

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

DNA チップを用いたうつ病の診断と病態解析

平成18年度 総括・分担報告書
主任研究者 大森 哲郎

平成19(2007)年 4月

目次

I. 総括研究報告

DNA チップを用いたうつ病の診断と病態解析

大森哲郎

----- 1

II. 分担研究報告

1. DNA チップを用いたうつ病の診断と病態解析

—電気けいれん療法（ECT）による mRNA 発現の変化に関する研究—

岡本長久

----- 9

2. 精神病性障害の評価と解析

橋本亮太

----- 13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 24

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 28

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

DNAチップを用いたうつ病の診断と病態解析

主任研究者 大森哲郎 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授

要旨

生涯罹患率が10%にも上るうつ病的な診断は、社会全体の急務である。主任研究者らは、ストレス反応と関連する遺伝子のmRNAの発現量を一括解析するDNAチップを開発した。本研究はこのDNAチップをうつ病の診断と病態解析に応用するものである。分子生物学的な先端技術を応用した先駆的な研究でありながら、患者負担は最少2.5mlの通常採血のみであることから臨床応用が容易である。平成18年度は、これまでの2色法から、対照者の不要なチップ（1色法）に解析方法を切り替えて検討を続けた。チップはアジレント社製を使用した。これまでに、46例の未治療うつ病と122例の健常者を解析している。その結果、うつ病患者において発現量が有意に減少している遺伝子が21,895中631種あった。そのうちの24種を平均したときが、うつ病群と健常群の差異がもっとも顕著となり、82.6%の感度でうつ病を正しく判定できた。

本研究は、DNAチップという新たな方法論を導入して、うつ病の早期診断、治療評価および病態研究に画期的な進歩をもたらすものである。

分担研究者

岡本長久 国立精神・神経センター武蔵病院

橋本亮太 大阪大学大学院医学系研究科附属子どものこころの分子統御機構研究センター疾患関連分子解析部門

A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつく。年間3万人以上にもものぼる自殺者の多くがうつ病に罹患していたと推定される。また、怠学、失職、引きこもりなどの社会的問題やアルコール関連障害などの医学的問題にも深く関連している。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活

の向上に必須であり、社会全体の急務である。病態の評価、早期診断、及び治療評価に応用できる簡便かつ客観的な指標の確立の意義は絶大であり、その必要性は高い。

我々のグループは、神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などと関連する遺伝子1500種のmRNAの発現量を、白血球を試料として一括解析するDNAチップを開発した。学位審査発表などの心理学的ストレスにさらされると、特定の遺伝子

発現が増減し、翌日には回復することを見出し、ストレスに鋭敏に反応する測定系となることを確認している。本研究の目的は、このDNAチップを起点として、DNAチップを用いて白血球中のmRNA発現量を解析し、それをうつ病の診断と病態解析へ応用することである。平成18年度においては、これまでの2色法のチップを1色法に切り替えて、解析を行った。対照者の不要な1色法への方法論の切り替えは、DNAチップを臨床応用のための必須の過程である。

B. 研究方法

徳島大学精神科神経科を受診した未治療のうつ病患者のうち、本診断法開発のための研究に参加することについて文書により説明し同意を得たものを対象とした。平成18年度は徳島市周辺の精神科クリニックを受診した未治療のうつ病患者で、本診断法開発のための研究に参加することについて文書により説明し同意を得たものをも対象に加えた。診断は、DSM-Vの中等症または重症うつ病エピソードに合致するものとし、精神病症状をともなう重症うつ病エピソードおよび双極性障害うつ病エピソードは今回の解析対象からは除外した。また精神科合併症を有するもの、重篤な身体合併症を有するもの、および身体疾患治療薬を服用しているものは除外した。採血は、午前10時から午後1時までの間に医師または看護師が、安静下に肘静脈より行った。うつ病の重症度はハミルトン評価尺度で評価した。外来診察終了後に血液5-10mlを採取した。キアゲン社製mRNA抽出用試験管を用いてmRNAを抽出した。抽出したmRNAの増幅と蛍光ラベルを行

い、DNAチップを用いて神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などと関連する1500種類の遺伝子のmRNAの発現量を解析し、クラスター解析を行った。血液からのmRNAの抽出は徳島大学で行い、DNAチップの解析は、日立ライフサイエンス事業部に委託して行った。測定のコエフィシエント値は20%以下であり、信頼性と再現性は良好である。

平行してリアルタイムPCRを用い、Taqman probeにて特定標的遺伝子の発現を、glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNAを内部標準として測定した。平成18年度にはCREB、HDAC5遺伝子mRNAを含むいくつかの遺伝子発現を解析対象とした。必要に応じ、遺伝子多型について放射性同位元素を利用したシークエンス及びsingle strand conformation polymorphism法で解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子多型解析ではなく、すべての人に発現しているmRNAの発現量を測定するものであり、いわゆる遺伝子解析研究ではない。しかし、倫理面への配慮は十分に行い、連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護する。対応票は、研究代表者（大森哲郎）が厳重に保管し、解析を行う日立ライフサイエンス事業部には番号のみを通知する。希望者のみを対象とし、本研究の目的、方法、危険性、得られる分析結果、及びその情報の管理について説明し、書面で合意を取得する。尚、研究計画は徳島大学病院倫理委員会の承認を平成13年に受けている。平成18年度におこなった徳島周辺の精神科クリニックからも臨床データと血液サンプルを採取することに関して

も、平成18年6月26日に徳島大学病院倫理委員会の承認を得た。また共同研究施設の国立精神・神経センターの倫理委員会へも倫理審査を求め、平成16年2月13日付けで承認を受けている。

C. 研究結果

平成17年度までに160検体以上のうつ病患者血液を採取し、診断、重症度、治療前後などの臨床データをデータベース化している。うつ病以外の疾患でも、未服薬例を中心に、統合失調症30例、双極性障害15例、パニック障害35例、強迫性障害25例のサンプルの臨床データと血液サンプルを収集している。このうち身体合併症および精神科的合併症のない当該病相未治療の単極性うつ病45例を、性年齢のマッチした非喫煙健康対照者と比較して解析した。

1) うつ病全例にほぼ共通して変化している遺伝子が約20種見出された。2) 同時に、うつ病の半数でのみ変化している遺伝子群も数10種存在するため、遺伝子発現パターンからうつ病が2群に分かれた。この2群間の臨床症状には差がなく、両群を分ける臨床指標は現在のところ明らかではない。3) 変動遺伝子のいくつかは、治療後に正常方向へと変化した。4) これらの所見は疾患特異的であり、急性ストレスに由来する変化とは異なる。以上の所見は、mRNAの発現パターンを指標として、うつ病を健康成人および精神科他疾患から識別できること、および治療経過にそった変化が捉えられることを意味している。

平成18年度の解析対象は徳島大学病院または徳島市周辺の精神科クリニックを受診した単極性うつ病患者である。うつ病

の診断はDSM-IVに従い、ハミルトン評価尺度で重症度を評価した。血液10mlを採取し、キアゲン社製mRNA抽出用試験管を用いてmRNAを抽出した。抽出したmRNAの増幅と蛍光ラベルを行い、DNAチップを用いて神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などに関連する約2万の遺伝子のmRNAの発現量を解析し、クラスター解析を行った。血液からのmRNAの抽出は徳島大学で行い、DNAチップの解析は、日立ライフサイエンス事業部に委託して行っている。平成18年度は日立ライフサイエンス事業部で試作した1色法チップとアジレント社の1色法チップの両方でチップ解析を行った。測定のコэффициентは20%以下であり、信頼性と再現性は良好である。得られたデータの解析については、搭載遺伝子数の多いアジレント社の解析を先行させている。

これまでに、46例の未治療うつ病と122例の健常者を解析している。その結果、うつ病患者において発現量が有意に減少している遺伝子が21,895中631種あった。それらのうち、統計学的な有意差が大きい順にいくつ組み合わせて判定すると最もうつ病群を識別するかを検討したところ、上位24種を平均したときが、うつ病群と健常群の差異がもっとも顕著となり、82.6%の感度でうつ病を正しく判定できた。

以上のDNAチップ解析と平行して、定量性に優れるリアルタイムPCRを用いていくつかの特定標的遺伝子のmRNA発現量の解析を行った。平成17年度までに、うつ病未治療時にはセロトニントランスポーターの発現が増加し治療により減少すること、逆にLIMが未治療時は低

下し治療により増加することを明らかにしたが、本年度の検討から、うつ病未治療時には、HDAC5、CREBなどいくつかの mRNA 発現に変動があり、治療後に正常化することを認めた。これらうつ病の病態に重要な関与を持つと推定される分子の mRNA である。統合失調症でもいくつかの遺伝子発現の変動を見出したが、変動はうつ病と同一ではなかった。以上の DNA チップやリアルタイム PCR を用いた検討により得られた所見は、mRNA の発現パターンを指標として、うつ病を健康成人および精神科他疾患から識別でき、かつ治療経過にそった変化が捉えられることを意味している。DNA チップを用いた死後脳病態研究は数多いが、試料として末梢白血球を用い、病態研究よりも診断指標としての応用を優先したところに本研究の独創と特色がある。数多くの mRNA 発現量を同時測定することによって、単一因子の測定では捉え切れなかったうつ病特異的な所見を的確に捕捉することを目指している。遺伝子 mRNA 発現変動は、うつ病で見られる神経内分泌系、神経免疫系あるいは自律神経系などの異常を反映していると思われるが、より直接的にうつ病の中樞異常と関連している可能性もある。リアルタイム RT-PCR 法により発現変動を確認したいくつかの遺伝子については、SNP 多型を検索し、疾患対照多型解析も行ったが、遺伝子多型の差異に基づくものではなかった。

以上の研究は、DNA チップの特徴を最大限に生かした独創的かつ先端的な研究であり、同時に、少量の通常採血以上には被験

者の協力を要しないため、臨床応用と直結する実用的な研究である。現時点でもきわめて有望な所見であるが、さらに継続して検討する必要がある。

D. 考察

うつ病は生涯罹患率が 10%前後の頻度の高い疾患であり、その頻度は現代社会の構造やストレスの影響を受けて今後さらに増加することが予想される。この疾患は、罹患者の精神と身体に著しい苦悩をもたらし、その社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、自殺企図に結びつくことも少なくない重大な疾患である。年間 3 万人以上にものぼる自殺者の大半はうつ病に罹患していたと推定されている。また、怠学、失職、引きこもりなどの社会的問題やアルコール関連障害などの医学的問題にも深く関連している。この疾患を的確に診断し、すみやかに治療する体制を確立することは、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。

うつ病の診療には専門医だけでなくプライマリケア医師の関与が必要である。しかし、うつ病の診断は精神科医にとっても常に必ずしも容易ではなく、まして精神医学的診察に習熟していないプライマリケア医師にとっては正確な診断は至難である。診断を補助する客観的指標の確立には計り知れない意義がある。本研究は、DNA チップを用いてうつ病を評価した世界初の試みである。研究結果は、白血球 mRNA 発現を指標として、うつ病の診断に有用な生物学的マーカーの確立が可能であることを示している。患者負担が

少量採血のみである点は、臨床応用のための重要な条件である。現在の研究をさらに発展させ、簡便性とコスト面を考慮した実用型チップを完成させることにより、感度と特異性を両立させた臨床現場で使用できるうつ病の客観的指標を確立することができる。うつ病の診断精度と治療率を向上させ、二次的な医学的・社会的問題を減少させることにつながる。

客観的な指標を目指して、これまでもいくつかの検査方法が試みられている。うつ病は、脳内のモノアミン系の機能的変調があり、その変調は心身相関作用を通して、神経内分泌系、神経免疫系、自律神経系に少なからぬ影響を及ぼしていることが知られている。特に、神経内分泌的な異常のひとつである軽度の副腎皮質ホルモン分泌亢進をデキサメサゾン抑制試験によつて的確に把握してうつ病の診断に応用する試みは、1980年代以降に精力的に研究されたが、試験薬服用という煩雑さおよび感度や特異性の限界から臨床応用には至らなかった。研究段階では、その他の神経内分泌系、神経免疫系、自律神経系、日内リズムや睡眠構築の異常なども報告されている。最近では、脳画像を用いた脳血流や脳内モノアミン受容体の変化なども指摘されはじめているが、いずれも感度や再現性に問題が残る。いずれに着目するにしても、限られた因子を測定する方法ではうつ病という複雑な心身疾患を評価することそのものが困難であるとも言える。また、従来の検査は、施行と評価には膨大な時間と労力が必要であり、簡便性という観点をも考慮すると、日常診療への応用はとうてい望

むことが出来ないのが現状である。

本研究は、DNA チップを用いてうつ病を評価する世界で最初の試みである。本方法は、患者の特別な協力を必要とせず、通常の採血による 2.5ml の血液をもとに解析可能であり、非侵襲的で簡便な日常的に行うことのできる検査法である。数多くの RNA 発現量から生体機能を多面的に把握する本方法は、従来の限られた因子を測定する方法に比べ、うつ病のように心と身体にまたがる複雑な心身疾患の評価方法として原理的にも適切である。

申請者が本研究に着手した時点では、白血球を試料とする精神神経疾患の mRNA 発現解析研究は世界にほとんど類例がなく、まさしく先駆的な研究であったが、ここ 2-3 年の間にリアルタイム RT-PCR 法によって、うつ病や統合失調症における特定遺伝子発現の変化が我々自身を含め国内外から少なからず報告されるようになった。また DNA チップによる白血球 mRNA 発現パターンによって病態や疾患を識別する試みも、我々自身による試み (Morita 他 *Neurosci. Lett.* 2005, Ohmori 他 *J Med Invest.* 2005) のほか、国外から慢性疲労症候群 (Kaushik 他 *J Clin Pathol* 2005 など) や統合失調症 (Bowden 他, *Schizophrenia Res.* 2006 など) に関して報告され始めた。末梢と中枢の発現は必ずしも同じではないが、ある程度の相関があることも知られており (Sullivan 他 *Am J Med Gen B* 2006)、現在、注目度の増している研究領域である。

平成 18 年度にある程度の完成をみた対照の不要な 1 色法を、さらに発展させ、簡便化することにより、実用的な診断ツールとしての DNA チップが完成すると

思われる。

E. 結論

DNAチップを用い、白血球中に発現する mRNA を指標として、うつ病の新しい評価方法の確立を目指して研究を行った。平成18年度は、対照者を必要としない1色法のチップに方法論を切り替えて、未治療うつ病を対象に解析を行い、うつ病に特異的な mRNA 発現パターンを見出し、健康対照者および精神科他疾患から識別に成功している。平行して、リアルタイムPCR法によってうつ病未治療時の 5HTT、LIM、HDAC5、CREB な特定遺伝子発現の増減と、治療後の正常化を確認している。

本研究は、DNAチップを用いてうつ病を評価する世界で最初の試みである。先端的かつ独創的なものであるが、一方で患者負担は少量通常採血のみであり、うつ病評価への臨床応用が現実的である。プライマリーケア、健康診断、精神科診療施設などの場で早期診断、病態評価および治療評価に応用可能である。うつ病の診断や治療に客観的な指標の導入を実現させることが期待され、社会的・医療行政的意義は大きい。本研究の成果は、DNAチップによるうつ病評価が可能であることを示している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（主任研究者分のみ）

(1) 論文発表

Iga J, Ueno S, Yamauchi K, Numata S, Motoki I, Tayoshi S, Kinouchi S, Ohta K, Song H, Morita K, Rokutan K, Tanabe H,

Sano A, Ohmori T. Gene expression and association analysis of LIM (PDLIM5) in major depression.

Neurosci Lett 400(2006) 203-207

Satsuki Sumitani, Masafumi Harada, Hitoshi Kubo, Tetsuro Ohmori Proton magnetic resonance spectroscopy reveals an abnormality in the anterior cingulate of a subgroup of obsessive-compulsive disorder patients. Psychiatry Reserch: Neuroimaging,154(1); 85-92, 2007

Takahide Taniguchi, Satsuki Sumitani, Michitaka Aono, Junichi Iga, Sawako Kinouchi, Hiroshi Aki, Mami Matsushita, Kyoko Taniguchi, Mami Tsuno, Kazunari Yamanishi, Masahito Tomotake, Yasuhiro Kaneda, Tetsuro Ohmori. Effect of antipsychotic replacement with quetiapine on the symptoms and Quality of Life of schizophrenic patients with extrapyramidal symptoms. Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental. 2006 Oct;21(7):439-45.

Shusuke Numata, Shu-ichi Ueno, Jun-ichi Iga, Ken Yamauchi, Song Hongwei, Koji Ohta, Sawako Kinouchi, Sumiko Shibuya-Tayoshi, Shin-Ya Tayoshi, Michitaka Aono, Naomi Kameoka, Satsuki Sumitani, Masahito Tomotake, Yasuhiro Kaneda, Takahide Taniguchi, Yasuhito Ishimoto, Tetsuro Ohmori. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism in schizophrenia is associated with age at onset

and symptoms .Neurosci Lett 401; 1-5 ,
2006

M. Tomotake, Y. Kaneda, J. Iga, S. Kinouchi,
S. Tayoshi, I. Motoki, S. Sumitani, K.
Yamauchi, T. Taniguchi, Y. Ishimoto, S. Ueno,
T. Ohmori. Subjective and objective
measures of quality of life have different
predictors for people with schizophrenia.
Psychological Reports 99: 477-487, 2006

S. Numata, S. Ueno, J. Iga, K. Yamauchi, S.
Hongwei, S. Kinouchi, S. Shibuya-Tayoshi, S.
Tayoshi, H. Aki, S. Sumitani, M. Itakura, T.
Ohmori. Interaction between catechol-
O-methyltransferase (COMT) Val108/158Met
and brain-derived neurotrophic factor
(BDNF) Val66Met polymorphisms in age at
onset and clinical symptoms in schizophrenia.
J Neural Transm 114, 255-259, 2006

J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S.
Kinouchi, S. Tayoshi, H. Song, T. Ohmori.
Altered HDAC5 and CREB mRNA
expressions in the peripheral leukocytes of
major depression. Progress Neuro-
Psychopharmacol Biological Psychiatry 31:
628-632, 2007

J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S.
Tayoshi, S. Kinouchi, M. Nakataki, H. Song,
K. Hokoishi, H. Tanabe, T. Ohmori. Gene
expression and association analysis of
vascular endothelial growth factor in major
depressive disorder. Progress Neuro-
Psychopharmacol Biological Psychiat 31:

658-663, 2007

S. Numata, S. Ueno, J. Iga, K. Yamauchi, S.
Hongwei, S. Kinouchi, Hashimoto R, Takeda
M, Kunugi H, Itakura M, T. Ohmori. Gene
expression in the peripheral leukocytes and
association analysis of PDLIM5 gene in
schizophrenia. Neurosci Lett 415: 28-33,
2007

H. Aki, M. Tomotake, Y. Kaneda, J. Iga, S.
Kinouchi, S. Shibuya-Tayoshi, S. Tayoshi, I.
Motoki, K. Moriguchi, S. Sumitani, K.
Yamauchi, T. Taniguchi, Y. Ishimoto, S. Ueno,
Ohmori T. Subjective and objective quality of
life, levels of life skills, and their clinical
determinants I outpatients of schizophrenia.
Psychiatry Research 2007 (in press).

(2) 学会発表

36th Annual meeting, Society for
Neuroscience. Atlanta, 2006.10.14-18,
Atlanta USA. Gene expression and association
analysis of LIM (PDLIM5) in major
depression. J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S.
Numata, I. Motoki, S. Tayoshi, S. Kinouchi,
K. Ohta, H. Sou, K. Morita, K. Rokutan, H.
Tanabe, A. Sano, T. Ohmori.

36th Annual meeting, Society for
Neuroscience. Atlanta, 2006.10.14-18,
Atlanta USA. Gene expression and
association analysis of LIM (PDLIM5) in
schizophrenia. Shusuke Numata, Shu-ichi
Ueno, Jun-ichi Iga, Ken Yamauchi, Song
Hongwei, Ryota Hashimoto, Masatoshi

Takeda, Hiroshi Kunugi, Mitsuo Itakura,
Tetsuro Ohmori

European Patent Application
No 05006769

第28回日本生物学的精神医学会
2006.9.14-16 名古屋 うつ病患者の末
梢白血球 *LIM (PDLIM5)* 遺伝子発現と遺伝
子関連解析 伊賀淳一 上野修一 山内
健 宋鴻偉 沼田周助 木内佐和子 田
吉純子 大森哲郎

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

第28回日本生物学的精神医学会
2006.9.14-16 名古屋 3T proton MRS を
用いた OCD の脳内代謝物の検討 住谷
さつき 原田雅史 久保均 田吉伸哉
田吉純子 木内佐和子 上野修一 大森
哲郎

第28回日本生物学的精神医学会
2006.9.14-16 名古屋 BDNFVal66Met
polymorphism in schizophrenia is associated
with age of onset and symptoms. S. Numata,
S. Ueno, J. Iga, K. Yamauchi, S. Hongwei, S.
Kinouchi, S. Shibuya-Tayoshi, S. Tayoshi, S.
Sumitani, T. Ohmori.

第28回日本生物学的精神医学会
2006.9.14-16 名古屋 Gene expression in
the peripheral leukocytes in mental disorders.
S. Ueno, T. Ohmori:

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願中

特願 2006-262903

US Patent Application

No 11/091,674,

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

DNAチップを用いたうつ病の診断と病態解析

－電気けいれん療法（ECT）による mRNA 発現の変化に関する研究－

分担研究者 岡本長久 国立精神・神経センター武蔵病院 精神科医長

要旨

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつくため、うつ病はわが国に限らず世界各国で重要政策課題としてとりあげられている。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務であるが、うつ病患者の中で抗うつ薬による初回治療に反応しない患者が40-50%存在し、うつ病患者の10-20%程度が、複数の作用機序の異なる抗うつ剤によって改善しない薬物治療抵抗性うつ病であることが知られており、現在の薬物療法には限界が存在している。

一方、電気けいれん療法(electroconvulsive therapy ; ECT)は、メタ解析においてうつ病に対して薬物療法より高い有効性が証明され、薬物治療抵抗性うつ病に対しても高い有効性と迅速な効果発現を有する治療法であることが知られている。ECTの歴史は古く、ECTによって改善する多くの患者が存在するものの、ECTの作用機序の本質的解明に結びつく臨床研究は未だ存在しない。

主任研究者らは、ストレス反応と関連する遺伝子のmRNAの発現量を一括解析するDNAチップを開発した。本研究の目的は、電気けいれん療法(ECT)前後のうつ病患者を対象としてDNAチップを用いた調査を行い、「ECTによる抑うつ症状の改善」と「mRNA発現の変化」の関連を明らかにし、ECTの遺伝子レベルでの奏功機序を解明することである。また、ECT対象群の多くが薬物療法抵抗性のうつ病患者であるため、「ECTと薬物療法によるDNAチップ所見の変化パターンの異同」を詳しく調べることで、①従来明らかになっていなかったうつ病の病態の理解が進み、②今後、新しい抗うつ薬を開発していく際の示唆が得られる可能性もあると考えている。現在、ECTを施行した7症例の検体の解析を行っている。

A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつく。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国

民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。病態の評価、早期診断、及び治療評価に応用できる簡便かつ客観的な指標の確立の意義は絶大であり、その必要性は高い。

主任研究者らは、神経伝達物質、サイト

カイン、ホルモン、熱タンパク質などと関連する遺伝子1500種のmRNAの発現量を、白血球を試料として一括解析するDNAチップを開発した。学位審査発表などの心理的ストレスにさらされると、特定の遺伝子発現が増減し、翌日には回復することを見出し、ストレスに鋭敏に反応する測定系となることを確認している。本研究の目的は、電気けいれん療法（ECT）前後のうつ病患者を対象としてDNAチップを用いた調査を行い、「ECTによる症状の改善」と「mRNA発現の変化」の関係を明らかにすることである。

B. 研究方法

国立精神・神経センター武蔵病院精神科を受診してECTを受けるうつ病患者のうち、本診断法開発のための研究に参加することについて文書により説明し同意を得たものを対象とした。診断は、ICD-10(International Classification of Diseases 10th edition)の中等症または重症うつ病エピソードに合致するものとし、精神病症状をとまなう重症うつ病エピソードおよび双極性障害うつ病エピソードは除外した。また、重篤な身体合併症を有するものも除外した。採血は、ECT前、初回ECT前・後、3回目ECT前、5回目ECT前、8回目ECT前、ECT終了後の計7回行った。うつ病の重症度はハミルトン評価尺度で評価した。なお、ECT施行中は薬物療法の処方内容は変更しないこととした。

得られた血液サンプルから、キアゲン社製mRNA抽出用試験管を用いてmRNAを抽出した。抽出したmRNAの増幅と蛍光ラベルを行い、DNAチップを用いて神経伝達物質、

サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などと関連する1500種類の遺伝子のmRNAの発現量を解析し、クラスター解析を行った。血液からのmRNAの抽出は徳島大学医学部ストレス制御医学分野（六反一仁教授）で行い、DNAチップの解析は、日立ライフサイエンスセンターに委託して行っている。測定のCV値は20%以下であり、信頼性と再現性は良好である。

図に、国立精神・神経センター武蔵病院における本研究のプロトコル概要を示す。

（倫理面への配慮）

本研究は遺伝子多型解析ではなく、すべての人に発現している mRNA の発現量を測定するものであり、いわゆる遺伝子解析研究ではない。しかし、倫理面への配慮は十分に行い、連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護する。対応票は、研究代表者（大森哲郎）が厳重に保管し、解析を行う日立ライフサイエンスセンターには番号のみを通知する。希望者のみを対象とし、本研究の目的、方法、危険性、得られる分析結果、及びその情報の管理について説明し、書面で合意を取得する。尚、研究計画は徳島大学病院倫理委員会の承認を平成13年に、国立精神・神経センター武蔵病院倫理委員会の承認を平成16年2月13日に受けている。

C. 研究結果および考察

平成17年度に当院うつ・ストレスケア病棟でECTを行った薬物治療抵抗性うつ病患者63名のうち、開始時より50%以上のハミルトンうつ病評価尺度17項目の減少を認める治療反応群93%（寛解群74%

を含む)と9割以上の治療抵抗性うつ病患者に症状改善を認めた。

本年度は、ECTを受けた7名の薬物療法抵抗性うつ病患者の参加を得て、サンプルの解析を行っている。本研究を通して、「ECTによる抑うつ症状の改善」と「DNAチップ所見の変化」の関連を明らかにして、ECTの奏功機序を解明することを目標としている。また、ECT対象群は薬物療法抵抗性のうつ病患者であるため、「ECTと薬物療法によるDNAチップ所見の変化パターンの異同」を詳しく調べることで、①従来明らかになっていなかったうつ病の病態の理解が進み、②今後、新しい抗うつ薬を開発していく際の示唆が得られる可能性もあると考えている。

現時点では、3症例に関し、ECT前、初回ECT前・後、3回目ECT前、5回目ECT前、8回目ECT前、ECT終了後の計7回のチップ解析を終了し、予備的にクラスター解析も試みた。各症例ごとにECT前後あるいは、ECT経過にしたがって、発現の増減する遺伝子を多数認めるものの、3症例ではECTによる変動として明確なことをいえなかった。

遺伝子発現変動は、急性ストレスによっても、うつ状態によっても、うつ状態の改善によっても変化するので、今後、それらの要因にも十分な注意を払いながら、症例数を増やす必要がある。

D. 結論

神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などと関連する遺伝子1500種のmRNAを解析する革新的なDNAチップを用いて、「ECTによるうつ病の改善」と「mRNA

発現パターンの変化」の関係についての調査研究を行った。本研究は、DNAチップを用いて白血球遺伝子発現を指標に、うつ病でのECT実施前後の生体変化を把握を試みる世界で最初の試みであり、今後追求する価値がある。症例数を増やし、ECTの反応との関連や、1回のECT施行による変化、ならびに1クール治療前後の変化などを明確にし、ECTの生体に及ぼす影響や、作用機序に関し研究を進めたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

- ・ 岡本長久：難治性うつ病への対応。医学の歩み 219: 955-962, 2006
- ・ 岡本長久：うつ病の薬物療法-最新の知見を踏まえて-。調剤と情報 686-691, 2006
- ・ 岡本長久、野田隆政：期待される新規抗うつ薬と併用療法：エビデンスに基づく難治性うつ病の治療。新興医学出版社、82-104, 2006
- ・ 野田隆政、岡本長久：電気けいれん療法(electroconvulsive therapy；ECT)：エビデンスに基づく難治性うつ病の治療。新興医学出版社、82-104, 2006
- ・ 功刀浩、柳沢ひろみ、田中美穂、岡本洋平、堀弘明、橋本亮太、中林哲夫、岡本長久、大森まゆ、沢村香苗、斎藤治、樋口輝彦、廣中直行：統合失調症とうつ病におけるプレパルスインヒビションと関連指標：予備

的報告、精神医学 49、2007

- ・ 岡本長久：電気けいれん療法：A E R A M O O K 『新版 職場のうつ』(仮題)、2007年5月(予定)、朝日新聞社

(2) 学会発表

- ・ Nagahisa Okamoto：An MRI study of neurodevelopmental risk factors for psychosis: a relationship between discordant birth weight and morphological brain development in healthy monozygotic twins, 5th International Early Psychosis Association conference, 6 October. 2006, Birmingham, England
- ・ 岡本長久：2007年度政策医療ネットワーク精神疾患研修会「成人期に会う広汎性発達障害. 2007年2月9日、東京
- ・ 岡本長久：NPO 不安・抑うつ臨床研究会主催第13回都民講演会「双極性障害治療の実際」、2007年2月3日、東京
- ・ 野田隆政, 澤田由紀子, 岡本長久, 齋藤治, 樋口輝彦：「修正型電気けいれん療法 (mECT) マニュアル、クリニカルパスの作成およびその効果の検討。」第102回日本精神神経学会総会、2006年5月11日、福岡
- ・ 堀弘明, 沢村香苗, 岡本長久, 大森まゆ, 樋口輝彦, 功刀浩：「外来うつ病、一般成人におけるストレスとDEX/CRHテスト」、生物学的精神医学会、2007年7月(抄録採択済)、札幌
- ・ 市川亮, 坂本広太, 牧安紀, 元永悠

介, 佐藤真由美, 岡本長久：「ビデオを用いた修正型電気痙攣療法の説明を行って～患者のmECTのイメージの評価」、第103回日本精神神経学会総会、2007年5月(抄録採択済)、高知

- ・ 岡本長久, 佐藤真由美, 坂本広太, 長房裕子, 森崎洋平, 伊藤暢厚, 中井哲滋, 「うつ病における修正型電気けいれん療法の術中麻酔薬の差異の検討～ケタミン麻酔およびプロポホル麻酔とのオープン試験による比較～」、第103回日本精神神経学会総会、2007年5月(抄録採択済)、高知
- ・ 長房裕子, 佐藤真由美, 山下典生, 森崎洋平, 伊藤暢厚, 坂本広太, 岡本長久, 「うつ病における疾患特異的SPECT所見の検討」、第103回日本精神神経学会総会、2007年5月(抄録採択済)、高知

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

精神病性障害の評価と解析

分担研究者 橋本亮太 大阪大学大学院医学系研究科附属子どものこころの分子統御
機構研究センター 疾患関連分子解析部門 特任助手

要旨

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつく。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。主任研究者らは、神経伝達物質、サイトカイン、ホルモンとそれらの受容体や情報伝達分子に加え、ストレスタンパク質などのストレス反応と関連する遺伝子の mRNA の発現量を一括解析する DNA チップを開発した。これを用いた研究から学位審査などのストレスに曝されると、共通の遺伝子発現が増減し、翌日には回復することが判明している。主任研究者らのグループはこの DNA チップをうつ病の早期診断、治療評価および病態研究に応用することに成功している。うつ病と同様に、自殺企図の頻度が高い重篤な精神疾患として、精神病性障害（統合失調症）がある。本研究では、DNA チップを用いて統合失調症の早期診断、治療評価および病態研究に応用することを目的とする。

A. 研究目的

統合失調症はおよそ人口の100人に1人が罹患する common disease であるが、思春期～成人早期に発症し、慢性・再発性の経過をたどる難治性疾患である。入院患者は全国で20万人を超え、あらゆる病気の中で最も多い。平成10年度の日本の精神医療費は1兆6千億円であるが、その半分以上が統合失調症の治療に費やされる。この疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。病態の評価、早期診断、及び治療評価に応用できる簡便かつ客観的な指標の確立の意義は絶大であり、その必要性は高い。

我々の目的は、ヒトの約3万に上るとい

われる mRNA の発現量を測定できるアフィニティメトリクス社の DNA チップを用いて、白血球中の mRNA 発現量を解析し、統合失調症の診断と病態解析へ応用することである。

B. 研究方法

国立精神・神経センター、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部精神医学、大阪大学大学院医学系研究科精神医学にて、統合失調症患者、健常被験者に、本診断法開発のための研究に参加することについて文書により説明し同意を得たものを対象とした。診断は DSM-IV にて行い、症状評価スケールによる評価（PANSS: Positive and Negative symptoms scale）や異常不随意運動スケールによる

遅発性ジスキネジアの評価 (DIEPS: Drug induced extrapyramidal symptoms scale) 等を用いて症状評価を行った。採血は、医師または看護師が、安静下に肘静脈より行った。外来診察終了後に血液5mlを採取した。キアゲン社製RNA抽出用試験管を用いてRNAを抽出した。

本研究は、それぞれの施設の倫理審査委員会において承認を受けており、それに基づいて、試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理 (匿名化) などを徹底させた。

DNAチップは、約3万あるといわれるヒトのmRNAを網羅的に定量解析できるアフィメトリクス社のものを用いた。抽出したRNA 1ugをcDNAにしたうえで、1サイクル法にて増幅し、その後ラベリングを行ってチップに乗せて解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子多型解析ではなく、すべての人に発現しているmRNAの発現量を測定するものであり、いわゆる遺伝子解析研究ではない。しかし、倫理面への配慮は十分に行い、遺伝子解析に準じた連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護する。個人情報、書類に記載されたもの (書類情報) とデータ・ベースに入力されたもの (電子情報) とがあり、前者は、研究参加への同意書と、個人情報や臨床データが記入された個人データ・シートである。書類情報のうち、同意書は2枚綴りであり、1枚をカルテに保管し、もう1枚は個人情報管理者 (武蔵病院副院長、補助者: 臨床検査室山下智子氏) のもとに集められ、匿名化ID番号を付与されて、臨床検査室内に金庫

に保管される。個人データ・シートは武蔵地区の精神科医師がカルテ情報を基に記入した後に一旦臨床検査室のもとに集められ、原本を臨床検査室内の金庫に保管し、データ・シートから氏名、生年月日、院内IDなどの個人識別情報を削除し、匿名化ID番号を付与した後に研究所に送られる。大阪大学においても国立精神・神経センターと同様な方法を用いて、遺伝子解析に準じた連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護した。

電子情報は、上記の個人識別情報が削除された個人データ・シートに基づいて研究員が外部と切り離されたコンピュータにおいて入力し、フロッピー・ディスクないしMOディスクなどの外部記憶装置を用いて研究責任者が厳重に管理する。また、解析作業を行う場合にも他の一切のコンピュータと切り離された状態で行う。なお、これらの電子情報のファイルには暗証番号を付け、外部記憶装置を紛失した場合でも他人がファイルを開けないような措置を講じる。

C. 研究結果および考察

平成17年度に、国立精神・神経センターにて収集したサンプル (性・年齢をマッチさせた統合失調症38例と健常者36例) を用いて、これらのRNAを0.3ugずつプールして1ugずつをそれぞれ3つのDNAチップにて検討した。統合失調症・健常者サンプルで同じ処理をした3つのサンプルによるDNAチップにおける遺伝子発現の違いを検討すると遺伝子発現が確認されたもののうち約1%が2倍以上異なっていたことから、遺伝子発現の違いのカットオフを2倍に設

定すると1%が擬陽性になることがわかった。次に、統合失調症と健常者においての比較をそれぞれのチップ間において行うと(全部で9通り)、それぞれ30から150程度の遺伝子発現が2倍以上変化していた。そのうち、10の遺伝子発現が、9通り中、5通りにおいて2倍以上の変化が認められた。

分担研究者である橋本は、平成18年度より、大阪大学大学院医学系研究科附属子どものこころの分子統御機構研究センター疾患関連分子解析部門(精神医学教室兼任)に異動した。そこでは、さらなる解析に必要な実験機器がないことにより、国立精神・神経センターのサンプルを用いた解析を一時中断し、大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室におけるサンプル収集のシステムの構築を開始した。精神医学教室のスタッフの協力の下で、PANSSやDIEPSSなどの臨床評価を行った統合失調症サンプルの収集だけでなく、うつ病においてもGRIDハミルトンうつ病評価尺度(Grid-HAMD)を行ったうえでサンプル収集をした。その結果、統合失調症45例、うつ病20例のサンプル収集ができた。そのうち、未治療のものがそれぞれ2例と4例あり、今後の研究に生かすことができると考えられる。

D. 考察

精神病性障害は、うつ病とともに、罹患者の精神と身体に著しい苦悩をもたらす、その社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、自殺企図に結びつくことも少なくない重大な疾患である。よってこの疾患を的確に診断し、すみやかに治療する体制を確立することは、国民生活の向

上に必須であり、社会全体の急務である。

しかし、精神病性障害の診断は簡単なものではなく、十分に熟練した精神科専門医による一時間ほどの面接により、その症状を的確に把握することが必要である。さらに一般的身体状態および神経学的状態に大きな異常のないことを確認し、必要に応じて脳波や脳画像検査によって脳器質性疾患を除外して診断に至る。得られた所見を、世界保健機構(WHO)やアメリカ精神医学会による診断基準と照合し、診断を確定することが一般的である。診断に習熟を要するのは、簡便かつ客観的な症状評価方法が存在しないことが大きな要因となっている。

本研究班の成果として、mRNAの発現パターンを指標として、うつ病を健康成人および統合失調症から識別できること、および治療経過にそった変化が捉えられることが得られている。よって統合失調症においても同様に、白血球内のmRNAが、特有の発現パターンを示すことを見出せる可能性がある。本研究においては、うつ病とは異なるチップを用いているが、そのチップはヒトのmRNAを網羅したものであり、よりスクリーニングに適していると考えられる。しかし、チップ間の結果が完全に一致するわけではないことから、大きく発現レベルが動く生物学的なマーカーのスクリーニングとして有用であると考えられる。本年度、昨年度に得られた結果をもとに、発現レベルに変化のあったmRNAに関して、それぞれのサンプル(統合失調症38例、健常者36例)についてリアルタイムPCR法などを用いて結果の確認をする必要があった。しかし、分担研究者である橋本の異動

により、必要な実験機器が異動先になかったため、実際に検討することができなかったことは大変残念なことである。しかし、新たにもっとも重要であると考えられるサンプル収集を行うシステムを大阪大学にて立ち上げたことは、今後、実験機器が配備されれば、研究を進めることを可能としたといえる。今後、主任研究者である大森哲郎教授にサンプルを送ることにより共同研究を進めていく予定である。

E. 結論

ヒトの遺伝子産物を網羅的に測定できるDNAチップを用い、統合失調症の新しい評価方法の確立を目指して研究を行った。順調に研究がすすみ、ある程度の結果が出つつある。

本研究は先端的かつ独創的なものであるが、一方で患者負担は少量通常採血のみであり、統合失調症評価への臨床応用が現実的である。プライマリーケア、健康診断、精神科診療施設などの場で早期診断、病態評価および治療評価に応用可能である。統合失調症の診断や治療に客観的な指標の導入を実現させることが期待され、社会的・医療行政的意義は大きい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Hashimoto R, Hashimoto H, Shintani N, Chiba S, Hattori S, Okada T, Nakajima M, Tanaka K, Kawagishi N, Nemoto K, Mori T, Ohnishi T, Noguchi H, Hori H, Suzuki T, Iwata

N, Ozaki N, Nakabayashi T, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Weinberger DR, Kunugi H, Baba A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is associated with schizophrenia, *Mol Psychiatry* (in press).

2. Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa T, Yamanaka H, Maeno H, Wada K, Kunugi H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi, *Behavioural Brain Research*, (in press).

3. Mori T, Ohnishi T, Hashimoto R, Nemoto K, Moriguchi Y, Noguchi H, Nakabayashi T, Hori H, Harada S, Saitoh O, Matsuda H, Kunugi H. Progressive changes of white matter integrity in schizophrenia revealed by diffusion tensor imaging, *Psychiatry Research: Neuroimaging*, (in press).

4. Numata S, Ueno S, Iga J, Yamauchi K, Hongwei S, Hashimoto R, Takeda M, Kunugi H, Itakura M, Ohmori T. Gene expression in the peripheral leukocytes and association analysis of PDLIM5 gene in schizophrenia, *Neurosci Lett*, in press.

5. Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Nuripa A, Kida T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Akatsu H, Kosaka K, Funakoshi E,

- Nishitomi K, Sakaguchi G, Kato A, Hattori H, Uema T, Takeda M. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between {beta}-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*, 16:15-23, 2007.
6. Hong K, Sugawara Y, Hasegawa H, Hayasaka I, Hashimoto R, Ito S, Inoue-Murayama M. A new gain-of-function allele in chimpanzee tryptophan hydroxylase 2 and the comparison of its enzyme activity with that in humans and rats, *Neurosci Lett*, 412:195-200, 2007.
 7. Hashimoto R, Numakawa T, Ohnishi T, Kumamaru E, Yagasaki Y, Ishimoto T, Mori T, Nemoto K, Adachi N, Izumi A, Chiba S, Noguchi H, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Kamiya A, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Weinberger DR, Sawa A, Kunugi H. Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology, and ERK signaling. *Hum Mol Genet*, 15:3024-3033, 2006.
 8. Hashimoto R, Hattori S, Chiba S, Yagasaki Y, Okada T, Kumamaru E, Mori T, Nemoto K, Tani H, Hori H, Noguchi H, Numakawa T, Ohnishi T, Kunugi H. Susceptibility genes for schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*, 60: S4-S10, 2006.
 9. Ohnishi T, Hashimoto R, Mori T, Nemoto K, Moriguchi Y, Iida H, Yamada M, Noguchi H, Nakabayashi T, Hori H, Ohmori M, Tsukue R, Anami K, Hirabayashi N, Harada S, Arima K, Saitoh O, Kunugi H. The association between the Val158Met polymorphism of the Catechol-O-methyl transferase gene and morphological abnormalities of the brain in chronic schizophrenia. *Brain*, 129:399-410, 2006.
 10. Okada T, Hashimoto R, Numakawa T, Iijima Y, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Kato T, Kunugi H. A complex polymorphic region in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene confers susceptibility to bipolar disorder and affects transcriptional activity. *Mol Psychiatry*, 11:695-703, 2006.
 11. Masui T, Hashimoto R, Kusumi I, Suzuki K, Tanaka T, Nakagawa S, Kunugi H, Koyama T. A possible association between -116C/G single nucleotide polymorphism of XBP1 gene and lithium prophylaxis in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 9(1):83-88, 2006.
 12. Chiba S, Hashimoto R, Hattori S, Yohda M, Lipska B, Weinberger DR, Kunugi H. Effect of antipsychotic drugs on DISC1 and dysbindin expression in mouse frontal cortex and hippocampus. *J Neural Transm*, 113:1337-1346, 2006

13. Masui T, Hashimoto R, Kusumi I, Suzuki K, Tanaka T, Nakagawa S, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Kato T, Kunugi H, Koyama T. Lithium response and Val66Met polymorphism of the BDNF gene in Japanese patients with bipolar disorder. *Psychiatr Genet*, 16(2):49-50, 2006.
14. Kunugi H, Hashimoto R, Okada T, Hori H, Nakabayashi T, Baba A, Kudo K, Ohmori M, Takahashi S, Tsukue R, Anami K, Hirabayashi N, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Asada T, Harada S, Arima K, Saitoh O. Possible association between nonsynonymous polymorphisms of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene and schizophrenia in a Japanese population. *J Neural Transm*, 113:1569-1573, 2006.
15. Hori H, Noguchi H, Hashimoto R, Nakabayashi T, Omori M, Takahashi S, Tsukue R, Anami K, Hirabayashi N, Harada S, Saitoh O, Iwase M, Kajimoto O, Takeda M, Okabe S, Kunugi H. Antipsychotic medication and cognitive function in schizophrenia. *Schizophr Res*, 86:138-146, 2006.
16. Law AJ, Lipska BK, Weickert CS, Hyde TM, Straub RE, Hashimoto R, Harrison PJ, Kleinman JE, Weinberger DR. Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17): 6747-6752, 2006.
17. Nemoto K, Ohnishi T, Mori T, Moriguchi Y, Hashimoto R, Asada T, Kunugi H. The Val66Met polymorphism of the BDNF gene affects age-related brain morphology. *Neurosci Lett* 397(1-2):25-29, 2006.
18. Kumamoto N, Matsuzaki S, Inoue K, Hattori T, Shimizu S, Hashimoto R, Yamatodani A, Katayama T, Tohyama M. Hyperactivation of Midbrain Dopaminergic System in Schizophrenia could be attributed to the Down-regulation of Dysbindin. *Biochem Biophys Res Commun*, 345:904-909, 2006.
19. Tanaka K, Shintani N, Hashimoto H, Kawagishi N, Ago Y, Matsuda T, Hashimoto R, Kunugi H, Yamamoto A, Kawaguchi C, Shimada T, Baba A. Psychostimulant-induced attenuation of hyperactivity and prepulse inhibition deficits in *Adcyap1*-deficient mice. *J Neurosci*. 26(19):5091-5097, 2006.
20. Nakahachi T, Iwase M, Takahashi H, Honaga E, Sekiyama R, Ukai S, Ishii, R, Ishigami W, Kajimoto O, Yamashita K, Hashimoto R, Shimizu A, Takeda M. Discrepancy of performance among working memory related tasks in autism spectrum disorders was caused by task characteristics except working