

where A β was eluted, 100- μ l fractions were analyzed by A β M-specific BNT77-BA27 or BNT77-BC05 ELISA as described previously in detail (Matsubara et al., 2004). With regard to ELISA specific for A β Os, a chemiluminescence-based ELISA was carried out to detect specifically A β Os, not monomeric A β . Microplates (Maxisorp White Microplate; Nunc, Roskilde, Denmark) were precoated with monoclonal 2C3 (IgG2b isotype) and sequentially incubated for 24 hr at 4°C with 100 μ l of different samples, followed by 24-hr incubation at 4°C with horseradish-peroxidase-conjugated BA27 Fab' fragment (anti-A β ₁₋₄₀ antibody, specific for A β ₄₀; Wako) or horseradish-peroxidase-conjugated BC05 Fab' fragment (anti-A β ₃₅₋₄₃ antibody, specific for A β ₄₂, Wako). Chemiluminescence was developed using SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL) on a Veritas microplate luminometer (Promega, Madison, WI).

Human Materials Including Brain and CSF

All human brains were used under a protocol provided by the human studies committee for research-related use of human materials of the Faculty of Medicine, University of Tokyo; Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology; Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital; and National Center for Geriatrics and Gerontology. This research project was approved by the local ethical committee of the Faculty of Medicine, University of Tokyo; Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology; Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital; and National Center for Geriatrics and Gerontology.

Statistical Analyses

We used factorial design analysis of variance (ANOVA) or Student's unpaired *t*-test to analyze data as appropriate. Significant ANOVA values were subsequently subjected to analyses of simple main effects or post hoc comparisons of individual means using Tukey's or Dunnett's method as appropriate. We considered $P \leq 0.05$ as significant for all studies.

RESULTS AND DISCUSSION

We determined the ability of monoclonal 2C3 to capture A β oligomers in AD-affected brains. Multiple "saline-soluble" A β species with molecular masses corresponding to those of 1-, 2-, 4-, 8-, and 12-mers were immunoprecipitated using monoclonal 6E10 from the cerebral cortex of the AD brain (Fig. 1A, lane 1). In contrast, monoclonal 2C3 unequivocally retrieved "soluble" 4-, 8-, and 12-mers from the AD brain (Fig. 1A, lane 2), but not those from the control brain (Fig. 1A, lane 3) under the conditions studied. These findings clearly demonstrated that monoclonal 2C3 is specific to A β Os, not A β M.

Among the soluble oligomers identified, 12-mer has been shown as a candidate A β assembly responsible for plaque-independent cognitive decline in AD (Lesné et al., 2006). We then assessed the levels of 12-mer in saline-soluble fractions by immunoblotting using monoclonal 2C3 in 50 autopsy cases as previously reported (Katsuno et al., 2005): the entorhinal cortices (ECs)

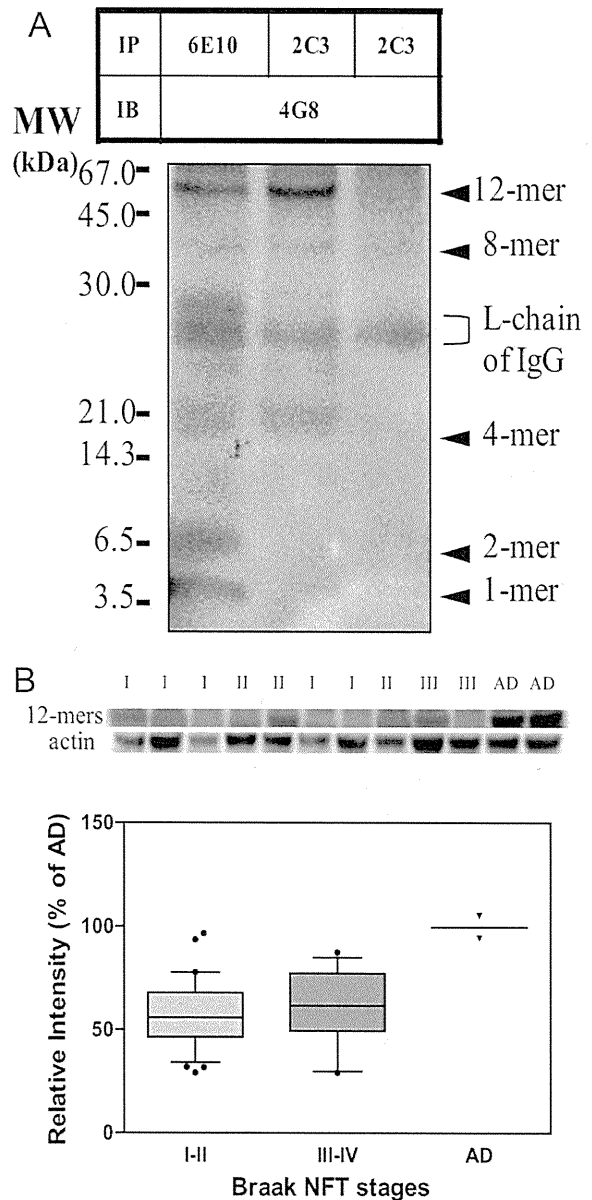


Fig. 1. Soluble oligomeric 2C3 conformers exist in human brain. **A**: 4G8 immunodetection of 6E10 or 2C3 immunoprecipitates in saline-soluble AD brain (lanes 1, 2) and control brain (lane 3). **B**: Relative intensity (percentage AD) of soluble 2C3-immunoreactive 12-mer in human entorhinal cortices obtained from 50 autopsy cases from the general aged population (Braak NFT stages I-II, $n = 35$; Braak NFT stages III-IV, $n = 13$; Braak NFT stages > IV, AD cases, $n = 2$).

were obtained from two AD individuals, 35 individuals with Braak NFT stages I-II, and 13 individuals with Braak NFT stages III-IV. As depicted in Figure 1B, approximately 45% and 60% levels of 12-mer (AD cases,

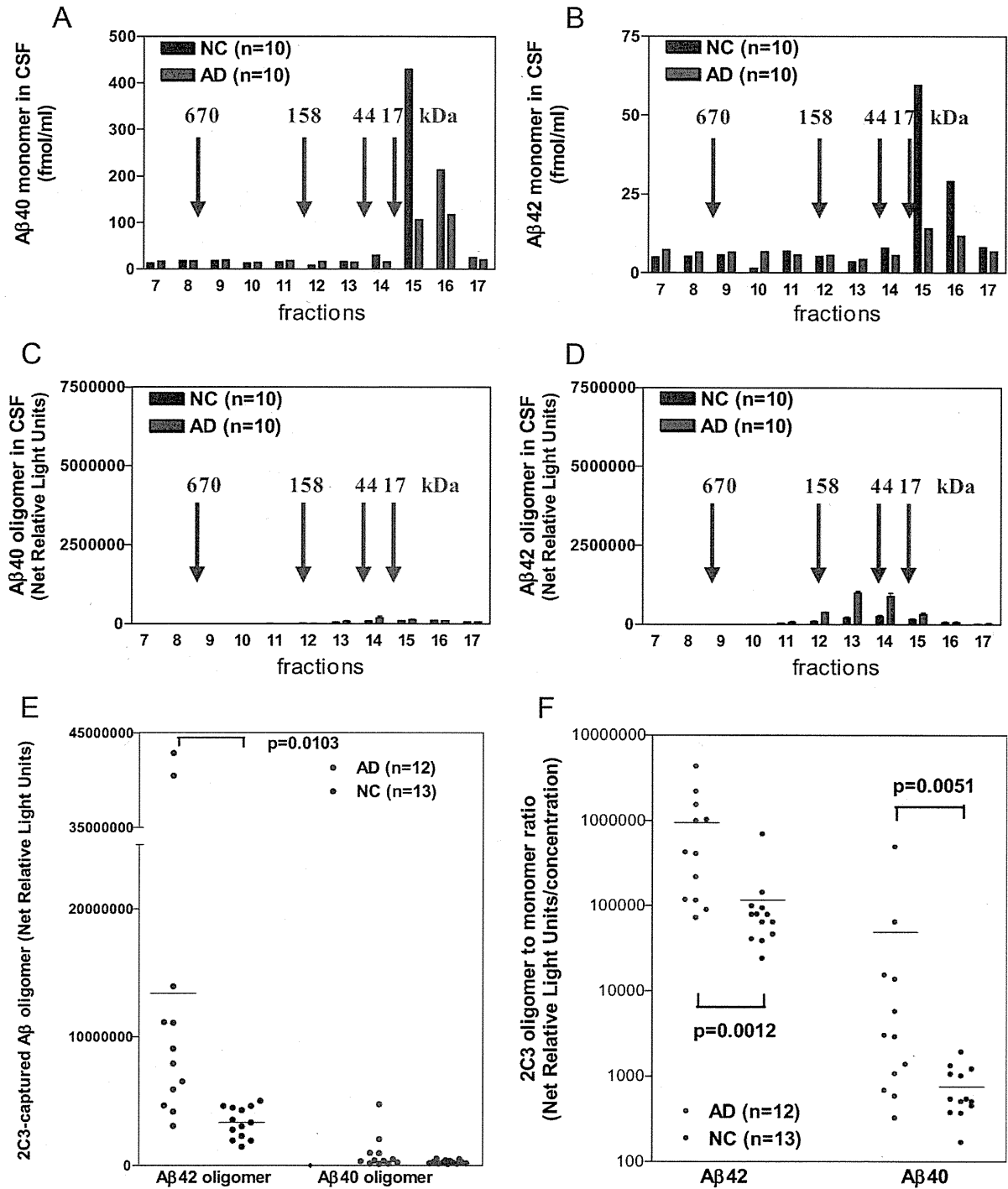


Fig. 2. Characterization of soluble oligomeric 2C3 conformers in human CSF. The presence of AβMs was analyzed by size-exclusion chromatography (SEC) using pooled whole CSF (A,B): Aβ_{x-40} monomers (A) vs. Aβ_{x-42} monomers (B). The presence of AβOs was analyzed by SEC using pooled lipoprotein-depleted CSF (C,D): Aβ_{x-40} oligomers (C) vs. Aβ_{x-42} oligomers (D). E: Quantitation of

oligomeric 2C3 conformers measured in 12 AD patients (red circles) and 13 NC subjects (blue circles). F: Aβ₄₂ O/M index vs. Aβ₄₀ O/M index. Horizontal bars indicate the mean values. The statistical significance in comparison with the age-matched control group was analyzed by the Mann-Whitney test.

100%) had already accumulated in the ECs from NCs (Braak NFT stages I–II) and in those with mild cognitive impairment (Braak stages III–IV), respectively, suggesting that the accumulation of 12-mer precedes the appearance of cognitive impairment and increases as the Braak NFT stages progress. These findings clearly showed that the ECs of AD patients exhibit metabolic conditions that accelerate A β assembly.

To assess further the disease-related metabolic conditions, we focused on CSF, which mimics CNS environments. By a novel 2C3-based ELISA specific for sA β O_s and BNT77-based ELISAs specific for sA β M_s (Enya et al., 1999; Funato et al., 1999), we directly evaluated the disease-related metabolic conditions in CSF. To investigate the presence of native sA β O_s, pooled, native, whole CSF (Fig. 2A,B) and pooled lipoprotein-depleted CSF (Fig. 2C,D) were subjected to SEC. Total cholesterol was detected in whole CSF fractions 7–14, indicative of lipoprotein-associated fractions. BNT77-based ELISAs revealed that the levels of lipoprotein-associated A β M_s (fractions 7–14) in AD were similar to normal control levels (Fig. 2A,B), whereas the levels of lipoprotein-free A β _{x-40} monomers (Fig. 2A) and A β _{x-42} monomers (Fig. 2B) in native whole CSF were lower in AD than in age-matched normal controls. In contrast, ELISA of the oligomeric 2C3 conformer in pooled, lipoprotein-depleted CSF revealed the presence of larger A β species in fractions 12–15 with molecular masses ranging from 17 to 158 kDa, corresponding to 4- to 35-mers (Fig. 2C,D). The levels of the oligomeric 2C3 conformer in each fraction appeared to be higher in AD patients than in normal controls. To assess further the pathological relevance of this finding, the oligomeric 2C3 conformer was measured in 12 AD patients and 13 NCs. To address the issue on the presence of any metabolic conditions favoring A β assembly, A β M_s were also measured to evaluate the A β O_s/A β M_s ratio (the O/M index). Interestingly, the levels of oligomeric 2C3 conformers composed of A β ₄₂, not A β ₄₀, are significantly higher in AD patients than in NCs ($P = 0.0103$; Fig. 1E). Noticeably, the O/M index for either A β ₄₂ or A β ₄₀ is significantly higher in AD patients than in NCs: A β ₄₂ O/M index ($P = 0.0012$) vs. A β ₄₀ O/M index ($P = 0.0051$; Fig. 1F). Recently, Fukumoto et al. (2010) reported a similar finding, supporting the reliability of our finding. Another group also reported that the levels of A β O_s in CSF are significantly higher in AD patients than in NCs (Georganopoulou et al., 2005). Along with our findings, it is likely that the conversion of lipoprotein-free monomeric soluble A β into oligomeric assembly preferentially occurs in AD CSF, mirroring the disease-related metabolic conditions in the brain parenchyma. In support of our findings, a similar AD-related environmental alteration in CSF has been suggested (Ikeda et al., 2010). In contrast, it has been hypothesized that lower CSF A β ₄₂ levels in AD patients can be ascribed to sequestration of soluble A β ₄₂ into amyloid plaques. Several lines of evidence support this hypothesis; for example, an inverse correlation was

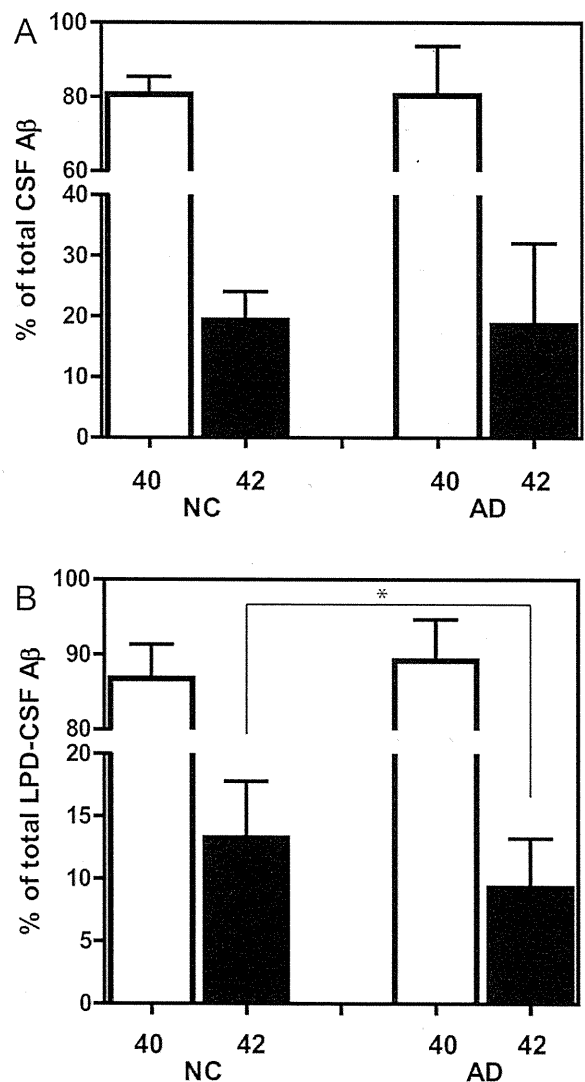


Fig. 3. Quantitation of A β ₄₀ and A β ₄₂ in native and lipoprotein-depleted CSF. The relative amounts (mean \pm SD expressed as the percentage of total A β) of A β ₄₀ (open bars) and A β ₄₂ (solid bars) were quantitated in whole CSF (A) and lipoprotein-depleted CSF (B) in age-matched controls (NCs) and patients with sporadic Alzheimer's disease (AD). The levels of soluble A β species were measured by BNT-77-BA27 or BNT77-BC05 ELISA as described in Materials and Methods. Student's unpaired *t*-test revealed a statistically significant reduction ($*P = 0.0305$) in the relative amount of lipoprotein-free A β ₄₂ in sporadic AD patients.

found between CSF A β ₄₂ levels and brain amyloid burden as evaluated by Pittsburgh compound B (PIB)-PET imaging (Klunk et al., 2004; Fagan et al., 2006). We have clarified this issue by comparing the levels of lipoprotein-free sA β M_s in lipoprotein-depleted CSF from the 12 sporadic AD patients and 13 NCs. In the case of whole CSF, the relative amounts of sA β M_s were similar in both groups (Fig. 3A). The LPD-CSF total A β M

levels in both groups were relatively constant (302.8 ± 203.1 fmol/ml in sporadic AD patients and 463.9 ± 332.4 fmol/ml in NCs). In relative terms, the LPD-CSF A β M values represented $31.6\% \pm 20.7\%$ of the total A β in sporadic AD patients and $32.2\% \pm 13.5\%$ of the total A β M in NCs. Although these relative amounts of total lipoprotein-associated sA β M (~70%) vs. lipoprotein-free sA β M (~30%) remained essentially unchanged in sporadic AD patients, the amount of lipoprotein-free A β_{42} was significantly lower ($P = 0.0305$) in the sporadic AD patients ($9.3\% \pm 3.9\%$) than in NCs ($13.2\% \pm 4.5\%$; Fig. 3B), which is in accordance with our above-mentioned finding that the level of oligomeric 2C3 conformers composed of A β_{42} was significantly elevated in AD patients ($P = 0.0103$; see Fig. 2E). Note that about 70% of CSF sA β M are normally associated with lipoprotein particles, whereas ~90% of sA β M that circulate in normal plasma are associated with lipoprotein particles (Matsubara et al., 1999). These findings clearly indicate that the CNS constitutes a risky environment in which the lipoprotein-sA β M interaction is impaired, leading to A β assembly. From this point of view, a key molecule to maintain monomeric sA β_{42} metabolism in CNS appears to be HDL-like lipoprotein particles. A similar intracerebral sequestration of sA β M by an anti-A β antibody has been proposed to prevent the accumulation of toxic A β assemblies (Yamada et al., 2009). In the case of HDL, a previous study showed that A β depositions is enhanced in PDAPP transgenic mice under conditions of markedly suppressed HDL (Wahrle et al., 2005), whereas A β depositions is inhibited in PDAPP transgenic mice under conditions of markedly overexpressed HDL (Wahrle et al., 2008). ApoE4-HDL shows less cholesterol exchange between lipid particles and the neuronal membrane compared with apoE3-HDL (Zou et al., 2002), leading to altered membrane functions, e.g., signal transduction, enzyme activities, ion channel properties, and conformation of sA β peptides, which contribute to the disease-related metabolic conditions. In this sense, the dissociation of sA β_{42} from or the lack of association with HDL-like lipoprotein particles not only constitutes a potential mechanism to initiate and/or accelerate the cascade favoring A β_{42} assembly in the brain, but also results in a reduced clearance of physiological lipoprotein-associated sA β_{42} peptides in the brain.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Dr. Hui Sun for her participation in the early stages of this project.

REFERENCES

- Chromy BA, Nowak RJ, Lambert MP, Viola KL, Chang L, Velasco PT, Jones BW, Fernandez SJ, Lacor PN, Horowitz P, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. 2003. Self-assembly of A β_{1-42} into globular neurotoxins. *Biochemistry* 42:12749-12760.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. 2005. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8:79-84.
- Enya M, Morishima-Kawashima M, Yoshimura M, Shinkai Y, Kusui K, Khan K, Games D, Schenk D, Sugihara S, Yamaguchi H, Ihara Y. 1999. Appearance of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein (Abeta) dimer in the cortex during aging. *Am J Pathol* 154:271-279.
- Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, LaRossa GN, Spinner ML, Klunk WE, Mathis CA, DeKosky ST, Morris JC, Holtzman DM. 2006. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol* 59:512-519.
- Fukumoto H, Tokuda T, Kasai T, Ishigami N, Hidaka H, Kondo M, Allsop D, Nakagawa M. 2010. High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *FASEB J* 24:2716-2726.
- Funato H, Enya M, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ihara Y. 1999. Presence of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein dimers in the hippocampus CA1 not exhibiting neurofibrillary tangle formation. *Am J Pathol* 155:23-28.
- Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, Thaxton CS, Mufson EJ, Klein WL, Mirkin CA. 2005. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2273-2276.
- Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA. 1998. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* 4:827-831.
- Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M. 2002. Amyloid beta-protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. *J Neurosci Res* 70:438-446.
- Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. 2003. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10417-10422.
- Hass C, Selkoe DJ. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.
- Ikedo T, Ono K, Elashoff D, Condron MM, Noguchi-Shinohara M, Yoshita M, Teplow DB, Yamada M. 2010. Cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients promotes amyloid beta-protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 21:81-86.
- Katsuno T, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Yamanouchi H, Ishiura S, Murayama S, Ihara Y. 2005. Independent accumulations of tau and amyloid beta-protein in the human entorhinal cortex. *Neurology* 64:687-692.
- Kayed R, Pensalfini A, Margol L, Sokolov Y, Sarsoza F, Head E, Hall J, Glabe C. 2009. Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J Biol Chem* 284:4230-4237.
- Klein WL, Krafft GA, Finch CE. 2001. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24:219-224.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausén B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Långström B. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Ann Neurol* 55:306-319.
- Koudinov AR, Koudinova NV, Kumar A, Beavis RC, Ghiso J. 1996. Biochemical characterization of Alzheimer's soluble amyloid beta protein in human cerebrospinal fluid: association with high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 223:592-597.
- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. 2004. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid β oligomers. *J Neurosci* 24:10191-10200.

- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β_{1-42} are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448–6453.
- Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT Jr. 2002. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418:291.
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352–357.
- Lin H, Bhatia R, Lal R. 2001. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J* 15:2433–2444.
- Matsubara E, Ghiso J, Frangione B, Amari M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M. 1999. Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann Neurol* 45:537–541.
- Matsubara E, Sekijima Y, Tokuda T, Urakami K, Amari M, Shizuka-Ikeda M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Ikeda S, Murakami T, Abe K, Otomo E, Hirai S, Frangione B, Ghiso J, Shoji M. 2004. Soluble Abeta homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins. *Neurobiol Aging* 25:833–841.
- Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K. 2001. A novel action of Alzheimer's amyloid beta-protein (Abeta): oligomeric Abeta promotes lipid release. *J Neurosci* 21:7226–7235.
- Noguchi A, Matsumura S, Dezawa M, Tada M, Yanazawa M, Ito A, Akioka M, Kikuchi S, Sato M, Ideno S, Noda M, Fukunari A, Muramatsu S, Itokazu Y, Sato K, Takahashi H, Teplow DB, Nabeshima Y, Kakita A, Imahori K, Hoshi M. 2009. Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (Abeta) assembly from Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 284:32895–32905.
- Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J, Lal R. 2005. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10427–10432.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. 1993. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9649–9653.
- Selkoe DJ. 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837–842.
- Tanzi RE, Bertram L. 2001. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32:181–184.
- Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Hartman RE, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM. 2005. Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:43236–43242.
- Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Kim J, Li A, Knoten A, Jain S, Hirsch-Reinshagen V, Wellington CL, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM. 2008. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 118:671–682.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535–539.
- Wellington CL. 2004. Cholesterol at the crossroads: Alzheimer's disease and lipid metabolism. *Clin Genet* 66:1–16.
- Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T. 2009. Abeta immunotherapy: intracerebral sequestration of Abeta by an anti-Abeta monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Abeta. *J Neurosci* 29:11393–11398.
- Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M. 2002. A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci* 22:4833–4841.

特集2 精神疾患モデル動物の妥当性

2. 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

窪田 美恵*, 加藤 忠史*

抄録：我々は、気分障害を伴う遺伝性ミトコンドリア病の原因遺伝子 *Polg1* に点変異を持つマウス（変異 *Polg1* トランスジェニックマウス [mutant *Polg1* transgenic (Tg) マウス]) を作出し、双極性障害モデルマウスとしての妥当性を検討してきた。さらに、脳内遺伝子発現について、同腹野生型との差異を調べ、患者死後脳での遺伝子発現解析の結果と比較することにより、両者の共通点として、ミトコンドリア関連遺伝子である *Ppif* の発現減少を見出した。*Ppif* は、 Ca^{2+} を制御する巨大チャネルである Permeability Transition Pore (PTP) を調節する蛋白質、シクロフィリン D (cyclophilin D : CypD) をコードする。Tg マウス脳ミトコンドリアでは Ca^{2+} 取り込みが亢進しており、この遺伝子発現減少がミトコンドリアにおける Ca^{2+} 制御機能を変化させると考えられた。また、CypD 阻害薬 (NIM811) の慢性投与により、Tg マウスの輪回し行動における異常が抑制されたことから、CypD が新規治療薬の標的となる可能性がある。これらの結果から、Tg マウスのモデル動物としての有用性が示唆された。

日本生物学的精神医学会誌 22 (2) : 109-116, 2011

Key words : bipolar disorder, mitochondrial DNA, polymerase γ , mitochondrial calcium uptake, cyclophilin D, NIM811

はじめに

我々は、双極性障害モデルマウスとして脳内にミトコンドリア機能障害を持つトランスジェニックマウスを作出した。このモデルマウスを作成する発端となった双極性障害におけるミトコンドリア機能障害についての所見や作成された動物において観察された行動異常については以前本誌に報告しておりである^{20, 21)}。本稿では、引き続きこのマウスで観察された行動表現型の基盤となる脳内異常を理解するために検討してきた研究結果について紹介したい。まず、同腹野生型と比較した際のモデルマウスでの脳内遺伝子発現変化について、さらに患者死後脳での遺伝子発現変化との共通点について検討し、その結果から得られた知見を元に行動薬理学的評価を行うことでこのマウスのモデル動物としての信頼性を確認した。

1. 動物モデルの妥当性

動物モデルとして重要な条件として3つの満たすべき妥当性が提唱されている。まず、病因と同じメカニズムに基づいて作られているか、という構成概念妥当性、次に、モデルの示す行動変化が患者の病態に類似しているか、という表面妥当性、そして最後に、患者で効果の示されている薬剤がモデルにも類似した作用を示すかという、予測妥当性である。

これまで、これらを全て満たす双極性障害の動物モデルは存在しなかったと言って良からう。既報の気分障害動物モデルは大きく4つのタイプに分類できる。

- ①薬理モデル：躁状態やうつ状態を薬理学的に再現したモデル
- ②遺伝モデル：過去に報告された疾患関連遺伝子进行操作したマウス

Availability of neuron-specific mutant *Polg1* transgenic mice as animal model of bipolar disorder

* 独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム (〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1) Mie Kubota, Tadafumi Kato : Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hiroosawa, Wako, Saitama, 351-0198, Japan

【窪田 美恵 E-mail : tamie@brain.riken.jp】

- ③自然発症モデル：行動試験においてうつ状態を強く示す傾向をもつ系統を利用したモデル
- ④薬剤標的分子モデル：リチウムやバルプロ酸など気分障害の治療薬の作用点として考えられてきた分子に注目し、それらの役割を研究する目的で作出されたマウス

実際には、主に躁またはうつ状態のどちらかの表現型を示すモデルが提唱されており、双極性障害そのものを再現できるモデルの開発としては成功した例はほとんどないと思われる。

気分障害の中でも双極性障害における特徴は、うつ病に比較して遺伝的要因が大きく、躁とうつという2相性を示し、再発を繰り返すことである。我々の作成したマウスは、気分障害を伴う遺伝性ミトコンドリア病の遺伝子 *Polg1* に点変異を持つマウス [変異 *Polg1* トランスジェニック (mutant *Polg1* transgenic : m *Polg1* Tg) マウス] である。これまでに報告されてきた患者の脳画像解析によるエネルギーレベルの異常やミトコンドリアDNA多型など遺伝学的研究から、モデルとしての構成概念妥当性を満たすと考えている。そして、この m *Polg1* Tg マウスの長期的な輪回し行動測定において観察された周期的な行動変化や昼夜の行動パターンの異常などから表面妥当性も満たされたと考えられた。さらに予測妥当性に関して、双極性障害患者の治療薬反応性は、代表的な気分安定薬であるリチウムの他、バルプロ酸、ラモトリギン、オランザピンなどが奏効することが報告されている。また、うつ病には効果の認められている三環系抗うつ薬を双極性障害患者におけるうつ状態に対して投与することにより、躁転など症状の悪化が見られる特徴がある。以前に報告したように、この m *Polg1* Tg マウスで観察された輪回し行動異常に、リチウムや電気けいれん療法が奏効することから、予測妥当性が示されたと考えられた。特に、三環系抗うつ薬に対する反応については、アミトリプチリン 200 mg/L を10日間連続的に飲水投与したところ、m *Polg1* Tg マウスの中には夜間の行動量が投与後から突然増加し、薬物投与を止めた後にも、数週間その増加が持続した例が観察された。昼夜の異常な行動リズムも悪化する傾向が見られ、双極性障害患者のうつ症状に関して報告されている、躁転や急速交代型への移行に類似した行動変化がみられ、モデルとしての妥当性が支持された。

これらの結果からこの m *Polg1* Tg マウスは3つの妥当性を満たすモデルとして利用できると思われ

た。*POLG1* 遺伝子は遺伝性ミトコンドリア病である慢性進行性外眼筋麻痺の原因遺伝子であり、この疾患を呈する患者では気分障害を合併することが多く報告されている。その一方、すべての双極性障害の患者は *POLG1* 遺伝子に変異を持つわけではなく、一部の群で観察されるということも事実である。それでもミトコンドリアDNA異常を持つマウスで双極性障害と似たような行動異常、また細胞内シグナリング異常が見られるかどうかを検討することで双極性障害における共通の分子異常を解明できる可能性を考えた。共通の症状を引き起こすなんらかの生物学的基礎が存在し、同様の症状を引き起こすのであれば、その共通した病態生理のメカニズムを知ることによって最終的には病理学的異常を理解することができ、その症状を改善するための標的分子や薬剤が新規に開発できる可能性が考えられる。

2. m *Polg1* Tg マウス脳内遺伝子発現変化

そこで、m *Polg1* Tg マウス脳内における遺伝子発現変化を観察した。5ペアの同腹マウスの海馬、前頭葉を測定対象とし、Affymetrix社のマウス用DNAマイクロアレイを用いて両組織において発現変化を示す遺伝子群を同定した。発現が認められた約20,000個の遺伝子のうち、野生型に比較して m *Polg1* Tg マウスでは、前頭葉で1,471個、海馬で922個の遺伝子発現レベルに有意な違いが見られた。二つの領域で60遺伝子が共通しており、そのうち33遺伝子が同方向に変化していた。さらに33遺伝子のうち、18遺伝子が共通に発現低下を示し(表1)、このうち、海馬において最も有意に変化していた遺伝子はグルココルチコイド受容体をコードする遺伝子 *Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (NR3C1)* だった。*NR3C1* は、両領域で野生型マウス脳内に比較して有意に発現レベルが低下しており、海馬では定量的PCR法による測定でも有意に低下していることが確認された ($p < 0.001$)。グルココルチコイド受容体の発現変化は他のうつ症状的表現型を示す動物モデルにおいても報告があり、うつ状態やストレス反応性に関連すると考えられている^{1,9,12)}。この結果も m *Polg1* Tg マウスの気分障害モデルとしての妥当性を支持する。また、15遺伝子が発現上昇し(表2)、最も有意に変化していたのはスプライシングファクターの一つである *Sfpq* という遺伝子だった。興味深いことに *SFPQ* 遺伝子発現レベルの変化は、双極性障害患者死後脳を用いた他の研究チームでのDNAマイクロ

表1 m Polg1 Tg マウスの海馬, 前頭葉において同腹野生型マウスに対して有意に発現レベルが低下していた遺伝子リスト

Symbol	Gene title	Hippocampus		Frontal cortex		Public ID	Probe set ID
		Fold	p value*	Fold	p value*		
<i>Nr3c1</i>	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	-1.12	< 0.001	-1.33	0.035	NM_008173	1421866_at
<i>Ero1l</i>	ERO (endoplasmic reticulum oxidoreductin) 1-like (S. cerevisiae)	-1.08	0.001	-1.21	0.043	BM234652	1419029_at
<i>Med26</i>	Mediator complex subunit 26	-1.46	0.005	-1.62	0.007	AK017726	1452282_at
<i>Npdc1</i>	Neural proliferation, differentiation and control gene 1	-1.12	0.008	-1.12	0.028	NM_009849	1418259_a_at
<i>2900052N01Rik</i>	RIKEN cDNA 2900052N01 gene	-1.36	0.009	-1.32	0.026	AU067665	1436231_at
<i>Kif5c</i>	Kinesin family member 5C	-1.32	0.009	-1.50	0.047	AI844677	1450804_at
<i>Flnb</i>	Filamin, beta	-1.15	0.016	-1.29	0.002	AW538200	1426750_at
<i>Rapgef6</i>	rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	-1.10	0.017	-1.11	0.038	BQ177183	1427412_s_at
<i>Usp31</i>	Ubiquitin specific peptidase 31	-1.09	0.017	-1.19	0.038	BM227490	1442099_at
<i>Prmt3</i>	Protein arginine N-methyltransferase 3	-1.21	0.020	-1.24	0.005	AK008118	1431768_a_at
<i>Aif1l</i>	Allograft inflammatory factor 1-like	-1.22	0.035	-1.07	0.016	BC024599	1424263_at
<i>Cntn3</i>	Contactin 3	-1.09	0.036	-1.13	0.024	NM_008779	1420739_at
<i>Ppif</i>	Peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	-1.12	0.038	-1.18	0.008	NM_134084	1416940_at
<i>Copg</i>	Coatmer protein complex, subunit gamma	-1.16	0.044	-1.13	0.009	BC024686	1415670_at
<i>Emoph1</i>	Enolase-phosphatase 1	-1.10	0.044	-1.28	0.002	BC021429	1423705_at
<i>Smad3</i>	MAD homolog 3 (Drosophila)	-1.25	0.045	-1.28	0.019	BI150236	1450472_s_at
<i>BC003266</i>	cDNA sequence BC003266	-1.04	0.049	-1.08	0.039	NM_030252	1449189_at
<i>Glud1</i>	Glutamate dehydrogenase 1	-1.10	0.049	-1.19	0.040	BI329832	1416209_at

* Paired t test (< 0.05).

表2 m Polg1 Tg マウスの海馬, 前頭葉において同腹野生型マウスに対して有意に発現レベルが上昇していた遺伝子リスト

Symbol	Gene title	Hippocampus		Frontal cortex		Public ID	Probe set ID
		Fold	p value*	Fold	p value*		
<i>Sfpq</i>	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	1.26	0.003	1.27	0.039	BG061796	1439058_at
<i>Erdv1 protein</i>	Clone IMAGE : 3983821	2.12	0.005	1.98	0.022	BC021831	1427820_at
<i>Top1mt</i>	DNA topoisomerase 1, mitochondrial	1.13	0.005	1.19	0.002	AF362952	1460370_at
<i>Zc3h13</i>	Zinc finger CCCH type containing 13	1.18	0.006	1.18	0.031	AW536655	1434894_at
<i>Pspc1</i>	Paraspeckle protein 1	1.37	0.013	1.27	0.009	BB590675	1423192_at
<i>Hist2h2aa1</i>	Histone cluster 2, H2aa1	1.33	0.032	1.48	0.024	BC010564	1418367_x_at
<i>ImmP2l</i>	Mitochondrial inner membrane protease subunit 2 (IMP2-like protein).	1.38	0.039	1.27	0.029	BB291417	1458099_at
<i>EG633640</i>	Predicted gene, EG633640	1.28	0.039	1.12	0.040	BG068672	1426607_at
<i>Slc35e1</i>	Solute carrier family 35, member E1	1.20	0.041	1.21	0.038	BB041864	1434103_at
<i>Ube3c</i>	Ubiquitin protein ligase E3C	1.22	0.041	1.29	0.019	BE690666	1444562_at
<i>Rbm25</i>	RNA binding motif protein 25	1.18	0.042	1.31	0.024	AI159652	1437862_at
<i>Ptprn2</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	1.16	0.045	1.45	0.009	U57345	1425724_at
<i>Polg</i>	Polymerase (DNA directed), gamma	1.42	0.045	1.23	0.007	BG064799	1423272_at
<i>4930447A16Rik</i>	RIKEN cDNA 4930447A16 gene	1.28	0.046	1.35	0.027	BB012182	1431671_at
<i>Tradd</i>	TNFRSF1A-associated via death domain	1.20	0.047	1.39	0.050	AA201054	1452622_a_at

* Paired t test (< 0.05).

アレイを用いた遺伝子発現解析結果によっても報告されている¹⁶⁾。また, Le-NiculescuらはDBP (D-box binding protein) ノックアウトマウスでの遺伝子発現解析結果から *Sfpq* 遺伝子発現変化について双極性障害における関連を提唱している¹⁵⁾。

3. 患者死後脳と m Polg1 Tg マウス脳内遺伝子発現変化における共通点

双極性障害の病態に関連する神経学的基盤を探索するため, m Polg1 Tg マウスの脳内遺伝子発現変化を利用し, 以前に報告したヒト死後脳サンプルで

の遺伝子発現解析結果との共通点を検討した。患者サンプルでも共通に変化している所見がみつければ、モデルマウスの表現型と患者の病態に共通に関連する分子の候補となりえると考えられるからである。次に *m Polg1* Tg マウス脳内で野生型に比較して発現変化していた遺伝子について双極性患者死後脳での発現レベルを確認した。

まず、*m Polg1* Tg マウス海馬と前頭葉で発現レベルが同方向に変動していた遺伝子についてヒトサンプルで検索できるようにするため、マウス用プローブ番号をヒトプローブ番号に変換したところ、ヒトでは39遺伝子に相当していた。そのリストを元に、スタンレー財団から提供された健常者と双極性障害患者の前頭葉 (BA46) を用いて調べられた遺伝子発現解析結果に基づき、発現量の比較を行った。ヒト死後脳サンプルではサンプル pH が低いと遺伝子発現パターンが大きく変動することが報告されているため¹⁰⁾、pHの影響があると思われるサンプルを除外し、健常群25例、患者群18例を用いて検討した。健常者に比べ、患者において発現レベルが有意に変化していた遺伝子は3プローブあり、*Ppif*、*Sfpq*の2つの遺伝子をコードしていた。どちらの遺伝子も発現レベルは *m Polg1* Tg マウスと同方向に変動していた (表3)。*Sfpq* についてはもともと4つの異なるプローブがマイクロアレイ上に存在し、発現レベル変化の方向にばらつきがあったこと、また *Ppif* 発現レベルについては、特に2つのプローブで有意な差が見られたと同時にミトコンドリア関連遺伝子であることから、我々は *Ppif* に注目した。必ずしも *POLG1* 遺伝子変異を持たない患者群でも *m Polg1* Tg マウスと同様の結果が確認されたことから、この遺伝子発現変化は、双極性障害の病態に関連する変化であると考えられた。

4. *Ppif* 発現減少とミトコンドリア機能

Ppif はシクロフィリン D (cyclophilin D : CypD)

表3 *m Polg1* Tg マウスと双極性障害患者死後脳において共通に発現レベルが変化していた遺伝子リスト

Symbol	Gene title	pH \geq 6.5 samples (bipolar n = 18, control n = 25)		All samples (bipolar n = 33, control n = 34)		Public ID	Probe set ID	Locus
		Fold change	p value*	Fold change	p value*			
<i>PPIF</i>	Peptidylprolyl isomerase F	-1.20	0.016	-1.19	0.005	NM_005729	201490_s_at	10q22-q23
<i>PPIF</i>	Peptidylprolyl isomerase F	-1.17	0.042	-1.11	0.095	BC005020	201489_at	10q22-q23
<i>SFPQ</i>	Splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	1.33	0.002	1.10	0.215	AV705803	221768_at	1p34.2

* t test (< 0.05).

をコードする遺伝子である。CypDはミトコンドリアマトリックスに存在し、内膜側に存在する蛋白質に結合して permeability transition pore (PTP) と呼ばれるチャネル開口に関与していることが提唱されており¹⁰⁾、PTP開口はアポトーシスやネクロトーシスに関連するとされている¹¹⁾。ミトコンドリアには Ca^{2+} の取り込みと排出に関与するそれぞれ独立した輸送機構があり、細胞質内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると急速にユニporterが働き、 Ca^{2+} をとりこむ能力を有する。逆にミトコンドリア内の Ca^{2+} は、主に Na^{+}/Ca^{2+} 交換輸送系により排出されると考えられているが、 Ca^{2+} 濃度が過剰に上昇した際には、このPTPも短く開口し、ミトコンドリア内から Ca^{2+} が放出される。ミトコンドリアは、このように小胞体とともに細胞内のマイクロドメインを形成して、精密に細胞内 Ca^{2+} 濃度を制御している。

双極性障害と細胞内 Ca^{2+} 動態異常との関連性を示す所見は、現在のところ、患者血小小板や嗅神経細胞を用いた結果により、G蛋白共役受容体を介して細胞内シグナリングを活性化させた時の細胞内 Ca^{2+} 反応異常として示され^{5, 6, 11, 14)}、双極性障害の素因になっている可能性が示唆されている。

我々は、*Ppif* 発現変化とミトコンドリア機能変化を確認するため、*m Polg1* Tg マウス脳から単離したミトコンドリアで Ca^{2+} 取り込み能を測定した。一定濃度の Ca^{2+} をミトコンドリアが取り込む様子を図1に示す。*m Polg1* Tg マウス由来ミトコンドリアでは、野生型マウスの脳ミトコンドリアに比べ、ミトコンドリア外の Ca^{2+} が、短い時間で Ca^{2+} 投与前の静止レベルに戻る傾向が観察された。免疫抑制薬として使用されている、シクロスポリン A は CypD 阻害薬であり、シクロスポリン A 存在下で PTP 開口を抑制することが示されている¹²⁾ ことから、*m Polg1* Tg マウスミトコンドリアでは PTP に関与する CypD 発現低下により、PTP 開口が抑制されたと考えられた。

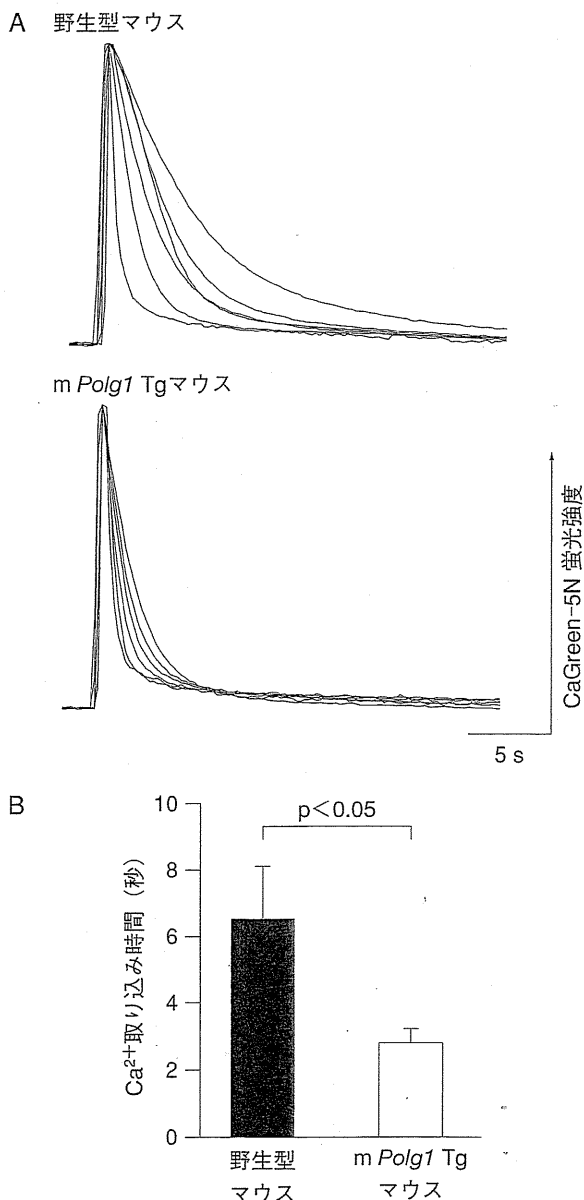


図1 m Polg1 Tgマウス脳ミトコンドリアにおけるカルシウム取り込みの亢進

A Ca²⁺の濃度変化に対応して外液のCa²⁺指示薬の蛍光強度が変化した様子。皮質・海馬を含む前脳からミトコンドリアを密度勾配法で単離し、蛍光色素である25 nM Calcium Green-5Nを含む緩衝液にインキュベーションした。ミトコンドリア呼吸基質として20 mM グルタミン酸2 mM マレイン酸を添加した。ミトコンドリア外液の蛍光強度 (Ex488 nm, Em530 nm)を測定しながら、既知濃度のCa²⁺液 (100 nmol/mg ミトコンドリア蛋白量)を添加した。一過性に上昇した外液内Ca²⁺レベルがミトコンドリアによる取り込みにより徐々に減少した。同腹野生型マウス由来のミトコンドリアはCa²⁺添加前のレベルにゆっくりと戻るのに比べ、m Polg1 Tgマウス由来のミトコンドリアは急速に取り込む様子が観察された。

B Ca²⁺の取り込み時間。Ca²⁺添加後のピークから添加前のレベルに戻るまでの50%減衰時間を6例で平均し、比較した。

5. シクロフィリンD阻害薬のm Polg1 Tgマウス行動異常に対する作用

さらにCypD阻害薬を用いてm Polg1 Tgマウスの行動異常に対する作用を観察した。免疫抑制剤として臨床的に使用されているシクロスポリンAは、ミトコンドリアではPTP開口を阻害することが知られている。これは、真菌 *Tolypocladium inflatum* Gams種の代謝産物として産生される天然化合物であり、11個のアミノ酸よりなる環状ポリペプチドである。この免疫抑制活性は、細胞質のカルシニューリンへの作用によるものである。ポリペプチドの一部を改変することにより、カルシニューリンに対する作用を失わせ、ミトコンドリアCypD阻害作用のみを持つようにした誘導体として、NIM811が開発されている^{8, 18)}。我々は、単離ミトコンドリアを用いた *in vitro* 実験で、NIM811がシクロスポリンAに比較してより低濃度でPTP開口を抑制することを確認した。

NIM811を投与したラットの脳では、虚血耐性を獲得できることが示されている¹⁹⁾。気分安定薬であるリチウム投与後のラット脳も虚血耐性を示すことから^{2, 3, 17)}、NIM811もリチウム同様の気分安定効果を持ち、m Polg1 Tgマウスで観察された双極性障害に類似した異常行動が抑制されるのではないかと仮定した。

そこで、2週間のNIM811慢性投与によるm Polg1 Tgマウス異常行動への作用を確認した。m Polg1 Tgマウスで報告されている特徴的な輪回し行動異常は、暗期から明期に切り替わった後の3時間程度の時間帯に、輪回し量が多く観察されるというものである。そこで、NIM811をm Polg1 Tgマウスの腹腔内に40 mg/kg/dayで投与し、この輪回し行動量の異常に注目して観察を続けたところ、m Polg1 Tgマウスの明期開始後3時間における輪回し行動量は、薬物投与前に比べ有意に抑制された(図2)。この結果から、CypD阻害薬は双極性障害において治療的意義を持つ可能性が示唆されると共に、m Polg1 Tgマウスが双極性障害の動物モデルとして、気分安定薬開発のための行動薬理学実験に用いることが可能であることが示唆された。これまで気分安定薬として汎用されているリチウムだけでなく、バルプロ酸や非定型抗精神病薬も神経細胞保護作用を示すことが示されている。小規模な治験で有効性が示唆されたウリジンやNアセチルシステインがミトコンドリア機能に保護的な効果を持つことと考え合わせると、CypD阻害薬も同様に気分安定

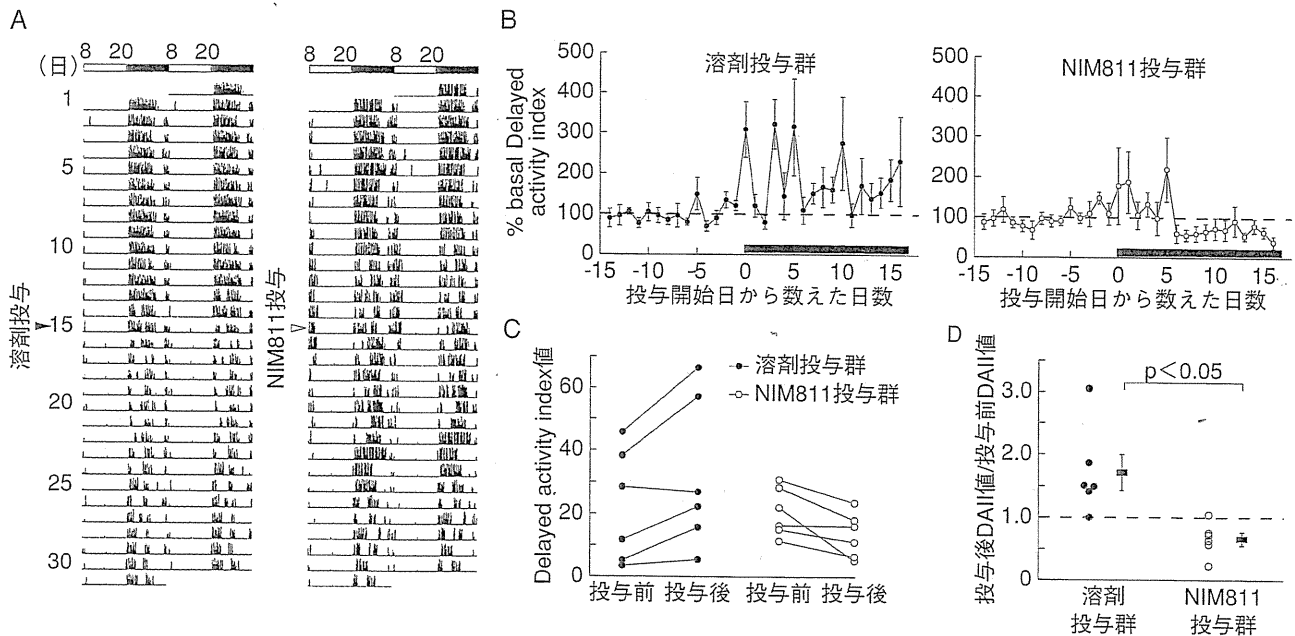


図2 *m Polg1 Tg* マウスの輪回し行動異常に対する NIM811 慢性投与の効果

- A 約4週間にわたる *m Polg1 Tg* マウスの輪回し行動量をダブルプロットで示した。NIM811 (40 mg/kg) および溶剤投与開始日を矢頭で示した (記録開始後15日目)。
- B 投与開始前を基準とした輪回し行動異常の変化。明期開始後3時間の輪回し量を前日夜間 (午後8時から次の日の午前8時まで) の輪回し総量で基準化し (基準値を点線で示した)、異常行動の指標 (Delayed activity index, DAI) として測定した。同腹6匹分を1日ごとに平均し、NIM811 および溶剤の投与開始日を原点として投与前14日間に対する、投与中16日間のDAI値の変化率をプロットした。
- C NIM811 および溶剤の投与前7日間と投与開始後10日目から16日目までの7日間のDAI値の平均 (●: 溶剤投与群, ○: NIM811投与群)。
- D 投与前に対する投与後のDAI値の比 (●: 溶剤投与群, ○: NIM811投与群)。NIM811投与群では有意に抑制された ($p < 0.05$ (Aspin-Welch's modified t test))。

薬としての候補になりえると思われる。このモデルマウスは、新たな作用機序を持つ双極性障害の治療薬の創薬研究や、気分安定薬の作用メカニズムを分子レベルで解明するための薬理学的研究に利用できると考えられる。

謝辞: 本研究に使用したNIM811を提供していただいたノバルティスファーマ、ヒト死後脳サンプルを御提供いただいたスタンレー財団、および遺伝子発現解析に御協力いただいた東京大学精神科分子精神医学講座岩本和也准教授に感謝致します。

文 献

- Boyle MP, Brewer JA, Funatsu M, et al (2005) Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 : 473-478.
- Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, et al (1999) The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem*, 72 : 879-882.
- Corson TW, Woo KK, Li PP, et al (2004) Cell-type specific regulation of calreticulin and Bcl-2 expression by mood stabilizer drugs. *Eur Neuropsychopharmacol*, 14 : 143-150.
- Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 341 : 233-249.
- Dubovsky SL, Christiano J, Daniell LC, et al (1989) Increased platelet intracellular calcium concentration in patients with bipolar affective disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 46 : 632-638.
- Hahn CG, Gomez G, Restrepo D, et al (2005) Aberrant intracellular calcium signaling in olfactory neurons from patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry*, 162 : 616-618.
- Hansson MJ, Persson T, Friberg H, et al (2003) Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria. *Brain Res*, 960 : 99-111.

- 8) Hansson MJ, Mattiasson G, Mansson R, et al (2004) The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 36 : 407-413.
- 9) Herman JP, Adams D, Prewitt C (1995) Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology*, 61 : 180-190.
- 10) 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.
- 11) Kato T, Ishiwata M, Mori K, et al (2003) Mechanisms of altered Ca^{2+} signalling in transformed lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 6 : 379-389.
- 12) Kitraki E, Karandrea D, Kittas C (1999) Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 69 : 331-338.
- 13) Korde AS, Pettigrew LC, Craddock SD, et al (2007) Protective effects of NIM811 in transient focal cerebral ischemia suggest involvement of the mitochondrial permeability transition. *J Neurotrauma*, 24 : 895-908.
- 14) Kusumi I, Koyama T, Yamashita I (1994) Serotonin-induced platelet intracellular calcium mobilization in depressed patients. *Psychopharmacology*, 113 : 322-327.
- 15) Le-Niculescu H, McFarland MJ, Ogden CA, et al (2008) Phenomic, convergent functional genomic, and biomarker studies in a stress-reactive genetic animal model of bipolar disorder and co-morbid alcoholism. *Am J Med Genet Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 147B : 134-166.
- 16) 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.
- 17) Nonaka S, Hough CJ, Chuang DM (1998) Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 : 2642-2647.
- 18) Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, et al (2002) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol*, 62 : 22-29.
- 19) Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, et al (2003) Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem*, 10 : 1485-1506.
- 20) 加藤忠史 (2006) ミトコンドリア DNA と双極性障害. *脳と精神の医学*, 17 : 197-205.
- 21) 笠原和起, 加藤忠史 (2008) 双極性障害におけるミトコンドリア機能障害. *脳と精神の医学*, 19 : 107-115.

■ ABSTRACT

Availability of neuron-specific mutant *Polg1* transgenic mice as animal model of bipolar disorder

Mie Kubota, Tadafumi Kato

Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders RIKEN Brain Science Institute

We hypothesized that dysfunction of mitochondria in the brain is involved in the pathophysiology of bipolar disorder (BD). We previously reported that neuron-specific mutant *Polg1* (mitochondria DNA polymerase) transgenic (Tg) mice exhibited BD-like phenotypes and proposed that the Tg mice would be an animal model of bipolar disorder. We examined gene expression profiles in the brains of the Tg mice using DNA microarray analysis and the obtained data were compared with the data in the postmortem brains of patients with bipolar disorder. We found that *PPIF* showed similar changes. *PPIF* encodes cyclophilin D (CypD), a component of the mitochondrial permeability transition pore. A CypD inhibitor, NIM811, significantly improved the abnormal behavior of the Tg mice. These findings suggest that CypD is a promising target for a new drug for BD and our model mouse is useful for the development of new mood stabilizers.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 22 (2) : 109-116, 2011)

特集1 気分障害研究 UP TO DATE

4. 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

笠原 和起*, 加藤 忠史*

抄録：双極性障害の発症には大きな遺伝的要因が存在する。しかし、単一の遺伝子変異によって規定される単純な遺伝病とは異なり、複数の遺伝的要因が関与していると考えられる。このようなありふれた複雑疾患について、ありふれた変異が発症に関わっているという仮説と、まれな変異に関わっているという2つの仮説が提案されている。これまで前者の仮説に基づく研究が盛んに行われてきたが、大きな成功は得られていない。DNAシーケンシングの技術の発達とともに、後者の仮説に基づく研究が可能になってきた。我々は、*POLG1* 遺伝子（ミトコンドリアDNA合成酵素をコード）に注目し、変異を検索した。そこで見出した変異の中から、生化学的な解析法や、他の疾患の臨床情報、およびコンピューターの予測プログラムを用いて、疾患の原因になりうる有害な変異を洗い出そうとしている。本稿では、我々のまれな変異に関する研究戦略と現在得られている結果を解説するとともに、本解析の過程で気が付いた重要な問題点を提起したい。

日本生物学的精神医学会誌 22 (2) : 97-102, 2011

Key words : rare variant, bipolar disorder, *POLG1*, dominant mutation

はじめに

我々は、双極性障害の発症にまれな変異 (rare variant) が関わっている可能性を考え、候補遺伝子における変異を検索し、そこで見出した中から、疾患の原因になりうる変異を洗い出そうとしている。これまでに、日本人サンプルを中心に、*POLG1* 遺伝子（ミトコンドリアDNA合成酵素をコード）のすべてのエクソン領域をシーケンシングし、多数のまれな変異を見出した。また、これらのすべての変異について生化学的な活性を測定し、有害な変異 (deleterious variant) を同定した。現在、さらにサンプル数を増やして解析中のため、本稿では、研究の具体的な結果について記述するというよりは、まれな変異に関する解析の過程で気が付いた重要な問題点を提起し、議論する。まずは、双極性障害のような複雑疾患における、ありふれた変異 (common variant) とまれな変異の役割に関する仮説と、我々の研究戦略を概説したい。

1. ありふれた変異とまれな変異

双極性障害を含めた多くの精神疾患には、その程度の差はあれ、その発症に遺伝的な負因が存在する。しかし、メンデル型の遺伝様式を示す単純な遺伝病とは異なり、数多くの変異が複雑に関わっていると考えられている。このような複雑疾患で、かつ、ありふれた疾患の場合、疾患に関与するゲノム変異の有り様として2種類の仮説が提案されている。ひとつが、ありふれた変異 (群) が病気に関わっているという「common disease-common variant (CDCV) 仮説」で、もう一つが、まれな変異 (群) が病気に関わっているという「common disease-rare variant (CDRV) 仮説」である^{1, 10)}。実験技術の容易さもあり、CDCV仮説に基づく研究がこれまで主に行われてきた。特にここ数年、数千人以上の多数のサンプルを用い、高密度のSNPアレイを利用した全ゲノム関連研究 (GWAS) が報告されるようになり¹⁰⁾、複雑疾患のゲノム研究の一里塚となった。なお、

Comprehensive analysis of rare variants of mitochondrial DNA polymerase gene (*POLG1*) identified in patients with bipolar disorder

*理化学研究所 脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム (〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1) Takaoki Kasahara, Tadafumi Kato : Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders, RIKEN Brain Science Institute, 2-1, Hirosawa, Wako-Shi, Saitama, 351-0198 Japan

【笠原 和起 E-mail : casa@brain.riken.jp】

「ありふれた」や「まれな」の定義であるが、すなわち、変異を有するアレルの存在頻度 (minor allele frequency : MAF) がどれほどであれば「ありふれた」とするか、厳密な定義はないものの一般的にはおおよそ表1に示したような区分けがされている。

2. CDCV 仮説とそれに基づく結果

CDCV 仮説は、「common disease-common variant-common origin」仮説とも言われてきたように、ありふれた変異は、ヒトがアフリカで誕生して世界各地に広がっていく過程で、ある1人に生じた変異であり、それが人類の間に広がったものである。つまり、ありふれた古い変異は、表現型に現れにくく、選択や淘汰されにくいことを意味している。このようなありふれた変異を対象とする CDCV 仮説では、エフェクトサイズや浸透率 (penetrance) が小さいありふれた変異の集まりによって疾患の発症要因が規定されると想定する。

この CDCV 仮説に基づく研究手法である GWAS では、ヒトゲノム上に点在する数十万個の SNP (ありふれた変異) の遺伝子型を調べ、疾患の発症要因 (保護的な作用の場合もある) と関連しているかどうかを解析する。双極性障害に関しては、数千人オーダーの多数の DNA サンプルを用いた GWAS が6つ報告されている (一部、サンプルの重複がある)。最も再現性があり、また最も P 値が小さい SNP は、*ANKK1* 遺伝子のイントロンに存在していた ($P=9.1 \times 10^{-9}$; オッズ比=1.45)³⁾。この SNP (rs10994336) は、日本人ではありふれた変異であり、日本人の約半数がリスクアレルを持っていると考えられる。GWAS が検出するシグナル (SNP) は、そのものが疾患と関連している場合もあれば、その SNP に近接した (連鎖不平衡にある) 変異が関連

している場合もありえる。rs10994336 周辺をシーケンシングして、重要な変異を見つけようという試みが行われているだろうが、他の疾患では GWAS の結果からその次に進むこの段階でつまづいている場合がほとんどである⁴⁾。

GWAS を行う過程で、まれな変異であるゲノムの微小欠失や重複 (copy number variation : CNV) を検出し、これらのまれな CNV と疾患との相関を調べた研究もある。双極性障害では CNV の寄与は否定的であるが⁵⁾、統合失調症や自閉症では、まれな CNV が発症に高いリスクを付与することが示唆されている。

また最近、通常の GWAS でもまれな変異の寄与を検出できるのではないかと報告されている⁶⁾。つまり、CDRV 仮説も GWAS によって調べることがある程度は可能かもしれない。エフェクトサイズの大きなまれな変異が特定の遺伝子に存在し、このような変異が複数個、サンプルの中に含まれている場合、その近くのありふれた変異がシグナルとして検出できる可能性がある。この現象は合成的な相関 (synthetic association) と呼ばれるが、これまでの GWAS で得られたシグナルのうち、ありふれた変異と疾患との相関に由来する場合 (当初のねらい) がどれぐらいであり、合成的な相関に由来する場合がどれほどなのかは不明である。

3. CDRV 仮説

もう一つの仮説である CDRV に基づく研究では、まれな変異を調べるために、最終的には各サンプルを DNA シーケンシングする必要があるが、時間も研究費もかかる。そのため、候補遺伝子に注目してまれな変異を検索する手法がとられている。しかし、次世代シーケンサーの解析価格が低下したことにより、海外ではすでに、全ゲノムシーケンシングあ

表1 存在頻度による変異の分類

変異の種類	変異の頻度 (MAF)	変異の同定法について
ありふれた変異 (common)	5%以上	SNP チップを用いた現在の GWAS の対象となる
比較的まれな変異 (uncommon, less common)	1~5%	1000 ゲノムプロジェクトにおいて調べることが可能
まれな変異 (rare)	1%以下	エフェクトサイズまたは浸透率が大きければ、リシーケンシングによって調べることが可能
プライベート変異 (private)	特定の家系のみ	浸透率が大きければ、連鎖解析や共分離解析によって調べることが可能

(Cirulli ET, Goldstein DB (2010) Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. Nat Rev Genet, 11 : 415-425. ¹⁾ より引用・改変)

るいは全エクソン（エクソーム）シーケンシングによってまれな変異の解析が進められている。

まれな変異をGWASと同様な解析法で検出しようとするなら（例えば、MAF<0.1%, P 値< 5×10^{-8} , 検出力=80%）、患者群、コントロール群各10,000人の大量のサンプルを用いても、オッズ比が4.5以上の変異しか見つからない。つまり、まれな変異の解析では、非常に影響力が強い変異が存在することを期待して、それを同定しようと努力することになる。数百人ほどのサンプル数における候補遺伝子の解析では、エフェクトサイズがさらに大きな原因変異を探していることになる。

4. 双極性障害におけるまれな変異の解析

双極性障害において、CDRV仮説に基づいてまれな変異を検索した研究としては、G72 (DAOA) (BP 555人, コントロール564人)⁹⁾, プリン受容体 (P2RX7) (BPI 687人, MD 1,036人, コントロール1,204人)⁴⁾, アリルアルキルアミン *N*-アセチル基転移酵素 (AANAT) (BP 188人, MD 257人, コントロール440人)¹³⁾, インスリン様成長因子1 (IGF1) (BP 506人, コントロール510人)¹²⁾ などがある。我々は現在、15番染色体長腕q26に存在する候補遺伝子 *POLG1* 遺伝子の変異を調べている。*POLG1* は23個のエクソンからなり、ミトコンドリアDNA (mtDNA) 合成酵素の触媒サブユニット (1,239アミノ酸残基) をコードしている。我々は、双極性障害のミトコンドリア機能障害仮説を提唱し、その実証を行ってきたが (詳細は本誌の総説^{6, 9)} を参照していただきたい)、その仮説を支持する証拠の一つが、メンデル型遺伝性のミトコンドリア病である慢性進行性外眼筋麻痺 (chronic progressive external ophthalmoplegia: CPEO) の患者において気分障害が高頻度で見られることがある。これまでに、CPEO患者における精神症状を包括的に調べた

研究はないが、気分障害を併発するCPEO患者がいる家系が少なくとも8例報告されている⁷⁾。DSMにもとづいた診断が行われているのは1家系だけだが、その家系では、CPEO罹患者4名全員がCPEO発症以前に双極性障害と診断されている。

CPEOの原因遺伝子として、これまでに5つの遺伝子が同定されており¹⁴⁾, いずれもmtDNAの合成や維持にかかわるタンパク質をコードしている。理由は不明であるが、この5遺伝子のうち、もっとも頻繁に変異が見つかる遺伝子が *POLG1* である。*POLG1* 変異によるCPEO患者は、単一遺伝子変異による優性遺伝の場合もあるが、多くの場合、まれな変異を2つ持つ複合ヘテロ接合体 (compound heterozygote) である。また、*POLG1* の変異は、CPEOとは異なる臨床症状のいくつかの疾患の原因にもなっており、これまでに、100以上の *POLG1* の点変異がCPEOやその他の疾患に関連すると報告されている¹⁴⁾。このように、*POLG1* は、まれな変異に関して、これまでに非常によく研究されてきている遺伝子であるといえよう。さらに、*Polg1* 変異を持つトランスジェニックマウスが双極性障害に類似した行動異常を示すことを我々は明らかにしており⁷⁾, これらを考え合わせ、双極性障害においてまれな変異を調べる際の第一のターゲットとして *POLG1* が適していると推測した。

5. *POLG1* のまれな変異解析の実際

患者466人, コントロール508人のDNAサンプルから、*POLG1* のすべてのエクソンをPCRで増幅し、サンガー法でシーケンシングした。多数の点変異が見つかり、アミノ酸配列を変える変異 (非同義置換: nonsynonymous substitution) は、21個含まれていた (表2)。その中のほとんどは、それぞれ1人からしか見つからなかった。患者群とコントロール群で、非同義置換の変異の頻度に違いは無かった。

表2 *POLG1* 遺伝子のまれな変異の解析結果

変異の種類	同定した変異の数	変異を有する人の数	
		患者群 ^{a)}	コントロール群 ^{b)}
非同義置換変異	21	18	19
予測プログラムで有害とされた変異 ^{c)}	8 ^{d)}	12 ^{d)}	2 ^{d)}
生化学的に有害とされた変異	7	13	9
CPEO患者で見つかった変異	1	2	0

a) 双極性障害患者群466人中 (双極I型343人, 双極II型119人, 統合失調感情障害, 双極型4人)

b) コントロール群508人中

c) 予測プログラムにはPolyPhenを用いた

d) ナンセンス変異 (終止コドン変異) はPolyPhenでは解析できないが、有害と推測されるため、その変異を集計に加えた

また、すべてのまれな変異は、ヘテロ接合の状態で見つかった。

まれな変異の研究では、ありふれた変異の研究とは異なり、同定したまれな変異そのものが疾患（の発症）に関わることを想定する。そのため、アミノ酸配列を変えない変異（同義置換）より、非同義置換の方が興味深い。さらに、非同義置換の中でも、POLG1の酵素活性や安定性に影響を与える有害な変異を洗い出したい。このスクリーニングの方法には、大きく分けて3種類あるだろう。①生化学的な手法で調べる方法（*in vitro*）、②同じ変異を持つ動物モデルや患者を調べる方法（*in vivo*）、そして③コンピューターの予測プログラムを用いて調べる方法（*in silico*）である。実施の容易さは③>①>②であるが、③予測プログラムから得られるデータの確度はその中では低いと考えられる。

我々はまず、コンピュータープログラムによる予測を行ってみた。いくつもの予測プログラムがこれまでに発表されているが、その中で、最古参の一つであり、またweb上のサービスとして使用できるPolyPhen¹⁵⁾を用いた。その結果、8個の変異が「probably damaging」と予測された。それらの多くが患者群で見つかった変異で、統計学的に有意に患者に多かった（ $P=0.005$ ；Fisher's exact probability test）（表2）。

そこで、生化学的な手法を用いて変異体の酵素活性を調べ、疾患との関連を検討した。同定したすべての非同義置換変異について、変異体のタンパク質を培養細胞で発現させて抽出・精製し、POLG1の酵素活性を測定した。具体的には、POLG1は、DNA合成活性と、合成の際に誤った塩基を取り込んだときにそれを削り出すエクソヌクレアーゼ活性を持っているので、その両活性をすべてのPOLG1変異体について解析した。どちらかの活性をほとんど失わせる変異を有害とした。また、培養細胞で発現させたときに、ほとんど発現しない変異体も複数あり、これらも有害な変異と見なした。合計で7個の有害な変異が生化学的な解析から同定できたが、それらが患者群で有意に多く見られるわけではなかった（表2）。

また、見出したまれな変異の中に、すでにCPEO患者で見つかった変異がないか調べたところ、1つの変異が見つかった。この変異は、上記の生化学的な解析では、発現しにくかった。この変異を有する人は、CPEO患者で2人、Alpers病（mtDNA減少による全身性の疾患で進行性脳灰白質ジストロフィーや肝障害を伴う）の患者で1人これまでに報

告されているが、いずれもPOLG1の複合ヘテロ接合体で、精神症状に関する報告はない。今回の変異は双極性障害の2患者から見つかったが、コントロール群からは見つからなかった（表2）。

6. ドミナント変異

生化学的な解析方法とコンピューターの予測プログラムは、それぞれの変異が有害かどうかを調べる。言い換えれば、変異がホモ接合体の状態のときに有害かどうかを調べることを意味している。一方、上述したように、今回、すべてのまれな変異はヘテロ接合の状態で見つかった。ヘテロ接合性の変異が疾患の発症に大きくかかわるには、優性遺伝の変異と同様の影響力を持つ必要がある。このような変異をドミナント変異（dominant variant）といい、大きく分けて3つのパターンがある（表3）。生化学的な解析において、変異タンパク質と正常なタンパク質を等量混合して酵素活性を測れば、ドミナント変異であるかどうかをある程度はスクリーニングすることができるのではないかと考えた。実際に調べてみると（ただし、発現しにくい変異について実験できなかったが）、等量の正常POLG1の共存によってすべての変異体の活性が補償され、ドミナント変異は見つからなかった。

7. まれな変異の研究の未来

今回我々は、双極性障害の発症にPOLG1遺伝子のまれな有害変異が関わっているかどうかを調べたが、統計学的には有意な関連を見出せなかった。現在、サンプル数をさらに増やして解析中であるが、気が付いた重要な点を最後に整理したい。一つは、まれな変異は多くの場合、ヘテロ接合性で見つかるため、その条件下で有害かどうか（ドミナント変異であるかどうか）を見極めることが肝要である。もう一つ、コンピューターの予測プログラムの結果は、生化学的な解析の結果と大きな違いがあった。この点は、今後、まれな変異の研究が、多数のサンプルを用いて全ゲノムシーケンシングを行うようになった場合、問題になるだろう。膨大な数の変異が同定されるようになったとき、それらの変異が有害かどうかをスクリーニングする現実的な方法は予測プログラムのみである。予測プログラムのさらなる改良が望まれる。その際に、ドミナント変異であるかどうかを予測できるようになるとすばらしいが、容易なことではないだろう。

表3 ドミナント変異の分類

変異の種類	特性	変異の例
Haplo-insufficient 変異	正常なアリルが1コピーでは量的に不十分な遺伝子の機能喪失変異	酵素をコードしている遺伝子ではこの種の変異は珍しく、細胞骨格や接着に関わる遺伝子や転写因子の遺伝子で見つかることが多い。ヘテロノックアウトマウスで表現型が見られる遺伝子も haplo-insufficient であると言える。
Gain-of-function 変異 (neomorph 変異)	本来の機能とは異なる機能を付与する変異	最も研究されているのは、がん原遺伝子の変異だろう。受容体やキナーゼの遺伝子に見られる恒常的活性型の変異や、タンパク質の安定性を変える変異。プロモーター領域の変異では、発現量や発現する組織や時期を変えたりする場合もある。
Dominant negative-like 効果を 持つ変異	正常なアリルからの遺伝子産物の機能までも抑制してしまう変異	多量体を形成するタンパク質をコードする遺伝子で見つかる場合が多い。最も有名な変異は、アジア人でのみ見られるアセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) の E504K 変異だろう。四量体で機能するため、ヘテロ接合体でも活性は正常ホモの1/16しかない。

まれな変異の研究は、エフェクトサイズが大きなまれな変異を前提としているが、双極性障害においてはそのような変異は存在しないことも覚悟しなくてはいけないかもしれない。エフェクトサイズが小さいまれな変異となると、現在の技術とサンプルサイズではお手上げである。エフェクトサイズが大きな変異を探すことは、メンデル型の遺伝様式を示す家系を探すこととほとんど同じである。ただし、かつて歩んだ道、すなわち1980年代に行われた連鎖解析に立ち戻るわけではない。全ゲノムやエクソームのシーケンシングによって家系内の罹患者たちが共有する変異をつまびらかにでき、生化学的な手法や予測プログラムによって変異の特徴付けができる。この情報と、家系内で変異と疾患が共分離 (co-segregation) するかという遺伝学的な情報を組み合わせれば、浸透率が完全でなくても疾患に関与する変異を同定できる可能性は強まる。まれな変異の研究が注目されるようになった今日、被験者のサンプリングの重要性がより高まっている。

文 献

- 1) Cirulli ET, Goldstein DB (2010) Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*, 11 : 415-425.
- 2) Dickson SP, Wang K, Krantz I, et al (2010) Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol*, 8 : e1000294.
- 3) Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, et al (2008) Collaborative genome-wide association analysis supports a role for *ANKK1* and *CACNA1C* in bipolar disorder. *Nat Genet*, 40 : 1056-1058.
- 4) Green EK, Grozeva D, Raybould R, et al (2009) *P2RX7*: A bipolar and unipolar disorder candidate susceptibility gene? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B : 1063-1069.
- 5) Grozeva D, Kirov G, Ivanov D, et al (2010) Rare copy number variants: a point of rarity in genetic risk for bipolar disorder and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 67 : 318-327.
- 6) 笠原和起, 加藤忠史 (2008) ミトコンドリアDNAと双極性障害. *脳と精神の医学*, 19 : 107-115.
- 7) Kasahara T, Kubota M, Miyauchi T, et al (2006) Mice with neuron-specific accumulation of mitochondrial DNA mutations show mood disorder-like phenotypes. *Mol Psychiatry*, 11 : 577-593.
- 8) 加藤忠史 (2006) ミトコンドリアDNAと双極性障害. *脳と精神の医学*, 17 : 197-205.
- 9) Maheshwari M, Shi J, Badner JA, et al (2009) Common and rare variants of *DAOA* in bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B : 960-966.
- 10) Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461 : 747-753.
- 11) MIM ID #157640 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/157640]
- 12) Pereira AC, McQuillin A, Puri V, et al (2011) Genetic association and sequencing of the insulin-like growth factor 1 gene in bipolar affective disorder.

- der. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 156 : 177-187.
- 13) Soria V, Martínez-Amorós E, Escaramís G, et al (2010) Resequencing and association analysis of arylalkylamine *N*-acetyltransferase (*AANAT*) gene and its contribution to major depression susceptibility. J Pineal Res, 49 : 35-44.
- 14) Stumpf JD, Copeland WC (2011) Mitochondrial DNA replication and disease : insights from DNA polymerase γ mutations. Cell Mol Life Sci, 68 : 219-233. [<http://tools.niehs.nih.gov/polg/>]
- 15) Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, et al (2001) Prediction of deleterious human alleles. Hum Mol Genet, 10 : 591-597. [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>]
- 16) Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. Nature, 447 : 661-678.

■ ABSTRACT

Comprehensive analysis of rare variants of mitochondrial DNA polymerase gene (*POLG1*) identified in patients with bipolar disorder

Takaoki Kasahara, Tadafumi Kato

Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders, RIKEN Brain Science Institute

The role of genetic factors in bipolar disorder has been established. Recently, genome-wide association studies, relying on the common disease-common variant hypothesis, showed the association of several SNPs with bipolar disorder but the P-values and odds ratios were very low. With the development of DNA sequencing technology, an alternative hypothesis, common disease-rare variant hypothesis, becomes testable. We focused on the *POLG1* gene and searched for rare variants in 505 patients with bipolar disorder and 550 controls obtained from multi-center collaborative study in Japan. *POLG1* encodes mitochondrial DNA polymerase and is one of causative genes for chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO), which is a mitochondrial disease and occasionally accompanied by mood disorders. We identified dozens of non-synonymous variants of *POLG1*. We are now screening them for deleterious variants by using several methods : biochemical experiments (*in vitro*), referring to clinical data of CPEO patients with *POLG1* variants (*in vivo*), and computer prediction tools (*in silico*). In this article, we also discuss important issues with rare variant studies, which were noticed in the course of our study.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 22 (2) : 97-102, 2011)



気分障害の生物学的研究の最新動向—DSM, ICD 改訂に向けて*

気分障害の分子神経生物学**

加藤忠史¹⁾

Key words

Mood disorder, Depression, Bipolar disorder, Molecular neurobiology

はじめに

国民の社会生活障害の大きな要因となってい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。抗うつ薬によく反応するメランコリー型に加え、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。一方、抗うつ薬により、攻撃性、衝動性が高まる、「賦活症候群」が引き起こされるのではないかと、との懸念が繰り返し報道され、一部には精神医療パッシング的な動きさえ見受けられる。抗うつ薬による悪化を防ぐためには、双極性障害における初発の大うつ病エピソードを、その生物学的基盤に基づいて診断できるようにすることが必要であるが、面接による現在の診断法には限界があり、今後、分子神経生物学的な病態に基づいて、気分障害の疾患概念

と亜型分類を確立し、生物学的な診断分類に基づいて治療を最適化する必要がある。

気分障害の分類

気分障害には、大うつ病および双極性障害の他、気分変調症、気分循環性障害、一般身体疾患による気分障害、物質誘発性気分障害などがある。一般身体疾患による気分障害としては、神経疾患によるもの、内分泌疾患によるものが多い。物質誘発性気分障害は、治療薬で起きる場合、依存性薬物による場合がある。

うつ病

1. うつ病の類型

うつ病の発症に関与する危険因子としては、遺伝、養育、ライフイベントや社会的環境などによるストレス、加齢、身体因、薬剤、性別など、多くの要因がある。これらの危険因子の関与の程度は、うつ病の亜型によっても異なる。大うつ病の分類法は確立していないが、代表的な類型としては、以下のようなものが考えられよう。

- ①メランコリー型うつ病(内因性うつ病)
- ②非定型うつ病
- ③季節性うつ病
- ④血管性うつ病
- ⑤双極スペクトラムうつ病

メランコリー型うつ病では、伝統的に、執着性

2010年4月14日受稿, 2010年9月17日受理

* 第38回精神研シンポジウム(2009年12月より)

** Molecular Neurobiology of Mood Disorders

1) 理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム(☎351-0198 和光市広沢2-1), KATO Tadafumi: Laboratory for Molecular Dynamics of Mental Disorders, RIKEN Brain Science Institute, Wakou, Japan

0488-1281/11/¥500/論文/JCOPY