性が論じられてきた。そして、それが近年のジェノタイピング技術の進歩とともに可能なものとなりつつある。本稿では、いくつかの大規模ジェノタイピング法、中でもマイクロアレイの出現によって疾患感受性遺伝子同定の手法がどう変わっていくか、その可能性と問題点について紹介する。〔臨床検査 49:509-515, 2005〕

[KEYWORDS] 複雑遺伝疾患, 疾患感受性遺伝子, SNP, 全染色体領域アソシエーション・マッピング

はじめに

糖尿病・高血圧・精神疾患などの発症には多くの罹患脆弱性遺伝子(疾患感受性遺伝子)とそれに環境要因などが加わった複雑な機構が存在すると考えられている。それゆえ、これらの疾患は多遺伝子性疾患(polygenic disease), 多因子疾患(multifactorial disease), 複雑遺伝疾患(complex disease)などとも呼ばれる。また、有病率が高いことから「ありふれた疾患(common disease)」とも呼ばれている。単一遺伝子疾患(メンデル型遺伝疾患)については、罹患率の低さなどから家系収集の困難さはあるものの、浸透率が高

く、また遺伝様式や遺伝子頻度の推定がしやすいことなどから、遺伝子同定に至る方法論はほぼ確立されている。一方、複雑遺伝疾患の遺伝学的解析では、罹患率が高いものの「疾患の異種性(heterogeneity)」, 「低浸透率(low penetrance)」などに起因する様々な困難が付きまとう。しかし、この数年の周辺技術の進歩はWGAという新たな戦略を可能とし、今後の展開が期待されている^{1,2)}。

疾患感受性遺伝子の同定

発病に関与する遺伝子を同定する手法としては、①機能的な面から遺伝子を探索するアプローチ(functional approach)と②遺伝子の染色体上での存在座位を探索するポジショナルなアプローチ(positional approach)などがある。機能的なアプローチについての詳細は他稿に譲るが、例えば、アフィメトリック(Affymetrix)社のHuman Genome U 133 Plus 2.0 Arrayでは47,000以上の転写産物を1枚のマイクロアレイで解析することが可能であり、包括的な全ゲノム発現プロファイリングを効率よく行うことができる。しかし、発現された転写産物は生体内で起きているネットワークとしての複雑な反応の結果であり、必ずしも原因遺伝子(疾患感受性遺伝子)の変化を直接示すものではない。また、複雑遺伝疾患では癌関連遺伝子の研究でしばしば見られるようなドラスティックな変化が個々の遺伝子発現でみられることも稀である。

1) YAMADA Kazuo, IWAYAMA Yoshimi, YOSHIKAWA Takeo
理化学研究所脳科学総合研究センター 分子精神科学研究チーム

一方、ポジショナルなアプローチでは、疾患の病態に対してなんら仮定を置かず、ただ染色体のどの座位にあるかという観点から遺伝子の特定を目ざす。遺伝子マーカーとしては主に一塩基多型(single nucleotide polymorphism ; SNP)が用いられる。ポジショナルなアプローチは連鎖解析(linkage study)と関連解析(association study)の2つに大別される。

全染色体領域アソシエーション・マッピングの可能性

家系集積性が低い、高齢発症である、個々の遺伝子効果が弱い、などの理由で連鎖解析での成功が望めない複雑遺伝疾患に対しては関連解析が重要な役割を果たすであろうことは予想されてき

た。しかし、1999年にKruglyakは「WGAを成功させるためには各サンプルに対して500,000 SNPsの解析が必要である」という膨大なジェノタイプを要求する試算を出した³⁾。この膨大なジェノタイプは従来の実験法では現実には実行困難なものであり、WGAに基づく戦略は研究室レベルでは到底不可能なものであった(2001年にReichらがNorth-European populationの連鎖不平衡のデータを元に出した比較的楽観的な試算でも55,000 SNPsの解析というものであった⁴⁾。したがって、500,000~1,000,000個以上の研究に適したSNPsの同定と、それを解析する大規模で効率の良い技術の開発が待たれてきた。

本稿執筆時点で、NCBI BUILD 124(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi)に登録されているレファレンス SNP は10,054,521

連鎖解析(Linkage study)

染色体は組換えを伴う減数分裂を経て両親から子供に伝達されるが、近傍に存在する対立遺伝子間では組換えを起こしにくく(組換え率 $\theta=0$)、離れるにつれて組換えを起こしやすくなる($0<\theta<0.5$)。したがって、両親の染色体上の疾患感受性遺伝子の近傍にある遺伝子多型(マーカー)は組換えの影響を受けずに子孫に伝達される確率が高い。この現象を連鎖(linkage)と呼び、罹患同胞では同じ多型が共有されやすく、健常同胞では共有されにくい。連鎖解析では組換えが独立に起きているかどうかを統計的に検定する。連鎖研究は家系内の組換えを前提とすることからある程度の範囲(10~30 cM)までしか座位の特定は行えず、より狭い領域まで疾患感受性座位を絞り込んでいくことには適さない。原因遺伝子に到達するには連鎖解析後に詳細な連鎖不平衡に基づくマッピング(関連解析)が求められる。

関連解析(Association study)

健常対照群に比して疾患群で特定の対立遺伝子が多く共有されている現象を関連(association)と呼び、対立遺伝子自体が病因に寄与しているかもしくは近傍の病因遺伝子と連鎖不平衡にある可能性を示唆する。関連研究の主な手法としては、①対立遺伝子の分布頻度を罹患者と一般健常者とで比較するものと、②対立遺伝子の両親から子孫への伝達の偏りを検討するものがある。前者は

case-control studyとも呼ばれ、後者としては伝達連鎖不平衡テスト(transmission disequilibrium test ; TDT)などがよく用いられる。関連研究では疾患感受性遺伝子のごく近傍(人種、染色体座位によって異なるが、50~100 kb程度)でしかシグナルが検出されない。そのため、検索には非常に多くのマーカーを必要とするが、もし検出されればそのまま遺伝子特定につながる可能性が高い。

連鎖不平衡 (linkage disequilibrium ; LD)

対立遺伝子群が互いに近傍に存在するために組換えを起こさずに世代を超えて受け継がれていき、統計的に強い関連を示す場合、それらは「連鎖不平衡にある」という(いずれ悠久の歴史を人類が経れば、非常に近い座位に存在する対立遺伝子群間でもやがて組換えが起こり、関連を失った「平衡状態に達する」であろうが、現在はまだ過渡的な「不平衡状態にある」と考える)。LDが保たれている領域をハプロタイプ・ブロックなどと呼ぶ。遺伝統計では、 D' 、 r^2 などの指標がよく用いられる。平均50~100 kb程度の距離と考えられ、仮に同一ブロック内に疾患感受性変異が存在すれば、その範囲内の対立遺伝子はいずれもマーカーとなりうる。各民族など遺伝的に均一な集団では血縁関係のない罹患者間でも同じ対立遺伝子が検出されると仮定する。

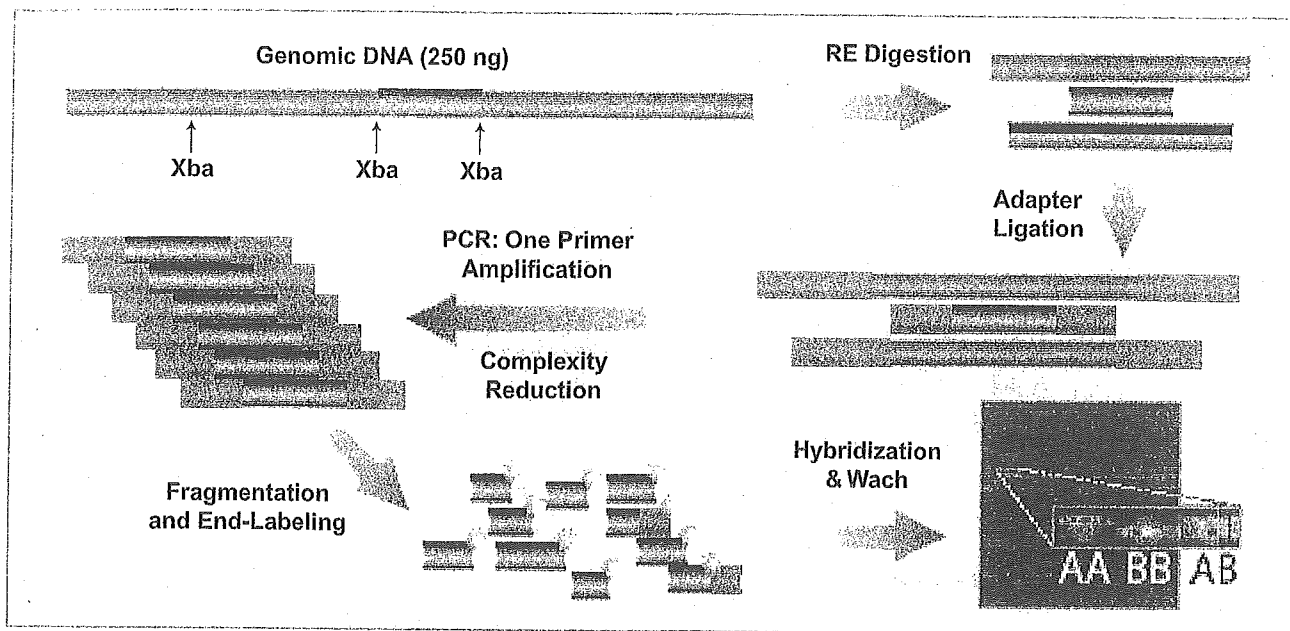


図1 GeneChip Mapping 100 K Array(アフィメトリックス社)の原理

個まで増え、そのなかで多型性が確認されたものが5,054,675個に及ぶ。そして、最新のアレイ技術はWGAを日常的に使用できる技術の1つに変えつつある。いよいよ機は熟し、WGAの時代となった。

■ SNP ジェノタイピング・サービスの最新技術

個々のSNPの大規模SNP解析システムとしては、MassArrayシステム(<http://www.hitachi-hitec.com/science/bio/snp.html>), TaqMan Assay (<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/home/index.jsp>)などがある。MassArrayシステムでは、MALDI-TOF質量分析計(Mass Spectrometer)を用いて1サンプルを2~3秒で解析可能であり、1日に1万ジェノタイピング以上のハイスループットが期待できる。また、TaqMan Assayでは、PCR増幅だけの1ステップで、標的SNPの対立遺伝子に蛍光プローブを標識し、その蛍光シグナルを検出する。PCR反応後、数分間で384サンプルプレートのシグナルが検出できる。TaqMan Assayでは疾患関連遺伝子探索用にデザインされた200万SNPsが利用可能であり、カスタムSNPsについても個々にオーダーすることができる。このほかにも様々なSNP検出法が考案されており、商

業的に利用可能である(Third Wave; <http://www.twt.com/>, Parallele; <http://www.parallelebio.com/>, Perlegen; <http://www.perlegen.com/>など)。しかし、これらは興味のある遺伝子領域のSNPを検出するという枠を出るものではない。ハイスループットとはいっても、これらの方法を用いてWGAを行うことは時間的・コスト的にも研究室レベルでは現実的ではない。しかし、アフィメトリックス社のGeneChip Mapping 10 K/100 K Array, イルミナ社のBeadArrayテクノロジーなどのチップテクノロジーはその研究環境を一変させるものである。ある程度の規模の予算があれば、一研究室でWGAを行うということが選択可能な戦略となりつつある。

1. GeneChip Mapping 100 K Array(アフィメトリックス社; <http://www.affymetrix.co.jp/>)

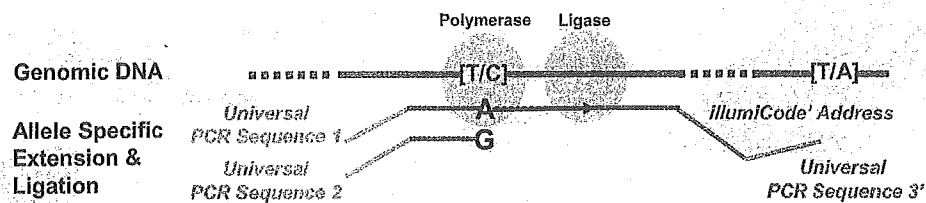
2004年7月、100,000 SNPsを網羅するGeneChip Mapping 100 K Arrayが発売され、初めてのWGAプラットフォームとなった。各SNPのジェノタイプを決定する原理は次のステップによる(図1)。

(1) 全ゲノムDNA(250 ng)を制限酵素(XbaIまたはHindIII)で切断する。

(2) 4塩基(bp)の特異的突出末端に対応するアダプターを結合(Adapter Ligation)する。短く切断されたすべてのDNA断片は両端に共通の配列をもつことになる。

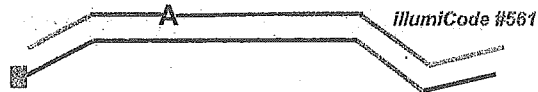
GoldenGate™ Assay

Allele Specific Extension and Ligation



Amplification

Amplification Template



PCR with Common Primers



Hybridization to Universal illumiCode™ Array

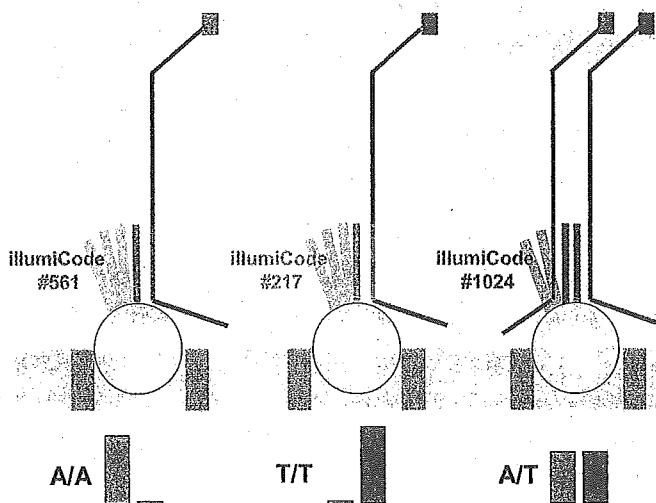


図2 BeadArray テクノロジー(イルミナ社)の原理

(3) アダプター配列を認識するプライマーを用いて、アダプターを付加した DNA フラグメントを増幅する。PCR 条件は、250~2,000 bp のサイズのフラグメントを優先的に増幅するように最適化されている (Complexity Reduction)。

(4) 増幅した DNA をアレイにハイブリダイズ

させるのに適した短いフラグメントに切断し (Fragmentation)、蛍光標識する (End-Labeling)。

(5) GeneChip Mapping 100 K Set アレイにハイブリダイズさせる (Hybridization & Wash)。

(6) 高解像度スキャナーでシグナルを読み取

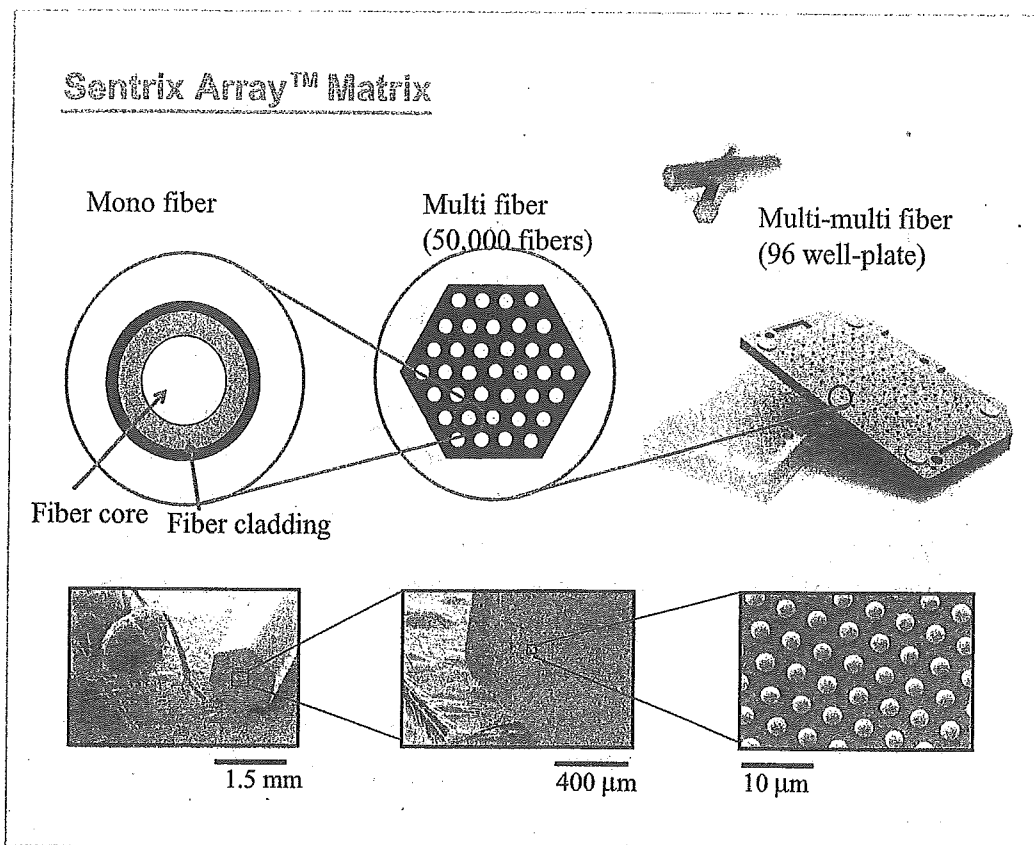


図2 つづき

り、ソフトウェアにより自動的にジェノタイプを決定する。

アフィメトリックス社の 100 K SNPChip は現在の疾患遺伝子検索の状況を一変させる可能性がある。従来のジェノタイピングと比べると、①労力の著しい軽減、②疾患感受性遺伝子に直接辿り着く可能性 (SNPs 間の平均距離が 23.6 kb)、③ 250 ng/sample という少量の DNA での実験、④ 正確性が高く、ジェノタイピングエラーに左右されにくい解析、などが利点として挙げられる。また、連鎖解析や癌抑制遺伝子の不活化の研究で用いられるヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; LOH) などの解析には、10,204 個の SNP が配置された GeneChip Mapping 10 K Array も利用可能である。アフィメトリックス社のニュースリリースでは 2005 年度中には 500 K Array の発売も予定しているという。Kruglyak が示唆した 500,000 SNPs による WGA が、いよいよ現実のものとなりつつある。

2. BeadArray テクノロジー (イルミナ社;
<http://www.illumina.com>)

現在発売されている Sentrix Array Matrix で

は、50,000 本の光ファイバーからなる 1 本の光ファイバー束上に個々の SNP を同定するための $3 \mu\text{m}$ のビーズが $6 \mu\text{m}$ 間隔で配置されている (図 2)。それぞれのビーズは illumicode と呼ばれる 1,620 種類のシーケンスオリゴタグのいずれかで修飾されている。ジェノタイピングの原理は、GoldenGate Assay と呼ばれ、次のようなステップからなる (図 2)。

(1) ゲノム DNA 上で対立遺伝子特異的に伸張反応を行い、両端に共通配列をもち、個々の対立遺伝子に illumicode 配列を付けたフラグメントを合成する (Allele Specific Extension and Ligation)。

(2) 両端の共通配列を用いて、蛍光標識したプライマーで PCR 反応を行う (Amplification)。

(3) アレイ上の相補的な illumicode をもつビーズと結合反応を行う (Hybridization to Universal IllumiCode Array)。

(4) 高密度スキャナーで蛍光シグナルを読み取り、ジェノタイピングを行う。

50,000 本の光ファイバーはいずれかの illumicode でランダムに修飾されており、各対立

遺伝子に対して平均 $50,000 \div 1,620 = 30.9$ 個のビーズが用意されることになる。この冗長性が正確なジェノタイピングを可能にしている。カスタムアレイでは1ウェル当たりユーザーが指定した1,536個のSNPが配置され、1アレイで96サンプルが一度に解析できる。連鎖解析用には5,861個のSNPsがプロットされたアレイセット(Linkage IV Panel)が用意されている。遺伝子のエクソン領域を中心に100,000 SNPを1枚のアレイに搭載したBeadArrayの発売が今春に予定されており、来年には1,000,000 SNPs Arrayも発売されるという。現時点ではカスタムメイドのハイスループット・SNPジェノタイピングとしては、最も稼動コストが安価なプラットフォームである。国際HapMapプロジェクト(<http://www.hapmap.org/>)では、およそ60%のジェノタイピングで使用されている。

全染色体領域アソシエーション・マッピングの問題点

チップテクノロジーによって膨大なジェノタイピングデータを手にすることが可能だとして、どのようなことが問題となるであろうか。最も大きな課題は、いかにしてそこから本当に疾患に関連するSNPを同定するかである。遺伝統計学的には次のような問題がよく議論される。

1. 多重検定の問題

通常、統計検定は有意水準5%あるいは1%を基準として行うことが多い。しかし、100,000個のSNPsについて独立な検定を行えば5,000個あるいは1,000個のSNPが偽陽性として検出されることが予想され、「多重検定の問題」といわれる。多重検定による偽陽性を補正するために、「Bonferroniの補正」、「False Discovery Rate (FDR)法」、「Holms-Sidak法」、「Permutation法」など、様々な方法が考案されている。しかし、WGAではいずれもかなり厳しい基準となる。期待できるP値はサンプル数と遺伝子の疾患に与える影響の強さによって決まる。「本当に関与しているのでP値が高くなる」というものではない。多重検定に対しての補正を行えば、影響の弱い遺伝子は多くの偽陽性の中に埋もれてし

まい、検出できなくなる。逆にある程度以上の効果をもつ遺伝子変異があれば、一網打尽に検出できる可能性もある。実際には、アソシエーション・マッピングは探索的な研究というべきものであり、得られた結果に様々なエビデンスを積み上げて蓋然性を獲得していく必要がある。

2. 集団の階層化

集団の階層化(研究対象の集団がいくつかの遺伝的に異なる集団の混合であることを指す)による偽陽性がよくcase-control studyでは問題になる。Devlin & RoederのGenomic Control法、PritchardらによるSTRUCTURE解析法、といった階層化によるバイアスを減らす方法が検討されている。しかし、どれだけのマーカーでどの程度の階層化が検出できるのかなど、現実的な適応には問題点も多い。一方、TDTなどのfamily-based methodsでは基本的には階層化の問題を回避することが出来るが、十分な検出力をもつtriad(両親と罹患者の3人からなる家系解析単位)のサンプル収集は容易ではない。

3. 集団遺伝学的・系統発生的検討

民族・集団が異なると、SNP頻度・連鎖不平衡マップが異なる。また、複雑遺伝疾患では関与する対立遺伝子の異種性(allelic heterogeneity)や座位の異種性(locus heterogeneity)などが相互に影響を与える可能性もある。最終的には数多くの集団を詳細に調べて、集団遺伝学的・系統発生的検討を行っていく必要がある。

今後の展望

本稿作成中に、Affymetrix GeneChip Mapping 100 K Arrayを使用した初めての疾患感受性遺伝子同定の論文が出された⁵⁾。96人の患者と50人の健常対照者の解析で、全染色体領域から原因遺伝子がピンポイントで検出されている。この疾患では影響(オッズ比)が比較的強い遺伝子が存在したことが成功の最も大きな要因ではあるが、今後これに続く成果が多く疾患で得られることを期待している。また、いうまでもないことながら、疾患研究は患者・家族・臨床医、そして社会全体の理解と協力のもとに進められていくものであり、近い将来に研究が還元されていくこと

を願うものである。

謝辞 本稿作成に当たり、以下の方々には多大なご協力をいただきました。ここに氏名を掲げて謝意を表します(敬称略)。

板倉智敏(理化学研究所脳科学総合研究センター・リサーチリソースセンター)、福本恵介(同)、細田英明(アフイメトリクスジャパン株式会社)、Michael Paumen(同)、藤田裕治(同)、浅岡広彰(イルミナ株式会社)。

文 献

- 1) Hirschhorn JN, Daly MJ : Genome-wide association studies for common diseases and complex

traits. Nat Rev Genet 6 : 95-108, 2005

- 2) Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, et al : Genome-wide association studies ; theoretical and practical concerns. Nat Rev Genet 6 : 109-118, 2005
- 3) Kruglyak L : Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. Nat Genet 22 : 139-144, 1999
- 4) Reich DE, Cargill M, Bolik S, et al : Linkage disequilibrium in the human genome. Nature 411 : 199-204, 2001
- 5) Klein RJ, Zeiss C, Emily Y, et al : Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration 10.1126/science. 1109557 (Science Express Research Articles)

お知らせ

お知らせ

平成 17 年度公益信託臨床検査医学研究振興基金 研究奨励金授与候補者の応募要項

目 的

本基金は臨床検査医学(臨床病理学, 臨床検査診断学, 検査診断学, 病態検査学等)および臨床検査分野において活躍し, 学術的貢献の期待が大きいと認められる若手研究者に研究奨励金を贈り, 将来に向けて若手研究者を育成することを目的といたしております。

対 象

臨床検査医学(臨床病理学, 臨床検査診断学, 検査診断学, 病態検査学等)および臨床検査分野に関する研究のうち, 本基金の目的に合致するもの。

応募資格

研究奨励金授与候補者は, 以下のいずれかに該当しない研究者とします。

- (1) 応募締切日において年齢 50 歳以上の方
- (2) 教授, 病院・研究所等の部長職以上にある方
- (3) 過年度において当基金(振興会合)の研究奨励金を受けられた方

助成金額 1 件 100 万円以内

推薦方法

推薦者は別紙所定の用紙に候補者名と, 詳細な履歴, 研究分野, 研究題目, 研究内容と推薦理由等必要事項をご記入のうえ, 本基金事務局宛送付願います。

締 切 日 平成 17(2005)年 6 月 30 日必着

選考方法

本基金の運営委員会が委嘱した選考委員会において選考のうえ, 運営委員会で決定します。

研究奨励金の贈呈

平成 18(2007)年 2 月の予定

推薦書送付先

〒103-8670 東京都中央区八重洲 1-2-1

みずほ信託銀行株式会社

プライベートバンキング企画部福祉信託係

公益信託 臨床検査医学研究振興基金

☎ 03-3274-9210 FAX 03-3274-9504

- (注) 1. 研究奨励金は贈呈後の 1 年間に使用することを原則とします。
2. 当研究奨励金の受領者に対しては, 研究成果報告書(経過と結果)および奨励金の使用状況についての収支報告書(証拠書類を付けて)を求めるほか, 特に条件はつけません。しかし, 研究終了時にはしかるべき専門誌に研究成果を発表していただくことといたします。
- なお, 発表する際は“公益信託臨床検査医学研究振興基金より研究奨励金を授与された研究である”旨を表記していただきます。
3. 応募に際しては, 代表研究者が, 当該研究が行われる主たる大学・研究所等の施設長又は機関長から, この研究奨励金を申し込むことについての承諾を必ず得てください。

公益信託臨床検査医学研究振興基金

Charitable Trust Laboratory Medicine Research Foundation of Japan

信託管理人 河合 忠

運営委員長 中原 一彦

精神疾患感受性候補遺伝子 IMPA2 の機能解析

大西哲生* 大羽尚子*
 佐藤友美** Sung-Kee Chung***
 平林義男**** 山田和男*
 茂野佳美* 古市貞一**
 吉川武男*

抄録：IMPA2 (inositol monophosphatase 2) は、統合失調症、躁うつ病、小児熱性けいれんの発症脆弱性関連領域 18p11.2 に存在するが、その遺伝子産物の機能は全く不明である。IMPA2 には、構造的に極めて近縁なタンパク質をコードする IMPA1 が存在する。そこで、本研究では IMPA1 と IMPA2 遺伝子産物の機能を比較検討した。IMPA2 とその近縁分子 IMPA1 はマウス脳において特徴的な発現パターンを示した。IMPA2 は IMPA1 と比較すると極めて低効率ではあるが、inositol monophosphate をマグネシウム依存的に脱リン酸化する活性を示した。IMPA1 は以前より気分安定薬リチウムの標的酵素の候補と考えられてきたが、IMPA2 は通常の条件でのリチウムによる阻害は限定的であった。以上の結果より、IMPA2 は IMPA1 とは異なる特異的な機能を果たしていると考えられた。

精神薬療研究年報 第37集：42～48, 2005

Key words : bipolar disorder, inositol monophosphatase, IMPA1, IMPA2, lithium

はじめに

躁うつ病、統合失調症においては、その発症には環境因子に加え、遺伝的背景の影響が強いことが知られてきた。我々は精力的に患者 DNA サンプルの収集を進め、遺伝解析によって染色体上の責任領域の同定を行ってきた。染色体 18p11.2 は、躁うつ病、統合失調症において我々が注目してきた領域であるが、実際の責任遺伝子の同定には至っていない。この領域には、我々が有力な候補遺伝子として新規に同定した IMPA2 (myo-inositol

monophosphatase 2) が存在している¹⁾。IMPA2 とは別に、myo-inositol (1 or 4) monophosphate を脱リン酸化し、気分安定薬リチウムの治療濃度によって阻害されることから、リチウムの標的、あるいは病態そのものに関連すると考えられてきた分子として IMPA1 がある。しかしながら、遺伝解析では IMPA1 の躁うつ病への関連は否定¹⁰⁾されている。IMPA2 については、躁うつ病に加え統合失調症においても遺伝統計学的な関連がある¹²⁾ことを我々は示した。他グループからも、アラブ人躁うつ病患者で関連を示す結果⁹⁾が発表されてい

* 理化学研究所脳科学総合研究センター 分子精神科学研究チーム；〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1,

** 理化学研究所脳科学総合研究センター 分子神経形成研究チーム；〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1,

*** Pohang 科学技術大学 (韓国)；〒790-784 韓国ポハン市, **** 理化学研究所脳科学総合研究センター 平林研究ユニット；〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

* Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-City, Saitama 351-0198, Japan. ** Laboratory for Molecular Neurogenesis, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-City, Saitama 351-0198, Japan. *** Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, South Korea. **** Hirabayashi Research Unit, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-City, Saitama 351-0198, Japan.

る。我々は死後脳を用いた解析では、IMPA2 mRNA が躁うつ病において有意に増加していることも見いだしている（未発表データ）。IMPA2 の躁うつ病との遺伝統計学的関連については否定的なデータもある。一方で、IMPA2 は小児の熱性けいれんの遺伝学的疾患脆弱性規定因子の一つである可能性⁹が最近示された。このように躁うつ病をはじめとするいくつかの疾患への関与が疑われるにもかかわらず、この遺伝子産物の酵素タンパク質としての基本的な characterization は従来全くなされておらず、酵素活性の有無さえ不明であった。

そこで本研究においては、主に IMPA2 の生化学的な性質について IMPA1 と比較検討することとした。

方 法

In situ hybridization

マウス（生後7日）脳における IMPA1,2 の転写産物の局在の検討は、*Sadakata* らの方法⁹に基づいて行った。pBluescript KS にマウス IMPA1 もしくは IMPA2 cDNA のほぼ全長を組み込み、T7 もしくは T3 ポリメラーゼにより antisense または sense プローブを合成した。

プラスミドと培養細胞

ヒト IMPA1 および IMPA2 cDNA を HA タグタンパク質発現ベクター SR-HA¹²⁰ベクターのクローニング部位に挿入した（SR-HA-IMPA1, SR-HA-IMPA2）。これらのプラスミドをもとに、IMPA1, IMPA2 の1アミノ酸置換（Asp → Asn）変異体を発現するプラスミド（SR-HA IMPA1 DN, SR-HA-IMPA2 DN）を常法により作成した。同様にして V5 タグ付加 IMPA 発現プラスミド V5-IMPA1, IMPA2 も作成した。

ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293T 細胞は、DMEM/10% fetal calf serum 中で常法により培養した。遺伝子導入の前日に細胞を再播種し、翌日リン酸カルシウム法により遺伝子導入を行った。免疫沈降実験においては6 cm dish 一枚、組み替えタンパク質を精製するためには各プラスミドを10 cm dish 15枚のスケールで行った。遺伝子導入48時間後に細胞を回収し、その後免疫沈降実験も

しくは組み替えタンパク質の精製実験に用いた。

免疫沈降による IMPA 複合体解析

Yamashita, Ohnishi らの方法^{9,11}に基づいて HA タグタンパク質の免疫沈降実験を行った。SR-HA-IMPA1, SR-HA-IMPA2 もしくは空ベクター（SR-HA）遺伝子導入により十分遺伝子発現が誘導された細胞を回収して、lysis buffer F（200 μ l/6 cm dish）に懸濁し、超音波処理で細胞を破碎した。15000 rpm, 4°C, 15 min の遠心処理により得た上清を免疫沈降実験に用いた。HA affinity matrix（Roche）による免疫沈降物を lysis buffer でよく洗浄したあと、2xSDS sample buffer 中で100°C, 3min 処理して電気泳動サンプルとした。SDS-PAGE, PVDF 膜に転写後、抗 HA 抗体（Roche）、抗 V5 抗体（Invitrogen）、抗 IMPA1 抗体、抗 IMPA2 抗体のいずれかで、ECL（Amersham Bioscience）による Western blot 法で検出した。

組み替えタンパク質の精製

一過性遺伝子導入 HEK293T 細胞からの組み替えタンパク質の産生についての詳細は、*Yamashita, Ohnishi* らの文献^{9,11}を参照されたい。簡単には lysis buffer 中に回収した細胞を懸濁し、超音波処理で細胞を破碎した後、バッチ法により HA-affinity matrix（Roche）に HA タグ付加タンパク質の吸着を行った。計6回の洗浄に引き続き、HA peptide（Roche）を添加し、37°C で incubate することにより HA 付加タンパク質を特異的に上清に回収した（Elution 1）。この溶出操作をもう一度繰り返し（Elution 2）、Elution 1,2 とともに終濃度 25% になるよう glycerol を添加した後、使用時まで -80°C で保管した。組み替えタンパク質の精製度は、SDS-PAGE に続く銀染色、抗 HA, IMPA1 もしくは IMPA2 特異的抗体での Western blot 解析により評価した。

酵素活性の測定

一部のイノシトールリン酸は化学合成^{9,11}した。他の多くのものは和光純薬、ナカライテスク、Alexis, Calbiochem, Sigma 等から購入した。酵素活性の測定には、50 mM Tris-HCl pH8.0, 0.1 mM EGTA, 1 mM の基質および 0 ~ 5 mM MgCl₂ 存在下 37°C で保温し、遊離する無機リン酸を Biomol Green 試薬（Biomol Reseach Lab.）により比色定

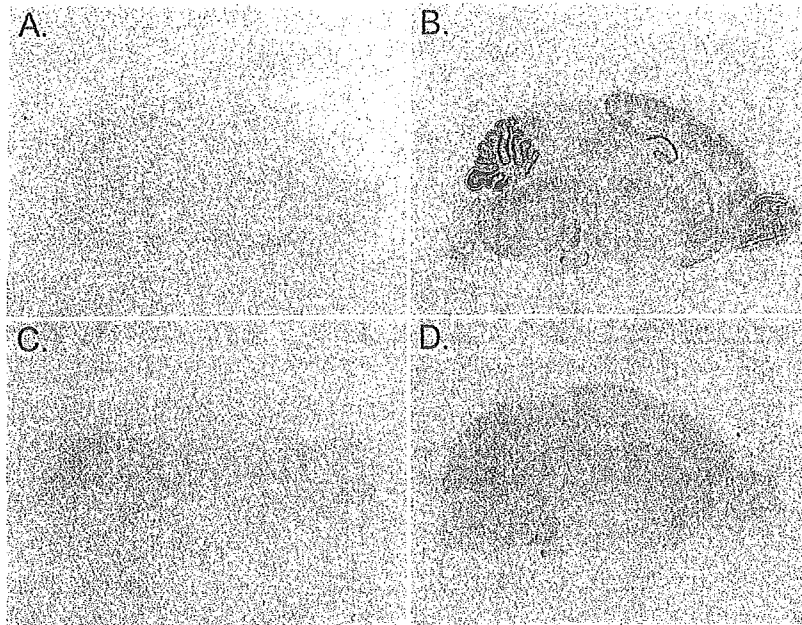


Fig. 1 Distribution of IMPA transcripts in mouse brain
Whole brain sections (sagittal, P7) were stained with IMPA1 sense (A), IMPA1 antisense (B), IMPA2 sense (C) or IMPA2 antisense (D) probes.

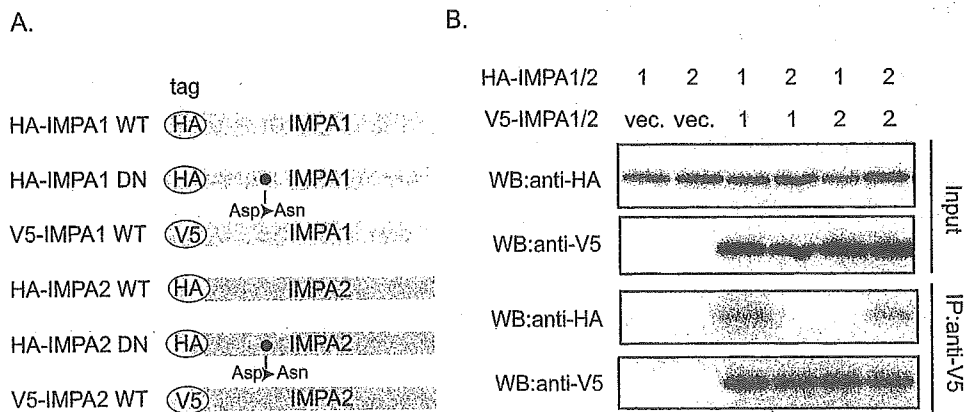


Fig. 2 Complex formation between IMPA1 and IMPA2
(A) A diagram showing the V5 or HA-tagged IMPA proteins used in this study. In IMPA1 DN and IMPA2 DN, an aspartate residue conserved between IMPA1 and IMPA2 and essential for the enzymatic activity, was mutated to asparagine. (B) HEK293T cells were transfected with either HA-IMPAs and V5-IMPAs or empty vector (vec.) as shown. Input (upper two panels) and immunoprecipitate (lower two panels) by V5 antibody were subjected to western blot analysis using HA or V5 antibodies.

量することで活性を評価した。遊離無機リン酸の絶対量は、リン酸カリウムによる標準曲線から計算した。

結 果

IMPA 遺伝子転写産物の脳内分布

IMPA1,2 の遺伝子発現が脳内で見られること

は、いくつかの報告で明らかになっているが、その詳細な発現パターンについての情報は全く存在しない。我々は、脳内にどのように IMPA 転写産物が分布しているのかを生後7日のマウスを使った *in situ* hybridization により検討した。Fig. 1 にあるように、IMPA1,2 の大まかな発現パターンは極めて似ており、ともに全脳で広く発現するこ

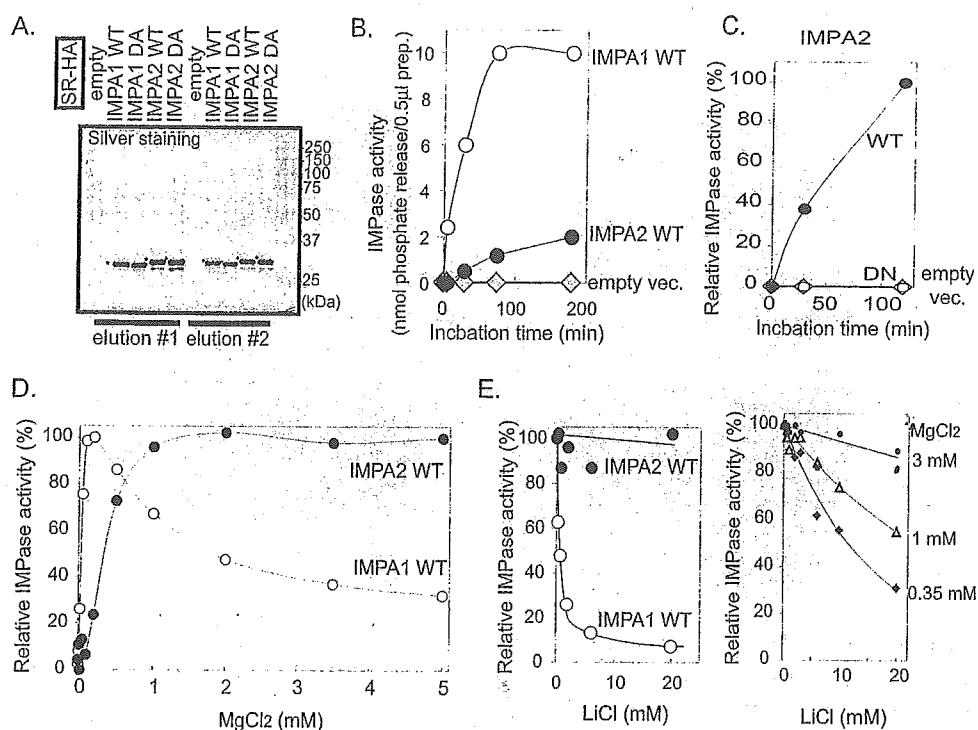


Fig. 3 Enzymatic characterization of IMPA2

(A) Recombinant IMPA1 and IMPA2 were analyzed by SDS-PAGE and silver staining. (B) Inositol 1-monophosphatase activity with IMPA1 WT, IMPA2 WT and vector preparation were tested. (C) Inositol 1-monophosphatase activity was tested with IMPA2 WT, IMPA2 DA and vector preparation. (D) Inositol 1-monophosphatase activity of IMPA1 WT and IMPA2 WT preparation in various concentrations of magnesium chloride were tested. (E) Relative inositol 1-monophosphatase activity of IMPA1 WT and IMPA2 WT preparation were tested in various concentrations of lithium chloride, in the presence of 2mM (left), and 0.35, 1 or 3 mM (right) of magnesium chloride.

とが判明した。一方で、小脳の層構造などで特徴的な発現パターンの違いが認められた。

IMPA2の複合体形成能

IMPA1はホモダイマーを形成することが報告されている⁷⁾。一方で、*in situ* hybridizationの結果より、IMPA1とIMPA2転写産物の脳内分布は極めて類似している。そこで我々はIMPA2が、IMPA1と同様ホモダイマーを形成する能力があるのかとともに、IMPA1とヘテロダイマーを形成して機能分子を形成する可能性があるのかを検討した。そのために、V5-IMPA1, V5-IMPA2, HA-IMPA1, HA-IMPA2を発現するプラスミドを構築し、V5-IMPAとHA-IMPAの組み合わせでHEK293T細胞に同時に発現させ、抗V5抗体による免疫沈降物中に含まれるHA-IMPAタンパク質の有無をWestern blotにより解析した(Fig. 2)。この結果でもIMPA1同士での共免疫沈降は認められ、これ

はIMPA1のホモダイマー形成能を反映したものと考えられる。IMPA2同士の共沈降も認められたが、IMPA1-IMPA2複合体は検出されなかった。従って、IMPA2はIMPA1と同様ホモ複合体を形成するが、細胞内ではIMPA1とヘテロダイマーを形成しないのではないかと考えられる。

IMPA2の酵素活性

組み替えタンパク質はIMPA1, IMPA2とも高い精製度を示し、遺伝子導入293T細胞からほぼ同じ収量を得た(Fig. 3A)。cDNAが挿入されていないvector(empty)も同様にtransfectionし、精製の操作を行いコントロールサンプルとした。また、IMPA1およびIMPA2組み替えタンパク質中には、それぞれIMPA2, IMPA1タンパク質は検出されないことを特異抗体によるWestern blotで確認した(data not shown)。IMPA1は、イノシール1リン酸の中でもinositol 1-phosphate (I 1-

Table 1 Substrate specificity of IMPA1 and IMPA2
Summary of the dephosphorylation efficiency of IMPA1 and IMPA2 towards various substrates. None of the compounds show an equivalent efficiency in IMPA2 preparations comparable to IMPA1 preparations.

	compound	IMPA1	IMPA2		compound	IMPA1	IMPA2
IP ₁	Inositol 1-P	+++++++	+	IP ₄	Inositol 1,2,3,6-P ₄	-	-
	Inositol 2-P	-	-		Inositol 1,2,5,6-P ₄	-	-
	Inositol 4-P	+++++++	++		Inositol 1,3,4,5-P ₄	-	-
IP ₂	Inositol 1,4-P ₂	++	++	Inositol 1,3,5,6-P ₄	-	-	
	Inositol 1,5-P ₂	+/-	-	Inositol 1,3,4,6-P ₄	-	-	
	Inositol 3,4-P ₂	-	-	Inositol 1,4,5,6-P ₄	-	-	
	Inositol 4,5-P ₂	+	-	Inositol 3,4,5,6-P ₄	-	-	
IP ₃	Inositol 1,2,3-P ₃	-	-	IP ₅	Inositol 1,3,4,5,6-P ₅	-	-
	Inositol 1,2,6-P ₃	-	-		Inositol 1,2,3,4,5-P ₅	-	-
	Inositol 1,3,4-P ₃	-	-	IP ₆	Inositol 1,2,3,4,5,6-P ₆	-	-
	Inositol 1,3,5-P ₃	-	-		Gluc.-P	Glucose 1-P	++++
	Inositol 1,3,6-P ₃	-	-	Glucose 6-P		++	-
	Inositol 1,4,5-P ₃	-	-	Fruc.-P	Fructose 1-P	++	-
	Inositol 1,4,6-P ₃	-	-		Fructose 6-P	++	-
	Inositol 1,5,6-P ₃	-	-	others	Fructose 1,6-P ₂	+	-
	Inositol 2,4,5-P ₃	-	-		β -glycero-phos.	+++++	++
Inositol 3,4,5-P ₃	-	-	2'-AMP	+++++	++		

P) や inositol 4-phosphate (I 4-P) を効率よく脱リン酸化することが知られていること, IMPA2 は IMPA1 と高い相同性 (アミノ酸レベルで > 53%) を示すことから, まず組み替え IMPA2 タンパク質の I 1-P 脱リン酸化活性を検討した. IMPA2 には, IMPA1 と比較すると弱いながらも活性が認められた (Fig. 3B). IMPA1 において活性に必須であるアスパラギン酸が同定されているが, このアミノ酸は IMPA2 でも保存されている. IMPA2 のこの部位の変異体 (IMPA2 DN) 組み替え体は全く活性を示さない (Fig. 3C) ことから, IMPA2 が示す活性は, 混入する何らかの脱リン酸化酵素によるものではなく, 確かに IMPA2 そのものの活性を反映するものであると結論した. 続いて I 1-P を用いてマグネシウムの感受性を検討した. IMPA2 は IMPA1 と同様マグネシウムイオン非存在下では全く活性を示さなかった. しかし濃度依存性は全く異なり, IMPA2 はより高濃度のマグネシウムを要求すること, IMPA1 が示す高濃度マグネシウム領域での酵素活性の抑制が見られないという特徴が

あった.

気分安定薬リチウムは IMPase を阻害し, 酵素産物であるイノシトールを細胞内から枯渇させることで薬効を発揮するとする “inositol depletion” 仮説²⁾は現在でも有力である. いままでの報告と同じく, 我々が動物培養細胞から精製した組み替え IMPA1 も, 治療濃度のリチウムにより顕著に阻害された ($IC_{50} = \sim 0.6$ mM). 一方で, IMPA2 は 20 mM リチウムの存在下でもほとんど阻害されなかった (Fig. 3D). 低マグネシウム濃度の条件下では, 弱い阻害活性が認められた (マグネシウム濃度 0.35 mM で $IC_{50} = \sim 13$ mM) (Fig. 3E).

IMPA2 の I 1-P に対する酵素活性は, IMPA1 と比較すれば極めて弱い (比活性で $\sim 1/50$) ことから, 我々は IMPA2 は IMPA1 とは異なる基質に対するスペクトラムを示すのではないかと考え, 各種イノシトールリン酸を初め, 多くの基質候補をスクリーニングした. Table 1 に示したように, 調べた 34 種の化合物の中には, IMPA1 が I 1-P を脱リン酸化するのと同様かそれ以上の効率で

IMPA2が脱リン酸化するものは発見できず、IMPA1が脱リン酸化するものに対して弱い活性を示すものがあった。ただ一つの例外は、I 1,4-P₂であり、IMPA2の脱リン酸化効率もIMPA1を用いた場合と同等であり、I 1-Pより効率良く脱リン酸化した。またイノシトールポリリン酸 (IP₃, IP₄, IP₅, IP₆) の中には、IMPA2により脱リン酸化されるものは見つからず、グルコース1リン酸 (Gluc.1-P), β -glycerophosphate, 2'-AMPなどIMPA1で脱リン酸化活性が報告されていた物質を弱く脱リン酸化した。

考 察

我々は本研究においてIMPA2が脱リン酸化酵素としての活性を持つことを初めて実験的に示した。IMPA2がリチウムの一次標的分子となり得るのかは非常に興味深い。I 1-Pを基質とした場合、マグネシウム濃度が極端に低い条件下では弱くリチウムにより阻害されるもの、生理学的マグネシウム濃度条件下 (約1 mM) では、治療濃度のリチウムでは阻害が限局的であることが今回の研究で明らかになった。最近、躁うつ病患者全体で見た場合の関連はないが、リチウムによる治療反応性がIMPA2の遺伝子多型と関連しているとする報告²⁾や、IMPA2のプロモーター活性がリチウムにより抑制されることを培養細胞レベルで示す報告が相次いだ。我々の予備的な検討では、死後脳 (BA46) においてIMPA2 mRNAが対照群と比較して有意に上昇している (data not shown)。

IMPA2はいくつかの基質に対して酵素活性を示すが、IMPA1が示す活性と比較すると極めて弱い。これは、IMPA2の至適条件 (たとえば金属イオン要求性、至適pH、至適塩濃度、未知のcofactorなど) がIMPA1とは全く異なるためである可能性があるが、我々はIMPA2はIMPA1とは異なる未知の物質が真の生理基質ではないかと考え、現在精力的に検索している。I 3-P, I 5-P, I 6-Pなどのイノシトールモノリン酸には特に興味を持たれる。

リチウムイオンのIMPA1に対する作用機序は、基質-酵素複合体への相互作用によると言われており、実際リチウムの阻害効果は基質によって多少異なる挙動を示す。この観点からリチウムのIMPA2に

対する影響に関しても、真の生理基質を用いた検証が必要になるであろう。今後はこのような生化学的、酵素学的検討に加え、遺伝子改変動物、患者死後脳などを用いた多面的な解析を通じて、IMPA2と躁うつ病をはじめ各種疾患との関連を検討していく必要がある。

文 献

- 1) Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Neutral and developmental activations of lithium: a unifying hypothesis. *Cell*, 1989; 59: 411-9.
- 2) Dimitrova A, Milanova V, Krastev S, Nikolov I, Toncheva D, Owen MJ, Kirov G. Association study of myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2) polymorphisms with bipolar affective disorder and response to lithium treatment. *Pharmacogenomics J*, 2004; 1-7.
- 3) Kwon YU, Im J, Choi G, Kim YS, Choi KY, Chung SK. Synthesis of three enantiomeric pairs of scyllo-inositol phosphate and molecular interactions between all possible regioisomers of scyllo-inositol phosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003; 13: 2981-4.
- 4) Kwon YU, Lee C, Chung SK. Facile syntheses of all possible diastereomers of conduritol and various derivatives of inositol stereoisomers in high enantiopurity from myo-inositol. *J Org Chem*, 2002; 67: 3327-38.
- 5) Nakayama J, Yamamoto N, Hamano K, Iwasaki N, Ohta M, Nakahara S, Matsui A, Noguchi E, Arinami T. Linkage and association of febrile seizures to the IMPA2 gene on human chromosome 18. *Neurology*, 2004; 63: 1803-7.
- 6) Ohnishi T, Yamashita A, Kashima I, Schell T, Anders KR, Grimson A, Hachiya T, Hentze MW, Anderson P, Ohno S. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol Cell*, 2003; 12: 1187-200.
- 7) Parthasarathy L, Vadnal RE, Ramesh TG, Shyamaladevi CS, Parthasarathy R. Myo-inositol monophosphatase from rat testes: purification and properties. *Arch Biochem Biophys*, 1993; 304: 94-101.
- 8) Sadakata T, Mizoguchi A, Sato Y, Katoh-Semba R, Fukuda M, Mikoshiba K, Furuichi T. The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. *J*

- Neurosci, 2004 ; 43 : 43 - 53.
- 9) Seelan RS, Parthasarathy LK, Parthasarathy RN. Lithium modulation of the human inositol monophosphatase 2 (IMPA2) promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004 ; 324 : 1370 - 8.
- 10) Sjöholt G, Ebstein RP, Lie RT, Berle JO, Mallet J, Deleuze JF, Levinson DF, Laurent C, Mujahed M, Bannoura I, Murad I, Molven A, and Steen VM. Examination of IMPA1 and IMPA2 genes in manic-depressive patients : association between IMPA2 promoter polymorphisms and bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 2004 ; 9 : 621 - 9.
- 11) Yamashita A, Ohnishi T, Kashima I, Taya Y, Ohno S. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of non-sense-mediated mRNA decay. *Genes & Dev*, 2001 ; 15 : 2215 - 28.
- 12) Yoshikawa T, Kikuchi M, Saito K, Watanabe A, Yamada K, Shibuya H, Nankai M, Kurumaji A, Hattori E, Ishiguro H, Shimizu H, Okubo Y, Toru M, Detera-Wadleigh SD. Evidence for association of the myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2) gene with schizophrenia in Japanese samples. *Mol Psychiatry*, 2001 ; 6 : 202 - 10.
- 13) Yoshikawa T, Padigaru M, Karkera JD, Sharma M, Berrettini WH, Esterling LE, Detera-Wadleigh SD. Genomic structure and novel variants of myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2). *Mol Psychiatry*, 2000 ; 5 : 165 - 71.
- 14) Yoshikawa T, Turner G, Esterling LE, Sanders AR, Detera-Wadleigh SD. A novel human myo-inositol monophosphatase gene, IMP.18p, maps to a susceptibility region for bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 1997 ; 2 : 393 - 7.

ABSTRACT

Functional analysis of the IMPA2 gene product

Tetsuo Ohnishi*, Hisako Ohba*, Tomomi Sato**, Sung-Kee Chung***, Yoshio Hirabayashi****, Kazuo Yamada*, Yoshimi Shigeno*, Teiichi Furuichi**, Takeo Yoshikawa*

*Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-City, Saitama 351-0198, Japan. **Laboratory for Molecular Neurogenesis, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-City, Saitama 351-0198, Japan. ***Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, South Korea. ****Hirabayashi Research Unit, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-City, Saitama 351-0198, Japan.

IMPase (inositol monophosphatase) represents one possible target for the mood stabilizer, lithium. The IMPA1 gene codes for this enzyme, and it has a close homologue, IMPA2. IMPA2 is a suggested susceptibility gene for mental disorders such as bipolar disease and schizophrenia, however, little is known about its function.

In this study, we performed functional analyses of the IMPA2 gene product. *In situ* hybridization revealed that IMPA1 and IMPA2 transcripts have an overlapping expression pattern with characteristic differences in mouse brains. *In vivo*, recombinant IMPA2 forms a complex with itself, but not with IMPA1, suggesting that the IMPA2 homodimer but not the IMPA1/IMPA2 heterodimer may be present under physiological conditions. Next, we examined the enzymatic character of recombinant IMPA2. IMPA2 has a weak but apparent inositol monophosphatase activity, with a requirement for magnesium different to that of IMPA1. We are currently trying to identify specific substrates for IMPA2, but none tested so far are efficiently dephosphorylated by the recombinant enzyme. In summary, IMPA2 plays a functional role independent of IMPA1 *in vivo*.

(Ann. Rep. Mitsubishi Pharma Res. Found. 2005, 37 : 42 ~ 48)

統合失調症の治療抵抗性・難治性に関与する 候補遺伝子研究

糸川昌成^{*,**} 新井 誠^{*}
 古川愛造^{*} 小幡 菜々子^{*}
 柴田伸江^{*} 佐藤加奈^{*}
 太郎良久美^{*} 吉田有希^{*}
 氏家 寛^{***} 曾良一郎^{****}
 吉川武男^{**}

抄録：NCAM1 遺伝子の多型が解体型統合失調症と関連することを昨年度報告した。また抗精神病薬の代謝酵素である CYP2D6 の *5, *10 多型は、酵素活性を低下させるアジア人で代表的な多型であり、抗精神病薬の反応性に影響することが示唆されている。長期予後・治療抵抗性の観点から NCAM1 遺伝子の多型と CYP2D6 の *5, *10 多型と臨床像の関連を 121 例の症状固定した長期入院の統合失調症において検討した。CYP2D6 の genotype と維持投薬量、PANSS の間に関連は認められなかった。NCAM1 遺伝子の IVS6 + 32T > C において、risk allele C を持つ患者は持たない患者より維持投薬量が多く、PANSS が高い傾向が認められた。IVS6 + 32T > C の risk allele C を持つ患者において、維持投薬量と PANSS の間に有意な正の相関が認められ (Spearman $\rho = 0.33$, $P = 0.02$)、特に女性患者で強い相関が認められた (Spearman $\rho = 0.62$, $P = 0.002$)。

精神薬療研究年報 第37集：116～120, 2005

Key words : NCAM, CYP2D6, Non-responder, Polymorphism, Treatment-resistant

はじめに

統合失調症の薬物療法も 50 年を過ぎ、治療抵抗性の問題が統合失調症治療の課題として残され、その解明と治療法の開発が待たれている。Kane ら^① の治療抵抗性の基準 (2 系統・3 種以上の薬剤を chlorpromazine 換算 1000 mg/日投与して 6 週間

にわたり症状に改善がないもの) によれば、統合失調症の 13～22% が治療抵抗性であると報告されている。わが国でも、29% が治療抵抗性との報告があり^②、治療抵抗性の病態解明は統合失調症の薬物療法における看過出来ない課題である。われわれは、NCAM1 遺伝子の多型が解体型統合失調症と関連し、リスクアレルを持つ患者が PANSS

* 東京都精神医学総合研究所 統合失調症研究部門；〒156-8585 東京都世田谷区上北沢 2-1-8, ** 理化学研究所 分子精神科学研究チーム；〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1, *** 岡山大学大学院医歯学総合研究科 精神神経病態学教室；〒700-8530 岡山県岡山市鹿田町 2-5-1, **** 東北大学大学院医学系研究科 神経科学講座精神神経生物学分野；〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1

* Department of Schizophrenia Research, Tokyo Institute of Psychiatry, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan. ** Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-city, Saitama 351-0198, Japan. *** Department of Neuropsychiatry, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama-city, Okayama 700-8558, Japan. **** Department of Neuroscience, Division of Psychobiology, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai-city, Miyagi 980-8574, Japan.

で評価された陰性症状の複数の項目で有意に高い点を示したことを昨年度報告した。NCAMが統合失調症のリスクファクターであるだけでなく、慢性転帰に関与することが示唆されたことから、長期予後・治療抵抗性の観点から解析を行った。また抗精神病薬の代謝酵素であるCYP2D6の*5,*10多型は、酵素活性を低下させるアジア人で代表的な多型であり³⁾、抗精神病薬の反応性に影響する可能性が考えられることから*5,*10と精神症状、投薬量の関連を検討した。

対象と方法

対象は、DSM-IVで統合失調症と診断された121例(男性51例,女性70例,平均年齢51.5±11.4歳)。平均罹病期間は26.3±13.2年であり、慢性期の長期入院患者である。なお本研究は、東京都精神医学総合研究所、都立松沢病院の倫理委員会の承認を得て、被験者には研究の趣旨を文書で説明し、書面で同意を得られた症例を対象とした。採血時の精神症状をPANSSにより評価し、投薬内容をハロペリドール換算して遺伝子型と比較検討した。

末梢血リンパ球からフェノール・クロロフォルム法によりDNAを抽出した。Hersbergerら⁴⁾のmultiplex long PCR法によりCYP2D6*5をgenotypeした(Fig. 1)。CYP2D6*10とNCAM1遺伝子のIVS6+32T>Cの遺伝子型はPCR-direct sequence法により決定した⁵⁾。

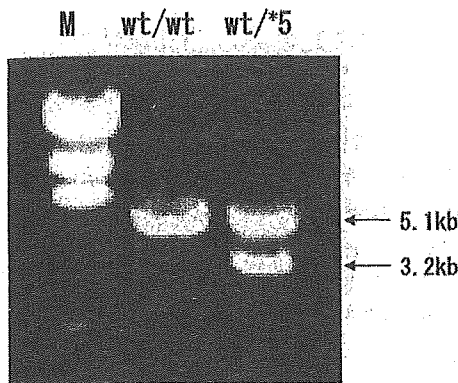


Fig. 1 PCR patterns of the *5 polymorphism of CYP2D6 gene

Multiplex long PCR using Hershberger's method showed 5.1 kb band for wild-type and 3.2 kb band for *5. M λ HindIII marker.

結果

対象における*5と*10のallele頻度は、それぞれ0.09, 0.41だった(Table 1)。*5,*10をmutant型としてまとめて解析したところ、遺伝子型間で一日服薬量、PANSSの得点に有意な差は認められなかった(Table 2)。また、一日服薬量とPANSSの得点の間に有意な相関は認められなかつ

Table 1 Distribution of polymorphisms of the CYP2D6 gene

Genotype counts (frequency)					Allele counts (frequency)		
wt/wt	wt/*10	wt/*5	*10/*10	*10/*5	wt	*5	*10
26	47	12	18	8	111	20	91
(0.24)	(0.42)	(0.11)	(0.16)	(0.07)	(0.50)	(0.09)	(0.41)

Table 2 Clinical characteristics and polymorphisms of the CYP2D6 gene

	wt/wt	wt/mut	mut/mut	P ^b
Dose of medication (mg/day) ^a	21.4±3.2	25.4±2.5	22.4±2.6	0.58
PANSS	27.5±2.3	31.0±1.6	27.1±2.2	0.28
Correlation				
Spearman ρ	0.10	0.20	0.02	
P	0.31	0.08	0.46	

a) haloperidole equivalent

b) P value was calculated by using ANOVA

Table 3 Clinical characteristics and IVS6+32T>C of the *NCAM1* gene

	T/T	T/C	CC	P ^b
Genotype counts (frequency)	78 (0.66)	39 (0.33)	2 (0.01)	
Dose of medication (mg/day) ^a	21.7±1.8	26.9±3.0	30.7±29.2	0.06
PANSS	28.4±1.1	31.2±1.5	22.0	0.08
Correlation				
Spearman ρ	-0.03	0.33		
P	0.82	0.02		
Male				
Genotype counts (frequency)	30 (0.59)	19 (0.37)	2 (0.04)	
Dose of medication (mg/day) ^a	22.9±3.2	27.8±3.9	30.7±29.2	0.16
PANSS	28.4±1.1	31.2±1.5	22.0	0.13
Correlation				
Spearman ρ	0.13	-0.11		
P	0.24	0.31		
Female				
Genotype counts (frequency)	48 (0.71)	19 (0.29)	0	
Dose of medication (mg/day) ^a	20.9±2.2	26.0±4.8		0.17
PANSS	30.2±1.8	31.6±3.4		0.13
Correlation				
Spearman ρ	0.01	0.62		
P	0.45	0.002		

a) haloperidole equivalent

b) P value was calculated by using t-test : TT vs TC + CC

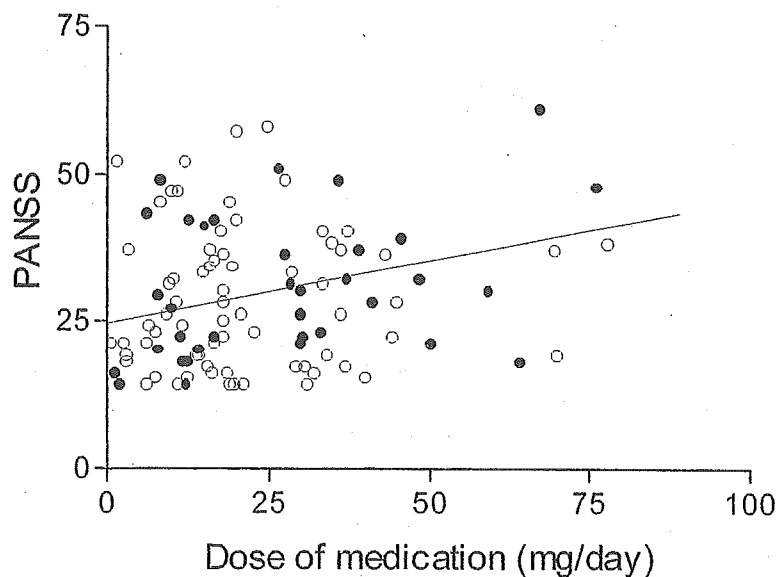


Fig. 2 Correlation between PANSS score and dose of neuroleptics in chronic schizophrenia. Dose of medication was calculated as haloperidol equivalent. Open circles represent patients with IVS6 + 32T/T and filled circles are schizophrenics carrying IVS6 + 32T/C. Patients with schizophrenia carrying IVS6 + 32C displayed significant correlation between dose of medication and PANSS (Spearman $\rho = 0.33$, $P = 0.02$).

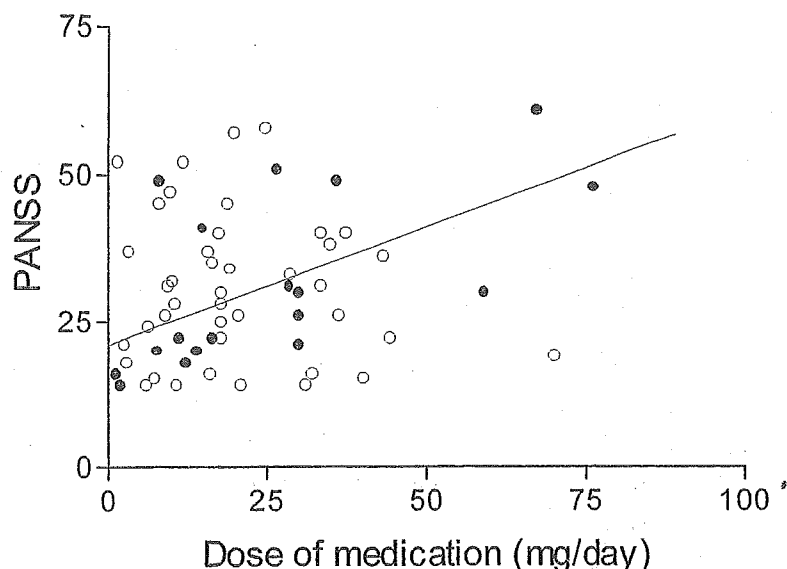


Fig. 3 Correlation between PANSS score and dose of neuroleptics in female schizophrenia. Dose of medication was calculated as haloperidol equivalent. Open circles represent patients with IVS6 + 32T/T and filled circles are schizophrenics carrying IVS6 + 32T/C. Female patients showed significant correlation between dose of medication and PANSS (Spearman $\rho = 0.62$, $P = 0.002$).

た。NCAM1 遺伝子の IVS6 + 32T > C では、対象の 33% に T/C, 2% に C/C を認めた (Table 3)。一日服薬量と PANSS の得点は、C allele を持つ患者で C allele を持たない患者より高い傾向が認められた ($P = 0.06, 0.08$)。また、TC の患者では一日服薬量と PANSS の得点の間に有意な正の相関が認められた (Table 3, Fig. 2)。男女に分けて解析したところ、男性においては、有意ではないものの一日投薬量、PANSS ともリスク群 (TC) で非リスク群より高い値を示したが、いずれの遺伝子型においても投薬量と PANSS の間に有意な相関は認められなかった。女性において、有意ではないものの一日投薬量、PANSS ともリスク群 (TC) で非リスク群より高い値を示し、TC において投薬量と PANSS の間に有意な正の相関が認められた (Table 3, Fig. 3)。

考 察

対象に認められた *5, *10 の allele 頻度がそれぞれ 0.09, 0.41 で、Bertilsson ら²⁾が報告したアジア人の 0.06, 0.51 の値に近かった。*5, *10 を mutant 型としてまとめた解析において、遺伝子型間で一日服薬量、PANSS の得点に有意な差は認められなかったが、対象のほぼ全例が多剤を服用し

ていて CYP2D6 に複雑な相互作用をもたらしていた可能性が考えられる。また、喫煙が CYP2D6 の活性に影響を及ぼすことも指摘されており、そうした因子も関与した可能性も考えられる。

NCAM1 遺伝子の IVS6 + 32T > C では、TC の患者では一日服薬量と PANSS の得点の間に有意な正の相関が認められた。これは、慢性期の維持投薬量が多いものほど PANSS の高い点で評価される症状が残存固定していることを反映しており、治療抵抗性を示唆している。昨年度われわれが報告した、C allele を持つ患者が複数の PANSS の項目で高い得点を示した結果とも一致する所見であると考えられる。

NCAM1 遺伝子の IVS6 + 32T > C を男女に分けて解析した結果、女性において TC を持つ患者で一日服薬量と PANSS の得点の間に有意な正の相関が認められたが、われわれは、IVS6 + 32T > C と統合失調症との関連に性差があることを報告しており²⁾、治療抵抗性との関連でも IVS6 + 32T > C において性差が存在した可能性が考えられた。

文 献

- 1) Arai M, Itokawa M, Yamada K, Toyota T, Arai

- M, Haga S, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T. Association of neural cell adhesion molecule 1 gene polymorphisms with bipolar affective disorder in Japanese individuals. *Biol Psychiatry*, 2004 ; 55 : 804 - 10.
- 2) 新井 誠, 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, 糸川昌成. 双極性障害および統合失調症における性差と神経細胞接着分子の関連研究. 脳と精神の医学 (印刷中).
- 3) Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6 : clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 2002 ; 53 : 111 - 22.
- 4) Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hanseler E. Rapid detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4, and CYP2D6*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem*, 2000 ; 46 : 1072 - 7.
- 5) 稲垣 中, 八木剛平, 内村英幸. 治療抵抗性分裂病—その疫学と治療. *精神医学*, 1999 ; 41 : 570 - 6.
- 6) Kane JM, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H. Clozapine in treatment-resistant schizophrenics. *Psychopharmacol Bull*, 1988 ; 24 : 62 - 7.
- 7) Ohara K, Tanabu S, Yoshida K, Ishibashi K, Ikemoto K, Shibuya H. Effects of smoking and cytochrome P450 2D6*10 allele on the plasma haloperidol concentration/dose ratio. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003 ; 27 : 945 - 9.

ABSTRACT

Study on candidate genes involved in treatment-resistant of schizophrenia

Masanari Itokawa^{***}, Makoto Arai^{*}, Aizo Furukawa^{*}, Nanako Obata^{*}, Nobue Shibata^{*}, Kana Sato^{*}, Kumi Tarora^{*}, Yuuki Yoshida^{*}, Hiroshi Ujike^{****}, Ichiro Sora^{****}, Takeo Yoshikawa^{**}

^{*}Department of Schizophrenia Research, Tokyo Institute of Psychiatry, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan. ^{**}Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-city, Saitama 351-0198, Japan. ^{***}Department of Neuropsychiatry, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama-city, Okayama 700-8558, Japan. ^{****}Department of Neuroscience, Division of Psychobiology, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai-city, Miyagi 980-8574, Japan.

We previously reported that polymorphisms of the *NCAM1* gene were associated with disorganized schizophrenia. The *5 and the *10 of CYP2D6 are polymorphisms which reduce activity of the enzyme that metabolites neuroleptics. We analyzed SNP of the *NCAM1* gene and *5 and *10 of CYP2D6 using 121 chronic schizophrenics. *5 or *10 were not associated with dose of medication or PANSS. Schizophrenia with IVS6 + 32T > C of *NCAM1* showed tendency of high dose of medication and high score of PANSS. Patients with schizophrenia carrying IVS6 + 32T > C displayed significant correlation between dose of medication and PANSS (Spearman $\rho = 0.33$, $P = 0.02$). Female patients showed significant correlation between dose of medication and PANSS (Spearman $\rho = 0.62$, $P = 0.002$).

(Ann. Rep. Mitsubishi Pharma Res. Found. 2005, 37 : 116 ~ 120)