

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

統合失調症陰性症状の成因解明と治療法開発に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 富田 博秋

平成20 (2008) 年 3月

# 総括研究報告書（平成19年度）

## 目 次

### I. 総括研究報告

統合失調症陰性症状の成因解明と治療法開発に関する研究・・・・・・・・・・1

富田 博秋

II. 研究成果の刊行に関する一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 28

III. 研究成果の刊行物・別冊・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

# I. 総括研究報告

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

統合失調症陰性症状の成因解明と治療法開発に関する研究

主任研究者：富田 博秋

東北大学大学院 医学系研究科 精神・神経生物学分野 准教授

研究協力者：田中 千晶、兪 志前、石川美由紀、木村 好、小松 浩

研究要旨：本研究はゲノム研究、機能ゲノム研究の手法を応用した下記の3つのプロジェクトを3年計画で施行・統合して、統合失調症罹患者の症状のうち、生活のQOLの改善や社会復帰を阻んでいる最も大きな要因の一つとなっている感情の平板化や自閉といった陰性症状の形成および進行に関わる分子群を特定し、これらの分子群を標的にした統合失調症陰性症状の治療・予防に有効な薬剤の開発に繋げ、罹患者の生活のQOL改善や社会復帰を促進に寄与することを目指す。【プロジェクト1：統合失調症陰性症状に関わる免疫細胞の分子遺伝学的解析】本プロジェクトは従来より指摘される統合失調症の陰性症状の形成・進展への免疫系の関与を想定し、これまでに未着手であった統合失調症罹患者に想定される免疫細胞の分子遺伝学的変化を包括的にするため、統合失調症罹患者及び健常対照者の各種免疫細胞の機能を評価した上でマイクロアレイ技術を用いて全ゲノムの遺伝子発現量を包括的に評価し、統合失調症陰性症状及び脳組織の萎縮の形成・進行に関与する免疫細胞における分子遺伝学的変化を特定することを目的とする。初年度は最も一貫した報告がなされているヘルパーT細胞の分画であるTh1細胞とTh2細胞を細胞ソーティング法で単離し、Th1細胞とTh2細胞に特異的な遺伝子発現プロファイルを特定した。また、統合失調症罹患者からの臨床症状・血液検体の収集を開始し、細胞ソーティング法により、従来の報告通りTh2細胞有意の細胞プロファイルを観察した。Th1細胞とTh2細胞は血液細胞中でも少ないポピュレーションであり遺伝子発現も少なく、マイクロアレイ解析が困難であることから、これまでにマイクロアレイ解析を行った先例はないが、当グループは世界に先駆けてTh1細胞とTh2細胞の包括的な遺伝子発現プロファイルを特定することに成功した。今後、統合失調症解析の症例数を増やすことで、統合失調症の陰性症状を始め、病態に関係する分子の特定が可能になるだけでなく、今年度の研究の成果はTh1細胞とTh2細胞の関係する多くの疾患の病態解明にも応用できると期待される。【プロジェクト2：画像所見を中間表現型とするゲノム多型解析】本プロジェクトは統合失調症の陰性症状の病態形成に関与するゲノム多型に関する包括的検討を行うため、統合失調症罹患者及び健常対照者の臨床所見・脳画像所見・ゲノム多型情報を統合して統合失調症陰性症状及び脳組織の萎縮の形成・進行に関与するゲノム多型を特定することを目的とする。初年度中に東北大学に研究専用の3テスラMRI機器の設置が完了し、次年度に向けて撮像条件の検討などを行なった。【プロジェクト3：死後脳組織の分子遺伝学的解析】本プロジェクトは死後脳組織からレーザー・マイクロディセクション法等により特定の細胞種を集積することで、統合失調症の陰性症状の形成・進展に関与する前頭葉前野を含む複数の脳部位において複数種の神経細胞やグリア細胞の細胞種特異的な分子病態を特定することを目的とする。初年度は死後脳組織において精神疾患の分子病態を特定する上で重要な交絡因子である死亡時の低酸素状態への暴露の影響を評価するため、神経細胞や各種グリア細胞由来の培養細胞の低酸素状況下での影響を評価する予備実験を行ない、ミトコンドリア機能などが細胞種特異的に変化することを特定した。

## A. 研究目的

### A-1. 統合失調症陰性症状に関わる免疫細胞の分子遺伝学的解析

本プロジェクトは従来より指摘される統合失調症の陰性症状の形成・進展への免疫系の関与を想定してこれまでに未着手であった統合失調症罹患者に想定される免疫細胞の分子遺伝学的変化を包括的にするため、統合失調症罹患者及び健常対照者の詳細な臨床情報、画像情報、各種免疫細胞のマイクロアレイ技術を用いた全ゲノムの遺伝子発現量情報等の包括的な情報を3年間かけて集積し、統合失調症陰性症状及び脳組織の萎縮の形成・進行に関与する免疫細胞における分子遺伝学的変化を特定することを目的とする。

初年度は最も一貫した報告がなされているヘルパーT細胞の分画であるTh1細胞とTh2細胞の遺伝子発現に焦点をあて、①Th1細胞とTh2細胞を細胞ソーティング法で単離し、各細胞に特異的な遺伝子発現プロファイルを行なうための技術の確立と技術の妥当性の検討、②Th1細胞とTh2細胞に特異的な遺伝子発現プロファイルの特定、③統合失調症罹患者からの臨床症状・血液検体の収集を開始し、細胞ソーティング法によるTh1、Th2細胞の集積、マイクロアレイ解析のシステムを確立し、Th1、Th2ポピュレーションの特定を目的とする研究を行なった。

### A-2. 統合失調症陰性症状に関わる画像所見を中間表現型とするゲノム多型解析

本プロジェクトは統合失調症の陰性症状の病態形成に関与するゲノム多型に関する包括的検討を行うため、統合失調症罹患者及び健常対照者の臨床所見・脳画像所見・ゲノム多型情報を統合して統合失調症陰性症状及び脳組織の萎縮の形成・進行に関与するゲノム多型を特定することを目的とする。

初年度は、平成19年度末に本研究プロジェクトで連携を行う東北大学加齢医学研究所に研究専用の3テスラ核磁気共鳴画像装置が設置され、平成20年度移行の撮像法につき条件検討を行なった。また、認知機能の評価を行なうためのプロトコルを本研究プロジェクトで連携を行う東北大学大学院医学系研究科の精神神経学分野や宮城県下の連携病院で行なった。

### A-3. 統合失調症陰性症状に関わる死後脳組織の分子遺伝学的解析

本プロジェクトは死後脳組織からレーザー・マイクロディセクション法等により特定の細胞種を集積することで、統合失調症の陰性症状の形成・進展に関与する前頭葉前野を含む複数の脳部位において複数種の神経細胞やグリア細胞の細胞種特異的な分子病態を特定することを目的とする。

初年度は死後脳組織において精神疾患の分子病態を特定する上で重要な交絡因子である死亡時の低酸素状態への暴露の影響を評価するため、神経細胞や各種グリア細胞由来の培養細胞の低酸素状況下での影響を評価する予備実験を行なった。

これまでに死後脳組織の分子遺伝学的研究を行う際には提供者の死因や死亡時の低酸素状態等の状況 (Agonal Factor)、特に低酸素状態が死後脳組織内の遺伝子発現等に及ぼす影響が著しく大きいことから、死後脳組織を用いた分子遺伝学的研究において死亡時の低酸素状態等の要因をいかにコントロールするかが重要な鍵となる。一方で、脳を構成する神経細胞、各種グリア細胞の種類によって低酸素に対する反応性が異なることが示唆されており、各細胞種への影響を評価することは今後の重要な課題として残されている。グリア細胞の中でもオリゴデンドロサイトは近年精神疾患の病態への報告が多

い一方で低酸素などのストレスに脆弱なことが知られている。そこで本研究では、ヒト脳のニューロンおよびオリゴデンドロサイト由来の培養細胞を用いて低酸素状態下における各細胞種特異的な遺伝子発現パターンの変化をマイクロアレイ解析により包括的に検討することで、中枢神経系における低酸素状態に対する細胞種特異的な現象の特定を目的とした。

## B. 研究方法

### B-1. 統合失調症陰性症状に関わる免疫細胞の分子遺伝学的解析

[臨床所見の集積]

(資料1参照)

研究の主旨、方法等につき説明を理解した上で、研究に協力を得られる罹患者から、所定の同意書に署名による同意を得た上で、罹患者との面接、診療録や主治医・医療機関職員・罹患者家族からの聴取により、下記の臨床情報の収集を行い資料1の用紙等に記録を行った。

診断名、家族歴（何人兄弟の何番目、精神疾患罹患者等）、既往歴・合併症（診断名・発症年齢、アレルギー、生育歴、教育歴（最終学歴）、職歴、婚姻歴、発症年齢、初発症状、病歴、入院回数・期間、治療歴〔抗精神病薬（最大容量・期間・効果）、気分安定薬（一般名・最大容量・期間）、抗パーキンソン薬（一般名・最大容量・期間）、抗ヒスタミン剤（一般名・最大容量・期間）、副作用（錐体外路症状、肥満、多飲水、その他））。

陽性および陰性症状評価尺度（Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS）により、陽性症状7項目、陰性症状7項目、総合精神病理16項目の3領域につき評価を行なった。

[血液の採取]

全血10 mlを採血しヘパリン0.5ml加で50mlファルコンチューブに室温で保存。このうち1ml

をプロジェクト2の全ゲノム多型解析研究のDNA抽出用に-80℃フリーザーに凍結保存。

[リンパ球の単離]

50mlファルコンチューブに末梢血9mlとリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline, PBS）9mlをピペティングで混和し2倍希釈する。15mlのスクリーキャップつきチューブ3本にFicoll-Paque PLUS液を6mlづつを入れる。希釈した血液6mlを静かにチューブの側面を伝いながら流し落とし重層させ、20分間遠心を行なう。3本分の上清の血清成分をまとめて凍結保存。パスツールピペットでリンパ球の層を吸い取り、新しいポリプロピレンチューブに入れる。2%濃度のウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum, FBS）と1mM濃度のエチレンジアミン四酢酸（ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA）を含むPBSを予め入れておいたリンパ球（BuffyCoat）に入れ、ピペティングで混和後、10分間遠心を行うことで、単離したリンパ球（BuffyCoat）を洗浄する。この洗浄の工程を2回繰り返す。

[Th1細胞、Th2細胞単離のための抗体の選択]

(資料2、3参照)

資料1、2に示す通り、これまでにTh1細胞、Th2細胞を単離した報告を集積し、最も広く使用され、安定した結果が報告されているマーカーとして、ヘルパーT細胞に対するCD4（cluster of differentiation）、Th1分画に対するCXCR3（CHEMOKINE, CXC MOTIF, RECEPTOR 3）、Th2分画に対してCCR4（CHEMOKINE, CC MOTIF, RECEPTOR 4）を特異的細胞マーカーとして選択した。

[ヘルパーT細胞、Th1細胞、Th2細胞に特異的な抗体による標識]

抗体はヘルパーT細胞の細胞表面マーカーであるCD4に特異的な抗CD4抗体を黄緑色蛍光色素

FITC (fluorescein isothiocyanate) で標識したものの、ヘルパーT細胞の分画であるTh1ヘルパーT細胞に特異的な細胞表面マーカーCXCR3に特異的な抗CXCR3抗体を蛍光色素APC

(allophycocyanin) で標識したもの、およびヘルパーT細胞の分画であるTh2ヘルパーT細胞に特異的な細胞表面マーカーCCR4に特異的な抗CCR4抗体を蛍光色素PE (phycoerythrin) で標識したものをを用いた。

3本の洗浄後のリンパ球 (BuffyCoat) を一つにまとめTotal 200ulとなるようにPBS [2%FBS, 1mM EDTA] を加える。抗体を各20ulずつ新しいチューブに入れて混ぜ、これにリンパ球

(BuffyCoat) 200ulを加え、穏やかに攪拌する。氷上で遮光した状態で60分間インキュベートする。1時間後、PBS [2%FBS, 1mM EDTA] 1mlを加えて攪拌し、15分間、4℃で遠心することで洗浄し、余分な抗体を洗い流す。上清を除き、1mlになるようPBS [2%FBS, 1mM EDTA] を加え、攪拌して細胞を浮遊させる。細胞数をカウントし、 $10^7$ 細胞/mlに更に希釈する。最終濃度が $1 \mu\text{g/ml}$ となるようにPI (propidium iodide) を添加する。

#### [細胞のソーティング]

(資料4参照)

ベクトン・ディッキンソン社の細胞ソーティング装置FACS Ariaで、抗CD4抗体と抗CXCR3抗体で陽性のTh1ヘルパーT細胞と抗CD4抗体と抗CCR4抗体で陽性のTh2ヘルパーT細胞を採取した。また、抗CD4抗体のヘルパーT細胞の中から、抗CXCR3抗体および抗CCR4抗体の両方で標識される細胞と抗CXCR3抗体と抗CCR4抗体のいずれでも標識されない、非Th1-非Th2のヘルパーT細胞の集積も行った。

ソーティングの設定は下記の通り行なった。細胞の大きさ等を反映するフォワードスキャッター (Forward Scatter, \_FSC) と細胞内構造の

複雑さ等を反映するサイドスキャッター (Side Scatter, \_SSC) を展開したパターンから、リンパ球のパターンを示す細胞分画P1を選択。この分画P1を、更に、細胞死を反映するPIとヘルパーT細胞を標識するCD4-FITCで展開し、CD4陽性のヘルパーT細胞で、なお且つ、PI陰性の生存している細胞を含む細胞分画P3を選択する。この細胞分画P3を、更に、Th1マーカー陽性を示すCXCR3-APCとTh2マーカー陽性を示すCCR4-PEで展開し、CXCR3-APC(+), CCR4-PE(-)をTh1ヘルパーT細胞分画P4、CXCR3-APC(-), CCR4-PE(+)をTh2ヘルパーT細胞分画P5として選択。また、CXCR3-APC(+), CCR4-PE(+)の両方のマーカーに陽性の細胞を細胞分画P6、CXCR3-APC(-), CCR4-PE(-)の両方のマーカーに陰性の細胞を細胞分画P7として選択し、これらの細胞の遺伝子発現プロファイルの検討を行なった。

上記の各細胞分画に属する細胞数を細胞ソーティング装置でカウントし、各細胞群を別々のチューブに回収し、遠心してマイクロチューブに集め、RNA保護剤を加えて溶解したのち、-80℃フリーザーに凍結した。

#### [RNA抽出と定量]

RNA抽出過程の条件を均一にするため、RNA抽出はQIAGEN社のQIACUBE核酸抽出装置とQIAGEN社のRNeasy Mini Kitを用いて各細胞からの総RNAの抽出を行い、最終量 $30 \mu\text{l}$ に溶出し、RNA定量に用いる量を除いたものは速やかに-80℃フリーザーに凍結する。この過程で、QIAGEN社のDNaseキットを用いてgenomic DNAを分解除去しておく。RNAの定量と品質評価はAgilent社のBioAnalyzer2100装置とAgilent社のRNAピコキットを用いて行なった。RNAの品質評価には総RNAの泳動パターンから得られるリボソームRNA分画の18Sと28Sのピークや、リボソームRNA分画やベースラインの情報を元に算出されるRNA品質の指標であるRIN (RNA integrity number) を用いた。

## [マイクロアレイ実験]

免疫細胞には総じてRNA量が少ないことが知られており、このプロジェクトのように特定の免疫細胞分画のマイクロアレイ・プロファイルを行なうには、2ラウンドのRNA増幅が必要となる。300pgの総RNAをエピセクター社のターゲットアンプ2ラウンド アミノアリルaRNA 増幅キットを用いてRNAの増幅標識を行なった。総RNAからcDNAを合成し、これからcRNAのインビトロでの転写を行なう。このcRNAから再度cDNAの合成を行い、cRNAのインビトロ転写を行なうものである。この2回目のcRNAインビトロ転写の際に、各転写物にアミノアリル-UTPを取り込ませ、このアミノアリルにビオチンを結合させる。

以上のようにビオチン標識を行なったcRNAをイルミナ社が提供するプロトコルに従って、ハイブリダイゼーション・バッファーに混和し、イルミナ社のヒューマン6 v2エクスペクション・ビードチップに16時間ハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ後、非特異的に吸着しているcRNAを洗浄した後、ビード・ステーション500Xで4万8687種のプローブのそれぞれについてのシグナル強度情報を集積した。

## [定量RT-PCR実験]

マイクロアレイにより注目された遺伝子につき、特異的なプライマー・セットを合成し、また、既に抽出し冷凍保存されているRNAを用いて合成されたcDNAを用いて、サイバー・グリーン法による定量RT-PCRにより、遺伝子発現を定量し、マイクロアレイのデータが再現されることを確認する。各実験工程でのばらつきが偽陽性を引き起こしている可能性を除くため、各施行を6回以上繰り返した上でSPSS等のソフトウェアを用いた統計解析によりその再現性を評価した。

## [データ解析]

ビード・ステーション500Xで4万8687種のプローブのそれぞれについてのシグナル強度情報から、ビード・ステーション発現マイクロアレイ解析ソフトウェアにより、バックグラウンド・シグナル強度を補正したデータに数種のアプローチによりノーマライゼーションを試みた。この中で最もイルミナ社が推奨し、また、汎用されているアベレージ・ノーマライゼーションにより、大きなデータの影響が無いことを確認し、以後の解析はアベレージ・ノーマライゼーションを用いて解析を行った。

同じ個体から2回採血を行なったデータにつきデータの再現性を確認した。また、アレイ間の発現プロファイルの相関を検討し、サンプルや実験に大きな問題がないかを確認した。また、Th1ヘルパーT細胞ならびにTh2ヘルパーT細胞に発現することが知られる遺伝子の発現パターンを評価し、実験の妥当性を評価した。

更に、Th1細胞とTh2細胞に特異的に発現する遺伝子のリストを作成し、これら新規に特定されたTh1、Th2細胞特異的な遺伝子のより特異的なマーカーとしての有用性を検討した。また、Th1細胞とTh2細胞の遺伝子発現プロファイルを検討し、それぞれの細胞の機能との関係についての検討を行なった。また、Th1-Th2マーカーの両方に陽性の細胞群、Th1-Th2マーカーのいずれにも陰性の細胞群の遺伝子発現プロファイルについても検討した。

最後に統合失調症罹患者と健常者のTh1細胞、Th2細胞のポピュレーションの比較の検討を行なった。

## B-2. 統合失調症陰性症状に関わる画像所見を中間表現型とするゲノム多型解析

### [認知機能評価プロトコルの検討]

本プロジェクトでH20年度以降、臨床評価での連携を行なう予定の東北大学医学系研究科精神神経学分野（松岡洋夫教授）の研究グループや



宮城県下で本研究に関する共同研究に関して倫理委員会の承認を得ている研究協力病院（宮城県立精神医療センター・青葉病院・こだまホスピタル）と認知機能評価プロトコルの検討を行った。

#### [画像MRI撮像プロトコルの検討]

また、平成19年度末に東北大学加齢医学研究所にフィリップス社超伝導磁気共鳴画像診断装置Achieva 3.0T-Xが設置され、本プロジェクトの画像評価での連携を行う東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野（川島隆太教授）やフィリップス社と平成20年度移行の撮像手順につき検討を行なった。

#### [ゲノム多型解析プロトコルの検討]

平成20年度以降行なう全ゲノム多型解析のプロトコルについての検討を行なった。

### B-3. 統合失調症陰性症状に関わる死後脳組織の分子遺伝学的解析

#### [低酸素状態の影響評価のための細胞培養実験]

ヒト神経細胞由来(SK-N-SH細胞)およびヒト・オリゴデンドロサイト由来(OL細胞)の合計2種類の培養細胞をMEM(10%FBS)培地およびD-MEM(10%FBS)培地で培養する。トリプシン処理から18時間後にこの細胞を酸素濃度2%または20%に設定した湿式CO<sub>2</sub>インキュベーターに移し、そこから更に48時間培養した。48時間培養終了時において20%酸素濃度下で培養した細胞が70~80%コンフルエントとなっていることを確認する。OL細胞については、20%酸素濃度下での培養48時間後に100%コンフルエントになるような条件でも実験を行なった。

#### [低酸素下での細胞機能評価]

ミトコンドリア活性を評価するためプロメガ社のセルタイター96アクエアス・ワン・ソリューション細胞増殖アッセイキットを用いて、MTS

細胞増殖アッセイキットを用いて、MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]の還元を指標とし、各条件下で培養された細胞の酵素活性を測定した。各細胞を96穴プレートで培養し、酸素濃度2%または20%に設定した湿式CO<sub>2</sub>インキュベーターに移した47時間後にセルタイター96アクエアス・ワン・ソリューション・リジェントを20ul加えインキュベーターに戻し反応させる。1時間反応後、10%のSDS溶液を25ul添加することで反応を停止させ、MTSが還元され形成したフォルマザンを490nmにおける吸光値で測定した。また、並行して各細胞を6穴プレートで同様に48時間培養を行い、洗浄、トリプシン処理後、細胞数のカウントを行なった。

#### [RNAの抽出・精製]

培養を終了した細胞をPBSで2回洗浄した後、セルスクレイパーを用いて細胞を回収した各細胞からQIAGEN社のRNAの抽出・精製キットを用いてTotal RNAを抽出、精製した。この過程で、QIAGEN社のDNaseキットを用いてgenomicDNAを分解除去した。抽出したRNAは核酸等分析装置(Agilent社 Bioanalyzer2100)でRNA検体のリボソームRNAの18S、28S量の定量を行い抽出したRNA検体の退縮の程度を評価した。精製されたRNAは11 ug毎にマイクロチューブに分注し氷点下80度の冷凍庫に保存しておいた。

#### [Affymetrixマイクロアレイ実験]

精製されたTotal RNA 各10 μgからAffymetrix社が提供するプロトコルに従ってcDNAを合成し、このcDNAを用いてビオチンラベルしたcRNAを生成し、これを精製細分化した後、アフィメトリックス・U133プラス・ジーンチップに16時間ハイブリダイズさせた。フルイディクス・ステーションを用いて各ジーンチップのプロープに非

特異的に付着するビオチン標識cRNAを洗浄した上でプローブに特異的にハイブリダイズするcRNAのビオチンを蛍光標識した。フルイディクス・ステーションで非特異的蛍光色素をWashした後、専用のScannerを用いて各プローブ当たりの蛍光の強度を定量した。

#### [マイクロアレイ・データ解析]

マイクロアレイの結果からGCOS/MAS5のアルゴリズムを用いて各転写物の発現量を算出し、バックグラウンド補正、ノーマライゼーションを行なった。各細胞種における経時的に有酸素、無酸素条件下のデータを比較することで、各細胞種における遺伝子発現への影響を評価した。この過程で無酸素状態の神経細胞特異的、オリゴデンドロサイト各々で遺伝子発現が影響を受ける遺伝子群を選別した。

#### [定量RT-PCR実験]

マイクロアレイにより注目された遺伝子につき、特異的なプライマー・セットを合成し、また、既に抽出し冷凍保存されているRNAを用いて合成されたcDNAを用いて、サイバー・グリーン法による定量RT-PCRにより、遺伝子発現を定量し、マイクロアレイのデータが再現されることを確認した。各実験工程でのばらつきが偽陽性を引き起こしている可能性を除くため、各施行を6回以上繰り返した上でSPSS等のソフトウェアを用いた統計解析によりその再現性を評価した。

#### [脳組織の集積]

学内外での死後脳組織集積に向けた準備を行なった。また、連携を行なっているカリフォルニア大学アーバイン校の脳バンク（責任者：ウィリアム・バニー教授）と死後脳組織を用いた研究のプロトコル等についての検討を行なった。また、国内で既に死後脳組織の集積を行っている福島県立医科大学精神医学講座（丹羽真一教

授）、国立精神神経センター武蔵病院（有馬邦正臨床検査部長）、都立松沢病院（新里和弘医長）とも平成20年度以降の死後脳組織を対象とする研究に関する研究連携の検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って作成し、東北大学倫理委員会の承認を得た研究計画を遵守する形で実施を行なうものである。画像研究・免疫細胞の発現研究・ゲノム多型研究については既に承認済み（添付）であり、死後脳研究についてはH19年度中に承認の予定である。研究計画書は下記の点等に配慮して作成されている。

- ① 罹患者・健常対照者・（死後脳組織については）遺族に研究の主旨、手順等を文書および口頭で説明した上で、本研究のため病歴、治療歴等の情報、脳画像所見、及び血液検体や死後脳組織から得られた遺伝子発現情報を本研究の解析に使用することへの同意を文書で得る。
- ② 罹患者がその後研究への協力を取り止めたい時にはいつでも申し出れば直に対象から除外し、検体、情報を破棄する旨を伝える。検体の破棄は匿名のまま密封容器に破棄する。
- ③ 対象者の個人識別情報を保護するため採血後は検体をコード化して、氏名、連絡先などの個人情報とは完全に分けて取り扱う。個人情報は本研究に従事しない東北大学の常勤医師が個人情報管理者として他の一切のコンピュータと接続していないコンピュータに情報を厳重に保管する。

本研究は動物実験、疫学研究、遺伝子治療研究、臨床研究、幹細胞研究の倫理に関する手続きが必要な研究に該当しない。

## C. 研究結果

### C-1. 統合失調症陰性症状に関わる免疫細胞の分子遺伝学的解析

[Th1細胞・Th2細胞単離の方法論]

(資料4参照)

血液細胞をFSCとSSCにより、形態と細胞内構造の密度で大まかにリンパ球を選別し、細胞死を反映するPIとヘルパーT細胞を標識するCD4-FITCで展開した後、更に、Th1マーカー陽性を示すCXCR3-APCとTh2マーカー陽性を示すCCR4-PEで展開してTh1ヘルパーT細胞とTh2ヘルパーT細胞を単離する細胞ソーティングのプロトコルで、十分な細胞の分離が行なえることを確認した。

[細胞の収量と再現性]

(資料5参照)

健常者3名から異なる採取日に採血した血液から細胞ソーティングを行い、Th1ヘルパーT細胞(Th1)、Th2ヘルパーT細胞(Th2)、Th1およびTh2マーカー共陽性細胞(Double Positive, WP)、Th1・Th2陰性ヘルパーT細胞(Double Negative, WN)の採取し、再現性を確認した。

[総RNAの収量とクオリティーコントロール]

(資料6参照)

健常者3名から細胞ソーティングにより回収した、Th1ヘルパーT細胞(Th1)、Th2ヘルパーT細胞(Th2)、Th1およびTh2マーカー共陽性細胞(Double Positive, WP)、Th1・Th2陰性ヘルパーT細胞(Double Negative, WN)から総RNAを抽出し、総RNAのクオリティー・コントロールを行った。Agilent BioAnalyzer 2100にAgilent RNA Picoキットを用いて総RNAサンプルの泳動実験を行い、リボソームRNAの18Sと28Sの比(28S/18S比)やRIN(RNA Integrity Number)等の総RNAのクオリティー・コントロールの指標を確認した。総じて28S/18S比は1.5以上、RIN値は8以上あることが確認でき、総RNAの質は良好であることが

確認された。28S/18S比1.5未満、RIN値7未満の検体は以降の実験には使用しないものとする。

[Th1細胞・Th2細胞における既存マーカー遺伝子発現パターンの評価]

本研究の細胞ソーティングにより採取したTh1ヘルパーT細胞には同細胞の細胞表面マーカーとして知られ、ソーティングに用いたCXCR3遺伝子が特異的に高いシグナル強度で発現していた。また、Th1ヘルパーT細胞の機能を特徴付けるインターフェロン $\gamma$ (IFNG)も特異的に高シグナル強度で発現していた。

本研究の細胞ソーティングにより採取したTh2ヘルパーT細胞にはソーティングに用いたTh2細胞表面マーカーであるCCR4遺伝子も特異的に発現していた他、他のTh2細胞表面マーカーであるCCR3、CRCH2等の遺伝子、更にはTh2ヘルパーT細胞が産生するサイトカインであるインターロイキン4(IL4)やインターロイキン5(IL5)も発現しており、セルソーティングとマイクロアレイ実験のプロトコルの妥当性が確認された。

[マイクロアレイ解析による新規Th1細胞・Th2細胞特異的遺伝子群の特定]

(資料7参照)

イルミナ・マイクロアレイには同一プローブでラベルされているビーズが30前後という多数装着されており、これらの複数のビーズで同一種のプローブについて検出されるシグナル強度の平均と標準偏差を算出し、これによってシグナル強度の信頼性と転写物が確かに検出されているかをディテクション値として評価を行なうことが可能になる。我々は複数の実験で一定して結果が得られる遺伝子を元に、Th1およびTh2ヘルパーT細胞のキャラクタライゼーションを行なった。Th1細胞には8463の遺伝子が、Th2細胞には8123の遺伝子が有意に検出され、そのうち、7541の遺伝子はTh1細胞、Th2細胞に共通して発

現していた。Th1ヘルパーT細胞でのみ有意なディテクション値とともにシグナル強度30以上を示し、Th2細胞ではシグナルが検出されない55の遺伝子をTh1ヘルパーT細胞特異的遺伝子として特定した。同様に4つのTh2ヘルパーT細胞特異的遺伝子を特定した。

[Th1ヘルパーT細胞とTh2ヘルパーT細胞の遺伝子発現プロファイル]

(資料8、9参照)

各免疫細胞に有意に発現が検出される遺伝子の各々について、Th1ヘルパーT細胞とTh2細胞における発現強度を比較して、Th1細胞に有意に高く発現する366の遺伝子をTh1優位遺伝子、Th2細胞に有意に高く発現する290の遺伝子をTh2優位遺伝子として検出し、Th1およびTh2ヘルパーT細胞の発現プロファイルを検討した。Th1ヘルパーT細胞には外的刺激物やストレスに反応して発現することが知られる遺伝子群が有意に多く発現しており、妥当な遺伝子発現プロファイルを示していると考えられた。また、Th2細胞には細胞死に関わる遺伝子群が有意に多く発現していた。

[統合失調症罹患者のTh1細胞・Th2細胞プロファイル]

統合失調症罹患者群と健常対照者群でTh1細胞とTh2細胞の細胞数の比をStudent t検定で比較したところ、有意に統合失調者群でTh2細胞の比が高かった( $p < 0.01$ )。

## C-2. 統合失調症陰性症状に関わる画像所見を中間表現型とするゲノム多型解析

本研究プロジェクトで連携を行う東北大学大学院医学系研究科の精神神経学分野や宮城県下の連携病院で導入に適した認知機能評価尺度の検討を行い、簡便性、要する時間、評価項目の包括性などを総合的に考慮して、統合失調症簡易認知機能評価尺度(Brief Assessment of

Cognition in Schizophrenia, BACS)を導入することに決定した。平成20年5月以降、評価を開始する。

平成19年度末に東北大学加齢医学研究所にフィリップス社超伝導磁気共鳴画像診断装置 Archiveva 3.0T-Xが設置され、本プロジェクトの画像評価での連携を行う東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野(川島隆太教授)やフィリップス社と平成20年度移行の撮像手順につき検討を行ない、前頭前野、帯状回、海馬等の領域の灰白質、白質の容積や拡散テンソル画像法(Diffusion Tensor Imaging, DTI)解析を行うことを決定し、手順等を作成した。平成20年5月以降、解析を開始する。

## C-3. 統合失調症陰性症状に関わる死後脳組織の分子遺伝学的解析

[低酸素状態の影響評価のための細胞培養実験]

(資料10参照)

低酸素状態に曝されたSK-N-SH細胞およびOL細胞はMTS還元および細胞数において、異なる応答を示した。SK-N-SH細胞において、低酸素によるMTS還元能の上昇が見られたが、細胞数にはその影響は見られなかった。また、70~80%コンフルエントのOL細胞ではMTS assayおよび細胞数ともに低酸素による影響は見られなかったが、100%コンフルエントの場合、MTS還元能が2%酸素濃度下で増加した一方、細胞数が著しく減少といった細胞密度の違いによる応答の違いが見られた。

MTS等のテトラゾリウム塩は、ミトコンドリア局在性のデヒドロゲナーゼにより還元されることから、グリア細胞において低酸素負荷によりそれらの酵素を含む、ミトコンドリア機能が刺激を受けたことが示唆された。また、100%コンフルエントになるまで培養したOL細胞における実験結果より、過密な条件下で培養することで低酸素によるミトコンドリア機能への負荷が顕在化した可能性が考えられた。

[Affymetrixマイクロアレイ実験]

(資料11、12、13参照)

マイクロアレイ解析の結果、遺伝子発現プロファイルにより大きな影響が観察された。

ミトコンドリア活性における影響と一致してOL細胞では、コンフルエントの状態により影響が現れた遺伝子数が異なり、70-80%に比べ100%コンフルエントでは、発現誘導では約3倍、抑制では約5倍の遺伝子数の変化がみられた。また、SK-N-SH細胞では同じコンフルエント状態のOL細胞に比べ発現誘導・抑制どちらにおいても1/2-1/3程度しかみられなかった。

OL細胞において発現量の変化が著しい遺伝子の中には、これまでに筋肉細胞などで低酸素により発現誘導または抑制されるとChi等によって報告されている遺伝子と一致する遺伝子が7種存在した。これらの遺伝子は、細胞種によらず、普遍的に低酸素の影響を受ける遺伝子である可能性が考えられる。

また、各細胞により変化した遺伝子群は大きく異なった。OL細胞では複数の糖類関連の遺伝子群が発現誘導され、逆に抑制された遺伝子群としてリボソーム関連遺伝子が挙げられた。一方、SK-N-SH細胞では、OL細胞とは大きく異なり、膜関連遺伝子群が誘導、ホメオタシス関連遺伝子が抑制される傾向が現れた。

## D. 考察

### D-1. 統合失調症陰性症状に関わる免疫細胞の分子遺伝学的解析

特定の免疫細胞の包括的遺伝子発現プロファイルの検討は世界的にも先例が無いため、最初に健常者の血液での条件検討を行なった。採血日を変えて得た血液からも再現性の高い細胞数比と遺伝子発現プロファイルを得ることができ、また、少数の細胞からも高品質のRNAが得られ、また、微量のRNAからの2ラウンド増幅を用いた

マイクロアレイ手技により、再現性の高い発現プロファイルデータが得られ、本研究の方法論の正当性が証明された。また、既知のTh1ヘルパーT細胞とTh2ヘルパーT細胞のマーカー遺伝子の発現パターンの検討によっても、技術の正当性が確認された。

更に、世界に先駆けてTh1ヘルパーT細胞とTh2ヘルパーT細胞のマイクロアレイによる包括的な遺伝子発現プロファイルの解析に成功し、55個のTh1細胞特異的な遺伝子と4個のTh2細胞特異的な遺伝子を特定した。この遺伝子情報は、より有効なTh1細胞、Th2細胞特異的マーカーの開発、さらにはヘルパーT細胞の機能分類の開発に繋がる可能性が期待される。

また、Th1細胞とTh2細胞に多く発現する遺伝子発現プロファイルの検討は、統合失調症を含めてTh1-Th2のバランスの障害が知られている疾患の病態解明に結びつくものと期待される。

統合失調症罹患者と健常対照者からの血液のTh1細胞とTh2細胞の比を検討したところ、従来の報告と一致してTh2細胞の比が高く、次年度以降、更に多くの検体を解析して確認を行ない、統合失調症の陰性症状の程度に相関する分子遺伝学的変化が検出されることが期待される。

### D-2. 統合失調症陰性症状に関わる画像所見を中間表現型とするゲノム多型解析

初年度は認知機能評価で連携研究を行う東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野（松岡洋夫教授）および宮城県下の連携病院と画像解析で連携研究を行う東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野（川島隆太教授）およびフィリップス社と研究方法・手順に関する検討を行なった。平成20年度5月以降、認知機能・脳画像・ゲノム多型情報の集積が円滑に行なわれ、プロジェクト1の免疫細胞の遺伝子発現情報や陰性症状評価尺度の情報とも統合されて、陰性症状進行に関わる画像所見・分子遺伝学的機序の

解明が進むと考えられる。

### D-3. 統合失調症陰性症状に関わる死後脳組織の分子遺伝学的解析

従来より、低酸素状態の脳組織および細胞に及ぼす影響は脳血管障害等の疾患との関連で研究が行われている (Slevin 2005)。また、近年活発に行われている各種中枢神経疾患の成因解明のための死後脳組織における分子遺伝学的現象の解析における低酸素状態の影響の評価の重要性を指摘する報告がなされて来ており、その観点からも脳組織内の遺伝子発現等に低酸素状態が及ぼす影響についての検討が行われてきている (Tomita 2004, Ryan 2004, Vawter 2006)。一方、低酸素が及ぼす影響は細胞種によって大きく異なることが知られている。Chi等(2006)はマイクロアレイ解析を用いて平滑筋細胞、上皮細胞、内皮細胞由来の遺伝子発現変化を包括的に解析している。Irace等(2005)やKuan等(2003)のデータは低酸素状態が神経細胞や膠細胞特異的な分子遺伝学的変化を引き起こすことを指摘している。しかし、これまでに神経細胞、各種膠細胞内の遺伝子発現パターンを包括的に解析した研究はなされておらず、本申請研究が実施されることで細胞種特異的な遺伝子発現パターンが明らかになることが望まれる。実験結果より、脳が低酸素状態下におかれた際、低酸素が及ぼす生物学的影響は細胞種により大きく異なることが示唆された。本研究の成果は脳血管障害等の疾患の病態解明に役立ち、新たな病状評価の指標や治療法の開発に繋がる可能性を有するのみでなく、国内・国外の脳バンク運営ならびに死後脳組織を用いた分子遺伝学的研究において死亡時の低酸素状態の影響を評価する上で重要な情報を提供し、今後期待される国際的な基準作成にも貢献することが期待される。

## E. 結論

### E-1. 統合失調症陰性症状に関わる免疫細胞の分子遺伝学的解析

世界に先駆けて特定の免疫細胞のマイクロアレイ手技による包括的遺伝子発現解析の手技の確立に成功した。更に、Th1ヘルパーT細胞とTh2ヘルパーT細胞のマイクロアレイによる包括的な遺伝子発現プロファイルの解析に成功し、55個のTh1細胞特異的な遺伝子と4個のTh2細胞特異的な遺伝子を特定した。この遺伝子情報は、より有効なTh1細胞、Th2細胞特異的マーカーの開発、さらにはヘルパーT細胞の機能分類の開発や、統合失調症を含めてTh1-Th2のバランスの障害が知られている疾患の病態解明に結びつくものと期待される。また、統合失調症罹患患者からの血液では健常対照者に比して、有意にTh2細胞の比が高く、従来の報告と一致していた。次年度以降、更に多くの検体を解析して確認を行ない、統合失調症の陰性症状の程度に相関する分子遺伝学的変化が検出されることが期待される。

### E-2. 統合失調症陰性症状に関わる画像所見を中間表現型とするゲノム多型解析

初年度は研究連携を行う研究グループと認知機能評価と画像解析の研究手法・手順に関する検討を行なった。平成20年度5月以降、認知機能・脳画像・ゲノム多型情報の集積が円滑に行なわれ、陰性症状進行に関わる画像所見・分子遺伝学的機序の解明が進むと考えられる。

### E-3. 統合失調症陰性症状に関わる死後脳組織の分子遺伝学的解析

初年度、実験結果より、脳が低酸素状態下におかれた際、低酸素が及ぼす生物学的影響は細胞種により大きく異なることが示され、また、細胞種特異的な遺伝子プロファイルが示された。平成20年度は、細胞種特異的に陰性症状の進行に関わる遺伝子発現の細胞種特異的パターンを解析するための脳組織検体の集積を進め、平

成 2 1 年度に施行される分子遺伝学的解析が行なわれる際に本年度の研究結果が反映されるものと考えられる。

[参考文献]

Schwarz MJ, Chiang S, Müller N, Ackenheil M. T-helper-1 and T-helper-2 responses in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun.* 2001; 15(4): 340-370.

Riedel M, Spellmann I, Schwarz MJ, Strassnig M, Sikorski C, Möller HJ, Müller N. Decreased T cellular immune response in schizophrenic patients. *J Psychiatr Res.* 2007; 41(1-2): 3-7.

Schwarz MJ, Müller N, Riedel M, Ackenheil M. The Th2-hypothesis of schizophrenia: a strategy to identify a subgroup of schizophrenia caused by immune mechanisms. *Med Hypotheses.* 2001; 56(4): 483-486.

Avgustin B, Wraber B, Tavcar R. Increased Th1 and Th2 immune reactivity with relative Th2 dominance in patients with acute exacerbation of schizophrenia. *Croat Med J.* 2005; 46(2): 268-274.

Kim YK, Myint AM, Lee BH, Han CS, Lee HJ, Kim DJ, Leonard BE. Th1, Th2 and Th3 cytokine alteration in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28(7): 1129-1134.

Schwarz MJ, Chiang S, Müller N, Ackenheil M. T-helper-1 and T-helper-2 responses in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun.* 2001; 15(4): 340-370.

Schwarz MJ, Müller N, Riedel M, Ackenheil M. The Th2-hypothesis of schizophrenia: a strategy to identify a subgroup of schizophrenia caused by

immune mechanisms. *Med Hypotheses.* 2001; 56(4):483-486.

Henneberg A, Riedl B, Dumke HO, Kornhuber HH. T-lymphocyte subpopulations in schizophrenic patients. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci.* 1990; 239(5): 283-284.

Masserini C, Vita A, Basile R, Morselli R, Boato P, Peruzzi C, Pugnetti L, Ferrante P, Cazzullo CL. Lymphocyte subsets in schizophrenic disorders. Relationship with clinical, neuromorphological and treatment variables. *Schizophr Res.* 1990; 3(4): 269-275.

Rapaport MH, McAllister CG, Kirch DG, Pickar D. The effects of typical and atypical neuroleptics on mitogen-induced T lymphocyte responsiveness. *Biol Psychiatry.* 1991; 29(7): 715-717.

Müller N, Riedel M, Schwarz MJ, Engel RR. Clinical effects of COX-2 inhibitors on cognition in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2005; 255(2): 149-151.

Müller N, Strassnig M, Schwarz MJ, Ulmschneider M, Riedel M. COX-2 inhibitors as adjunctive therapy in schizophrenia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004; 13(8): 1033-1044.

Schwarz MJ, Krönig H, Riedel M, Dehning S, Douhet A, Spellmann I, Ackenheil M, Möller HJ, Müller N. IL-2 and IL-4 polymorphisms as candidate genes in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2006; 256(2): 72-76.

Cohen H, Ziv Y, Cardon M, Kaplan Z, Matar MA, Gidron Y, Schwartz M, Kipnis J. Maladaptation to

mental stress mitigated by the adaptive immune system via depletion of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ cells. *J Neurobiol.* 2006; 66(6): 552-563.

Kipnis J, Cardon M, Strous RD, Schwartz M. Loss of autoimmune T cells correlates with brain diseases: possible implications for schizophrenia? *Trends Mol Med.* 2006; 12(3): 107-112.

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 2006; 9(2): 268-275.

Kipnis J, Cohen H, Cardon M, Ziv Y, Schwartz M. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(21): 8180-8185.

Chi JT, Wang Z, Nuyten DS, Rodriguez EH, Schaner ME, Salim A, Wang Y, Kristensen GB, Helland A, Børresen-Dale AL, Giaccia A, Longaker MT, Hastie T, Yang GP, van de Vijver MJ, Brown PO. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med.* 2006; 3(3): e47.

Irace C, Scorziello A, Maffettone C, Pignataro G, Matrone C, Adornetto A, Santamaria R, Annunziato L, Colonna A. Divergent modulation of iron regulatory proteins and ferritin biosynthesis by hypoxia/reoxygenation in neurones and glial cells. *J Neurochem.* 2005; 95(5): 1321-1331

Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G,

Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(25): 15184-15189.

Tomita H, Vawter MP, Walsh DM, Evans SJ, Choudary PV, Li J, Overman KM, Atz ME, Myers RM, Jones EG, Watson SJ, Akil H, Bunney WE Jr. Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry.* 2004; 55(4): 346-352.

Ryan MM, Huffaker SJ, Webster MJ, Wayland M, Freeman T, Bahn S. Application and optimization of microarray technologies for human postmortem brain studies. *Biol Psychiatry.* 2004; 55(4): 329-336.

Vawter MP, Tomita H, Meng F, Bolstad B, Li J, Evans S, Choudary P, Atz M, Shao L, Neal C, Walsh DM, Burmeister M, Speed T, Myers R, Jones EG, Watson SJ, Akil H, Bunney WE. Mitochondrial-related gene expression changes are sensitive to agonal-pH state: implications for brain disorders. *Mol Psychiatry.* 2006; 11(7): 615, 663-679.

## F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. Atz M, Walsh D, Cartagena P, Li J, Evans S, Choudary P, Overman K, Stein R, Tomita H, Potkin S, Myers R, Watson SJ, Jones EG, Akil H, Bunney WE Jr, Vawter MP. Methodological considerations for gene expression profiling of human brain. *J Neurosci*



Methods, 2007;163(2): 295-309.

2. Li JZ, Meng F, Tsavaler L, Evans SJ, Choudary PV, Tomita H, Vawter MP, Walsh D, Shokoohi V, Chung T, Bunney WE Jr, Jones EG, Akil H, Watson SJ, Myers RM. Sample matching by inferred agonist stress in gene expression analyses of the brain. BMC Genomics. 2007; 8(1): 336 [Epub ahead of print]

## (2) 総説

1. 富田博秋、田中千晶：精神疾患研究におけるミトコンドリア関連遺伝子の発現変化～病態か、アーチファクトか？. 脳と精神の医学, 19(2):印刷中

## 2. 学会発表

### (1) 特別講演、シンポジウム等

1. 富田博秋、「精神疾患研究におけるミトコンドリア関連遺伝子の発現変化～病態か、アーチファクトか？」第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会、札幌、2007年7月12日
2. 富田博秋、「ゲノム研究を明日の精神科臨床に役立てるために」第101回岡山大学大学院医歯薬学総合研究科精神神経病態学教室臨床集談会、岡山、2007年12月15日
3. 富田博秋、「気分安定薬は双極性障害に何故効くのか？～基本から最新の研究情報まで～」デパケン双極性障害適応拡大5周年記念講演会、仙台、2008年2月1日

### (2) 国際学会

1. Tomita H, Tanaka C, Kim HB, Bunney WE. Microarray gene expression profiles in neuronal and

glial cell lines after lithium treatment. Society for Neuroscience 37th annual meeting, San Diego CA., USA. November 3-7, 2007

### (3) 一般学会発表

1. 富田博秋、服部寿妃、坂本 昌樹、佐藤 大樹、ヘレン・キム、ウィリアム・バニー 「リチウム投与によるニューロンおよびグリア特異的遺伝子発現変化」第27回リチウム研究会、東京、2007年4月20日
2. 田中千晶、石川美由紀、富田博秋 「低酸素状態下での脳内細胞種特異的遺伝子発現の包括的検討」第15回日本精神・行動遺伝医学会、東京、2007年11月17日
3. 田中千晶、石川美由紀、富田博秋 「低酸素状態がニューロンおよびオリゴデンドロサイトに及ぼす分子遺伝学的変化の検討～統合失調症死後脳研究に関連して～」第3回日本統合失調症学会、2008年3月15日

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1) 特許取得：報告書作成時点で本研究に基づいて既に申請・取得した特許はない。  
(①Th1ヘルパーT細胞、Th2ヘルパーT細胞に特異的な新規遺伝子群を新たな細胞マーカーの開発、及び、Th1/Th2バランスに関連する疾患の診断法、治療法の開発の標的として特許申請準備中。  
②脳内細胞種特異的に低酸素状態で発現変化を起こす遺伝子群を低酸素・脳虚血による脳障害治療法開発の標的として特許申請準備中。)
- 2) 実用新案登録：なし
- 3) その他：なし

# 資 料

(資料1：臨床情報一般)

匿名化ID：\_\_\_\_\_ 性別：\_\_\_\_\_ 年齢：\_\_\_\_\_

診断名：

家族歴：何人兄弟の何番目：

精神疾患罹患者（診断名・関係）：

既往歴・合併症（診断名・発症年齢）：

アレルギー：

生育歴：

教育歴（最終学歴）：

職歴：

婚姻歴：

発症年齢：

初発症状：

病歴：

入院回数・期間（何回・何ヶ月）：

治療歴・抗精神病薬（一般名・最大容量・期間・効果）：

気分安定薬（一般名・最大容量・期間）：

抗パーキンソン薬（一般名・最大容量・期間）：

抗ヒスタミン剤（一般名・最大容量・期間）：

副作用・EPS：

肥満：

多飲水：

その他：

(資料2 : Th1ヘルパーT細胞マーカーの文献考察の要約)

Th1 マーカー: CD4およびCXCR3

Ref No	マーカー	抗体	抗体メーカー	FCM機器	論文名	last	
H2	CXCR3	FITC-anti CXCR3	Dako	FACScan;BD	Cancer Sci	Kazunari Tanabe Tokyo Women's Medical University	2006(97)8,780-786
	CCR5	FITC-anti CCR5	PharMingen				
	CD4	PE-antiCD4	BD				
H4	CXCR3	PE-antiCXCR3	R&D Systems	FACStar ;BD	J. Immunol	Seishi Kyoizumi Department of Radiobiology, Radiation Effects Research Foundation	2002(169)39-48.
H7	CD4	FITC-antiCD4	BD	FACSCoulter	Ann Rheum Dis	P M Villiger Rheumatology and Clinical Immunology and Allergy, University Hospital, CH-3010 Bern, Switzerland	2005(64)318-320
	CXCR3	APC-antiCXCR3					
Hg;Tissue	CXCR3	PE/FITC- antiCXCR3	PharMingen	FACSCalibur;BD	Int. J. Cancer	Iwao Sasaki Tohoku University School of Medicine	2005(116)949-956
	CCR5	PE-antiCCR5					
H33	CD4	FITC/Cy-chrome-antiCD4	BD	FACSCalibur ;BD	American Journal of Gastroenterology	Sheung Tat Fan The university of Hong Kong	20041111-1121
	CCR5	Phycoerythrin-antiCCR5					
	CXCR3	Phycoerythrin-antiCXCR3					
H12	CXCR3	FITC/NHS-LC-Biotin-antiCXCR3	Boehringer Mannheim Corp/Pierce	FACScan;BD	Eur. J. Immunol.	Christina M. Parker Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Harvard Medical School	2000(30)819-826
	CCR5	FITC/NHS-LC-Biotin-antiCCR5					
H10**	CD4	anti-CD4-APC	Beckman	FACSCalibur	Eur. J. Immunol.	Federica Sallusto Institute for Research in Biomedicine,	2003(33)474-482
	CCR5	anti-CCR5	PharMingen				
	CXCR6	anti-CXCR6	Millennium Pharmaceuticals				
	CXCR3	anti-CXCR3	PharMingen				
**検出は2次抗体を用いた。							
H11	CD4	PerCP-antiCD4	BD	FACScan;BD	Journal of Clinical Immunology	KAZUHIKO TAKEHARA Kanazawa University Graduate School of Medical	2003(23),4
	CXCR3	PE-antiCXCR3	BD				
H14	CD4	PerCP-antiCD4	BD	FACSCalibur; BD	Investigative Ophthalmology & Visual Science	Andrew D. Dick University of Bristol	2004(45)1,170-176
	CCR5	PE-antiCCR5	BD				
	CXCR3	PE-antiCXCR3	BD				
H15	CD4	PE-anti-CD4	PharMingen	FACScan;BD	J. Clin. Invest.	Charles R. Mackay LeukoSite, Inc.,	1998(101),4,746-754
	CXCR3	biotinylated anti-CXCR3 mAb	自作				
	CCR5	anti-CCR5	自作				
H16	CD4	(PE)-labeled anti-human CD4	PharMingen	FACScan; BD	Mod Rheumatol	Saburo Sone Tokushima University	2003(13)114-120
	CXCR3	FITC-labeled antihuman CXCR3					
H19	CXCR3	FITC-antiCXCR3	DAKO	FACScan;BD	Acta Med. Okayama	Hirofumi Makinoa Okayama University Graduate School of Medicine ,	2006(60)3,149-157
	CCR4	FITC-antiCCR4 mAb	KyowaHakko				
	CD4	Per-CP-antiCD4	BD				