

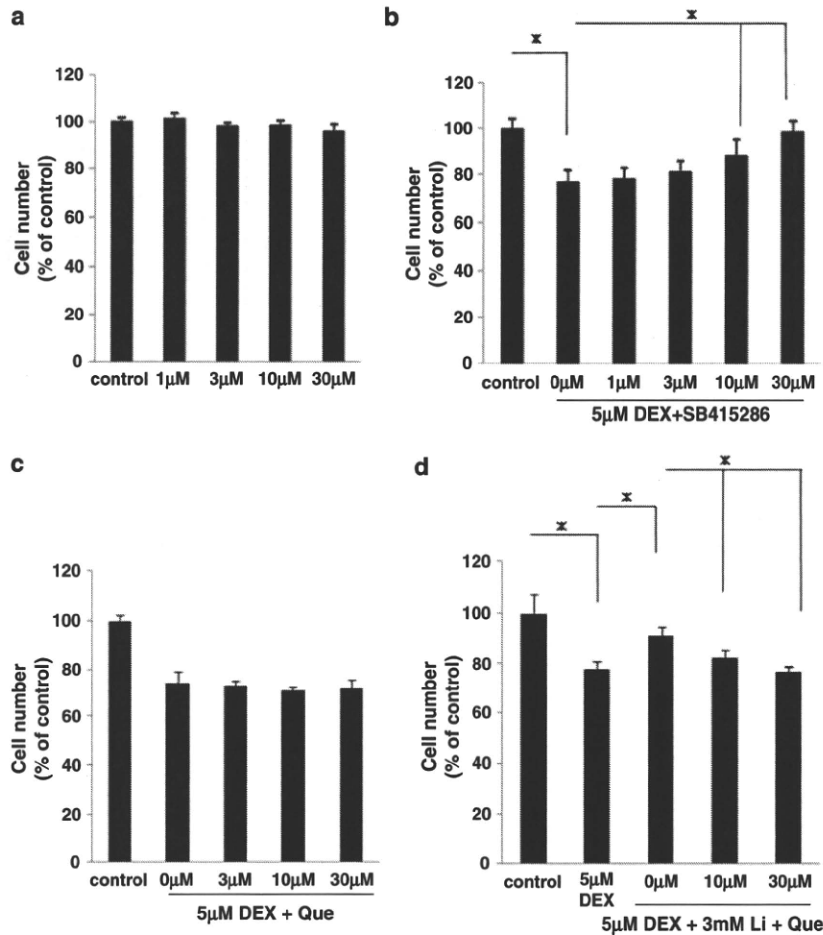


Figure 4 The involvement of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and β -catenin/TCF pathway in the reciprocal actions between dexamethasone (DEX) and lithium (Li) on adult rat dentate gyrus-derived neural precursor cell (ADP) proliferation. (a) SB415286 had no effect on ADP proliferation in the absence of DEX. Alamar Blue assay was performed 3 days after the treatment. Data are shown as the means $\pm$ SEM of four independent cultures. (b) SB415286 recovered DEX-decreased ADP proliferation. Alamar Blue assay was performed 3 days after the treatment. Data are shown as the means $\pm$ SEM of four independent cultures. $p < 0.05$, compared with control or 0 μ M. (c) Quercetin (Que) had no effect on ADP proliferation in the absence of Li. Alamar Blue assay was performed 3 days after the treatment. Data are the means $\pm$ SEM of four independent cultures. (d) Que abolished the recovery effect of Li on DEX-decreased ADP proliferation. Alamar Blue assay was performed 3 days after the treatment. Data are shown as the means $\pm$ SEM of four independent cultures. $*p < 0.05$, compared with control, 5 μ M DEX or 0 μ M.

phosphorylated residues; Ser⁹ to render it inactive (Cross *et al*, 1995) and Tyr²¹⁶ to render it active (Hughes *et al*, 1993). Moreover, Li works as an inhibitor of GSK-3 β through the direct inhibition of its catalyzed reaction (Klein and Melton, 1996; Stambolic *et al*, 1996). Therefore, we investigated whether DEX and Li affect the expression of GSK-3 β and the phosphorylation of these residues. Cells were treated with DEX and/or Li for 3 days, and western blotting was performed. Ser⁹ is well phosphorylated, but Tyr²¹⁶ is little in the control condition (Figure 7a). DEX increased the phosphorylation of Tyr²¹⁶ remarkably, but it had no effect on the expression of GSK-3 β and the phosphorylation of Ser⁹ (Figure 7a and b). Conversely, the treatment of Li alone or those of DEX and Li had no effect on all of them (data not shown). Taken together, these results suggested that DEX might decrease ADP proliferation by increasing the phosphorylation of Tyr²¹⁶ on GSK-3 β and that Li might recover ADP proliferation, decreased by DEX through the direct inhibition of its

catalyzed reaction, not changing the phosphorylation of Tyr²¹⁶ on it.

DISCUSSION

Here we have established the culture system of ADP. ADP is carefully isolated from the dissected DG of adult rats to exclude any subependymal tissues, grows at monolayers in the described condition, and can be passaged 10–11 times with the same character. ADP expresses nestin, GFAP, SOX2, and BLBP, but not DCX and Prox1. In addition, ADP has proliferation potency and multipotency. Some culture systems of neural precursor cells derived from the adult rodent hippocampus have already been reported (Palmer *et al*, 1997, 1999; Seaberg and van der Kooy, 2002; Bull and Bartlett, 2005; Babu *et al*, 2007). Our culture system is based on them, but is different in some ways as shown below. Both Seaberg's and Bull's culture systems are derived from mouse

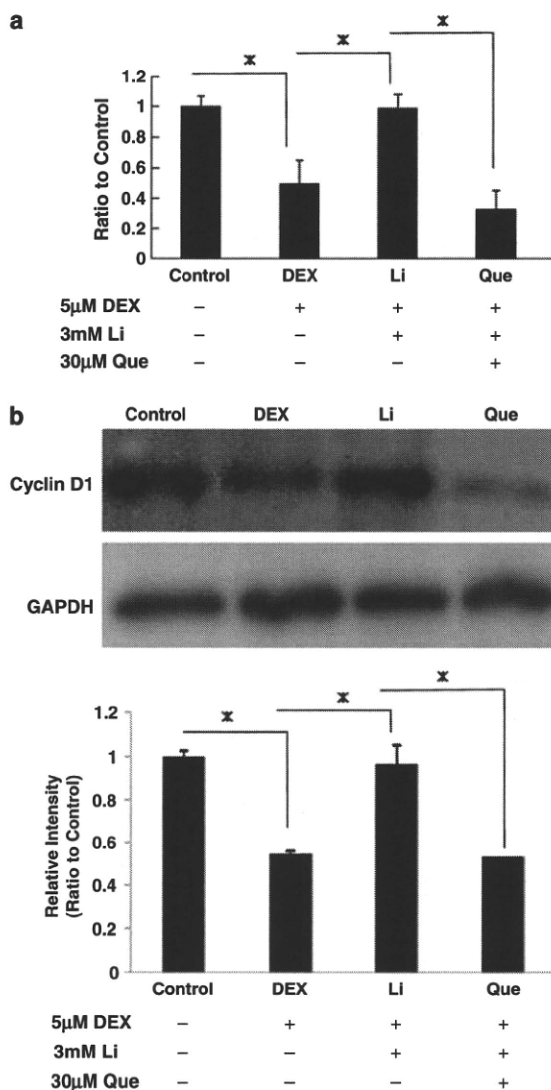


Figure 5 Cyclin D1 expression is reciprocally regulated by dexamethasone (DEX) and lithium (Li) through the β -catenin/TCF pathway. (a) DEX decreased mRNA expression of cyclin D1, Li recovered it, and Que abolished the recovery effect of Li. Cells were treated with 5 μ M DEX, 3 mM Li, and/or 30 μ M Que. After 3 days, RNA isolation and quantitative RT-PCR were performed. Values are shown as the ratio of cyclin D1 mRNA vs glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA. Data are shown as the means $\pm$ SEM of three independent samples. * p < 0.05, compared with control, DEX, or Li. (b) DEX decreased protein expression of cyclin D1, Li recovered it, and Que abolished the recovery effect of Li. Cells were treated with 5 μ M DEX, 3 mM Li, and/or 30 μ M Que. After 3 days, nuclear proteins were prepared, 20 μ g of them was loaded into each lane, and western blotting was performed. Pictures are shown from a typical experiment that was repeated three times. Data are shown as the means $\pm$ SEM of three independent cultures. * p < 0.05, compared with control, DEX, or Li.

DG, but their culture conditions differ from ours. Babu's culture system is relatively close to ours, but it is derived from mouse DG and can be passaged many more times than ours. In addition, the properties of adult mouse-derived neural precursor cells may be different from those of adult rat-derived ones (Ray and Gage, 2005). Meanwhile, Palmer's

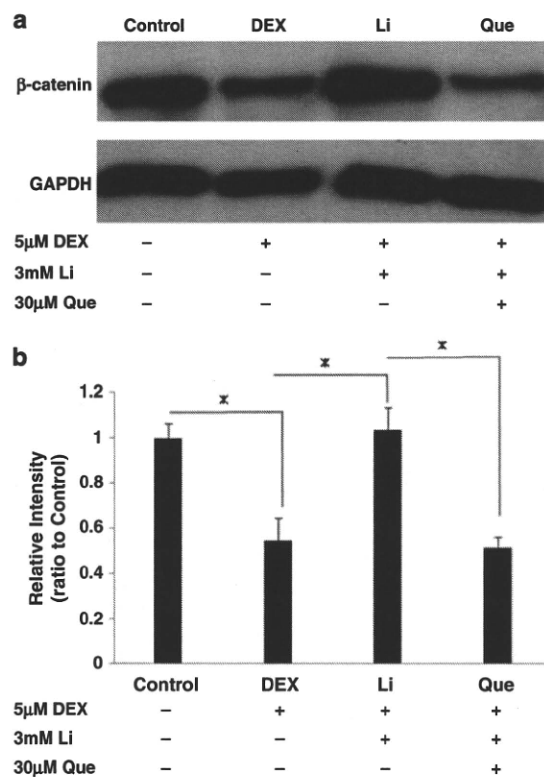


Figure 6 Nuclear translocation of β -catenin is reciprocally regulated by dexamethasone (DEX) and lithium (Li). (a, b) DEX decreased nuclear β -catenin, Li recovered it, and Que abolished the recovery effect of Li. Cells were treated with 5 μ M DEX, 3 mM Li, and/or 30 μ M Que. After 3 days, nuclear proteins were prepared, 20 μ g of them was loaded into each lane, and western blotting was performed. In (a), pictures are shown from a typical experiment that was repeated three times. In (b), data are shown as the means $\pm$ SEM of three independent cultures. * p < 0.05, compared with control, DEX, or Li.

culture system is derived from rat entire hippocampus, but not dissected DG.

Four differentiation stages of precursor cells, including stem and progenitor cells, have been proposed in adult rodent hippocampus *in vivo* (Seri et al, 2001; Fukuda et al, 2003; Kempermann et al, 2004; Steiner et al, 2006): Cells in the first stage (type-1 cells) express nestin, GFAP, SOX2, and BLBP. Cells in the second stage (type-2a cells) express nestin, SOX2, and BLBP. The expression of GFAP in this stage is vague. Cells in the third stage (type-2b cells) express nestin, DCX, and Prox1, but not GFAP and SOX2 (Kempermann, 2006; Gage et al, 2008). Therefore, the expression pattern of markers on ADPs corresponds to type 1 cell or type 2a cell *in vivo*. The shape of ADP is different from that of type 1 cell, with an elongated and blanced shape, and is similar to that of type 2a cell with a flat and round shape (Kempermann et al, 2004). The proliferation potency of ADP is limited; that of type 1 cell is probably unlimited, and that of type 2a cell is limited (Kempermann et al, 2004). Taken together, ADP could possible be type2a cells. It is poorly understood which stage of neural precursor cells contributes to the reactivity of drugs to neurogenesis. However, a recent study indicated that type 2a-like cells might be a target of fluoxetine, which is an

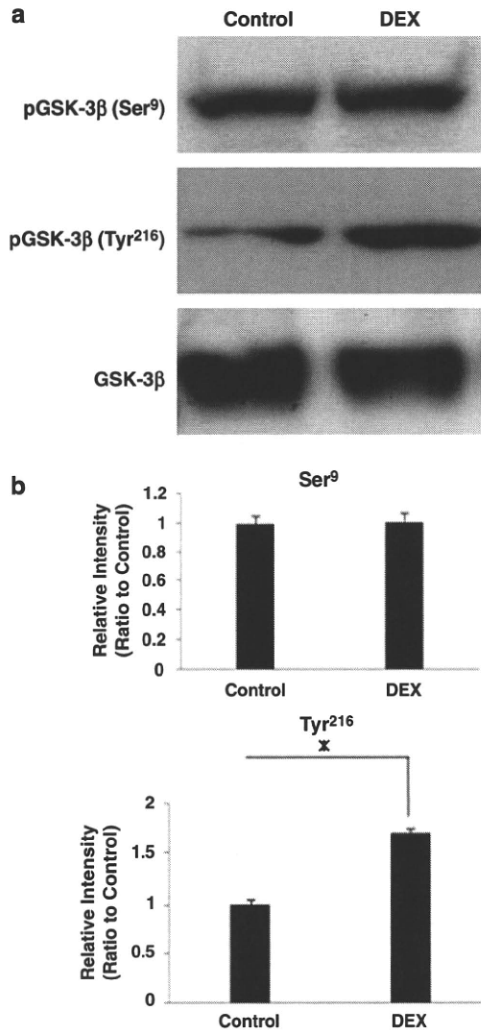


Figure 7 Effects of dexamethasone (DEX) on two phosphorylated residues: Ser⁹ and Tyr²¹⁶ of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). (a, b) DEX increased the phosphorylation of Tyr²¹⁶, not but Ser⁹ of GSK-3 β . Cells were treated with 5 μ M DEX. After 3 days, 20 μ g of cell lysates were loaded into each lane and western blotting was performed. In (a), pictures are shown from a typical experiment that was repeated three times. In (b), data are shown as the means $\pm$ SEM of three independent cultures. * $p < 0.05$, compared with control.

antidepressant and can increase adult neurogenesis in DG (Encinas *et al*, 2006). Therefore, it might be beneficial to examine the reactivity of type 2a cells to various drugs and ADPs could be a good model for type2a cells.

Some studies have shown that Li increases adult neurogenesis in DG of rodents *in vivo* (Chen *et al*, 2000; Son *et al*, 2003; Kim JS *et al*, 2004). In addition, it has been shown that Li directly increases neural precursor cells derived from the embryo (Kim JS *et al*, 2004) and adult entire hippocampus (Wexler *et al*, 2008). However, it remains unclear whether Li directly affects the proliferation of neural precursor cells in DG of adult rodents. To elucidate it, we investigated the effect of Li on ADP proliferation. Although Li had no effect on ADP proliferation in the absence of DEX, Li recovered the ADP proliferation decreased by DEX to the control level.

Interestingly, these findings are different from Wexler's results in spite of the closeness of the source of cells. The discrepancy might be due to the difference of the source and character of cells as well as culture condition. We have no answer regarding which culture condition and reactivity to Li is closer to those of *in vivo* neural precursor cells in adult DG, and further investigation to answer this question might lead to a further understanding of their character, including the reactivity to various drugs.

It has been shown that the activation of β -catenin/TCF pathway leads to increasing cyclin D1 expression in tumor-derived cell lines (Tetsu and McCormick, 1999; Shtutman *et al*, 1999). In this study, we found that both cyclin D1 expression and the protein level of nuclear β -catenin are reciprocally regulated by DEX and Li as well as ADP proliferation. These results suggest the involvement of β -catenin/TCF pathway in the reciprocal effects between DEX and Li on ADP proliferation. β -Catenin/TCF pathway is also well known as the canonical Wnt pathway. It has already been shown that the canonical Wnt pathway regulates the proliferation of embryo-derived neural precursor cells *in vitro* (Hirsch *et al*, 2007) and adult hippocampal neurogenesis *in vivo* (Lie *et al*, 2005). However, Lie *et al* showed that the canonical Wnt pathway regulates the proliferation of DCX-positive and elongated cells, which may correspond to type 3 cells and are in the late differentiation stages of neural precursor cells (Kempermann, 2006; Gage *et al*, 2008). Therefore, our present study is the first report to indicate the involvement of β -catenin/TCF pathway in the proliferation of hippocampal neural precursor cells in the early differentiation stages.

Moreover, we first clarified the involvement of glucocorticoids in β -catenin/TCF pathway in adult DG-derived neural precursor cells. There is the possibility that GR directly represses the transcription of cyclin D1 because GR is a transcription factor that can promote or repress the transcription of various genes through direct binding to their promoters (Schoneveld *et al*, 2004). Our results do not exclude this possibility, and this direct mechanism could regulate ADP proliferation in cooperation with β -catenin/TCF pathway.

We found that DEX significantly increases the phosphorylation of Tyr²¹⁶ and has no effect on the phosphorylation of Ser⁹ on GSK-3 β . These results suggest that DEX might negatively regulate β -catenin/TCF pathway through the phosphorylation of Tyr²¹⁶ on GSK-3 β . Although it has been shown that glucocorticoids negatively regulate cell proliferation through decreasing the phosphorylation of Ser⁹ in osteoblasts (Smith *et al*, 2002), nothing else is known about the effects of glucocorticoids on the phosphorylation states of GSK-3 β . Therefore, our present study is the first report to indicate the effects of glucocorticoids on the phosphorylation of Tyr²¹⁶ on GSK-3 β .

GSK-3 is well known to be encoded by two different genes, GSK-3 β and GSK-3 α (Frame and Cohen, 2001; Grimes and Jope, 2001). As most studies of the function of GSK-3 activity in neurogenesis and cell proliferation have focused on the more abundant GSK-3 β , our present study also focused on GSK-3 β . However, some studies have highlighted a role for GSK-3 α in neuronal disease (Phiel *et al*, 2003). In addition, both Li and SB415286 can inhibit not only GSK-3 β but also GSK-3 α . Therefore, the limitation of

our present study is that it does not exclude the involvement of GSK-3 α .

We have shown that DEX and Li reciprocally regulate ADP proliferation through GSK-3 β and β -catenin/TCF pathway; DEX activates GSK-3 β through the phosphorylation of Tyr²¹⁶; GSK-3 β activated by DEX inhibits β -catenin/TCF pathway, and Li recovers it through inhibiting GSK-3 β activated by DEX. However, it remains unclear how DEX increases the phosphorylation of Tyr²¹⁶ on GSK-3 β . To elucidate it might lead to a further understanding of stress mechanism and the development of new therapeutic targets for psychiatric disorders.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by Grant-in-aid no.18591269 for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan. We thank M Kihara for her expert technical assistance and K Suzuki, T Tanaka, T Masui, and H Toda for their helpful critique.

DISCLOSURE/CONFLICTS OF INTEREST

All the authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997). β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16: 3797–3804.
- Ahmed SA, Gogal Jr RM, Walsh JE (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170: 211–224.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002). Neurogenesis in the adult subventricular zone. *J Neurosci* 22: 629–634.
- Atack JR, Broughton HB, Pollack SJ (1995). Inositol monophosphatase—a putative target for Li⁺ in the treatment of bipolar disorder. *Trends Neurosci* 18: 343–349.
- Babu H, Cheung G, Kettenmann H, Palmer TD, Kempermann G (2007). Enriched monolayer precursor cell cultures from microdissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. *PLoS ONE* 2: e388.
- Bull ND, Bartlett PF (2005). The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci* 25: 10815–10821.
- Cameron H, McKay RDG (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2: 894–897.
- Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK (2000). Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem* 75: 1729–1734.
- Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ et al (2000). Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 7: 793–803.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785–789.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351: 95–105.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 463–475.
- Encinas JM, Vahtokari A, Enikolopov G (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8233–8238.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA et al (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313–1317.
- Frame S, Cohen P (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359: 1–16.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003). Two distinct subpopulation of nestin positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23: 9357–9366.
- Gage FH (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433–1438.
- Gage FH, Kempermann G, Song H (2008). *Adult Neurogenesis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E (1997). Neurogenesis in dentate gyrus of adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17: 2492–2498.
- Grimes CA, Jope RS (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65: 391–426.
- Hirsch C, Campano LM, Wöhrle S, Hecht A (2007). Canonical Wnt signaling transiently stimulates proliferation and enhances neurogenesis in neonatal neural progenitor cultures. *Exp Cell Res* 313: 572–587.
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (1993). Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 12: 803–808.
- Jayatissa MN, Bisgaard C, Tingström A, Papp M, Wiborg O (2006). Hippocampal cytochrome correlates to escitalopram-mediated recovery in chronic mild stress rat model of depression. *Neuropsychopharmacology* 31: 2395–2404.
- Kempermann G (2006). *Adult Neurogenesis*. Oxford University Press: Oxford.
- Kempermann G, Chesler EJ, Lu L, Williams RW, Gage FH (2006). Natural variation and genetic covariance in the adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 780–785.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27: 447–452.
- Kim JB, Ju JY, Kim JH, Kim TY, Yang BH, Lee YS et al (2004). Dexamethasone inhibits proliferation of adult hippocampal neurogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Brain Res* 1027: 1–10.
- Kim JS, Chang MY, Yu IT, Kim JH, Lee SH, Lee YS et al (2004). Lithium selectively increases neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells both *in vitro* and *in vivo*. *J Neurochem* 89: 324–336.
- Klein PS, Melton DA (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8455–8459.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A et al (2005). Wnt signaling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437: 1370–1375.
- Malberg JE, Duman RS (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28: 1562–1571.
- Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z (1997). Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. *J Immunol Methods* 204: 205–208.
- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW (1997). Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of β -catenin. *J Biol Chem* 272: 24735–24738.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of adult CNS. *J Neurosci* 19: 8487–8497.

- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8: 389–404.
- Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH (2005). Quercetin, a potent inhibitor against β -catenin/TCF signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 227–234.
- Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 17: 879–886.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (2003). GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423: 435–439.
- Ray J, Gage FH (2005). Differential properties of adult rat and mouse brain-derived neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31: 560–573.
- Salic A, Lee E, Mayer L, Kirschner MW (2000). Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 5: 523–532.
- Schoneveld OJLM, Gaemers I, Lamers WH (2004). Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochim Biophys Acta* 1680: 114–128.
- Seaberg RM, van der Kooy D (2002). Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* 22: 1784–1793.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21: 7153–7160.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R et al (1999). The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5522–5527.
- Smith E, Coetzee GA, Frenkel B (2002). Glucocorticoids inhibit cell cycle progression in differentiating osteoblasts via glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem* 277: 18191–18197.
- Son H, Yu IT, Hwang SJ, Kim JS, Lee SH, Lee YS et al (2003). Lithium enhances long-term potentiation independently of hippocampal neurogenesis in the rat dentate gyrus. *J Neurochem* 85: 872–881.
- Sousa N, Almeida OF (2002). Corticosteroids: sculptors of hippocampal formation. *Rev Neurosci* 13: 59–84.
- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996). Lithium inhibits glycogen kinase synthase-3 activity and mimics wingless signaling in intact cells. *Curr Biol* 6: 1644–1668.
- Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54: 805–814.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Aging Res Rev* 4: 141–194.
- Tetsu O, McCormick F (1999). β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422–426.
- Wexler EM, Geschwind DH, Palmer TD (2008). Lithium regulates adult hippocampal progenitor development through canonical Wnt pathway activation. *Mol Psychiatry* 13: 285–292.



抗精神病薬とファルマコゲノミックス

上 野 修 一

Key Words

抗精神病薬, ファルマコゲノミックス, 薬物動態, 感受性

1 はじめに

抗精神病薬は、統合失調症などの精神障害に対して用いる、抗幻覚妄想作用、興奮抑制作用のある薬物を指し、子供から老人まで年齢を問わずに処方される一般的な薬物である。抗精神病薬のプロトタイプはchlorpromazineであり、そのドパミンD2受容体阻害作用が、抗精神病薬としての作用を持つ⁵²⁾と考えられ、これまでに多くの抗精神病薬が開発されてきた。しかしながら、抗精神病薬の効果には、個人差があり、そして、すべての個体が反応し改善するというわけでもない。たとえば、統合失調症の中で抗精神病薬に反応するものは、50%程度であるにすぎないと考えられている。1988年にKane¹⁹⁾らによって、clozapineが難治性の統合失調症を改善する作用が再度確認されて以後、抗精神病薬の作用には、D2受容体のみならず、他の系を介した作用が関わるとも考えられるようになってきた。この総説では、ファルマコゲノミックスを、抗精神病薬の投与から標的臓器である脳で効果を示すまでと考え、その効果、副

作用など、個人差を説明するものとして位置づけ、統合失調症への効果を中心に概説したいと思う。

2 ファルマコキネティクスとファルマコダイナミクス

図1に示すように、経口、非経口的に体内に取り込まれた薬物が、標的臓器で作用するまでには、体内での血液循環を介した系(pharmacokinetics; ファルマコキネティクス, 薬物動態)により血中濃度が決定され、標的臓器である脳に取り込まれ、その効果を発揮する(pharmacodynamics; ファルマコダイナミクス, 薬物感受性)。そのため、薬物の標的臓器での効果を検討するうえでは、まず、この双方を考えなくてはならない⁹⁾。

1. ファルマコキネティクス, 薬物動態

ファルマコキネティクス(pharmacokinetics; 薬物動態)は、経口のおよび静脈注射や筋肉注射など非経口的に体内に導入された薬物が、吸収、分布、排泄のサイクルにより決定される機構を指す。この薬物の体内分布には、著しい個人差があることが以前から知られている。た

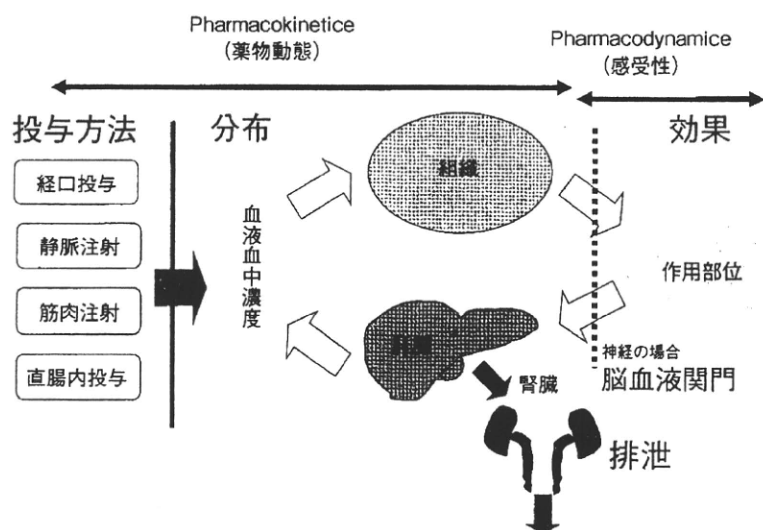


図1 ファルマコキネティクスとファルマコダイナミクス

体内に取り込まれた薬物は、体内を循環し、肝臓、腎臓で分解され排出されるが、この薬物動態は、ファルマコキネティクスと呼ばれ、薬物血中濃度として表れる。標的臓器の効果は、生体の機能を修飾し薬理作用を発現する過程、ファルマコダイナミクス（薬物感受性）として示されるが、抗精神病薬の作用においては、脳血液関門を通過したのちの中樞神経系の反応をみなければならない。

たとえば、抗精神病薬の投与では、肝臓、腎臓を中心とする排泄系の代謝の遅延による薬物血中濃度の上昇が、悪性症候群などの副作用と関わる可能性がある。抗精神病薬の代謝に関わる主な酵素は、肝臓に存在するチトクロームP450 (CYP450)系酵素であるが、この酵素は多くのよく似た酵素群から構成されており、さまざまな薬物の代謝に関わっている。そのなかでも分解酵素CYP2D6の機能性多型は、降圧薬デブリソキンの異常な血中濃度の上昇を伴う一群の解析からまず注目された。デブリソキンを遺伝的に分解できず異常な血中濃度の上昇を呈する低代謝群は、Poor Metabolizer (PM)と呼ばれ、遺伝的にデブリソキンの水酸化能が極めて低く、その形質は常染色体劣性に遺伝することが示され³³⁾、のちに、詳細に検討された^{34,49)}。多くの抗精神病薬は、CYP2D6で分解されるため、悪性症候群を起こした症例では、PMのため抗精神病薬の体内での薬物代謝がうまくいかず、異常な抗精神病薬血中濃度の上昇をきたし、その結果として、標的臓器である脳での障害をきたしやすい可能性がある。われわれは、CYP2D6遺伝子のPMをきたす機能性多型につ

いて解析し、CYP2D6の分解活性が悪性症候群の発症に直接関係しないことを報告した⁶¹⁾。この酵素活性の個人差と抗精神病薬の効果や副作用については、悪性症候群や錐体外路症状との有意な関連の報告^{20,22,51)}がある一方で、継続的に投与されている患者では効果や副作用発現とはあまり関係がないとする報告もあり⁴⁴⁾、まだ結論が出ていない。risperidoneやaripiprazoleは、主にCYP2D6で代謝されるが、olanzapineはCYP1A2, quetiapineはCYP3A4を主な代謝系としているため、異なったCYPの解析も必要である⁵⁵⁾。また、olanzapineなどの抗精神病薬の代謝には、グルクロン酸抱合も関与しており、それも検討すべきかもしれない。

2. 脳血液関門の通過性

中枢神経系には、脳血液関門(Blood Brain Barrier; BBB)と呼ばれる関所があり、薬物は選択的に移動する。もちろん、薬物勾配によって中枢神経系に作用する受動輸送もあるが、ほとんどの薬物は、能動輸送により脳に取り込まれるか、逆に、取り除く方向に輸送される。そのため、標的とする受容体での反応の前に、BBBの取り込みの個人差の影響を考える必要が

表1 ドパミン受容体の分布と性質

受容体	分布	GTP結合タンパク質	細胞内伝達系	中枢神経機能との 関連	疾患との関連
D1	線条体, 辺縁系, 大脳皮質	Gs	AC 活性化	精神病症状?	統合失調症で減少
D2	線条体, 辺縁系, 大脳皮質, 下垂体	Gi/o	AC 抑制	陽性症状, 陰性症状, 錐体外路出現, プロラクチン上昇	D2 親和性と抗精神病薬用量との相関
D3	大脳皮質, 側坐核	Gi/o	AC 抑制	精神病症状?	
D4	前頭葉, 中脳, 扁桃核	Gi/o	AC 抑制		clozapine 親和性高
D5	海馬, 視床	Gs	AC 活性化		

Gs:GTP 結合タンパク質刺激, Gi/o:GTP 結合タンパク質抑制。AC; アデニレートシクラーゼ, 薬理学的には D1 作用を持つ D1, D5 と D2 作用を持つ D2, D3, D4 にわかれる。

ある。

P-glycoprotein は、脳や腎臓、肝臓、腸などで薬物耐性に関わるとされるタンパク質であり、脳では、疎水性の高い薬物のBBBを通過しての脳への取り込みに関わるとされる。P-glycoprotein は、MDR1 遺伝子によりコードされており、quetiapine や risperidone などの非定型抗精神病薬は、特に P-glycoprotein に対して高親和性を示す。Nakagomi らは、プロラクチン量を中枢での risperidone の反応の指標として利用し、P-glycoprotein 阻害薬 verapamil を投与すると risperidone の取り込みが低下することを示し³⁹⁾、P-glycoprotein の発現変化が、抗精神病薬 risperidone の効果に影響する可能性を示唆した。このことから、MDR1 遺伝子の機能性多型は、抗精神病薬の脳内分布に影響するのではないかと想像されるが、risperidone の中枢神経系の作用には、MDR1 の機能性多型は直接影響しないことが同じグループから報告されている⁶⁴⁾。しかし、薬物反応と BBB との関連については、代謝産物の影響や、BBB でのトランスポーター、受容体を介した別のメカニズムの影響も考えられ、さらなる解析が必要である。

3 標的臓器、脳での抗精神病薬の作用

先程図1で説明したように、標的臓器である中枢神経系への効果に直接影響するのが、ファルマコダイナミクスである。中枢神経系に取り込まれた薬物の効果は、脳の奏効部位であるシナプス(図2)で最終的に決定される。1996年に risperidone が上市されて以降、平成21年6月現在、本邦では6種類の新規抗精神病薬を用いることができるようになったが、これらの薬物は、それ以前に発売された抗精神病薬と異なり、D2 受容体阻害に加え、5HT2A など他の受容体に対する阻害作用などの特徴を持っているため、非定型抗精神病薬、または、第二世代抗精神病薬と呼ばれる。それぞれの詳細な薬理学的特性は、別の総説を参照にしていきたい³⁸⁾が、新規抗精神病薬の開発の結果、ドパミン系以外を介した作用が、抗精神病薬の作用と関連している可能性がある。抗精神病薬の直接作用の差をゲノム医学と関連させ、ドパミン受容体を中心に概説する。

1. ドパミン受容体

ドパミン受容体には、薬理学的に D1 作用をもった D1 および D5 受容体と、D2 作用を持つ

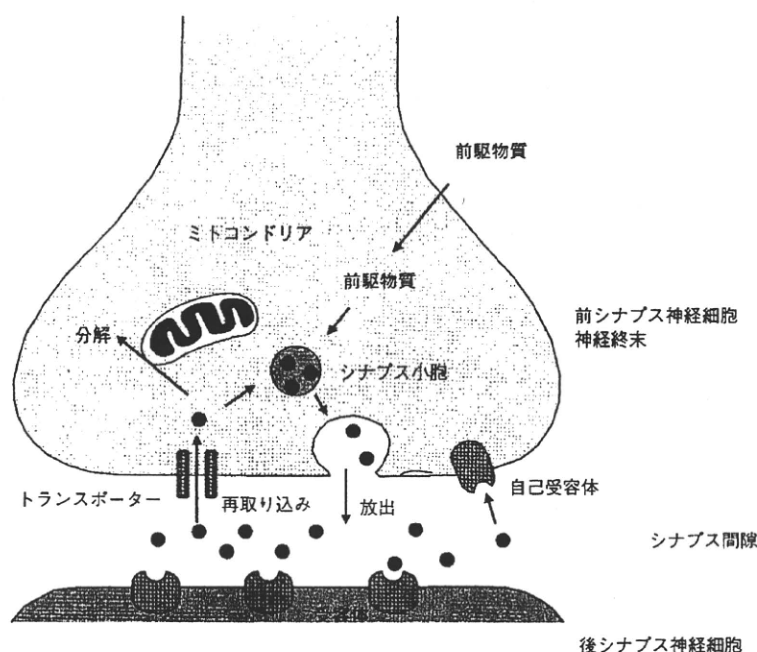


図2 シナプス構造

前駆物質が前シナプス神経細胞に取り込まれ、いくつかの過程を経て、神経伝達物質としてシナプス小胞に蓄えられる。神経伝達物質は電気的刺激によりシナプス間隙に放出されたのちに、後シナプスの受容体によって受け取られ、情報が伝達される。伝達が終了した神経伝達物質は、トランスポーターによって再取り込みされ、再利用されるか、分解される。シナプスでの神経伝達物質の量は自己受容体により調節されている。ファルマコゲノミックスには、このシナプスの神経伝達物質の合成、伝達、分解に関わる因子がすべて影響する可能性がある。

D2, D3, D4受容体に分けられる(表1)。ともにGタンパク質に結合した受容体であるが、D1およびD5受容体は、アデニレートシクラーゼ活性を上昇させ細胞内のcAMPを増加させる。一方、D2作用を持つ受容体はアデニレートシクラーゼ活性を低下させcAMPを抑制する。前述したように、抗精神病薬は、ドパミンD2受容体を阻害し、陽性症状を改善させる。しかしながら、その効果は、個人によって異なり、同じ薬物においても、個人差が問題となってくる。

a) *DRD1* (D1受容体遺伝子)

D1受容体は446のアミノ酸からなるGタンパク質結合受容体である。D1受容体遺伝子*DRD1*は、3つのグループから独立して報告された^{4,57,65)}。Potkinら⁴⁵⁾は、PET研究から、D1遺伝子多型Ddel多型とclozapineの効果について言及し、個人間での効果の差を明らかにしている。しかし、Hwangら¹⁷⁾は、一部の統合失調症では、D1受容体とclozapineとの治療反応と

の関連は確認できたものの、Potkinらと同一の多型については、関連は確認できなかったと報告しており、D1受容体の個人差が本当に治療反応と関連しているかどうかについては、まだ、十分な結論は出ていない。

b) *DRD2* (D2受容体遺伝子)

D2受容体は、報酬依存系に関わる中脳－大脳辺縁系のドパミンを仲介する後シナプス膜に存在するGタンパク質結合受容体で、その遺伝子*DRD2*は、11q23.1に位置している¹¹⁾。精神病薬の陽性症状への効果はD2の受容体を介しているため、機能的な多型と薬物効果との関連が予想されるが、Lenczら³⁰⁾は、初発統合失調症患者にrisperidoneもしくはolanzapineを投与し、多型別に薬物反応を調べたところ、*DRD2*のプロモーター領域多型(-241A>G, -141C ins/del)と薬物反応が関連していることを報告した。本邦でも、初発統合失調症のrisperidoneの効果にD2受容体の2つの一塩基多型(-241A>G

とTaqIA)が³, 抗精神病薬の薬物効果にこの受容体の個人差が関与することが確認されている¹⁸⁾。一方, 抗精神病薬による重篤な副作用である悪性症候群とこの遺伝子の関係も検討されているが, まだ, 結論は出ていない^{21,36,58)}。

c) *DRD3* (D3受容体遺伝子)

D3は, Sokoloffら⁵⁴⁾により抗精神病薬の新たな標的受容体として同定された。D3は, 運動調節, 認知, 感情調節などに関わる側坐核や大脳皮質に分布しており, パーキンソン病に用いるドパミンアゴニストは, D3を介して強迫買い, パンディングなどの異常行動を起こすと報告¹⁰⁾されていること, また, amisulprideなどの抗精神病薬は, D2のみでなくD3を強く阻害するために, 陰性症状やうつ症状にも効果があるとされ, この遺伝子と精神症状との関連に興味を持たれる。*DRD3*には, N末の9番目のアミノ酸セリンがグリシンと置換する機能性多型ser9gly多型があるが, まず, clozapineに対する薬物反応性はgly型の方がよいと報告された⁵³⁾。陽性症状との関連⁴⁶⁾, 陰性症状や社会機能との関連²⁶⁾も報告され, 治療抵抗性の有無についても関与が報告²³⁾されるなど, 他の抗精神病薬との関係についても興味を持たれるところである。一方, この多型と抗精神病薬の長期使用による副作用, 遅発性ジスキネジアとの関連も報告⁵⁶⁾されており, それは, メタ解析でも有意であった¹⁾。

d) *DRD4* (D4受容体遺伝子)

D4は, clozapineに強く結合する新規ドパミン受容体としてクローニングされた遺伝子である⁶³⁾。clozapineは, D4に対して高い親和性を持っており, また, 遺伝子発現が前頭前野に局在していることから, 統合失調症の発症や薬物効果との関連が注目されてきた。*DRD4*のエクソン3領域に機能性多型が存在し, 性格と関連が報告⁷⁾されて以来, 抗精神病薬の作用との関連においても, さまざまな解析が行われているが, いくらか有意な報告はあるものの, 現在のところ, その関連は否定的である⁴³⁾。

e) *DRD5* (D5受容体遺伝子)

Grandyらにより, D1受容体と同じようにアデニレートシクラーゼを活性化する受容体として同定された¹²⁾。しかし, risperidoneの効果と*DRD5*との関係は否定的との報告が, 一報あるのみで, まだあまり検討が進んではいない¹⁸⁾。

2. セロトニン受容体

clozapineおよびclozapineをプロトタイプとする非定型抗精神病薬は, 従来のドパミンD2受容体阻害のみでなくセロトニン受容体を同時に阻害し, その結果, 副作用であるパーキンソン症状を抑制し, 陰性症状にも効果があるのではないかと予測された。セロトニン5HT2A受容体は, 線条体前シナプス細胞に分布しドパミンの発火を抑制しているが, 非定型抗精神病薬は5HT2Aを阻害することで, 副作用に関係する黒質-線条体系でドパミンの抑制を解除するため, パーキンソン症状を緩和するとされる³⁵⁾。5HT2A多型を用いた相関解析では, 統合失調症の陽性症状よりも, 陰性症状とより関連するとされ²⁵⁾, 陰性症状に関わる前頭葉での反応に関わっていると思われる。一方, 前シナプスに存在する自己受容体5HT1Aは, そのアゴニストが抑うつ作用を持つことから, うつ状態や自殺との関連が報告²⁹⁾されており, 統合失調症においても陰性症状や認知症状などとの関連が考えられる²⁾。Reynoldsら⁴⁸⁾は, *5HT1A*遺伝子のプロモーター領域にある機能性多型-1019C/Gを解析し, 初発統合失調症患者の抗精神病薬投与後の陰性症状, 抑うつ症状の改善に関与していることを見いだしている。*5HT2C*遺伝子も統合失調症の陰性症状との関連⁴⁷⁾, 副作用である体重増加との関連が報告^{59,62)}されている。抗精神病薬の親和性から, その他のセロトニン受容体についての相関研究も行われつつある。

3. グルタミン酸受容体

グルタミン酸受容体は, 興奮性神経伝達物質グルタミン酸の伝達に関わる受容体で, カイニン酸受容体, α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸(AMPA)受

容体、N-メチル-D-アスパルギン酸(NMDA)受容体と3つのイオンチャンネル型受容体と、代謝型NMDA受容体からなる。このなかで、イオン依存性NMDA受容体は、覚せい剤フェンシクリジンや麻酔剤ケタラルの結合部位であり、統合失調症との関連が最も考えられている受容体である。NMDA受容体は、主なNR1と従となるNR2の2つのサブユニットからできているが、clozapine投与によりNR2Bサブユニット(GRIN2B)が増加することから、clozapine反応との間に相関があるかどうか調べられ、clozapineの効果や治療抵抗性統合失調症との関連が報告されているものの、まだ、症例数が十分でなく今後の検討が必要である¹⁶⁾。同じくGRIN2B多型が、遅発性ジスキネジアに関与しているとの報告³²⁾もある。AMPA受容体との関連については、まだ、報告されていない。最近、代謝型グルタミン酸受容体mGluR2/3刺激薬が統合失調症において有意に症状を改善し、抗精神病薬としての効果が期待されると報告された⁴²⁾。今後、抗精神病薬の作用の一部がグルタミン酸受容体を介している可能性やその個体差について研究が進むと思われる。

4. その他

ムスカリン性アセチルコリン受容体は、Gタンパク質に結合した受容体であり、M1-M5と5つのサブタイプが知られている。clozapineの抗精神病薬としての作用の一部は、M4を介していると予想されており、この機序に基づく抗精神病薬も合成されつつある⁵⁰⁾。アセチルコリン受容体など他の神経伝達系を介したファルマコゲノミックスについても検討される必要があるだろう。また、ドパミンの分解に関わるcatechol-O-methyltransferase (COMT) 遺伝子やMonoamine oxidase A (MAO-A) 遺伝子と薬物効果との間との相関も調べられており、そのなかでCOMT多型を用いた解析では、薬物効果との間に有意な関連が報告^{13,37)}されている。一方、シナプスでの神経伝達物質の再取り込みに関わるトランスポーター遺伝子との関連について

は、ドパミントランスポーターおよびセロトニントランスポーター遺伝子について検討されている^{6,14,24,28)}が、その関連については結論を下すのは時期尚早のように思われる。

4 神経栄養因子としての抗精神病薬の作用

抗精神病薬は、これまで神経終末のシナプスで受容体を介した神経伝達を変化させることによって作用すると考えられていた。しかし、近年、抗精神病薬は神経細胞新生作用を持つことが示され、一部は神経栄養因子を介し機能することが明らかとなってきた^{40,41)}。抗精神病薬の種類によってもその効果は異なり、Liebermanら³¹⁾は、olanzapine長期投与中の統合失調症患者では、脳の萎縮が抑えられたことを報告し、のちに形態学的にも確認している⁶⁰⁾。これらの効果は、一部脳由来神経栄養因子(brain derived neurotrophic factor; BDNF)を介している²⁷⁾と思われるが、BDNFの前駆体タンパク質proBDNFには神経伸長に影響を与える機能性多型Val66Metがあることがわかっており⁸⁾、この多型とclozapineの効果の間に有意な関連が報告¹⁵⁾されている。

5 免疫系との関連

重篤な副作用と免疫系の関連についても最近報告がある。たとえば、統合失調症でも用いられるcarbamazepineの重篤な副作用Stevens-Johnson症候群とHLA-B抗原HLA-B*1502とが関連するとの報告³⁾やclozapineによる顆粒球減少症はアレルギー反応であるとの報告⁵⁾がある。平成21年には、わが国でもclozapineが上市されたこともあり、今後の検討が待たれる。

6 最後に

薬理学的にドパミン受容体阻害を中心とした作用で考えられていた抗精神病薬の効果は、現

在,さまざまな見地から見直されつつある。それに伴い,抗精神病薬のファルマコゲノミクスも,さまざまな解析を加えていく必要がある。抗精神病薬の効果は,明らかに個人差があるため,ゲノム医学を生かした解析によって,それぞれの患者に応じたテーラーメイド医療を行うことが,今後統合失調症の治療において,ますます重要になってくるように思える。

文献

- 1) Bakker PR, van Harten PN, van Os J : Antipsychotic-induced tardive dyskinesia and the Ser9Gly polymorphism in the DRD3 gene: a meta analysis. *Schizophr Res* 83 : 185-192, 2006
- 2) Bantick RA, Deakin JFW, Grasby PM : The 5-HT1A receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? *J Psychopharmacol* 15 : 37-46, 2001
- 3) Chung WH, Hung SI, Hong HS et al : Medical genetics : a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* 428 : 486, 2004
- 4) Dearth A, Gingrich JA, Falardeau P et al : Molecular cloning and expression of the gene for a human D (1) dopamine receptor. *Nature* 347 : 72-76, 1990
- 5) Dettling M, Cascorbi I, Opgen-Rhein C et al : Clozapine-induced agranulocytosis in schizophrenic Caucasians: confirming clues for associations with human leukocyte class I and II antigens. *Pharmacogenomics J* 7 : 325-332, 2007
- 6) Dolzan V, Serretti A, Mandelli L et al : Acute antipsychotic efficacy and side effects in schizophrenia: association with serotonin transporter promoter genotypes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32 : 1562-1566, 2008
- 7) Ebstein RP, Novick O, Umansky R et al : Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of novelty seeking. *Nat Genet* 12 : 78-80, 1996
- 8) Egan MF, Kojima M, Callicott JH et al : The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112 : 257-269, 2003
- 9) Evans DW, Relling MV : Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286 : 487-491, 1999
- 10) 藤本健一 : 病的賭博とパーキンソン病 神経研究 進歩 60 : 1039-1046, 2008
- 11) Grandy DK, Marchionni MA, Makam H et al : Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Nat Acad Sci* 86 : 9762-9766, 1989
- 12) Grandy DK, Zhang Y, Bouvier C et al : Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proc Nat Acad Sci* 88 : 9175-9179, 1991
- 13) Gupta M, Bhatnagar P, Grover S et al : Association studies of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene with schizophrenia and response to antipsychotic treatment. *Pharmacogenomics* 10 : 385-397, 2009
- 14) Güzey C, Scordo MG, Spina E et al : Antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia: associations with dopamine and serotonin receptor and transporter polymorphisms. *Eur J Clin Pharmacol* 63 : 233-241, 2007
- 15) Hong CJ, Yu YW, Lin CH et al : An association study of a brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and clozapine response of schizophrenic patients. *Neurosci Lett* 349 : 206-208, 2003
- 16) Hong CJ, Yu YW, Lin CH et al : Association analysis for NMDA receptor subunit 2B (GRIN2B) genetic variants and psychopathology and clozapine response in schizophrenia. *Psychiatr Genet* 11 : 219-222, 2001
- 17) Hwang R, Shinkai T, De Luca V et al : Association study of four dopamine D1 receptor gene polymorphisms and clozapine treatment response. *J Psychopharmacol* 21 : 718-727, 2007
- 18) Ikeda M, Yamanouchi Y, Kinoshita Y et al : Variants of dopamine and serotonin candidate genes as predictors of response to risperidone treatment in first-episode schizophrenia. *Pharmacogenomics* 9 : 1437-1443, 2008
- 19) Kane J, Honigfeld G, Singer J et al : Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 45 : 789-796, 1988
- 20) Kato D, Kawanishi C, Kishida I et al : Effects of CYP2D6 polymorphisms on neuroleptic malignant syndrome. *Eur J Clin Pharmacol* 63 : 991-996, 2007
- 21) Kishida I, Kawanishi C, Furuno T et al : Lack of association in Japanese patients between neuroleptic malignant syndrome and the TaqI A poly-

- morphism of the dopamine D2 receptor gene. *Psychiatr Genet* 13 : 55-57, 2003
- 22) Kobylecki CJ, Jakobsen KD, Hansen T et al : CYP2D6 Genotype Predicts Antipsychotic Side Effects in Schizophrenia Inpatients: A Retrospective Matched Case-Control Study. *Neuropsychobiology* 59 : 222-226, 2009
 - 23) Kohlrausch FB, Gama CS, Lobato MI et al : Naturalistic pharmacogenetic study of treatment resistance to typical neuroleptics in European-Brazilian schizophrenics. *Pharmacogenet Genomics* 18 : 599-609, 2008
 - 24) Lafuente A, Bernardo M, Mas S et al : Dopamine transporter (DAT) genotype (VNTR) and phenotype in extrapyramidal symptoms induced by antipsychotics. *Schizophr Res* 90 : 115-122, 2007
 - 25) Lane HY, Chang YC, Chiu CC et al : Association of risperidone treatment response with a polymorphism in the 5-HT_{2A} receptor gene. *Am J Psychiat* 159 : 1593-1595, 2002
 - 26) Lane HY, Hsu SK, Liu YC et al : Dopamine D3 receptor ser9gly polymorphism and risperidone response. *J Clin Psychopharmacol* 25 : 6-11, 2005
 - 27) Lee BH, Kim YK : Increased plasma brain-derived neurotrophic factor, not nerve growth factor-Beta, in schizophrenia patients with better response to risperidone treatment. *Neuropsychobiology* 59 : 51-58, 2009
 - 28) Lee HY, Kim DJ, Lee HJ et al : No association of serotonin transporter polymorphism (5-HTTVNTR and 5-HTTLPR) with characteristics and treatment response to atypical antipsychotic agents in schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33 : 276-280, 2009
 - 29) Lemonde S, Turecki G, Bakish D et al : Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci* 23 : 8788-8799, 2003
 - 30) Lencz T, Robinson DG, Xu K et al : DRD2 promoter region variation as a predictor of sustained response to antipsychotic medication in first-episode schizophrenia patients. *Am J Psychiat* 163 : 529-531, 2006
 - 31) Lieberman JA, Tollefson GD, Charles C et al : Antipsychotic drug effects on brain morphology in first-episode psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 62 : 361-370, 2005
 - 32) Liou YJ, Wang YC, Chen JY et al : Association analysis of polymorphisms in the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 2B (GRIN2B) gene and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Psychiatry Res* 153 : 271-275, 2007
 - 33) Mahgoub A, Idle JR, Dring LG et al : Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 310 : 584-586, 1977
 - 34) Marez D, Legrand M, Sabbagh N et al : Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 7 : 193-202, 1997
 - 35) Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC : Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pK_i values. *J Pharmacol Exp Ther* 251 : 238-246, 1989
 - 36) Mihara K, Kondo T, Suzuki A et al : Relationship between functional dopamine D2 and D3 receptors gene polymorphisms and neuroleptic malignant syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 117 : 57-60, 2003
 - 37) Molero P, Ortuño F, Zalacain M et al : Clinical involvement of catechol-O-methyltransferase polymorphisms in schizophrenia spectrum disorders : influence on the severity of psychotic symptoms and on the response to neuroleptic treatment. *Pharmacogenomics J* 7 : 418-426, 2007
 - 38) 村崎光邦, 西川弘之, 石橋 正 : ドパミン-セロトニン拮抗薬 臨床精神薬理 11 : 845-854, 2008
 - 39) Nakagami T, Yasui-Furukori N, Saito M et al : Effect of verapamil on pharmacokinetics and pharmacodynamics of risperidone: In vivo evidence of involvement of P-glycoprotein in risperidone disposition. *Clin Pharmacol Ther* 78 : 43-51, 2005
 - 40) 中川 伸, 安部川智浩, 伊藤候輝ほか : 神経細胞新生と抗精神病薬分子精神医学 6 : 10-15, 2006
 - 41) 沼田周助, 上野修一 : 神経栄養因子と抗精神病薬. 分子精神医学 6 : 16-19, 2006
 - 42) Patil ST, Zhang L, Martenyi F et al : Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat Med* 13 : 1102-1107, 2007
 - 43) Pickar D, Rubinow K : Pharmacogenomics of psychiatric disorders. *Trends Pharmacol Sci* 22 : 75-83, 2001
 - 44) Plesnicar BK, Zalar B, Breskvar K et al : The influence of the CYP2D6 polymorphism on psychopathological and extrapyramidal symptoms in the patients on long-term antipsychotic treatment. *J*

- Psychopharmacol 20 : 829-833, 2006
- 45) Potkin SG, Basile VS, Jin Y et al : D1 receptor alleles predict PET metabolic correlates of clinical response to clozapine. *Mol Psychiatry* 8 : 109-113, 2003
 - 46) Reynolds GP, Yao Z, Zhang X et al : Pharmacogenetics of treatment in first-episode schizophrenia: D3 and 5-HT2C receptor polymorphisms separately associate with positive and negative symptom response. *Eur Neuropsychopharmacol* 15 : 143-151, 2005
 - 47) Reynolds GP, Yao Z, Zhang XB et al : Pharmacogenetics of treatment in first-episode schizophrenia: D3 and 5-HT2C receptor polymorphisms separately associate with positive and negative symptom response. *Eur Neuropsychopharmacol* 15 : 143-151, 2005
 - 48) Reynolds, GP, Arranz B, Templeman LA et al : Effect of 5-HT1A receptor gene polymorphism on negative and depressive symptom response to antipsychotic treatment of drug-naïve psychotic patients. *Am J Psychiat* 163 : 1826-1829, 2006
 - 49) Sachse C, Brockmoller J, Bauer S et al : Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60 : 284-295, 1997
 - 50) Scarr E, Dean B : Muscarinic receptors: do they have a role in the pathology and treatment of schizophrenia? *J Neurochem* 107 : 1188-1195, 2008
 - 51) Schillevoort I, de Boer A, van der Weide J et al : Antipsychotic-induced extrapyramidal syndromes and cytochrome P450 2D6 genotype: a case-control study. *Pharmacogenetics* 12 : 235-240, 2002
 - 52) Seeman P : Brain dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 32 : 229-313, 1980
 - 53) Shaikh S, Collier DA, Sham PC et al : Allelic association between a Ser-9-Gly polymorphism in the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia, *Hum Genet* 97 : 714-719, 1996
 - 54) Sokoloff P, Giros B, Martres MP et al : Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D-3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347 : 146-151, 1990
 - 55) Spina E, de Leon J : Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review. *Bas Clin Pharmacol Toxicol* 100 : 4-22, 2007
 - 56) Steen VM, Løvlie R, MacEwan T et al : Dopamine D3-receptor gene variant and susceptibility to tardive dyskinesia in schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 2 : 139-145, 1997
 - 57) Sunahara RK, Niznik HB, Weiner D M et al : Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 347 : 80-83, 1990
 - 58) Suzuki A, Kondo T, Otani K et al : Association of the TaqI A polymorphism of the dopamine D (2) receptor gene with predisposition to neuroleptic malignant syndrome. *Am J Psychiatry* 158 : 1714-1716, 2001
 - 59) Templeman LA, Reynolds GP, Arranz B et al : Polymorphisms of the 5-HT2C receptor and leptin genes are associated with antipsychotic drug-induced weight gain in Caucasian subjects with a first-episode psychosis. *Pharmacogenet Genom* 15 : 195-200, 2005
 - 60) Thompson PM, Bartzokis G, Hayashi KM et al : Time-lapse mapping of cortical changes in schizophrenia with different treatments. *Cereb Cortex* 19 : 1107-1123, 2009
 - 61) Ueno S, Otani K, Kaneko S et al : Cytochrome P-450 2D6 Gene polymorphism is not Associated with Neuroleptic Malignant Syndrome. *Biol Psychiat* 40 : 72-74, 1996
 - 62) Ujike H, Nomura A, Morita Y et al : Multiple genetic factors in olanzapine-induced weight gain in schizophrenia patients: a cohort study. *J Clin Psychiatry* 69 : 1416-1422, 2008
 - 63) Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC et al : Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350 : 610-614, 1991
 - 64) Yasui-Furukori N, Tsuchimine S, Saito M et al : Association between major Multidrug Resistance 1 (MDR1) gene polymorphisms and plasma concentration of prolactin during risperidone treatment in schizophrenic patients. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiatry* 31 : 1230, 2007
 - 65) Zhou QY, Grandy DK, Thambi L et al : Cloning and expression of human and rat D (1) dopamine receptors. *Nature* 347 : 76-80, 1990

第 105 回日本精神神経学会総会

教 育 講 演

精神障害の理解のための分子医学的アプローチ

上 野 修 一 (愛媛大学大学院医学系研究科脳とこころの医学)

精神障害は、遺伝因や環境因が複雑に絡み合った多因子疾患であり、精神障害を診断し、治療の反応、経過を探り、予後や再発を調べるための生物学的な指標はまだ十分ではない。精神障害は、中枢神経系を冒す疾患ではあるものの、神経系、免疫系、内分泌系を通して全身に影響する疾患であるため、末梢を循環する血液の状態から精神障害の病因を明らかにし、精神障害の状態像を把握できる指標が作れるのではないかと予想される。また、血液を循環するアミノ酸やビタミン群の変化が脳に影響を与えるかもしれない。今回、血液の状態から精神障害を理解する分子医学的方法を二つ紹介したい。ひとつは、末梢血中アミノ酸やビタミン量の変化から精神障害を理解する方法である。その例として、統合失調症とビタミンB₆合成の律速段階酵素 Pyridoxine-5'-Phosphate Oxidase (PNPO) 遺伝子との疾患-対照研究を示す。もうひとつは、末梢血白血球で発現する遺伝子中間産物 mRNA (messenger RNA) を測定することによる精神障害の理解である。mRNA は、最終産物のタンパク質と異なり抽出しやすく、real-time PCR 法や DNA チップを用いて、遺伝子の種類に関わらず同じ方法で定量することができる。末梢血白血球で発現する遺伝子量を、精神障害群と健常対照群で比較することや、同一個体で複数回にわたり調べることから、精神障害のなりやすさ、すなわち、体質に関係する指標 (trait marker) およびその時点での状態像を表す指標 (state marker) を明らかにできる可能性がある。その例として、うつ病と末梢血遺伝子 mRNA 発現量の研究を提示する。

はじめに

精神障害では、他の疾患に比べて、遺伝の疾患発症に関わる率が高いことは、臨床遺伝学的に確認されている。Plomin らは、双生児での疾病の発生の一致率を様々な疾患で調べ、精神障害では、一般内科疾患に比較して一卵性双生児の発症の一致率が高いことを報告した¹⁹⁾。しかしながら、遺伝子がほぼ一致する一卵性双生児に比較して、遺伝子の半分が同一である二卵性双生児では、その一致率は理論的には一卵性双生児の半分となるはずであるが、精神障害での二卵性双生児の一致率は半分よりも低い。これは関与する因子が単一でないことを示しており、精神障害は、多くの遺伝子が関わる多因子疾患であるとした。図 1 に示す

ように、病気は、遺伝などの生まれもった脆弱性からなる体質因と養育環境や栄養などの環境因との組み合わせにより発症する。たとえば、常染色体優性遺伝、常染色体劣性遺伝などと表現される単一遺伝子疾患では、疾病を起こす病因遺伝子に異常を持つかどうかが発症に大きく関与する。一方、交通事故などの外傷による障害では、環境因によって発症するかどうかはほぼ決定される。精神障害は、糖尿病や高血圧などの生活習慣病などと同様に、多くの遺伝因と環境因が相互に複雑に関与し発症する疾患と考えられ、ありふれた疾患 (common diseases) とか多因子疾患 (multifactorial diseases) であると表現される。そのため、精神障害においては、変更不能な因子

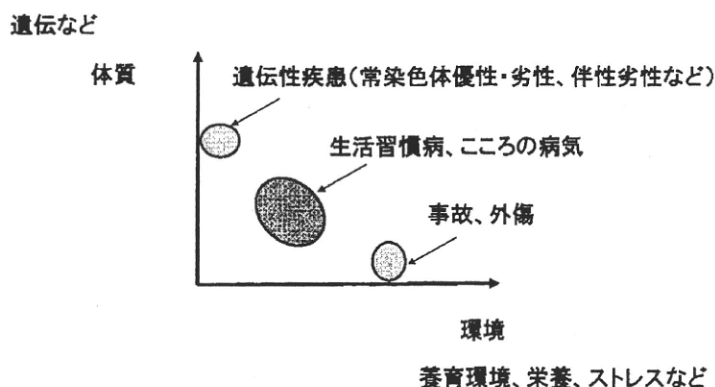


図1 病気の発症に関わる影響

(遺伝因)を明らかにすることにより、変更可能な因子(環境因)を整えることで、患者の発症を抑制し、治療反応を改善し、回復を支援し、再発を予防する方法が明らかにできると考えられる。

一方、どのような状態にあるかの指標も大切である。多くの身体疾患と異なり、精神障害においては、臨床診断は、熟練した精神科医が診察し行う。現在用いられているICD-10、DSM-IVなどの操作的診断基準は、まず、器質的疾患を除外したうえで、精神症状を誰でも判断できるような客観的基準を示し行うようになっている。そのため、統計学的に解析可能な客観的な診断基準ではあるものの、治療法の選択や予後については触れていない。生物学的な指標として、たとえば、うつ病では、視床下部-下垂体-副腎(hypothalamic pituitary adrenal, HPA)軸の過活動がみられることから、デキサメサゾン抑制試験(Dexamethasone suppression test, DST)や、その変法であるデキサメサゾン/CRH試験(dexamethasone-corticotrophin releasing hormone, DEX/CRH test)が、うつ病の病態を検出する方法として行われている²¹⁾。しかし、この方法では、約半数のうつ病患者しか検出できない。精神障害の診断、治療反応性の評価、将来の状態像、再発を知るための生物学的な指標などはほとんどなく、状態像の判断は、熟練した精神科医による面接や治療評価尺度などの心理検査により行っているの

が現状である。

今回、精神障害の病因、診断、状態像の把握、再発の有無など精神障害を把握するための手法として、末梢血から得られた情報から、精神障害を理解する手法を紹介したいと思う。

1. 疾患-対照研究を用いたアプローチ

ホモシステインは、メチオニンから合成される硫黄を含むアミノ酸であるが、生体内でのメチル化に関わる重要なアミノ酸である(図2)。ホモシステインの分解異常は、ホモシチン尿症として知られており、成長段階でのホモシステインの高値が、知的障害、てんかんなどの病態を引き起こす。また、血中ホモシステイン量が高いと、血管障害を引き起こしやすく、脳血管障害や虚血性心疾患になりやすい。統合失調症では、以前から血中ホモシステイン量が高いことが報告されてきたが、Muntjewerffらは、血中ホモシステイン量と統合失調症の関係を調べた報告のメタ解析を行い、血中ホモシステイン量が $5\mu\text{mol/L}$ 増加すると、統合失調症発症のオッズ比が1.7倍になることを示した¹⁵⁾。ホモシステイン量の調節は、ホモシステインからメチオニン合成酵素によりメチオニンに向かう系と、ホモシステインが分解され、シスタチオンとなり、さらに代謝を受け、グルタチオンに向かう系の双方によって調節されている²²⁾。メチオニン合成酵素はビタミン B_{12} を補酵素とし、一方、グルタチオンに向かう系のシ

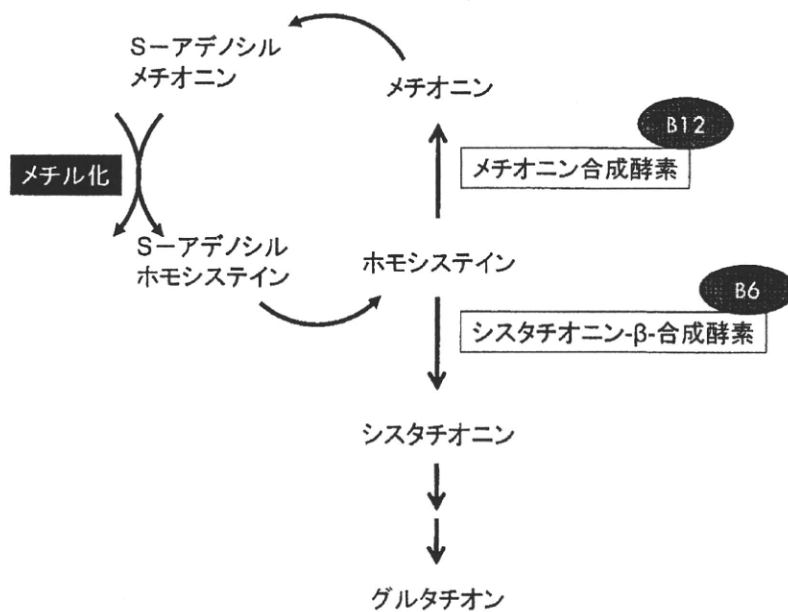


図2 ホモシステインの代謝

スタチオン-β-合成酵素およびシスタチオナーゼは、ビタミンB₆を補酵素とする。そのため、統合失調症の高ホモシステイン血症には、ビタミンB群の影響が予想されるが、Levineらは、高ホモシステイン血症を示す統合失調症患者にビタミンB群を投与すると、血中ホモシステインは低下し、精神症状および高次脳機能は改善したと報告した⁹⁾。

上記から、血中ホモシステイン濃度の上昇に影響を与える因子としてビタミンB₆に注目し、長期入院中の慢性の統合失調症患者の血中ビタミンB₆濃度を予備的に測定したところ、男女を問わず低下していることを確認した（未発表データ）。ビタミンB₆合成の律速段階酵素はPNP酸化酵素（pyridoxamine-n-phosphate, PNPO）であること¹⁶⁾、PNPOの欠損により精神障害を起こすこと¹⁴⁾、PNPO遺伝子の座位がある17番染色体17p11-q25領域が統合失調症と関連すること²⁶⁾から、統合失調症とPNPO遺伝子に関連があると考え、統合失調症患者356名、健常対照者582名を用いて疾患-対照研究を行った。その結果、統合失調症とPNPO遺伝子のプロモーター

部位にある一塩基多型rs2325751との間に最も有意な相関が確認され、ハプロタイプ解析によってもそれは証明された²⁹⁾。しかしながら、統合失調症において、血中ビタミンB₆濃度が、ホモシステイン濃度や精神症状に直接影響を与えているかどうかについては確認しておらず、相関解析した症例数も少ないことから、この関連については、今後の検討が必要であると思われる。

2. 末梢血白血球発現遺伝子からのアプローチ

精神障害は中枢神経系を冒す疾患であるが、多くの精神障害は、神経系、免疫系、ホルモン系などを介して全身に作用し、中枢神経症状のみならず、全身の身体的な症状を呈する⁹⁾（図3）。末梢血白血球は、全身を巡回しており、様々な情報を受け取る細胞であるため、中枢神経系で起こっている変化を表す指標となる可能性がある。末梢血白血球のmessengerRNA（mRNA）は、遺伝子が発現するための遺伝子中間産物であるが、その量を定量することによって、精神障害の指標となるかどうか注目した。末梢血白血球は、静脈採血によって比較的侵襲性低く得ることができる試

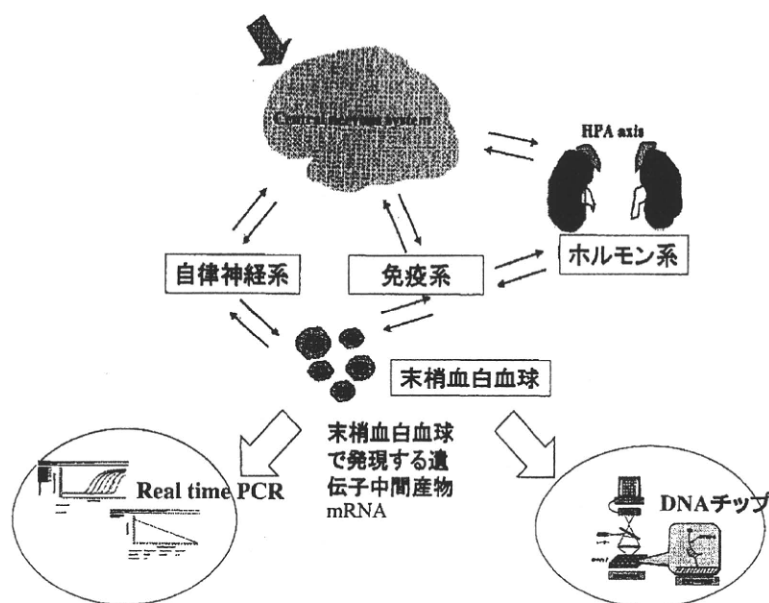


図3 精神障害の病態像把握のための方法論（文献15を改変）

料であり、患者の状態に合わせて、複数回試料の採取も可能である。最終産物のタンパク質の発現変化をみることもできるが、タンパク質は、20個以上のアミノ酸が並ぶ複合体ペプチドであり、それぞれが機能するために三次元構造をとっており、構造が複雑で異なった性質を持っているため、回収して正確に定量することが難しい。一方、mRNAは抽出がタンパク質に比較して容易であり、どの遺伝子でも同様の方法を用いた正確な定量が可能である。mRNAの発現量を調べる方法には、定量的real time PCR法と、DNAチップ法がある。real time PCR法は、polymerase chain reaction (PCR) を利用した定量法で、目的とする遺伝子産物は、反応サイクルごとに2倍、4倍、8倍と指数関数的に増幅され、やがてプラトーに達し遺伝子増幅は終了する。段階希釈した標準試料を同様に増幅させると、それぞれの標準試料も指数関数的に増幅され、スタート時点での標的DNAの量の多い順に増幅曲線が描かれる。測定したい試料と標準試料の増幅曲線のずれから遺伝子産物量を正確に定量することができる。一方、DNAチップを用いた解析は、発現している遺伝子を網羅的に解析することができるため、そ

れぞれの疾患に特異的な遺伝子の組み合わせのパターンを調べることができる方法であるが、特定の遺伝子に絞った定量性については、DNAチップはreal time PCR法に比較して劣る。

うつ病を中心に、末梢血白血球での遺伝子発現研究をとらえてみると、まず、ドパミンDRD4受容体の発現量²⁰⁾やCREB遺伝子発現⁸⁾が調べられた。我々が行ったうつ病と末梢血白血球でのセロトニントランスポーター遺伝子発現との関連については、第103回本学会総会で発表し本雑誌に掲載しているので、それも参考にしていきたい²⁵⁾が、これまで行われているうつ病とreal time PCR法を用いた末梢血白血球の遺伝子発現を調べた研究については、結果を表1にまとめて提示する。

最 後 に

これまで、精神科では、診断し、状態像を把握し、薬物効果や再発の有無について、定量化できる生物学的指標はほとんどなかったのが現実である。今回は、末梢血から得られた情報から、精神障害に関係する体質を表す指標 (trait marker) を明らかにできる可能性、および末梢血白血球の

表1 うつ病と末梢血白血球発現

遺伝子	変化	参考文献
SLC6A4 (Serotonin transporter)	増加	3, 24
	減少	10
CREB1 (cAMP response element-binding protein 1)	増加	7
	変化なし	8
GCCR alpha (Glucocorticoid Receptor alpha)	減少	12
HDAC5 (Histone deacetylase 5)	増加	7
SLC6A2 (Noradrenalin transporter)	減少	11
DRD4 (Dopamine receptor D4)	減少	20
VEGF (Vascular endothelial growth factor)	増加	5
PDLIM5 (PDZ and LIM domain 5)	減少	4
ARRB1 (β -arrestin 1)	減少	1, 13
GLO1 (glyoxalase-1)	減少	2
GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor)	減少	18
ARTN (artemin)	減少	18
NTF-3 (neurotrophin 3)	減少	18
PDE4B (Phosphodiesterase 4B)	増加	17

遺伝子発現の解析によって精神障害の状態像を表す指標 (state marker) が得られる可能性を示した。このように新たな視点から精神障害の病因の解明や診断, 治療効果の判定, 再発の予測などが行われるようになると思われる。

謝 辞

本研究の趣旨を理解し, 貴重な試料を提供していただいた患者ボランティアおよび健常ボランティアの方々の協力なしには行えなかった。今回の講演は, 私が徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部精神医学講座に所属していたときから現在まで共同研究として行ったものであり, 同教室の大森哲郎教授をはじめ教室員に感謝する。本稿で紹介した研究の一部は, 厚生労働省および文部科学省の科学研究費の助成を受けている。

文 献

1) Avissar, S., Matuzany-Ruban, A., Tzukert, K., et al.: Beta-arrestin-1 levels: reduced in leukocytes of patients with depression and elevated by antidepressants in rat brain. *Am J Psychiatry*, 161; 2066-2072, 2004

2) Fujimoto, M., Uchida, S., Watanuki, T., et al.: Reduced expression of glyoxalase-1 mRNA in mood disorder patients. *Neurosci Lett*, 438; 196-199, 2008

3) Iga, J., Ueno, S., Yamauchi, K., et al.: Serotonin transporter mRNA expression in peripheral leukocytes of patients with major depression before and after treatment with paroxetine. *Neurosci Lett*, 389; 12-16, 2005

4) Iga, J., Ueno, S., Yamauchi, K., et al.: Gene expression and association analysis of LIM (PDLIM5) in major depression. *Neurosci Lett*, 400; 203-207, 2006

5) Iga, J., Ueno, S., Yamauchi, K., et al.: Gene expression and association analysis of vascular endothelial growth factor in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31; 658-663, 2007

6) Iga, J., Ueno, S., Ohmori, T.: Molecular assessment of depression from mRNAs in the peripheral leukocytes. *Annals of Medicine*, 40; 336-342, 2008

7) Iga, J., Ueno, S., Yamauchi, K., et al.: Altered HDAC5 and CREB mRNA expressions in the peripheral leukocytes of major depression. *Prog Neuropsychophar-*

- macol Biol Psychiatry, 31 ; 628-632, 2007
- 8) Lai, I.C., Hong, C.J., Tsai, S.J. : Expression of cAMP response element-binding protein in major depression before and after antidepressant treatment. *Neuropsychobiology*, 48 ; 182-185, 2003
- 9) Levine, J., Stahl, Z., Sela, B.A., et al. : Homocysteine-reducing strategies improve symptoms in chronic schizophrenic patients with hyperhomocysteinemia. *Biol Psychiatry*, 60 ; 265-269, 2006
- 10) Lima, L., Urbina, M. : Serotonin transporter modulation in blood lymphocytes from patients with major depression. *Cell Mol Neurobiol*, 22 ; 797-804, 2002
- 11) Mata, S., Urbina, M., Manzano, E., et al. : Noradrenaline transporter and its turnover rate are decreased in blood lymphocytes of patients with major depression. *J Neuroimmunol*, 170 ; 134-140, 2005
- 12) Matsubara, T., Funato, H., Kobayashi, A., et al. : Reduced glucocorticoid receptor alpha expression in mood disorder patients and first-degree relatives. *Biol Psychiatry*, 59 ; 689-695, 2006
- 13) Matuzany-Ruban, A., Avissar, S., Schreiber, G. : Dynamics of beta-arrestin1 protein and mRNA levels elevation by antidepressants in mononuclear leukocytes of patients with depression. *J Affect Disord*, 88 ; 307-312, 2005
- 14) Mills, P.B., Surtees, R.A., Champion, M.P., et al. : Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5'-phosphate oxidase. *Hum Mol Genet*, 14 ; 1077-1086, 2005
- 15) Muntjewerff, J.W., Kahn, R.S., Blom, H.J., et al. : Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia : a meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 11 ; 143-149, 2006
- 16) Ngo, E.O., LePage, G.R., Thanassi, J.W., et al. : Absence of pyridoxine-5'-phosphate oxidase (PNPO) activity in neoplastic cells : isolation, characterization, and expression of PNPO cDNA. *Biochemistry*, 37 ; 7741-7748, 1998
- 17) Numata, S., Iga, J., Nakataki, M., et al. : Gene expression and association analyses of the phosphodiesterase 4B (PDE4B) gene in major depressive disorder in the Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B ; 527-534, 2009
- 18) Otsuki, K., Uchida, S., Watanuki, T., et al. : Altered expression of neurotrophic factors in patients with major depression. *J Psychiatr Res*, 42 ; 1145-1153, 2008
- 19) Plomin, R., Owen, M.J., McGuffin, P. : The genetic basis of complex human behaviors. *Science*, 264 ; 1733-1739, 1994
- 20) Rocc, P., De Leo, C., Eva, C., et al. : Decrease of the D4 dopamine receptor messenger RNA expression in lymphocytes from patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 26 ; 1155-1160, 2002
- 21) Schatzberg, A.F., Garlow, S.J., Nemeroff, C.B. : Molecular and cellular mechanisms in depression. *Neuropsychopharmacology : Fifth Generation of Progress*, (ed. by Davis KL, Charney D, Coyle JT et al.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1039-1050, 2002
- 22) Schwammenthal, Y., Tanne, D. : Homocysteine, B-vitamin supplementation, and stroke prevention : from observational to interventional trials. *Lancet Neurol*, 3 ; 493-495, 2004
- 23) Song, H., Ueno, S., Numata, S., et al. : Association between PNPO and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res*, 97 ; 264-270, 2007
- 24) Tsao, C.W., Lin, Y.S., Chen, C.C., et al. : Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30 ; 899-905, 2006
- 25) 上野修一, 伊賀淳一, 沼田周助ほか : うつ病の心因, 内因, 器質因 : うつ病を遺伝子から考える 精神経誌, 109 ; 859-863, 2007
- 26) William, N.M., Norton, N., Williams, H., et al. : A systematic genomewide linkage study in 353 sib pairs with schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 73 ; 1355-1367, 2003