

200905001B

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～21年度 総合研究報告書

研究代表者 富田博秋

平成22(2010)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19-21年度 総括研究報告書

研究代表者 富田 博秋

平成22 (2010) 年 3月

# 総合研究報告書（平成19-21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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

III. 研究成果の刊行物・別冊・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

# I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
総合研究報告書

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、菊地 淑恵、木村 好、

石川美由紀、有銘預世布、曾良 一郎

（東北大学大学院 医学系研究科 精神・神経生物学分野）

田邊陽一郎、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4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して行われた。【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した。世界に先駆けて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確立し、Th1細胞、Th2細胞に特異的に発現する新規の遺伝子群を特定した。更に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い、疾患の病態に相関してTh1細胞、Th2細胞で顕著に発現変動する遺伝子群を単離した。【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罹患者及び健常対照者の臨床所見・脳画像所見・機能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した。本研究により統合失調症罹患者は健常対照者に比べて白質繊維走行の統合性が低下している脳部位を特定し、更にこの統合性の低下と相関する免疫細胞の遺伝子発現変化を特定した。【プロジェクト3：死後脳組織の分子遺伝学的解析】本プロジェクトにより死後脳組織において顕著な交絡因子である死戦期の低酸素暴露などの細胞特異的な脳への影響を評価する方法を確立した。また、低酸素暴露がDNAメチル化にも顕著に影響することを示した。【プロジェクト4】本プロジェクトにより同一個体の脳内ミクログリアと末梢単球の遺伝子発現プロファイル並びに、外界刺激への両者間での反応パターンは近似しており、ミクログリア-単球系を介した神経免疫相関のメカニズムの検討と末梢単球の分子動態の観察により脳内ミクログリアの分子動態を推測できる可能性を示した。



## 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

(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した。

初年度に確立したヘルパー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を目的に実験を行った。引き続き、平成20～21年度に渡って、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細胞に特有な遺伝子発現プロファイルの特定を目的に研究を行った。

### 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した。

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が導入され、

撮像法や認知機能の評価を行なうためのプロトコルの作成を目的に研究を行った。引き続き平成20～21年度は統合失調症罹患者と健常者の脳構造とワーキングメモリ課題への脳血流の反応性を評価すること、並びに、脳画像所見を表現型としてこれに相関する免疫細胞の遺伝子発現変化の特定を目的とした。

### 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

本アプローチは死後脳組織の特定の細胞種の遺伝子発現プロファイリング情報を集積する集積することで、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本研究機関終了後にも継続する目標として研究を行った。

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手技を確立する目的で予備実験を行なった。

平成21年度はこれら低酸素暴露による各脳由来神経細胞、グリア細胞の遺伝子発現プロファイルと死戦期に低酸素に暴露し低酸素となった死後脳における発現プロファイルを比較して、低酸素暴露による発現変化の細胞特異性を特定することを目的に解析を行った。また、遺伝子発現量だけでなく低酸素暴露によるDNAメチル化状態への影響の有無を検討することを目的とする研究も行った。

A-4. 実験動物、ヒト脳由来培養細胞、死後脳組織を対象とする末梢血由来マーカーによる中枢神経内での病態評価の妥当性検討研究  
末梢血免疫細胞の分子遺伝学的現象が脳内細胞の分子遺伝学的現象とどのように相関をしている

るかほとんど知られておらず、今後、神経免疫  
相関研究を進める上でこのメカニズムを明らか  
にすることは重要な課題である。脳内の免疫機  
構の中心的役割を担う単球系細胞であるミク  
ログリアと末梢血のTh1/Th2ヘルパーT細胞分化に  
関わる単球とは発生学的、形態学的、機能的に  
近いといわれている。この両者の遺伝子発現プ  
ロファイルと比較し、互いの類似性、相違を明  
確にすることは有用と考えられる。互いに相関  
動く分子と特定すれば、中枢神経系のミクログ  
リアの活性を末梢単球の解析により推測するシ  
ステムにも繋がるのが期待される。そこで同  
一のマウスから単離した脳内ミクログリアと末  
梢血中の単球の遺伝子発現プロファイル、およ  
び外部刺激への反応性の相違の解析を目的にク  
ロアレイ解析を行った。

## 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  
(n=26)または健常対照者(n=22)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]

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  
を加え、50mlファルコンチューブに次の行程ま  
で室温で保存。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16.5mlとリン  
酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered  
saline, PBS）16.5mlをピペティングで混和し  
2倍希釈する。15mlのスクリュウキャップつきチ  
ューブ4本にFicoll-Paque PLUS液を6mlづつ入れ  
る。希釈した血液8mlを静かに重層させ、400×g  
で30分間遠心を行なう。パスツールピペットで  
リンパ球(Buffy Coat)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に入れ、ピペティングで混和後、100×gで10分間遠心を行い、さらに10% FBSを添加したRPMI培地にて、単離したリンパ球を洗浄する。洗浄後のリンパ球は10%のDMSOを添加した10%FBS-RPMI培地に107個/mlになるように懸濁し、液体窒素内で保存した。

#### [Th1細胞、Th2細胞単離のための抗体の選択]

(資料3、4)

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である、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Type1ヘルパーT細胞 (Th1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Type 2ヘルパーT細胞

(Th2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。

冷凍保存したリンパ球を素早く融解後、10%FBSを含むRPMI培地に懸濁し、100×gで15分間遠心を行い、単離したリンパ球を洗浄した。この行程を2度行い、さらにPBS [2%FBS, 1mM EDTA]で洗浄した。洗浄後のリンパ球を10<sup>7</sup>個/200ulと

なるようにPBS [2%FBS, 1mM EDTA] を加える。リンパ球107個あたり抗CD4抗体20ul、抗CXCR3および抗CCR4抗体を各40ulずつ新しいチューブに入れて混ぜ、これにリンパ球を加え、穏やかに攪拌する。氷上で遮光した状態で60分間染色した。染色終了後、PBS [2%FBS, 1mM EDTA] 1mlを加えて攪拌し、15分間、4°Cで遠心することで洗浄し、結合していない抗体を洗い流す。上清を除き、107細胞/mlになるようPBS [2%FBS, 1mM EDTA] を加え、攪拌して細胞を浮遊させ、最終濃度が1μg/mlとなるようにPI (propidium iodide) を添加した。

#### [細胞のソーティング]

(資料6、7参照)

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細胞と抗CD4抗体と抗CCR4抗体で陽性のTh2細胞を採取した。

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抽出はQIAGEN社のQIACUBE核酸抽出装置とQIAGEN社のRNeasy Mini KitまたはRNeasy Micro Kitを用いて各細胞からの総RNAの抽出を行い、最終量15-30  $\mu$  lに溶出した。RNA定量に用いる量を除いたものは速やかに-80℃フリーザーに凍結した。この過程でQIAGEN社のDNaseキットを用いてgenomic DNAを分解除去した。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。500pgの総RNAをエピセン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、それからインビトロでのcRNA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6 v2エクスペレーション・ビードチップに20時間ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイズ後、非特異的に吸着しているcRNAを洗浄し、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。

#### [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。

予備実験としてこれまでに同じ個体から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ている。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ている。また、Th1細胞ならびにTh2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。

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、相関係数が著しく低いサンプルを除き疾患に特異的な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、東北大学加齢医学研究所の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・DNA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。一方、同様に回収した細胞からQIAGENのキットでゲノムDNAを抽出した。

### [マイクロアレイ・データ解析]

当研究グループにおいて解析した低酸素培養細胞のマイクロアレイデータとカリフォルニア大学アーバイン校において解析された組織pHの異

なる死後脳組織のマイクロアレイデータとを比較検討した。Affymetrixマイクロアレイは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、バックグランド補正、ノーマライゼーションを行なった。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った。

#### [DNAメチル化解析]

低酸素状態下または通常酸素状態下で培養したヒト神経細胞由来のIllumina発現マイクロアレイ実験によって、低酸素暴露により顕著に発現が抑制される遺伝子群の中からDisrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) 遺伝子から転写翻訳されるタンパク質と結合して細胞内のcAMP濃度を調節し、統合失調症への罹患感受性が示唆されるphosphodiesterase 4D (PDE4D) 遺伝子を選択し、この遺伝子の上流領域のDNAメチル化の程度を検討した。低酸素下と定常酸素下で培養した細胞からDNAを抽出し、断片化し、抗メチル化シトシン抗体でプルダウンして、メチル化DNAプールのPDE4DのCpG Island領域のコピー数を低酸素群と対照群とで比較した。

#### B-4. 実験動物、ヒト脳由来培養細胞、死後脳組織を対象とする末梢血由来マーカーによる中枢神経内での病態評価の妥当性検討研究

末梢血免疫細胞の分子遺伝学的現象と脳内細胞の分子遺伝学的現象との相関を調べるため、脳内の免疫機構の中心的役割を担う単球系細胞であるミクログリアと末梢血のTh1/Th2ヘルパーT細胞分化に関わる単球との遺伝子発現プロファイルの相関を検討するため、同一のC57BL/6J マウス (8 週齢 ; 雄n=10) から脳内ミクログリアと末梢血単球を単離して遺伝子発現プロファイルの相違を検討した。更に単球の樹状細胞への分化に影響することが報告されるリチウムを投与して脳内、末梢血の単球系細胞の遺伝子発現

プロファイルへの影響の相違を検討した。更にこれらの遺伝子発現プロファイルをヒト神経細胞由来 (SK-N-SH細胞)、ヒト・アストロサイト由来 (UG87細胞)、およびヒト・オリゴデンドロサイト由来 (OL細胞) の発現プロファイルや死後脳組織の発現プロファイルとの比較を行った。

マイクロアレイ実験は上記実験と同様にイルミナ社のシステムを用いて行った。死後脳組織の発現プロファイルデータは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) のマイクロアレイ解析データに基づいて比較検討を行った。

#### 6 (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細胞とTh2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。

[細胞の収量と実験の妥当性の検討]

(資料6)

健常者6名(男性3名、女性3名)から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)を採取し、発現プロファイルを検討した。

[総RNAの収量とクオリティーコントロール]

(資料7)

健常者6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)、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、リボン

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。

[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Th2細胞と比較して32倍高いシグナル強度で発現していた。また、Th1ヘルパーT細胞の機能特徴付けるインターフェロン $\gamma$ (IFNG)も16倍高いシグナル強度で発現していた。また、Hamalainen(2001)等により刺激分化させたTh1細胞の発現プロファイルにおいて高発現が報告されているCCL5、CCR2、GranzymeBでも2倍以上の発現が確認された。

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(GPR44)、IL1R2等の遺伝子、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8)

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9212の遺伝子が、Th2細胞には9254の遺伝子が有意に検出され、そのうち、8328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20以上を示し、Th2細胞ではシグナルが検出されない2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。

[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)

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50の遺伝子をTh1優位遺伝子、Th2細胞に有意に高く発現する40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。

[統合失調症罹患者のTh1細胞・Th2細胞数比および総RNAの収量とクオリティー]

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、罹患者群ではばらつきが大きくわずかではあるが、Th2優位な値を示した。また得られた細胞数が少ないサンプルではRNAの品質(RIN値)は低い値を示したが、大半の高い質のRNAを得ることができた。

[統合失調症罹患者のTh1細胞・Th2細胞の発現プロファイル]

統合失調症罹患者群 (n=20) と健常者群

(n=24) のTh1細胞の遺伝子発現プロファイルの比較を行い、罹患者で発現が2倍以上高い19遺伝子と半分以下の72遺伝子群を認めた。一方、Th2細胞に関しては統合失調症罹患者群 (n=21) と健常者群 (n=25) の比較では、罹患者に優位

に発現する19遺伝子、発現が50%以下の遺伝子が認められた。

## 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

[全脳体積の解析] 灰白質、白質とも、頭蓋内体積で割ることで、個人の頭蓋内体積の差異を補正し、Gray Matter Ratio、White Matter Ratioとして計測。年齢、性を補正した上で、健常群と疾患群をANCOVAにて解析したところ、Gray Matter、White Matterともに全体の容積としては統合失調症群と対照群とで有意な差は認められなかった。

部位毎に比較していくと右下前頭回白質の体積については統合失調症群は健常対照群に比して容積が増大していた(資料10)。

[白質繊維束統合性の解析]

Diffusion Tensor Imaging (拡散テンシル画像) による統合失調症罹患者群と健常対照者群の白質繊維束統合性の比較を行ったところ、左上側頭回、左海馬、右側頭極の3カ所で統合失調症群の統合性が健常者と比べて有意に落ちていた(資料11)。

## 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12、資料13参照)

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。

#### [マイクロアレイ解析]

(資料14)

マイクロアレイ解析を行った結果、遺伝子発現レベルでもオリゴデンドロサイトでは他の細胞種に比べ大きな影響が観察された。発現変化を受ける遺伝子の種類は神経細胞と比して、グリア細胞間で全般に高い類似性が認められ、中でも糖代謝系に関わる遺伝子が共通して発現変化を受けていた。低酸素暴露により脳内細胞と末梢組織細胞とともに発現変化する遺伝子を細胞種間で普遍的な低酸素状態暴露履歴のマーカーとして特定した。また、低酸素などの死戦期状況に暴露しpHが低下した死後脳組織と暴露が少なく生理的pHに近く保たれた組織との遺伝子発現プロファイルの相違と低酸素暴露した神経細胞、グリア細胞の遺伝子発現プロファイルを比べ、死後脳組織の低酸素暴露履歴のマーカーを特定した。本研究により低酸素暴露による脳内細胞の細胞種特異的变化や細胞種間に共通の変化が包括的に把握され、死後脳組織の死戦期における低酸素暴露の履歴をより適確に評価することが可能になった。(資料15、16)

更に抗メチル化シトシン抗体を用いた免疫沈降法により得られるメチル化CpGを含むDNA断片

のコピー数を比較することで発現変化に対応するメチル化の変化を評価した。

Phosphodiesterase 4D (PDE4D)の発現が低酸素暴露により低下しているのに対応して、そのゲノム上流領域のメチル化が亢進していることが示された。

#### C-4. 実験動物、ヒト脳由来培養細胞、死後脳組織を対象とする末梢血由来マーカーによる中枢神経内での病態評価の妥当性検討研究

末梢Monocytes (CD11b) と脳ミクログリア

(CD11b) において発現する遺伝子はほぼ共通しており、単球系細胞を樹状細胞に分化促進することが報告されるリチウム投与によっても共通増加した遺伝子変化が見られ、末梢血と中枢神経系の単球細胞は近似した分子遺伝学的変化を示し、脳内と末梢の免疫機構をリンクさせていることを示唆した。この他、脳内および末梢の単球系細胞と脳内神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトや死後脳組織における遺伝子発現プロファイルの相違についての検討がなされた。

並行して、死後脳組織を対象とする精神疾患の病態解明を行う上で必須となる死戦期の低酸素による交絡因子の影響の評価を行い、オリゴデンドロサイトとアストロサイト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。

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。

## 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

世界に先駆けて確立した免疫細胞のソーティングによる包括的遺伝子発現プロファイルにより引き続き、Th1細胞、Th2細胞の発現プロファイルの解析を行った。この方法は再現性の面でも安定してTh1、Th2を単離して発現解析を行っていることが確認された。

昨年度に引き続き健常者におけるTh1優位遺伝子とTh2優位遺伝子の特定を行いそれぞれ50と40の遺伝子に絞りこみをおこなった。これらはより有用なTh1、Th2マーカーとして有用である可能性を有する。

また、昨年度に引き続きより多くの統合失調症罹患者と健常対照者のTh1、Th2細胞の単離とマイクロアレイ解析を行って、Th1、Th2細胞において疾患特異的に発現する遺伝子の絞り込みを行い、Th1細胞においては91の遺伝子、Th2細胞においては19の遺伝子に絞り込んだ。これらの遺伝子は統合失調症において慢性に進行する脳の委縮や白質統合性の低下、認知機能の低下などを推し進める分子として病態に関わっている可能性を有する。これらは病態の客観的評価のためのマーカーとして、あるいは病態の進行を免疫神経相関機序を介して食い止める薬剤の標的としての有用性が期待される。今後更に新たなコホートでこれらの分子の病態指標としての妥当性を検討することは重要な課題と考えられる。

### 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

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、白質容積および白質走行の統合性は統合失調症で低下しており、白質病変の方が鋭敏に病態を反映している可能性を示唆した。これら白質病変を表現型としてこれに相関する遺伝子多型や末梢血免疫細胞の分子遺伝学的現象を捉えることは統合失調症の病態に関わる分子を特定する上で有用なアプローチと考えられる。今回の研究により特定された白質の変化と相関して発現が変動する遺伝子群は今後、より大きなコホートで知見の妥当性を確認しながら、さらに分子群の絞り込みを行うとともに、免疫細胞において各分子が果たしている役割を特定していく必要がある。

### 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

本研究では低酸素暴露した神経細胞、グリア細胞の遺伝子発現プロファイルと、低酸素暴露等により低pHを呈している死後脳組織の遺伝子プロファイルを比較することで、細胞特異的な低酸素暴露履歴のマーカーを特定した。また、メチル化DNA解析により低酸素暴露が遺伝子の転写物発現量のみならずDNAメチル化の程度にも影響を及ぼすことを示した。本研究により低酸素暴露による脳内細胞の細胞種特異的变化や細胞種間に共通の変化が包括的に把握され、死後脳組織の死戦期における低酸素暴露の履歴をより適確に評価することが可能になった。

計画に反して、本研究期間中に死後脳組織において統合失調症の陰性症状を評価するには至らなかった。今後、死後脳研究の環境を整え、より死戦期の低酸素暴露などの要因をコントロールした組織を対象とする研究は世界的にも十分整っているとはいえ、今後のブレインバンクの整備は重要な課題と考えられる。

D-4. 実験動物、ヒト脳由来培養細胞、死後脳組織を対象とする末梢血由来マーカーによる中枢神経内での病態評価の妥当性検討研究

今回の研究は脳内ミクログリアの遺伝子発現プロファイルは脳内の神経細胞やアストロサイト、オリゴデンドロサイトなどと比較してもはるかに、末梢血の単球の遺伝子発現プロファイルと近いことを示しており、外部刺激に対する遺伝子発現の応答もミクログリアと末梢単球では似ていることを示していた。末梢単球の分子状態のモニターにより脳内ミクログリアの分子動態を推測するシステムを構築することが可能であることを示唆する重要な知見が得られた。

## 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

世界に先駆けて確立した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により統合失調症の病態に関わることが示唆されるTh1細胞に発現する91の遺伝子とTh2に発現する19の遺伝子を特定した。この方法論とそれによって特定された遺伝子群は精神疾患の成因に神経免疫相関機序を介して関わるメカニズムを解明する上で有用で、これらの分子は病態の客観的把握システムや病態進行をとめる治療薬の開発にも有用と期待される。

### 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

統合失調症罹患者は健常対照者と比較して白質走行の統合性が低下していることが示唆された。また、この統合性の低下を表現型としてこれに関連して免疫細胞において発現変化をする遺伝子群の特定を行い、これらの知見は本疾患の病態解明に有用と考えられる。

### 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

本研究により細胞特異的に低酸素暴露の影響を受ける遺伝子群を特定した。これらの分子をマーカーに死戦期の低酸素暴露の履歴の推測が可能になると考えられる。また、低酸素暴露は転写物の発現量に影響するだけでなくDNAメチル化にも影響を及ぼすことが示された。

### E-4. 実験動物、ヒト脳由来培養細胞、死後脳組織を対象とする末梢血由来マーカーによる中枢神経内での病態評価の妥当性検討研究

今回の研究は脳内ミクログリアと末梢血の単球の遺伝子発現プロファイルやその外部刺激に対する応答が近似していることを示した。末梢単球の分子状態のモニターにより脳内ミクログリアの分子動態を推測するシステムを構築することが可能であることを示唆するもので、今後、実用化に向けた研究が望まれる。

#### [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) 国内

口頭発表	19件
原著論文による発表	1件
それ以外（レビュー等）	8件

### 1. 論文発表

#### (1) 原著論文

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, 52-59, 2009.

#### (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. 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. 曾良一郎、笠原好之、内海修、久保有美子、富田博秋、池田和隆：AD/HDの遺伝要因解明の現状. 分子精神医学. 9(3), 262-267, 2009.

6. 富田博秋：死後脳研究の現在と今後. 精神医学Update—最新研究動向. 医学のあゆみ 231(10), 967-973, 2009.

7. 富田博秋：Bardet-Biedl症候群. 特集 肥満—最新の基礎・臨床研究— 日本臨牀 67(2), 506-510, 2010.

8. 富田博秋：死後脳研究の展望と脳バンク. 特集 内因性精神疾患の死後脳研究. 精神医学 52(4), 367-376, 2010.

### 3. 学会発表等

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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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回日本神経学会、東京、2008年7月9-11日

8. 富田博秋. 気分安定薬と抗精神病薬の奏功機序の共通点と相補性～抗躁・気分安定作用と神経保護作用を中心に～ 学術講演会 気分安定薬を考える2009, 仙台 [2009/7/21]

9. 兪志前、田中千晶、小松浩、木村好、曾良一郎、富田博秋. 気分安定薬リチウムの樹状細胞における遺伝子発現変化の包括的検討. 第29回リチウム研究会, 東京 [2009/4/18]

10. 兪志前、田中千晶、小松浩、高橋怜史、木村好、曾良一郎、富田博秋. 気分安定薬のアストロサイトにおける遺伝子発現変化の包括的検討. 第31回日本生物学的精神医学会. 京都 [2009/4/23-25]

11. 田邊陽一郎、田中千晶、兪志前、小松浩、木村好、羽藤愛、松岡洋夫、曾良一郎、富田博秋. ラモトリギン投与によるヒト脳由来細胞に

における包括的遺伝子発現の解析. 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会合同年会. 京都[2009/11/13-15]

12. 羽藤愛、兪志前、田中千晶、田邊陽一郎、小松浩、木村好、松岡洋夫、曾良一郎、富田博秋. 気分安定薬投与によるオリゴデンドロサイトの遺伝子発現変化の解析. 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会合同年会. 京都[2009/11/13-15]

13. 兪志前、田中千晶、田邊陽一郎、小松浩、木村好、羽藤愛、松岡洋夫、曾良一郎、富田博秋. 気分安定薬リチウムの樹状細胞における遺伝子発現変化の包括的検討. 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会合同年会. 京都[2009/11/13-15]

14. 田邊陽一郎、田中千晶、兪志前、小松浩、木村好、羽藤愛、松岡洋夫、曾良一郎、富田博秋. 気分安定薬バルプロ酸とラモトリギン投与時のヒト脳細胞における遺伝子発現変化のマイクロアレイ解析による包括的検討. 第8回 Bipolar Disorder研究会. 東京[2009/11/22]

15. Yu Z, Tanaka C, Tomita H. Effect of Lithium Treatment on Gene Expression Profile of Human Monocyte-Dendritic Cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会. 大阪 [2009/12/2-4]

16. Ono C, Yu Z, Ishii N, Tomita H. Microarray Gene Expression Profiling of Th1/Th2 helper T Cells as a Tool for Neuropsychimmunology. 第39回日本免疫学会総会・学術集会. 大阪[2009/12/2-4]

17. 富田博秋、小野千晶、竹澤芳樹、福與なおみ、植松貢、土屋 滋、岡本伸彦、黒澤健司、松本直通. ソトス症候群のスクリーニング・診断システム開発のための研究～リンパ芽球を対象とするNSD1遺伝子の下流遺伝子のスクリーニングを中心に～ 第9回 東北出世前医学研究会. 仙台[2010/1/30]

18. 富田博秋、小野千晶、竹澤芳樹、兪志前、菊地淑恵、福與なおみ、西村章、松本直通. ソトス症候群責任遺伝子NSD1遺伝子の下流で発現調節を受ける遺伝子群のスクリーニング. 第17回日本精神・行動遺伝医学会. 高槻[2010/2/11]

19. 富田博秋. こころの健康と分子研究～より有効で副作用の少ない治療法の開発に向けて～. 市民シンポジウム「こころの健康と科学研究の今日と未来」. 仙台[2010/1/23]

## 1) 国外

口頭発表	12件
原著論文による発表	2件
それ以外（レビュー等）	1件

## 1. 論文発表

### (1) 原著論文

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, Tsavalier 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. Sora I, Li B, Fumushima S, Fukui A, Arime Y, Kasahara Y, Tomita H, Ikeda K. Monoamine transporter as a target molecule for psychostimulants. *International Review of Neurobiology*, 85: 29-33,