

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

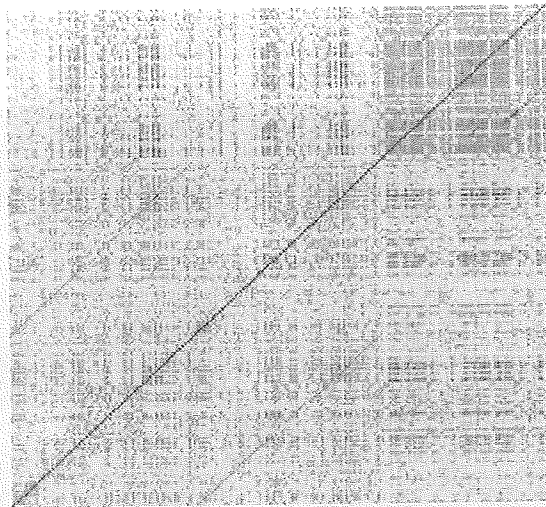
Title: Most strongly changed genes upon agonal stress

Description:

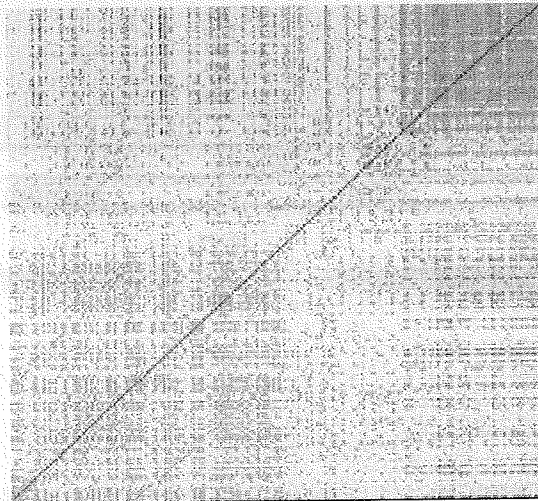
The spreadsheet "1000Up\_LowpH" listed 1000 most strongly up-regulated genes among the Type-2, low-pH samples and their t scores in five regions. The second spreadsheet "1000Down\_LowpH" listed the corresponding 1000 most strongly down-regulated transcripts. The Unigene ID's are from Unigene Build 176.



A



B



C

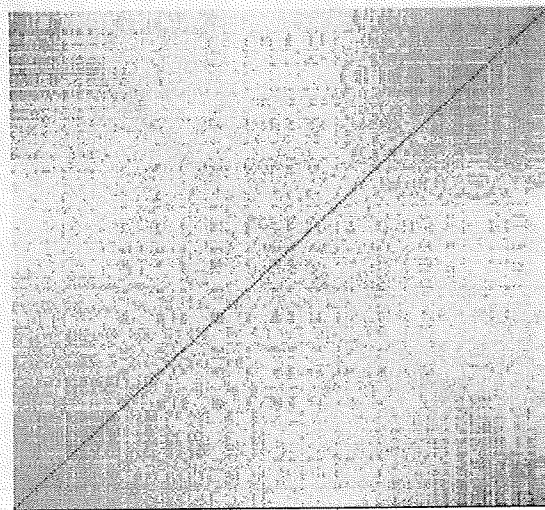
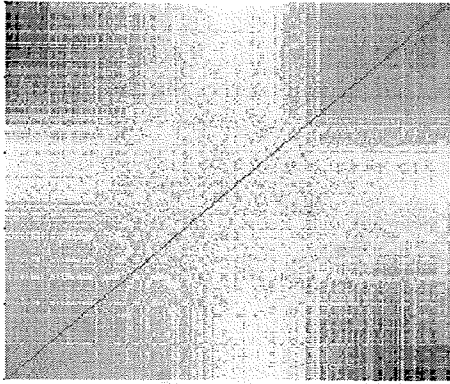
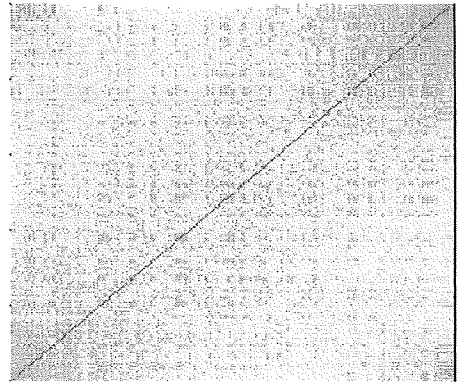


Figure 2

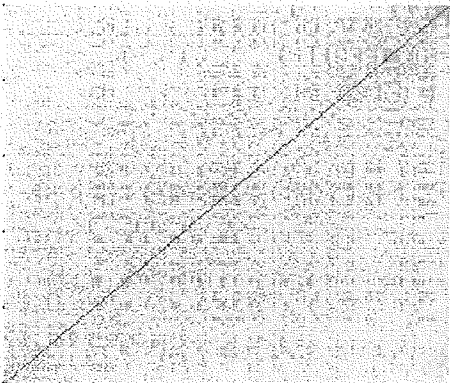
**top25% of genes**



**2nd 25% of genes**



**3rd 25% of genes**



**last 25% of genes**

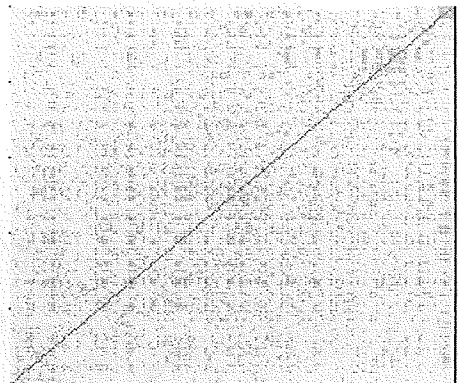


Figure 3

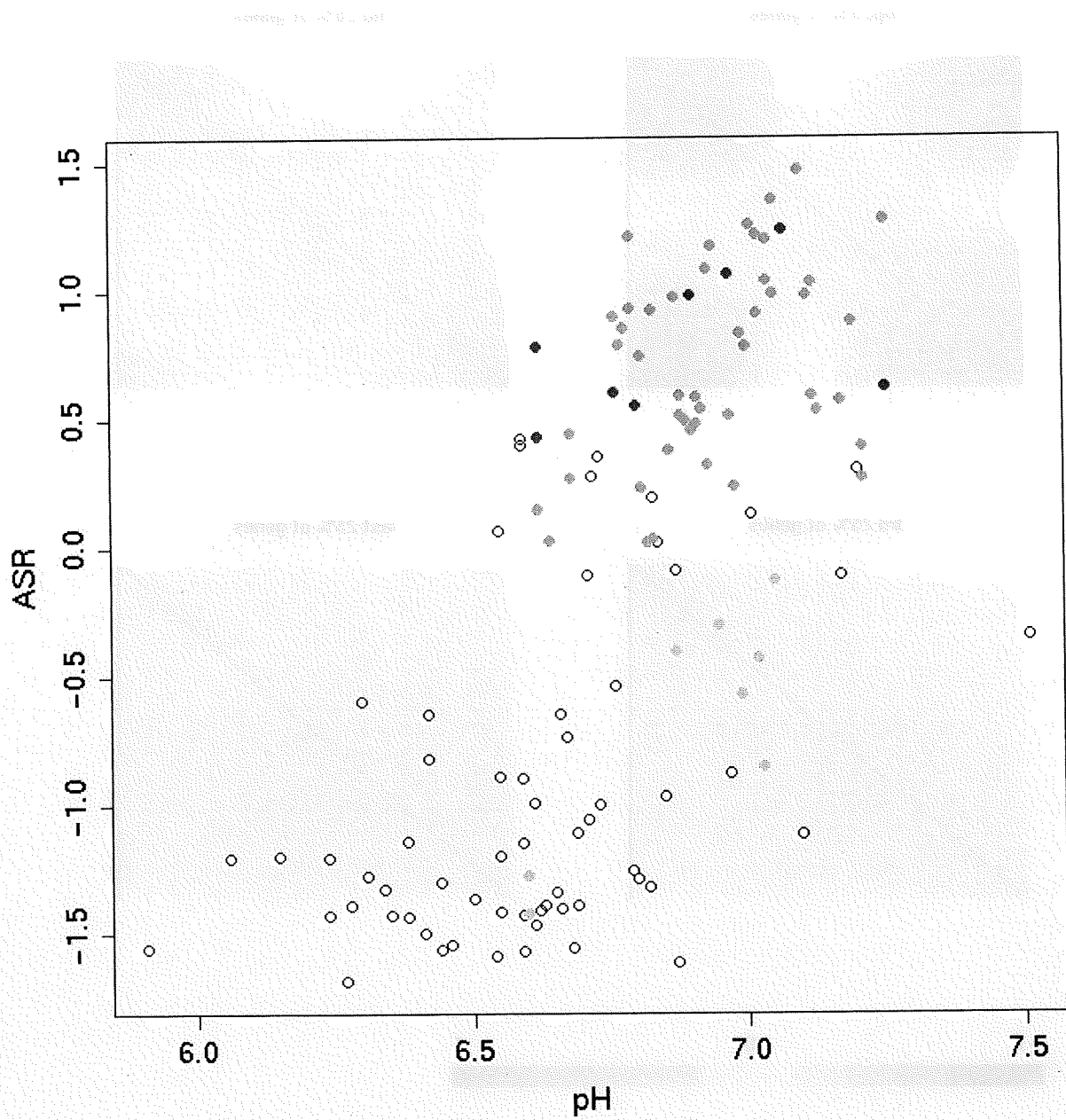
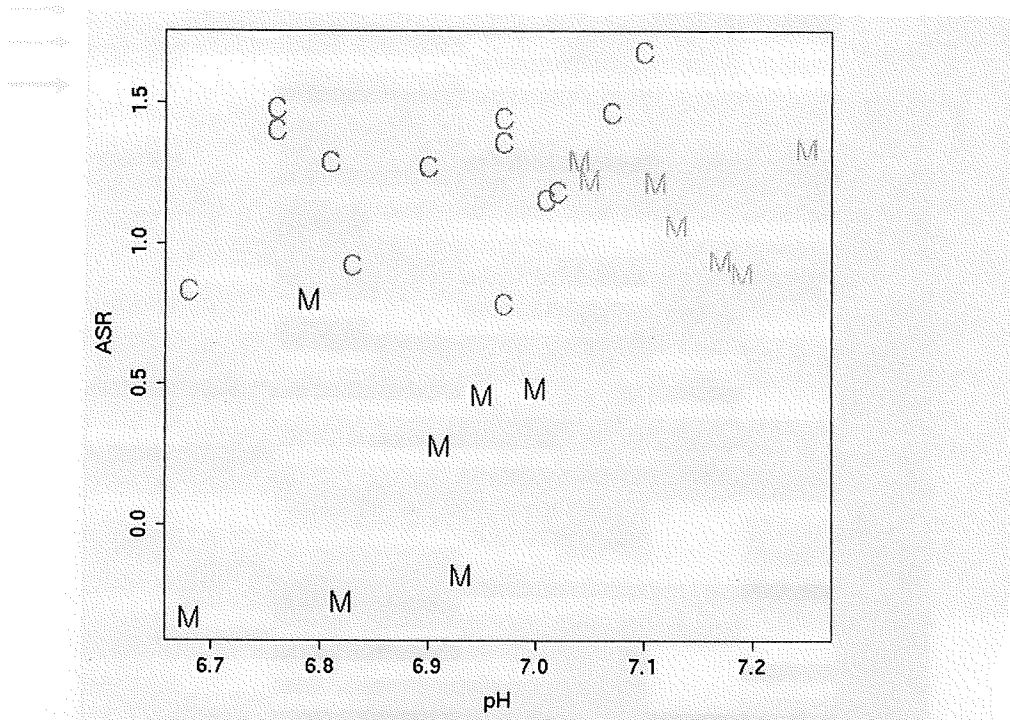


Figure 4

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

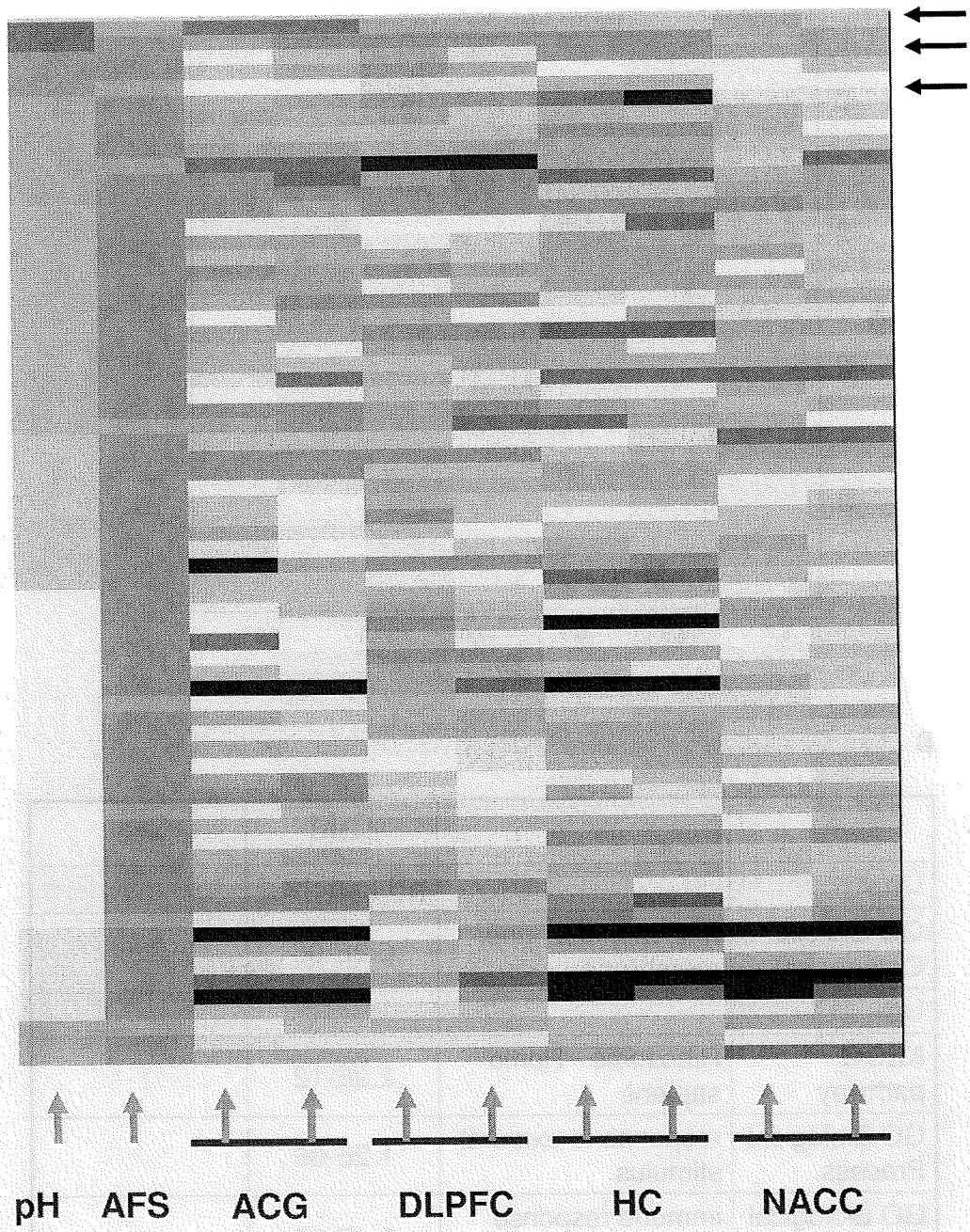


Figure 6

**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>



## MONOAMINE TRANSPORTER AS A TARGET MOLECULE FOR PSYCHOSTIMULANTS

Ichiro Sora,\* BingJin Li,\* Setsu Fumushima,\* Asami Fukui,\* Yosefu Arime,\*  
Yoshiyuki Kasahara,\* Hiroaki Tomita,\* and Kazutaka Ikeda<sup>†</sup>

\*Department of Biological Psychiatry, Tohoku University Graduate School of Medicine,  
Sendai 980-8574, Japan

<sup>†</sup>Molecular Psychiatry Research, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo 156-8585, Japan

- I. Introduction
- II. MAP-Induced Behavioral Sensitization
- III. MAP-Induced Hyperthermia and Neuronal Toxicity
- References

Methamphetamine (MAP), a drug of abuse known worldwide for its addictive effects and neurotoxicity, causes somatic and psychiatric disorders. MAP enters terminals/neurons via monoamine transporters, displaces both vesicular and intracellular monoamines, and facilitates the release of monoamines into the extraneuronal space through synaptic transport via the monoamine transporters. Chronic psychostimulant abusers exhibit psychotic features, including delusions and auditory hallucinations. The dopamine transporter (DAT) and the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) play pivotal roles in the action of MAP, including locomotor effects. The deletion of DAT attenuates the locomotor effects of MAP and may play larger role in behavioral responses to MAP compared to the deletion of VMAT2. MAP produces hyperthermia and/or neuronal toxicity in most species. The effects of MAP in DAT or serotonin transporter (SERT) single knockout (KO) mice and DAT/SERT double KO mice suggested that DAT and SERT are key molecules for hyperthermia and neuronal toxicity of MAP.

### I. Introduction

Methamphetamine (MAP) is a psychostimulant that induces enhanced arousal and euphoria acutely, and psychosis and addiction chronically. MAP enters the terminals/neuron via the monoamine transporters (dopamine transporter: DAT, serotonin transporter: SERT, or norepinephrine transporter: NET), displaces

both vesicular and intracellular monoamines, and facilitates release of monoamines into the extraneuronal space by synaptic transport in the monoamine transporters (Seiden *et al.*, 1993). The large release of monoamine produced by psychostimulant is thought to contribute to the drug's effects in the brain.

## II. MAP-Induced Behavioral Sensitization

The acute and chronic pharmacological consequences of MAP in human users have been observed in behavioral experiments in animals, including both hyperactivity and sensitization of locomotor responses (Segal and Schuckit, 1983). Behavioral sensitization is a phenomenon whereby repeated intermittent exposure to MAP-like psychostimulant elicits a progressive enhancement of those responses, which persists for extended time periods following withdrawal from the drug and are easily reinstated by exposure to the drug or psychosocial stress (Robinson and Becker, 1986). This process closely resembles the course of the relapse in MAP-induced psychosis or schizophrenia, thus sensitization in animals has been suggested to model these psychoses (Sato *et al.*, 1983). Behavioral sensitization is thought to be an early and enduring manifestation of neuronal plasticity associated with changes in mesolimbic dopamine neurotransmission (Kalivas *et al.*, 1993). MAP induces dopamine release through exchange diffusion of plasma membrane DAT (Seiden *et al.*, 1993), and release of vesicular dopamine into the cytosol by acting on the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) (Sulzer *et al.*, 2005). The dopamine releasing effect of MAP has been postulated to mediate its locomotor stimulant and rewarding effects (White and Kalivas, 1998). Therefore, DAT and VMAT2 should play pivotal roles in the mechanisms underlying the actions of MAP.

DAT knockout (KO) mice and VMAT2 KO mice have been used to investigate the roles of DAT and VMAT2 in dopamine neurotransmission and pharmacological mechanisms underlying the actions of psychostimulants. Homozygous deletion of the DAT gene has been reported to produce a 10-fold increase (Shen *et al.*, 2004) or fivefold elevation (Jones *et al.*, 1998) of extracellular dopamine concentrations in the striatum measured by *in vivo* microdialysis, while heterozygous deletion of DAT was not found to significantly increase extracellular dopamine (Shen *et al.*, 2004) or to produce a smaller twofold elevation (Jones *et al.*, 1998) of dopamine in the striatum. Homozygous DAT KO mice show growth retardation and hyperactivity, whereas heterozygous DAT KO mice did not show gross abnormalities in either development or baseline behavioral parameters (Sora *et al.*, 1998). Habituated homozygous DAT KO mice do not show any significant cocaine-induced increase in locomotion (Sora *et al.*, 1998, 2001; Uhl *et al.*, 2002).

We examined locomotor activity and sensitization in heterozygous DAT KO ( $\text{DAT}^{+/-}$ ), heterozygous VMAT2 KO ( $\text{VMAT2}^{+/-}$ ), double heterozygous DAT/VMAT2 KO ( $\text{DAT}^{+/-}$   $\text{VMAT2}^{+/-}$ ), and wild-type (WT) mice to evaluate the roles of DAT and VMAT2 in MAP-induced locomotor behavior (Fukushima *et al.*, 2007). In  $\text{DAT}^{+/-}$   $\text{VMAT2}^{+/-}$  mice, all of MAP-induced behavioral responses were similar to those in  $\text{DAT}^{+/-}$ , but not  $\text{VMAT2}^{+/-}$  mice. The behavioral effects of both acute and chronic MAP administration were suppressed in heterozygous DAT KO mice, whether or not it was combined with heterozygous VMAT2 KO. Contrary to the effect observed in heterozygous DAT KO mice, acute MAP administration produced greater locomotor responses in heterozygous VMAT2 KO mice. These findings indicate that the half deletion of DAT plays a major role in both acute and chronic behavioral responses to MAP, while the effect of the half deletion of VMAT2 is less prominent.

### III. MAP-Induced Hyperthermia and Neuronal Toxicity

MAP abuse causes serious health hazards including irreversible neuronal degeneration, seizures, hyperthermia, and death in human and experimental animals (Davidson *et al.*, 2001). Among these side effects, MAP produces hyperthermia and/or dopaminergic neurotoxicity in most species. Clinical reports and animal studies indicate that lethality by MAP closely correlates with hyperthermia, which may be the primary cause of death. Animal studies suggest that dopamine receptor activation is crucial for MAP-induced hyperthermia (Broening *et al.*, 2005) and lethality (Bronstein and Hong, 1995). There has also been an assumption that the hyperthermia that follows MAP administration is serotonin receptor-mediated (Green *et al.*, 2003).

We examined hyperthermic and lethal toxic effects of MAP in DAT, SERT, and DAT/SERT double KO mice to elucidate the role of these two transporters in MAP-induced hyperthermia and lethality (Numachi *et al.*, 2007). MAP caused significant hyperthermia even in the mice with a single DAT gene copy and no SERT copies ( $\text{DAT}^{+/-}$   $\text{SERT}^{-/-}$  mice). Mice with no DAT copies and a single SERT gene copy ( $\text{DAT}^{-/-}$   $\text{SERT}^{+/-}$  mice) showed significant but reduced hyperthermia when compared to WT mice after MAP. These results demonstrate that MAP exerts a hyperthermic effect via DAT, or via SERT, in the absence of DAT. DAT gene deletion in mice strikingly increased  $\text{LD}_{50}$  of MAP by 1.7–1.8 times that of WT mice, suggesting that the lethal toxic effect of MAP is mainly dependent on DAT. Although DAT and SERT were shown here to be involved in both the effects of MAP on temperature as well as MAP lethal toxicity, the mechanisms are nonetheless different; DAT single KO mice exhibited hyperthermia but greatly reduced MAP lethality, and the lethality was no different from

DAT/SERT double KO mice that had hypothermic responses to MAP. Thus, although the lethal toxic effect of MAP is mainly dependent on DAT, with some contribution from SERT, hyperthermia is not prerequisite for MAP-induced lethality.

In conclusion, these findings lead us to hypothesize that DAT variants may have more profound effects than VMAT2 or SERT variants on the clinically important consequences of acute and chronic MAP abuse in humans.

#### Acknowledgments

This study was supported in part by Grant-in-Aid for Health and Labor Science Research (Research on Pharmaceutical and Medical Safety) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; by Grants-in-Aid for Scientific Research (B), Scientific Research on Priority Areas—System study on higher order brain functions and Research on Pathomechanisms of Brain Disorders, Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

#### References

- Broening, H. W., Morford, L. L., and Vorhees, C. V. (2005). Interactions of dopamine D1 and D2 receptor antagonists with D-methamphetamine-induced hyperthermia and striatal dopamine and serotonin reductions. *Synapse*, **56**, 84–93.
- Bronstein, D. M., and Hong, J. S. (1995). Effects of sulpiride and SCH 23390 on methamphetamine-induced changes in body temperature and lethality. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274**, 943–950.
- Davidson, C., Gow, A. J., Lee, T. H., and Ellinwood, E. H. (2001). Methamphetamine neurotoxicity: Necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **36**, 1–22.
- Fukushima, S., Shen, H., Hata, H., Ohara, A., Ohmi, K., Ikeda, K., Numachi, Y., Kobayashi, H., Hall, F. S., Uhl, G. R., and Sora, I. (2007). Methamphetamine-induced locomotor activity and sensitization in dopamine transporter and vesicular monoamine transporter 2 double mutant mice. *Psychopharmacology (Berl.)* **193**, 55–62.
- Green, A. R., Mcchan, A. O., Elliott, J. M., O'Shea, E., and Colado, M. I. (2003). The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol. Rev.* **55**, 463–508.
- Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Jaber, M., Giros, B., Wightman, R. M., and Caron, M. G. (1998). Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4029–4034.
- Kalivas, P. W., Sorg, B. A., and Hooks, M. S. (1993). The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav. Pharmacol.* **4**, 315–334.
- Numachi, Y., Ohara, A., Yamashita, M., Fukushima, S., Kobayashi, H., Hata, H., Watanabe, H., Hall, F. S., Lesch, K. P., Murphy, D. L., Uhl, G. R., and Sora, I. (2007). Methamphetamine-

MONOAMINE TRANSPORTER AS A TARGET MOLECULE FOR PSYCHOSTIMULANTS 33

- induced hyperthermia and lethal toxicity: Role of the dopamine and serotonin transporters. *Eur. J. Pharmacol.* **572**, 120–128.
- Robinson, T. E., and Becker, J. B. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.* **396**, 157–198.
- Sato, M., Chen, C. C., Akiyama, K., and Otsuki, S. (1983). Acute exacerbation of paranoid psychotic state after long-term abstinence in patients with previous methamphetamine psychosis. *Biol. Psychiatry* **18**, 429–440.
- Segal, D. S., and Schuckit, M. A. (1983). Animal models of stimulant-induced psychosis. In "Stimulants: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives" (I. Grees, ed.), pp. 131–167. Raven, New York.
- Sciden, L. S., Sabol, K. E., and Ricaurte, G. A. (1993). Amphetamine: Effects on catecholamine systems and behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 639–677.
- Shen, H. W., Hagino, Y., Kobayashi, H., Shinohara-Tanaka, K., Ikeda, K., Yamamoto, H., Yamamoto, T., Lesch, K. P., Murphy, D. L., Hall, F. S., Uhl, G. R., and Sora, I. (2004). Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by *in vivo* microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1790–1799.
- Sora, I., Wichems, C., Takahashi, N., Li, X. F., Zeng, Z., Revay, R., Lesch, K. P., Murphy, D. L., and Uhl, G. R. (1998). Cocaine reward models: Conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7699–7704.
- Sora, I., Hall, F. S., Andrews, A. M., Itokawa, M., Li, X. F., Wei, H. B., Wichems, C., Lesch, K. P., Murphy, D. L., and Uhl, G. R. (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: Combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5300–5305.
- Sulzer, D., Sonders, M. S., Poulsen, N. W., and Galli, A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Prog. Neurobiol.* **75**, 406–433.
- Uhl, G. R., Hall, F. S., and Sora, I. (2002). Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol. Psychiatry* **7**, 21–26.
- White, F. J., and Kalivas, P. W. (1998). Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend.* **51**, 141–153.

LSUHSC New Orleans ILL

ILLiad TN: 72001

LNO/LNM

Borrower: LAUTUL  
Lending String:

SEP 15 '09

Lending Library: LAULNO/LNM  
Call #:  
Location: pdf

Patron: Cachat, Jonathan - TN; 62957

Regular

Journal Title: International review of  
neurobiology

Shipping Option: Ariel

Volume: 85 Issue:  
Month/Year: 2009 Pages: 29-33

EFTS: Yes  
Charge:  
MaxCost: \$15.00

Article Author: Sora I;Li B;Fumushima S;Fukui  
A;Arime Y;Kasahara Y;Tomita H;

Shipping Address:  
Rudolph Matas Medical Library  
Tulane University Medical Center  
1430 Tulane Ave.  
New Orleans, LA 70112-2699

Article Title: Monoamine transporter as a target  
molecule for psy

Fax: 504-988-7417  
Ariel: 129.81.7.204

ILL Number: 27766328



Comments:

## 特集：ミトコンドリア機能障害と精神神経疾患

97-106

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？

富田 博秋\*，田中 千晶\*

**Key words** : postmortem brain, microarray, agonal state, hypoxia, mental disorder, psychiatric disorder

## 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

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) 21) 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，さらに死戦期の状況，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っているブリツカー・コンソーシアムの一員と

Mitochondria-related Gene Expression Profile in Psychiatric Postmortem Brain Studies ~ Pathology or Artifact ?

\*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] Hiroaki Tomita, Chiaki Tanaka : Department of Biological Psychiatry, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryō-Machi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan.

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

表1 精神疾患(統合失調症・気分障害)死後脳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	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
出典	Konradi ら 2004	Altar ら 2006	Prabakaran ら 2004	Sun ら 2006	Iwamoto ら 2005	Vawter ら 2006
脳バンク	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

して、死後脳組織を対象とする研究を行う一方、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<sup>2) 5) 7) 10) 23) 25)</sup>、細胞間・細胞内の信号伝達関連遺伝子<sup>3) 6) 7) 17) 18) 20) 21)</sup>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<sup>1) 10) 13) 19) 24) 26)</sup>。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<sup>1) 13) 19)</sup>。

さらに、トロント大学、理化学研究所、ブリッカー・コンソーシアムの三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，ブリツカー・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遺伝子の一つのみで，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行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ブリツカー・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>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。さらに，研究対象とした統合失調症群の組織pHが健常者群のものに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，さらに，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)。

#### 1. 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きており，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

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 ら 2006		Iwamoto ら 2005		Vawter ら 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		
			ANKRD6	増		
C で始まる遺伝子	CLPX	増	CASQ1	増	CAT	増
	COQ7	減	COX15	増	CCT3	増
	COX5A	減			COX6A1	減
	COX6C	減				
D で始まる遺伝子	DIABLO	減	DKFZp547P234	増	DAD1	増
			DLAT	増		
E で始まる遺伝子	ENO2	減	ETFDH	増		
F で始まる遺伝子			FLJ20288	増		
G で始まる遺伝子	GAPDH	減	GLDC	増	GATM	増
	GPI	減			GLUL	増
	GPX4	減				
H で始まる遺伝子	HMGCS2	増	HADH	増	HADHB	増
	HTRA2	減			HSPA2	増
					HSPA5 増	
I で始まる遺伝子			IDE	増		
M で始まる遺伝子	MCCC1	減	MAOB	増	MAPK1	減
	MCEE	増	ME1	増		
	MMAA	増	MRPL3	増		
	MPST	減	MRPL39	増		
	MRPS12	減	MRPL48	減		
	MSRB2	減	MRPS22	増		
			MTO1	増		
N で始まる遺伝子	NDUFS7	減	NDUFS1	増	NAPG	減
	NDUFS8	減	NME6	増	NR4A1	減
O で始まる遺伝子			OGG1	減		
P で始まる遺伝子			PPM2C	増		
S で始まる遺伝子	SLC25A16	減			SPP1	増
T で始まる遺伝子	TOMM40	減	TIMM22	減	TM4SF10	増
U で始まる遺伝子	UQCRC2	減	UQCRC2	増		

<p><b>一般情報</b></p> <p>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)  <b>死因、死亡時の状況 (Agonal Factor)</b>  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)</p> <p><b>臨床情報</b></p> <p>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</p> <p><b>組織の状態の客観的指標</b></p> <p>神経病理学的所見  <b>組織 pH</b>  <b>総RNAの退縮 (Degradation)</b></p>
--

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

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きている他に、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 値はより高い

ほうが良いと考えられるが、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わ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

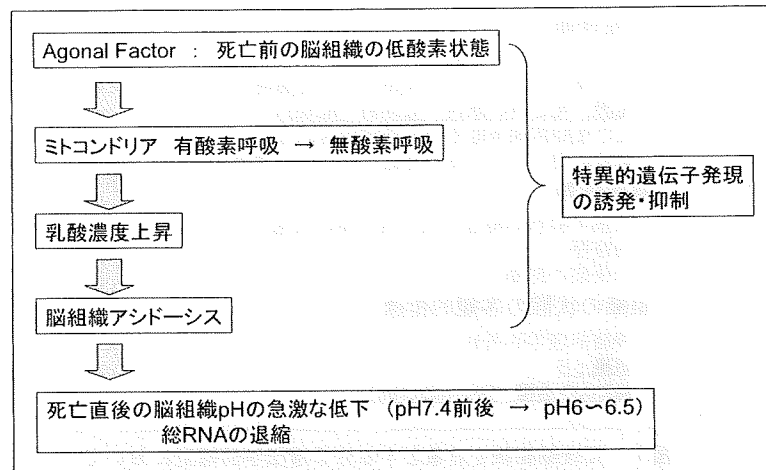


図2 脳組織のpH低下・発現プロファイル著明変化の機序

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ら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>。

## 2. 死戦期 (Agonal State) の状況と期間

死戦期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考えられる。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