

のと思われる(図2)。

低 pH の脳組織で RNA の退縮が進む機序についてもよく分かっておらず推測の域をでない。通常 RNA 分解酵素が活性化すると数時間以内に RNA の退縮が進むはずであるので、死後脳組織から比較的安定した RNA が抽出されることが多いのは、RNA 退縮を防ぐ何らかの機構が働いているものと考えられる。次項で述べるような死戦期の影響を免れて組織 pH が高く保たれている組織の場合、死後 ATP 濃度が急速に低下するため ATP 依存性の RNA の退縮が生じ難い、RNA 分解酵素よりも RNA 分解酵素の阻害酵素の方が長く失活を免れる、または、死後に翻訳されなくなった RNA は RNA 分解酵素の分解の対象になりにくくなるなどの機序が想定されているのに対し、アシドーシスを呈する組織ではこれらの RNA を安定化させる機序が働き難くなるなどの可能性が考えられる。

また、組織 pH の低下や死戦期の状況などの因子が遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響は RNA の退縮の程度に及ぼす影響を介したものだけではなく、死戦期の間の遺伝子発現調節への影響を介したものも含まれると考えられる。

組織 pH は遺伝子発現プロファイル全体に大きな影響を及ぼすが、その中でも特にミトコンドリア関連遺伝子の発現は低酸素状態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<sup>9,14,26</sup>。健常者の高 pH の組織と低 pH の組織を比較した場合、ミトコンドリア関連遺伝子は他のカテゴリの遺伝子よりも大きく動き、また、高 pH 組織だけを解析してもミトコンドリア関連遺伝子の発現レベルは他のカテゴリの遺伝子よりも pH に相関する傾向が見られる。Halim 等が指摘するように統合失調症群と健常対照者を比較した研究の多くで統合失調症群において若干 pH が低いということは、データを解釈する上で十分な注意を要するものと考えられる<sup>8</sup>。

#### **b. 死戦期(Agonal State)の状況と期間**

死戦期(Agonal State)とは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、脳組織の細胞にとって大きなストレスを引き起こすとされており、死戦期の状態や期間が死後脳組織の分子遺伝学的状態に大きな影響を及ぼすことは想像に難くない。死後脳組織の分子生物学的現象に影響を及ぼす死戦期の状態には図3に示すような因子が挙げられる。当然、この問題は長年に渡る死後脳研究の中でしばしば検討されてきており、著しい低酸素状態等に暴露されるという死戦期の状態や長期間の死戦期が組織 pH の低下や RNA の退縮と相関することを示す多くの報告がなされている(図3)。

死戦期の影響が大きいと考えられる症例を予め解析の対象から除外することは理想的であるとえられる。一方、死戦期の影響の評価は主観的になりがちで、特に低酸素の評価を客観的に行なうことは困難であることもあり<sup>27</sup>、死戦期の状況だけでサンプルを研究対象から外すかどうかは議論の分かれるところであると思われる。少なくとも可能な限り死戦期の状態を含む詳細な臨床データを集積し、慎重に評価を行なうことは重要と考えられる。

### c. 服薬歴、喫煙歴、その他の因子

前項の通り、死戦期の影響に比べるとその他の交絡因子の影響は比較的小さいと考えられるが、死戦期の影響以外で組織の pH に影響を及ぼしうる交絡因子として報告されているものに服薬歴と喫煙歴が挙げられる。Halim 等は統合失調症と健常者群では、統合失調症群で pH が低いことを指摘し、この pH 低下は死因・死戦期の状態から来る影響だけではなく、抗精神病薬の投与による影響を指摘している。Halim 等の報告でこの可能性を示唆する証拠として、統合失調症群で、抗精神病薬を投与したラット脳内の乳酸上昇と pH 低下が観察されており、統合失調症の脳組織の pH 低下には抗精神病薬の内服の影響である可能性を指摘している<sup>8</sup>。一方、Lipska 等は生前の喫煙歴が脳組織の pH を低下させ、RNA を退縮させる要因になっていることを指摘している<sup>15</sup>。

症例数を考えると、服薬歴や喫煙歴の影響は死戦期の影響程は大きくないと考えられるため、抗精神病薬の未服薬症例や非喫煙例症例だけを解析を行うことを考えるのは現実的ではないことから、統計解析の際にこれらの因子を交絡因子として注意深く取り扱うことが重要と考えられる。

この他にも、PMI は死戦期の影響と比べると小さいものの RNA の退縮に若干の影響を及ぼし、また、死亡時の年齢、性差などの要因も特定の遺伝子発現のプロファイルに何らかの影響を及ぼすことが知られている。これらの因子もやはり統計解析の際に交絡因子として検討が必要である。

## 4. 低酸素状態の細胞特異的な遺伝子発現プロファイルへの影響

死後脳組織の分子遺伝学的研究を行う上で考慮しなければならないもう一つの重要なことに脳組織は多種多様な細胞種により様々な比率で構成されていることである。組織ブロックの遺伝子発現プロファイルのある種の特徴は、各細胞種における遺伝子発現変化の総体であり、細胞種のポピュレーションもある程度反映していると考えられる。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、前述の通り、近年精神疾患の病態への報告が多い一方で、神経細胞とともに低酸素などのストレスに脆弱なことが知られている。

我々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に特異的な遺伝子発現パターンの変化をマイクロレイ解析により包括的に検討を行った結果、オリゴデンドロサイト由来の細胞は低酸素状態下でミトコンドリア関連の遺伝子発現に顕著な変化が見られることを観察した。マイクロレイ上には 54613 個の転写物がありこのうち 757 個の転写物がミトコンドリア関連転写物に分類されている。低酸素刺激により神経細胞由来細胞 SK-N-SH では 267 個の転写物の発現が増加、295 個が減少しているのに対し、オリゴデンドロサイト由来細胞 OL では低密度で

の培養では 877 個の転写物が増加、745 個の転写物が減少、高密度培養ではさらに多くの転写物に顕著な変化が認められた。これらの発現が増減した転写物のうちミトコンドリア関連の転写物が占める割合はミトコンドリア関連転写物がアレイ上にデザインされている割合より有意に高く、ミトコンドリア関連転写物はオリゴデンドロサイト由来細胞でとりわけ敏感に低酸素に反応することを示唆している（表 3）。

今後、更に低酸素状態が及ぼす脳内の細胞種特異的な遺伝子発現パターンを明らかにすることで、低酸素の細胞への影響の分子基盤が解明されるとともに、死後脳組織の死戦期の低酸素への暴露の影響を評価する尺度の作成にも寄与することが期待される。

## 5. おわりに ～ 今後の死後脳研究に求められるもの ～

以上から本稿の表題の精神疾患研究においてミトコンドリア関連遺伝子の発現変化が病態か、アーチファクトか？という問題については、ミトコンドリア関連遺伝子が特に死戦期の状況・組織 pH 等の因子に敏感に影響を受けやすいこと、そして実際に観察されている遺伝子群にほとんど一致が見られず、病態という因子に対してランダムな遺伝子発現変化を拾っているように見えることから、現時点においては、アーチファクトを観察している可能性が高い、あるいは、精神疾患の影響という因子が死亡時の状況の影響などの他の因子の影に隠れて検出されていない状況と言わざるを得ないように考えられる。

もちろん、精神疾患の病態へのミトコンドリア遺伝子の関与は、MRS 研究や DNA 多型解析など複数の独立した手法からの証拠が蓄積されてきており、死後脳組織におけるミトコンドリア関連遺伝子発現に関して信頼おけるデータを得ることが困難であるだけで、精神疾患の病態へのミトコンドリア遺伝子の関与の可能性を否定するものではない。むしろ、ミトコンドリア関連遺伝子の発現が種々のストレス因子に敏感に反応することは、現状での死後脳研究での検出は困難であるものの、生体内で精神疾患の病態に関して何らかの遺伝子発現変化を来たしている可能性を示唆しているとも考えられる。何故、ミトコンドリア関連遺伝子の発現が種々のストレス因子に敏感に反応するのかということは今後の興味深い課題とも言える。

一方、今後の死後脳組織を対象とする分子遺伝学的研究を進めていく上において、どこまでの情報を信頼おける安定した情報として評価しうるのかを見極める技術の開発が必要である。また、今後、死戦期の影響、組織 pH、RNA の退縮、服薬歴、喫煙歴などを含む諸因子をより厳格にコントロールした、より多くの対象症例を解析することで、信頼性の高い解析結果が得られることが可能になることが望まれる。これまでのところ死後脳研究はこれらの諸因子のコントロールという点でも、対象症例数という点でも、精神疾患の病態の影響を検出するためのパワーは限定されたものであったと言えるが、今後、ミトコンドリア関連遺伝子の発現異常に関してまでも安定したデータが得られるような高い水準の研究が可能になるよう、研究の発展と脳バンク制度の整備が行なわれることで、精神疾患

の分子病態の解明が着実に行なわれることが期待される。

## 文献

1. Altar CA, Jurata LW, Charles V, et al (2005) Deficient hippocampal neuron expression of proteasome, ubiquitin, and mitochondrial genes in multiple schizophrenia cohorts. *Biol Psychiatry*, 58: 85-96.
2. Aston C, Jiang L, Sokolov BP (2004) Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *J Neurosci Res*. 77: 858-866.
3. Choudary PV, Molnar M, Evans SJ, et al (2005) Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 15653-15658.
4. Copois V, Bibeau F, Bascoul-Mollevis C, et al (2007) Impact of RNA degradation on gene expression profiles: assessment of different methods to reliably determine RNA quality. *J Biotechnol*. 127: 549-559.
5. Dracheva S, Davis KL, Chin B, et al (2006) Myelin-associated mRNA and protein expression deficits in the anterior cingulate cortex and hippocampus in elderly schizophrenia patients. *Neurobiol Dis*, 21(3): 531-540.
6. Evans SJ, Choudary PV, Neal CR, et al (2004) Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 15506-15511.
7. Hakak Y, Walker JR, Li C, et al (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 4746-4751.
8. Halim ND, Lipska BK, Hyde TM, et al (2008) Increased lactate levels and reduced pH in postmortem brains of schizophrenics: Medication confounds. *J Neurosci Methods*, 169: 208-213.
9. Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2005) 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*, 14: 241-253.

10. Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, et al (2005) DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *J Neurosci*. 25: 5376-5381.
11. Kato T (2007) Mitochondrial dysfunction as the molecular basis of bipolar disorder: therapeutic implications. *CNS Drugs*, 21: 1-11.
12. Kato T (2008) Role of mitochondrial DNA in calcium signaling abnormality in bipolar disorder. *Cell Calcium*, [Epub ahead of print]
13. Konradi C, Eaton M, MacDonald ML, et al (2004) Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 61: 300-8.
14. Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, et al (2004) Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum Mol Genet*, 13: 609-616.
15. Lipska BK, Deep-Soboslay A, Weickert CS, et al (2006) Critical factors in gene expression in postmortem human brain: Focus on studies in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 60: 650-658.
16. Mexal S, Berger R, Adams CE, et al (2006) Brain pH has a significant impact on human postmortem hippocampal gene expression profiles. *Brain Res*, 1106:1-11.
17. Mirnics K, Middleton FA, Marquez A, et al (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron*. 28: 53-67.
18. Nakatani N, Hattori E, Ohnishi T, et al (2006) Genome-wide expression analysis detects eight genes with robust alterations specific to bipolar I disorder: relevance to neuronal network perturbation. *Hum Mol Genet*, 15: 1949-1962.
19. Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, et al (2004) Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry*, 9: 684-697.

20. Ryan MM, Lockstone HE, Huffaker SJ, et al (2006) Gene expression analysis of bipolar disorder reveals downregulation of the ubiquitin cycle and alterations in synaptic genes. *Mol Psychiatry*, 11: 965-978.
21. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 7: 3.
22. Stan AD, Ghose S, Gao XM, et al (2006) Human postmortem tissue: what quality markers matter? *Brain Res*, 1123: 1-11.
23. Sugai T, Kawamura M, Iritani S, et al (2004) Prefrontal abnormality of schizophrenia revealed by DNA microarray: impact on glial and neurotrophic gene expression. *Ann N Y Acad Sci*. 1025: 84-91.
24. Sun X, Wang JF, Tseng M, et al (2006) Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*, 31: 189-196.
25. Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, et al (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet*, 362: 798-805.
25. Tomita H, Vawter MP, Walsh DM, et al (2004) Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry*. 55: 346-352.
26. Vawter MP, Tomita H, Meng F, et al (2006) Mitochondrial-related gene expression changes are sensitive to agonal-pH state: implications for brain disorders. *Mol Psychiatry*, 11: 663-679
27. Weis S, Llenos IC, Dulay JR, et al (2007) Quality control for microarray analysis of human brain samples: The impact of postmortem factors, RNA characteristics, and histopathology. *J Neurosci Methods*, 165: 198-209.

表1：精神疾患（統合失調症・気分障害）死後脳マイクロレイ研究が示すミトコンドリア関連遺伝子発現異常

研究グループ	ハーバード大学	サイキアトリック ジェノミクス社	ケンブリッジ大学	トロント大学	理化学研究所 精神疾患動態	ブリッカー コンソーシアム
論文	Konradi等 2004	Altar等 2006	Prabakaran等 2004	Sun等 2006	Iwamoto等 2005	Vawter等 2006
脳シク	ハーバード	スタンレー	スタンレー	スタンレー	スタンレー	アーバイン
解析された脳領域	海馬	海馬	前頭前野	前頭前野	前頭前野	前頭前野 (帯状回)
ミトコンドリア遺伝子発現 変化が観察された疾患	双極性障害 (統合失調症)	統合失調症 (気分障害)	統合失調症	双極性障害	双極性障害 (統合失調症)	双極性障害 大うつ病性障害
平均pH (平均28S/18S)	(対照者: 1.1) (罹患者: 0.8)		対照者: 6.54 罹患者: 6.4	対照者: 6.61 罹患者: 6.43	対照者: 6.73 罹患者: 6.65	対照者: 6.95 罹患者: 6.97
pH カットオフ					> 6.5	>6.6



表2. 双極性障害死後脳（前頭前野）マイクロアレイ研究が示す  
ミトコンドリア関連遺伝子発現異常

研究グループ	トロント大学		理化学研究所 精神疾患動態		プリツカー コンソーシアム	
出典	Sun 等 2006		Iwamoto 等 2005		Vawter 等 2006	
脳バンク	スタンレー		スタンレー		アーバイン	
健常者 pH	6.61 ± 0.27		6.73 ± 0.15		6.95 ± 0.07	
双極性障害 pH	6.43 ± 0.30		6.65 ± 0.14		6.97 ± 0.10	
脳領域	前頭前野		前頭前野		前頭前野	
遺伝子リスト	遺伝子シンボル	増減	遺伝子シンボル	増減	遺伝子シンボル	増減
A で始まる遺伝子	ATP5C1	減	AK2	減	APG1	増
	ATP5G3	減	AKAP10	増	ATP6V0E1	増
	ATP5J	減	AKAP10	増		
C で始まる遺伝子	CLPX	増	ANKRD6	増	CAT	増
	COQ7	減	CASQ1	増	CCT3	増
	COX5A	減	COX15	増	COX6A1	減
	COX6C	減				
D で始まる遺伝子	DIABLO	減	DKFZp547P234	増	DAD1	増
E で始まる遺伝子	ENO2	減	DLAT	増		
			ETFDH	増		
F で始まる遺伝子	GAPDH	減	FLJ20288	増		
			GLDC	増	GATM	増
G で始まる遺伝子	GPI	減			GLUL	増
H で始まる遺伝子	GPX4	減				
	HMGCS2	増	HADH	増	HADHB	増
I で始まる遺伝子	HTRA2	減			HSPA2	増
					HSPA5	増
M で始まる遺伝子	MCCC1	減	IDE	増		
	MCEE	増	MAOB	増	MAPK1	減
	MMAA	増	ME1	増		
N で始まる遺伝子	MPST	減	MRPL3	増		
	MRPS12	減	MRPL39	増		
	MSRB2	減	MRPL48	減		
O で始まる遺伝子			MRPS22	増		
	NDUFS7	減	MT01	増		
P で始まる遺伝子	NDUFS8	減	NDUFS1	増	NAPG	減
			NME6	増	NR4A1	減
S で始まる遺伝子	SLC25A16	減	OGG1	減		
T で始まる遺伝子	TOMM40	減	PPM2C	増		
U で始まる遺伝子	UQCRC2	減			SPP1	増
			TIMM22	減	TM4SF10	増
			UQCRC2	増		

図1

## 死後脳組織を対象とする分子遺伝学的研究において データへの影響を考慮すべき要素

### 一般情報

性別、死亡時の年齢

生活歴（アルコール、喫煙、依存性薬物摂取歴を含む）

死因、死亡時の状況 (Agonal Factor)

死亡後脳組織凍結までの時間 (Postmortem Intervals)

解析に用いられるまで凍結されていた期間 (Freezer Time)

### 臨床情報

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

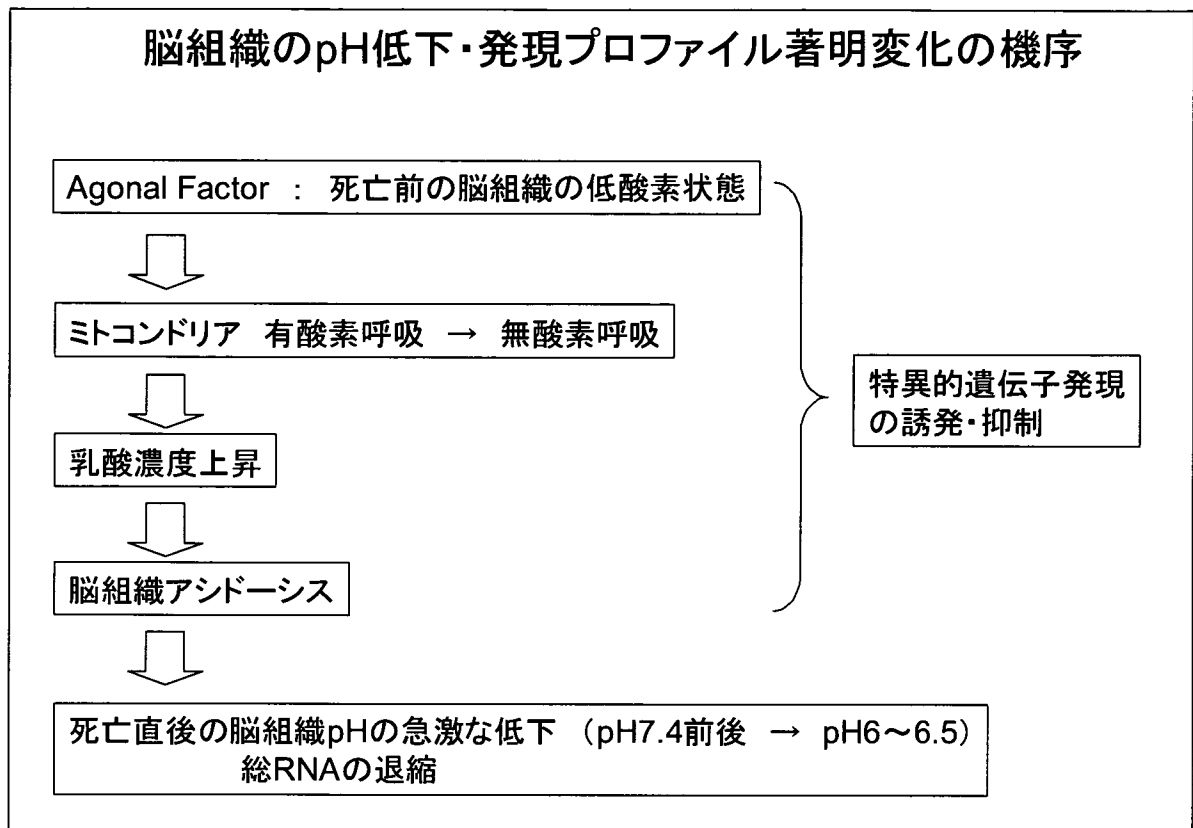
### 組織の状態の客観的指標

神経病理学的所見

組織 pH

総RNAの退縮 (Degradation)

図2



## 死後脳研究における Quality Control の指標

### Agonal Factor Score

- I. 苦悶状態の期間(Duration of agonal phase)
- II. 分子遺伝学的現象に影響する特異的な苦悶状態
  - (1)低酸素 (2)昏睡 (3) 高熱 (4) 痙攣 (5) 著しい脱水 (6) 低血糖
  - (7) 多臓器不全 (8) 頭部外傷 (9) 神経毒性物質の摂取

### 脳組織 pH

総RNA退縮 (リボソーム RNA 28S/18S 比・RIN)

アレイデータに基づくPost-hoc Quality 評価

Degradation Plot

ACI (Average Correlation Index)

Clustering Analysis etc

表3. 各種培養細胞で低酸素状態により発現に影響を受ける転写物数

	神経細胞由来細胞	オリゴデンドロサイト 由来細胞 (低密度)	オリゴデンドロサイト 由来細胞 (高密度)
マイクロアレイ上の全 転写物数	54613	54613	54613
マイクロアレイ上の全 転写物のうちミトコンド リア関連の転写物数	757	757	757
低酸素により増加した 転写物数	267	877	2882
低酸素により増加した 転写物のうちミトコンド リア関連の転写物数	1	19	53
増加したミトコンドリア 関連転写物数が偶然 に観察される可能性	N.S.	< 0.05	< 0.05
低酸素により減少した 転写物数	295	745	4012
低酸素により減少した 転写物のうちミトコンド リア関連の転写物数	4	18	125
減少したミトコンドリア 関連転写物数が偶然 に観察される可能性	N.S.	< 0.05	< 0.01