

200833026A

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20年度 総括研究報告書

研究代表者 富田博秋

平成21(2009)年 3月

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20年度 総括研究報告書

研究代表者 富田 博秋

平成21 (2009) 年 3月

# 総括研究報告書（平成20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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35
  
- III. 研究成果の刊行物・別冊・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36

# 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

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、木村 好、石川美由紀、有銘預世布

（東北大学大学院 医学系研究科 精神・神経生物学分野）

小松 浩、伊藤 文晃、松岡 洋夫

（東北大学大学院 医学系研究科 精神神経学分野）

瀧 靖之、竹内 光、中川 誠秀、秋月 祐子、川島 隆太

（東北大学加齢医学研究所・脳機能開発研究分野/認知機能発達研究部門）

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から指摘されている統合失調症の陰性症状の形成・進展への免疫系の関与の分子遺伝学的メカニズムを解明するために、統合失調症罹患者及び健常対照者の各種免疫細胞を対象にマイクロアレイ技術を用いた全ゲノムの遺伝子発現量の包括的解析を行い、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。平成19年度に末梢血からヘルパー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、マイクロアレイ法により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する技術を世界に先駆けて確立したのに引き続き、平成20年度は統合失調症罹患者の末梢血から単離したTh1とTh2ヘルパーT細胞のマイクロアレイ解析を世界に先駆けて行った。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機構を特定することを目的とする。平成19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撮像条件の検討などを行なったのに引き続き、平成20年度は統合失調症罹患者ならびに健常対照者につき構造MRIと機能MRIを行った。【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。平成19年度、20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レ

ザー・マイクロディセクション法の条件設定などを行った。

## 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

(資料1：統合失調症への免疫系の関与)

本プロジェクトは従来から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、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を行い、健常者の血液を対象にTh1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を行ったのに続き、平成20年度は統合失調症罹患者と健常者からの臨床症状・血液検体の収集を行い、罹患者のTh1、Th2細胞に特異的な遺伝子発現プロファイルの特定を行った。

### 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機構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新設された研究専用の3テスラ核磁気共鳴画像装置での撮像法や認知機能の評価を行なうためのプロトコルを連携して研究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が、平成20年度は統合失調症罹患者と健常者を対象とした撮像を行った。

### 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。

平成19年度、20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

#### [研究対象]

東北大学病院精神科および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）に通院、または任意入院中である成人の統合失調症罹患者または健常対照者で本研究の目的、方法等を理解した上で書面同意の得られるものを本研究の対象とした。

#### [臨床所見の集積]

（資料2：研究の流れ、資料3：臨床情報一般参照）

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。

#### [認知機能所見の集積]

上記と同じ研究対象となる統合失調症罹患者と健常対照者を多少に統合失調症認知機能簡易評価尺度日本語版（BACS-J）を行い、言語性記憶・学習、作業記憶、運動機能、言語流暢性（意味流暢性、文字流暢性）、注意・情報処理速度、遂行機能の評価を行った。

#### [血液の採取]

上記と同じ研究対象となる統合失調症罹患者と健常対照者の全血20 mlを採血しへパリン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。別の1mlを全血からのRNA抽出用に用い、残りを下記のリンパ球の単離に用いた。

#### [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 (Buffy Coat) 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 (Buffy Coat) 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]

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]

(資料4: 統合失調症罹患者の免疫システムへの分子遺伝学的アプローチ、資料5: 細胞ソーティング法によるTh1およびTh2ヘルパーT細胞の選別参照)

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、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 (Buffy Coat) 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づつ新しい

チューブに入れて混ぜ、これにリンパ球 (Buffy Coat) 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]

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細胞の集積も行なった。

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  $\mu$ 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をエビ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た。

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6v2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種のプロープ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。

#### [データ解析]

ビード・ステーション500Xで4万8687種のプロープ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ルゴリズム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。

予備実験として同じ個体から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。

更に統合失調症罹患者と健常者のTh1細胞、Th2細胞から抽出した総RNAを対象にマイクロアレイ解析を行い、疾患に特異的なTh1細胞、Th2細胞における遺伝子発現プロファイルの検討を行った。

## 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

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）との共同研究として、上記の研究対象となる統合失調症罹患者と健常対照者につき、平成19年度末に東北大学加齢医学研究所に新設されたフィリップス社超伝導磁気共鳴画像診断装置Achieva 3.0T-Xを用いて、構造MRI、機能MRIの撮像を行った。構造MRIとしては脳各領域の灰白質、白質の容積をVoxel-based Morphologyにより評価、白質の走向を拡散テンソル画像(Diffusion Tensor Imaging; DTI)により評価を行った。また、機能MRIにより、2-Backs作業記憶課題施行による脳血流の変化や安静時脳血流の脳領域間の相関などの評価を行った。これらの画像データと免疫細胞のマイクロアレイ遺伝子発現データとの相関を検討した。

## 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ス社のセルタイター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 [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。

また、低酸素刺激による細胞の乳酸産生の評価を行った。

#### [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 µg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プ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を用いて各プロープ当たりの蛍光の強度を定量した。

更に、同じRNA検体を対象にイルミナ・マイクロアレイシステム(免疫細胞研究の方法と同様)を用いて遺伝子発現解析を行い、技術的アーチファクトを検討した上での低酸素の生物学的な影響の検討を行った。

#### [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。

イルミナアレイについてはBeadStudioソフトウェア等を用いて解析を行い、Affymetrixマイクロアレイデータとの比較を行った。

#### [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・パニー教授)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(新里和弘医師)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。また、日本生物学的精神医学会に設けられた脳バンク設立委員会の委員として、死後脳集積の基盤整備に取り組んだ。

### (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であり、承認後も採血量の変更などのプロトコル変更を行う際には、その都度、倫理委員会で追加承認を得ている。死後脳研究については日本生物学的精神医学会に設けられた脳バンク設立委員会と連携して、脳バンクの基盤整備のために適切な倫理申請の行い方の検討を行った。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]

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6参照)

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7参照)

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γ (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]

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。

[統合失調症罹患者と健常者の臨床評価、認知機能評価]

(資料10：統合失調症陽性・陰性症状評価尺度、資料11：統合失調症認知機能評価尺度参照)

研究対象となった統合失調症罹患者の統合失調症陽性・陰性症状評価尺度 (PANSS) の陽性症状尺度得点は16.8点、陰性症状尺度得点は20.2点、総合精神病理評価尺度得点35.2点であった。

また、統合失調症罹患者と健常対照者に統合失調症認知機能簡易評価尺度日本語版 (BACS-J) を行い、言語性記憶・学習、作業記憶、運動機能、言語流暢性 (意味流暢性、文字流暢性)、注意・情報処理速度、遂行機能の各項目を評価したところ、健常対照者では各評価項目の点数の平均は言語性記憶・学習54.0、作業記憶21.8、運動機能99.0、言語流暢性47.3、(意味流暢性21.0、文字流暢性26.3)、注意・情報処理速度79.5、遂行機能20.0であったのに対し、統合失調症罹患者の平均点数は言語性記憶・学習33.9、

作業記憶16.6、運動機能56.8、言語流暢性35.8、  
(意味流暢性15.8、文字流暢性20.0)、注意・  
情報処理速度40.4、遂行機能13.9と全体的に低  
下しており、このうち、言語流暢性に関する項  
目以外の全ての項目(言語性記憶・学習、作業  
記憶、運動機能、注意・情報処理速度、遂行機  
能)で有意差をもって低下していた。

[統合失調症罹患者のTh1細胞・Th2細胞数比]

(資料12:ヘルパーT細胞サブクラスTh1/Th2  
の細胞比)

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比較したところ、統合  
失調症群で約半分に減少しており、これは従来  
血清サイトカイン濃度で推測されてきた統合失  
調症のTh2優位仮説を細胞数比から裏付ける直接  
の証拠といえる。

[統合失調症罹患者のTh1細胞・Th2細胞の発現プ  
ロファイル]

(資料13:統合失調症に関連してTh1細胞で発  
現異常を認める遺伝子群、資料14:(資料1  
4:統合失調症に関連してTh2細胞で発現異常を  
認める遺伝子群参照)

統合失調症罹患者群と健常者群のTh1細胞の遺  
伝子発現プロファイルの比較を行い、統合失調  
症群に発現の高い51の遺伝子群と統合失調症群  
で発現の低い402の遺伝子群を認めた。このうち、  
陰性症状の強さと有意に相関するIL10RAを含む  
23の遺伝子、また、Th1/Th2のバランス異常の程  
度と有意に相関する遺伝子4つを特定した。

また、統合失調症罹患者群と健常者群のTh2  
細胞の遺伝子発現プロファイルの比較を行い、  
統合失調症群に発現の高い92の遺伝子群と統合  
失調症群で発現の低い90の遺伝子群を認めた。  
このうち、陰性症状の強さと有意に相関する  
BCL2を含む5の遺伝子、また、Th1/Th2のバラン  
ス異常の程度と有意に相関する遺伝子3つを特定

した。

今後、症例数を増やしてこれらの所見の確認  
を行い、統合失調症の陰性症状に関わる可能性  
のある分子群として今後研究を進める必要があ  
る。

## 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

平成19年度末に東北大学加齢医学研究所に  
導入されたフィリップス社超伝導磁気共鳴画像  
診断装置Achieva 3.0T-Xにより、統合失調症罹  
患者並びに健常対照者の構造MRI、機能MRI撮像  
を行った。

[構造MRI:灰白質の容積・血流量と臨床症状と  
の相関]

(資料15:構造MRI 灰白質の容積・血流量と  
臨床症状との相関参照)

灰白質の容積・血流量そのものに統合失調症群  
と健常者群で差を認めなかった。灰白質の容積  
・血流量と臨床症状との相関を検討したところ、  
灰白質の容積・血流量が低いほど陽性症状が強  
いという灰白質の容積・血流量とPANSS陽性症状  
尺度点数との有意な負の相関を認めた。今後症  
例数を増やし確認を行う必要がある。

[機能MRI:作業記憶課題による脳血流の賦活]

(資料16:機能MRI 2-Back作業記憶課題によ  
る脳血流の賦活参照)

これまでおこなった評価では統合失調症罹患者  
に2-Back作業記憶課題による脳血流の賦活の低  
下傾向を認めたが、2-Back作業記憶課題に取り  
組めた症例数が少なく、今後更に症例数を増や  
して検討を行う必要がある。

## 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17、資料18参照)

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。

更に、OL細胞を低酸素条件下で培養し、培養液の乳酸の濃度の測定を行ったところ、低酸素群で有意に乳酸生成が増加していた。

#### [マイクロアレイ実験]

(資料19参照)

アフィメトリックスとイルミナの2種類のマイクロアレイ解析により、人工的アーチファクトの影響を考慮した上で解析を行った結果、オリゴデンドロサイト由来のOL細胞において顕著な発現量の変化を示す遺伝子が多く認められた。また、オリゴデンドロサイト由来のOL細胞とアストロサイト由来のSVGp12細胞では低酸素に対して共通の遺伝子が応答した。これらアストロサイトに共通して見られる低酸素反応性遺伝子には炭水化合物代謝、アポトーシス、細胞周期、細胞増殖に関わる遺伝子が多く含まれていた。

## 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、従来からの報告と一致してTh2細胞の比が高く、これは従来、血清サイトカイン濃度に基づく間接的証拠をもとに提唱されてきた統合失調症のTh2優位仮説を裏付ける直接証拠となると考えられる。

また、統合失調症のTh1細胞では陰性症状の強さに相関してIL10RAなどの遺伝子が発現変化を受け、Th2細胞ではBCL2などアポトーシスに関連する遺伝子などが陰性症状の強さに相関して発

現変化を受けており、これらの分子が免疫機構を介して統合失調症の陰性症状の発現進行に関わる可能性を示唆した。今後、症例数を増やして確認、検討を行う必要がある。

## 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

灰白質の容積や灰白質血流量そのものは統合失調症群と健常者群で差が見られなかったが、灰白質容積および灰白質血流量の低下は陽性症状の強さと有意な相関を示しており、興味深い。今後、症例数を増やして確認する必要がある他、脳部位別の評価なども行い詳細に検討する必要がある。

また、作業記憶課題による脳血流の評価を行ったが、課題が困難なため有効回答数に達する症例が少なく、現在のところ統計的解析をおこなうことができていない。今後、より容易な課題に切り替えるなどの方策を検討する必要があると考えられる。

## 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

従来から、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。今年度はアフィメトリックスアレイに加え、イルミナアレイでの解析も並行して行うことで、人工的なアーチファクトを考慮に入れた解析を行い、低酸素の細胞特異的な評価を行った。これまで、比較的低酸素の神経細胞への影響に関心が払われてきたが、むしろ、グリア細胞、特にオリゴデンドロサイトへの低酸素の影響を適切に評価する必要があると考えられた。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、従来のサイトカインに基づく間接的な証拠を直接的な証拠で裏付けることができた。統合失調症の陰性症状に関連ある可能性のある分子の発現をTh1細胞とTh2細胞に認め、今後、病態解明に向けて確認のための研究が必要となる。

### 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

統合失調症罹患者と健常対照者の構造MRIと機能MRI撮像を行い、灰白質の容積・血流量の減少と統合失調症の陽性症状の強さとの相関を認めた。今後、症例数を増やし、また、脳部位別に解析を行う必要がある。

### 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

脳が低酸素状態下におかれた際、グリア細胞、特にオリゴデンドロサイトが生物学的にも遺伝子発現プロファイルの上でも大きな影響を受けることが示された。オリゴデンドロサイトとアストロサイトは低酸素に対してアポトーシス関連や炭水化合物代謝に関わる遺伝子などが共通に発現変化を受けることも示された。今後、死後脳組織を用いて細胞種特異的な遺伝子発現変化を検討する上で必須の所見と考えられる。

#### [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, Borresen-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. 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):97-106, 2008.

2. 富田博秋：精神科ブレインバンク構築のための倫理的基盤。分子精神医学。8(4):69-72, 2008.

3. 富田博秋：気分障害の網羅的遺伝子発現解析。医学のあゆみ。229(3), 8121-8125, 2009.

4. 富田博秋、田中千晶、兪志前：交絡因子に配慮した脳バンク構築の必要性。脳と精神の医学。20(1), 2009 Mar.

5. 富田博秋、田中千秋、兪志前、小松浩、木村好、曾良一郎、Helen B. Kim, William E. Bunney. 気分安定薬奏功機序解明のための包括的

遺伝子発現解析。臨床薬理の進歩30, 2009.

## 2. 学会発表

### (1) 特別講演、シンポジウム等

1. Tomita H. The importance of quality control in brain bank management. Symposium "Toward constructing brain bank of psychiatric diseases". World Federation of Societies of Biological Psychiatry 2nd Asia-Pacific Congress, Toyama, Japan. September 11-13, 2008.

2. Tomita H. Psychoneuroimmunology in schizophrenia. Symposium "Recent advances and future directions in psychoneuroimmunology as useful approaches to psychiatric disorders" World Federation of Societies of Biological Psychiatry 2nd Asia-Pacific Congress, Toyama, Japan. September 11-13, 2008.

3. Tomita H. Effect of mood stabilizers on genome-wide gene expression profiles of human CNS-derived cell lines. Symposium "Genome-wide studies of bipolar disorder and mood stabilization". World Congress of Psychiatric Genetics 15th annual meeting, Osaka, Japan. October 11-15, 2008

### (2) 国際学会

1. Tomita H, Tanaka C, Kim HB, Bunney WE. Neuron- and glia- specific gene expression profiles after lithium treatment. Collegium internationale neuro-psychopharmacologicum 50th congress, Munich, Germany. July 13-17, 2008

2. Tanaka C, Ishikawa M, Tomita H. Hypoxia-induced gene expression profiles of Neuron and Oligodendrocyte. Collegium internationale neuro-psychopharmacologicum 50th congress, Munich, Germany. July 13-17, 2008

3. Yu Z, Tanaka C, Komatsu H, Takahashi S, Kim HB, Kimura K, Sora I, Bunney WE, Tomita H. Microarray gene expression profiles in neuronal and glial cell lines after lithium, valproate, carbamazepine and lamotrigine treatment. World Federation of Societies of Biological Psychiatry 2nd Asia-Pacific Congress, Toyama, Japan. September 11-13, 2008.
4. Tomita H, Tanaka C, Yu Z. FACS-array approach into immunological aspects of schizophrenia. World Congress of Psychiatric Genetics 15th annual meeting, Osaka, Japan. October 11-15, 2008
5. Komatsu H, Tanaka C, Yu Z, Kimura K, Takahashi S, Sora I, Matsuoka H, Tomita H. Expression profiles of BDNF transcript variants in neuronal and glial cell lines after treatment with mood stabilizers. World Congress of Psychiatric Genetics 15th annual meeting, Osaka, Japan. October 11-15, 2008
6. Tomita H, Tanaka C, Yu Z, Kimura K, Bunney WE. Hypoxia-induced gene expression profiling in neuron and oligodendrocyte. Society for Neuroscience 38th annual meeting, Washington DC, USA. November 15-19, 2008
7. Itoi K, Nakamura H, Yokokawa T, Sato Y, Kobayashi K, Tanaka C, Tomita H, Uchida K, Iwasaki Y, Ishii Y. A comprehensive gene expression analysis of the locus coeruleus noradrenergic neurons during early development by the FACS-array technology. Society for Neuroscience 38th annual meeting, Washington DC, USA. November 15-19, 2008
8. Tanaka C, Yu Z, Kimura K, Ishii N, Tomita H. Microarray gene expression profiling of Th1/Th2 helper t cells as a tool for neuropsychimmunology. Society for Neuroscience 38th annual meeting, Washington DC, USA. November 15-19, 2008
- (3) 一般学会発表
1. 富田博秋、田中千晶、ヘレン・キム、ウィリアム・バニー 「神経細胞およびグリア細胞における遺伝子発現プロファイルへのリチウムの影響: LITHIUM-INDUCED GENE EXPRESSION PROFILES IN NEURONAL AND GLIAL CELL LINES」第31回日本神経科学会、東京、2008年7月9-11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