

#### 4. その他の薬剤

プロモクリプチン、アマンタジンなどのドパミンAゴニストは単独でも抗うつ効果を持つことが報告されている<sup>13)14)</sup>が、増強療法については効果のエビデンスは乏しい。

うつ病の成因については従来ノルアドレナリンとセロトニン系が注目され、現在の抗うつ薬が開発されてきたが、従来の薬剤に治療抵抗性があるうつ病ではドパミン系の低下が関与している可能性が示唆されている。このような背景からドパミンAゴニスト、MAO-B(モノアミン酸化酵素B)阻害薬である塩酸セレギリン(抗うつ薬との併用は禁忌)、ノルアドレナリン・ドパミン再取り込み阻害薬であるbupropionなど、ドパミン系を増強する薬剤が治療抵抗性うつ病の一部に有効である可能性はあると考えられる。

気分安定薬として躁うつ病に対する保険適応があるバルプロ酸やカルバマゼピンについては、これまでに幾つかの症例報告やオープン試験にて有効性を認めるといふ報告があるものの、エビデンスレベルは低いのが現状である。

ラモトリギンはわが国では2008年に抗てんかん薬として発売されたが、治療抵抗性うつ病に対する増強療法のプラセボ比較対照試験を2つ認め<sup>15)16)</sup>、その2つ共にプラセボと比べて抗うつ効果に有意差は無い結果となった。またStevens-Johnson症候群のリスクを最小にするため少量ずつの増量が必要なが使用上の難点である。

$\omega$ -3脂肪酸の治療抵抗性うつ病に対する増強療法については、3つ<sup>17)18)</sup>のプラセボ比較対照試験においてプラセボと比べて有意にうつ症状を改善したとの結果が出ている。そのため治療抵抗性うつ病における増強療法の中で $\omega$ -3脂肪酸のエビデンスレベルは非定型抗精神薬に次いで、リチウムやT3よりも高い結果となっている。(表3)。

その他の増強療法として $\beta$ -blockerでセロトニン1A自己受容体のアンタゴニスト作用を持つピンドロール、セロトニン1A受容体作動薬であるタンドスピロン、交感神経刺激役であるモダフィニル、メチルフェニデートやイノシトール、葉酸、ホルモン類など

による治療戦略の可能性が存在する<sup>20)</sup>が、否定的な見解もあり、エビデンスは乏しく有害事象も不明確である。

### III. まとめ

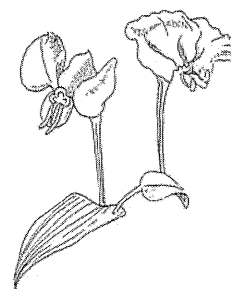
うつ病に対する抗うつ薬の投与が始まって半世紀が経過し、これまでにさまざまな治療法が検討されてきたものの、治療抵抗性うつ病に対する治療戦略は未だ定まっておらず、さまざまな治療アルゴリズムが存在するのが現状である。そのような中で、増強療法はいわゆる‘セカンドライン’として一定の位置を占めてきたことは事実であり、今後もその役割は続いていくものと考えられる。近年、急速にエビデンスが蓄積されつつある非定型抗精神薬による増強療法は、徐々にわが国の臨床の現場においても浸透し始めている印象であり、これまでのリチウムや甲状腺ホルモンなどによる増強療法に取って代わる可能性を秘めていると言える。

しかし、長期使用に於ける効果や副作用の検証や、リチウム、甲状腺ホルモンなどに対する比較試験はほとんど無く、それらに対する比較優位性ははっきりしておらず、今後の更なる研究が必要とされる場所である。

### 文 献

- 1) Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, et al : STAR\*D Study Team : Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D : implications for clinical practice. *Am J Psychiatry* 163 : 28-40, 2006.
- 2) Bauer M, Forsthoef A, Baethge C, et al. : Lithium augmentation therapy in refractory depression-update 2002. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 253 : 132-139, 2003.
- 3) Bauer M, Döpfmer S : Lithium augmentation in treatment-resistant depression : meta-analysis of placebo-controlled studies. *J Clin Psychopharmacol* 20 : 287, 2000.
- 4) Crossley NA, Bauer M : Acceleration and augmentation of antidepressants with lithium for

- depressive disorders: two meta-analyses of randomized, placebo-controlled trials. *J Clin Psychiatry* **68** : 935-940, 2007.
- 5) Baumann P, Nil R, Souche A, et al : A double-blind, placebo-controlled study of citalopram with and without lithium in the treatment of therapy-resistant depressive patients : a clinical, pharmacokinetic, and pharmacogenetic investigation. *J Clin Psychopharmacol* **16** : 307-314, 1996.
  - 6) Katona CL, Abou-Saleh MT, Harrison DA, et al : Placebo-controlled trial of lithium augmentation of fluoxetine and lofepramine. *Br J Psychiatry* **166** : 80-86, 1995.
  - 7) Aronson R, Offman HJ, Joffe RT, et al. : Triiodothyronine augmentation in the treatment of refractory depression. A meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* **53** : 842-848, 1996.
  - 8) Cooper-Kazaz R, Lerer B : Efficacy and safety of triiodothyronine supplementation in patients with major depressive disorder treated with specific serotonin reuptake inhibitors. *Int J Neuropsychopharmacol* **11** : 685-699, 2008.
  - 9) Amsterdam JD, Hornig-Rohan M : Treatment algorithms in treatment-resistant depression. *Psychiatr Clin North Am* **19** : 371-386, 1996.
  - 10) Bauer M, Hellweg R, Gräf KJ, et al : Treatment of refractory depression with high-dose thyroxine. *Neuropsychopharmacol* **18** : 444-455, 1998.
  - 11) Papakostas GI, Shelton RC, Smith J, et al. : Augmentation of antidepressants with atypical antipsychotic medications for treatment-resistant major depressive disorder : a meta-analysis. *J Clin Psychiatry* **68** : 826-831, 2007.
  - 12) Nelson JC, Papakostas GI. : Atypical antipsychotic augmentation in major depressive disorder : a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *Am J Psychiatry* **166** : 980-991, 2009.
  - 13) Nierenberg AA, Dougherty D, Rosenbaum JF : Dopaminergic agents and stimulants as antidepressant augmentation strategies. *J Clin Psychiatry* **59** : 60-64, 1998.
  - 14) Vale S, Espejel MA, Dominguez JC : Amantadine in depression. *Lancet ii* (7721) : 437, 1971.
  - 15) Barbosa L, Berk M, Vorster M : A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of augmentation with lamotrigine or placebo in patients concomitantly treated with fluoxetine for resistant major depressive episodes. *J Clin Psychiatry* **64** : 403-407, 2003.
  - 16) Santos MA, Rocha FL, Hara C : Efficacy and safety of antidepressant augmentation with lamotrigine in patients with treatment-resistant depression : a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* **10** : 187-190, 2008.
  - 17) Peet M, Horrobin DF : A dose-ranging study of the effects of ethyl-eicosapentaenoate in patients with ongoing depression despite apparently adequate treatment with standard drugs. *Arch Gen Psychiatry* **59** : 913-919, 2002.
  - 18) Nemets B, Stahl Z, Belmaker RH. : Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *Am J Psychiatry* **159** : 477-479, 2002.
  - 19) Su KP, Huang SY, Chiu CC, et al : Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Neuropsychopharmacol* **13** : 267-271, 2003.
  - 20) 岡本長久ほか : 「エビデンスに基づく難治性うつ病の治療」(野村総一郎, 樋口輝彦編). 新興医学出版社, 東京, 2006, p82-p105



## 難治性うつ病への対応

Management of refractory depression in Japan in 2010



岡本長久 坂本広太

Nagahisa OKAMOTO and Kota SAKAMOTO

国立精神・神経医療研究センター病院精神科

◎ “難治性うつ病”と一口にいても難治性に関して厳密な定義があるわけではない。臨床現場において何種類もの薬物療法を試みても改善しない治療抵抗性うつ病や、容易に再発し頻回に病相を反復するうつ病などを指しており、うつ病全体の30%程度にみられる。アメリカで行われた大規模臨床試験 STAR\*D 研究(Systematic Treatment Alternatives to Relieve Depression; 4段階に分けたアルゴリズムに沿って各治療を比較した臨床試験)では最終段階までの累積寛解率は67%で、4段階の薬物治療戦略を試みても寛解に至らない症例が1/3存在することが示されている。難治性うつ病に対する治療法として、抗うつ薬にリチウム、甲状腺ホルモン、非定型抗精神病薬、ドパミンアゴニストなどを併用する増強療法や電気痙攣療法などが臨床使用されているが、その治療戦略に関して、エビデンスに基づき治療を標準化するための十分な数の臨床研究はまだない。加えて日本では市販されている抗うつ薬の種類が少ないこともあり、難治性うつ病の臨床研究やアルゴリズム作成は遅れをとっている。わが国でも標準化された治療戦略を確立するため、エビデンスを蓄積していくことが臨床における重要な課題である。本稿ではその現状および今後の展望について述べる。



Key word: 難治性うつ病, 治療抵抗性うつ病, 増強療法, 併用療法, 修正型電気痙攣療法

薬物療法はうつ病治療の第一選択肢であり、わが国では1960年前後より第一世代三環系抗うつ薬(Tricyclic antidepressant: TCA)が、1980年代以降には第二世代のTCAや四環系抗うつ薬が発売された。またこの10年間は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(Selective Serotonin Reuptake Inhibitor: SSRI)やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(Serotonin Noradrenalin Reuptake Inhibitor: SNRI)が各国でつぎつぎと承認、発売され、わが国でもSSRIでは1999年マレイン酸フルボキサミン、2000年塩酸パロキセチン、2006年塩酸セルトラリンが、SNRIでは2000年塩酸ミルナプランが発売され、抗うつ薬の選択の幅は広がっている。また、2009年には新しい作用機序をもつノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性抗うつ薬(Noradrenergic and Specific Serotonergic Antidepressant: NaSSA)であるミルタザピンが発売され、2010年にはSNRIである塩酸

デュロキセチンが発売される予定である。

海外ではこれらの作用機序の抗うつ薬に加えてドパミン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬であるブプロピオン、モノアミン酸化酵素A阻害薬などが発売されており、わが国でもモノアミン酸化酵素A阻害薬以外の抗うつ薬は治験が行われ、今後導入される可能性が高い。

しかし、初回治療の抗うつ薬で寛解しない患者が2/3程度存在し、最終的にうつ病患者の約1/3程度が適切な薬物治療戦略によって改善しない難治性うつ病であることが知られている<sup>1)</sup>。



### 難治性うつ病の定義

一般的に難治性うつ病という言葉は、従来治療に反応しないうつ病に用いられてきた。しかし、すべての抗うつ薬とmECTや認知行動療法を試しすべて無効であった後に難治性うつ病と診断するのは、各国により発売されている抗うつ薬に

表 1 Thase & Rushの治療抵抗性うつ病のレベル分類<sup>3)</sup>

Stage I	1種類の作用機序の少なくとも1つの抗うつ剤による適切な治療に反応しない
Stage II	Stage I で用いられたものとは異なる作用機序の1つの抗うつ剤による適切な治療に反応しない
Stage III	Stage II に加え、1つの三環系抗うつ剤による適切な治療に反応しない
Stage IV	Stage III に加え、MAO 阻害薬による適切な治療に反応しない
Stage V	Stage IV に加え、両側性の電気けいれん療法に反応しない

違いがあることから難治性の定義が変わってしまう。また、介入の時期も不明確で、研究の標準化も困難となる。したがって、難治性(refractory)の定義はどの作用機序の何種類の抗うつ剤に反応しないかという治療抵抗性(treatment-resistant)の程度により規定されることが望ましい。しかし、従来の研究では研究者によってこの治療抵抗性の定義にばらつきが大きかったことが、現在まで難治性うつ病の臨床研究の標準化が困難であった大きな理由である。

Thase & Rush らはうつ病の治療抵抗性のレベルを分類し、その定性分類は明確であるため臨床

表 2 MGHでの治療抵抗性うつ病の定量的分類方法<sup>4)</sup>

Stage	説明	治療抵抗性スコア
Stage 1	1つの市販の抗うつ剤での適正な治療(適正用量で最低6週間に反応しない)	各1点
Stage 2	用量の最適化、期間の最適化、増強療法、併用療法	各0.5点
Stage 3	電気けいれん療法	3点

研究や治療戦略に使用されてきた(表1)。しかし、このThase & Rushモデルは同じ種類の薬剤より他の種類の薬剤への変更のほうが有効と考えていることや治療の階層付けがされていること(ECT>MAOI>TCA)、増強療法や併用療法を考慮していないことなどから批判的な見解もだされている。このような理由から治療抵抗性のレベルの定量的評価にはThase & RushモデルよりもMassachusetts General Hospital(MGH) Staging Method等の難治性診断基準(表2)のほうが適しているという意見もある<sup>2)</sup>。

近年、治療抵抗性の研究的定義は、“異なる作用機序の2つの抗うつ剤を十分量、十分期間用いても改善しないうつ病”という基準が用いられることで標準化されつつある。すなわち、Thase & RushのモデルではStage II以上がこの定義による治療抵抗性うつ病に該当する。十分量、十分期間の治療とは一般的に、十分な効果を上げる最大量(イミプラミン換算で150mg程度)か、症状改善が乏しい場合は最大用量で4~6週間以上の期間の治療とされる。しかし、近年、2週間までの抗うつ薬反応性で、以後の治療反応性を予測できるといふ報告も増加してきており<sup>5)</sup>、十分量で2週間にまったく無反応の場合では臨床的には変薬が許容される可能性がある。しかし、部分効果が認められる場合は、すくなくとも4~6週間の経過観察を必要とする。

またうつ病の頻回の病相反復者(rapid-cycler)に関しては明確な基準がなく、今後の標準化が必要である。

### 難治性うつ病の診断と評価

治療抵抗性うつ病と診断する場合、みせかけの

#### サイドメモ 1

#### 抗うつ薬の有効性の判定

うつ病の臨床試験に用いられる評価尺度として、Hamilton Rating Scale for depression(HRS-D)、Montgomery-Asberg Depression Rating Scale(MADRS)などがある。抗うつ剤の臨床反応性は臨床試験開始時の基線ラインからの評価尺度の改善の割合によって定義され、“無反応(nonresponse)”, “部分反応(partial response)”, “反応(response)”, “寛解(remission)”に分類される。一般的に、“反応”は臨床試験終了時、開始時より50%以上のうつ病評価尺度の減少を認めるもの、“部分反応”は25%以上50%以下のうつ病評価尺度の減少を認めるものとされている。“寛解”の定義は一定しないが、一般的にはHRS-D 17項目の総点が7点以下、MADRSの総点が10点以下になった場合を“寛解”とよぶ。臨床試験では抗うつ薬服用により“反応(response)”以上であった場合に、その抗うつ薬は有効であったと判断されることが多い。

表 3 みせかけの難治性と対応

	みせかけの難治性	対応
患者側要因	患者アドヒアランス不良(自己服薬調整や安易な転医など)	信頼関係の再構築と十分な治療教育
治療者側要因	診断の誤り 双極性うつ病の誤診 症候性うつ状態の誤診(甲状腺機能低下症や悪性腫瘍など) 脳器質性うつ状態の誤診(各種の認知症など) 治療の誤り 不適切な投与量(少量多剤併用など) 不適切な投与期間(早すぎる有効性の判定など) 精神科合併症の評価・対応不十分(不安障害・パーソナリティ障害・摂食障害・アルコール依存症) 心理社会的影響因子への対応不十分 うつ病亜型に応じた有効な治療不十分	病歴再聴取と気分安定薬の使用 身体疾患の評価と治療 脳器質性疾患の評価と治療 単剤化の努力と十分量の治療 十分期間での効果判定 合併する精神科疾患の同時治療 精神療法の強化・環境調整 各うつ病亜型に有効な治療への適正化

治療抵抗性を慎重に除外しなければならない。みせかけの治療抵抗性には患者側要因と医療者側要因がある。患者側要因には安易な転医の繰返しや服薬の自己中断、または自己調整などのノンアドヒアランスがあり、医療者側要因には原疾患の誤診と不適切な治療がある(表3)。このため、治療抵抗性の判断をする前に、患者側要因を評価するとともに、十分に診断と治療を再考する必要がある。

双極性うつ病、パーソナリティ障害、適応障害、不安障害、アルコール依存症などの物質依存症、認知症、初期統合失調症など幅広い疾患が難治性うつ病と診断され、紹介されてくることが多い。

診断の見直しとしてもっとも重要なものは双極性うつ病である。躁うつ病は60~70%がうつ病相で発症し、うつ病と診断される。しかし、うつ病が抗うつ薬を主剤とした治療となるのに対して双極性うつ病は気分安定薬やクエチアピンなどの非定型抗精神病薬が主剤となり、抗うつ薬は有効性に乏しいだけでなく、病相の不安定化を招くことがある。躁病相が短期で軽い場合や躁病相がない段階での診断は非常に難しいが、治療が異なる両者の鑑別は重要であり、つねに躁うつ病の可能性を念頭において本人や家族から詳細な情報収集を行うことで、見逃されていた過去の軽躁病エピソードおよび薬剤性躁転を再評価することが必要である。若年発症、躁うつ病の家族歴、不安障害の合併、頻回のうつ病相や急速な再燃と回復、非定型うつ症状などのbipolarity(躁うつ病傾向)を有する場合はとくに注意を要する。

甲状腺機能低下症や悪性腫瘍などに伴う症候性うつ状態は血液検査を含めた身体学的検査で評価し、それぞれの身体疾患に対する治療を行う必要がある。ステロイドやインターフェロンなどにより誘発される薬剤性うつ状態はうつ状態に対する精神科的治療を行いながら、可能なかぎりそれぞれの薬剤の減量や中止を行うことが基本となる。脳血管疾患、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症やLewy小体型認知症などの脳器質性疾患に伴ううつ状態も鑑別が必要である。認知症がうつ状態を初発症状として発症することがあるため、両者の鑑別は困難であることがあり、認知機能検査や脳画像検査も含めた慎重な診断が必要である。また、低活動性せん妄による精神活動や活動性の低下、喜怒哀楽の消失はうつ病と誤診されやすく、脳波所見も含めた正確な意識状態の評価が必要となる。

みせかけの治療抵抗性のもうひとつの要因として不適切な治療がある。多剤を少量ずつ併用するなどの適切でない治療が行われている場合も多く、抗うつ薬については一つひとつの抗うつ薬について十分量の治療と慎重な効果判定を極力1種類ずつ行っていく必要がある。また、短期間でつぎの抗うつ薬に変更するなど、無効の判定が早すぎてその抗うつ薬が十分に有効性を発揮できなかったという場合も多い。

また、うつ病亜型に応じた適切な治療が行われていたかを評価する必要がある。精神病性うつ病は抗うつ薬単剤の反応性が悪く、初期より抗うつ薬に非定型抗精神病薬が併用されるか、アモキサ

ピンや ECT が選択されるはずである。メランコリー型うつ病は SNRI や TCA を優先的に使用したほうがよいことがあり、非定型うつ病ではモノアミン酸化酵素阻害薬がわが国では発売されていないため SSRI や NaSSA が主体となる。季節性うつ病では比較的セルトラリンのエビデンスが高く、また高照度の光療法が高い有効性をもつ。

さらに、うつ病に合併した精神疾患を評価しておくことも重要である。パーソナリティ障害、摂食障害、アルコール乱用や依存、不安障害などの合併は治療抵抗性になりやすいことが知られている。それぞれの合併精神疾患に対する治療がうつ病治療と並行して適切に行われていたかを評価し、行われていなかった場合は合併精神疾患の並行した治療を行う必要がある。パーソナリティ障害や摂食障害では薬物療法だけでなく、環境調整に加えてストレス耐性や適応力を強化していくような認知行動療法的アプローチなどが必要となる場合もあれば、心理的トラウマが関係している場合は EMDR やエクスポージャーなどの専門的治療が必要な場合もある。また、しばしば合併するアルコール依存症では断酒継続が不可欠な治療となる。さらに、不適切な休息環境、経済的問題、家族関係の病理などによる支援組織の欠如など心理社会的な難治化要因が見逃されていないかを評価し、必要があれば援助組織や医療・福祉サービスを強化する。診断が真にうつ病で上記の難治化要因が否定された場合は真の治療抵抗性うつ病であり、はじめて治療抵抗性うつ病の治療戦略が必要となる。

難治性うつ病の定義が混沌としていたため、臨床医によって難治性(治療抵抗性)の定義が異なることも多いが、治療戦略自体も治療抵抗性のレベルに応じて異なってくる。このため、現在までに使用された抗うつ剤の種類、用量、期間、反応性の程度はもちろん、副作用、うつ病亜型などを総合的に評価しておく必要がある。家族歴ではセロトニン輸送体の遺伝子多型による遺伝負因をもつ可能性も示唆されており、治療抵抗性や薬剤反応性が家族間で共通することがある。

## うつ病はどれくらい難治化するのか？

近年アメリカで、STAR\*D アルゴリズムに基づく、治療抵抗性のレベルに応じた大規模な二重盲検試験が行われた。図 1 に STAR\*D 研究における各治療オプションでの寛解率を示す<sup>1)</sup>。1 種類目の SSRI で約 1/3 の患者が寛解するが、以後治療抵抗性が増すにつれて、どのような治療オプションを選択しても寛解率がしだいに減少していくことがわかる。レベル 4 までの累積寛解率は 67% で、実に 1/3 の患者が 4 種類の治療オプションを経過しても寛解しないまま残されることになる。

## 難治性うつ病に対する治療戦略

### 1. 薬物療法

薬物療法の選択肢として各種のガイドラインでは他の抗うつ薬への薬剤変更、増強療法、抗うつ薬どうしの併用療法が薬物療法戦略の選択肢となるが、それぞれにメリットとデメリットがある(表 4)。

#### ① 抗うつ剤の変更

わが国で発売されている抗うつ薬(成分)には SSRI(3 種類)、SNRI(1 種類)、NaSSA(1 種類)、TCA(8 種類)、四環系抗うつ薬(3 種類)、トラゾトン、スルピリドがある。適切な初回治療に反応がなく、抗うつ薬を変更する場合には同一作用機序の抗うつ薬に変更する場合と作用機序の異なる抗うつ薬に変更する選択肢がある。過去の大規模研究によると、初回治療における 1 種類目の SSRI が無効であった場合に、異なる SSRI に変更した場合<sup>6-8)</sup>、SNRI に変更した場合<sup>7,8)</sup>、NaSSA へ変更した場合<sup>9)</sup>、TCA に変更した場合<sup>10)</sup>の治療反応率はいずれも 30~50%程度で、どの選択肢をとっても大きな違いはなさそうである。STAR\*D のレベル 2 の結果でも有意な差は認められていない。しかし、一方で同一機序の SSRI よりも SNRI や NaSSA などの他の機序の抗うつ薬に変薬したほうが、有意に寛解率が高い(SSRI への変薬群 23.5%と他の機序への変薬群 28%)というメタ解析もある<sup>11)</sup>。

2 種類以上の抗うつ薬に無反応である治療抵抗性レベルの抗うつ薬の変更におけるエビデンスはいまだ少なくエビデンスに基づいて治療を階層化

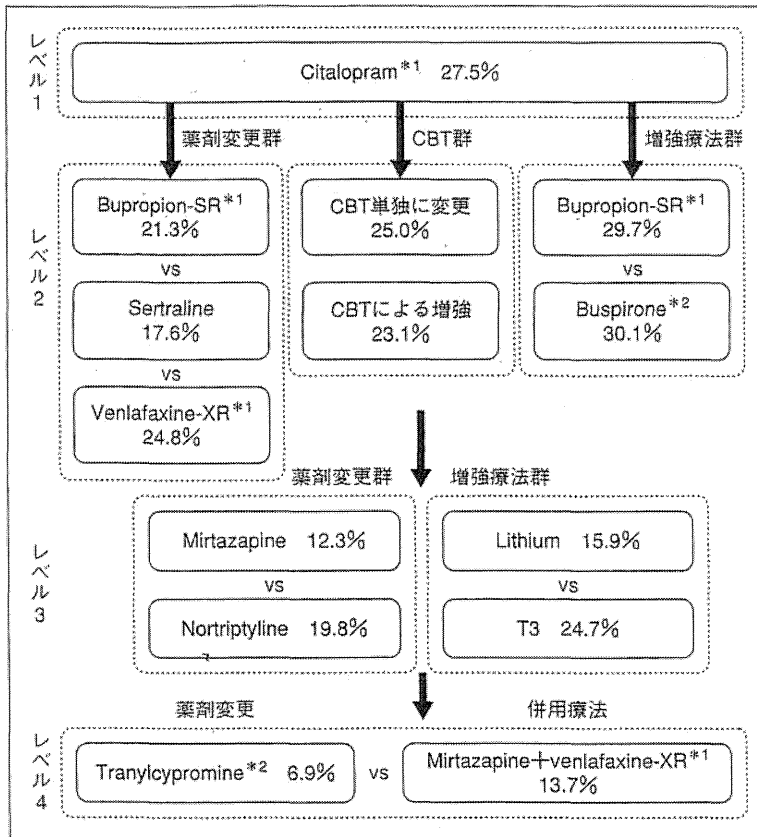


図 1 STAR\*D 研究における寛解率<sup>4)</sup>

\*1: 現在わが国でその薬剤または類似成分が治験中の薬剤, \*2: 現在わが国での導入予定のない薬剤. 無印は現在わが国で発売中の薬剤.

Citalopram は SSRI, Bupropion はドパミン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (Dopamine Noradrenalin Reuptake Inhibitor: DNRI), Venlafaxine は SNRI, Tranylcypromine はモノアミン酸化酵素 A 阻害薬 (Mono Amine Oxidase A Inhibitor: MAOA-I) に抗うつ薬の薬理学的作用により分類される. Buspirone はセロトニン 1A 受容体作動薬.

表 4 各治療戦略における特徴

	薬剤変更	増強療法	併用療法
保険適応	あり	なし	あり
有効性のエビデンス	少ない	比較的多い	少ない
副作用のデータ	多い	少ない	非常に少ない
臨床的副作用	少ない	比較的多い	非常に多い
前薬の部分反応の利用	不可能	可能	可能

するのは困難である. STAR\*D ではこのレベル (レベル 3) の患者がミルタザピン (平均 42.7 mg) とノルトリプチリン (平均 96.8 mg) に割り付けられ, HRSD の寛解率はミルタザピン群では 12.3%,

ノルトリプチリン群では 19.8%, 反応率はミルタザピン群で 13.4%, ノルトリプチリン群で 16.5% であり, 両群の有効性に有意な差はなかったことが示されている<sup>1)</sup>. このレベルでは, 高くはないが一定の治療反応率がある NaSSA や TCA への抗うつ薬への変更も考慮することになる. また, SNRI であるベンラファキシンの高容量投与はこのレベルの治療抵抗性でも比較的效果が高い. Poirier ら (1999) の 4 週間の二重盲検試験で, 2 種類以上の抗うつ薬に抵抗性のうつ病患者が高用量のベンラファキシシン群, パロキセチン群に割り付けられ, 寛解率はそれぞれ 42% と 20%, 反応率はそれぞれ 52% と 33% で高用量ベンラファキシシンが優れ



ていたことが示されている。ベンラファキシンをはじめとする SNRI は SSRI と異なり用量依存性に臨床効果が増加することが知られており、難治性うつ病に対しての治療用量として、わが国で設定されている SNRI であるミルナシブランの治療用量を検討する余地があるかもしれない。このレベル以上での、TCA から TCA への変更はわが国でよく用いられる手法であるが、データも少ないながら反応率は 30% 以下と低いと考えられる。

## ② 増強療法

上記の治療抵抗性レベルにある患者や、治療抵抗性レベルが低くても現在使用している抗うつ薬で部分効果が認められる場合は、部分効果を生かすことができる増強療法が選択肢となりうる。わが国で使用できる増強療法としては、炭酸リチウム、甲状腺ホルモン、非定型抗精神病薬、ドパミンアゴニスト、抗てんかん薬、ピンドロールなどがあるが、現在治療抵抗性うつ病に対して比較的強いエビデンスをもつ治療戦略はリチウム、甲状腺ホルモン、非定型抗精神病薬による増強療法である。なお増強療法はどれもうつ病に対してはわが国で保険適応となっていないことに注意を要する。

リチウムの作用機序はいまだ未解明であるが、その主要な働きはセカンドメッセンジャー機構に働きかけ、セロトニンの神経伝達効果を増強すると考えられている。リチウム増強療法については多くの二重盲検試験が行われており、3つのメタ解析<sup>12-14)</sup>が行われ有効性が示されている。薬物治療抵抗性うつ病の 50% 近くに 4 週以内の効果増強が認められるとされ、とくに血中濃度 0.5meq/l 以上に維持した場合は改善率が高い。効果発現時期については Thase ら(1989)のオープン試験では 5~6 週目に反応する群も認められており、6 週間以上の投与が推奨されることもある。しかし、もっとも最近行われたメタ解析<sup>14)</sup>でも対象は 10 個の二重盲検試験の 269 人であり、うち 9 個の試験の人数は 35 人以下である。さらに、対象とした二重盲検試験に双極性うつ病が含まれているものがあり、おもに bipolarity をもつうつ病にリチウムが効果を発揮したのではないかという見解も存在する。

甲状腺ホルモンはセロトニンやノルアドレナリンの神経伝達効果を増強することに加え、潜在的に低下した甲状腺機能を是正することにより効果を発揮すると考えられている。甲状腺ホルモンには T3 と T4 があり、T4 は T3 に代謝され、脳内での活性をもつ。欧米での使用は T3 の使用が多いが、T3 は半減期が短く血中濃度の変動が大きいため、わが国では伝統的に T4 の使用が一般的である。ただし T4 は有効性の報告がある一方で、否定的見解もあり、治療抵抗性うつ病へのエビデンスレベルは低い。Joffe ら(1993)の二重盲検試験では T3(25~50 mg/day)にはリチウム増強療法と同等の効果があり、プラセボに勝ることを示している。Aronson ら(1996)による 292 人を対象とした T3 のメタ解析では 23% に増強効果を認めたが、二重盲検試験に限った解析では効果は認めなかった<sup>15)</sup>。また、Joffe ら(2006)による 2 週間の短期治療の報告ではリチウム、T3、リチウムと T3 の併用、プラセボで治療効果に差がないことがわがっている。

STAR\*D では 2 種類の治療戦略に失敗した患者がリチウム群、T3 群に割り付けられ、最長 14 週間の治療が行われた。寛解率は、リチウム群では 15.9%、T3 群では 24.7% であり、有効性に有意な差は認めらず、副作用による中断率はリチウム群 23.2%、T3 群 9.6% とリチウム群のほうが忍容性が低い結果となっている<sup>1)</sup>。

1999 年、Ostroff と Nelson が非定型抗精神病薬の有効性を報告して以降、STAR\*D 開始時にはエビデンスの乏しかった非定型抗精神病薬の治療抵抗性うつ病に対する増強療法のエビデンスが近年急速に増加した。2007 年、Papakostas らは 1,500 人を対象としてオランザピン、リスペリドン、クエチアピンのメタ解析を行って有効性を示した<sup>16)</sup>。その後、アリピプラゾールとクエチアピンの臨床試験のエビデンスが急速に蓄積し、アメリカ FDA では単極性うつ病の増強療法として 2008 年最初にアリピプラゾールが認可され、2009 年にクエチアピンも承認された。さらに、治療抵抗性うつ病に対し SSRI であるフルオキセチンとオランザピンの合剤も承認された。このような状況のなか、2009 年行われた 16 個の二重盲検試験



の3,480人を対象としたメタ解析<sup>17)</sup>では非定型抗精神病薬(オランザピン, リスペリドン, クエチアピン, アリピプラゾール)のプラセボに対する反応率の odds ratio は 1.69, 寛解率の odds ratio は 2.00 であることが報告され, その有効性に非定型抗精神病薬の種類による有意な差はないことも示された. このメタ解析はいままでもっともエビデンスが高いとされたりチウムや T3 のメタ解析の実に 12~13 倍の人数を対象としており, これらの結果からは現在治療抵抗性うつ病に関してもっともエビデンスが高い増強療法は非定型抗精神病薬ということになる. ただし, 同時にこの解析における有害事象による治療中断率は 9.1% で odd ratio は 3.91 とプラセボより高く, 加えて維持療法時などの長期投与における有効性と安全性は未解明であることには留意する必要がある. 抗精神病薬の併用効果の機序はまだわかっていないが, 各非定型抗精神病薬の特有の作用や, Zhang ら(2000)の報告する前頭前野におけるノルアドレナリンやドパミンの放出増加作用に関与する可能性がある.

プロモクリプチン, アマンタジン, プラミヘキソールなどのドパミンアゴニストは単独でも抗うつ効果をもつことが報告されており, 少数の臨床試験では治療抵抗性うつ病患者に対して有効である可能性が示唆されている. うつ病の病因については従来ノルアドレナリンとセロトニン系が注目され, 現在の抗うつ薬が開発されてきたが, 従来の薬剤に治療抵抗性があるうつ病ではドパミン系の低下が関与している可能性が示唆されている. このような背景からドパミンアゴニスト, MAO-B 阻害薬である塩酸セレギニン(抗うつ薬との併用は禁忌), ノルアドレナリン・ドパミン再取込み阻害薬のブプロピオンなどドパミン系を増強する薬剤が, 治療抵抗性うつ病の一部に有効である可能性がある.

カルバマゼピン, ラモトリジンなどの抗てんかん薬はやはりいくつかの臨床試験で有効性には一定のエビデンスがある.

その他の増強療法として  $\beta$ -blocker でセロトニン 1A 自己受容体のアンタゴニスト作用をもつピンドロール, セロトニン 1A 受容体作動薬である

タンドスピロン, パルプロ酸, トピラメートなどの抗てんかん薬, 交感神経刺激薬であるモダフィニルや, イノシトール, リルゾール,  $\omega$ -3 脂肪酸, 葉酸, ホルモン類などの治療戦略の可能性が存在するが<sup>18)</sup>, 否定的見解もあり, エビデンスは非常に乏しく有害事象も不明確である.

したがって, 現時点では増強療法として上記の非定型抗精神病薬またはリチウムを第一選択とし, それが無効であった場合, 順次, 甲状腺ホルモン, ドパミンアゴニスト, カルバマゼピンなどを選択肢としていくことが最善と考えられる.

### ③ 併用療法

Texas Medication Algorithm Project (TMAP) の非精神病性うつ病アルゴリズム 2008 年度版においては, 各種の作用機序をもつ新規抗うつ薬による初回治療で部分反応があった場合に, 従来の部分反応を変薬により失う可能性を考慮してリチウムや T3 などによる増強療法という選択肢に加えて, SSRI と NaSSA, SNRI と NaSSA の併用など作用機序の異なる新規抗うつ薬どうしの併用を許容している. また, 2 種類の治療戦略で改善のない場合には, 非定型抗精神病薬による増強療法とともに, SSRI と NaSSA や SSRI と TCA などの併用療法が選択肢のひとつとなっている. そして, 4 種類の治療戦略に無反応でかつ電気痙攣療法や迷走神経刺激にも無反応であった場合には薬物相互作用への注意と薬理的に異なる作用機序の薬剤を使用することを前提に, 3 種類の抗うつ薬の併用が選択肢として許容されている. またこのアルゴリズムでは 100 mg 以下のトラゾドンが不眠に対する治療としてどの段階でも許容されている.

また, Star\*D 研究における抗うつ剤どうしの併用は, やはり SSRI とブプロピオンや SNRI と NaSSA といった比較的選択性の高い, 異なる作用機序の抗うつ薬を用いて広範囲スペクトラムの治療をつくりだす戦略が採用されている. レベル 4 では 3 種類の治療戦略に失敗した患者が MAOI である tranlycypromine 単剤への変更またはベンラファキシンとミルタザピンの併用療法に割り付けられた. HRSD の寛解率と反応率はそれぞれ tranlycypromine 単剤群で 6.9% と 12.1% で, 併用

療法群で 13.7%, 23.5% であり, 不耐性による治療中断率は tranylcypromine 群で 41.4%, 併用療法群では 21.6% であった<sup>1)</sup>。この研究のほか, ミルタザピンに関しては Carpenter ら (2002) が, 抗うつ薬治療に反応しない 20 名の大うつ病または気分変調症患者にミルタザピン 15~30 mg/day の併用療法を行う二重盲検試験を行い, 反応率と寛解率はそれぞれミルタザピン群では 64% と 45%, プラセボ群では 20% と 13% であったと報告している。ミルタザピンと同様の後シナプス  $\alpha_2$  受容体遮断作用をもつミアンセリンに関しても併用療法の報告が存在する。1 種類以上の治療抵抗性うつ病に関する SSRI とミアンセリンに関する併用療法の効果は, Ferrei ら (2001) の二重盲検試験では明らかな有効性が報告されているが, Licht ら (2002) の二重盲検試験の結果は否定的なものであった。しかし, ミアンセリン併用もミルタザピンと同様  $\alpha_2$  受容体遮断作用によりセロトニン再取込み阻害効果を増強し, 抗うつ効果を強める可能性があることに加え, 強い抗ヒスタミン作用により強固な不眠に効果を発揮するため, 睡眠薬の代用としても臨床的に併用が有用なことがある。SSRI とトラゾドンの併用療法は同様に不眠に効果的であり, Maes ら (1996) による二重盲検試験では, 治療抵抗性うつ病にも単剤療法より有効であることが示されている。

TCA と SSRI の併用療法について, Nelson ら (2004) は 39 名のうつ病患者で 6 週間の二重盲検試験を行い, フルオキセチンと TCA であるデシプラミン併用による寛解率は 54% でそれぞれの単剤療法よりも優れていることを示している。しかし, Fava ら (2002) はフルオキセチンとデシプラミン併用がフルオキセチンを単純に増量するより効果が劣ることを示しており, 評価は定まっていない。

SSRI と TCA や TCA と TCA の併用療法はわが国では多用されているが, 大規模な二重盲検試験がなく, 薬剤によっては CYP を介した薬物相互作用により血中濃度が何倍にも高まることで, 重篤な心血管系副作用やセロトニン症候群の出現のリスクが高まるため, 使用がやむをえない場合は薬理的相互作用を踏まえたうえで慎重に行うべ

きである。すくなくとも多剤併用にならないよう医師の最善の努力は必要であり, 部分効果も乏しい無効な抗うつ薬は早期に中止することが望ましい。上記の知見から, 治療抵抗性うつ病に関しての抗うつ薬併用に関してミルタザピン, ミアンセリン, トラゾドンなどが選択肢となりうるが, TCA と SSRI の併用に関しては薬理と相互作用について専門的知識のもと十分な配慮が必要であり, また TCA と TCA の併用はエビデンスが乏しく相互作用もきわめて多いため極力行わないほうがよいと考えられる。

#### ④ 容易に再発し病相を反復するうつ病に対する治療

うつ病がおおむね改善してもまだ軽度の症状が残存する場合は, 完全寛解をめざした積極的な薬物療法を行うことで再燃率を低下させることができる。Star\*D 研究において各レベルで十分に反応のあった患者の再発に関する 12 カ月の追跡研究によれば, 追跡研究導入時に良好に反応したが, 寛解していなかった患者の各治療抵抗性レベルでの再発率はそれぞれ 59%, 68%, 76%, 83% であるのに対し, 寛解していた患者の各レベルでの再



#### 完全寛解の定義

うつ病治療では完全寛解が治療の最終目標である。完全寛解はうつ病による残遺症状がほとんどなく, 心理社会機能が完全に回復した状態と定義することができる。うつ病患者は急性期症状から急速な回復により著しい改善を感じ, 評価尺度は大きく改善することが多いが, 長期的には軽度の残遺症状を残し心理社会機能は十分な回復に至っていないことが少なくない。寛解と判断された患者の 1/3 に不眠や倦怠感などの残遺症状が存在し, 残遺症状のある患者では再発リスクが高いことが示されている。うつ病評価尺度の改善後も自覚的な心理社会機能の回復には時間がかかり, 仕事, 学業, 日常生活などに支障をきたすことがあるため, 症状が持続する間は薬物療法を早期に中断せず継続し, 認知行動療法などの精神療法を併用することが有効である。今後, 抗うつ薬の有効性に関する臨床研究は長期予後や心理社会的機能の評価も含め行われていかなければならない。

発率は 33.5%, 47.4%, 42.9%, 50.0% であり, 治療抵抗性レベルが高かった患者ほど再発しやすいことを示すとともに, おおむね改善したが, 寛解していない患者はより高い再発率を示すことを明らかにしている<sup>1)</sup>.

一方, 一度は完全寛解するが, すぐに再燃してしまう rapid cycler タイプのうつ病では躁うつ病を視野に入れた病歴聴取や寛解期の気分状態の評価を再度行う必要がある. 病相の頻回の反復や急速なうつ病相の出現と回復は前述したような bipolarity の一部である可能性があるからである. 真にうつ病で, 抗うつ薬を何種類も変更し十分量の抗うつ薬を用いているにもかかわらず容易に頻回に病相を再燃する場合は, 積極的にリチウムなどの気分安定薬の併用を考慮する必要がある. リチウムのうつ病における病相予防効果は Souza ら (1991) によるメタ解析で有効性が示されており, その後も多くの臨床試験で有効性が示されている. また, カルバマゼピンもリチウムほどではないが, 病相予防効果に関する有効性が報告されている.

## 2. 修正型電気痙攣療法(mECT)と その他の非薬物療法的戦略

Pagnin ら<sup>19)</sup>や UK ECT Review Group<sup>20)</sup>のメタ解析によれば, 治療抵抗性うつ病を含むうつ病に対して, ECT には薬物療法よりも優れた有効性があることが示されている. アメリカ精神医学会のガイドラインでは, 薬物療法抵抗性うつ病は ECT の二次適応となっており, 高度の治療抵抗性うつ病でも ECT への反応率は約 70% 以上である<sup>21)</sup>. Folkers (1997) らは 2 剤以上の抗うつ薬抵抗性であった 39 人を, パロキセチン群と右片側性 ECT 群に割り付け, 反応率はパロキセチン群で 28%, ECT 群で 71% であり, HRSD の改善はパロキセチン群で 30%, ECT 群で 60% であったことを示している.

ECT 後の再発は ECT 治療における最大の限界であり, ECT は高い急性期効果を示す一方で, 継続療法を行わない場合は高い再燃率を示すことが知られている. ECT コース終了後, 維持療法を行わない場合には 6 カ月以内の再燃率は 65~80% と報告されており, 治療抵抗性も同様に再燃しや

すいことが知られている. ECT 後の維持薬物療法については, ノルトリプチリンとリチウムの併用療法, パロキセチン, イミプラミン, ノルトリプチリンなどの有効性が報告されているが, まだ研究は少ない. すくなくとも再燃予防には十分な維持薬物療法が必要である.

適切かつ十分な薬物療法にもかかわらず, 再燃, 再発を繰り返す場合は, 低頻度の ECT を定期的に繰り返す維持 ECT (maintenance ECT) も選択肢となりうる. 維持 ECT の目標は, 再燃を防ぐために十分な頻度で ECT を行い, 寛解状態を保つことであり, 薬物抵抗性で ECT に反応するが, 再燃, 再発を繰り返す症例に適している. 維持 ECT のガイドラインは存在しないが, Schwarz らは, 維持 ECT の施行基準を示し平均 7 回の繰り返す入院, 10 回の薬物療法の失敗, 5 種類の向精神薬, ECT への高い反応性などをあげている. Gagne ら (2000) は, 5 年間の追跡調査を行い, 抗うつ薬と維持 ECT の併用群での寛解維持率は 2 年後, 5 年後それぞれ 93%, 73% と良好であったが, 抗うつ薬単独群では 52%, 18% と低いことを示している. この研究においては ECT 群のほうが過去の薬物療法抵抗性レベルが高かったが, 高い寛解維持率を示している. 再燃の兆候がみられた場合は,

サイド  
メモ  
3

### 修正型電気痙攣療法

電気痙攣療法 (electroconvulsive therapy : ECT) の歴史は古く, わが国では 1939 年より ECT の報告があり, うつ病に対しても高い有効性が確認されている治療である. 麻酔や筋弛緩薬を使わず施行する従来型 ECT では副作用も多く, 1950 年代になると, 静脈麻酔薬と筋弛緩薬, 呼吸循環管理を用いた修正型電気痙攣療法 (modified ECT : mECT) が施行されるようになった. わが国でも, 1980 年代に mECT が普及し, 高齢患者や身体合併症患者に対しても安全な ECT を提供できるようになった. さらに, 定電流短パルス矩形波治療器 (パルス波治療器) が, わが国で 2002 年に認可され, 導入された. パルス波治療器は交流正弦波治療器 (サイン波治療器) の 1/3 程度のエネルギー量で痙攣誘発することができ, さらに安全性が向上した. 高度の治療抵抗性うつ病に関しても期待できる治療法である.

維持 ECT の予定を早めることで対応可能である。しかし、維持 ECT に関する具体的なガイドラインはなく、安易な維持 ECT 導入は避け、十分なインフォームドコンセントを行い症例ごとに慎重に検討することが望ましい。臨床研究では ECT の作用機序の解明が急務であるが、ECT の無作為化割付試験や維持 ECT の長期効果と副作用、ECT コース終了後の継続薬物療法に関する研究も必要である。

また、近年 FDA に認可された迷走神経刺激はわが国ではまだ適応がなく、経頭蓋磁気刺激、深部脳刺激、精神外科においては海外においてもまだ実験的治療の域を出ない。

### 3. 認知行動療法(CBT)

治療抵抗性うつ病に対する精神療法の有効性については McPherson ら(2005)や Thase ら(2001)による総説があり、エビデンスは十分ではないが、CBT が有効である可能性が示唆されている。

Star\*D 研究では初回 SSRI による治療が失敗した場合、CBT を単独で行った群、CBT をシタロプラムに対する増強療法として行った群に割り付けられ、それぞれが薬剤変更群、薬剤増強療法群と比較された。増強療法群での比較ではシタロプラムと CBT の併用が citalopram に対する薬剤増強療法と比較され、CBT を含む治療変更群では CBT 単独群が薬剤変更群と比較された。増強療法群の比較では、認知療法増強群では HRSD 寛解率 23%、反応率 35%で、薬物療法増強群では寛解率 33%、反応率 28%で有意差はなかった。ただし、薬物療法増強群では認知療法による増強群よりも早期に寛解する傾向があった。治療変更群での比較では認知療法群では寛解率 25%、反応率 22%、薬物療法群では寛解率は 28%、反応率 27%で有意な差はなかったが、認知療法群のほうが異なる抗うつ薬へ変更した群より副作用が少なかった<sup>1)</sup>。また、1種類の SSRI が無効であった青年期うつ病に関する研究では、抗うつ薬に CBT を併用したほうが抗うつ薬単独よりも治療成績がよいことが示されている<sup>2)</sup>。これらの研究からは、すくなくとも1種類の抗うつ薬への治療抵抗性レベルでは CBT は有効と考えられ、臨床的にもうつ病に特徴的な認知の偏りをもつうつ病や薬効の乏しいス

トレスへの耐性の低い、いわゆる新型うつ病などには抗うつ薬に併用した CBT が必要かつ有効な場合がある。

## ● おわりに

難治性うつ病に対する治療戦略は現在臨床的な重要課題であるが、多くの治療戦略に関するエビデンスはいまだ乏しく、治療の標準化や治療アルゴリズムの構築のために、今後エビデンスを蓄積していく必要がある。また、研究の標準化のためには、難治性うつ病の定義、反応や寛解の定義、みせかけの治療抵抗性うつ病について十分考慮しなければならない。治療に関してはエビデンスに十分な配慮を行うとともに、各個人にオーダーメイドの治療を提供する必要がある。

当院ではうつ病専門外来とうつ・ストレス専門病棟の連携のもと、2名の気分障害を専門とする精神科専門医により客観的な評価・診断を行うとともに、治療抵抗性うつ病に対するより高いエビデンスに基づく治療戦略のアドバイスを行っている。当院病棟では年間1,300回を超える修正型電気痙攣療法の施行件数があり、個々の症例の特性に応じた急性期 ECT または維持 ECT を行っている。また、専門病棟において多職種チームによる入院認知行動療法、心理社会的治療などの複合的な治療を行い、各個人にオーダーメイドの治療を提供できるように複合的な戦略をとっている。

## 文献

- 1) 岡本長久：精神科治療学，23：277-284，2008。
- 2) Souery, D. et al. : *J. Clin. Psychiatry*, 67 : 16-22, 2006.
- 3) Thase, M. E. et al. : *J. Clin. Psychiatry*, 58 : 23-29, 1997.
- 4) Petersen, T. et al. : *J. Clin. Psychopharmacol.*, 25 : 336-341, 2005.
- 5) Nakajima, S. et al. : *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2009 Dec. 5. [Epub ahead of print]
- 6) Thase, M. E. et al. : *J. Clin. Psychiatry*, 58 : 16-21, 1997.
- 7) Rush, A. J. et al. : *N. Engl. J. Med.*, 354 : 1231-1242, 2006.
- 8) Brent, D. et al. : *JAMA*, 299 : 901-913, 2008.
- 9) Thase, M. E. et al. : Annual Meeting of the American college of neuropsychopharmacology, Puerto Rico, 2000.
- 10) Thase, M. E. et al. : *Arch. Gen. Psychiatry*, 59 : 233-239, 2002.

- 11) Papakostas, G. I. et al. : *Biol. Psychiatry*, **63** : 699-704, 2008.
- 12) Bauer, M. : *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **253** : 132-139, 2003.
- 13) Bauer, M. : *J. Clin. Psychopharmacol.*, **20** : 287, 2000.
- 14) Crossley, N. A. et al. : *J. Clin. Psychiatry*, **68** : 935-940, 2007.
- 15) Aronson, R. et al. : *Arch. Gen. Psychiatry*, **53** : 842-848, 1996.
- 16) Papakostas, G. I. et al. : *J. Clin. Psychiatry*, **68** : 826-831, 2007.
- 17) Nelson, J. C. et al. : *Am. J. Psychiatry*, **166** : 980-991, 2009.
- 18) 岡本長久・他：エビデンスに基づく難治性うつ病の治療(野村総一郎, 樋口輝彦編). 新興医学出版, 2006, pp.82-105.
- 19) Pagnin, D. et al. : *J. ECT*, **20** : 13-20, 2004.
- 20) UK ECT Review Group : *Lancet*, **361** : 799-808, 2003.
- 21) Okamoto, N. et al. : *J. ECT*, 2009 Nov. 19. [Epub ahead of print]

# Functional Genetic Variation at the *NRGN* Gene and Schizophrenia: Evidence From a Gene-Based Case–Control Study and Gene Expression Analysis

Kazutaka Ohi,<sup>1,2,3</sup> Ryota Hashimoto,<sup>1,2,4\*</sup> Yuka Yasuda,<sup>1,2</sup> Motoyuki Fukumoto,<sup>1,2</sup> Hidenaga Yamamori,<sup>1,2,5</sup> Satomi Umeda-Yano,<sup>5</sup> Takeya Okada,<sup>1,2</sup> Kouzin Kamino,<sup>1,3</sup> Takashi Morihara,<sup>1</sup> Masao Iwase,<sup>1</sup> Hiroaki Kazui,<sup>1</sup> Shusuke Numata,<sup>6</sup> Masashi Ikeda,<sup>2,7</sup> Tohru Ohnuma,<sup>8</sup> Nakao Iwata,<sup>2,7</sup> Shu-ichi Ueno,<sup>9</sup> Norio Ozaki,<sup>2,10</sup> Tetsuro Ohmori,<sup>6</sup> Heii Arai,<sup>8</sup> and Masatoshi Takeda<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

<sup>2</sup>CREST (Core Research for Evolutionary Science and Technology), JST (Japan Science and Technology Agency), Kawaguchi, Saitama, Japan

<sup>3</sup>National Hospital Organization, Yamato Mental-Medical Center, Yamatokoriyama, Nara, Japan

<sup>4</sup>Molecular Research Center for Children's Mental Development, United Graduate School of Child Development, Osaka University, Kanazawa University and Hamamatsu University School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

<sup>5</sup>Department of Molecular Neuropsychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

<sup>6</sup>Department of Psychiatry, Tokushima University Graduate School of Medicine, Kuramoto, Tokushima, Japan

<sup>7</sup>Department of Psychiatry, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi, Japan

<sup>8</sup>Department of Psychiatry, Juntendo University School of Medicine, Bunkyo, Tokyo, Japan

<sup>9</sup>Department of Psychiatry, Ehime University Graduate School of Medicine, Toon, Ehime, Japan

<sup>10</sup>Department of Psychiatry, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Aichi, Japan

Manuscript Received: 19 October 2011; Manuscript Accepted: 22 February 2012

Genome-wide association and follow-up studies have reported an association between schizophrenia and rs12807809 of the *NRGN* gene on chromosome 11q24.2. We investigated the association of five linkage disequilibrium-tagging SNPs and haplotypes that cover the *NRGN* gene with schizophrenia in a Japanese sample of 2,019 schizophrenia patients and 2,574 controls to determine whether rs12807809 is the most strongly associated variant for schizophrenia in the vicinity of the *NRGN* gene. We found that the rs12807809–rs12278912 haplotype of the *NRGN* gene was associated with schizophrenia (global  $P = 0.0042$ ). The

frequencies of the TG and TA haplotypes of rs12807809–rs12278912 in patients were higher (OR = 1.14,  $P = 0.0019$ ) and lower (OR = 0.85,  $P = 0.0053$ ), respectively, than in the controls. We did not detect any evidence of association of schizophrenia with any SNPs; however, two nominal associations of rs12278912 (OR = 1.10,  $P = 0.057$ ) and rs207571 (OR = 1.10,  $P = 0.057$ ) were observed. Furthermore, we detected an association between the rs12807809–rs12278912 haplotype and *NRGN* expression in immortalized lymphoblasts derived from 45 HapMap JPT subjects ( $z = 2.69$ ,  $P = 0.007$ ) and confirmed

## How to Cite this Article:

Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Umeda-Yano S, Okada T, Kamino K, Morihara T, Iwase M, Kazui H, Numata S, Ikeda M, Ohnuma T, Iwata N, Ueno S-i, Ozaki N, Ohmori T, Arai H, Takeda M. 2012. Functional Genetic Variation at the *NRGN* Gene and Schizophrenia: Evidence From a Gene-Based Case–Control Study and Gene Expression Analysis.

Am J Med Genet Part B 159B:405–413.

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare; Grant number: H22-seishin-ippan-001; Grant sponsor: Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT); Grant sponsor: KAKENHI; Grant numbers: 22390225, 23659565; Grant sponsor: Japan Foundation for Neuroscience and Mental Health.

\*Correspondence to:

Dr. Ryota Hashimoto, M.D., Ph.D., Molecular Research Center for Children's Mental Development, United Graduate School of Child Development, Osaka University, Kanazawa University and Hamamatsu University School of Medicine, D3, 2-2, Yamadaoka, Suita, Osaka 5650871 Japan. E-mail: hashimor@psy.med.osaka-u.ac.jp

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 27 March 2012

DOI 10.1002/ajmg.b.32043

the association in immortalized lymphoblasts derived from 42 patients with schizophrenia and 44 healthy controls ( $z = 3.09$ ,  $P = 0.002$ ). The expression of the high-risk TG haplotype was significantly lower than the protective TA haplotype. The expression was lower in patients with schizophrenia than in controls; however, this difference was not statistically significant. This study provides further evidence of the association of the *NRGN* gene with schizophrenia, and our results suggest that there is a link between the TG haplotype of rs12807809–rs12278912, decreased expression of *NRGN* and risk of developing schizophrenia. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** schizophrenia; *neurogranin* (*NRGN*); single nucleotide polymorphism (SNP); genome-wide association study (GWAS); gene expression

## INTRODUCTION

Schizophrenia is a common and complex psychiatric disease with strong genetic components. Schizophrenia has an estimated heritability of approximately 80% [Cardno and Gottesman, 2000; Tsuang, 2000], and many genes have been implicated in the pathogenesis of schizophrenia [Sun et al., 2008].

Genome-wide association studies (GWAS) of single nucleotide polymorphisms (SNPs) investigate thousands of DNA samples from patients and controls, and these studies are a powerful tool for identifying common risk factors in complex diseases. Stefansson et al. [2009] combined the samples (from 12,945 patients with schizophrenia and 34,591 controls) from three large GWAS (the GENE-plus, the International Schizophrenia Consortium and the Molecular Genetics of Schizophrenia GWAS) and conducted follow-up studies in 4,999 patients and 15,555 controls from four sets of samples from Europe, including from the Netherlands, Denmark, Germany, Hungary, Norway, Russia, Sweden, Finland, and Spain. The authors detected several significant association signals. Seven markers gave  $P$  values smaller than the genome-wide significance threshold of approximately  $1.6 \times 10^{-7}$  in the combined samples: five markers, rs6913660, rs13219354, rs6932590, rs13211507, and rs3131296, which spanned the major histocompatibility complex (MHC) region on chromosome 6p21.3–22.1; a marker, rs12807809, located 3,457 bases upstream of the *neurogranin* (*NRGN*) gene on chromosome 11q24.2; and a marker, rs9960767, in intron 4 of the transcription factor 4 (*TCF4*) gene on chromosome 18q21.2. Of the seven SNPs, four SNPs, rs6913660, rs13219354, rs13211507, and rs9960767, were not polymorphic in the HapMap Japanese in Tokyo (JPT) samples. The minor allele frequencies (MAFs) for two SNPs, rs6932590 and rs3131296, were less than 5%. Because only one marker, rs12807809, in the *NRGN* gene was a common SNP in the HapMap JPT samples (MAF greater than 5%), we focused on this SNP and the *NRGN* gene in the present study.

The *NRGN* gene is the human homolog of the neuron-specific rat *RC3/neurogranin* gene. *NRGN* encodes a postsynaptic protein kinase substrate that binds calmodulin (CaM) in the absence of calcium and has been implicated in dendritic spine formation and synaptic plasticity [Baudier et al., 1991]. *NRGN* plays an important

role in the  $\text{Ca}^{2+}$ –CaM signaling pathway [Hayashi, 2009].  $\text{Ca}^{2+}$  influx-induced oxidation of *NRGN* leads to the postsynaptic activation of CaM-dependent protein kinase II (CaMKII) by CaM, which is associated with strengthened *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor signaling [Li et al., 1999]. Reduced *NRGN* activity may mediate the effects of NMDA hypofunction implicated in the pathophysiology of schizophrenia.

The *NRGN* gene spans 7.3 kb of genomic DNA and contains four exons [Martinez de Arrieta et al., 1997]. Part of exon 1 and exon 2 encode a 78-amino-acid protein, and exons 3 and 4 contain untranslated sequences. A thyroid hormone response element (TRE) has been identified in intron 1 [Martinez de Arrieta et al., 1999]. An association between the *NRGN* gene and schizophrenia has previously been reported in a small population of male Portuguese and Brazilians [Ruano et al., 2008], although the associated SNP in the study, rs7113041, was not tightly correlated with the genome-wide supported SNP, rs12807809 (HapMap CEU  $r^2 = 0.07$ , JPT  $r^2 = 0.01$ ). In addition, two separate studies reported no association between the genetic variants of *NRGN* and schizophrenia in Bulgarian [Betcheva et al., 2009] and Chinese populations [Li et al., 2010]. The genome-wide supported SNP and other SNPs in the *NRGN* gene were not genotyped in the GWAS of schizophrenia in Japanese populations because of a difference in the genotyping chips used among the separate GWAS, which the Illumina HumanHap 300 or 550 BeadChips, Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 5.0 and Affymetrix GeneChip Mapping 100 K microarrays [Stefansson et al., 2009; Ikeda et al., 2011; Yamada et al., 2011] were used. Here, we first investigated the association between the *NRGN* gene and schizophrenia in a Japanese population using a gene-based approach to determine whether rs12807809 is the most strongly associated variant for schizophrenia near the *NRGN* gene. Second, we examined whether the associated haplotype of *NRGN* influenced *NRGN* expression in immortalized lymphoblasts derived from the HapMap JPT samples and our Japanese case–control samples.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

Subjects for the genetic association analysis included 2,019 unrelated patients with schizophrenia (54.5% males, with a mean age  $\pm$  SD of  $44.7 \pm 15.1$  years) and 2,579 unrelated healthy controls (49.4% males,  $45.4 \pm 19.4$  years). The mean age did not differ significantly between cases and controls ( $P = 0.24$ ); however, the male to female ratio of the patients was significantly higher than in the controls ( $P < 0.05$ ). Age and sex-matched subjects for *NRGN* expression analysis consisted of 42 patients with schizophrenia (58.1%,  $38.4 \pm 11.2$  years) and 44 healthy subjects (56.8% males,  $38.0 \pm 11.4$  years). These subjects were included in the genetic association analysis. All subjects used in both analyses were biologically unrelated, of Japanese ethnicity and were recruited from four geographical regions in Japan: Osaka, Aichi, Tokushima, and Tokyo [Yamaguchi-Kabata et al., 2008; Ohi et al., 2009]. Cases were recruited from outpatient and inpatient facilities at university hospitals and psychiatric hospitals. Each subject with schizophrenia had been diagnosed by at least two trained psychiatrists based on an unstructured clinical interview; diagnoses were made based on the



criteria of the fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). Controls were recruited through local advertisements. Psychiatrically healthy controls were evaluated using unstructured interviews to exclude individuals who had current or past contact with psychiatric services. Written informed consent was obtained for all subjects after the procedures had been fully explained. This study was carried out in accordance with the World Medical Association's Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethical Committee of Osaka University, Fujita Health University, Nagoya University, Tokushima University and Juntendo University.

### SNP Selection and SNP Genotyping

This study was designed to examine the association between the *NRGN* gene and schizophrenia by selectively tagging SNPs in the *NRGN* gene and flanking regions ( $\pm 5$  kb). We selected five tagging SNPs using the TAGGER algorithm (Paul de Bakker, <http://www.broad.mit.edu/mpg/tagger>) with the criteria of  $r^2$  greater than 0.80 in "pair-wise tagging only" mode and an MAF greater than 5%, which was implemented in Haploview 4.2 using HapMap data release 27 Phase II + III, Feb 2009, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126 [Japanese in Tokyo (JPT), Chr 11: 124,109,952.124,127,307]. The five tagging SNPs were rs1939214, rs12807809, rs12278912, rs2075713, and rs11219769. Markers are shown in Table I; orientation and alleles are reported on the genomic plus strand (rs12807809 is reported as T/C, as has been reported in previous GWAS [Stefansson et al., 2009]). Venous blood was collected from the subjects and genomic DNA was extracted from whole blood according to standard procedures. The SNPs were genotyped using the TaqMan 5'-exonuclease allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) as previously described [Hashimoto et al., 2006, 2007]. Detailed information on the PCR conditions is available upon request. Genotyping call rates were 98.9% (rs1939214), 98.5% (rs12807809), 99.3% (rs12278912), 99.3% (rs2075713), and 99.5% (rs11219769). No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the examined SNPs was detected in the patients with schizophrenia or healthy controls ( $P > 0.05$ ). The positions of the five SNPs analyzed in the present study are shown in Figure 1.

### Quantitative Measurement of *NRGN* Gene Expression

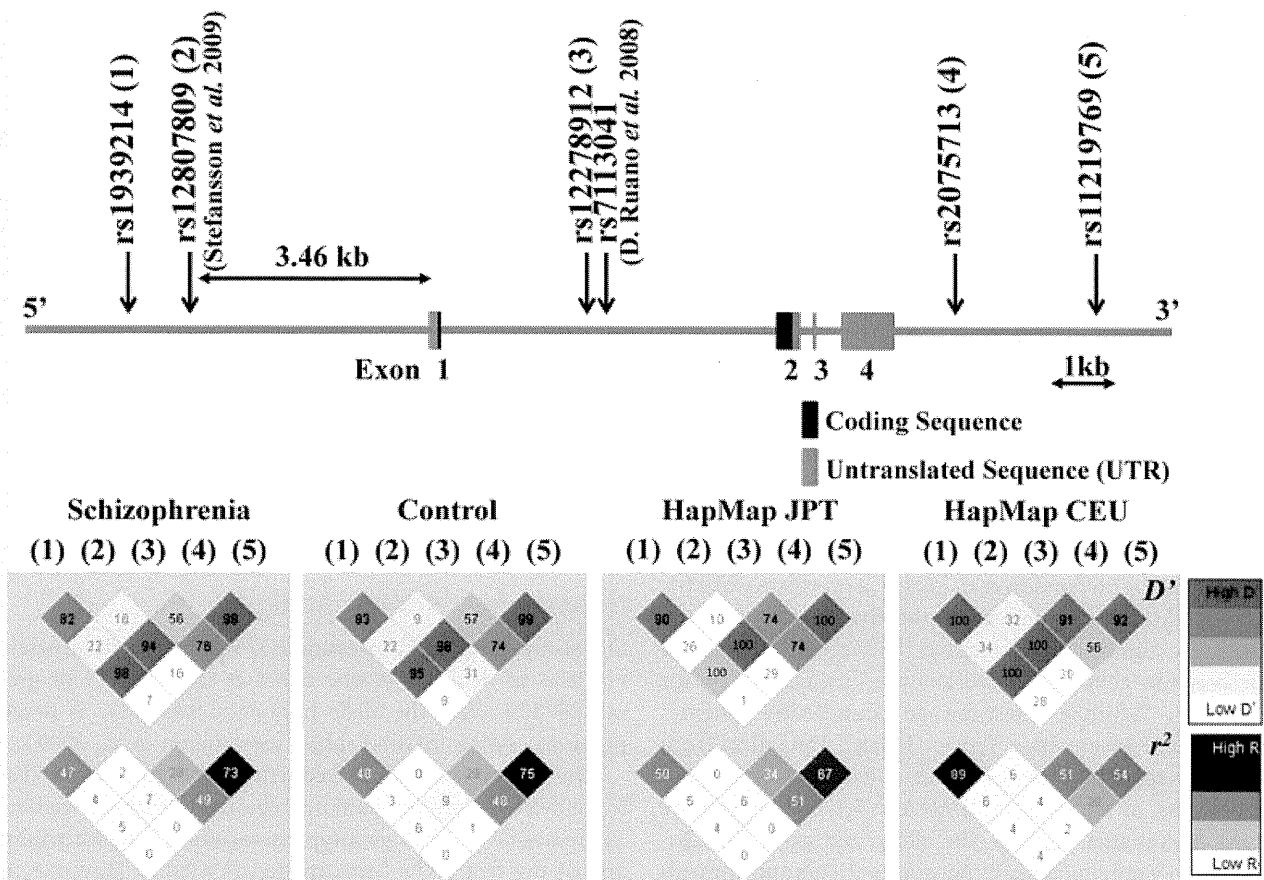
Isolation and immortalization procedures of lymphocytes from blood using the Epstein-Barr virus (EBV) were performed by SRL of Tokyo, Japan. Immortalized, patient-derived lymphocytes were grown in culture media supplemented with 20% fetal bovine serum. Total RNA was extracted from cell pellets using the RNeasy Mini Kit (Qiagen K.K., Tokyo, Japan). The total yield of RNA was determined by absorbance at 260 nm, and the quality of the RNA was determined using agarose gel electrophoresis.

According to the manufacturer's protocol, total RNA was treated with DNase to remove contaminating genomic DNA using DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion, Austin, TX). Total RNA (10  $\mu$ g) treated with DNase was used in a 50- $\mu$ l reverse transcriptase reaction to synthesize cDNA with the SuperScript

TABLE I. Genotype and Allele Distributions for SNPs in the *NRGN* Gene Between Patients With Schizophrenia and Controls in a Japanese Population

Marker	SNP IDs (M)	Position <sup>a</sup>	M/m <sup>b</sup>	Gene	SCZ (n = 2019)				CON (n = 2579)				MAF		Allelic		OR (95% CI)
					M/M	M/m	m/m	M/M	M/m	m/m	SCZ	CON	P-value ( $\chi^2$ )	P-value ( $\chi^2$ )			
					0.67	0.30	0.04	0.66	0.30	0.04	0.19	0.19	0.51 (1.3)	0.29 (1.1)	0.25	0.26	
rs1939214 (A)	124110500	A/G	5'														1.06 [0.95-1.18]
rs12807809 (T) <sup>c</sup>	124114495	T/C	5'	0.58	0.35	0.07	0.56	0.37	0.07	0.44 (1.6)	0.25	0.26	0.25	0.26	0.25 (1.3)	0.25 (1.3)	1.06 [0.96-1.16]
rs12278912 (G) <sup>d</sup>	124117369	G/A	Intron1	0.61	0.34	0.05	0.59	0.35	0.06	0.13 (4.1)	0.22	0.23	0.22	0.23	0.057 (3.6)	0.057 (3.6)	1.10 [1.00-1.22]
rs2075713 (A)	124123149	A/C	3'	0.65	0.31	0.04	0.62	0.33	0.05	0.17 (3.5)	0.20	0.21	0.20	0.21	0.057 (3.6)	0.057 (3.6)	1.10 [1.00-1.22]
rs11219769 (G)	124125357	G/T	3'	0.57	0.37	0.06	0.55	0.38	0.07	0.24 (2.8)	0.25	0.26	0.25	0.26	0.09 (2.8)	0.09 (2.8)	1.09 [0.99-1.19]

SCZ, patients with schizophrenia; CON, healthy controls; M, major allele; m, minor allele; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio.  
<sup>a</sup>db SNP build 129.  
<sup>b</sup>The first alleles shown are major alleles. All the alleles are represented according to the plus strand DNA sequence.  
<sup>c</sup>The genome-wide supported SNP for schizophrenia [Stefansson et al., 2009].  
<sup>d</sup>Because a high linkage disequilibrium between rs12278912 and rs7113041 [Ruano et al., 2008] was found in the HapMap\_JPT samples ( $r^2 = 0.93$ ), rs12278912 was selected as the tagging SNP by the TAGGER program.



**FIG. 1.** The genomic structure of *NRG1*, including the locations of the five tagging SNPs studied and linkage disequilibrium of these SNPs in the patient, control, HapMap JPT, and CEU groups. Based on an entry in the Entrez Gene database [National Center for Biotechnology Information], the genomic structure of *NRG1* is shown above. The locations of the SNPs analyzed in this study are indicated by arrows, with numbers indicated in parentheses. The numbers indicated in parentheses refer to the numbering of the SNPs in the linkage disequilibrium [LD] diagram. The distances of exons–introns and intermarkers are drawn to scale. The LDs between pairwise SNPs are shown using the  $D'$  [upper] and  $r^2$  [lower] values at the bottom of the map of the gene structure separately for cases, controls, the HapMap JPT samples and the HapMap CEU samples. High levels of LD are represented by black [ $D'$  and  $r^2$ ] coloring, with increasing color intensity from 0 to 100, as shown by color bars.

First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. Detailed information on the PCR conditions is available upon request.

To measure mRNA expression levels of housekeeping ( $\beta$ -actin) and *NRG1* genes, we used the Pre-Developed TaqMan Assay Reagent kit (Applied Biosystems). Primer information (gene name: assay ID, transcript ID, target region) is as follows; *NRG1*: Hs00382922\_m1, NM\_001126181.1 and NM\_006176.2, Exon1-2;  $\beta$ -actin: 4326315E, NM\_001101, no region indicated (Applied Biosystems). Expression levels of these genes were measured by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) using an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with a 384-well format as previously described [Yamamori et al., 2011; Yasuda et al., 2011]. PCR data were obtained using Sequence Detector software (SDS version 2.1; Applied Biosystems) and quantified using a standard curve. This software plotted the real-time fluorescence intensity and selected the threshold within the linear phase of the amplicon

profile. The software plotted a standard curve of the cycle at threshold  $C_t$ , which is where the fluorescence generated within a reaction crossed the threshold, versus the quantity of RNA. All samples were measured using a single plate per target gene, and their  $C_t$  values were in the linear range of the standard curve. The quantity of each sample was predicted by  $C_t$  values. The qRT-PCR reaction was performed in triplicate, and the expression level of the gene was taken as the average of three independent measurements. Standard curves were obtained using serial dilutions (1:4) of pooled complementary DNA prepared from 300 ng total RNA derived from immortalized lymphocytes. The standard curves of  $\beta$ -actin and *NRG1* showed that these genes were expressed in immortalized lymphocytes. In each experiment for  $\beta$ -actin and *NRG1*, the  $R^2$  value of the standard curve was  $>0.99$ , and no-template control assays resulted in no detectable signal. The individual expression levels of the *NRG1* gene were normalized to the housekeeping gene (raw target gene expression level divided by raw housekeeping gene expression level) and were used for statistical analysis.

## Haplotype Associated With *NRGN* Expression (eQTL)

To identify whether the haplotypes in *NRGN* associated with schizophrenia may be expression quantitative trait loci (eQTL), we analyzed *NRGN* expression in two datasets of lymphoblast-derived HapMap JPT samples and in the Japanese case-control samples. For the HapMap JPT samples, we extracted genotypes and *NRGN* lymphoblastoid expression data from the HapMap JPT samples ( $n = 45$ ) deposited in GeneVar (<http://www.sanger.ac.uk/humgen/genevar/> [Stranger et al., 2007]). For the Japanese case-control samples, we used our genotypes and *NRGN* lymphoblastoid expression data obtained using the method described above.

### Statistical Analyses

We performed power calculations using the Power Calculator for Two-Stage Association Studies (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/> [Skol et al., 2006]). The power estimate was based on an allele frequency of 0.83 at rs12807809, an odds ratio of 1.19, which was indicated by Stefansson et al. [2009], a prevalence of 0.01, and an alpha level of 0.05 using a multiplicative model.

Differences in clinical characteristics between patients and controls or between genotypes were analyzed using  $\chi^2$  tests for sex and the Mann-Whitney *U*-test for age using PASW Statistics 18.0 software (SPSS Japan, Inc., Tokyo, Japan). Deviation from HWE was tested separately in test cases and controls using  $\chi^2$  tests for goodness of fit using SNPalyze V5.1.1 Pro software (DYNACOM, Yokohama, Japan). The allelic and genotypic distributions of *NRGN* polymorphisms between patients and controls were analyzed using  $\chi^2$  tests with SNPalyze V5.1.1 Pro software. The number of effective independent SNPs assayed was estimated to correct for multiple testing by the spectral decomposition method of Nyholt using the SNPspD software [Nyholt, 2004]. The effective number of independent marker loci was 4.13 and corrected *P*-value for allelic and genotypic associations was set at  $P < 0.012$ . Pairwise linkage disequilibrium (LD) analyses expressed by  $D'$  and  $r^2$  were applied to detect the intermarker relationships in each group using Haploview 4.2 software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/contact.php>). Haplotype frequencies were estimated using the method of maximum likelihood with genotyping data using the expectation-maximization (EM) algorithm from SNPalyze V5.1.1 Pro software. Rare haplotypes detected in less than 3% of patients and controls were excluded from the haplotypic association analysis, as previously described [Ohi et al., 2009, 2010]. We performed 10,000 permutations for significance tests to determine empirical significance using a  $2 \times 2$  contingency table approach. We used a 2- to 5-window fashion analysis. Since Bonferroni correction for multiple testing is considered to be too conservative to apply to genetic association analyses [Nyholt, 2001], method of Nyholt [Nyholt, 2004] for allelic and genotypic associations and permutation tests [Dudbridge, 2003] for haplotypic associations are considered to be appropriate for these analyses.

The difference in expression levels between Japanese patients with schizophrenia and controls was analyzed using linear regression in PASW Statistics 18.0 software. Age and sex, which may influence gene expression, were corrected for in the expression analysis. HPlus (<http://qge.fhrc.org/hplus>) is a software applica-

tion for estimating haplotype frequencies and inferring individual haplotypes based on EM and progressive ligation (PL) algorithms [Li et al., 2003], and most significantly assessing haplotypic associations with various types of phenotypes using linear regression. Differences of expression levels among haplotypes were analyzed using linear regression in HPlus software. Each genotype was treated as the number of major alleles (0, 1, and 2) in the expression analysis. For the joint haplotype analysis in HPlus software, each haplotype was tested against the reference haplotype (equal to most frequent haplotype) using linear regression. As age and sex were not available for the HapMap samples, these confounding factors were not corrected for in the expression analysis. Expression levels in Japanese cases, control samples and in the combined samples were corrected for age and sex in the analyses. We applied a Bonferroni correction in expression analysis (three tests). The significance level for statistical tests was set at two-tailed  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Genetic Association Analysis

Our study size of 2,019 cases and 2,579 controls had sufficient power (>80%) to detect a genetic effect at ORs of 1.19 or greater for rs12807809 when the allele frequency was 0.83, as described in previous GWAS (SGENE-plus) [Stefansson et al., 2009].

The genotype and allele frequencies of five tagging SNPs located in the *NRGN* gene and flanking regions are summarized in Table I. There was no allelic or genotypic association with schizophrenia for any of the five SNPs (uncorrected  $P > 0.05$ ). However, nominal differences in allele frequencies between patients and controls were observed in rs12278912 ( $\chi^2 = 3.6$ ,  $P = 0.057$ , corrected  $P = 0.24$ ) and rs2075713 ( $\chi^2 = 3.6$ ,  $P = 0.057$ , corrected  $P = 0.24$ ). The major allele frequencies of both SNPs were higher in patients than in controls. Consistent with previous GWAS [Stefansson et al., 2009], the frequency of the major T allele of rs12807809 was higher in patients (75.4%) than in controls (74.4%) in our Japanese population, although the results did not reach statistical significance [ $\chi^2 = 1.3$ ,  $P = 0.25$ , OR (95% confidence interval (CI)) = 1.06 (0.96–1.16)].

We focused on haplotypic association between patients with schizophrenia and healthy subjects using a 2- to 5-window fashion analysis. Haplotype analysis showed a significant association with schizophrenia (rs12807809–rs12278912,  $\chi^2 = 13.1$ , global  $P = 0.0042$ ) (Supplementary Table I). The frequency of the major TG haplotype of rs12807809–rs12278912 was higher in patients (62%) than in controls (58%) [ $\chi^2 = 9.4$ ,  $P = 0.0019$ , OR (95% CI) = 1.14 (1.05–1.24)] (Table II). On the other hand, the frequency of the TA haplotype of rs12807809–rs12278912 was lower in patients (14%) than in controls (16%) [ $\chi^2 = 7.3$ ,  $P = 0.0053$ , OR (95% CI) = 0.85 (0.76–0.96)] (Table II). There was no haplotypic association with schizophrenia for any other haplotypes. These findings suggest that the major TG haplotype of rs12807809–rs12278912 may be related to an increased risk of schizophrenia, and the TA haplotype may have a protective role against the susceptibility to schizophrenia. These results of allelic, genotypic, or haplotypic associations were not affected by excluding 86 samples used for expression analyses (data not shown).

TABLE II. Differences in the rs12807809–rs12278912 Haplotype Between Patients With Schizophrenia and Healthy Subjects

Haplotype	Frequency		Individual $P$ ( $\chi^2$ )	OR (95%CI)	Global $P$ ( $\chi^2$ )
	Patients	Controls			
rs12807809 <sup>a</sup> –rs12278912 <sup>b</sup>					
TG	0.62	0.58	<b>0.0019 [9.4]</b>	1.14 [1.05–1.24]	<b>0.0042 [13.1]</b>
CG	0.17	0.18	0.07 [3.4]	0.90 [0.81–1.01]	
TA	0.14	0.16	<b>0.0053 [7.3]</b>	0.85 [0.76–0.96]	
CA	0.08	0.08	0.57 [0.3]	1.05 [0.90–1.22]	

Significant  $P$  values are shown as bold-faced and underlined type.

<sup>a</sup>The genome-wide supported SNP for schizophrenia [Stefansson et al., 2009].

<sup>b</sup>Because a high linkage disequilibrium between rs12278912 and rs7113041 [Ruano et al., 2008] was found in the HapMap JPT samples ( $r^2 = 0.93$ ), rs12278912 was selected as the tagging SNP by the TAGGER program.

The LD relationships between the markers are provided in figure 1. The LD pattern observed in our controls was similar to our patients and the JPT HapMap samples; however, it was different from that of the CEU HapMap samples. The strengths of the LD patterns of rs1939214–rs12807809 and rs12278912–rs2075713–rs1219769 were different between Japanese populations and the CEU HapMap samples. The low LD pattern of rs12807809–rs12278912 was similar among the groups ( $D' < 0.50$ ,  $r^2 < 0.10$ ).

### NRGN Gene Expression Analysis

The *NRGN* expression level was lower in patients with schizophrenia ( $n = 42$ , mean  $\pm$  SD,  $0.86 \pm 0.58$ ) than in controls ( $n = 44$ ,  $1.00 \pm 0.75$ ). However, the results did not reach statistical significance ( $r = -0.14$ ,  $\beta = -0.11$ ,  $SE = 0.14$ ,  $t = -0.97$ ,  $P = 0.34$ ).

Based on the results from the genetic association analysis, we investigated whether the rs12807809–rs12278912 haplotype of the *NRGN* gene was an eQTL in two datasets. The rs12807809–rs12278912 haplotype related to schizophrenia was significantly associated with *NRGN* expression in healthy HapMap JPT samples. The *NRGN* gene expression of the high-risk TG haplotype of rs12807809–rs12278912 was significantly lower than that of the protective TA haplotype ( $z = 2.69$ ,  $P = 0.007$ ). We confirmed that the rs12807809–rs12278912 haplotype was significantly associated with *NRGN* expression normalized to the  $\beta$ -actin expression in the controls and combined samples (Fig. 2 and Table III, control samples:  $z = 2.30$ ,  $P = 0.021$ , combined samples:  $z = 3.09$ ,  $P = 0.002$ ). The association occurred in the same direction among the HapMap JPT, control, and combined samples. In case samples, the expression level of rs12807809–rs12278912 was lower in samples with the high-risk TG haplotype than in those with the protective TA haplotype, although the result did not reach statistical significance ( $z = 1.49$ ,  $P = 0.14$ ). The association in the HapMap JPT and combined samples remained significant after correction for multiple tests (HapMap JPT samples: corrected  $P = 0.021$ , combined samples: corrected  $P = 0.006$ ). However, there was no significant association after applying the correction in control samples (corrected  $P = 0.063$ ).

### DISCUSSION

In this study, we provided evidence that haplotypes, including the genome-wide-screen-supported SNP of the *NRGN* gene, were associated with an increased risk of schizophrenia. Our in silico analysis showed that the high-risk rs12807809–rs12278912 haplotype of the *NRGN* gene may be associated with a low expression level of the *NRGN* gene in lymphoblasts derived from the HapMap JPT samples. We confirmed the association between the haplotype and *NRGN* expression in the combined case–control samples. Our results suggest that the schizophrenia-associated haplotype at the

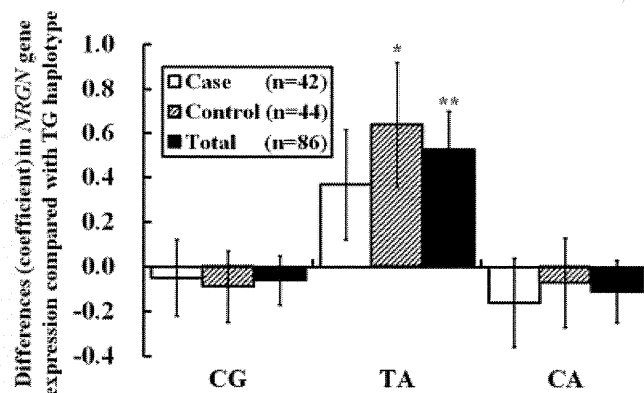


FIG. 2. The association between the rs12807809–rs12278912 haplotype of the *NRGN* gene and *NRGN* expression in lymphoblasts. Expression of the protective TA haplotype of rs12807809–rs12278912 was significantly higher than that of the high-risk TG haplotype in controls and combined case–control samples. The error bars represent standard errors of the coefficient. Estimated frequencies of each haplotype were as follows—TG haplotype: Case, 69%; Control, 61%; Total, 65%; CG haplotype: Case, 16%; Control, 20%; Total, 18%; TA haplotype: Case, 7%; Control, 11%; Total, 9%; CA haplotype: Case, 8%; Control, 9%; Total, 8%. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

*NRGN* gene may be a functional variant, and the results support an association between the *NRGN* gene and schizophrenia.

This report is the first investigation of the association of tagging SNPs and haplotypes covering the *NRGN* gene with schizophrenia. To our knowledge, five genetic studies have investigated whether the *NRGN* gene is implicated in schizophrenia. A genome-wide linkage study has shown that the chromosomal region 11q23.3-24 including the *NRGN* gene is linked to schizophrenia in British and Icelandic populations [Gurling et al., 2001]. Subsequently, an association study determined that rs7113041, which displays high LD with rs12278912 and is located on intron 1 in the *NRGN* gene, is related to the risk of developing schizophrenia in male subjects of Portuguese origin [Ruano et al., 2008]. In addition, three GWAS and follow-up studies have shown that rs12807809 is associated with schizophrenia in large European samples [Stefansson et al., 2009]. However, two studies reported no association between *NRGN* and schizophrenia in Bulgarian or Chinese populations [Betcheva et al., 2009; Li et al., 2010]. In the present study, we determined that the rs12807809–rs12278912 haplotype is associated with an increased risk of schizophrenia in a Japanese population. However, there were no significant associations between any SNP, including rs12807809 and rs12278912, and schizophrenia in the population. The inconsistency of association among the previous studies and the present study might result from ethnic differences or type I or II errors for the different sample sizes: Portuguese, 315 cases, 295 controls and 73 trios [Ruano et al., 2008]; European Caucasian, 12,945 cases and 34,591 controls [Stefansson et al., 2009]; Japanese, 2,019 cases and 2,579 controls (present study); Bulgarian, 185 cases and 184 controls [Betcheva et al., 2009]; and Chinese, 2,496 cases and 5,184 controls [Li et al., 2010]. In addition, the SNPs investigated in each study were different. Ruano et al. [2008] and Betcheva et al. [2009] examined rs7113041, which has high LD with rs12278912 but not with rs12807809, whereas Stefansson et al. [2009] and Li et al. [2010] examined rs12807809

but not rs12278912. However, none of these studies examined haplotypes for the *NRGN* gene. Because the rs12807809–rs12278912 haplotype may be the most significant genetic variant in this region, further study is required to confirm the association between the rs12807809–rs12278912 haplotype and schizophrenia in other populations.

Differences in the relative *NRGN* expression levels between patients with schizophrenia and healthy subjects were not demonstrated. This result may be due to the small sample sizes in this study, which may have resulted in the failure to identify a modest difference in *NRGN* expression in this complex disease. We determined that the major TG haplotypic and the TA haplotypic frequencies of rs12807809–rs12278912 were higher and lower, respectively, in patients with schizophrenia than in healthy controls. In addition to these findings, we found that *NRGN* gene expression of the high-risk TG haplotype was significantly lower than that of the protective TA haplotype in lymphoblasts derived from our Japanese case–control subjects as well as the JPT HapMap sample. The low LD patterns of rs12807809–rs12278912 were similar across populations. This region may be vulnerable to recombination. Combinations of the TG and TA of rs12807809–rs12278912 could play an important role in the pathogenesis of schizophrenia. In this study, gene expression data derived from lymphoblasts raised the possibility that the rs12807809–rs12278912 haplotype may be a functional variant of *NRGN*. Further biological studies of the function of rs12807809–rs12278912 are required to verify the expression results.

Smith et al. [2011] analyzed *NRGN* expression in several brain tissues derived from a dataset of at least 130 individuals of European ancestry. However, they showed that neither the genome-wide supported SNP nor any individually correlated SNPs were associated with *NRGN* expression. They did not examine any association between haplotype and *NRGN* expression. There are several challenges in investigating expression findings in the postmortem

TABLE III. The Association Between the rs12807809–rs12278912 Haplotype and mRNA Expression

Haplotypes	Frequency	Coefficient	SE	CI	P-value (Z-score)
Schizophrenia (n = 42)					
TG	0.69	0 (ref)	—	—	—
CG	0.16	−0.05	0.17	{−0.39−0.29}	0.76 {−0.30}
TA	0.07	0.37	0.25	{−0.12−0.86}	0.14 {1.49}
CA	0.08	−0.16	0.20	{−0.55−0.24}	0.43 {−0.78}
Healthy control (n = 44)					
TG	0.61	0 (ref)	—	—	—
CG	0.20	−0.09	0.16	{−0.39−0.22}	0.58 {−0.55}
TA	0.11	0.64	0.28	{0.09−1.18}	<b>0.021 {2.30}</b>
CA	0.09	−0.07	0.20	{−0.46−0.32}	0.73 {−0.34}
Total subjects (n = 86)					
TG	0.65	0 (ref)	—	—	—
CG	0.18	−0.06	0.11	{−0.28−0.15}	0.57 {−0.57}
TA	0.09	0.53	0.17	{0.19−0.87}	<b>0.002 {3.09}</b>
CA	0.08	−0.11	0.14	{−0.39−0.17}	0.45 {−0.75}

Joint Association Analysis (the reference haplotype is the most frequent haplotype).  
 For the joint haplotype test, several haplotypes were tested against the reference haplotype.  
 Significant P values are shown as bold-faced and underlined type.