

(SAM) by DNA methyltransferase (DNMT) enzymes. Methylation of the promoter region of genes is generally associated with the inhibition of transcription factor binding to *cis*-acting regulatory sequences and the recruitment of repressor complexes, including methyl CpG binding proteins (MBDs), resulting in transcriptional repression [9, 10]. Histone modifications confer what has been called a ‘histone code’ on the genome, defining parts of the genome that are accessible to transcription in a given tissue type at a given time [11]. For example, acetylation of the ninth lysine residue on histone 3 (H3–K9) is classically associated with active transcription and open chromatin [12]. The role of histone methylation is less clear, as it can either enhance or repress transcription depending on the histone modified [8]. Because enzymes that deacetylate histones (HDACs) are known to recruit transcriptional repressors, such as MBDs, patterns of methylation and acetylation are intimately linked. Pharmacological manipulations, including drugs of abuse, such as cocaine and alcohol, as well as a mood stabilizer, such as valproate, have been shown to modulate chromatin function by influencing the activity of these enzymes. Recent evidence also suggests that chromatin remodeling as a result of environmental perturbations plays a role postnatally in processes that affect behavior.

In this review, evidence suggesting that epigenetic factors might influence the development of mood disorders, such as depression and bipolar disorder, are introduced.

Epigenetic studies relevant to depression

Clinical evidence suggesting the role of epigenetics in depression

Depression is not only one of the most prevalent causes of mental suffering [13, 14] but also places an enormous economic burden on society [15]. The accumulated evidence from epidemiological studies suggests that genetic predispositions interact with the environment in potentiating depression [16, 17]. Aversive life events potentiate depression in some individuals and resiliency in others. Such interindividual variation may be mediated by variations of neurotrophic and neurotransmitter systems. A polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) coding region, producing pro-BDNF with either a methionine or a valine in position 66, has been associated with depression in several populations [18, 19]. With respect to neurotransmitter systems, particular emphasis has been placed on serotonin dysfunction in depression. For example, individuals carrying a common short variant of a repetitive sequence in the serotonin transporter gene in a region controlling transcription (5-HTTLPR, the

serotonin transporter gene-linked polymorphic region) show increased neuroticism or harm avoidance relative to individuals homozygous for the long variant of the 5-HTTLPR. There is some controversy as to whether or not the polymorphic region confers greater risk of depression per se. A longitudinal study found that individuals carrying the short 5-HTTLPR variant showed more depressive symptoms as a function of stressful life events, while the carriers of the long 5-HTTLPR variant did not show increase of depression associated with stress. This result suggested a possible gene environmental interaction [20], although this is still controversial [21]. In the brain, these changes might be reflected in differential functional connectivity between areas, including the hippocampus, as a function of life stress [22].

Finally, there is evidence in a variety of species, including humans, nonhuman primates, and rodents, that early postnatal care (or early life stress) influences the risk for depression in adulthood. In humans, there is considerable evidence that early childhood abuse or neglect increases the risk of depression as well as other psychopathologies [23–25]. Patterns of abuse and neglect may be transmitted intergenerationally from mother to daughter in both humans and in non-human primates [26]. In rhesus macaques, infants cross-fostered from non-abusive mothers to abusive mothers, and infants cross-fostered from abusive mothers to non-abusive mothers showed levels of abuse in adulthood similar to that of their adoptive mothers, suggesting transmission via an epigenetic mechanism that remains to be defined [27]. Other studies have shown that early childhood adversity in humans [17] and non-human primates [28] enhances stress reactivity in adulthood. These data imply that resiliency to stress has a protective effect against depression. Similar studies in rodents have recently shed light on possible molecular mechanisms of these effects.

Epigenetic regulation of stress vulnerability in rodents

The laboratories of Michael Meaney and Moshe Szyf, working with a rodent model of maternal care, were the first to demonstrate a mechanism of epigenetic regulation of stress [12]. In rats, naturally occurring variations in maternal care have been shown to regulate the expression of the glucocorticoid receptor (GR) in the hippocampus of offspring. This effect is stable into adulthood, and recent evidence suggests that it is epigenetically regulated [6]. Rat mothers show large individual differences in licking and grooming (LG) of pups during the first week of life. Pups reared by ‘high’ LG mothers (at least 1 SD above the mean) show less anxiety-like behavior and a more rapid recovery from stress than do pups reared by ‘low’ LG (at

least 1 SD below the mean) mothers [29]. Interestingly, these differences appear to be transmitted non-genomically, as female pups exhibit maternal behavior characteristic of their foster mother [30]. In addition, pups from high LG litters cross-fostered to low LG litters, and vice versa, exhibit behavioral and physiological responses to stress in adulthood that are characteristic of their foster environment [30]. These effects are mediated, at least in part, by alterations in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis function, including enhanced glucocorticoid negative feedback sensitivity due to an increase in GR in the offspring of high LG mothers. Glucocorticoid receptor expression is regulated at the level of RNA, through splice variation in the 5' untranslated region (UTR) of exon 1 [31].

Alterations in maternal behavior are associated with alterations in the expression of GR, including differences in the expression of the exon 1₇ transcript [31, 32]. DNA methylation of the GR1₇ promoter has recently been shown to be greater in the offspring of low LG mothers than in those of high LG mothers [6]. These differences in DNA methylation emerge during the first week of life in parallel with differences in maternal behavior, and they are remarkably stable into adulthood. Nevertheless, this epigenetic programming is reversible by pharmacological manipulations later in life. Specifically, infusion of Trichostatin A (TSA), an HDAC inhibitor, eliminated the hypermethylation of GR1₇ in rats from low LG litters [6], whereas central infusion of the methyl donor L-methionine enhanced the methylation of GR1₇ in rats from high LG litters [33]. These data provide a first example of epigenetic programming by the social environment and suggest that DNA methylation may be malleable in postmitotic neurons.

Role of histone modification in antidepressive treatment action

A complete understanding of the mechanisms of action of common physiological interventions used to treat depression, including monoamine oxidase (MAO) inhibitors, tricyclic antidepressants, such as imipramine, and electroconvulsive shock (ECS) therapy has remained elusive, in part because of the relative stability of symptoms and the delayed behavioral response to treatment with these methods [8]. All antidepressants are known to increase levels of monoamine neurotransmitters at the synapse [34]. In addition, several treatments have recently been implicated in chromatin remodeling. For example, the histone demethylase BHC110/LSD1, which bears a strong sequence homology with MAO, was shown to target dimethyl Histone 3 at lysine 4 (H3K9) for demethylation *in vitro* [35]. Furthermore, transcriptional activity at genes targeted by BHC110 was enhanced by increases in

dimethyl H3K9. These results implicate epigenetic mechanisms in the activity of MAO inhibitors.

Eric Nestler and colleagues have experimental documentation of the associations between histone modifications and changes in behavioral function in response to antidepressant treatment and ECS in the hippocampus of rodents, a brain region implicated in depression [8, 36, 37]. In mice subjected to chronic social defeat stress, chronically administered imipramine produced a selective hyperacetylation of histone H3 at the BDNF III and BDNF IV promoters as well as increased H3K4 dimethylation at the BDNF III promoter [37]. These changes were concomitant with an enhancement of BDNF transcription in these mice. In contrast, such hyperacetylation was not observed in nondefeated control mice. In addition, levels of the histone deacetylase HDAC5 decreased and HDAC9 increased with social defeat stress in imipramine-treated mice relative to controls, whereas drug treatment or stress alone had no effect. Finally, the overexpression of HDAC5 blocked the effect of imipramine in the social defeat paradigm. Thus, although BDNF expression increased in both the control and the socially defeated mice, the observed histone and HDAC modifications with imipramine treatment occurred only in the context of social defeat stress. The data provide a new explanation for the delayed onset of action of antidepressants in the treatment of depression. It should be noted that an observed increase in dimethylation of H3K27 as a result of social defeat stress was not reversed by imipramine.

In another study, Tsankova et al. [36] examined histone modification 30 min, 2 h and 24 h after acute or repeated ECS in rats. These researchers observed significant differences in the levels of H4 acetylation in both the c-Fos and cAMP regulatory element binding protein (CREB) promoter regions, and a significant decrease in acetylated H4 after 24 h in the chronic ECS only, together with decreases in expression. Electroconvulsive shock leads to H3 phosphoacetylation in the c-Fos promoter in both the acute and chronic conditions, but only in the chronic condition for the BDNF. The regulation of BDNF also differed between chronic and acute ECS conditions. For the BDNF II promoter, acetylated H4 decreased significantly 24 h after chronic ECS treatment, whereas during the same time interval there was an increase in acetylated H4 in the acute condition. However, there was no change in the levels of acetylated H4 in the BDNF II promoter. In addition, in the chronic condition only, phosphoacetylated H3 increased in the BDNF II promoter but decreased in the BDNF III promoter. These changes accompanied increased transient levels of mRNA in the acute condition and 24 h after the chronic condition. Interestingly, acetylated H3 was observed only in the chronic ECS condition for both the BDNF II and BDNF III promoters. These differences in

histone modifications accompanying acute versus chronic ECS may be instructive because the stimulus was identical and differed only in the frequency of its application. Much as is the case of antidepressant medication, a significant response to ECS treatment in depression depends upon chronic administration in patients. The findings demonstrate that several long-lasting histone modifications occur in response to chronic ECS conditions, leading to long-term effects on gene regulation. In addition, the histone modifications that accompanied ECS were idiosyncratic – not only to the type of ECS treatment but also dependent on the gene promoter analyzed. These results provide further credence to the aforementioned notion that a histone code of specific modifications determines the regulation of a specific gene (and of specific promoters within a given gene [11]). The characterization of this histone code for other genes affected by depression should lead to further advances in treatment.

Epigenetics in bipolar disorder

Genomic imprinting

In the genomic imprinting phenomenon, a maternally or paternally transmitted allele is inactivated by DNA methylation and hemiallelic expression is observed. Many imprinted genes are related to development. Transmission patterns of genetic diseases caused by the mutation of imprinted genes are complex, because their influence on offspring depends on the gender of the parent who transmitted the mutated allele. Such gender differences of transmission observed in the transmission of diseases caused by mutations of imprinted genes are referred to as a parent-of-origin effect (POE) [38–40].

Bipolar disorder may be transmitted from a mother more often than from a father [40]. When bipolar disorder is transmitted from the father, the offspring tends to have a more severe form of the illness [41] and an earlier age of onset [42] than when it is transmitted from the mother; in addition, there is a higher prevalence with the former [43]. Based on evidence suggesting the role of genomic imprinting in bipolar disorder, Gershon et al. [44] performed a linkage analysis in which they assessed the gender of the transmitting parent. These researchers found a linkage with chromosome 18 only in paternal transmission. Nothen et al. [45] confirmed that the linkage of bipolar disorder with 18p11.2 could only be seen in paternally inherited pedigrees, and McInnis et al. [46] reported that they observed linkage with 18q22 only in paternally transmitted pedigrees.

These pieces of evidence prompted the search for imprinted genes on chromosome 18. Corradi et al. [47] found that GNAL at 18p11.2, which encodes a G protein

alpha subunit, may be a candidate of an imprinted gene. Although they showed that the promoter region of this gene is methylated, no evidence of allele specific methylation was shown.

Recent linkage analyses have used software to calculate the linkage based on the assumption of paternal or maternal imprinting. Such studies have detected several additional linkage loci suggestive of imprinting: 13q12, 1q41 [46], 2p24-21, 2q31-q32, 14q32, and 16q21-q23 [48]. Transmission disequilibrium tests in trio samples also revealed the association of several genes when the gender of the transmitting parent was taken into consideration [49, 50]. None of these linkages or findings in association studies suggestive of imprinting have as yet been validated by molecular biological experiments to show allele-specific expression or methylation. Apparent POE does not always represent genomic imprinting but can be caused by several mechanisms [40]. Indeed, although we found the association of polymorphisms of HSPA5 at 9q33-34.1 with bipolar disorder only in paternal transmission, this gene showed biallelic expression in the brain, which ruled out the possibility that HSPA5 is imprinted in the brain, at least in the prefrontal cortex [51].

Using a machine learning approach, Luedi et al. searched for imprinted genes in the mouse genome and reported that several genes on the candidate loci of bipolar disorder (13q13 and 18q22) might be imprinted [52]. However, this prediction also awaits experimental validation. In addition, DNA methylation status may differ between mice and humans.

In summary, genomic imprinting in bipolar disorder has only been suggested by statistical genetics and, to date, there has been no molecular biological evidence to support this possibility.

None of the findings in linkage analysis and genetic association studies in bipolar disorder have been consistently replicated. One possible explanation for the lack of consistency is false positive findings due to multiple statistical testings. It should be cautioned that an analysis considering the possibility of genomic imprinting not only provides a clue to understanding the pathophysiology of the illness but also increases the probability of false positive results, if the results are not adequately validated by experiments.

Pharmacology

Lithium is the best established mood stabilizer, having antimanic, antidepressive, and prophylactic effects on bipolar disorder. Valproate is the next most widely used mood stabilizer, having robust antimanic effects, putative prophylactic effects, but no antidepressive effects.

Although the mechanism of action of valproate on bipolar disorder remains controversial, HDAC inhibition is proposed as one of mechanisms [53]. Neuroprotective effects are common to these two major mood stabilizers, lithium and valproate [54], and the neuroprotective effect of valproate may be mediated by HDAC inhibition [55, 56]. Valproate also enhances neuronal differentiation in neural progenitor cells by HDAC inhibition [57]. These findings suggest a possible role of histone acetylation, which is coupled with DNA methylation, in the pathophysiology of bipolar disorder. However, the role of other mechanisms, for example inositol depletion and the increase of bcl-2 on the mitochondrial membrane, have also been suggested, and it is still not known whether HDAC inhibition is crucial for the effect of valproate on bipolar disorder.

S-adenosyl methionine supplies a methyl residue in a DNA methylation reaction. Many studies have found SAM to have antidepressive effects [58]. Interestingly, Carney et al. [59] reported that nine of 11 patients with bipolar depression treated with SAM switched to mania, suggesting a specific effect of SAM on bipolar depression. As mentioned above, central infusion of L-methionine, a precursor of SAM, increased DNA methylation of the promoter of the GR gene. Methionine treatment was found to abolish the effect of a high LG mother on the offspring, as shown by the decreased DNA methylation status of GR and the inhibition of behavioral despair [33]. The fact that SAM, which similarly enhances DNA methylation, is effective in the treatment of depression is apparently contradictory to the effect of methionine. S-adenosyl methionine is a methyl-residue donor not only for the DNA methylation reaction but also for other enzymatic reactions. For example, creatine is produced from SAM and guanidinoacetate, and SAM treatment increases the phosphocreatine level in the brain [60]. This effect may also contribute to the antidepressive effect of SAM because decreased phosphocreatine levels have been reported in bipolar depression [61].

The antimanic effect of valproate, which inhibits HDAC and decreases DNA methylation, and the antidepressant effect of SAM, which increases DNA methylation, together indirectly suggest a role for DNA methylation in the symptoms of mania and depression in bipolar disorder. However, this is still a preliminary hypothetical mechanism, and to date there has been no study focusing on the role of DNA methylation in mania and depression.

DNA methylation analysis in postmortem brains

Abdolmaleky et al. recently examined the DNA methylation status of the promoter of membrane-bound catechol-O-methyltransferase (COMT) [62], an enzyme which

regulates the level of dopamine and which is regarded as a candidate gene in bipolar disorder. A methionine to valine substitution at site 158 (Val158Met), which alters enzyme activity, was reported to be associated with bipolar disorder [63, 64], although this result is still controversial [65]. The COMT gene has two promoters, each generating its own mRNA isoform: the membrane-bound isoform (MB-COMT) and the soluble isoform (S-COMT), respectively. Abdolmaleky et al. [62] examined the methylation status of the MB-COMT promoter in the prefrontal cortex (Brodmann's area 46) by means of a methylation-specific PCR analysis. Although this region of the genome was predominantly unmethylated, a weak methylation signal could be detected. While 60% of 35 controls in the Stanley Microarray Collection samples showed some PCR product obtained from the methylated allele, only 29% of 35 patients with bipolar disorder and 26% of 35 patients with schizophrenia showed a methylation signal. This difference was statistically significant. Subjects with a methylation signal showed significantly lower expression levels of MB-COMT than those not showing a methylation signal in postmortem brain samples obtained from the Harvard Brain Tissue Resource Center [62]. This study suggested the possible role of hypomethylation of the promoter of MB-COMT in bipolar disorder and schizophrenia.

In contrast, Dempster et al. [66] analyzed the DNA methylation status of the promoter of S-COMT using Pyrosequencing in 60 postmortem brain samples obtained from the Stanley Neuropathology Consortium. These researchers analyzed two CpG sites, site 1 and site 2, corresponding to cytosine 27 and 23, respectively, of an earlier study [67] because these two sites, among the six sites studied, were found to be partially methylated in many brain regions. Site 1 showed 45.4% methylation, while site 2 showed 34.5% methylation. Dempster et al. [66] found that although the methylation status of the two CpG sites analyzed showed a high correlation ($r = 0.8$, $P < 0.001$), there was no difference in DNA methylation status between diagnoses, and DNA methylation status was not correlated with the mRNA level of COMT.

DNA methylation differences between discordant twins

In spite of extensive linkage and association studies of bipolar disorder during the past two decades, the results are still not conclusive. No causative gene nor genetic risk factor has been established for bipolar disorder. In an attempt to identify the molecular pathogenesis of bipolar disorder, we have been focusing on monozygotic twins discordant for bipolar disorder.

Within this framework, we performed gene expression analysis of lymphoblastoid cell lines obtained from two

pairs of monozygotic twins discordant for bipolar disorder and found that 17 genes, including XBP1, HSPA5, ECGF1, and ATF5, were commonly down-regulated in both of the twins. Because XBP1 is an endoplasmic reticulum (ER) stress response-related transcription factor which regulates HSPA5, we focused on XBP1 [68]. Although we initially reported that a functional polymorphism of XBP1 was associated with bipolar disorder, this association was not replicated in subsequent studies [69, 70]. We also reported a weak but significant association of bipolar disorder with HSPA5 [51]. The induction of XBP1 upon ER stress was diminished in lymphoblastoid cells derived from patients with bipolar disorder [68]; this result was recently replicated in a larger number of samples [71], supporting the role of the ER stress pathway in bipolar disorder.

More recently, Matigian et al. [72] performed a gene expression analysis in three pairs of monozygotic twins discordant for bipolar disorder. These researchers suggested that the WNT pathway is altered in bipolar disorder. While they did not demonstrate the down-regulation of XBP1 and HSPA5 in these three pairs of monozygotic twins discordant for bipolar disorder, they did show the down-regulation of ECGF1 and ATF5 [72]. ATF5 may also be related to the ER stress pathway and interact with DISC1, the most established causative gene for schizophrenia and mood disorders. However, our single nucleotide polymorphism (SNP) analysis did not support the association of ATF5 with bipolar disorder [73].

We postulated that the observed differences in gene expression between twins might be caused by a difference in DNA methylation status [74]. Although it has been reported that differences in DNA methylation were observed between monozygotic twins discordant for schizophrenia [75–77], there have been no such studies in bipolar disorder. The DNA methylation status of XBP1 did not differ between twins [68]; therefore, we began a comprehensive search for genes showing differential DNA methylation patterns between discordant twins. To this end, we employed a molecular biological technique developed by Ushijima and colleagues [78], called MS-RDA (methylation-sensitive representational difference analysis), which was initially developed to search for genes differentially methylated in cancer tissue. This method, which consists of digestion by methylation-sensitive restriction enzyme and subsequent subtraction, is able to selectively amplify differentially methylated genomic regions. This method had been used for the detection of differentially methylated genes from a pair of genomic DNAs obtained from one individual, one sampled from cancer tissue and the other from neighboring normal tissue. These DNAs had the same genomic sequences but different DNA methylation statuses. This method cannot be used for a case control analysis because DNA sequence differences complicate the

results. However, this method can be used for the analysis of monozygotic twins having the same genomic sequences. Applying this method to a pair of monozygotic twins discordant for bipolar disorder, we isolated ten DNA fragments derived from CpG islands or putative promoters [79]. Among these ten fragments, DNA methylation differences in four regions was confirmed by bisulfite sequencing between the bipolar twin and control co-twin. Fraga et al. [80] reported that DNA methylation differences between monozygotic twins increase with age. Consequently, the differences in DNA methylation in discordant twins may not always be related to the pathophysiology of the illness.

To test the pathophysiological significance of DNA methylation, Kuratomi et al. [79] performed a case control analysis using Pyrosequencing and found an altered DNA methylation status of spermine synthase (SMS) in female patients with bipolar disorder. However, DNA methylation had increased in the bipolar patients, while it had decreased in the bipolar twin. On the other hand, this case control analysis also found a decreased methylation status of PPIEL (peptidylprolyl isomerase E-like) in the affected twin and patients with bipolar II disorder. The DNA methylation status of PPIEL was significantly correlated with its mRNA expression level ($R = -0.81$) and also with the DNA methylation levels in peripheral leukocytes ($R = 0.41$). Because PPIEL is a primate-specific gene, further analysis is not easy. However, we found that mRNA levels of PPIEL were lower in the frontal cortex and hippocampus and highest in the substantia nigra and pituitary gland [79]. These findings suggest that this gene may be involved in dopaminergic neurotransmission and/or neuroendocrine systems. Although it is not known whether the reduced DNA methylation status of PPIEL is a causative factor for bipolar II disorder or the result of the disease, it may in some way be related to the pathophysiology of the illness.

Discussion

As summarized above, epigenetic studies of bipolar disorder have just begun. The results of clinical genetic studies carried out to date suggest the role of genomic imprinting, but no study has yet been reported that directly tests this hypothesis. Pharmacological studies imply that pharmacological manipulation of DNA methylation status might alter mood states, but this has also not been tested experimentally in humans. There have been several studies recently that directly examine the DNA methylation status in samples obtained from patients.

In the case of schizophrenia, the results of DNA methylation analyses of RELN (reelin gene) in postmortem brains are not concordant. Two groups reported increased methylation in schizophrenia [81, 82], but two groups did

not [83, 84]. This discrepancy could be caused by methodological problems, such as the process of sodium bisulfite treatment, PCR bias, or cloning bias. Several studies used the methylation-specific PCR method, which has been successfully used for other applications, such as the diagnosis of imprinting [85] or the detection of hypermethylation in cancer [86]. Although methylation-specific PCR would be useful to analyze such “all-or-none” phenomena, it might not be ideal for the quantitative analysis of DNA methylation in the study of psychiatric illness. For the quantitative analysis of a large number of clinical samples, Pyrosequencing analysis of bisulfite-treated DNA [66, 79] or real-time PCR quantification of DNA digested by a methylation-sensitive restriction enzyme [83] would, in practical terms be useful approaches. Although none of these studies have used serially diluted standard samples to calibrate the DNA methylation levels, such approach may also be useful to obtain reliable and reproducible results in future studies.

The nature of the tissue used for DNA methylation analysis is also critical. In the case of lymphoblastoid cell lines, the DNA methylation status can be potentially affected by transformation by the Epstein-Barr virus; consequently, results in lymphoblastoid cells should be interpreted with caution. In the case of DNA methylation analysis in the brain, tissue heterogeneity might potentially affect the results [87] because brain tissue contains many cell types, including neurons and glia. The ideal approach would be to separate specific cell types in the brain, but the amount of DNA required for DNA methylation analysis currently hampers such approaches. Further technical development is necessary for future studies.

Conclusion

Epigenetic studies focusing on mood disorder are very recent developments. The results of several initial findings, however, seem quite promising; such as alterations in DNA methylation of the GR gene associated with maternal care and stress vulnerability, altered histone modification associated with antidepressive treatments, altered methylation status of COMT in the brains of patients with bipolar disorder and altered DNA methylation status of PPIEL in lymphoblastoid cells of patients with bipolar disorder. Further studies are needed to clarify the biological basis and pathophysiological significance of these findings.

References

1. Mill J, Petronis A. Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. *Mol Psychiatry*. 2007;12:799–814.
2. Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem*. 2001;276:40778–87.
3. Detich N, Theberge J, Szyf M. Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem*. 2002;277:35791–4.
4. Bruniquel D, Schwartz RH. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol*. 2003;4:235–40.
5. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*. 2003;302:890–3.
6. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*. 2004;7:847–54.
7. Meaney MJ, Szyf M. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? *Trends Neurosci*. 2005;28:456–63.
8. Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8:355–67.
9. Razin A, Razin S. Methylated bases in mycoplasmal DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980;8:1383–90.
10. Comb M, Goodman HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:3975–82.
11. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293:1074–80.
12. Szyf M. DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70:533–49.
13. Regier DA, Boyd JH, Burke JD Jr, Rae DS, Myers JK, Kramer M, Robins LN, George LK, Karno M, Locke BZ. One-month prevalence of mental disorders in the United States. Based on five epidemiologic catchment area sites. *Arch Gen Psychiatry*. 1988;45:977–86.
14. Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62:617–27.
15. Murray CJL, Lopez AD. The global burden of disease. World Health Organization, Geneva, 1998.
16. Monroe SM, Simons AD, Thase ME. Onset of depression and time to treatment entry: roles of life stress. *J Consult Clin Psychol*. 1991;59:566–73.
17. Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, MacLean C, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatry*. 1995;152:833–42.
18. Castren E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4:58–64.
19. Castren E, Voikar V, Rantamaki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7:18–21.
20. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 2003;301:386–9.
21. Surtees PG, Wainwright NW, Willis-Owen SA, Luben R, Day NE, Flint J. Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2006;59:224–9.
22. Canli T, Qiu M, Omura K, Congdon E, Haas BW, Amin Z, Herrmann MJ, Constable RT, Lesch KP. Neural correlates of epigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:16033–8.
23. Bebbington PE, Bhugra D, Brugha T, Singleton N, Farrell M, Jenkins R, Lewis G, Meltzer H. Psychosis, victimisation and childhood disadvantage: evidence from the second British

- National Survey of Psychiatric Morbidity. *Br J Psychiatry*. 2004;185:220–6.
24. Kaffman A, Meaney MJ. Neurodevelopmental sequelae of post-natal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *J Child Psychol Psychiatry*. 2007;48:224–44.
 25. Mullen PE, Martin JL, Anderson JC, Romans SE, Herbison GP. The long-term impact of the physical, emotional, and sexual abuse of children: a community study. *Child Abuse Negl*. 1996;20:7–21.
 26. Maestripieri D. The biology of human parenting: insights from nonhuman primates. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999;23:411–22.
 27. Maestripieri D. Early experience affects the intergenerational transmission of infant abuse in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:9726–9.
 28. Sanchez MM. The impact of early adverse care on HPA axis development: nonhuman primate models. *Horm Behav*. 2006;50:623–31.
 29. Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:5335–40.
 30. Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*. 1999;286:1155–8.
 31. McCormick JA, Lyons V, Jacobson MD, Noble J, Diorio J, Nyir-enda M, Weaver S, Ester W, Yau JL, Meaney MJ, Seckl JR, Chapman KE. 5'-heterogeneity of glucocorticoid receptor messenger RNA is tissue specific: differential regulation of variant transcripts by early-life events. *Mol Endocrinol*. 2000;148:506–17.
 32. Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*. 1989;50:597–604.
 33. Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci*. 2005;25:11045–54.
 34. Hyman SE. Even chromatin gets the blues. *Nat Neurosci*. 2006;9:465–6.
 35. Lee MG, Wynder C, Schmidt DM, McCafferty DG, Shiekhhattar R. Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chem Biol*. 2006;13:563–7.
 36. Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci*. 2004;24:5603–10.
 37. Tsankova NM, Bertone O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*. 2006;9:519–25.
 38. Grigoriou-Serbanescu M. A trial to apply the concept of genomic imprinting to the manic-depressive illness. *Rom J Neurol Psychiatry*. 1992;30:265–77.
 39. Kato T, Winokur G, Coryell W, Keller MB, Endicott J, Rice J. Parent-of-origin effect in transmission of bipolar disorder. *Am J Med Genet*. 1996;67:546–50.
 40. McMahon FJ, Stine OC, Meyers DA, Simpson SG, DePaulo JR. Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet*. 1995;56:1277–86.
 41. Grigoriou-Serbanescu M, Nothen M, Propping P, Poustka F, Magureanu S, Vasilescu R, Marinescu E, Ardelean V. Clinical evidence for genomic imprinting in bipolar I disorder. *Acta Psychiatr Scand*. 1995;92:365–70.
 42. Grigoriou-Serbanescu M, Wickramaratne PJ, Hodge SE, Milea S, Mihailescu R. Genetic anticipation and imprinting in bipolar I illness. *Br J Psychiatry*. 1997;170:162–6.
 43. Kornberg JR, Brown JL, Sadovnick AD, Remick RA, Keck PE Jr, McElroy SL, Rapaport MH, Thompson PM, Kaul JB, Vrabell CM, Schommer SC, Wilson T, Pizzuco D, Jameson S, Schibuk L, Kelsoe JR. Evaluating the parent-of-origin effect in bipolar affective disorder. Is a more penetrant subtype transmitted paternally? *J Affect Disord*. 2000;59:183–92.
 44. Gershon ES, Badner JA, Detera-Wadleigh SD, Ferraro TN, Berrettini WH. Maternal inheritance and chromosome 18 allele sharing in unilineal bipolar illness pedigrees. *Am J Med Genet*. 1996;67:202–7.
 45. Nothen MM, Cichon S, Rohleder H, Hemmer S, Franzek E, Fritze J, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Kreiner R, Weigelt B, Minges J, Lichtermann D, Maier W, Craddock N, Fimmers R, Holler T, Baur MP, Rietschel M, Propping P. Evaluation of linkage of bipolar affective disorder to chromosome 18 in a sample of 57 German families. *Mol Psychiatry*. 1999;4:76–84.
 46. McInnis MG, Lan TH, Willour VL, McMahon FJ, Simpson SG, Addington AM, MacKinnon DF, Potash JB, Mahoney AT, Chellis J, Huo Y, Swift-Scanlan T, Chen H, Koskela R, Stine OC, Jamison KR, Holmans P, Folstein SE, Ranade K, Friddle C, Botstein D, Marr T, Beaty TH, Zandi P, DePaulo JR. Genome-wide scan of bipolar disorder in 65 pedigrees: supportive evidence for linkage at 8q24, 18q22, 4q32, 2p12, and 13q12. *Mol Psychiatry*. 2003;8:288–98.
 47. Corradi JP, Ravyn V, Robbins AK, Hagan KW, Peters MF, Boštwick R, Buono RJ, Berrettini WH, Furlong ST. Alternative transcripts and evidence of imprinting of GNAL on 18p11.2. *Mol Psychiatry*. 2005;10:1017–25.
 48. Cichon S, Schumacher J, Müller DJ, Hurter M, Windemuth C, Strauch K, Hemmer S, Schulze TG, Schmidt-Wolf G, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Franzek E, Lanczik M, Fritze J, Kreiner R, Reuner U, Weigelt B, Minges J, Lichtermann D, Lerer B, Kanyas K, Baur MP, Wienker TF, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM. A genome screen for genes predisposing to bipolar affective disorder detects a new susceptibility locus on 8q. *Hum Mol Genet*. 2001;10:2933–44.
 49. Muglia P, Petronis A, Mundo E, Lander S, Cate T, Kennedy JL. Dopamine D4 receptor and tyrosine hydroxylase genes in bipolar disorder: evidence for a role of DRD4. *Mol Psychiatry*. 2002;7:860–6.
 50. Borglum AD, Kirov G, Craddock N, Mors O, Muir W, Murray V, McKee I, Collier DA, Ewald H, Owen MJ, Blackwood D, Kruse TA. Possible parent-of-origin effect of Dopa decarboxylase in susceptibility to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003;117:18–22.
 51. Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T. Functional polymorphisms of HSPA5: possible association with bipolar disorder. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336:1136–43.
 52. Luedi PP, Hartemink AJ, Jirtle RL. Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res*. 2005;15:875–84.
 53. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*. 2001;276:36734–41.
 54. Chuang DM. The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1053:195–204.
 55. Jeong MR, Hashimoto R, Senatorov VV, Fujimaki K, Ren M, Lee MS, Chuang DM. Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett*. 2003;542:74–8.
 56. Kanai H, Sawa A, Chen RW, Leeds P, Chuang DM. Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses

- excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. *Pharmacogenomics J*. 2004;4:336–44.
57. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:16659–64.
 58. Papakostas GI, Alpert JE, Fava M. S-adenosyl-methionine in depression: a comprehensive review of the literature. *Curr Psychiatry Rep*. 2003;5:460–6.
 59. Carney MW, Chary TK, Bottiglieri T, Reynolds EH. The switch mechanism and the bipolar/unipolar dichotomy. *Br J Psychiatry*. 1989;154:48–51.
 60. Silveri MM, Parow AM, Villafuerte RA, Damico KE, Goren J, Stoll AL, Cohen BM, Renshaw PF. S-adenosyl-L-methionine: effects on brain bioenergetic status and transverse relaxation time in healthy subjects. *Biol Psychiatry*. 2003;54:833–9.
 61. Kato T, Takahashi S, Shioiri T, Murashita J, Hamakawa H, Inubushi T. Reduction of brain phosphocreatine in bipolar II disorder detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord*. 1994;31:125–33.
 62. Abdolmaleky HM, Cheng KH, Faraone SV, Wilcox M, Glatt SJ, Gao F, Smith CL, Shafa R, Aeali B, Carnevale J, Pan H, Papegeorgis P, Ponte JF, Sivaraman V, Tsuang MT, Thiagalingam S. Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet*. 2006;15:3132–45.
 63. Kirov G, Murphy KC, Arranz MJ, Jones I, McCandles F, Kunugi H, Murray RM, McGuffin P, Collier DA, Owen MJ, Craddock N. Low activity allele of catechol-O-methyltransferase gene associated with rapid cycling bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 1998;3:342–5.
 64. Papolos DF, Veit S, Faedda GL, Saito T, Lachman HM. Ultra-ultra rapid cycling bipolar disorder is associated with the low activity catecholamine-O-methyltransferase allele. *Mol Psychiatry*. 1998;3:346–9.
 65. Hosak L. Role of the COMT gene Val158Met polymorphism in mental disorders: a review. *Eur Psychiatry*. 2007;22:276–281.
 66. Dempster EL, Mill J, Craig IW, Collier DA. The quantification of COMT mRNA in post mortem cerebellum tissue: diagnosis, genotype, methylation and expression. *BMC Med Genet*. 2006;7:10.
 67. Murphy BC, O'Reilly RL, Singh SM. Site-specific cytosine methylation in S-COMT promoter in 31 brain regions with implications for studies involving schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;133:37–42.
 68. Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M, Bundo M, Kasahara T, Kusumi I, Tsujita T, Okazaki Y, Nanko S, Kunugi H, Sasaki T, Kato T. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet*. 2003;35:171–5.
 69. Cichon S, Buervenich S, Kirov G, Akula N, Dimitrova A, Green E, Schumacher J, Klopp N, Becker T, Ohlraun S, Schulze TG, Tullius M, Gross MM, Jones L, Krastev S, Nikolov I, Hamshere M, Jones I, Czerski PM, Leszczynska-Rodziewicz A, Kapelski P, Bogaert AV, Illig T, Hauser J, Maier W, Berrettini W, Byerley W, Coryell W, Gershon ES, Kelsoe JR, McClinnis MG, Murphy DL, Nurnberger Jr, Reich T, Scheftner W, O'Donovan MC, Propping P, Owen MJ, Rietschel M, Nothen MM, McMahon FJ, Craddock N. Lack of support for a genetic association of the XBP1 promoter polymorphism with bipolar disorder in probands of European origin. *Nat Genet*. 2004;36:783–4; author reply 784–5.
 70. Hou SJ, Yen FC, Cheng CY, Tsai SJ, Hong CJ. X-box binding protein 1 (XBP1) C-116G polymorphisms in bipolar disorders and age of onset. *Neurosci Lett*. 2004;367:232–4.
 71. So J, Warsh JJ, Li PP. Impaired endoplasmic reticulum stress response in B-lymphoblasts from patients with bipolar-I disorder. *Biol Psychiatry*. 2007;62:141–7.
 72. Matigian N, Windus L, Smith H, Filippich C, Pantelis C, McGrath J, Mowry B, Hayward N. Expression profiling in monozygotic twins discordant for bipolar disorder reveals dysregulation of the WNT signalling pathway. *Mol Psychiatry*. 2007;12:815–825.
 73. Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T. Association analysis of ATF4 and ATF5, genes for interacting-proteins of DISC1, in bipolar disorder. *Neurosci Lett*. 2007;417:316–21.
 74. Kato T, Iwamoto K, Kakiuchi C, Kuratomi G, Okazaki Y. Genetic or epigenetic difference causing discordance between monozygotic twins as a clue to molecular basis of mental disorders. *Mol Psychiatry*. 2005;10:622–30.
 75. McDonald P, Lewis M, Murphy B, O'Reilly R, Singh SM. Appraisal of genetic and epigenetic congruity of a monozygotic twin pair discordant for schizophrenia. *J Med Genet*. 2003;40:E16.
 76. Petronis A, Gottesman II, Kan P, Kennedy JL, Basile VS, Paterson AD, Pependikyte V. Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizophr Bull*. 2003;29:169–78.
 77. Tsujita T, Niikawa N, Yamashita H, Imamura A, Hamada A, Nakane Y, Okazaki Y. Genomic discordance between monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1998;155:422–4.
 78. Ushijima T, Morimura K, Hosoya Y, Okonogi H, Tatematsu M, Sugimura T, Nagao M. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2284–9.
 79. Kuratomi G, Iwamoto K, Bundo M, Kusumi I, Kato N, Iwata N, Ozaki N, Kato T. Aberrant DNA methylation associated with bipolar disorder identified from discordant monozygotic twins. *Mol Psychiatry* 2007; in press [PMID: 17471289].
 80. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:10604–9.
 81. Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, Smith CL, Faraone SV, Wilcox M, Shafa R, Glatt SJ, Nguyen G, Ponte JF, Thiagalingam S, Tsuang MT. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;134:60–6.
 82. Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A, Costa E. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:9341–6.
 83. Tamura Y, Kunugi H, Ohashi J, Hohjoh H. Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 2007;15:519.
 84. Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Komori A, Sasaki T, Kato N, Kato T. Methylation status of the reelin promoter region in the brain of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 2007; in press [PMID:17870056].
 85. Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet*. 1997;16:16–7.
 86. Sato N, Fukushima N, Chang R, Matsubayashi H, Goggins M. Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. *Gastroenterology*. 2006;130:548–65.
 87. Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, Takao H, Iwayama-Shigeno Y, Yoshikawa T, Kato T. DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *J Neurosci*. 2005;25:5376–81.

気分障害のエピジェネティクス

加藤忠史*

KEY WORDS

- ・双極性障害
- ・大うつ病
- ・エピジェネティクス
- ・DNA メチル化
- ・ヒストン修飾

SUMMARY

うつ病はストレス脆弱性とストレスの相互作用で発症すると考えられる。ラットにおいて、養育の影響によるストレス脆弱性がグルココルチコイド受容体遺伝子の DNA メチル化変化を介しているとの説が提唱されている。抗うつ薬や電気けいれん療法は、BDNF（脳由来神経栄養因子）遺伝子のプロモーターにおけるヒストン修飾の変化を介していると報告されている。双極性障害では、HDAC（ヒストン脱アセチル化阻害酵素）阻害を介して DNA メチル化を低下させる作用をもつバルプロ酸が躁状態に有効である一方、DNA メチル化を促進する S-アデノシルメチオニンが双極性うつ病に有効であるとの報告があることなどから、DNA メチル化の関与が示唆されている。双極性障害患者死後脳における膜結合型 COMT のプロモーターの DNA メチル化変化の報告もあるが、方法的に疑問が残る。双極性障害に関して不一致な一卵性双生児の研究から、罹患双生児で PPIEL の低メチル化が見出され、症例対照研究では、双極 II 型障害で PPIEL の低メチル化がみられた。気分障害におけるエピジェネティクス研究は始まったばかりであり、更なる研究が必要である。

1. エピジェネティクスとは

エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列以外で、細胞から細胞に受け継がれ、遺伝子発現に長期的に影響する要因、およびそれを研究する学問のことをいう。こうしたメカニズムの代表が DNA メチル化とヒストン修飾である。この両者は密接に関連しており、一方が他方を変化させるという相互関係がある。

1) DNA メチル化

ゲノム DNA は、シトシンとグアニンが連なっている配列（CpG 配列という）の部分で、シトシンがメチル化修飾を受ける。シトシンはメチル化されてもグアニン

と対合することには変わらないため、DNA 複製には影響せず、アミノ酸配列にも影響しない。

ゲノムには CpG アイランドと呼ばれる、C-G 配列が連なって存在している領域があり、こうした領域はしばしばプロモーターとして機能している。その細胞でよく発現している遺伝子のプロモーターの CpG アイランドでは、CpG 配列のシトシンがメチル化されていないことが多い。逆に DNA メチル化を受けている CpG アイランドは、メチル化 DNA 結合蛋白との相互作用などのメカニズムを介して、転写因子との相互作用が阻害され、一般に遺伝子発現が抑制される¹⁾。

細胞分裂時、ゲノムの DNA メチル化状態は DNA メチルトランスフェラーゼ（DNMT）により娘細胞へと

KATO Tadafumi/* 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

コピーされる。DNAの二本鎖が二つに分かれ、相補鎖が形成された際には、Cm (メチル化シトシン)-G と対合するのはC-Gである。しかし、一方の鎖のCpGのシトシンがメチル化されていた場合に反対鎖のシトシンをメチル化する酵素であるDNMTが存在することにより、ゲノムのメチル化状態を完全にコピーすることができる。配偶子形成の際、インプリンティング領域以外はDNAメチル化がほぼ消去され、発生の間に再び組織特異的なメチル化 (*de novo* メチル化) を受け、リプログラミングされる。ある程度発生が進んでからは、DNAメチル化は安定と考えられる。

2) 脳内 DNA メチル化の年齢依存性

最近、ヒト大脳皮質における50の遺伝子のDNAメチル化状態を、妊娠17週から104歳に至る幅広い年齢層の125名で解析した論文が報告され、初めてヒト脳におけるDNAメチル化の年齢依存性の一端が明らかにされた。その結果、多くの遺伝子で年齢依存的なDNAメチル化状態の変化がみられ、年齢依存性変化には以下の4パターンがみられることがわかった²⁾。

- 1) 加齢とともに次第にメチル化されていく遺伝子 (*HOXA1* など8遺伝子)
- 2) 10歳頃まで (ほとんどは新生児期) にDNAメチル化が急速に増加し、その後は安定である遺伝子 (*PAX8* など18遺伝子)
- 3) 50歳以降、一部の者で急速にDNAメチル化が増加する遺伝子 (*HGMT* の1遺伝子のみ)
- 4) 10歳頃までにDNAメチル化が低下し、その後は安定している遺伝子 (くり返し配列 *Alu* のみ)
- 5) 明確な年齢依存性のない遺伝子 (その他)

このように、新生児期から10歳頃までに脳のDNAメチル化は大きく変動するようである。これが脳の細胞構成や解剖学的変化によるのか、各神経細胞における変化なのかなど、まだ不明な点は多いが、0~10歳の間にこのように脳のDNAメチル化状態が大きく変化するとすれば、その間の環境が、生涯にわたり脳内のDNAメチル化状態に永続的な影響を与える可能性も考えられる。

3) ヒストン修飾

ヒストンは、DNAをコンパクトに折り畳む際に必要とされる蛋白で、ヒストンの修飾状態はDNAのほぐれ方に影響することで、転写因子とDNAの相互作用を変化させ、遺伝子発現を制御する。ヒストンは、最もよく研究されているアセチル化の他、メチル化、スモイル化、ユビキチン化など、種々の修飾を受ける³⁾。ヒストンH3の9番目および14番目のリジン残基がアセチル化されると、クロマチンが開放された状態となり、転写が活性化される、といった所見が代表的なものである⁴⁾。

ヒストンの修飾状態が細胞分裂に際して保存されるメカニズムは明らかにされていない。有力な説の一つは、細胞分裂時にDNAの2本鎖がそれぞれに分かれる際、H3が2つとH4が2つという4量体であるヒストンが、H3-H4という2量体ずつに分かれ、DNAの相補鎖を合成する際に、ヒストンの修飾状態もコピーされるとの考え方である。しかし、4量体ヒストンにおいて、H3-H3の相互作用が強固であることから、このように対称な形でヒストンが分離することは化学的にはあり得ないと考えられていた。最近、ヒストンシャペロンであるCIAがH3、H4と相互作用することによって、ヒストンの修飾状態が複製される可能性が示された⁵⁾。しかしながら、ヒストンの修飾状態を複製するメカニズム自体は解明されておらず、ヒストン修飾状態が、細胞分裂時に伝達されて、エピジェネティックシグナルとして働いているかどうかは、いまだ証明されているとは言えない。

2. うつ病とエピジェネティクス

1) 遺伝環境相互作用とエピジェネティクス

うつ病は、遺伝子と養育環境などの相互作用によりストレス脆弱性が形成された者がストレスに曝された時に発症する疾患と考えられる。こうした遺伝・環境要因は、疫学的大規模研究により明らかにされ、特にセロトニントランスポーターのプロモーター多型 (HTTLPR) とストレス、あるいは虐待との遺伝環境相互作用の報告が有名である⁶⁾。しかし、その後の4,175名という大サンプルの研究では確認されていない⁷⁾。

エピジェネティクス研究は、こうした遺伝環境相互作用

用の結果として細胞・組織レベルに刻印された持続的な変化を検出することができると期待される⁸⁾。

2) 養育によるストレス脆弱性のエピジェネティック記憶

Meaney らのグループ⁹⁾は、母子分離などの人工的な操作以外で養育が仔に与える影響を研究するため、高養育 (high licking and grooming : High LG) ラットから生まれた仔ラットと、低養育 (Low LG) ラットから生まれた仔ラットを比較するというパラダイムで研究を進めてきた。その結果、High LG と Low LG の母親の仔では、成熟後の母性行動やストレスに対する脆弱性が異なり、これが非遺伝的に伝達されることを明らかにした。

彼らはその分子メカニズムに関して研究を進めた結果、以下の可能性を示した。出生直後に十分な母性行動を受けた仔ラットではセロトニンが放出され、セロトニン7受容体を介して転写因子 NGFI-A が誘導される。これが海馬グルココルチコイド受容体 (GR) 上流配列に作用すると、母性行動を受けた仔ラットは、GR 上流配列に NGFI-A が結合しているため、DNA メチル化を免れ、GR の発現量が保たれる。一方、十分な母性行動を受けなかったラットでは、生涯にわたり海馬 GR 上流配列が DNA メチル化され、GR 発現量が低下し、これが仔ラットの行動に長期的な影響を与える。histone deacetylase (HDAC) 阻害薬で、ヒストンアセチル化の増加を介して DNA メチル化を低下させる薬剤、トリコスタチン A を脳室内投与すると、Low LG ラットの仔におけるグルココルチコイド受容体遺伝子の DNA メチル化が低下し、それに伴ってストレス脆弱性が改善する¹⁰⁾。

この研究は、それまで仮想的なものであったエピジェネティック記憶を現実的に証明した初めての研究といえる。しかしながら、その後他のグループからこの所見が追試されたとの報告はなされておらず、更なる検討が必要と思われる。

もしこの所見が確認されれば、ヒトでも同様の現象が存在し、うつ病の発症脆弱性と関係しているのかどうかを解明していくことが必要であろう。

3) 抗うつ治療とヒストン修飾

Nestler らのグループ¹¹⁾は、抗うつ薬および電気けいれん療法メカニズムにヒストン修飾の変化が関与すると考えて研究を進めている。慢性社会的敗北ストレスを受けたマウスでは、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-III および-IV という転写物が低下し、これらのプロモーターにおけるヒストンメチル化 (発現に対し抑制的に作用する) が増加していた。イミプラミンの慢性投与は、こうした BDNF 低下に拮抗し、これらのプロモーターのヒストンアセチル化 (発現に対し促進的に作用する) を増加させた。イミプラミンのヒストンアセチル化増加作用は、HDAC5 の低下を介しており、ウイルスベクターにより HDAC5 を海馬に発現させると、イミプラミンの行動学的作用 (社会的敗北ストレスによる社会的相互作用低下の改善) が消失した。

この研究で観察されたヒストン修飾状態の変化は、単に BDNF の遺伝子発現状態を反映したものにも思え、ヒストンの修飾状態を調べることにどれだけの意味があるのかという疑問も残る。彼らは、イミプラミンによるヒストンの変化が、コントロールマウスへの投与ではみられず、社会的敗北ストレスを受けたマウスのみでみられたという点において、BDNF の変化とは異なっていると考えているようである。

一方、電気けいれん療法 (electroconvulsive therapy : ECT) による研究では、c-Fos, CREB, BDNF のヒストン H4 アセチル化は、これらの mRNA のレベルとよく相関し、単回の ECT でも変化する一方、H3 のヒストンアセチル化はより選択的であり、慢性 ECT 施行による BDNF の増加はプロモーター III および IV の H3 アセチル化により制御されていると報告された¹²⁾。このように、ECT の作用が長期に持続するメカニズムとして、ヒストン修飾の変化の関与が示唆されている。

4) 双極性障害とエピジェネティクス

① 遺伝学的所見

遺伝子が片親性に発現する現象、すなわちゲノムインプリンティングは、DNA メチル化を介している。インプリンティングが関与する遺伝病では、その遺伝子が母親から遺伝したか、父親から遺伝したかによって、表現

型が大きく異なる。双極性障害でも、どちらの親から遺伝したかによって、発症するか否か、あるいは症状の重症度が異なる現象、すなわち parent-of-origin effect (POE) が報告されている^{13)~15)}。双極性障害は、母方から遺伝する場合のほうが多い¹⁵⁾が、父方から遺伝した場合には重症で¹⁶⁾、発症年齢が早く¹⁷⁾、母方からの遺伝にくらべて同胞における罹患率が高い¹⁸⁾。

18番染色体との連鎖は、父方からの遺伝に関してのみみられる^{19)~21)}。この所見にもとづいて、18番染色体の連鎖部位のインプリンティングを受ける遺伝子が探索されている²²⁾。他にも、いくつかの領域、すなわち 13q12, 1q41²¹⁾, 2p24-21, 2q31-q32, 14q32, 16q21-q23²³⁾で POE を伴った連鎖が報告されているが、実際にインプリンティングが証明された例はない。

トリオサンプルにおける伝達不平衡テスト (transmission disequilibrium test: TDT) でも、母方からの遺伝と父方からの遺伝を分けて検討されるようになっており、こうした解析で関連を認めた報告もある^{24)~26)}。しかしながら、父方からの遺伝のみに関して有意な関連が認められた HSPA5 について検討した結果、脳内で両アレルとも発現しており、インプリンティングを受けているとは考えられなかった²⁶⁾。

② 薬理的所見

バルプロ酸は躁状態に有効であるが、その作用メカニズムは諸説ある。バルプロ酸とリチウムが共通に神経保護作用や神経新生への作用を有していることが注目されているが、バルプロ酸は HDAC 阻害作用をもっており²⁷⁾、これが神経保護作用²⁸⁾²⁹⁾や神経幹細胞の分化を促進する作用³⁰⁾に関係していると考えられた。

S-アデノシルメチオニン (SAM) は、DNA メチル化反応においてメチル基を供与する分子であり、DNA メチル化を促進する作用がある。SAM がうつ病に有効であるとする報告は多く³¹⁾、特に双極性うつ病患者 11 名中 9 名に躁転を引き起こしたとの報告は注目される³²⁾。ラットにおいて、SAM の前駆体である L-メチオニンの投与は、GR プロモーターのメチル化を促進し、High LG の行動学的影響に拮抗する³³⁾。

③ 死後脳の DNA メチル化解析

最近 Abdolmaleky ら³⁴⁾は、膜結合型 COMT (cate-

chol-O-methyltransferase) の DNA メチル化状態を双極性障害患者死後脳で調べた。COMT には 2 つの mRNA アイソフォーム、膜結合型 (membrane-bound COMT: MB-COMT) と可溶性 (soluble COMT: S-COMT) があり、それぞれに異なったプロモーターがある。彼らは、双極性障害患者死後脳の前頭前野 (ブロードマン 46 野) で MB-COMT のメチル化状態を、メチル化特異的 PCR (MS-PCR) により調べた。その結果、この領域はほとんどメチル化されていないが、メチル化された DNA 由来の PCR 産物がみられる割合が対照群 (35 名中 60%) にくらべ、双極性障害患者 (35 名中 29%) では有意に低かったと報告している。

一方、Dempster ら³⁵⁾は、スタンレー脳バンクの 60 名の患者群および対照群において、パイロシーケンス法により S-COMT の DNA メチル化を調べ、患者群と対照群に差を認めなかったと報告している。

Abdolmaleky ら³⁴⁾の用いた MS-PCR 法は元々インプリンティング病の診断のために用いられていたものであり³⁶⁾、定量性がないため、PCR がかかった回数を比較しても意味がないであろう。

Costa らのグループ³⁷⁾は Reelin 遺伝子 (*RELN*) のメチル化が統合失調症に関与しているという説を唱え、統合失調症患者の死後脳で *RELN* の DNA メチル化が亢進していると報告した。しかしながら、このデータは、CpG でないサイトが強くメチル化されているというやや理解しがたい結果であった。この所見を前述の MS-PCR 法で確認したとの報告³⁸⁾もあるが、メチル化感受性制限酵素処理と定量的ゲノム PCR 法を用いた検討では、患者群と対照群の差はみられなかった³⁹⁾。Tochigi ら⁴⁰⁾は、パイロシーケンス法を用いた定量法を確立し、段階希釈した標準サンプルによる検量線を測定して測定精度を検証したうえで患者サンプルで検討した結果、統合失調症患者の脳内で *RELN* はほとんどメチル化されていないことを見出した。Costa らのグループ³⁷⁾の報告は、sodium bisulfite 処理が不完全であるなど、種々の技術的問題点によるアーチファクトである可能性が高いと考えられた。

④ 一卵性双生児双極性障害不一致例における DNA メチル化差異の探索

われわれは以前、双極性障害に関して不一致な一卵性双生児間で遺伝子発現差異のある遺伝子として *XBPI* を同定した⁴¹⁾。ゲノム配列がほぼ同じである双生児の間で、一人だけが精神疾患を発症する理由としては、周産期の脳障害や、感染症など、さまざまな環境因が関与する可能性がある。しかしながら、これらの双生児では、こうした原因が特定できない。このように、DNA 配列そのものには違いがないはずの一卵性双生児間で大きな表現型の違いが存在する理由として、DNA メチル化の異常、すなわち epimutation (エピ変異) が考えられる⁴²⁾。しかし、これらの双生児では、*XBPI* の塩基配列、コピー数、および DNA メチル化には違いがなかった。

そこで、双生児間の不一致の原因は他の遺伝子の DNA メチル化差異によるものと考え、双生児間で DNA メチル化が異なる遺伝子を特定するため、これまでがんの研究に用いられてきた研究手法である methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA) 法を応用した。この方法は、正常な細胞とがん細胞の間で、DNA メチル化が異なる部分をスクリーニングする方法として開発された⁴³⁾。メチル化感受性制限酵素を用いていることから、ゲノム塩基配列の差異の影響も受けてしまうため、これまでは主として同一人物の細胞での比較のために応用されてきた。しかしながら、一卵性双生児であれば、この方法を応用することで、双生児の間で DNA メチル化差異を特定できると考えられた。

MS-RDA 法による検索で得られた多数のクローンの中から、リピート配列などを除き、CpG アイランドあるいはエクソン 1 付近の遺伝子として 10 クローンが選択された。さらに bisulfite 法で確認されたものとして 4 つに絞られ、症例対照研究で確認されたものとして、2 つの遺伝子に絞られた。うち一つである SMS (spermine synthase) は、X 染色体上の遺伝子であるため男女に分けて解析した結果、女性患者のみで関連していた。しかし、変化の方向が双生児と逆であること、メチル化状態と発現量が相関しないことなどから、その意義は不明であった。一方、もう一つの機能不明の遺伝子断

42(42)

片では、健常双生児ではほぼ完全にメチル化されており、罹患双生児では半分程度メチル化がはずれているという、より明確な DNA メチル化差異が見出された⁴⁴⁾。この遺伝子は、*PPIE* という既知遺伝子に配列が類似していたため、*PPIEL* (*PPIE*-like) と命名した。*PPIEL* の DNA メチル化は、多数例の被験者由来の培養リンパ芽球において、その遺伝子発現量とよく相関していた。

一卵性双生児間の DNA メチル化差異は、年齢とともに次第に増加することが報告されている⁴⁵⁾。したがって、一卵性双生児で差異がみられたからといって、それが病気と関係していると断定はできない。

そこで症例対照研究を行ったところ、双極 II 型障害患者で、*PPIEL* の低メチル化がみられた。この所見は、独立の双極 II 型障害患者群でも確認された。また、培養リンパ芽球のメチル化状態は、末梢血液の DNA におけるメチル化状態と相関していた。

PPIEL は、齧歯類と霊長類が分かれた後に遺伝子重複により生じたと考えられる、霊長類特異的な遺伝子である。ヒト脳における *PPIEL* 発現部位を調べたところ、下垂体および黒質に多く発現しており、ドパミン神経、あるいは神経内分泌への関与の可能性が考えられた。

今回の結果では、*PPIEL* の DNA メチル化変化が、病気の原因なのか、結果なのかは不明であるが、*PPIEL* が何らかの形で双極 II 型障害の病態に関与している可能性が考えられた。

おわりに

このように、気分障害におけるエピジェネティクス研究は、ようやくスタート地点に立ったところである。

前述のとおり、統合失調症研究においては、方法論的問題により不一致な結果が報告される事例があったことから、更なる方法論の洗練が必要と考えられる。これまで報告された定量的 DNA メチル化解析法の中では、sodium bisulfite 処理 DNA のパイロシーケンス法による解析³⁵⁾⁴⁰⁾⁴⁴⁾、あるいはメチル化感受性制限酵素処理後に定量的リアルタイム PCR 法でゲノム DNA 定量を行う方法³⁹⁾が、比較的簡便かつ定量性の得られる方法と考えられる。

また、ゲノム解析と異なり、エピジェネティクス解析

では、どのような組織を用いるかが重要となる。脳を用いたとしても、脳内のニューロン/グリア比の影響を受ける可能性も考えられる。エピジェネティクス研究を目指すうえで、患者死後脳を対象とする必要があるだけでなく、形態学をも視野に入れた解析が必要となっていくであろう。こうした面でも今後、更なる技術革新が必要と考えられる。



文 献

- 1) 佐々木裕之編：エピジェネティクス，シュプリンガーフェアラーク，東京，2004
- 2) Siegmund KD, Connor CM, Campan M *et al* : DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS ONE* 2 : e895, 2007
- 3) Tsankova N, Renthal W, Kumar A *et al* : Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8 : 355-367, 2007
- 4) Szyf M : DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy. *Biochemistry (Mosc)* 70 : 533-549, 2005
- 5) Natsume R, Eitoku M, Akai Y *et al* : Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature* 446 : 338-341, 2007
- 6) Caspi A, Sugden K, Moffitt TE *et al* : Influence of life stress on depression : moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301 : 386-389, 2003
- 7) Surtees PG, Wainwright NW, Willis-Owen SA *et al* : Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 59 : 224-229, 2006
- 8) Mill J, Petronis A : Molecular studies of major depressive disorder : the epigenetic perspective. *Mol Psychiatry* 12 : 799-814, 2007
- 9) Francis D, Diorio J, Liu D *et al* : Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 286 : 1155-1158, 1999
- 10) Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA *et al* : Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7 : 847-854, 2004
- 11) Tsankova NM, Berton O, Renthal W *et al* : Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9 : 519-525, 2006
- 12) Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ : Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 24 : 5603-5610, 2004
- 13) Grigoriu-Serbanescu M : A trial to apply the concept of genomic imprinting to the manic-depressive illness. *Rom J Neurol Psychiatry* 30 : 265-277, 1992
- 14) Kato T, Winokur G, Coryell W *et al* : Parent-of-origin effect in transmission of bipolar disorder. *Am J Med Genet* 67 : 546-550, 1996
- 15) McMahon FJ, Stine OC, Meyers DA *et al* : Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet* 56 : 1277-1286, 1995
- 16) Grigoriu-Serbanescu M, Nothen M, Propping P *et al* : Clinical evidence for genomic imprinting in bipolar I disorder. *Acta Psychiatr Scand* 92 : 365-370, 1995
- 17) Grigoriu-Serbanescu M, Wickramaratne PJ, Hodge SE *et al* : Genetic anticipation and imprinting in bipolar I illness. *Br J Psychiatry* 170 : 162-166, 1997
- 18) Kornberg JR, Brown JL, Sadovnick AD *et al* : Evaluating the parent-of-origin effect in bipolar affective disorder. Is a more penetrant subtype transmitted paternally? *J Affect Disord* 59 : 183-192, 2000
- 19) Gershon ES, Badner JA, Detera-Wadleigh SD *et al* : Maternal inheritance and chromosome 18 allele sharing in unilineal bipolar illness pedigrees. *Am J Med Genet* 67 : 202-207, 1996
- 20) Nöthen MM, Cichon S, Rohleder H *et al* : Evaluation of linkage of bipolar affective disorder to chromosome 18 in a sample of 57 German families. *Mol Psychiatry* 4 : 76-84, 1999
- 21) McInnis MG, Lan TH, Willour VL *et al* : Genome-wide scan of bipolar disorder in 65 pedigrees : supportive evidence for linkage at 8q24, 18q22, 4q32, 2p12, and 13q12. *Mol Psychiatry* 8 : 288-298, 2003
- 22) Corradi JP, Ravyn V, Robbins AK *et al* : Alternative transcripts and evidence of imprinting of GNAL on 18p11.2. *Mol Psychiatry* 10 : 1017-1025, 2005
- 23) Cichon S, Schumacher J, Müller DJ *et al* : A genome screen for genes predisposing to bipolar affective disorder detects a new susceptibility locus on 8q. *Hum Mol Genet* 10 : 2933-2944, 2001
- 24) Borglum AD, Kirov G, Craddock N *et al* : Possible parent-of-origin effect of Dopa decarboxylase in susceptibility to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 117 : 18-22, 2003
- 25) Muglia P, Petronis A, Mundo E *et al* : Dopamine D4 receptor and tyrosine hydroxylase genes in bipolar disorder : evidence for a role of DRD4. *Mol Psychiatry* 7 : 860-866, 2002

- 26) Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S *et al* : Functional polymorphisms of HSPA5 : possible association with bipolar disorder. *Biochem Biophys Res Commun* **336** : 1136-1143, 2005
- 27) Phiel CJ, Zhang F, Huang EY *et al* : Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* **276** : 36734-36741, 2001
- 28) Jeong MR, Hashimoto R, Senatorov VV *et al* : Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death : a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett* **542** : 74-78, 2003
- 29) Kanai H, Sawa A, Chen RW *et al* : Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. *Pharmacogenomics J* **4** : 336-344, 2004
- 30) Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T *et al* : Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** : 16659-16664, 2004
- 31) Papakostas GI, Alpert JE, Fava M : S-adenosyl-methionine in depression : a comprehensive review of the literature. *Curr Psychiatry Rep* **5** : 460-466, 2003
- 32) Carney MW, Chary TK, Bottiglieri T *et al* : The switch mechanism and the bipolar/unipolar dichotomy. *Br J Psychiatry* **154** : 48-51, 1989
- 33) Weaver IC, Champagne FA, Brown SE *et al* : Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation : altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* **25** : 11045-11054, 2005
- 34) Abdolmaleky HM, Cheng KH, Faraone SV *et al* : Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* **15** : 3132-3145, 2006
- 35) Dempster EL, Mill J, Craig IW *et al* : The quantification of COMT mRNA in post mortem cerebellum tissue : diagnosis, genotype, methylation and expression. *BMC Med Genet* **7** : 10, 2006
- 36) Kubota T, Das S, Christian SL *et al* : Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet* **16** : 16-17, 1997
- 37) Grayson DR, Jia X, Chen Y *et al* : Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 9341-9346, 2005
- 38) Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A *et al* : Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients : a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **134** : 60-66, 2005
- 39) Tamura Y, Kunugi H, Ohashi J *et al* : Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry* **12** : 519, 593-600, 2007
- 40) Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M *et al* : Methylation Status of the Reelin Promoter Region in the Brain of Schizophrenic Patients. *Biol Psychiatry*. 2007 Sep 14 : [Epub ahead of print]
- 41) Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M *et al* : Impaired feedback regulation of XBPI as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet* **35** : 171-175, 2003
- 42) Kato T, Iwamoto K, Kakiuchi C *et al* : Genetic or epigenetic difference causing discordance between monozygotic twins as a clue to molecular basis of mental disorders. *Mol Psychiatry* **10** : 622-630, 2005
- 43) Ushijima T, Morimura K, Hosoya Y *et al* : Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** : 2284-2289, 1997
- 44) Kuratomi G, Iwamoto K, Bundo M *et al* : Aberrant DNA methylation associated with bipolar disorder identified from discordant monozygotic twins. *Mol Psychiatry* 2007 May 1 : [Epub ahead of print]
- 45) Fraga MF, Ballestar E, Paz MF *et al* : Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 10604-10609, 2005

3. パニック障害研究の現状と展望

谷井久志, 西村幸香, 音羽健司, 佐々木 司, 貝谷久宣, 岡崎祐士

パニック障害は予期せぬ不安発作の繰り返しを主症状とする慢性の障害である。生涯罹患率は2%に及び、社会生活への影響も大きく、原因解明とよりよい治療法開発が望まれる。双生児の罹患一致率比較から遺伝要因の有意な関与は明らかで、関連研究を中心に多くの遺伝子探索研究が行われてきたが、いずれも対象規模等の点で不十分であった。現在我々は1,000例規模の対象リクルートを行って、SNPチップによるゲノムワイド関連解析を基礎に疾患感受性遺伝子探索研究を進めている。またNIRSやMRIによる脳画像研究でも興味深い結果を得ている。その結果については、将来の研究における中間表現型としての利用可能性も期待される。

はじめに

精神疾患は多因子が複雑に関与する疾患という特徴がある。そのゲノム研究においては、①合理的な必要性、②適切な形質の定義、③調密なDNA多型・変異マーカーと④十分なサンプル数が必要であり、⑤核内遺伝子配列情報の発病への関与が否定される場合にも

対応できる方法論（エピジェネティクスなど）をもつことが重要である。

パニック障害は動悸、発汗、胸部不快感、めまい感など自律神経系の異常を中心とする複数の身体的な症状を伴いつつ予期しない不安発作が繰り返されることを特徴とする（DSM-IV）¹⁾。パニック障害はしばしば慢性の経過を辿り、寛解と増悪を繰り返し、恐怖症

[キーワード&略語]

パニック障害, 不安障害, 近赤外線スペクトロスコープ (NIRS), 疾患感受性遺伝子, ゲノムワイド関連解析, SNPチップ

ACE : angiotensin converting enzyme

ADORA2 : adenosine A2a receptor

CCK : cholecystokin

CCKAR : cholecystokin-A receptor

COMT : catechol-O-methyltransferase

CREM : cAMP-responsive element modulator

DRD1 : dopamine D1 receptor

GLO : glyoxalase 1

HTR2A : serotonin 2A receptor

HTR2C : serotonin 5-HT-2C receptor

MAOA : monoamin oxidase A

NTRK3 : neurotrophic tyrosine kinase
receptor type 3

PBR : peripheral benzodiazepine receptor

SSRI : serotonin-specific reuptake inhibitor

Current status and prospect of panic disorder studies

Hisashi Tani¹⁾ / Yukika Nishimura¹⁾ / Takeshi Otowa²⁾ / Tsukasa Sasaki²⁾ / Hisanobu Kaiya³⁾ / Yuji Okazaki^{1) 4)} : Department of Psychiatry, Mie University Graduate School of Medicine¹⁾ / Department of Psychiatry, Health Service Center, University of Tokyo²⁾ / Warakukai Incorporated Medical Institution, Research Center for Panic Disorder³⁾ / Tokyo Metropolitan Matsuzawa Hospital⁴⁾ (三重大学大学院医学系研究科神経感覚医学講座精神病態学分野¹⁾ / 東京大学保健センター²⁾ / 医療法人和楽会パニック障害研究センター³⁾ / 東京都立松沢病院⁴⁾)

や大うつ病など他の精神疾患に合併することも多い²⁾。罹患頻度は高く、生涯罹患率は2%内外、それ以上に達するとの報告もある^{3) 4)}。パニック障害の苦悩は深刻であり、医療への希求は強く、疾患の解明への当事者からの期待と要望はきわめて強い。またパニック障害には自殺企図が高頻度、救急受診が高頻度などの特徴があり、不安障害全体の直接治療費総額は、統合失調症とほぼ同額とされる。さらに、不安障害による生産性の低下と損失は、直接医療費と同規模の額と推計されている。以上のような観点からパニック障害の原因を解明し、よりよい治療に結びつける試みは、本疾患の患者の苦痛の軽減など医療的な観点のみならず、医療経済学観点からも社会的観点からも、きわめて意義が高いと考えられる。

1) パニック障害をわが国で研究する意義について

1) 遺伝因子の関与について

以前より不安障害の家系研究において、家族集積性が認められることから遺伝的因子が関係していると推定されていた。パニック障害においても複数の家系研究がなされ、Croweらはパニック障害患者の直系の子孫では第一度親族中の患者の割合は17.3%であるのに比べ、一般対照群では約1.8%と発病のリスクが高まる傾向を指摘している⁵⁾。その他、米国やベルギー、オーストラリアなどで行われた大規模調査において患者群の第一親等では正常対照群と比較して8倍の危険率になっている⁶⁾。またGoldsteinらによる発症年齢における研究では、20歳以前の発症では家族性が強く17倍のリスクがあるのに対し、20歳以後の発症では6倍のリスクであった⁷⁾。親子間の発症年齢の差を見た研究でも、親の平均発症年齢が約30.1歳、子供では20.8歳であったが、評価のタイミングなどがバイアスとなっているため表現促進効果(anticipation)については一概には判断できない⁸⁾。双生児研究でも一卵性双生児の方が二卵性に比較して一致率が高くなっており⁹⁾、Kendlerらの女兒を用いた研究によると、一致率は一卵性24%に対して二卵性は11%であった¹⁰⁾。最近の双生児研究では全般性不安障害についての遺伝率は32%に対して、パニック障害の遺伝率は約48%と報告されている¹¹⁾。

以上をまとめると、パニック障害の遺伝的因子の関

する疫学的な知見としては、第一度親族の罹患危険率が有意に高いこと、同胞相対危険が高いこと、双生児研究での一致率や遺伝率の高さがあげられ、パニック障害の発病脆弱性に遺伝的因子が有意に関与していると結論される⁴⁾。

2) パニック障害の表現型について

パニック障害の主要症状であるパニック発作には呼吸器症状、自律神経症状、循環器症状があり、その特徴は簡潔・明瞭で特異な表現型としての妥当性があることが、他の精神疾患と比較しての特徴である。なおパニック障害の症状には、予期できないパニック発作、その反復のほか、それに続く予期不安、高頻度の空間恐怖、抑うつとの合併がある。パニック発作は、簡潔明瞭で診断確実な症状であり、短期間の脳機能異常を反映すると考えられるほか、誘発物質の存在(CO₂、乳酸)や主要症候へのSSRI (serotonin-specific reuptake inhibitor) など治療薬が有効な反応を示すことなどが知られている。われわれは1,000例以上のパニック障害患者の初発時パニック発作の症状別頻度を検討した¹²⁾。その結果、14番目までの症状(30%以上の患者に存在)のうち、13個は国際的精神疾患診断基準の症状と共通していたが、残りの1つ(口渇)は異なっており(10位)、民族差とも考えられた。また性差(男性<女性)と発症年齢(青年後期~30代半ば好発)は海外での報告と共通していた。

3) これまでの研究とわが国の状況：特に遺伝子研究について

パニック障害の疾患感受性遺伝子探索については、関連研究を中心に多数の研究が行われてきたが、いずれも対象数が小さく(最大で200人規模)、多因子・複雑疾患であるパニック障害の感受性遺伝子の検出にははるかに及ばない規模である。解析した遺伝子は21遺伝子90多型を解析した例外もあるが¹³⁾、多くはモノアミン系関連遺伝子やCCK関連遺伝子を対象に、ごく少数の多型を検討しており、その点でも不十分である。表に、nominal p値で5%水準以上の結果が得られた研究を列挙する〔表は文献14に、その後のもの(文献リスト参照)を追加したもの〕。しかし、有意差の全くみられなかったnegative studyはこれよりはるかに多い。negative studyも研究規模は小さく、患者240人程度が最大規模である¹⁵⁾。

パニック障害の感受性遺伝子探索を本格的に行うた

表 パニック障害の関連研究（5%有意以上の結果が得られた研究、文献14の表を改変）

著者と発表年	遺伝子	患者数	集団
Politi 2006 ²⁴⁾	<i>GLO</i>	162	Italian
Nakamura 2006 ²²⁾	<i>PBR</i>	91	Japanese
Maron 2005 ¹³⁾	<i>HTR2A</i>	127	Estonia
Maron 2005 ¹³⁾	<i>DRD1</i>	127	Estonia
Maron 2005 ¹³⁾	<i>5HTTLPR</i>	158	Estonia
Woo 2004 ²⁶⁾	<i>COMT</i>	178	Korean
Olsson 2004 ²³⁾	<i>ACE</i>	72	Swedish/male
Miyasaka 2004 ²¹⁾	<i>CCKAR</i>	109	Japanese
Domschke 2004 ¹⁸⁾	<i>COMT</i>	115	German
Yu 2003*	<i>COMT</i>	189	Korean
Inada 2003 ²⁰⁾	<i>HTR2A</i>	63	Japanese
Domschke 2003 ¹⁹⁾	<i>CREM</i>	88/76/62	German/Italian/Spanish
Armengol 2002*	<i>NTRK3</i>	59	Spanish
Woo 2002 ²⁵⁾	<i>COMT</i>	51	Korean
Hattori 2003*	<i>CCK</i>	73	Japanese
Deckert 2000*	<i>HTR2C</i>	211	German/Italian
Deckert 1999*	<i>MAOA</i>	209	German/Italian
Deckert 1998*	<i>ADORA2</i>	89	German

*文献14を参照

めには、これらの問題を十分にクリアした研究の実施が必要である。幸いわが国にはパニック障害専門クリニックの存在（関東・東海）という特別な臨床フィールドの存在があり、すでに8,000人以上が登録され、現在4,000人が受診中であり、世界最大と考えられている。われわれはこのフィールドの協力を得て、すでに700人以上のパニック障害患者のリクルートとサンプリングを行っており、近い将来1,000人規模に達する見通しである。また双生児の発見もすでに5組となっている。パニック障害は家族の協力も得られやすく、また罹患同胞対が統合失調症よりも発見しやすいという臨床的な印象もあり、短期間のサンプリングを可能にする要素に恵まれている。以下で、これまでの研究結果ならびに進行状況について紹介する。

2 われわれのこれまでの研究結果

1) 一卵性双生児不一致例についての検討

一卵性双生児は、遺伝的には全く相等しい二個体であるが、その一方のみがパニック障害を発症している

場合、すなわち一卵性双生児不一致例における両者の差異を検討することは疾患の原因を突き止めるうえで有力なアプローチの方法であるといえる。

われわれは、パニック障害一卵性双生児不一致例（30歳男性ペア）についての光トポグラフィーやMRIを用いた検討を行った。両者において、各種心理検査結果については社会不安尺度であるSTAI-S以外にはほとんど差を認めなかった。次いで、近赤外線スペクトロスコーピー（NIRS）を用いた検討を、ETG-4000・日立メディコ社製の52ch NIRS装置を用いて行った。被験者への検査は語流暢課題を用いた。一卵性双生児不一致例について、課題開始30秒後のoxy-Hb（酸素化ヘモグロビン）の変化を図1に示した（Twin A：パニック障害、Twin B：健常者）。これらの結果からパニック障害における前頭葉機能の低下が示唆された。次いで、MRIを施行し、一卵性双生児不一致例におけるVBM法を用いた脳形態画像解析を行った（図2）。ここで、パニック障害罹患患者（Twin A）では、健常男性群20名と比較して、左上前頭回灰白質

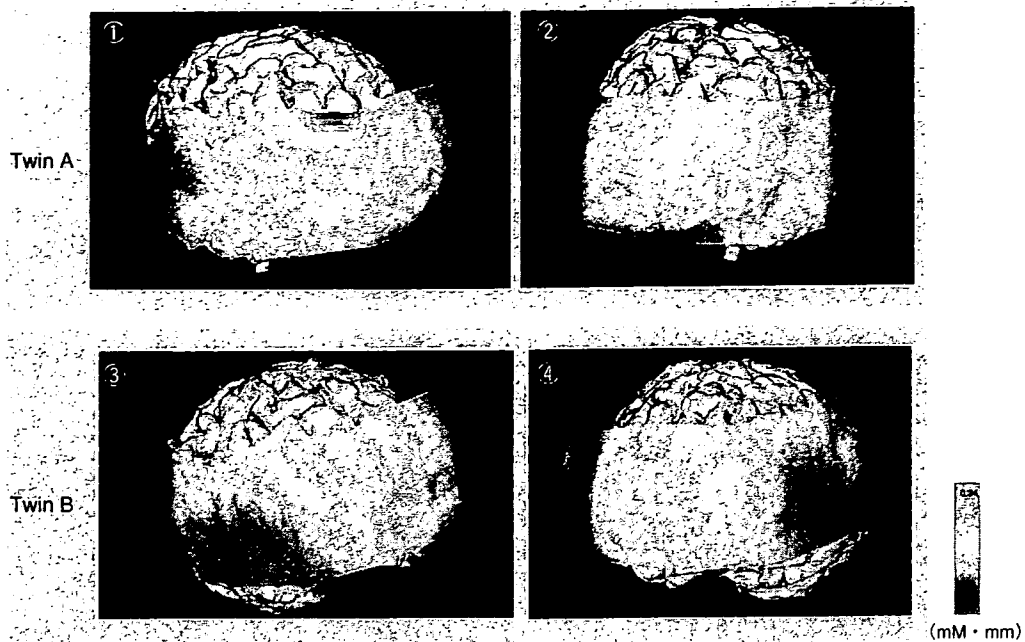


図1 一卵性双生児不一致例のNIRS（前頭葉機能）（巻頭カラー図8参照）

一卵性双生児・パニック障害罹患不一致例（上段Twin A：兄・パニック障害，下段Twin B：弟・健常）における，語流暢課題開始30秒時点の酸素化ヘモグロビン濃度変化のトポグラフィー画像を，三次元再構成した大脳皮質MRI画像上に表示した（①・③は左側，②・④は右側）．パニック障害の有無にかかわらず，前頭葉機能の全般的な低下があり，前頭前部は遺伝的な要因が関与し，前頭葉の外側部はパニック障害の病像を反映していると考えられた

の萎縮が認められたが，健常者（Twin B）では，逆に左上前頭回白質が，健常男性群20名より大きかった．また双生児ペア（2名）と健常男性群20名を比較した結果では，右海馬傍回を中心とした領域で萎縮が認められた．

以上の結果はパニック障害患者における海馬傍回を含む辺縁系の変化については疾患感受性などの脆弱性を示し，パニック障害の発症に関与するのは前頭葉であるという可能性を示唆するものであった．

2) 家族歴の有無による検討

100例以上のパニック障害患者に対する近赤外線スペクトロスコーピーによる検討では，全体に賦活が小さく，また語流暢課題遂行中の脳血流量の増加が遅延傾向にあることが示され，前頭葉機能の低下が考えられた¹⁶⁾．ここで，パニック障害・第一度親族にパニック障害が1人以上いる群（N = 9）と近親者にパニック障害の家族歴および精神科受診や服薬のない群（N = 83）との比較，すなわちパニック障害・精神疾患家族歴の有無による比較を行ったところ，家族歴のあるパ

ニック障害において前頭葉の内側部において有意に[ox-y-Hb]の賦活が小さいことが示され，何らかの遺伝的関与が考えられた．

3) 疾患感受性遺伝子の探索研究

パニック障害の疾患感受性遺伝子の探索を目的に，上述のように，関東地方および東海地方の専門診療施設をフィールドに，大規模な患者リクルートを進めている．方法としてはcase-control比較が中心だが，一部では家族例の収集も行っている．患者サンプルの収集はすでに800例以上に達しているが，そのうち200例を第一次サンプルとして，全ゲノムレベルでの関連解析を実施した．これは，Affymetrix社の500K SNPチップを用いて検討したもののだが，現在，患者200例と健常対照100例での比較検討した結果では，全ゲノム上で約80の遺伝子が今後の解析候補として検出されている．現在健常対照をさらに100例追加し，患者200例，対照200例での比較解析を進めている．患者のリクルート目標数は1,000例以上としているので，選定された候補遺伝子について，800例以上の患者サ

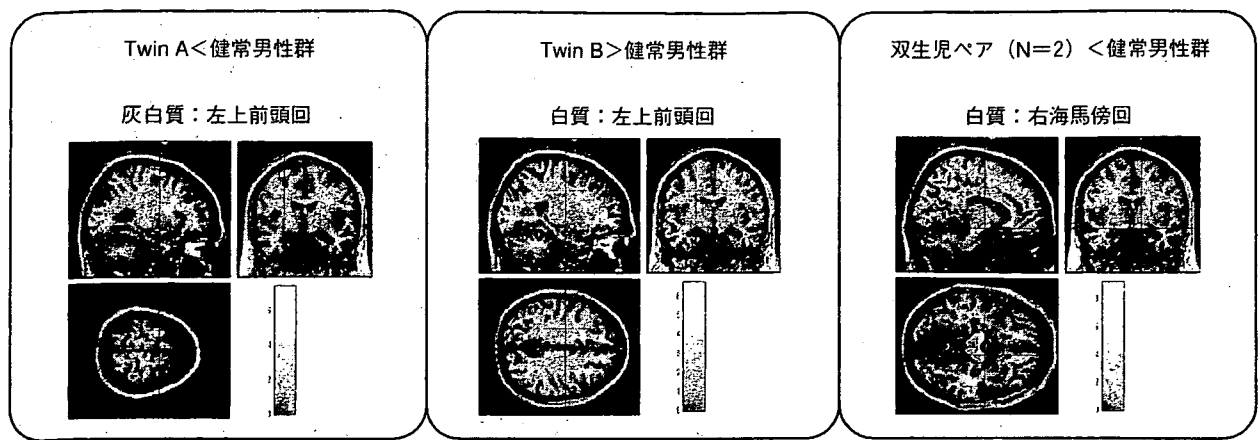


図2 一卵性双生児・パニック障害不一致例におけるVBM法を用いた脳形態画像解析 (巻頭カラー図9参照)
 健常男性群と比較して、左上前頭回が、罹患双生児 (Twin A) では小さく、健常双生児 (Twin B) では大きかった。また双生児ペアと健常男性群を比較すると、右海馬傍回を中心とした領域で差が認められた

ンプルを解析し、遺伝子を絞り込む予定である。また二次サンプル以後の解析では、東京大学人類遺伝学教室の徳永らの開発したDigiTag2システムを用いて、候補多型を一度に解析する。これはパニック障害疾患感受性遺伝子の関連解析としては、世界初の本格的な大規模研究である。関連解析により同定された遺伝子については、動物実験などを含めた機能解析を行ってその役割を確認していく予定である。パニック障害では、呼吸系、循環器系の症状を含む自律神経症状が主症状の1つとなっており、他の精神疾患に比較してより疾患特異的な動物モデルを作製できる可能性も期待される。

なお上記関連解析研究のほかに、家系サンプルを中心にarray-CGHを用いた染色体の微小欠損・重複の検討、発病不一致一卵性双生児のリンパ芽球を用いた遺伝子発現差異の検討を並行して行っている。

おわりに

パニック障害の原因解明研究の必要性、これまでの研究状況、ならびに現在われわれが進めている遺伝子探索ならびに脳画像研究について紹介した。このうち脳画像研究では、パニック障害における前頭葉機能の低下が遺伝的因子によっても制御される可能性が示されている。Gormanらはパニック障害の神経解剖学的仮説を提示し、PET, SPECT研究でパニック障害患者の前頭葉機能低下が示唆され、それが発作に対する“破滅的な”解釈や回避行動と関連することを示唆し

ている¹⁷⁾。パニック障害は遺伝的負因とともに他の身体疾患との関連性や身体的な症状が特徴的であり、発現する症状による分類など新たなアプローチの方法も考慮しつつ研究が進められることが重要である。また遺伝子探索研究は、ゲノムワイド関連解析による候補遺伝子群の推定、連鎖不平衡マッピングによる候補遺伝子の絞り込み、二次・三次サンプルによる結果の絞り込みという計画で、パニック障害に関する疾患感受性遺伝子の解明を目標に進めている。これらの研究がさらに発展すれば、パニック障害についての的確な診断、脆弱性因子の解明に基づく予防、そしてより個体の状況に合わせた効果的な治療などが期待される。

文献

- 1) American Psychiatric Association : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4th ed.) , American Psychiatric Association, Washington, DC, 1994
- 2) Weissman, M. M. et al. : Archives of General Psychiatry, 54 : 305-309, 1997
- 3) Kaiya, H. et al. : Psychiatr. Clin. Neurosci., 59 : 177-182, 2005
- 4) 佐々木司 : パニック障害 : 疫学. 最新医学・別冊 (新しい診断と治療のABC), 40 : 17-23, 2006
- 5) Crowe, R. R. et al. : Archives of General Psychiatry, 40 : 1065-1069, 1983
- 6) Knowles, J. A. & Weissman, M. M. : in Review of Psychiatry, eds. Oldham, J. M. & Riba, M. B. (Am. Psychiatr. Press. Washington, DC) , Vol. 14, pp.383-404, 1995