

201122003B

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業
(精神障害分野)

気分障害の神経病理学に基づく分類
を目指した脳病態の解明

(課題番号 H21-こころ-一般-002)

平成21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 加藤 忠史

(独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター)

平成24(2012)年3月

目 次

I. 総合研究報告

「気分障害の神経病理学に基づく分類を目指した脳病態の解明に関する研究」
独立行政法人理化学研究所 精神疾患動態研究チーム 加藤 忠史

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 資料

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業
(精神障害分野)

気分障害の神経病理学に基づく分類を目指した脳病態の解明

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 加藤忠史
独立行政法人理化学研究所 精神疾患動態研究チーム チームリーダー

平成 24 (2012) 年 3 月

うつ病は、大きな社会負担、急増する患者数等から社会問題となっているが、双極スペクトラム、非定型うつ病、血管性うつ病など、多様な病型が存在し、その診療には混乱も生じている。本研究の目的は、遺伝要因、早期養育環境、ストレス、加齢、動脈硬化などのうつ病の危険因子によって引き起こされる脳病態を、死後脳研究、脳画像解析、疫学研究、および動物モデルにおける神経科学的解析などによって明らかにし、脳病態に応じた気分障害の分類を目指すことである。

本研究の特色は、うつ病の危険因子による脳病態を多角的に明らかにすると共に、これを患者死後脳で確認することである。気分障害の疾患概念を病理学に基づいて再構築し、病型に応じた診断法、治療法を開発することができれば、精神医学が病理学に基づく医学へと進化する第一歩となる。現在混沌としている「うつ」が種々の脳疾患と心の悩みに明確に分類され、適切に対応されれば、自殺者数の減少、円滑な人事管理など、多くの波及効果が期待でき、国民の生活の質を向上させると期待される。

3 年間の研究により、ミトコンドリア DNA 異常を持つモデルマウスにおいて、前頭辺縁系、視床室傍核などにおけるミトコンドリア DNA 蓄積を見出すとともに、これを免疫組織化学的手法により確認した。さらに、人においてこうした病変を可視化する免疫組織化学的方法を確立した。

ストレスおよび免疫賦活によるうつ病モデルでは、前頭辺縁系および視床下部等の諸部位がうつ病の症状発現に関連すると考えられた。

疫学研究では、男性で、メタボリック症候群がうつ病の危険因子となることが示唆された。

また、脳卒中患者における MRI 構造画像を用いた検討により、抑うつと関係のある脳領域として、新たに、橋を含む脳幹部が見いだされた。

また、高齢者ブレインバンクで蓄積された症例の精神医学的診断を後方視的に行い、11 例の大うつ病性障害患者を見いだした。これらの症例では、脳血管障害、神経原線維変化などの神経病理学的変化を認めた。

この 3 年間の研究によって、これまで脳機能の変化によって生じると考えられてきた気分障害においても、気分制御に関わる脳内諸部位（脳幹部モノアミン神経核、視床下部、視床、前頭葉など）における、種々の神経病理学的変化（脳梗塞等の脳血管病変、神経原線維変化などの神経病理学的変化、ミクログリアの活性化、ミトコンドリア異常など）がその病態に関与していることが示唆された。

現状では、精神疾患患者の剖検例は少なく、死後脳集積はほとんど行われていないが、本研究の結果は、今後、気分障害を初めとする精神疾患患者の死後脳を集積するブレインバンクを設立し、研究を推進することが必要であることを示している。

研究分担者

加藤忠史 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター チームリーダー
神庭重信 九州大学医学部精神医学教室 教授
山下英尚 広島大学医学部精神医学教室 講師
村山繁雄 東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長

A. 研究目的

社会生活障害を引き起こす疾患として最大の要因であるうつ病の患者数は近年急速に増加し、社会問題となっている。しかし、抗うつ薬によく反応するメラニコリー型に加え、抗うつ薬により悪化する双極スペクトラム、抗うつ薬が奏効しにくく心理療法も重要となる非定型うつ病、難治化しやすい血管性うつ病など、治療抵抗性のうつ病が増加し、うつ病診療は混沌とした状況にある。面接に頼った現在の診断法には限界があり、現状の打開には、神経病理学所見に基づいて疾患概念を再構築すると共に亜型分類を確立し、脳病態診断に基づいて治療を最適化する他ない。

うつ病の発症には遺伝、養育、ストレス、加齢など、種々の危険因子が関与する。加藤らはミトコンドリアDNA異常が脳に蓄積する遺伝子改変マウスが双極性障害様の行動異常を示すことを見出した。山下らは基底核に脳血管障害が存在するとうつ病の中でも意欲低下が優勢となることを見出し、血管性うつ病の神経学的基盤を示した。神庭らはインターロイキン1(IL-1)が脳内モノアミン系に影響することや、インターフェロンがIL-1 β 上昇を介して海馬神経新生を低下させることを見出し、うつ病の神経免疫仮説を確立した。また久山町の65歳以上の全住民を対象としてうつ病の調査を行い、有病率を明らかにした。村山らは1万名近い脳を有する高齢者ブレインバンクを構築し、千例以上の検討で、加齢に伴い徐々にLewy小体が蓄積し、脳機能障害が引き起こされることを示した。

上記の他多くの研究から、遺伝要因によるミトコンドリア機能障害、ストレスによる神経内分泌免疫学的変化、加齢に伴う脳血管障害および異常蛋白蓄積など、各危険因子による脳機能障害がうつ病を引き起こすと考えられる。本研究では、こうした脳病態を臨床研究および動物モデルを用いて明らかにすると共に、これを患者死後脳で検討する。

本計画の特徴は、うつ病の異種性の高さを前提とし、まず各危険因子と脳病態の関連を明らかにし、次に脳病態を臨床診断(亜型分類)と対応づけることにより、気分障害の神経病理学的な分類の基盤を固めることである。本研究によりうつ病の神経病理学的所見に基づく分類が可能となれば、診療やメンタルヘルスマネジメントの最適化が可能となり、自殺者減少、生活の質の向上につながる。

B. 研究方法

動物実験では、ミトコンドリアDNA変異が脳内に蓄積するモデルマウスを用いて、ミトコンドリアDNA蓄積を指標として、気分障害類似の行動異常と関連する脳の異常を同定すると共に、こうした変化を可視化する技術を開発する。

また、うつ病の原因脳部位を探索するため、c-fos免疫染色を用いて、抗うつ薬の評価系として用いられている強制水泳試験時に、抗うつ薬投与によりc-fos反応が変化する脳部位を探索する。さらに、免疫賦活モデルを用いて、行動変化を観察すると共に、ミクログリア活性化の分布と時間経過を観察する。

地域疫学研究では、うつ病のスクリーニングを行い、耐糖能異常や認知機能障害との関係を調べる。本研究で得られた精神医学的診断のデータは、剖検において、神経病理学的所見との関係を調べるためにも用いる。

脳卒中患者における、定量的MRIを用いて、病変部位と症状の関連を検討する。

また、高齢者ブレインバンクの登録症例で、気分障害の調査を行うと共に、新たな剖検例について、神経病理学的検索を行う。

C. 研究結果

1) 双極性障害モデルマウスの研究

ミトコンドリアDNA(mtDNA)合成酵素の変異を脳特異的に発現させた双極性障害モデルマウスにおいて、mtDNA変異の蓄積部位を探索するため、マウスの脳切片をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により小片に細断し、各小片のDNAを用いて、定量的PCR法により、mtDNA欠失量を定量する、定量的mtDNA欠失マッピング法(quantitative Mapping of Deleted Mitochondrial DNA [qMDMD])を開発した。この方法により、モデルマウスにおいてmtDNA欠失をマッピングし、半網羅的に検討した結果、視床室傍核、下辺縁皮質などに、特に多くの欠失mtDNAを認めた。

双極性障害モデルマウスにおいて、mtDNA変異が蓄積している前頭辺縁系の諸部位において、mtDNA欠失が蓄積した細胞を可視化するため、mtDNA由来蛋白質であるチトクローム酸化酵素(Cox)、および核DNA由来蛋白質である、クエン

酸脱水素酵素の抗体、および核を染色する DAPI を用いた三重染色を行った。その結果、mtDNA 変異が蓄積している部位において、Cox 陰性細胞が散見され、モデルマウスでは有意に多く見られた。

気分障害患者の死後脳で同様の検討を行うべく、脳バンクより供与された凍結人大脳皮質および視床切片を用いて、マウスと同様の三重染色を行う方法を確立し、検討を行った。その結果、視床で Cox 陰性細胞を認める症例を見いだした。

なお、予備的な検討では、脳バンクのサンプルにおいては、視床室傍核が失われている場合があることがわかった。視床室傍核は、第三脳室に面しているため、脳を左右に切り分ける際に、損傷する場合が少なくないと考えられた。

2) うつ病モデルマウスの研究

うつ病の原因となる脳部位を同定するため、マウスに抗うつ薬を投与後、強制水泳試験を行い、脳を摘出し、灌流固定を行って、c-Fos 免疫組織化学による検討を行った。

その結果、前辺縁/下辺縁皮質、外側中隔、扁桃体基底外側核、内嗅領皮質、視床室傍核など、前頭辺縁系の諸部位に賦活が見られた。中でも、辺縁/下辺縁皮質の賦活は、尾懸垂試験では見られず、強制水泳に特異的な所見と考えられた。

分界条床核の内側域後内側部 (STMPM) では、イミプラミン前投与後の強制水泳試験で、c-Fos の発現が増加した。この部位における c-Fos の発現と強制水泳による無動時間との間に、負の相関がみられたことから、この部位の変化が抗うつ薬によるうつ様行動の改善と関連している可能性が考えられた。

免疫との関連については、抗うつ薬の活性化ミクログリアに対する影響を *in vitro* で調べた結果、いくつかの抗うつ薬が活性化ミクログリア由来の NO や炎症性サイトカイン産生を抑制することがわかった。

また、マウスにリポポリサッカライド (LPS) を投与し、免疫賦活を行った。実験には、8~10 週齢の BALB/c マウスを行い、LPS は 0.8 mg/kg を腹腔内投与した。Iba-1 に対する免疫組織化学によって、ミクログリアを可視化し、Image J を用いて形状・活性化を評価した。まず、行動を確認したところ、24 時間後においても、sickness behavior が遷延していることが見いだされた。更に、ミクログリア活性化を調べたところ、視床下部弓状核から腹内側核にかけて、ミクログリアの活性化が遷延していることがわかった。

3) 疫学研究

久山町における疫学研究では、地域住民 3025 名のうち、CES-D によりうつ病と評価された者は、男性 3.3%、女性 4.7%であった。男性では、メタボリック症候群を持つ者におけるうつ病の頻度は 7.3%と、非メタボリック症候群の者 (2.8%) より有意に高かった。女性では差は見られなかった。これらのことから、男性では、メタボリック症候群がうつ病の危険因子となる可能性が考えられた。

4) 血管性うつ病の研究

血管性うつ病の長期予後研究では、広島大学病院で入院加療をおこなった 50 歳以上で初発のうつ病患者 172 例でカルテおよび本人・家族への調査票によって、気分障害に関する長期予後および生命予後、認知症、その他の神経学的障害の有無を調査した。5 年以上の経過観察が可能であった 88 例について、頭部 MRI により潜在性脳梗塞の有無を評価し、血管性うつ病群および非血管性うつ病群の 2 群に分類し、長期的な予後について比較した。その結果、血管性うつ病群では、寛解を継続した割合 (5%) が、非血管性うつ病群 (36%) に比して有意に低いことを見出した。10 年転帰では、血管性うつ病では、認知症に進展した割合が有意に多かった。

さらに、脳卒中患者において、定量的 MRI を用いて、病変部位と症状の関連を検討した。初発脳卒中患者 113 例 (68.0±10.2 歳) における解析を行った。臨床評価としては、Hospital Anxiety and Depression scale (HADS)、Apathy score、認知機能検査等を行った。1.5T MRI を撮像し、マニュアルで病変をトレース後 VBM (voxel based morphometry) 解析を行った。

アパシーは基底核病変と関連していた。

抑うつ症状と有意な関連のある病変部位としては、橋を含む脳幹部、左大脳基底核、左前頭葉皮質が見いだされた。

5) 死後脳研究

これまでに蓄積された、高齢者ブレインバンクサンプルに関し、神経病理学的所見とうつ病の有無に関する調査を行った。

高齢者ブレインバンクで剖検され、神経病理学的所見を検討した 611 例中、「depression」の記載がある症例を、データベースを用いて検索した。その結果、精神科受診歴があり、うつ病、躁

うつ病、または双極性障害と診断された者、22名が見いだされた。これらの症例について、経験ある精神科医 (T.K.) がカルテを精査し、後方視的に DSM-IV 基準を適応した。その結果、大うつ病性障害と診断される者は 11 名で、うち 7 名は反復性、4 名は単一エピソードであった。うち 10 名は、脳血管障害、神経原線維変化などの病理学的所見を認めた。

一方、これまでの剖検例のうち、双極性障害の既往を調べたところ、3 名が該当し、1 例 (88 歳男性) は Binswanger 病、1 例 (67 歳男性) は軽度低酸素虚血性変化、1 例 (79 歳男性) は大脳皮質基底核変性症の病理診断であった。

また、高齢者ブレインバンクにおける新たな気分障害の剖検例で、死後脳の病理学的な検索に基づき、症例検討を行った。

症例 1 は、死亡時 81 歳女性である。死亡の 1 年 7 ヶ月前、他人に強く叱責され、精神的不安・不眠・記憶力減退が出現した。認知症初期の疑いとして精神科に紹介されたが、薬物治療で軽快した。うつ状態、不安神経症と診断された。死亡半年前より食事がとれなくなったが、近医で精神的なものだと診断された。その後、悪性リンパ種のため、死亡した。

神経病理学的検索の結果、神経原線維変化はステージ 4、老人斑はステージ 1、嗜銀顆粒ステージ 1、レヴィー小体は認めず、との結果であり、神経原線維変化優位型の老年性変化と考えられた。

症例 2 は、死亡時 70 歳女性である。長女が統合失調症である。50 歳ころより動悸、気分の落ち込みがあり、更年期のうつ症状として、デパスを常用していた。66 歳時、気分の落ち込みが強くなったため、ドグマチールを処方され、パーキンソン症状が出現し、動けなくなった。内服を中止したが改善せず、左優位の安静時振戦、筋強剛より、Yahr II 度の本態性パーキンソン病と診断された。抗パーキンソン病薬に反応し、改善した。67 歳、注意集中力障害、幻視のため、アリセプトを開始した。69 歳時、ADL は車いすレベルで、尿失禁、便秘も出現。70 歳時、Yahr V 度の状態で入院し、肺炎で死亡した。

神経原線維変化ステージ 4、老人斑はステージ 3、嗜銀顆粒ステージ 1、レヴィー小体ステージ 5、との結果であり、病理学的にはアルツハイマー型のびまん性 Lewy 小体病に矛盾しない結果であった。

双極性障害の症例 1 は、67 歳男性で、臨床診断は双極性障害、死因は Non-Hodkin large B cell lymphoma であった。33 歳時、躁うつ病を発症し、合計 9 回の入院歴がある。多弁、多動、気分

高揚、過干渉などがみられた。66 歳時、非ホジキンリンパ腫に罹患し、化学療法を受けていたが、死亡の二ヶ月前より嚥下障害、経口摂取困難となった。躁病による不隠に対し、抗精神薬を投与されたが、その後、死亡した。死後の病理学的検索では、脳には顕著な所見は見られなかった。

症例 2 は、79 歳女性で、臨床診断は、パーキンソン病、双極性感情障害であった。50 歳頃に、玄関に死んだ人が横たわっている、誰かに追いかけてられているといった訴えで、精神科病院に措置入院。53 歳頃より、うつ状態と躁状態を繰り返すようになった。また、73 歳頃より、パーキンソン症候群の診断で投薬を受けた。73 歳時、時間を構わず電話をかける等の躁症状のため、精神科に入院。その後、誤嚥性肺炎にて入院したが、発熱が改善せず、パーキンソン症状も悪化したため、入院。十二指腸潰瘍の併発、貧血、褥創、低栄養状態のため、5 ヶ月の経過で死亡した。病理学的検索では、皮質基底核変性症と診断された。この結果より、双極性障害の中には、既知の神経病理学的変化に伴う場合があると考えられた。

これらの結果より、老年期のうつ病および双極性障害では、前頭側頭型認知症、アルツハイマー病、脳虚血性変化、大脳皮質基底核変性症など、さまざまな神経病理学的変化を伴う場合があることがわかった。

D. 考察

双極性障害モデルマウスの研究では、気分障害の原因脳部位として、視床室傍核、前辺縁/下辺縁皮質などの脳構造の関与が疑われた。

ストレスあるいは免疫賦活によるうつ病モデルを用いた検討では、前辺縁/下辺縁皮質、外側中隔、扁桃体基底外側核、内嗅領皮質、視床室傍核など、前頭辺縁系の諸部位や視床下部の関与が示唆された。

一方、疫学研究および動物モデル研究から、免疫系、メタボリック症候群、脳血管障害など、多彩な因子が気分障害の危険因子となっていることがわかった。

脳卒中患者における MRI の研究では、抑うつ症状と縫線核病変の関連が示唆された。

死後脳研究では、老年期の気分障害患者における検討から、気分障害に関わる神経病理学的変化として、神経原線維変化、老人斑、Lewy 小体、脳虚血性変化など、さまざまな神経病理学的過程が関与する可能性が示唆された。

これらの病理学的変化は、高齢者の気分障害で見られたものであり、気分障害患者全般にも見ら

れるものではないかも知れない。また、これらの病理学的な所見は、うつ病に特異的なものではない。従って、病変の性質もさることながら、責任部位を検討することが特に重要であると考えられた。本研究で明らかになった気分障害関連脳部位に注目し、更に検索を進めることで、うつ病の病態に迫ることができると考えられる。

一方、気分障害の責任部位と考えられる微小脳部位は、脳保存時に損傷されやすいという問題点も判明し、今後の気分障害患者の脳集積においては、こうした気分障害候補部位の保存に注意が必要であると考えられた。

E. 結論

これまでのうつ病研究では、抗うつ薬の作用機序などに注目される場合が多く、脳のどの部位にどのような病理学的異常が生じるのかは、わかっていなかった。

今回の研究により、気分障害患者の少なくとも一部は、神経病理学的検索により検出可能な病変を有していることが明らかとなり、炎症、メタボリック症候群、血管性変化、神経変性など、さまざまな要因による病理学的変化がうつ病の背景となっている可能性が示唆された。更に、ミトコンドリア DNA 変異蓄積などの病変も、気分障害の病態に関与する可能性が考えられた。

しかしながら、気分障害においては、視床下部、脳幹モノアミン神経核、視床など、認知症等とは異なった病変分布を示す可能性が考えられた。

今回の研究から、これまで、機能的疾患と考えられてきた気分障害においても、剖検により、既存の手法を用いた神経病理学的な検索を行うことが必要であることが示唆された。更に、神経変性、脳血管病変などの病変だけでなく、新たな手法を用いた病変の可視化技術の開発・応用も必要と考えられた。

また、今回の知見は、動物モデルと高齢うつ病患者の死後脳所見に基づくものであり、今後は幅広い年齢の気分障害患者、双極性障害患者において、動物モデルで見られたような所見が確認されるかどうかを明らかにしていく必要がある。

しかしながら、現状では、精神疾患患者の死後脳集積はほとんど行われていない。

本研究の結果は、今後、気分障害を初めとする精神疾患患者の死後脳を集積するブレインバンクを設立し、研究を推進することが必要であることを示している。

F. 研究発表

1. 論文発表

(平成 21 年度)

Bundo M, Iwamoto K, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T. Mutation screening and assessment of the effect of genetic variations on expression and RNA editing of serotonin receptor 2C in the human brain. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2009 Dec 10.

Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ishiwata M, Ueda J, Kakiuchi C, Ishigooka J, Kato T. Effect of mood stabilizers on gene expression in lymphoblastoid cells. *J Neural Transm*. 2010 Feb;117(2):155-64.

Hashioka S, McGeer PL, Monji A, Kanba S. Anti-inflammatory effects of antidepressants: possibilities for preventives against Alzheimer's disease. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2009 Mar;9(1):12-9.

Okada G, Okamoto Y, Yamashita H, Ueda K, Takami H, Yamawaki S. Attenuated prefrontal activation during a verbal fluency task in remitted major depression. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2009 Jun;63(3):423-5.

Tokumaru AM, Saito Y, Murayama S, Kazutomi K, Sakiyama Y, Toyoda M, Yamakawa M, Terada H. Imaging-pathologic correlation in corticobasal degeneration. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009 Nov;30(10):1884-92.

Ishibashi K, Saito Y, Murayama S, Kanemaru K, Oda K, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K. Validation of cardiac (123I)-MIBG scintigraphy in patients with Parkinson's disease who were diagnosed with dopamine PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010 Jan;37(1):3-11.

加藤忠史 (2010) 双極性障害における神経生物学的研究 *ビオフィリア* 6: 25-28

加藤忠史 (2010) うつ病の分子生物学的研究 別冊・医学のあゆみ「うつ病のすべて」:172-175

笠原和起、加藤忠史 (2010) 双極性障害モデル 実験動物 生体の科学 6: 59-64

加藤忠史 (2010) 病因・病態 成因仮説 最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 9/気分障

加藤忠史 (2010) ミトコンドリア DNA と気分障害 医学のあゆみ 232: 735-739

(平成 22 年度)

Kubota M, Kasahara T, Iwamoto K, Komori A, Ishiwata M, Miyauchi T, Kato T. Therapeutic implications of down-regulation of cyclophilin D in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010 Nov;13(10):1355-68.

Fuke S, Kubota-Sakashita M, Kasahara T, Shigeyoshi Y, Kato T. Regional variation in mitochondrial DNA copy number in mouse brain. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Mar;1807(3):270-4. Epub 2010 Dec 8.

Iwamoto K, Ueda J, Bundo M, Kojima T, Kato T. Survey of the effect of genetic variations on gene expression in human prefrontal cortex and its application to genetics of psychiatric disorders. *Neurosci Res.* 2011 Mar 4.

Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Ishigooka J, Kato T. Comprehensive DNA methylation analysis of human peripheral blood leukocytes and lymphoblastoid cell lines. *Epigenetics.* 2011 Apr 1;6(4):508-15.

Horikawa H, Kato TA, Mizoguchi Y, Monji A, Seki Y, Ohkuri T, Gotoh L, Yonaha M, Ueda T, Hashioka S, Kanba S. Inhibitory effects of SSRIs on IFN- γ induced microglial activation through the regulation of intracellular calcium. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010 Oct 1;34(7):1306-16

Hama S, Yamashita H, Yamawaki S, Kurisu K. Post-stroke depression and apathy: Interactions between functional recovery, lesion location, and emotional response. *Psychogeriatrics.* 2011 Mar;11(1):68-76.

Yamashita H, Fujikawa T, Takami H, Yanai I, Okamoto Y, Morinobu S, Yamawaki S. Long-term prognosis of patients with major depression and silent cerebral infarction. *Neuropsychobiology.* 2010 Aug;62(3):177-81.

Ishibashi K, Kanemaru K, Saito Y, Murayama S, Oda K, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K. Cerebrospinal fluid metabolite and nigrostriatal dopaminergic function in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 2010 Jul;122(1):46-51. Epub 2009 Nov 28.

加藤忠史 (2010) 生物リズムと双極性障害 脳 21 13: 383-389

加藤忠史 (2010) 総論: うつ病の多様性と生物学—特集にあたって— *Medical Bio* 7: 21-25

加藤忠史 (2010) 双極性障害における神経生物学的研究 *ビオフィリア* 6: 25-28

加藤忠史 (2011) ミトコンドリア DNA と気分障害 別冊・医学のあゆみ「ここまでわかったミトコンドリア研究の新展開」 97-101

高田篤、加藤忠史 (2011) 視床室傍核 分子精神医学 11: 62-67

(平成 23 年度)

Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Miyauchi T, Komori A, Kazuno A, Adati N, Kusumi I, Okazaki Y, Ishigooka J, Kojima T, Kato T (2011) Hypermethylation of serotonin transporter gene in bipolar disorder detected by epigenome analysis of discordant monozygotic twins *Translational Psychiatry* 1: e24.

Takata A, Kim SH, Ozaki N, Iwata N, Kunugi H, Inada T, Ujike H, Nakamura K, Mori N, Ahn YM, Joo EJ, Song JY, Kanba S, Yoshikawa T, Kim YS, Kato T. Association of ANK3 with bipolar disorder confirmed in East Asia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011 Apr;156B(3):312-5.

Takata A, Kato M, Nakamura M, Yoshikawa T, Kanba S, Sano A, Kato T (2011) Exome sequencing identifies a novel missense variant in RRM2B associated with autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia. *Genome Biol* 12: 9. Sep

Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y. Glucose

- tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. *Neurology*. 2011 Sep 20;77(12):1126-34.
- Matsuzaki T, Sasaki K, Hata J, Hirakawa Y, Fujimi K, Ninomiya T, Suzuki SO, Kanba S, Kiyohara Y, Iwaki T. Association of Alzheimer disease pathology with abnormal lipid metabolism: the Hisayama Study. *Neurology*. 2011 Sep 13;77(11):1068-75.
- Takata A, Kawasaki H, Iwayama Y, Yamada K, Gotoh L, Mitsuyasu H, Miura T, Kato T, Yoshikawa T, Kanba S. Nominal association between a polymorphism in DGKH and bipolar disorder detected in a meta-analysis of East Asian case-control samples. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2011 Apr;65(3):280-5.
- Kato TA, Monji A, Yasukawa K, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Hashioka S, Han YH, Kasai M, Sonoda N, Hirata E, Maeda Y, Inoguchi T, Utsumi H, Kanba S. Aripiprazole inhibits superoxide generation from phorbol-myristate-acetate (PMA)-stimulated microglia in vitro: implication for antioxidative psychotropic actions via microglia. *Schizophr Res*. 2011 Jul;129(2-3):172-82.
- Sawa M, Yamashita H, Fujimaki K, Okada G, Takahashi T, Yamawaki S. Depressive symptoms and apathy are associated with psychomotor slowness and frontal activation. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2012
- Okada G, Okamoto Y, Kunisato Y, Aoyama S, Nishiyama Y, Yoshimura S, Onoda K, Toki S, Yamashita H, Yamawaki S. The effect of negative and positive emotionality on associative memory: an FMRI study. *PLoS One*. 2011;6(9):e24862.
- Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y: the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Altered γ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med*. 2012 Apr;4(4):344-352.
- Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E. Dissociation of β -amyloid from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates β -amyloid-42 assembly. *J Neurosci Res*. 2011 Jun;89(6):815-21.
- 窪田 美恵 , 加藤 忠史. 変異 Polg1 トランスジェニックマウスの双極性障害動物モデルとしての有用性. *日本生物学的精神医学会誌* 22(2), 109-116, 2011
- 笠原 和起 , 加藤 忠史. 双極性障害におけるミトコンドリア DNA ポリメラーゼ遺伝子のまれな点変異の網羅的解析. *日本生物学的精神医学会誌* 22(2), 97-102, 2011
- 加藤 忠史. 気分障害の分子神経生物学 (シンポジウム 気分障害の生物学的研究の最新動向--DSM,ICD 改訂に向けて) *精神医学* 53(4), 373-381, 2011
- 高田 篤 , 加藤 忠史. 双極性障害の分子生物学の最近の進歩. *臨床精神医学* 40(3), 291-298, 2011
- 神庭 重信. うつ病の精神薬理・生化学的研究を概観する *精神医学* 53(4), 357-362, 2011
- 齊藤 祐子 , 足立 正 , 村山 繁雄. 嗜銀顆粒. *日本臨床* 69(-) (1008), 161-165, 2011
- 村山 繁雄 , 齊藤 祐子. Braak 分類. *日本臨床* 69(-) (1008), 153-160, 2011
- 村山 繁雄 , 齊藤 祐子. 認知症の病理学. *総合臨床* 60(9), 1805-1808, 2011
- G.知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他

研究成果の刊行一覧表（平成 21 年度）

加藤 忠史

氏名	タイトル	雑誌／書籍名	巻	頁	年
Bundo M, Iwamoto K, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T.	Mutation screening and assessment of the effect of genetic variations on expression and RNA editing of serotonin receptor 2C in the human brain.	Psychiatry Clin Neurosci.	64	57-61	2009
Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ishiwata M, Ueda J, Kakiuchi C, Ishigooka J, Kato T.	Effect of mood stabilizers on gene expression in lymphoblastoid cells.	J Neural Transm.	117 (2)	155-64	2010
Hashioka S, McGeer PL, Monji A, Kanba S.	Anti-inflammatory effects of antidepressants: possibilities for preventives against Alzheimer's disease.	Cent Nerv Syst Agents Med Chem.	9	12-19	2009
Okada G, Okamoto Y, Yamashita H, Ueda K, Takami H, Yamawaki S.	Attenuated prefrontal activation during a verbal fluency task in remitted major depression.	Psychiatry Clin Neurosci.	63 (3)	423-25	2009
Tokumaru AM, Saito Y, Murayama S, Kazutomi K, Sakiyama Y, Toyoda M, Yamakawa M, Terada H.	Imaging-pathologic correlation in corticobasal degeneration.	AJNR Am J Neuroradiol.	30 (10)	1884-92	2009
Ishibashi K, Saito Y, Murayama S, Kanemaru K, Oda K, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K.	Validation of cardiac (123)I-MIBG scintigraphy in patients with Parkinson's disease who were diagnosed with dopamine PET.	Eur J Nucl Med Mol Imaging.	37 (1)	3-11	2010

加藤忠史	双極性障害における神経生物学的研究	ビオフィリア	6	25-28	2010
加藤忠史	うつ病の分子生物学的研究	別冊・医学のあゆみ「うつ病のすべて」		172-175	2010
笠原和起、加藤忠史	双極性障害モデル実験動物	生体の科学	6	59-64	2010
加藤忠史	病因・病態 成因仮説	最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC 9 / 気分障害(躁うつ病 改訂第2版)		32-39	2010
加藤忠史	ミトコンドリア DNA と気分障害	医学のあゆみ	232	735-739	2010

研究成果の刊行一覧表（平成 22 年度）

加藤 忠史

氏名	タイトル	雑誌／書籍名	巻	頁	年
Kubota M, Kasahara T, Iwamoto K, Komori A, Ishiwata M, Miyachi T, Kato T.	Therapeutic implications of down-regulation of cyclophilin D in bipolar disorder.	Int J Neuropsychopharmacol.	J 13 (10)	1355-68	2010
Fuke S, Kubota-Sakashita M, Kasahara T, Shigeyoshi Y, Kato T.	Regional variation in mitochondrial DNA copy number in mouse brain.	Biochim Biophys Acta.	1807 (3)	270-4	2011
Iwamoto K, Ueda J, Bundo M, Kojima T, Kato T.	Survey of the effect of genetic variations on gene expression in human prefrontal cortex and its application to genetics of psychiatric disorders.	Neurosci Res.			2011
Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Ishigooka J, Kato T.	Comprehensive DNA methylation analysis of human peripheral blood leukocytes and lymphoblastoid cell lines.	Epigenetics.	6(4)	508-15.	2011
Horikawa H, Kato TA, Mizoguchi Y, Monji A, Seki Y, Ohkuri T, Gotoh L, Yonaha M, Ueda T, Hashioka S, Kanba S.	Inhibitory effects of SSRIs on IFN- γ induced microglial activation through the regulation of intracellular calcium.	Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry	34(7)	1306-16	2010

Hama Yamashita Yamawaki Kurusu K.	S, H, S, location, and emotional response.	Post-stroke depression and apathy: Interactions between functional recovery, lesion location, and emotional response.	Psychogeriat rics.	11(1)	68-76.	2011
Yamashita Fujikawa Takami H, Yanai I, Okamoto Morinobu Yamawaki S.	H, T, Y, S, S.	Long-term prognosis of patients with major depression and silent cerebral infarction.	Neuropsychology.	62(3)	177-81.	2010
Ishibashi Kanemaru K, Saito Y, Murayama S, Oda K, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K.	K, S, S, K, K, K.	Cerebrospinal fluid metabolite and nigrostriatal dopaminergic function in Parkinson's disease.	Acta Neurol Scand	122 (1)	46-51	2010
加藤忠史	生物リズムと双極性障害	脳 21		13	383 -389	2010
加藤忠史	総論：うつ病の多様性と生物学 —特集にあたって—	Medical Bio		7	21-25	2010
加藤忠史	双極性障害における神経生物 学的研究	ビオフィリア		6	25-28	2010
加藤忠史	ミトコンドリア DNA と気分障 害	別冊・医学の あゆみ「ここ までわかった ミトコンドリ ア研究の新展 開」			97-101	2011
高田篤、加藤忠史	視床室傍核	分子精神医学		11	62-67	2011

研究成果の刊行一覧表（平成 23 年度）

加藤 忠史

氏名	タイトル	雑誌／書籍名	巻	頁	年
Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Miyachi T, Komori A, Kazuno A, Adati N, Kusumi I, Okazaki Y, Ishigooka J, Kojima T, Kato T.	Hypermethylation of serotonin transporter gene in bipolar disorder detected by epigenome analysis of discordant monozygotic twins	Translational Psychiatry	1	e24.	2011
Takata A, Kim SH, Ozaki N, Iwata N, Kunugi H, Inada T, Ujike H, Nakamura K, Mori N, Ahn YM, Joo EJ, Song JY, Kanba S, Yoshikawa T, Kim YS, Kato T.	Association of ANK3 with bipolar disorder confirmed in East Asia.	Am J Med Genet B (3) Neuropsychiatr Genet.	156B	312-5.	2011
Takata A, Kato M, Nakamura M, Yoshikawa T, Kanba S, Sano A, Kato T	Exome sequencing identifies a novel missense variant in RRM2B associated with autosomal recessive progressive external ophthalmoplegia.	Genome Biol	12.	9	2011
Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y.	Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study.	Neurology.	77(12)	1126-34.	2011

Matsuzaki T, Sasaki K, Hata J, Hirakawa Y, Fujimi K, Ninomiya T, Suzuki SO, Kanba S, Kiyohara Y, Iwaki T.	Association of Alzheimer disease pathology with abnormal lipid metabolism: the Hisayama Study.	Neurology.	77(11)	1068-7	2011
Takata A, Kawasaki H, Iwayama Y, Yamada K, Gotoh L, Mitsuyasu H, Miura T, Kato T, Yoshikawa T, Kanba S.	Nominal association between a polymorphism in DGKH and bipolar disorder detected in a meta-analysis of East Asian case-control samples.	Psychiatry Clin Neurosci.	65(3)	280-5.	2011
Kato TA, Monji A, Yasukawa K, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Hashioka S, Han YH, Kasai M, Sonoda N, Hirata E, Maeda Y, Inoguchi T, Utsumi H, Kanba S.	Aripiprazole inhibits superoxide generation from phorbol-myristate-acetate (PMA)-stimulated microglia in vitro: implication for antioxidative psychotropic actions via microglia.	Schizophr Res. Jul:	129(2)	172-82.	2011
Sawa M, Yamashita H, Fujimaki K, Okada G, Takahashi T, Yamawaki S.	Depressive symptoms and apathy are associated with psychomotor slowness and frontal activation.	Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.			2012
Okada G, Okamoto Y, Kunisato Y, Aoyama S, Nishiyama Y, Yoshimura S, Onoda K, Toki S, Yamashita H, Yamawaki S.	The effect of negative and positive emotionality on associative memory: an fMRI study.	PLoS One.	6(9)	e24862	2011

Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y; the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.	Altered γ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.	EMBO Mol Med.	4(4)	344-352.	2012
Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawahima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E.	Dissociation of β -amyloid from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates β -amyloid-42 assembly.	J Neurosci Res.	89(6)	815-21.	2011
窪田美恵 ,加藤忠史	変異 Polg1 トランスジェニックマウスの双極性障害動物モデルとしての有用性.	日本生物学的精神医学会誌	22(2),	109-116,	2011
笠原和起 ,加藤忠史	双極性障害におけるミトコンドリア DNA ポリメラーゼ遺伝子のまれな点変異の網羅的解析.	日本生物学的精神医学会誌	22(2),	97-102,	2011

加藤忠史	気分障害の分子神経生物学 (シンポジウム 気分障害の生物学的研究の最新動向--DSM,ICD改訂に向けて)	精神医学	53(4), 373-381,	2011
高田篤, 加藤忠史	双極性障害の分子生物学の最近の進歩.	臨床精神医学	40(3), 291-298,	2011
神庭重信	うつ病の精神薬理・生化学的研究を概観する	精神医学	53(4), 357-362,	2011
齊藤祐子, 足立正, 村山繁雄.	嗜銀顆粒.	日本臨床	69(-) (1008), 161-165,	2011
村山繁雄, 齊藤祐子.	Braak 分類.	日本臨床	69(-) (1008), 153-160,	2011
村山繁雄, 齊藤祐子.	認知症の病理学.	総合臨床	60(9) 1805-1808,	2011

平成 21 年度 資 料

Regular Article

Mutation screening and assessment of the effect of genetic variations on expression and RNA editing of serotonin receptor 2C in the human brain

Miki Bundo, PhD,¹ Kazuya Iwamoto, PhD,¹ Kazuo Yamada, MD, PhD,²
Takeo Yoshikawa, MD, PhD² and Tadafumi Kato, MD, PhD^{1*}

¹Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders and ²Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute, Saitama, Japan

Aim: Serotonin receptor 2C (*HTR2C*) has been postulated as being involved in the etiology or pathophysiology of mental disorders such as bipolar disorder, major depression and schizophrenia. We previously revealed the altered mRNA expression and RNA editing of *HTR2C* in the postmortem brains of patients with mental disorders. Here we examined the relationship between genetic variations and expression level or RNA editing level of *HTR2C* in the human brain.

Methods: We performed mutation screening of the *HTR2C* gene by sequencing all exons, exon–intron boundaries, and promoter region in the same cohort

used for expression and RNA editing studies ($n = 58$). Using the detected genetic variations, we examined the relationship between genetic variations and expression or RNA editing level.

Results and conclusion: We did not find novel mutations or single nucleotide polymorphisms that were specific to patients. Genotype and haplotype-based analyses revealed that genetic variations of *HTR2C* did not account for observed altered expression or RNA editing level of *HTR2C* in the brain.

Key words: bipolar disorder, depression, *HTR2C*, postmortem brain, schizophrenia.

SEROTONIN IS A monoamine neurotransmitter that plays important roles in regulation of mood, appetite, sexual behavior and anxiety. Serotonin receptor 2C (*HTR2C*) encodes a G protein-coupled receptor that activates phospholipase C. Knock-out mice for this gene showed various phenotypic and behavioral alterations including seizure, enhanced exploration of a novel environment, and dysregulation of anxiety-related behaviors,^{1–3} implicating the involvement of this gene in the pathophysiology of mental disorders. Several studies also reported the

significant associations between genetic variations of *HTR2C* and major depression (MD), bipolar disorder (BD),^{4,5} increased risk for lifetime hospitalization in schizophrenia (SZ),⁶ and psychotic symptoms of Alzheimer's disease.^{7,8} Among the known 14 serotonin receptors, *HTR2C* has a unique feature in that its pre-mRNA undergoes adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA editing by adenosine deaminases.⁹ In A-to-I RNA editing, the translation machinery recognizes inosine as guanosine, resulting in changes in amino acid sequences. In cases of *HTR2C*, there are five editable positions (termed sites A to E) in exon 5 (Fig. 1), which theoretically result in a generation of up to 24 different *HTR2C*, in terms of amino acid sequences.^{9,10}

In the studies using postmortem brains, decreased expression of *HTR2C* was reported in patients with SZ,^{11,12} and altered RNA editing in patients with SZ,¹³ MD,¹⁴ and BD¹⁵ as well as an animal model of depression.¹⁶ Consistent with these results, we have also

*Correspondence: Tadafumi Kato, MD, PhD, Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan. Email: kato@brain.riken.jp

Received 10 March 2009; revised 13 October 2009; accepted 26 October 2009.

Specification of field: molecular psychiatry and psychobiology

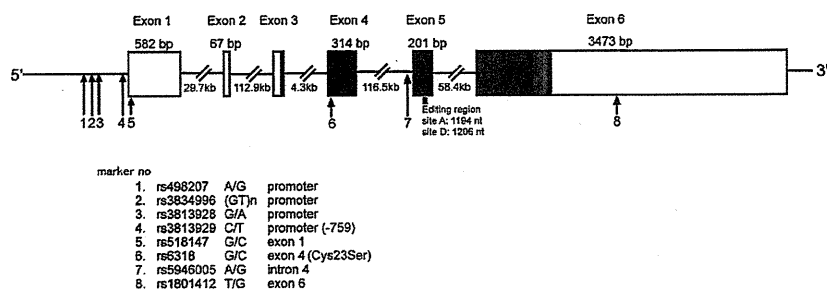


Figure 1. Genomic structure of the serotonin receptor 2C (*HTR2C*) gene. Exons are denoted by boxes, with untranslated regions in white and translated regions in black. SNP detected in this study are indicated by arrows. SNP are denoted as major allele/minor allele. RNA editing sites are indicated by a black bar.

revealed decreased expression of *HTR2C* in brains of patients with SZ and BD,¹⁷ and altered RNA editing status in major depression and suicide victims.¹⁸ To examine the possible cause of the altered status of expression and RNA editing, we here performed mutation screening of the *HTR2C* gene in the same cohort used in previous studies. We then examined the effect of genetic variations on expression and RNA editing level of *HTR2C* in the brain.

METHODS

Postmortem samples

Postmortem liver samples corresponding to prefrontal cortex samples, using previous expression¹⁷ and RNA editing¹⁸ studies, were donated by the Stanley Medical Research Institute (SMRI). This sample set, called Consortium Collection, consisted of patients with BD, MD and SZ, as well as control subjects. Each diagnostic group consisted of 15 subjects. Diagnosis had been made according to the DSM-IV criteria. Detailed information about subjects are found elsewhere.¹⁹ Of the 60 liver samples, we successfully extracted genomic DNA from 58 samples (15 BD, 15 MD, 14 SZ, and 14 controls) by standard phenol-chloroform extraction method.

Polymerase chain reaction and DNA sequencing

To screen the mutations in the *HTR2C* genomic region, we sequenced all exons, exon–intron boundaries, and the promoter region (Fig. 1). The polymerase chain reaction (PCR)-amplified regions, primer pairs and PCR conditions are available upon request. PCR products were sequenced with a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and a 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

The number of dinucleotide repeats at a microsatellite (rs3834996) was determined by 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using primers FAM-labeled 5'-TGCTGTTTGTGAAATGAAATG-3' and 5'-GTTTCITGAGAGGGAAGGCTTTCTCAA-3'.

Data analysis

In the genotype- and haplotype-based analyses, one-way ANOVA was conducted using the genotype or haplotype as the factor variable, and expression level or RNA editing efficiency as the dependent variable using SPSS 11.0J software (SPSS Japan). In cases where the number of informative genotypes or haplotypes was too small (≤ 2), we omitted that group from the ANOVA. We employed the Student's *t*-test for two-group comparison. $P < 0.05$ was considered to be significant. Previously determined *HTR2C* expression level¹⁷ and RNA editing efficiency¹⁸ in postmortem prefrontal cortex (Brodmann's Area 10) were used for data analysis. Of the five edited sites, editing efficiency of two sites (sites A and D) were available.²⁰ Power analysis was performed using G*power software.²¹

RESULTS

The genomic structure of the *HTR2C* gene (Xq24) is shown in Fig. 1. We sequenced all six exons, exon–intron boundaries and the promoter region (about 500 bp upstream region from exon 1) in a total of 58 subjects (15 BD, 15 MD, 14 SZ, and 14 controls). We detected seven SNP and a dinucleotide (GT) repeat polymorphism in these subjects (Fig. 1). All polymorphisms are known genetic variations and could be found in the SNP database. Among them, the rs3813929 (-795C/T) was reported to alter transcriptional activities by *in vitro* reporter assays, and the rs6318 (Cys23Ser) was shown to alter receptor activ-