

We thank Hyungwon Choi, Terry Speed, Margit Burmeister, Laura Scott for their helpful advice.

The authors are members of the NIMH Silvio O. Conte Center for Genomic Studies of Bipolar Disorder and Major Depression and the Pritzker Neuropsychiatric Disorders Research Consortium, supported by the Pritzker Neuropsychiatric Disorders Research Fund L.L.C. This work also received support from the William Lion Penzner Foundation.

## References

1. Elston R, Olson J, Palmer L (eds.): **Biostatistical Genetics and Genetic Epidemiology**. Chichester, England: John Wiley & Sons, LTD; 2002.
2. Knowler WC, Williams RC, Pettitt DJ, Steinberg AG: **Gm3;5,13,14 and type 2 diabetes mellitus: an association in American Indians with genetic admixture**. *Am J Hum Genet* 1988, **43**(4):520-526.
3. Campbell CD, Ogburn EL, Lunetta KL, Lyon HN, Freedman ML, Groop LC, Altshuler D, Ardlie KG, Hirschhorn JN: **Demonstrating stratification in a European American population**. *Nat Genet* 2005, **37**(8):868-872.
4. Freedman ML, Reich D, Penney KL, McDonald GJ, Mignault AA, Patterson N, Gabriel SB, Topol EJ, Smoller JW, Pato CN, Pato MT, Petryshen TL, Kolonel LN, Lander ES, Sklar P, Henderson B, Hirschhorn JN, Altshuler D: **Assessing the impact of population stratification on genetic association studies**. *Nat Genet* 2004, **36**(4):388-393.
5. Marchini J, Cardon LR, Phillips MS, Donnelly P: **The effects of human population structure on large genetic association studies**. *Nat Genet* 2004, **36**(5):512-517.
6. Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, Tomita H, Evans SJ, Choudary PV, Lopez JF, Avelar A, Shokoohi V, Chung T, Mesarwi O, Jones EG, Watson SJ, Akil H, Bunney WE, Jr., Myers RM: **Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions**. *Hum Mol Genet* 2004, **13**(6):609-616.
7. 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.
8. Pritchard CC, Hsu L, Delrow J, Nelson PS: **Project normal: defining normal variance in mouse gene expression**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(23):13266-13271.
9. Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JT, Griffin JL, Wayland M, Freeman T, Dudbridge F, Lilley KS, Karp NA, Hester S, Tkachev D, Mimmack ML, Yolken RH, Webster MJ, Torrey EF, Bahn S: **Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress**. *Mol Psychiatry* 2004, **9**(7):684-697, 643.
10. Sun X, Wang J, Tseng M, Young T: **Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontalcortex of subjects with bipolar disorder**. *J Psychiatry Neurosci* 2006, **31**(3):189-196.
11. Glatt SJ, Everall IP, Kremen WS, Corbeil J, Sasik R, Khanlou N, Han M, Liew CC, Tsuang MT: **Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(43):15533-15538.
12. 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**. *Mol Psychiatry* 2006, **11**(7):615.
13. Website title [[http://www.stanleyresearch.org/programs/brain\\_collection.asp](http://www.stanleyresearch.org/programs/brain_collection.asp)]
14. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P: **Inference of population structure using multilocus genotype data**. *Genetics* 2000, **155**(2):945-959.

15. Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P: **Association mapping in structured populations.** *Am J Hum Genet* 2000, **67**(1):170-181.
16. Tang H, Peng J, Wang P, Risch NJ: **Estimation of individual admixture: analytical and study design considerations.** *Genet Epidemiol* 2005, **28**(4):289-301.
17. Hinds DA, Stokowski RP, Patil N, Konvicka K, Kershenovich D, Cox DR, Ballinger DG: **Matching strategies for genetic association studies in structured populations.** *Am J Hum Genet* 2004, **74**(2):317-325.
18. Bamshad MJ, Wooding S, Watkins WS, Ostler CT, Batzer MA, Jorde LB: **Human population genetic structure and inference of group membership.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**(3):578-589.
19. Erosheva E: **Grade of membership and latent structure models with application to disability survey data.** *PhD Thesis.* Pittsburgh: Carnegie Mellon University; 2002.
20. Hauser ER, Watanabe RM, Duren WL, Bass MP, Langefeld CD, Boehnke M: **Ordered subset analysis in genetic linkage mapping of complex traits.** *Genet Epidemiol* 2004, **27**(1):53-63.
21. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D: **Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies.** *Nat Genet* 2006, **38**(8):904-909.
22. Setakis E, Stirnadel H, Balding DJ: **Logistic regression protects against population structure in genetic association studies.** *Genome Res* 2006, **16**(2):290-296.
23. Iwamoto K, Bundo M, Kato T: **Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis.** *Hum Mol Genet* 2005, **14**(2):241-253.
24. Torrey EF, Webster M, Knable M, Johnston N, Yolken RH: **The stanley foundation brain collection and neuropathology consortium.** *Schizophr Res* 2000, **44**(2):151-155.
25. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G: **Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(10):6567-6572.
26. Rosenberg NA, Li LM, Ward R, Pritchard JK: **Informativeness of genetic markers for inference of ancestry.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**(6):1402-1422.
27. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES: **Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring.** *Science* 1999, **286**(5439):531-537.
28. Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA: **Identifying biological themes within lists of genes with EASE.** *Genome Biol* 2003, **4**(10):R70.
29. Burke WJ, O'Malley KL, Chung HD, Harmon SK, Miller JP, Berg L: **Effect of pre- and postmortem variables on specific mRNA levels in human brain.** *Brain Res Mol Brain Res* 1991, **11**(1):37-41.
30. Hardy JA, Wester P, Winblad B, Gezelius C, Bring G, Eriksson A: **The patients dying after long terminal phase have acidotic brains; implications for biochemical measurements on autopsy tissue.** *J Neural Transm* 1985, **61**(3-4):253-264.
31. Hynd MR, Lewohl JM, Scott HL, Dodd PR: **Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue.** *J Neurochem* 2003, **85**(3):543-562.
32. Mexal S, Berger R, Adams CE, Ross RG, Freedman R, Leonard S: **Brain pH has a significant impact on human postmortem hippocampal gene expression profiles.** *Brain Res* 2006, **1106**(1):1-11.



33. Preece P, Cairns NJ: **Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance.** *Brain Res Mol Brain Res* 2003, **118**(1-2):60-71.
34. Reiner AP, Ziv E, Lind DL, Nievergelt CM, Schork NJ, Cummings SR, Phong A, Burchard EG, Harris TB, Psaty BM, Kwok PY: **Population structure, admixture, and aging-related phenotypes in African American adults: the Cardiovascular Health Study.** *Am J Hum Genet* 2005, **76**(3):463-477.
35. 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.
36. Purcell S, Sham P: **Properties of structured association approaches to detecting population stratification.** *Hum Hered* 2004, **58**(2):93-107.
37. Satten GA, Flanders WD, Yang Q: **Accounting for unmeasured population substructure in case-control studies of genetic association using a novel latent-class model.** *Am J Hum Genet* 2001, **68**(2):466-477.
38. Reich DE, Goldstein DB: **Detecting association in a case-control study while correcting for population stratification.** *Genet Epidemiol* 2001, **20**(1):4-16.
39. Devlin B, Roeder K: **Genomic control for association studies.** *Biometrics* 1999, **55**(4):997-1004.
40. Bacanu SA, Devlin B, Roeder K: **The power of genomic control.** *Am J Hum Genet* 2000, **66**(6):1933-1944.
41. Collins-Schramm HE, Chima B, Operario DJ, Criswell LA, Seldin MF: **Markers informative for ancestry demonstrate consistent megabase-length linkage disequilibrium in the African American population.** *Hum Genet* 2003, **113**(3):211-219.
42. Stuart RO, Wachsman W, Berry CC, Wang-Rodriguez J, Wasserman L, Klacansky I, Masys D, Arden K, Goodison S, McClelland M, Wang Y, Sawyers A, Kalcheva I, Tarin D, Mercola D: **In silico dissection of cell-type-associated patterns of gene expression in prostate cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(2):615-620.
43. Lu P, Nakorchevskiy A, Marcotte EM: **Expression deconvolution: a reinterpretation of DNA microarray data reveals dynamic changes in cell populations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(18):10370-10375.
44. Venet D, Pecasse F, Maenhaut C, Bersini H: **Separation of samples into their constituents using gene expression data.** *Bioinformatics* 2001, **17 Suppl 1**:S279-287.
45. Ghosh D: **Mixture models for assessing differential expression in complex tissues using microarray data.** *Bioinformatics* 2004, **20**(11):1663-1669.
46. Lahdesmaki H, Shmulevich L, Dunmire V, Yli-Harja O, Zhang W: **In silico microdissection of microarray data from heterogeneous cell populations.** *BMC Bioinformatics* 2005, **6**:54.
47. Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Bonilla C, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM: **Control of confounding of genetic associations in stratified populations.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**(6):1492-1504.
48. Evans SJ, Choudary PV, Neal CR, Li JZ, Vawter MP, Tomita H, Lopez JF, Thompson RC, Meng F, Stead JD, Walsh DM, Myers RM, Bunney WE, Watson SJ, Jones EG, Akil H: **Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(43):15506-15511.
49. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP: **Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(4):e15.
50. Website title [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>]

51. Dai M, Wang P, Boyd AD, Kostov G, Athey B, Jones EG, Bunney WE, Myers RM, Speed TP, Akil H, Watson SJ, Meng F: **Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(20):e175.
52. Website title  
[[http://brainarray.mhri.med.umich.edu/Brainarray/Database/CustomCDF/CDF\\_download\\_v3.asp](http://brainarray.mhri.med.umich.edu/Brainarray/Database/CustomCDF/CDF_download_v3.asp)]

## Figure legends

### Figure 1. Technical "block" effects due to cohort, chip-type, and laboratory (site)

a. A color-coded correlation matrix among 201 AnCg samples. Red indicates high correlation between pairs of samples; blue indicates low correlation. Samples were ordered by technical batches, which in turn were defined by Cohort, Chip Type, and Site, as indicated below the heatmap. Throughout this paper the sample order in correlation heatmaps is the same from left to right as from bottom to top. Pearson's correlations were calculated by using all U133A transcripts. Rectangular "blocks" of high correlation, indicated in red, correspond to samples that are highly similar to each other in gene expression patterns. These block-block partitions coincide with the natural boundaries of experimental batches as indicated below the heatmap. D1 through D4 indicate Depression Cohorts 1 to 4, while S1 and S2 indicate Schizophrenia Cohort 1 and 2.

b. The same correlation matrix after removing the block effect by median centering each block. The diagonal line of high values are self-self correlations, but the two off-diagonal lines of relatively high correlation values are between replicate chips for the same samples ran at two sites. The sample order and block partitions are the same as in 1a.

### Figure 2. From discrete classification to grades of membership

a. The same correlation matrix as in Figure 1b but with samples re-grouped so that the Type 1 samples are on the lower left side, showing that samples can be classified into two main types of expression patterns.

b. The same samples can be subdivided into three classes, and re-ordered accordingly in the correlation heatmap, still showing reasonably strong distinction between the three classes.

c. The same heatmap re-ordered by the first Principal Component scores, resulting in a gradual progression from one prototype to the other.

### Figure 3. Informativeness of genes for agonal stress

The same heatmap as shown in 2c but with the correlations calculated by using the 25% strongest Type 1-Type 2 genes (upper left), the next 25% (upper right), the third 25% (lower left), and the last 25% of genes (lower right). The genes were ranked by comparing 40 samples (~20% of the total of 201 samples) on the lower left side in 2c against 40 samples on the upper right side in a Student t test.

### Figure 4. Correlation of ASR and pH values

Median ASR values across 2-3 sites and six brain regions for 126 subjects versus their brain pH values. Samples indicated in red and black were in general agreement between pH and ASR. The eight samples in blue were previously removed from analysis due to either low pH or some clinical complications (AFS is non-zero), but had normal ASR values and likely had not experienced significant agonal stress. The eight samples shown in green were previously

included but had low ASR values, and should better be removed in order to reduce sample heterogeneity and possible case-control imbalance.

**Figure 5. Comparing pH-matching and ASR-matching with an example**

- a. ASR and pH values for samples used in a test case, where a group of pH-matched major depression samples (in blue) were compared to controls (in red), while a second group of ASR-matched major depression samples (in green) were compared to the same controls.
- b. In an analysis of enrichment of Gene Ontology and KEGG pathway terms for the top genes, the pH-matched comparison still revealed significant effects for gene families and pathways known to be affected by the pH effect, while the same effect was much attenuated in the ASR-matched comparison.

**Figure 6. Region-region difference of ASRs**

A color-coded table of (from left to right) pH values (red is higher pH), AFS scores (0 complication in red, AFS=1 in light blue), and eight series of ASR values (red-higher ASR) for 68 subjects satisfying  $pH > 6.6$  and at most two missing values out of eight ASR series. The eight ASR columns represented four brain regions, each measured in two sites. Tan-colored elements indicate missing data because the samples were not run.

## Additional files

### Additional file 1

File format: PDF

Title: Technical batch effects

Description:

a. The color-coded correlation matrix among the same 201 AnCg samples as in Figure 1a, but calculated by using only the 68 control probe sets targeting spiked-in *E. coli* transcripts. Sample order was the same as in Figure 1a.

b. Similar correlation heatmap based on 700-gene Illumina data. Samples were ordered by Cohort.

c. Correlation matrix among 24 chips that represented eight samples ran three times each. The first time (samples 1-8 counting from lower left) was on U133A chips; the next two times were on U133\_Plus2 chips. Shown are results after median centering of the chip-type blocks. The off-diagonal lines of high similarity are for the three replicate chips of the same samples, indicating that sample-sample differences were reproducibly measured across two chip types after removing the block effect.

### Additional file 2

File format: PDF

Title: Heatmap of normalized expression levels for "top 25%" genes in 201 AnCg samples

Description:

Shown are log-transformed, normalized expression levels of 3184 transcripts across 201 AnCg samples. These genes have the highest 25% of Type 1- Type 2 absolute t scores, and have been used to calculate the sample-sample correlations shown in Figure 3, upper left panel. The genes are ordered from left to right by their coefficients in the first principal component (i.e., each gene's "loading" in the first eigenvector), whereas the samples are ordered from top to bottom by their first principal component scores. The color scale is for log<sub>2</sub> values of -3 (8-fold lower expression) to 3 (8-fold higher), with some values in the upper left corner being greater than 3. These saturated values were shown in brown.

### Additional file 3

File format: CDT

Title: Expression levels of 3841 most changed genes

Description:

Normalized expression levels for 3841 genes in 201 samples as shown in Additional file 2. Samples and genes are ordered by PC results, and formatted in Treeview format.

### Additional file 4

File format: PDF

Title: Cross-validation errors in classifying samples

Description:

Number of cross-validation errors as a function of number of genes used in the nearest Shrunken Centroid classification [25] where the 201 AnCg samples were analyzed, and the Type 1-Type 2 designations were taken as known. Lower panel showed the errors for Type 1 and Type 2 samples separately.



**Additional file 5**

**File format: PDF**

**Title: Comparison of Type 1-Type 2 differences across brain regions**

**Description:**

Scatter plots of t scores for 12,734 transcripts on the U133A chips across six regions, showing that the Type-1 versus Type-2 comparisons in these brain regions are highly correlated. The t scores are calculated by comparing about 20% strongest Type 1 samples against about 20% strongest Type 2 samples in each region. The samples are ranked by a Principal Component Analysis by using all transcripts.

**Additional file 6**

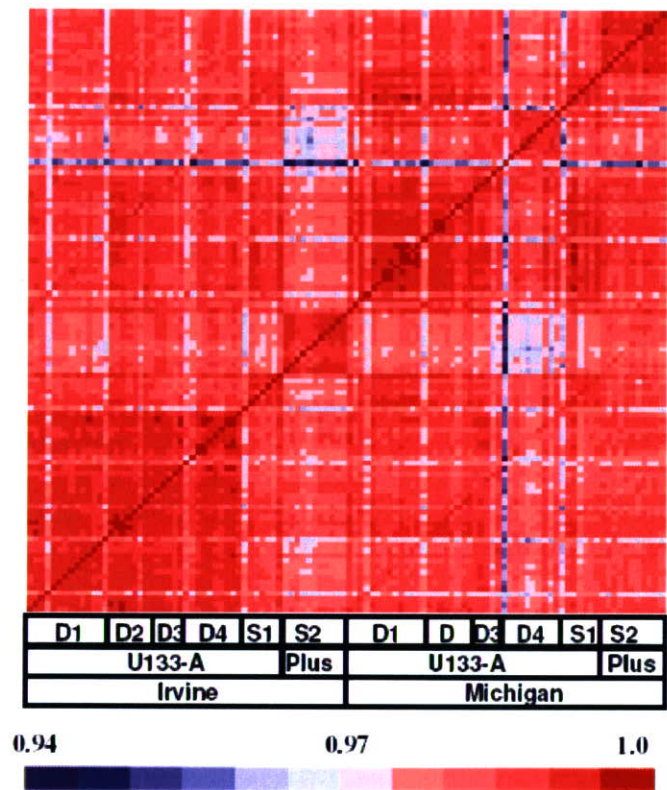
**File format: XLS**

**Title: Most strongly changed genes upon agonal stress**

**Description:**

The spreadsheet "1000Up\_LowpH" listed 1000 most strongly up-regulated genes among the Type-2, low-pH samples and their t scores in five regions. The second spreadsheet "1000Down\_LowpH" listed the corresponding 1000 most strongly down-regulated transcripts. The Unigene ID's are from Unigene Build 176.

A



B

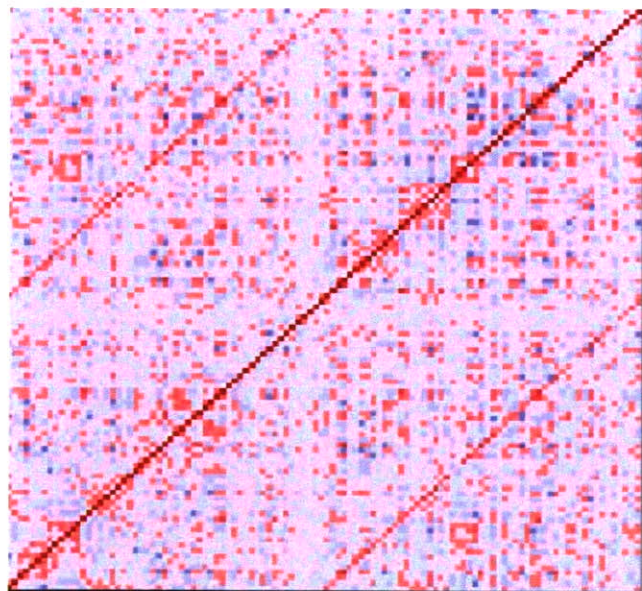
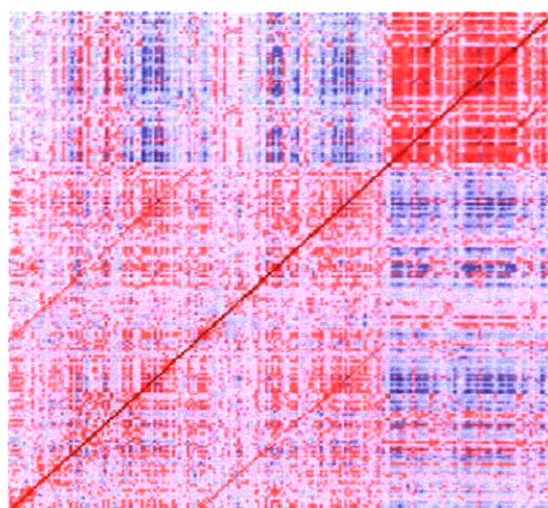
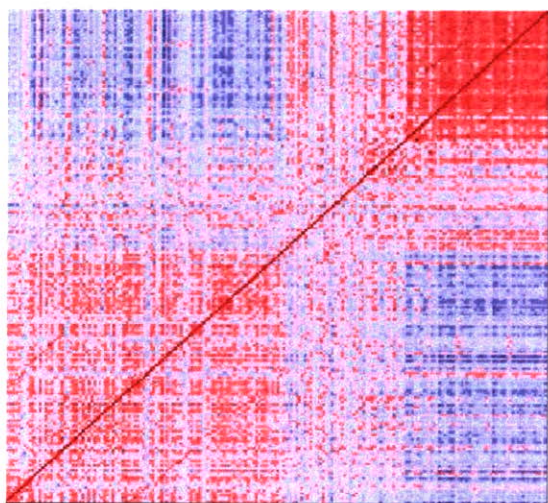


Figure 1

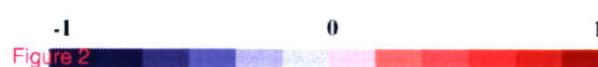
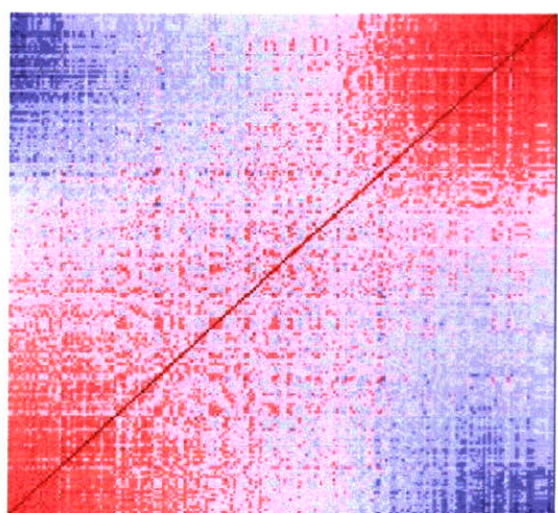
A



B



C





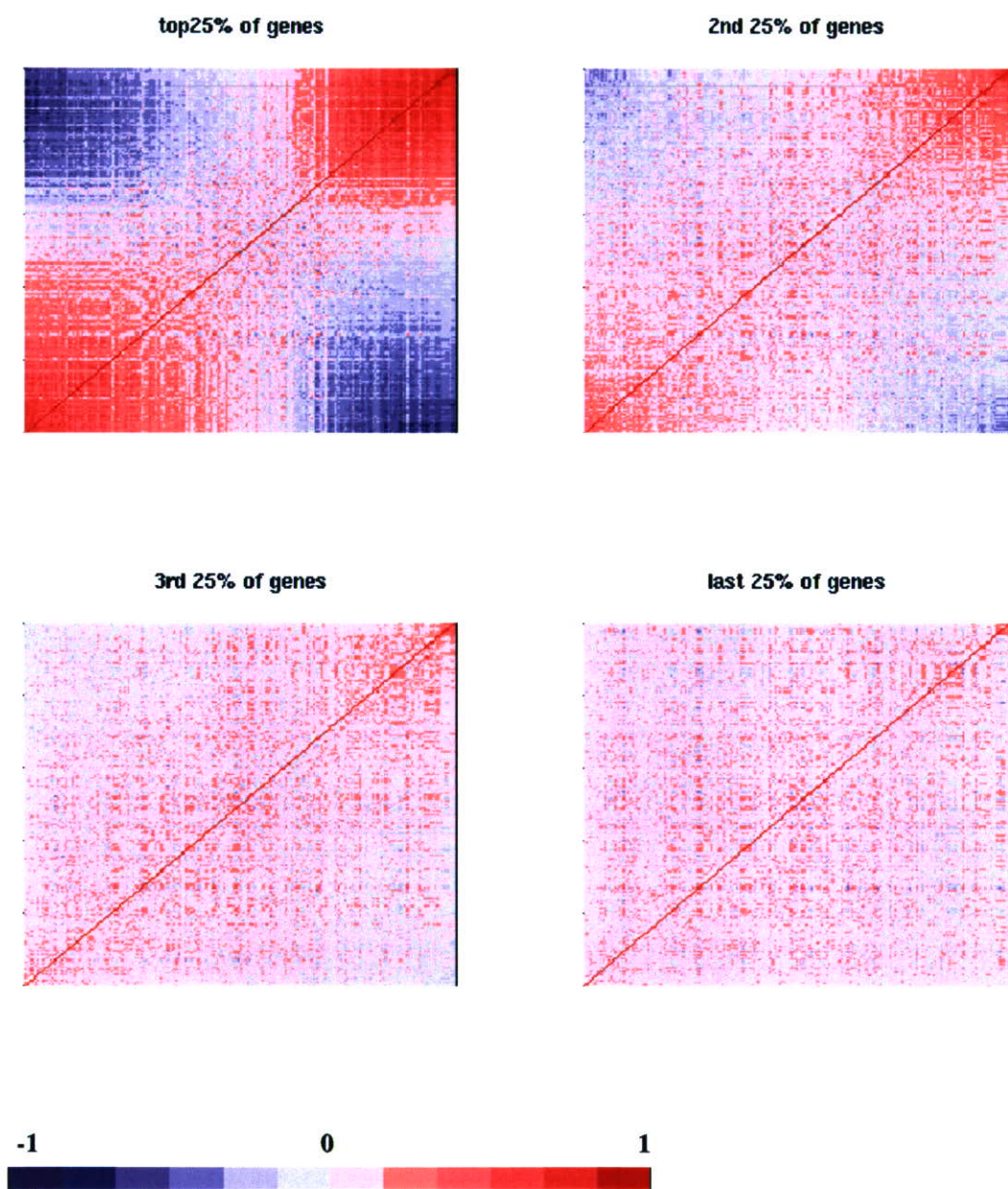


Figure 3

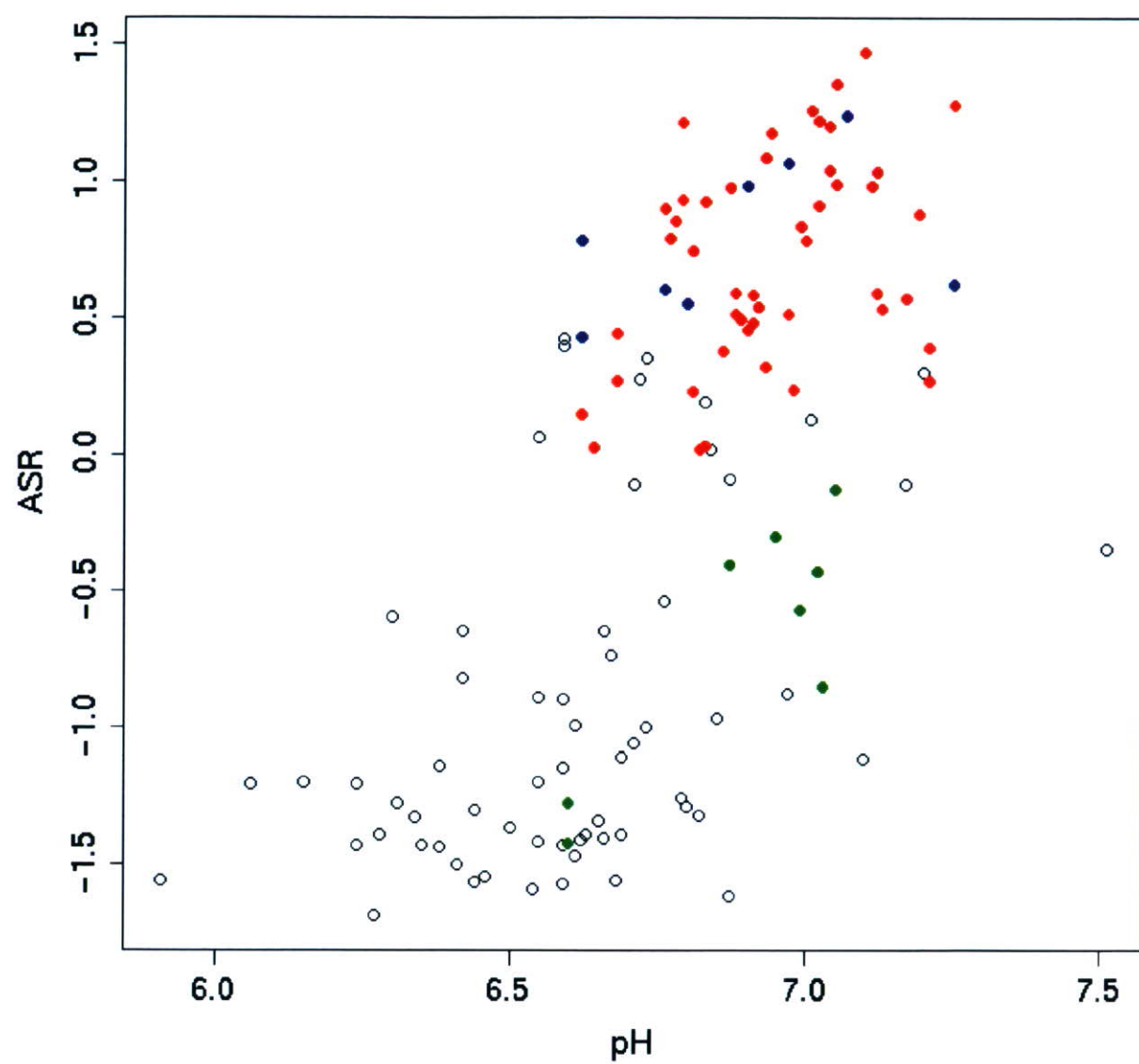
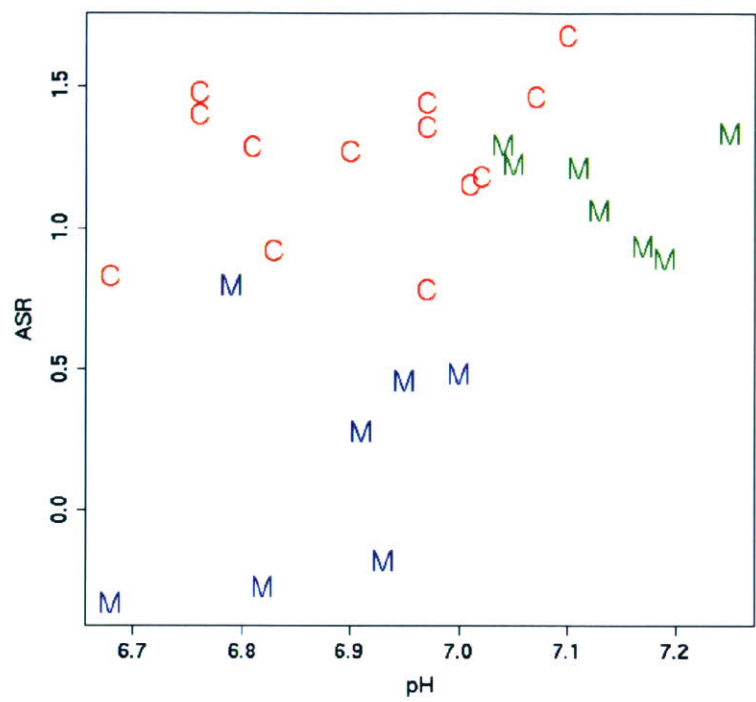


Figure 4



A



B

		C-M	C-M
Down		pH matched	ASR matched
GO Cellular Component	mitochondrial inner membrane	6.2E-06	0.92
Up			
KEGG pathway	Ribosome - Homo sapiens	2.9E-12	5.3E-06
GO Biological Process	response to external stimulus	1.2E-06	0.81
GO Biological Process	immune response	5.1E-05	0.94
GO Biological Process	defense response	6.1E-05	0.92

Figure 5

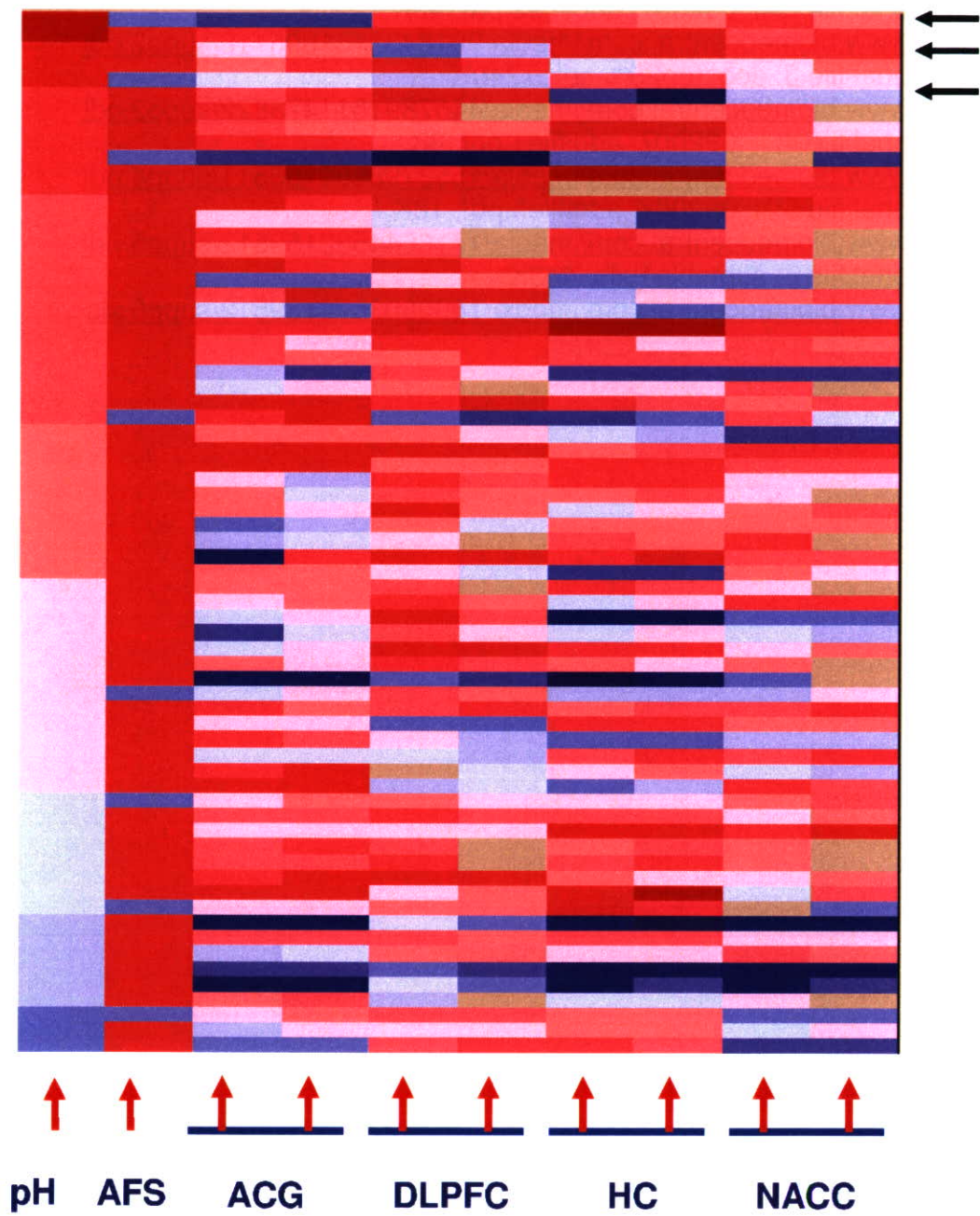


Figure 6

**Additional files provided with this submission:**

Additional file 1: li\_092007\_addifile1.pdf, 318K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1261304222159512/supp1.pdf>

Additional file 2: li\_092007\_addifile2.pdf, 40K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/9918437151595118/supp2.pdf>

Additional file 3: acg\_top25%.cdt, 7740K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/4457891511473822/supp3.cdt>

Additional file 4: li\_092007\_addifile4.pdf, 8K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1553798860159511/supp4.pdf>

Additional file 5: li\_092007\_addifile5.pdf, 16K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1716644533159512/supp5.pdf>

Additional file 6: suptable1.xls, 443K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1890803574159512/supp6.xls>

「脳と精神の医学」19巻2号（6月号）

特集：ミトコンドリア機能障害と精神神経疾患

タイトル：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？

筆者：富田 博秋、田中 千晶

筆者所属：東北大学大学院 医学系研究科 精神・神経生物学分野 [〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1]

Authors: Hiroaki Tomita, Chiaki Tanaka

Affiliation: Department of Biological Psychiatry, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryō-Machi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan.

連絡先：【富田 博秋 E-mail: htomita@mail.tains.tohoku.ac.jp】

## 1. はじめに

統合失調症や気分障害等の精神疾患の病態にミトコンドリア機能障害が関与を示す証拠が集積されてきている。統合失調症では、ミトコンドリア呼吸鎖コンポーネントの発現や活性の変化、電顕所見によるアクソン当りのミトコンドリア数の減少等の報告がなされ、気分障害では Phosphorus-31 核磁気共鳴スペクトロスコピー（magnetic resonance spectroscopy, MRS）によるエネルギー代謝の変化、ミトコンドリア DNA 欠失の増加、ミトコンドリア DNA 多型との相関、ミトコンドリア病との連鎖、灰白質の乳酸レベルの上昇、気分安定薬のミトコンドリア関連遺伝子 BCL2 への影響およびミトコンドリア障害マウスの表現型の類似等の多角的な知見が報告されてきている<sup>9,11,12</sup>。その中で、精神疾患罹患者と健常対照者から提供された死後脳を対象としたマイクロアレイ等の技術を用いて分子遺伝学的現象の包括的解析研究を行っている複数の研究グループがミトコンドリア関連遺伝子の発現変化を示唆する報告を行っており、精神疾患の病態へのミトコンドリア機能障害の関与を示す更なる証拠として関心が寄せられている<sup>1,2,10,13,19,24,26</sup>。

一方で、死後脳組織を対象とする研究では、解析の標的となる精神疾患の病態という因子以外に、死戦期（死に至る過程にある時期）の状況や服薬歴、喫煙歴等の生前の状況などの因子群、更に死戦期の状況、服薬歴、喫煙歴等の因子によって引き起こされるとされる脳組織の pH の低下や RNA の退縮という因子群が、マイクロアレイ研究などで得られる発現プロファイルに大きく影響を及ぼすことが知られている<sup>8,9,14,15,16,22,25,26</sup>。特に、マイクロアレイで解析しうる数万の全ゲノム遺伝子の転写物の中でも、ミトコンドリア機能に関連する遺伝子の転写物発現は死戦期の状況や組織 pH の低下等の因子に敏感に影響を受けることを示唆する複数の報告がなされていることから<sup>9,14,26</sup>、死後脳組織におけるミト

コンドリア関連遺伝子の発現変化の解釈には注意を要する。筆者らはカリフォルニア大学アーバイン校の脳バンクと連携して精神疾患の分子遺伝学的病態解明を行なっているプリツカー・コンソーシアムの一員として、死後脳組織を対象とする研究を行なう一方、培養細胞を用いて死後脳研究に必要な諸要因が脳内細胞特異的に及ぼす遺伝子発現プロファイルへの影響の評価を行なっている。本稿ではこれまでの精神疾患の死後脳研究におけるミトコンドリア関連遺伝子を含む発現プロファイリングのデータが病態とアーチファクトのどちらをどの程度反映している可能性があるかについての考察を行うとともに、ミトコンドリア関連遺伝子の発現解析のみならず、今後、死後脳組織を対象とする分子遺伝学的研究を行う際や、その研究結果を解釈する際に留意すべき点について検討を行なう。

## 2. 死後脳マイクロアレイ研究が示す精神疾患の病態がミトコンドリア関連遺伝子発現に及ぼす影響

精神疾患罹患者と健常対照者の死後脳マイクロアレイ所見の比較の際に見られる顕著な遺伝子発現プロファイリングの変化として、これまで、ミエリン・オリゴデンドロサイト関連遺伝子 2, 5, 7, 10, 23, 25、細胞間・細胞内の信号伝達関連遺伝子 3, 6, 7, 17, 18, 20, 24 とともにミトコンドリア関連遺伝子の発現プロファイリングの変化は複数のグループが共通して報告している 1, 10, 13, 19, 24, 26。ミトコンドリア関連遺伝子の発現変化を複数の研究グループが観察していることは、これまでの MRS 研究や DNA 多型解析等と併せて考えると、精神疾患の病態にミトコンドリア機能異常が関与していることを裏打ちする有力な証拠に思える (表 1)。

しかし、注意しなければならないのは、死後脳マイクロアレイ研究において報告されているミトコンドリア関連遺伝子の発現変化はミトコンドリア関連遺伝子の総体でみたカテゴリとしての一致であるという点である。ミトコンドリア関連遺伝子というカテゴリには非常に多種の遺伝子が含まれるが、ミトコンドリア関連のどの遺伝子の発現が変化しているかということになると研究グループ間での共通はほとんどなくなるといってもよく、オリゴデンドロサイト関連や細胞間・細胞内の信号伝達関連の遺伝子では個々の遺伝子レベルでも発現変化に再現性があることと対照的である。

例えば、統合失調症の死後脳マイクロアレイ研究でミトコンドリア関連遺伝子に着目した報告にケンブリッジ大学のグループが前頭前野、ハーバード大学およびサイキアトリック・ジェノミックス社が各々独立に海馬を解析した研究がある。対象となる組織が同じではないとはいえ、顕著に変化するミトコンドリア関連遺伝子としてリストされた遺伝子には全く共通が見出せない 1, 13, 19。

更に、トロント大学、理化学研究所、プリツカー・コンソーシアムの 3 つの研究グループが各々独立に双極性障害罹患者の前頭前野という同一疾患、同一脳領域を対象としたマイクロアレイ解析を行い、ミトコンドリア関連遺伝子というカテゴリ・レベルでは一致し



た遺伝子発現変化を報告しているが、個々の遺伝子レベルでみると、やはり、全く共通するところがない。トロント大学の研究では 25 個、理化学研究所の研究では 26 個、プリツカー・コンソーシアムの研究では 17 個の遺伝子が一定の基準を超えて顕著に遺伝子発現変化を受ける遺伝子としてリストされているが、これらで共通する遺伝子は UQCRC2 遺伝子の 1 つのみで、しかもこの遺伝子はトロント大学の研究では健常対照者群に比して双極性障害群に低く観察されているのに対して、理化学研究所の研究では逆に双極性障害群に高く観察されている。しかも、トロント大学も理化学研究所も同じスタンレー脳バンクから供給される脳組織を対象にして行なわれているにも関わらず、このような相違が生じるのは主に理化学研究所の方が、次節で記載する通り、より組織 pH 等の交絡因子に関して厳しい基準を設けて解析していることに由来していると考えられる。しかし、組織 pH 等に関して同様に厳しい基準を設けて解析しているプリツカー・コンソーシアムの研究とのオーバーラップも見られないことは、死後脳組織におけるミトコンドリア関連遺伝子の発現解析の難しさを示している<sup>9, 24, 26</sup> (表 2)。

ケンブリッジ大学のグループは統合失調症群と健常者群の前頭前野を比較して、ミトコンドリア関連遺伝子の他に、低酸素に惹起されることが知られている遺伝子を差の見られた遺伝子群として報告している。更に、研究対象とした統合失調症群の組織 pH が健常者群のものとは比べて有意に低いことを指摘し、この pH の差こそ、統合失調症の病態に関係したものであるという仮説を提起している<sup>19</sup>。しかし、もし組織の pH 低下とそれに伴うミトコンドリア遺伝子発現変化が疾患特異的なものであれば、もう少し研究グループ間に再現性が見られてもよいと思われる。研究グループ間でミトコンドリア関連遺伝子がカテゴリ・レベルでは検出されるのに、個々のレベルでの再現性が低いということが物語るのは、ミトコンドリア関連遺伝子のカテゴリに属する遺伝子は総じて様々な因子に敏感に反応して発現に影響を受け易く、その影響の受け方はランダムであるということ、このため、現時点では精神疾患の病態以外の因子の影響を強く反映しており、疾患特異的な変化を検出することが困難な状況であると考えられる。

### 3. 精神疾患の病態以外の諸要因が死後脳組織の分子遺伝学的状態に及ぼす影響の検討

精神疾患の病態を解析する上で、病態という因子以外に死後脳組織の分子遺伝学的状態に影響を及ぼす因子は交絡因子として、注意深く情報を収集しその影響を検討しなければならない。これらの交絡因子として、性別、死亡時の年齢、生活歴 (アルコール、喫煙、その他の依存性物質摂取歴を含む)、死戦期 (Agonal Factor: 死に至る過程にある時期で循環動態が脳等の重要臓器の機能を維持するには不十分と考えられる) の状況や期間、死亡後脳組織凍結までの時間 (Postmortem Interval: PMI)、解析に用いられるまで凍結されていた期間 (Freezer Time) などの一般情報、生前の病状の経過、死亡時の精神状態、治療歴、合併症の影響などの臨床情報が考えられる。また、これらの臨床情報を反映もし、更に、組織の

状態の客観的な指標になるのが、組織の神経病理学的所見、組織 pH、総 RNA の退縮 (Degradation) の程度などの情報である (図 1)。

#### a. 組織 pH と RNA の退縮

これらの因子のうちでも死後脳組織の遺伝子発現プロファイルに大きな影響を持つ要因に関してコンセンサスを得ている因子は、組織 pH の低下と総 RNA の退縮である。総 RNA の退縮の程度がマイクロアレイ解析などの遺伝子発現プロファイルに多大な影響を及ぼすことについては多くの論文が一致して報告しており、このことに疑いを挟むものはいないと思われる。RNA 退縮の程度を評価する方法についての検討もなされて来っており、従来はリボソーム RNA の 28S と 18S の発現量や発現量の比などが指標として用いられてきたが、Agilent Bioanalyzer 等により 28S と 18S のピークに加え、ベースラインの状態も含めて RNA 退縮を評価する指標である RIN (RNA Integrity number)<sup>21</sup> がより信頼性の高い指標として広く用いられて来ている他に、RQS (RNA quality scale) も提唱されている (Copois 2007)。また、アレイデータに基づく Post-hoc Quality 評価 (Degradation Plot, Average Correlation Index, Clustering Analysis, Dispersion Tree 等) も有用と考えられる<sup>4, 14, 25</sup>。

組織 pH の低下と総 RNA の退縮には高い相関を見出す報告は、一部の例外はあるものの、数十年に渡って非常に多くのデータが蓄積されており、マイクロアレイ研究が登場以降は組織 pH 低下が RNA 退縮と遺伝子発現プロファイルに大きな影響をもつという報告が多くなされている<sup>8, 9, 14, 15, 16, 22, 25, 26</sup>。

組織 pH の因子が遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響の大きさは、その他の精神疾患の病態、治療歴、喫煙歴、性別、PMI、組織の保存期間などを含む他の要因よりもはるかに大きいという複数の報告があり、死後脳組織の分子遺伝学的解析を行う上で注意して取り扱うべき因子と考えられる。複数の研究グループが死後脳組織の分子遺伝学的状態に顕著なアーチファクトを引き起こしうる Cut-off 値を検討した結果、pH6.5 前後が提唱されている<sup>9, 14, 16, 25</sup>。もちろん Cut-Off 値は高いに越したことはないと考えられるが、pH6.5 以下の組織を含む解析では大多数の遺伝子の発現レベルが組織 pH と相関し、pH の遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響が他の因子に比べて圧倒的に大きいのに対し、pH6.5 以上の組織のみでの解析を行うと pH の影響は顕著に弱まる。

死後脳組織によって組織 pH が生体の生理的 pH に近く保たれているものから、pH6.0 を切るような顕著なアシドーシスを来しているものまでであることに関しては、一般に、次項以降で述べる死戦期の低酸素等の細胞へのストレスのため、細胞内の乳酸が上昇し、組織のアシドーシスを来し、組織 pH が低下することが死後脳組織に観察される著しい pH 低下の機序として考えられている。動物実験から死後組織の pH が著しく低下するのは死後 10 分間以内の比較的直ぐの時期で、一旦、低下してしまうとそのまま 24-36 時間は安定という報告もある。死後脳組織で観察されるような pH6.0 前後で生体脳の機能が保たれているとは考え難いので、死戦期にストレスを受けた脳では死後急速にアシドーシスが進むも