

<p>Agonal Factor Score</p> <p>I. 苦悶状態の期間(Duration of agonal phase)</p> <p>II. 分子遺伝学的現象に影響する特異的な苦悶状態</p> <p>(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</p> <p>脳組織 pH</p> <p>総RNA退縮(リボソーム RNA 28S/18S 比・RIN)</p> <p>アレイデータに基づくPost-hoc Quality 評価</p> <p>Degradation Plot</p> <p>ACI (Average Correlation Index)</p> <p>Clustering Analysis etc</p>

図3 死後脳研究における Quality Control の指標

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、慎重に評価を行うことは重要と考えられる。

3. 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 に影響を及ぼす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 ら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・死戦期の状態からく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 ら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⁸⁾。一方, Lipska ら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¹⁰⁾。

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ア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。マイクロアレイ上には 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

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

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、さら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われることで、精神疾患の分子病態の解明が着実に行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-Mollevi 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 post-mortem 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 post-mortem 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 : 300-308.
- 14) Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, et al (2004) Systematic changes in gene expression in post-mortem 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 schizophre-

- nia 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.

精神科ブレインバンク構築のための倫理的基盤

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

はじめに

近年、精神疾患の分子病態を解明し合理的な治療法開発に繋げることを目指して、全ゲノムの分子現象を網羅的に解析する技術は精神疾患にも積極的に応用されつつある。その中でも、死後脳の分子遺伝学的研究は、精神活動・精神症状の発現に直接関係する分子が脳に特異的に転写・翻訳され機能していると考えられるだけに、疾患の成因解明の有用な戦略と考えられる。欧米では、わが国にくらべて、死後脳の分子遺伝学的研究推進のため数多くの精神科ブレインバンクが運営され、精神医学研究の発展と精神医療環境の改善を願って遺族あるいは生前の本人の意思で寄付される死後脳の受け皿となっている。

一方、遺族や故人の生前の尊い意思と社会のブレインバンクへの信頼を裏切ることなく、適正にブレインバンクを組織・運営するためには、倫理上のさまざまな面を慎重に考慮する必要がある。本稿では筆者がカリフォルニア大学アーバイン校 (University of California, Irvine: UCI) のブレインバンクの運営にかかわった前後に、欧米の臓器バンクに関連して議論をよんだ問題を紹介しつつ、今後、全国的な精神科ブレインバンクの体制整備の方針を検討するうえで考えなければならないことにつき考察を行いたい。

尊厳の遵守・厳格な管理体制

脳を含む死後の臓器を対象とする研究に関して最も考慮されるべきことはいかに故人・遺族・臓器の尊厳を遵守するかということで、遺体からの臓器摘出、保管、臓器・組織の解析のすべての過程をとおして、従事するすべての構成員がつねに敬意をもって臓器・組織を取り扱う必要があることはいうまでもない。

臓器提供者の尊い意思を踏みにじる言語道断な事件として、2004年、カリフォルニア大学ロサンゼルス校 (University of California, Los Angeles: UCLA) の組織バンクの構成員が遺族の同意なしに違法に臓器を販売していた他¹⁾、複数の組織バンクで不祥事が発覚している。運営者個人の資質に頼るのみでなく、複数のトレーニングを受けた構成員で組織的に脳組織を管理し、その管理体制を外部から監査する制度を設け、組織運営について完全な透明性を維持する必要がある。Graeber²⁾は「脳組織の価値は最も貴重な貴金属の価値を凌ぐものであり、文字通り“銀行”がセキュリティー管理を行なうのと同じくらい厳格に脳組織の管理を行う必要がある」と論じている。

インフォームド・コンセント

遺族や生前に自らの死後の脳の提供を申し出る者に対し、研究について十分説明し、適切に同意を得ることの

必要性は広く認識されていることと考えられるが、インフォームド・コンセント取得の欠如あるいは不十分さはこれまでにしばしば問題となってきた³⁾。2005年、同意取得の方法への配慮の重要性を改めて感じさせる訴訟が遺族から米国のスタンレー医学研究所に対して起された⁴⁾。この財団は1995年のブレインバンク設立以来、20以上の国の160名以上の研究者に無償で組織を提供し、世界の精神科死後脳研究を牽引してきたといっても過言ではないだけにこの訴訟の影響は大きい。数家族がほんの少しの切片を採取すると理解していたのに対して脳全体が採取保管されているということ、1家族はあらゆる組織について一切同意していないと訴訟を起こしたのに端を発し、さらにその後、メイン州で摘出された脳のうち約1/3にあたる31例が適切な同意の手続きなしに採取されているとする遺族・検察側と正当な同意を得たとする同財団とのあいだで公判が行なわれている。本来のプロトコルにしたがえば遺族との会話がテープレコーダーに記録されているはずであったが、第三者による電話越しの会話の聴取という形で同意の証拠が残されたことも問題の1つとしてあげられている。具体的な運営手続きの検討に慎重を要することの教訓として真摯に受けとめる必要がある。

個人情報・遺伝情報の保護

ブレインバンクに保管される脳は多くの場合、何らかの分子遺伝学的な解析の対象となり、遺伝情報が取り扱われることになるので、インフォームドコンセントの取得、検体の取扱いなどの手続きは「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」にしたがう必要がある。ブレインバンクでは死後脳組織とともに正確で詳細な臨床情報を集積する必要があるが、脳組織および臨床情報は最初の段階でコード番号を割り当てて匿名化し、ブレインバンク内の脳組織と臨床情報の取扱いも匿名化して行う。また、脳組織・臨床情報が第三者研究機関に脳組織・臨床情報が送られる場合も匿名化されたものが送付されるべきである。遺族から脳組織の引渡しの要求があったときには、遅滞なく遺族に引き渡さなければならず、そのためには、故人・遺族の個人情報と匿名化コード番号を連結する対応表を個人情報管理者が厳重に保管

する形の連結可能匿名化により匿名化を行なう必要がある。生前登録制度を行う場合には登録者の個人情報管理も厳格に行う必要がある。

不特定の研究機関に組織を提供すること

欧米のブレインバンクには集積した脳を特定の研究組織による研究に限定して使用しているところもあるが、狭義のブレインバンクは医学発展への貢献が見込める適正な研究組織に広く組織を供与することを目的として死後脳を集積保管する。この場合、試料提供の要請のあった研究実施機関の研究計画の意義・妥当性等を第三者の参加する試料提供審査委員会が迅速かつ公平に審議することで、集積された脳組織が適正に分配され、精神疾患の病態解明に寄与するよう運営するべきである。申請を行なう研究実施機関はそれぞれの施設の倫理委員会により各研究計画に対する承認を得る必要がある。また、ブレインバンクから提供された組織を用いた研究成果は公開されるべきである。集積されている組織を個別の研究に使用するたびに、遺族に新たに同意を求めるのは現実的でなく、このことについても遺族に説明し、包括的同意を得る必要がある。

ブレインバンクの技術的問題

集積された脳が技術的に適切に摘出・管理・解析され、精神医学に有益な情報が得られなければそもそも脳を提供する志に報いることにはならないことを考えると、技術的な問題は倫理的問題と直結する。貴重な検体を無駄にしないためには脳組織の適正な品質管理と分配のシステムの確立が必須である。欧米の死後脳研究の中で明らかになってきた脳組織の品質管理の点で注意を喚起すべきことは、死亡時に身体疾患により低酸素・昏睡状態等のいわゆる死戦期を長時間経て亡くなった提供者の脳組織の場合、死亡時の状況の脳組織の分子現象への影響が大きく、生前に精神疾患に罹患していたことによる影響をはるかに凌ぐということである。欧米のブレインバンクは設立当初から検察局に検死のために搬送されたケースの遺族に対し研究への協力を要請するという体制を取っているところが多く、結果として、比較的急死し、死戦期状況の影響が少ないケースが摘出・保管

の対象となることが多く、近年では、長時間の死戦期を経たケースを研究あるいは集積・保管の対象から除外する施設も出てきている⁵⁾⁶⁾。これに対し、従来、日本での死後臓器を対象とする医学研究は長期の闘病の末に亡くなり、医療機関と遺族のあいだですでに形成された信頼関係にもとづく同意に伴う臓器提供であることが多く、結果として潜在的に死戦期状況の影響の影響が大きい症例が多いと考えられる。この問題は、当事者・遺族を含め社会全体のブレインバンクへの理解・関心が高まり、治療を受ける医療機関と遺族のあいだの信頼関係を超越して、社会とブレインバンクのあいだの信頼関係が形成されることでおのずから解消されるものと考えられる。

経済的問題

ブレインバンクは非利益団体として運営し、臓器の取扱で利益を得るべきではない。一方でブレインバンク運営には臓器の摘出、処置、保管、移送にかかわる費用が必要で、提供された脳の尊厳を守り続ける意味でもこの財源をいかに継続的に確保するかは大きな問題である。運営は公的資金にもとづくことが望ましいが、場合によっては、その全体あるいは一部を当事者や家族で組織される団体などの経済的な利害を生まない団体からの寄付でまかなうことや、臓器・組織を利用する研究者から徴収することも検討されるべきかも知れない。脳組織を仲介することによっては勿論のこと、研究から得られる情報で経済的利益を得る可能性のある組織・団体（具体的には医療技術・薬剤の開発、販売により利益を得ている会社など）からの資金供給は避けるべきであろう。

法整備

ブレインバンクの運営は、現行法上は、わが国の死体の解剖・保存を規定する法律として1949年に公布された死体解剖保存法にもとづいて、遺族の同意を得たうえで解剖・保存を行なうことで成り立つ。今後、生前に自らの死後の脳の提供を申し出る生前同意によるブレインバンクへの脳の提供が増えることが期待されるが、その場合でも現行法では生前同意に加え遺族の同意を得ることが必須の条件となり、何らかの事情で遺族の同意が得られない場合、故人の意思が活かされないというこ

とも起こりうる⁷⁾⁸⁾。医学教育のための献体に関しては1983年に献体法が制定されたが、献体法では正常解剖にかぎって書面での生前の意志表示があれば、遺族がその旨を拒まない場合や遺族がない場合には遺族の承諾を要さず、限定的にはあるが生前の本人の意思を活かすよう規定されている。

献体法は医学教育を支えるための法律であるが、将来の医療環境の改善に役立つことを願う市民による遺体・臓器の寄付という点ではブレインバンクの理念と共通するもので、献体の体制が形成された歴史からは、今後、ブレインバンクが進むべき方向として学ぶところが多い。1951年に故倉屋利助氏による「死後自分の遺体を医学の発展のために医学生に献ずる」との発願に始まり、東京大学医学部解剖学教室の故藤田恒太郎教授のもとに、1955年献体を希望する篤志家たちの集まりとして白菊会が結成され、その後、献体希望者の生前の登録機関が他大学にも次々と自発的に設置されていった。さらに、これらの横の連絡組織として篤志解剖全国連合会が結成され、1983年『医学及び歯学教育のための献体に関する法律』が制定されるに至る⁹⁾。現在では全国の白菊会の献体登録者の総数は21万人を超え、組織は献体者・遺族の尊厳を遵守して厳格に運営されている¹⁰⁾。

医学教育とともに医学研究の推進により将来の医療環境の改善を図るためにも、ブレインバンクを含め死後臓器の医学研究の適正な促進を促すような法が整備されることが望ましい。

おわりに

～望ましいブレインバンクのあり方に向けて～

親族が亡くなった直後に始めてその遺族がブレインバンク・死後脳研究のことを聞かされ、比較的短時間のうちに提供することに対する理解・同意を求められるよりは、普段から一般的知識としてこれらの情報に接する機会があり、折にふれて自分や親族の死後に脳を研究目的で提供することについて考える機会をもつということを経た後に、本人の生前の判断あるいは遺族のより主体的な判断による寄付という形でブレインバンクへの脳の提供が行なわれることが理想的である。そのためには普段から精神医学・医療の情報を積極的に市民に広報し、将

来の精神医学・医療の発展にとって重要なシステムとしてブレインバンクを紹介していくことは、社会の信頼に足るブレインバンクのシステムを構築していくことと並んで重要な課題と考えられる。

文献

- 1) Broder JM, Pollack A : U. C. L. A. Official Is Held In Cadaver-Selling Inquiry. The New York Times March 8, 2004
- 2) Graeber MB : Twenty-first century brain banking : at the crossroads. *Acta Neuropathol* 115 : 493-496, 2008
- 3) Sheach Leith VM : Consent and nothing but consent? The organ retention scandal. *Sociol Health Illn* 29 : 1023-1042, 2007
- 4) Snyder D : A Dispute Over Brain Donations. Families Allege Improper Consent in Lawsuits Against Bethesda Institute. Washington Post June 30 : B01, 2005
- 5) Tomita H, Vawter MP, Walsh DM et al : Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile : quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry* 55 : 346-352, 2004
- 6) 富田博秋 : 死後脳組織を使った分子遺伝学的研究の実際. *分子精神医学* 6 : 243-250, 2006
- 7) 有馬邦正 : 生前同意制ブレインバンクの運営に際する法的・倫理的問題の研究. 厚生労働省科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業) こころの健康科学研究事業に係る企画及び評価に関する研究 平成 15 年度報告書 : 129-136, 2004
- 8) 矢島基美 : ブレインバンクをめぐる法律上の論点. 厚生労働省科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業) こころの健康科学研究事業に係る企画及び評価に関する研究 平成 15 年度報告書 : 137-140, 2004
- 9) 星野一正 : 献体の法制化を願みて. *時の法令* 1486 : 55-61, 1994
- 10) 財団法人 日本篤志献体協会ホームページ (2008 年 9 月 4 日現在) <http://www.kentai.or.jp/>

特集：精神疾患のブレインバンク設立に向けて

17-24

交絡因子に配慮した脳バンク構築の必要性

富田 博秋*, 田中 千晶*, 兪 志前*

Key words : brain bank, postmortem brain, agonal state, tissue pH, RNA integrity, microarray

1. はじめに

多数の遺伝子発現量などの分子遺伝学的現象を一度に包括的に解析するハイスループット解析技術は急速な進歩を遂げてきており、これらの技術を用いて精神疾患罹患者と健常対象者の死後脳を解析し比較することで、精神疾患の病態に関連する分子遺伝学的現象を特定できる可能性が広がってきている。このような研究の必要性から、欧米を中心として世界的に脳バンクの設立が加速しているが、現在のところ、分子遺伝学的研究の対象とするに足る検体数の死後脳を集積している脳バンクは欧米に偏在し、このため、ほとんどの死後脳研究は白人の脳に基づくものになっている。遺伝的バックグラウンドの相違を考えると、日本人あるいはアジア人を対象とする死後脳研究は日本やアジア諸国の精神疾患罹患者の分子病態を解明する上で重要なことである。日本においても死後脳研究の重要性や脳バンクの必要性については年々多くの精神科医や神経科学者の関心を引くようになってきており、日本のより多くの施設において脳バンクを設立・拡充させ、また、互いに有効に連携を取る体制を模索するための試みが始まって

いる。日本は欧米に比べると一足遅れて精神疾患の分子遺伝学的研究に備えた脳バンクの整備に着手することになる訳だが、その分、欧米でのこれまでの取り組みから得られた知見・ノウハウから、効率的で有用な脳バンク運営や死後脳研究の方法を学べるという利点がある。

そのような知見の中でも最も注目すべきことのひとつに死後脳の分子遺伝学的状態から疾患病態の因子を特定する上で、病態以外の諸条件に由来する交絡因子の評価・コントロールの問題がある。解析の対象となる死後脳の分子遺伝学的状態は単に精神疾患に罹患していたか否かという均一な疾患病態に由来する因子のみを反映するものではない。精神疾患罹患者の病歴、治療歴、死亡時の病勢は多様であり、また、罹患者、対照者の死後脳の分子遺伝学的状態は、精神疾患の病態という要因と同時に、性差や飲酒、喫煙歴など様々な生前の環境、死亡年齢、死因、死亡時の状況および死後の脳の摘出や保管の条件などの様々な要因を反映する。これらの要因は、死後脳研究により病態による因子を特定する際の交絡因子となり、交絡因子の評価・コントロールを如何に行うかが、死後脳研究により病態解明の有効性、信頼性を高める鍵となる。本稿では、脳バンク運営にお

Control of Confounding Factors in Brain Bank Management

* 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, Zhiqian Yu : Department of Biological Psychiatry, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan.

[富田博秋 E-mail : htomita@mail.tains.tohoku.ac.jp]

ける技術的側面の重要事項となる交絡因子の評価とコントロールに関して考慮すべき案件について検討を行う。

なお、欧米ではこれらの問題は、脳組織のQuality Control (品質管理)の問題と総称されることが多く、2008年の生物学的精神医学会のシンポジウムで筆者は「品質管理に配慮した脳バンク構築の必要性」というタイトルを用いた。ここでQuality (品質)と呼ばれ問題となるものは、主に組織の保存状態、分子のIntegrity (安定性)などの問題であり、解析により疾患の病態の影響を評価できる状態であるか否かという意味でHigh Quality (高品質)・Poor Quality (低品質)という言葉が用いられている。しかし、これを直訳して、日本において、「品質管理」「高品質」「低品質」という言葉を用いると、「品質」という言葉が生前の脳機能などその他の属性に関することなどを誤って連想させたり、脳の物質的な面が強調されて、脳組織に対する尊厳の念を関係者・協力者・市民の間で共有する上で望ましくないと考えるに至った。そこで、「品質」という訳語を用いることを避けて、この問題に関して、評価・コントロールの対象を端的に示す「Confounding factor (交絡因子)」という言葉を用いて、この問題を交絡因子の評価・コントロールの問題として検討・記載を行いたい。

2. 死後脳研究における交絡因子

一般に精神疾患の死後脳研究の主な目的は死後脳の組織・細胞・分子の状態を解析することで生前の精神疾患の病態が脳の組織・細胞・分子に及ぼした影響を特定することであると考えられるが、その際の交絡因子となる要因の概要を図1に示す。精神疾患罹患者に特有の生前の因子として、疾患の病型、臨床症状、病歴、発症してからの経過の長さ、死亡時の病勢、治療歴、既往歴、身体合併症などの要因は、疾患の病因・病態との関連や、これらの因子間の相互の関連について検討されなければならない。また、罹患者、対照者ともに共通する生前の因子として、性差や飲酒、喫煙歴など様々な生前の生活環境からくる要因も、死

後脳の分子遺伝学的状態に反映されることが知られている。また、死亡時の年齢、死因も死後脳の状態に影響する重要な要因となる。死亡に直結する病態の始まりから死亡に至るまでの期間で、生命をかるうじて維持する程度の循環動態が保たれているものの脳などの重要臓器の機能を維持するには不十分な状態を死戦期状態 (Agonal State)と呼ぶが、死戦期に起こる脳内の分子現象の変化は、そのまま直接死後脳の分子遺伝学的状態として残るため、死戦期の因子 (Agonal Factor)は特に重要である。死後、脳が摘出、保管され解析されるまでの課程も交絡因子として検討される必要がある。死亡した時点から、脳が摘出され、冷凍庫に凍結されるまでの時間は一般に死後経過時間 (Postmortem Interval: PMI)、凍結後、解析に使用されるまで冷凍庫に保管される期間を冷凍保存期間 (Freezer Storage Time) と呼ばれ、死後脳研究に特有な交絡因子として重視される。

これまでの研究から、上記の生前、死戦期、死後の因子は脳組織の性状に特異的な影響を及ぼすことが知られ、脳組織の性状を調べることである程度客観的に評価できることがわかってきた。死戦期に長時間に渡って低酸素等の状況に暴露されることなどにより死後脳組織のpHが低下するとともにRNA退縮が進んでRNAの完全性 (integrity) が低下することに関しては従来より多数の報告がこれを裏付けており^{1) 2) 6) 7) 11) 12) 15) 18) 21) 23) 25) 27) 35)}、近年のマイクロアレイを用いた発現プロファイルによる評価でもこれらの因子の顕著な影響が複数の研究グループにより観察されている^{1) 16) 19) 20) 28) 31) 32) 34)}。一方、死戦期の状況を客観的に評価することの困難さを指摘する論文³⁴⁾や死戦期の状況とRNA完全性の相関を否定する研究^{9) 26)}もあるが、そのようなグループもRNA完全性は重要な交絡因子としてコントロールされる必要があると結論づけている。客観的記録として特定可能な死戦期の影響、組織pHとRNAの完全性などは死後脳研究においてコントロールを行うべき客観的な交絡因子として重要であることはコンセンサスのあるところと考えられる。また、死戦期状態や死後経過時間は特定の遺伝子の発現量に反映されるという報告もあり^{13) 17) 22) 24) 30)}、死戦期や死後経過時間に発現

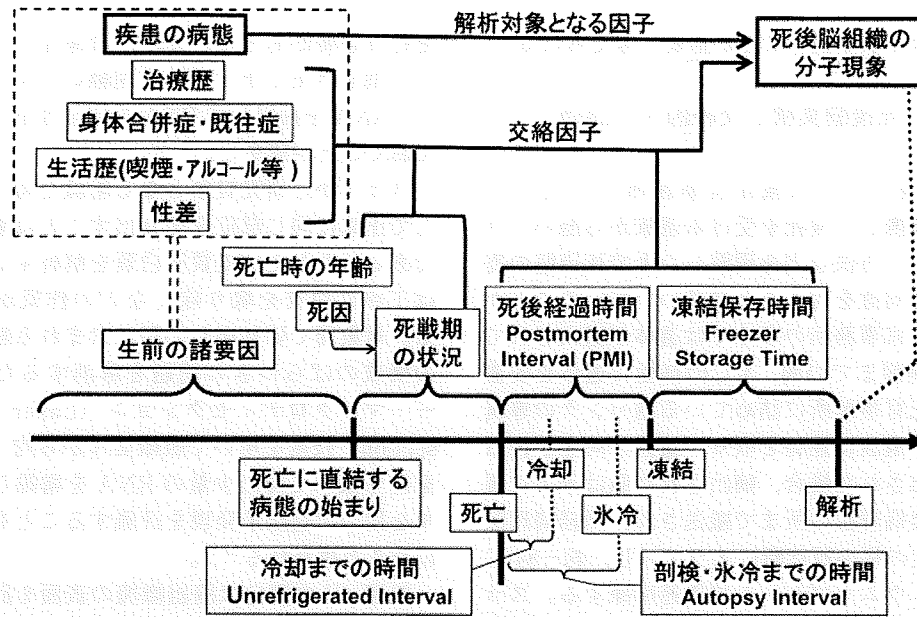


図1 死後脳を対象とする分子遺伝学的研究における交絡因子

が相関する遺伝子の発現レベルも客観的な交絡因子として使用しうる。また、あらゆる実験に共通することであるが、様々な解析の際のアーチファクトも交絡因子として注意を払う必要がある。以下の項では、臨床症状と死後脳を集積する上で、死後脳の交絡因子に関して配慮すべき点を検討する。

3. 臨床情報の集積と交絡因子の評価

精神疾患罹患者の診断、病歴、治療歴、死亡時の病勢、合併症などを正確に判断するために、適宜、遺族、主治医へのインタビュー、カルテの確認、剖検時の所見などの情報を集積し、これらの情報を総合して行われる。健常対照者についても見逃されている精神疾患既往歴がないかを慎重に調査する必要がある。また、罹患者、対照者とも、性差や飲酒、喫煙歴など、様々な生前の環境の相違、死亡時の年齢、死因、死亡前後の状況は分子の発現状況に影響することが知られ評価を要する。特に死亡前一定期間、低酸素状態、昏睡、発熱、痙攣、脱水、低血糖、頭部外傷（特に開放性）、

神経毒性物質の摂取、腎不全や多臓器不全などのエピソードがあり、徐々に衰弱して死去した場合、そのような死亡時の状況は、あらゆる要因の中でも多大に脳の mRNA やタンパク質の発現や安定性に作用することが知られ、この影響は精神疾患の及ぼす影響よりもはるかに大きいと考えられるので、この要因を十分に評価し影響を最小限にコントロールすることは重要である³²⁾。死戦期の影響の大きい症例や組織 pH が著しく低下している脳組織は解析の対象から除外することが望ましいと考えられる¹⁶⁾ 32)。

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、性差、死亡時の年齢、服薬歴、喫煙歴なども死後脳の分子遺伝学的状態への影響が報告されており、このうち、服薬歴、喫煙歴は組織 pH に影響することも示唆されている¹⁾ 10) 20) 33)。これらの因子の影響は死戦期の影響ほどは大きくないと考えられることや、集積しうる症例数に制限があることから、抗精神病薬の未服薬症例や非喫煙症例だけの解析を行うことを考えるのは現実的ではない。これらの因子は、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。

4. 死後脳集積と交絡因子の評価

米国の脳バンクは検死官事務所 Coroner's Office と連携し、検死を受ける遺族から脳バンク運営の目的・方法などを理解した上で死後脳の寄付について同意を得ることに基づいていることが多い。検死官事務所の多くでは遺体が搬入されてから検死解剖までの間、4℃の部屋に遺体を安置する。検死官事務所に詰めている脳バンクの専属スタッフが遺族に連絡を取り、遺族の同意が得られ脳が摘出された場合、摘出された脳は氷上に置かれて神経病理医の所まで搬送され、神経病理医が脳を規定の幅の冠状断にスライスし、約-84℃のアルミニウム・プレートで急速冷凍する。スライスされた脳組織ブロック（スラブ：slab）は神経病理医が神経学的病変の有無を確認する必要があり、スラブの両面を写真撮影し保存しておくことも望ましい。亡くなってから脳を凍結するまでの時間は死後経過時間（Postmortem Interval：PMI）として、分子発現状況への影響を評価する必要がある。PMIは48時間を超すとRNA退縮などへの影響が大きい、それ以内ではそう大きな影響はないとする報告が多い。死後経過時間だけでなく死後から脳組織の冷凍庫への保管の課程を更に細かく分けて、死亡してから4℃の部屋に安置されるまでの時間（Unrefrigerated Interval）、あるいは、死亡してから脳が摘出され氷上で冷却されるまでの時間（Autopsy Interval）を、評価の対象にしている脳バンクも多く、特に4℃の部屋に安置されるまでの時間が短いことは交絡因子のコントロールに重要とする知見もある³⁰⁾。

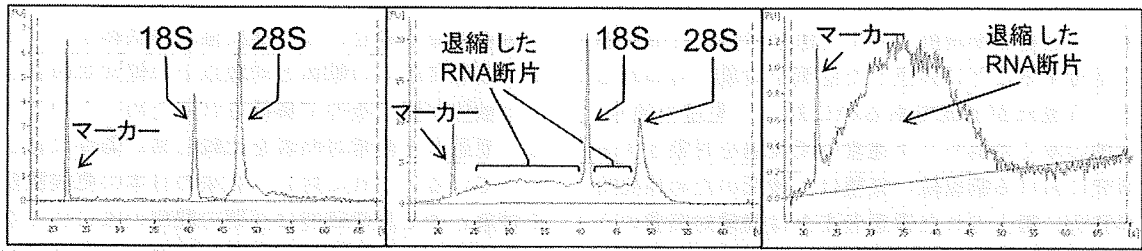
凍結された脳は-80℃の冷凍庫に保存するが、長期にわたって貴重な脳を保存する上で、停電などのトラブルによる温度上昇時に液体窒素が流入し温度を保つ装置や異常時に電話で責任者を呼び出すシステムを装着すること、トラブル発生時に組織を一時的に保管できる予備の冷凍庫スペースが必要である。凍結保存期間中に冷凍庫にトラブルがなければ大きな影響はないとする報告が多いが、PMIなどの因子とともに脳バンクごとに評価

を行う必要があろう。また、冷凍保存したスラブの一部をホモジナイズして組織のpHを定量したり、RNAを抽出してRNAの完全性をチェックしておくことが望ましい^{5) 32)}。

スラブから研究対象となる組織を切り出す際に正確に同じ部位を切り出すことは重要な課題である。たとえば皮質灰白質を解析するのであれば丁寧に白質を取り除くなどの作業が必要になる。対象間で切り出しの際に含まれる組織・細胞の構成のばらつきの問題を解消するためレーザー・マイクロディセクション（Laser Microdissection）技術を用いて組織切片から均一な細胞群を打ち抜いて得た少量のRNAを増幅したサンプルを用いて遺伝子発現を評価することも今後盛んになると思われる^{3) 14)}。

組織pHの測定は脳組織塊の表面を計る方法もあるが、同一部位から切り出した小切片をホモジナイズしたもののpHを測定する方法が一般的に用いられている。脳部位、ホモジナイズの条件、測定までに要する時間、室温などにより若干pHが異なるため、脳バンク間で共通のプロトコルを使用することが望ましく、少なくとも脳バンクごとには一定の条件で測定が行われる必要がある^{5) 32)}。複数の研究から死後脳組織の分子遺伝学的状態に顕著な影響を引き起こしうるpHのcut-off値としてpH6.5前後が提唱されている^{9) 14) 16) 25)}。もちろんcut-off値は高いほどよいと考えられるが、検体数とpHの影響の程度の兼ね合いで現実的なcut-off値の設定がなされる必要がある。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と高く相関し、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顕著に大きいものに対し、pH6.5以上の組織のみでの解析を行うとpHの影響は他の因子と同等のレベルに弱まる。

RNA完全性の評価は組織RNAの中で最も発現量の多いリボソームRNAの28Sと2番目に多い18S分子の発現量を定量することが一般的に行われる。図2に示す通り、28Sは生理的には18Sの倍近く発現しているが、mRNAも含めRNAが退縮するときには分子量の大きい28Sの方がその影響を受けやすいため、28S/18S比をとるとRNA



rRNA Ratio [28s / 18s]:1.9 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.1 rRNA Ratio [28s / 18s]:0.0
 RNA Integrity Number (RIN):10 RNA Integrity Number (RIN):6.6 RNA Integrity Number (RIN):2.1

図2 アジレント社バイオアナライザー 2100による18Sと28Sリボソームのピークの描出

サンプル全体が退縮している程 28S/18S 比は小さくなっていく。28S/18S 比の死後脳研究での現実的な値として 1.5 程度はあることが望ましいと考えられる。28S, 18S 発現量の評価はアガロース・ゲルでの電気泳動やアジレント社のバイオアナライザー 2100 などにより行われる。バイオアナライザー 2100 を用いると 28S と 18S のピークに加え、ベースラインの状態も含めて RNA 退縮を評価する指標 RNA integrity number (RIN) という指標が算出され、より信頼性の高い指標として広く用いられてきている²⁹⁾。RIN 値は 10 を最高に RNA が退縮するに従い値が低くなる (図 2)。この他に、RNA 完全性の評価の指標として RQS (RNA quality scale) も提唱されている³⁾。この他、遺伝子転写物の 5' 端 (転写開始部位近傍) 上流領域の方は 3' 端 (多重アデニン付着部位近傍) 下流領域よりも早く退縮するため、特定の遺伝子の各々の部位に設計されたプライマーを用いて qRT-PCR などサンプル中に残存する転写物の 5' 部位と 3' 部位のコピー数を定量し、3' / 5' 比を算出することも可能である^{5) 32)}。

死亡時の状況、組織 pH、RNA 完全性の評価をマイクロアレイなどの本実験を行う前に行うことが重要であることは言うまでもないが、マイクロアレイ実験を行った場合、そこから得られる豊富なデータは、死亡時の状況、組織 pH、RNA 完全性を評価する上でも有用である。また、マイクロアレイ実験中の人為的過誤、スキャンする際の気泡やアラインメントのずれなどのアーチファクト

の評価を行う上でも、実験後に実験データそのものを用いて病態解析の上での交絡因子を評価することも重要である。アフィメトリックス社のジーンチップを用いた場合、同社の RPT ファイルやバイオコンダクターから無料で提供されるデグラデーション・プロット (AffyRNAdeg : <http://rss.acs.unt.edu/Rdoc/library/affy/html/AffyRNAdeg.html>) を用いて RNA 完全性の評価が可能である。またマイクロアレイ機器の種類を問わず、クラスタリング解析、Dispersion Tree 解析、平均相関係数解析 (Average Correlation Index : ACI) を用いると死亡時の状況、組織 pH、RNA 退縮の影響を大きく受けているサンプルやマイクロアレイ実験中に大きな人為的過誤が生じたアレイを手早く確認できる^{19) 28) 32)}。これらの解析をもとに、マイクロアレイデータにより組織 pH 低下や RNA 退縮は遺伝子発現プロファイルに大きな影響を与えるという報告が多くなされている。

今後、死戦期状況、低酸素暴露、pH 低下に敏感に反応して発現変化する遺伝子群や死後経過時間の延長に反応して発現変化する遺伝子群が特定され、これらの情報を元にした交絡因子のコントロール方法などが開発されることが望まれる。

5. 交絡因子から見た死後脳バンクの運営形態

従来、日本での死後脳研究における脳組織の集積は、大学病院や研究機関と協力関係にある病院で死亡した罹患者のうち、その遺族が研究の目

的・方法などを理解した上で医学研究のために脳を寄付することに同意した症例を対象に行われるという流れが主流であるのに対し、先述の通り、米国の多くの脳バンク運営や死後脳を対象とする研究における脳組織の集積は、検死のため検死官事務所に搬入された罹患者または健常対照者のうち、遺族の同意を得られたケースを対象に行われるという流れで行われる。検死官事務所に脳バンクの専属職員が常駐し、研究の対象となりうる精神疾患罹患者および健常対照者を選別し、遺族に電話などで研究の目的・方法などの概要を説明し、脳を寄付し生前の情報を収集して研究に用いることに協力が得られるかを打診し、協力への同意が得られた親族に研究の詳細を説明して文書で同意を得るといった流れをとるところが多い。これらの作業は臓器移植のコーディネーターや角膜バンクとも連携しながら行われる。同意の得られた寄付者の脳は摘出された後、匿名化のための番号が付される。それ以降の行程に関わる脳バンク職員や研究者にはこの番号のみが知らされることで、脳組織や臨床データを用いた研究に携わるものに個人情報漏洩しないよう配慮される。脳バンク専属の複数の心理士が適宜精神科医のアドバイスを得ながら、生前の臨床症状や生活歴、死亡時の状況などの情報は遺族、主治医へのインタビュー、カルテの確認、剖検時の所見などを集積、総合して、生前の臨床診断や病状の評価を行い、健常対照者に精神疾患の既往が無いことを確認する。この過程は心理学的剖検（Psychological Autopsy）という言葉で表現される。これらの手順は事前に十分な法的な検討がなされ施設の倫理委員会が厳正な審査を受け承認を得た上で実施される。

欧米の脳バンクが検死官事務所と連携するシステムであることから、結果として、遺族の同意の元に脳バンクに献体される症例は事故または急性病変が死因となって死亡することが多くなり、このため、先述の死戦期状況の影響が少ないケースが摘出・保管の対象となることが多い。近年では、長時間の死戦期を経たケースを研究あるいは集積・保管の対象から除外する脳バンクも出てきている。また、健常対照者も精神疾患罹患者も検死

の対象となる場合には同様に協力の依頼を行うため、罹患者からの献体と同数以上の健常対照者からの献体が同じ条件で集積されるため、このことは、罹患者と健常対照者を比較し易い条件に結びついている。これに対し、従来の日本の死後臓器を対象とする医学研究は長期の闘病の末に亡くなり、医療機関と遺族の間で既に形成された信頼関係にもとづく同意に伴う臓器提供であることが多く、結果として死戦期状況の影響が大きい症例が集積され易くなることになる。また、健常対照者の死後脳を集積することが困難で、罹患者と健常対照者が異なる施設、システムで集積されることも多くなりがちであり、罹患者と健常者との比較を困難にしている。

このような状況を考慮して、短期・中期的には現在の日本の死後脳を集積システムの中で、死後脳研究における交絡因子への対処法を検討する必要がある。また、中長期的には、今後、日本の文化・条件を考慮しながら、より有効に交絡因子の影響を大きく受けずに、精神疾患罹患者と健常対照者の死後脳を解析・比較できるような新しい死後脳集積のシステムを構築していくことが望ましい。そのためにも、当事者・家族を含め社会全体の脳バンクへの理解・関心が高まり、治療を受ける医療機関と遺族の間の信頼関係を越えて、社会と脳バンクの間の信頼関係が形成される必要がある。精神医療・福祉の環境改善を図る上での脳科学推進の重要性と、その一環としての脳バンクの意義・有用性を当事者・家族・市民が理解できるような情報の普及に取り組むことが重要と思われる。

6. おわりに

今後、倫理面、技術面に十分配慮した脳バンクのネットワークが構築され、より多くの対象を均一な条件で解析することができれば、病態解明につながる信頼性の高い解析が可能になり、将来罹患者の方々に還元しうる成果が得られるのではないかと期待される。当面は日本の実情にあった脳バンクの運営システムと交絡因子の評価・コントロールの方法が工夫・検討される必要があると考

えられる。並行して、精神疾患罹患者・家族・市民と医学研究者が、研究により病態の解明が進み、より良い治療法が開発され得るというビジョンを共有でき、社会に脳バンク設立・拡充を後押しする機運が高まるよう、研究者側から働きかけることも重要な課題と考えられる。

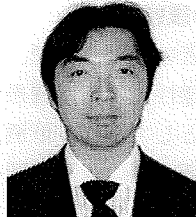
文 献

- 1) Bahn S, Augood SJ, Ryan M, et al (2001) Gene expression profiling in the post-mortem human brain--no cause for dismay. *J Chem Neuroanat*, 22 : 79-94
- 2) Benfenati F, Cimino M, Zoli M, et al (1991) Decrease in mRNA levels but not in the density of D2 dopamine receptors in rat striatum after transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*, 126: 6-8
- 3) Bernard R, Kerman IA, Meng F, et al (2008) Gene expression profiling of neurochemically defined regions of the human brain by in situ hybridization-guided laser capture microdissection. *J Neurosci Methods*,
- 4) Bonneuil N (2007) Ageing laws for the human frontal cortex. *Ann Hum Biol*, 34 : 484-492
- 5) Bunney WE, Bunney BG, Vawter MP, et al (2003) Microarray technology: a review of new strategies to discover candidate vulnerability genes in psychiatric disorders. *Am J Psychiatry*, 160: 657-666
- 6) Burke WJ, O'Malley KL, Chung HD, et al (1991) Effect of pre- and postmortem variables on specific mRNA levels in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 11 : 37-41
- 7) Chevreva I, Faull RL, Green CR, et al (2008) Assessing RNA quality in postmortem human brain tissue. *Exp Mol Pathol*, 84 : 71-77
- 8) 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
- 9) Ervin JF, Heinzen EL, Cronin KD, et al (2007) Postmortem delay has minimal effect on brain RNA integrity. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66 : 1093-1099
- 10) Halim ND, Lipska BK, Hyde TM, et al (2008) Increased lactate levels and reduced pH in post-mortem brains of schizophrenics : medication confounds. *J Neurosci Methods*, 169 : 208-213
- 11) Hardy JA, Wester P, Winblad B, et al (1985) The patients dying after long terminal phase have acidotic brains; implications for biochemical measurements on autopsy tissue. *J Neural Transm*, 61 : 253-264
- 12) Harrison PJ, Heath PR, Eastwood SL, et al (1995) The relative importance of premortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies : selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neurosci Lett*, 200 : 151-154
- 13) Hashimoto K, Sawa A, Iyo M (2007) Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry*, 62 : 1310-1316
- 14) Hemby SE, Ginsberg SD, Brunk B, et al (2002) Gene expression profile for schizophrenia : discrete neuron transcription patterns in the entorhinal cortex. *Arch Gen Psychiatry*, 59 : 631-640
- 15) Hynd MR, Lewohl JM, Scott HL, et al (2003) Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. *J Neurochem*, 85 : 543-562
- 16) Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2005) Altered expression of mitochondria-related genes in post-mortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet*, 14 : 241-253
- 17) Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, et al (2006) Expression of ribosomal subunit genes increased coordinately with postmortem interval in human brain. *Mol Psychiatry*, 11 : 1067-1069
- 18) Kingsbury AE, Foster OJ, Nisbet AP, et al (1995) Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 28 : 311-318
- 19) Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, et al (2004) Systematic changes in gene expression in post-mortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum Mol*

- Genet, 13 : 609-616
- 20) 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
 - 21) Miller MT, Sleight J, Rawlinson F, et al (1990) Amoxapine overdose : recovery after severe metabolic acidosis (pH 6.69) and status epilepticus. *Anaesth Intensive Care*, 18 : 246-248
 - 22) Miller P, Peers C, Kemp PJ (2004) Polymodal regulation of hTREK1 by pH, arachidonic acid, and hypoxia : physiological impact in acidosis and alkalosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286 : C272-282
 - 23) Morrison-Bogorad M, Zimmerman AL, Pardue S (1995) Heat-shock 70 messenger RNA levels in human brain : correlation with agonal fever. *J Neurochem*, 64 : 235-246
 - 24) Pardue S, Zimmerman AL, Morrison-Bogorad M (1994) Selective postmortem degradation of inducible heat shock protein 70 (hsp70) mRNAs in rat brain. *Cell Mol Neurobiol*, 14 : 341-357
 - 25) Paschen W, Djuricic B, Mies G, et al (1987) Lactate and pH in the brain : association and dissociation in different pathophysiological states. *J Neurochem*, 48 : 154-159
 - 26) Popova T, Mennerich D, Weith A, et al (2008) Effect of RNA quality on transcript intensity levels in microarray analysis of human post-mortem brain tissues. *BMC Genomics*, 9 : 91
 - 27) Ravid R, Van Zwieten EJ, Swaab DF (1992) Brain banking and the human hypothalamus-factors to match for, pitfalls and potentials. *Prog Brain Res*, 93 : 83-95
 - 28) Ryan MM, Huffaker SJ, Webster MJ, et al (2004) Application and optimization of microarray technologies for human postmortem brain studies. *Biol Psychiatry*, 55 : 329-336
 - 29) 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
 - 30) Spokes EG, Garrett NJ, Iversen LL (1979) Differential effects of agonal status on measurements of GABA and glutamate decarboxylase in human post-mortem brain tissue from control and Huntington's chorea subjects. *J Neurochem*, 33 : 773-778
 - 31) Stan AD, Ghose S, Gao XM, et al (2006) Human postmortem tissue : what quality markers matter? *Brain Res*, 1123 : 1-11
 - 32) 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
 - 33) Vawter MP, Evans S, Choudary P, et al (2004) Gender-specific gene expression in post-mortem human brain : localization to sex chromosomes. *Neuropsychopharmacology*, 29 : 373-384
 - 34) 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
 - 35) Yates CM, Butterworth J, Tennant MC, et al (1990) Enzyme activities in relation to pH and lactate in postmortem brain in Alzheimer-type and other dementias. *J Neurochem*, 55 : 1624-1630

気分障害の網羅的遺伝子発現解析

Comprehensive gene expression analysis into mood disorder



富田 博秋

Hiroaki TOMITA

東北大学大学院医学系研究科精神・神経生物学分野

◎気分障害の成因を解明するうえで、近年急速に発達を遂げたマイクロアレイをはじめとする網羅的遺伝子発現解析技術を用いて双極性障害、大うつ病性障害罹患者や健常対照者の死後脳組織の遺伝子発現を解析することは有効かつ必須のアプローチと考えられ、これまでに複数の研究グループが解析結果の報告を行ってきた。一方、脳機能や精神活動と密接に関連する各種免疫細胞を含み、脳内細胞と発現調節領域を含めて同一の塩基配列のゲノム DNA を有する末梢血は死後脳組織に比べて採取を行いやすく、同一罹患者の病相、病状の違いによる遺伝子発現変化の評価も可能であることから、罹患者や健常人から採取した末梢血全血や血液中のリンパ球などを対象とする網羅的遺伝子発現解析も試みられてきている。本稿では気分障害成因解明に向けての死後脳組織、末梢血などを対象とする網羅的遺伝子発現解析のこれまでの成果と今後の課題・展望について検討を行う。



Key Word : 双極性障害, 大うつ病, 死後脳, 免疫細胞, マイクロアレイ

気分障害とは顕著な気分の変動を中心症状とする疾患を総称し、うつ病相と躁病相の両方を呈する双極性障害と、うつ病相のみを呈する大うつ病性障害はその中核となる疾患である。ゲノムの塩基配列情報は脳組織特異的に mRNA へと転写され、さらに蛋白質に翻訳され、翻訳後修飾を受け、他の分子と相互作用することではじめて脳・精神機能に影響を及ぼすものであり、死後脳組織の網羅的遺伝子発現解析は精神疾患の病態解明には必須のアプローチである。一方、脳機能や精神活動と密接に関連する各種免疫細胞を含み、脳内細胞と発現調節領域を含めて同一の塩基配列のゲノム DNA を有する末梢血由来の細胞を対象とする網羅的遺伝子発現解析も、精神疾患成因解明において有効なアプローチとなりうる(図 1)。

本稿では、気分障害の病態解明に向けた死後脳と末梢血などを対象とする網羅的遺伝子発現解析研究のこれまでの成果と今後の課題・展望につい

て検討したい。

死後脳における遺伝子発現研究

死後脳を対象とする双極性障害と大うつ病性障害の網羅的遺伝子発現研究の、これまでの成果と今後の課題を下記に概説する。

1. 双極性障害

双極性障害の死後脳では MAG, ERBB, TF, PLP1, MOG, MOBP, MOG などの、ミエリンを形成するオリゴデンドロサイトに関連する遺伝子発現が低下しており、この知見は統合失調症や大うつ病性障害罹患者の脳にも共通した現象として観察されている¹⁻³⁾。また、双極性障害ではミトコンドリア機能⁴⁻⁸⁾、受容体・チャネル^{9,10)}、ストレス・免疫反応^{9,10)}、シャペロン機能⁹⁾、ユビキチン系¹⁰⁾、糖代謝^{6,11)}に関連する遺伝子発現変化が報告されている。これまでに報告のある双極性障害の死後脳研究の多くは、スタンレー脳バンクが世界

の研究施設に供給した死後脳を解析したものである。スタンレー脳バンクの双極性障害死後脳に基づく12の研究の生データを統合したメタ解析が行われており、酸化リン酸化、ユビキチン系、RNA スプライシング、細胞内蛋白輸送、熱ショック蛋白質、主要組織適合遺伝子複合体クラスII受容体活性、メタロチオネインという遺伝子カテゴリが双極性障害罹患者の脳で顕著に発現調節を受けていることや、個別の遺伝子としてPENK, GRK3, BDNF, HSPA5, LARS2, APO-L, HINT1, UBE2N, RELNなどの発現が低下していることが報告されている¹²⁾。このほか、双極性障害の自殺既遂者とそれ以外の死因による死亡者との比較でPLSCR4, EMX2の発現量に差があるとする報告¹³⁾や、双極性障害、大うつ病性障害を含めた精神疾患罹患者脳組織では、神経細胞周囲のオリゴデンドロサイト数やカルビンディン陽性介在神経密度の減少と、神経発達やアポトーシスに関連した遺伝子の発現量が相関するという報告がなされている¹⁴⁾。

2. 大うつ病障害

大うつ病性障害を対象とする死後脳マイクロアレイ解析研究は、著者が運営に参加したアメリカのカリフォルニア大学アーバイン校脳バンクのほか、前述のスタンレー財団、エール大学、コロンビア大学、カナダのマギル大学などの脳バンクで集積された死後脳を対象として行われている。著者らのグループは、大うつ病性障害罹患者の前頭前野、前帯状回などのアレイ解析を行い、GABA神経伝達^{15,16)}、グルタミン酸神経伝達¹⁵⁾、線維芽細胞成長因子システム¹⁷⁾、G蛋白結合受容体信号伝達システム(投稿中)に関連する遺伝子発現の顕著な変化を観察した。このほか、これまでにミエリン¹⁸⁾、ポリアミン代謝^{19,20)}、細胞増殖^{14,17,21)}、細胞代謝^{14,16)}、ストレス反応²²⁾、転写^{16,22)}に関する遺伝子群が大うつ病性障害、または大うつ病性障害に伴う自殺の影響により発現変化を受ける遺伝子群として報告されている。大うつ病性障害の病態特異的な発現変化として報告される遺伝子群が双極性障害以上に論文ごとに異なる傾向にあるのは、本質的に大うつ病性障害の成因の異質性が高いと考えられること、準拠する脳バンクの数が多

いことなども要因として考えられるが、かならずしもデータそのものの再現性が低いことを意味するものではなく、ただ単にデータ解析や論文化する際の焦点の当て方が異なる面もあると考えられる。

3. 死後脳研究の今後の課題

死後脳研究には、罹患者の病型、病歴、死亡時の病勢、合併症などの多様性に加え、罹患者、健常人ともに共通する問題として喫煙、飲酒、薬剤服用歴、死亡時の年齢、死亡時の状況、死後の脳の摘出・保管状況の多様性などの問題が大きいものに対し、各脳バンクで集積しうる症例数の数が現在までのところ少ないことから、今後、交絡因子に関する詳細な情報とともに、より多くの死後脳の集積を可能にする脳バンク制度の充実を急ぐ必要がある^{23,24)}。また、これまでの死後脳研究は、おもに欧米の脳バンクで集積された白人からの死後脳提供によるものが多く、アジア人、日本人との遺伝学的バックグラウンドの相違を考えると日本独自の脳バンク制度の整備が望まれる。技術的にも今後、次世代シーケンサーが普及し、より詳細かつ多様な遺伝子転写制御にかかわる現象の評価が可能になることが期待される。また脳は、さまざまな種類の神経細胞やグリア細胞の複合体であるが、これまでの研究の多くは組織ブロックから抽出されたRNAを解析しており、組織ブロックにおける細胞種の混合比率のばらつきに起因する偽陽性や特定の細胞種で起こっている重要な変化が他の細胞種の現象に埋もれて検出されないなどの可能性があり、細胞種特異的現象の評価は今後の課題となる。

末梢血などにおける遺伝子発現研究

死後脳研究に比べて末梢血は採取が行いやすく、また、同一の罹患者から複数の時点で採血を行うことで病相の影響を直接観察することが可能であることからも有用な研究の対象となる。血液の遺伝子発現解析が精神疾患の病態解明に有用である可能性として、①脳細胞と血液細胞のゲノム塩基配列は、プロモーターなどの遺伝子発現調節にかかわる領域も含めてほぼ同一であることから、遺伝子発現調節にもある程度相関があると考え

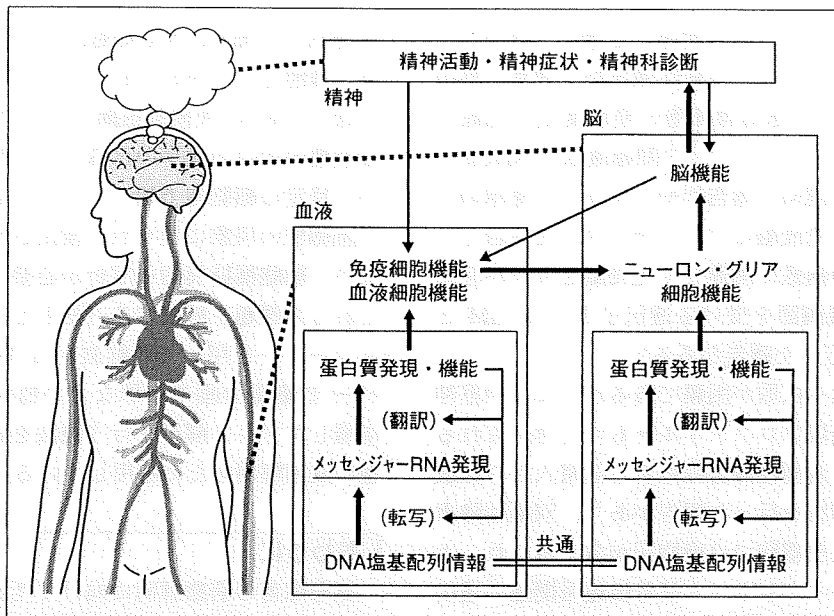


図1 精神疾患を対象とした死後脳組織および末梢血細胞の網羅的遺伝子発現解析の意義

脳機能や精神活動と各種免疫細胞の機能は密接に相関し、また、脳内細胞と末梢血細胞は発現調節領域を含めてほぼ同一塩基配列のゲノムDNAを有する。精神疾患の成因解明には、死後脳組織を解析することにより生前脳内で精神疾患の病態特異的に起こった分子遺伝学的現象を特定するアプローチと、末梢血細胞を解析することで疾患罹患感受性にかかわる素因や病相・病状に関連して起こる分子遺伝学的現象を特定するアプローチが、ともに有効と考えられる。

えられる。②脳と末梢組織はある程度同様にストレス、ホルモン、神経調節因子などの曝露を受けると考えられる。③モノアミン、サイトカイン等、共通の分子が脳内と末梢細胞で重要な働きをもち、末梢の現象が脳の現象と相関することが報告されている。④神経精神免疫相関、すなわち精神活動から免疫細胞への影響、免疫細胞から脳活動への影響がある、などのことが考えられる(図1)。血液などを対象とする気分障害の網羅的遺伝子発現研究のこれまでの成果と今後の課題を下記に概説する。

1. 双極性障害

双極性障害における末梢血由来細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った研究として統合失調症、双極性障害と健常人の全血をアレイ解析し、APOBEC3B, ADSS, ATM, CLC, CTBP1, DATF1, CXCL1, S100A9の8つの遺伝子発現パターンにより統合失調症と双極性障害とを識別できる可能性を示唆する報告や²⁵⁾、躁・うつ病相が短期間のうちに交代する急

速交代型双極性障害罹患者の躁病相時とうつ病相時に複数回採血して単核球層をアレイ解析し、うつ病相時にプロスタグランジン関連遺伝子 PTGDS と AKRIC3 の発現の上昇を認めた報告がある²⁶⁾。また、双極性障害罹患者と健常人由来のリンパ球を5日間低糖条件下での培養前後でアレイ解析を行い、低糖培養後のリンパ球中のミトコンドリア電子伝達系遺伝子発現は健常人では上昇するのに対し、罹患患者では低下するという報告もある²⁷⁾。

双極性障害罹患に関して不一致(1人が双極性障害に罹患し、もう1人が健常)である一卵性双生児同胞から樹立したBリンパ芽球培養細胞のアレイ解析を行い XBP1 などの発現変化を報告した研究は注目を集め²⁸⁾、その後、XBP1の機能解析や双極性障害との相関研究など、さまざまな方向からの研究が行われている²⁹⁻³²⁾。一方、別のグループが同様に双極性障害罹患に関して不一致の一卵性双生児のBリンパ芽球のアレイ解析を行った研究では XBP1 の発現変化は追認できず、WNTシ

グナルやアポトーシスに関連する遺伝子発現が上昇していた³³⁾。また、双極性障害群と健常人群由来の B リンパ芽球培養細胞の発現変化を比較した研究としてミトコンドリア関連遺伝子 NDUFB2 の発現変化を認めた報告³⁴⁾や、B リンパ芽球のアレイデータと死後脳のアレイデータとを統合し、双極性障害の病態に関連して死後脳とリンパ芽球で共通に発現調節を受ける遺伝子として LIM と HSPF1 を特定した報告がある⁹⁾。

末梢血に比べ採取が困難であるが、より中枢神経系に近い発現プロファイルをもつと考えられる嗅上皮細胞を双極性障害罹患者と健常人から採取してアレイ解析を行った報告があり、双極性障害罹患者の嗅上皮細胞では細胞死が多くみられ、ホスファチジルイノシトール信号伝達系関連の遺伝子発現の発現変化が認められている³⁵⁾。

2. 大うつ病障害

大うつ病性障害の末梢血を対象とする網羅的遺伝子発現解析研究はこれまでのところ少なく、抑うつ状態の罹患者のリンパ球にセロトニン・ノルアドレナリン再取込み阻害剤である抗うつ剤ベンラファキシンを投与したものと非投与の細胞をアレイ解析し、イオンホメオスタシス、細胞生存、神経可塑性、信号伝達などに関する遺伝子発現を観察した報告や³⁶⁾、大うつ病性障害罹患者と健常人の血液を多数のストレス関連遺伝子に特異的なプローブを載せたカスタムアレイで解析し、十数種の遺伝子の発現変化を観察したとする報告³⁷⁾などがある程度である。

3. 末梢血研究の今後の課題

気分障害の成因解明のための末梢血を対象とする網羅的発現解析研究は端緒についたところで、現在のところ再現性の高い知見が得られるに至っていない。これまで末梢血を対象として行われている研究は、新鮮血からの全血、単核球層、またはリンパ球を対象とするものか、B リンパ芽球培養細胞を対象とするものである。B リンパ芽球培養細胞は EB ウイルスがホストのゲノム DNA に挿入されることでリンパ球を株化細胞に形質転換させるが、この工程がランダムに発現調節に影響を及ぼす可能性が考えられる。新鮮血の場合、全血、単核球層はいうに及ばず、リンパ球にしても

B 細胞、T 細胞、NK 細胞、さらにさまざまな性格・機能をもつそれぞれのサブクラスの免疫細胞を含んでおり、死後脳組織ブロックの解析と同様、細胞種の混合の比率のばらつきに起因する偽陽性や、特定の細胞種で起こっている重要な変化が他の細胞種の現象に埋もれて検出されない可能性があり、細胞種特異的な解析が必要と考えられる。これらの課題を解決する方法として著者らは、セルソーターを用いて新鮮血から Th1 や Th2 ヘルパー T 細胞分画や単球などの特定の免疫細胞を単離してアレイ解析を行う技法を確立し、精神疾患の成因解明のため応用している。

おわりに

気分障害の病態解明に向けて死後脳、末梢血を対象にした網羅的遺伝子発現解析研究が複数の研究グループで行われ一定の成果は上がっているが、今後の課題は多い。死後脳研究に関しては、今後より多くの検体を用いて、より有効に交絡因子を考慮に入れた解析を行うことを可能にするような研究体制の拡充が望まれる。欧米の既存の脳バンクは症例数の集積に向けて活発に活動しており、さらにあらたな脳バンクが欧米やアジア諸国で新設されてきている。日本でも死後脳バンク体制構築の必要性についての認識が広まり、日本生物学的精神医学会にブレインバンク設立委員会が設けられるなど、複数の施設で連携して倫理的にも技術的にも信頼に足る死後脳バンクの制度を構築する準備が進んできており、今後のわが国における死後脳研究の発展が期待される。末梢血を対象とする精神疾患の分子遺伝学的研究もまだ端緒についたところで、今後より多くの症例を対象に細胞種や表現型を絞り込んだ研究がなされることで、有益な知見が集積されることが期待される。

文献

- 1) Tkachev, D. et al. : *Lancet*, **362** : 798-805, 2003.
- 2) Sokolov, B. P. : *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **10** : 547-555, 2007.
- 3) MacDonald, M. L. et al. : *Bipolar Disord.*, **8** : 255-264, 2006.
- 4) Iwamoto, K. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **14** : 241-253, 2005.
- 5) Quiroz, J. A. et al. : *Neuropsychopharmacology*, **33** :