

201224061B

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業・精神障害分野

精神障害者に対する包括的禁煙対策の確立

平成 22・23・24 年度 総合研究報告書

研究代表者 岸本年史

平成 25 年(2013 年) 5 月

目 次

I. 総合研究報告書

1. 活性酸素とニコチン依存の実験的研究 5
(分担研究者) 熊本大学大学院生命科学研究部 微生物学分野 赤池 孝章
2. 統合失調症患者の喫煙に関する予後の疫学調査 12
(分担研究者) 成増厚生病院 新貝 憲利
3. 統合失調症患者における長期禁煙についての臨床的研究 14
(研究代表者) 奈良県立医科大学 精神医学講座 岸本 年史
4. 統合失調症モデルマウス QTL 解析による統合失調症様行動異常を修飾
するニコチン感受性遺伝子の同定 19
(分担研究者) 滋賀県立成人病センター研究所 谷垣 健二
5. 精神障害者の禁煙プロトコール及び精神科病院の禁煙化のロードマップ作成 24
(分担研究者) 奈良女子大学 保健管理センター 高橋 裕子
6. 多能性幹細胞誘導 (iPS 細胞) を用いた実験的研究 32
(分担研究者) 奈良県立医科大学 精神医学講座 深見 伸一
7. 喫煙・禁煙が抗精神病薬に与える影響 35
(分担研究者) 弘前大学大学院医学研究科神経精神医学講座 古郡 規雄

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 43

III. 研究成果の別刷 61

I . 総合研究報告書

活性酸素とニコチン依存の実験的研究

研究分担者 赤池孝章 熊本大学大学院生命科学研究部 微生物学分野 教授

研究要旨

喫煙により生体に取り込まれる活性酸素種（ROS）や一酸化窒素（NO）などは、様々な病態に関与することが知られている。我々はこれまで、NO・ROSによる生体分子の酸化・ニトロ化修飾の解析を行い、3-ニトロチロシン（3-NT）や8-ニトロ-cGMPの酸化ストレスバイオマーカーとしての有用性を報告した。近年、統合失調症の病態形成に酸化ストレスが関与していることが指摘され、とくに喫煙が病態に及ぼす影響について関心が高まっている。そこで本研究では、酸化ストレスに関連した喫煙および統合失調症の病態解明と新たな診断・治療法の確立をめざして、新規酸化ストレスバイオマーカーの探索と酸化ストレス応答の分子メカニズムの解析を行った。喫煙に伴う酸化ストレスを評価するために、統合失調症症例と健常喫煙者を対象として、血漿蛋白質中の3-NTレベルを解析した結果、2例の喫煙者において比較的高いレベルの3-NTを検出した。また、近年酸化ストレス応答に関わる因子として注目されている硫化水素関連物質の血中濃度は、健常喫煙者や統合失調症非喫煙者に比べ、統合失調症喫煙者で高い傾向が見られた。ニコチンと酸化ストレスシグナルの関連について、培養神経細胞ではニコチン処理により8-ニトロ-cGMPが生成することが分かった。さらに、8-ニトロ-cGMPのシグナル活性が生体内で生成する硫化水素関連物質により制御されていることを見いだした。以上より、3-NTや硫化水素関連物質は、喫煙や統合失調症における酸化ストレスのバイオマーカーとして有用性が示され、硫化水素関連物質による酸化ストレス応答シグナル制御をさらに詳細に解析することにより、喫煙と統合失調症病態における酸化ストレスの役割の解明が進むものと思われる。

A. 研究目的

タバコの煙には2000種類以上もの様々な化学物質が含まれており、直接的に、あるいは間接的に生体に多彩な影響を及ぼすことが知られている。例えば、ニコチンは、アセチルコリンのアゴニストとして神経系において様々な生理・病理効果を示し、また、タバコの煙に含まれる一酸化窒素（NO）や活性酸素種（ROS）は呼吸器系をはじめ様々な病態に関与することが示唆されている。我々は、種々の病態下で内因性に産生されるNO・ROSや、喫煙に伴う外来性のNO・ROSに

よって、蛋白質、核酸塩基、脂質といった生体分子が化学修飾（酸化ストレス）を受け、3-ニトロチロシン（3-NT）や8-ニトロ-cGMPが生じることを報告してきた。8-ニトロ-cGMPはプロテインキナーゼGの活性化といったcGMP本来の働きのほか、ホスホジエステラーゼ耐性、細胞膜透過性、レドックス活性といった元のcGMPには見られない特有の性質を持ち、さらに蛋白質のシステイン残基にcGMPを付加するユニークな蛋白質翻訳後修飾（S-グアニル化）を介して、酸化ストレス応答の二次シグナル分子として働くことがわかっ

てきた。

近年、統合失調症の病態形成に酸化ストレスが関与していることが報告され、本症に対する喫煙の影響について関心が高まっているが、ニトロ化生体分子の生体内での生成・分解機序やその役割については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、統合失調症と喫煙に伴う酸化ストレスを評価するために 3-NT の血漿中レベルを測定するとともに、神経細胞における 8-ニトロ-cGMP の生成についてニコチンとの関連性に着目して解析を行った。また、近年酸化ストレス応答に関わる因子として注目されている硫化水素関連物質の生体内生成とシグナル制御機構について解析を行った。

B. 研究方法

- 1) 2009 年に奈良県立医科大学病院にて加療を受けた統合失調症症例(喫煙者 4 例, 非喫煙者 3 例)と健常喫煙者 (2 例) を対象とし、血漿蛋白質中の 3-NT レベルを、HPLC-電気化学検出器 (ECD) 法にて解析した。また、SH 反応試薬であるブロモビマンを用いた質量分析による硫化水素関連物質の定量法を確立し、血漿中の硫化水素関連物質レベルを測定した。
- 2) ラット小脳顆粒初代培養細胞 (Cerebellar Granule Cell, 以下 CGC) を、生後 9-10 日齢の Wistar rat より調製し、12 日間培養を行った。水に溶解したニコチン (終濃度 50 μ M, コントロールとして水のみ) を培地に加え、さらに 24 時間培養した。8-ニトロ-cGMP 特異的モノクローナル抗体 (1G6; 10 μ g/ml) を用いた蛍光免疫染色法により、8-ニトロ-cGMP の産生誘導の有無について解析した。
- 3) 酸化ストレス応答シグナル制御における硫化水素関連物質の役割を明らかにするために、試験管内にて 8-ニトロ-cGMP と各種硫化水素関連物

質を反応させ、反応機構の解析を行った。また、硫化水素産生が示唆されているシスタチオン β -シンターゼ (CBS) やシスタチオン γ -リアーゼ (CSE) をノックダウンした各種培養細胞 (A549 ヒト肺がん細胞, C6 ラットグリオーマ細胞など) を 8-ニトロ-cGMP で処理し、内因性硫化水素関連物質が蛋白質 S-グアニル化に与える影響をウエスタンブロットにより解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、奈良県立医科大学倫理委員会の承認を受けた上で実施された。

C. 研究結果

- 1) 血漿蛋白質中の 3-NT レベルは統合失調症喫煙者群では $0.86 \pm 0.49 \mu\text{mol/mol}$ であり、統合失調症非喫煙者群の $0.44 \pm 0.17 \mu\text{mol/mol}$ 、健常喫煙者群の $0.52 \pm 0.57 \mu\text{mol/mol}$ に比べて高い傾向が見られた。また、血中の硫化水素関連物質レベルは、統合失調症喫煙者では、統合失調症非喫煙者に比べ顕著に高く、健常喫煙者に比べても高い傾向が見られた。
- 2) 蛍光免疫染色の結果、ニコチン処理した CGC では、強い 8-ニトロ-cGMP の免疫反応を細胞質に認めた。軸索の反応性は非常に弱かった。一方、ニコチン処理しない細胞では 8-ニトロ-cGMP の免疫反応性を認めなかった。
- 3) 硫化水素関連物質と 8-ニトロ-cGMP の反応を解析した結果、グルタチオンなどのチオール基に硫黄原子が付加した化合物 (ポリスルフィド; R-S-SH) が 8-ニトロ-cGMP を分解して、新規環状ヌクレオチド 8-SH-cGMP を生成することが分かった。また、CBS や CSE をノックダウンした細胞では、硫化水素関連物質レベルが低下するとともに 8-ニトロ-cGMP の分解・代謝が抑制され、蛋白質 S-グアニル化が亢進した。

D. 考案

今回の結果から、血漿蛋白質中の 3-NT レベルや血中硫化水素関連物質レベルは、喫煙と統合失調症における酸化ストレスの指標として有用であることが示唆された。今後症例を集積し詳しく解析することにより、診断などへの応用が期待される。

次に今回、ニコチンの新しい作用として、神経細胞に作用して 8-ニトロ-cGMP 産生を誘導することを見いだした。この応答はニコチン処理後 10 分という短い時間で見られることから、mRNA や蛋白質レベルでの発現誘導ではなく、蛋白質活性自体に影響を与えているものと推測される。

近年、生体内での硫化水素関連物質の産生システムが明らかになり、その生理機能が注目されている。今回、硫化水素関連物質ポリスルフィドが 8-ニトロ-cGMP を分解・代謝し、8-ニトロ-cGMP による S-グアニル化を介したシグナル伝達の制御に関わることを明らかにした。これは硫化水素関連物質の生理機能とシグナル制御機構に関する全く新しい知見と考えられる。

8-ニトロ-cGMP の生成が神経系においてどのような生理活性を発揮するかについては今後の検討課題であるが、例えば、シナプス小胞関連蛋白質の S-グアニル化を介した神経伝達物質の開口放出に対する調節作用や、酸化ストレス応答を司る転写調節因子 Keap1 の S-グアニル化を介した細胞保護因子の誘導作用などを見いだしている。本研究の結果は、喫煙が精神・神経系に及ぼす生理的あるいは病的な作用を理解する上で重要な知見であると考えている。

E. 結論

喫煙統合失調症症例では酸化ストレスが亢進していることが明らかになった。3-NT、8-ニトロ-cGMP、硫化水素関連物質などの生体内動態と生

理機能の解析は、酸化ストレスに関連する喫煙と統合失調症の病態解明と新たな診断法、治療法の開発応用に貢献することが期待される。

F. 健康危険情報：特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shigemoto Fujii and Takaaki Akaike. Redox signaling by 8-nitro-cyclic guanosine monophosphate: nitric oxide- and reactive oxygen species-derived electrophilic messenger. *Antioxid Redox Signal.* in press, 2013.
- 2) Md. Mizanur Rahaman, Tomohiro Sawa, Ahmed Khandaker Ahtesham, Shahzada Khan, Hirofumi Inoue, Atsuh Irie, Shigemoto Fujii, and Takaaki Akaike. S-Guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling. *Antioxid Redox Signal.* in press, 2013.
- 3) Takahiro Joudoi, Yudai Shichiri, Nobuto Kamizono, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Jun Yoshitake, Naotaka Yamada, and Sumio Iwai. Nitrated cyclic GMP modulate guard cell signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* in press, 2013.
- 4) Takaaki Akaike, Motohiro Nishida, and Shigemoto Fujii. Regulation of redox signalling by an electrophilic cyclic nucleotide. *J Biochem.* 153: 131-138, 2013.
- 5) Yuki Kurauchi, Akinori Hisatsune, Yoichiro Isohama, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, and Hiroshi Katsuki. Nitric oxide/soluble guanylyl cyclase signaling mediates depolarization-induced protection of rat mesencephalic dopaminergic neurons from MPP(+) cytotoxicity. *Neuroscience.* 231:206-215, 2013.
- 6) Kaori Watanabe, Yu Ishima, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, Masaki Otagiri, and Toru Maruyana. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J.* 27:391-398, 2013.
- 7) Kohta Oyama, Shahzada Khan, Tatsuya Okamoto, Shigemoto Fujii, Katsuhiko Ono, Tetsuro Matsunaga, Jun Yoshitake, Tomohiro Sawa, Junko Tomida, Yoshiaki Kawamura, and Takaaki Akaike. Identification of and screening for human *Helicobacter cinaedi* infections and carriers via

- nested PCR *J Clin Microbiol.* 50: 3893-3900, 2012.
- 8) Yohei Saito, Tomohiro Sawa, Jun Yoshitake, Chisato Ito, Shigemoto Fujii, Takaaki Akaike, and Hirokazu Arimoto. Nitric oxide promotes recycling of 8-nitro-cGMP, a cytoprotective mediator, into intact cGMP in cells. *Mol Biosyst.* 8: 2909-2915, 2012.
 - 9) Motohiro Nishida, Tomohiro Sawa, Naoyuki Kitajima, Katsuhiko Ono, Hirofumi Inoue, Hideshi Ihara, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto, Makoto Suematsu, Hitoshi Kurose, Albert van der Vliet, Bruce A Freeman, Takahiro Shibata, Koji Uchida, Yoshito Kumagai, and Takaaki Akaike. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol.* 8: 714-724, 2012.
 - 10) Shang Guoguo, Takaaki Akaike, Jiang Tao, Chen Qi, Zhang Nong, and Li Hui. HGF-mediated inhibition of oxidative stress by 8-nitro-cGMP in high glucose-treated rat mesangial cells. *Free Radic Res.* 46: 1238-1248, 2012.
 - 11) Yoshifumi Sato, Mitsutoki Hatta, Md. Fazlul Karim, Tomohiro Sawa, Fan-Yan Wei, Shoki Sato, Mark A. Magnuson, Frank J. Gonzalez, Kazuhito Tomizawa, Takaaki Akaike, Tatsuya Yoshizawa, and Kazuya Yamagata. Anks4b, a novel target of HNF4 α interacts with GRP78 and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *J Biol Chem.* 287: 23236-23245, 2012.
 - 12) Takatsugu Goto, Yoshitoshi Ogura, Hideki Hirakawa, Junko Tomida, Yuji Morita, Takaaki Akaike, Tetsuya Hayashi, and Yoshiaki Kawamura. Complete genome sequence of *Helicobacter cinaedi* strain PAGU611, isolated in a case of human bacteremia. *J Bacteriol.* 194: 3744-3745, 2012.
 - 13) Yu Ishima, Hitomi Hoshino, Takuya Shinagawa, Kaori Watanabe, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Ulrich Kragh-hansen, Toshiya Kai, Hiroshi Watanabe, Toru Maruyama, and Masaki Otagiri. S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J Pharm Sci.* 101: 3222-3229, 2012.
 - 14) 藤井重元, 赤池孝章. 硫化水素と炎症. 感染・炎症・免疫 42: 235-237, 2012.
 - 15) 赤池孝章. 概論: 活性酸素によるレドックス制御の新たなパラダイム転換に迫る. 実験医学増刊: 活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患 (山本雅之監修, 赤池孝章, 一條秀憲, 森 泰生編集) 30: 2690-2696, 2012.
 - 16) 澤 智裕, 赤池孝章. ROS・親電子リガンドとガス状分子のシグナルネットワーク. 実験医学増刊: 活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患 (山本雅之監修, 赤池孝章, 一條秀憲, 森 泰生編集) 30: 2740-2745, 2012.
 - 17) 藤井重元, 赤池孝章. NOシグナリング NO signaling. イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典 (山本 雅, 仙波憲太郎, 山梨裕司 編). 羊土社, p.67-69, 2012.
 - 18) Shahzada Khan, Tatsuya Okamoto, Koji Enomoto, Naomi Sakashita, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Motohiro Takeya, Hisao Ogawa, Hiroshige Yamabe, and Takaaki Akaike. Potential association of *Helicobacter cinaedi* with atrial arrhythmia and atherosclerosis. *Microbiol Immunol.* 56:145-154, 2012.
 - 19) Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Shingo Kasamatsu, Jun Yoshitake, Rahaman Md Mizanur, Tatsuya Okamoto, Shigemoto Fujii and Takaaki Akaike. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. *Biochem J.* 441: 719-30, 2012.
 - 20) Yu Ishima, Fumika Yoshida, Ulrich Kragh-Hansen, Kaori Watanabe, Naohisa Katayama, Keisuke Nakajou, Takaaki Akaike, Toshiya Kai, Toru Maruyama, and Masaki Otagiri. Cellular uptake mechanisms and responses to NO transferred from mono- and poly-S-nitrosated human serum albumin. *Free Radic Res.* 45: 1196-1206, 2011.
 - 21) Eiko Yoshida, Takashi Toyama, Yasuhiro Shinkai, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, and Yoshito Kumagai. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in mammalian cells. *Chem Res Toxicol.* 24: 1633-5, 2011.
 - 22) Yoshiko Tokutomi, Keiichiro Kataoka, Eiichiro Yamamoto, Taishi Nakamura, Ma-saya Fukuda, Hisato Nako, Kensuke Toyama, Yi-Fei Dong, Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, and Shokei Kim-Mitsuyama. Vascular responses to 8-nitro-cyclic GMP in non-diabetic and diabetic mice. *Br J Pharmacol.* 162: 1884-93, 2011.
 - 23) Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, and Takaaki Akaike. Antioxidant effect of a nitrated cyclic nucleotide functioning as an endogenous electrophile. *Curr Top Med Chem.* 11: 1854-60, 2011.

- 24) Yuki Kurauchi, Akinori Hisatsune, Yoichiro Isohama, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, Koichi Shudo, and Hiroshi Katsuki. Mid-brain dopaminergic neurons utilize nitric oxide/cyclic GMP signaling to recruit ERK that links retinoic acid receptor stimulation to up-regulation of BDNF. *J Neurochem*. 116: 323-333, 2011.
- 25) Hideshi Ihara, Tomohiro Sawa, Yusaku Nakabeppu, and Takaaki Akaike. Nucleotides function as endogenous chemical sensors for oxidative stress signaling. *J Clin Biochem Nutr*. 48: 1-7, 2011.
- 26) Hideshi Ihara, Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomoaki Ida, Shingo Kasamatsu, Kouhei Kunieda, Tatsuya Okamoto, Tomohiro Sawa, and Takaaki Akaike. Methodological proof of immunochemistry for specific identification of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in glia cells. *Nitric Oxide*. 25: 169-175, 2011.
- 27) Takaaki Akaike, Albert van der Vliet, and Philip Eaton. Frontiers in nitric oxide and redox signaling. *Nitric Oxide*. 25: 57-58, 2011.
- 28) Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa, and Takaaki Akaike. Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides. *Amino Acids*. 41: 123-130, 2011.
- 29) 澤智裕, 小野勝彦, 赤池孝章. 活性酸素・一酸化窒素によるニトロ化シグナルと抗炎症作用. *感染・炎症・免疫*. 41: 12-19, 2011.
- 30) 岡本竜哉, 居原秀, 赤池孝章. 喫煙と酸化ストレス: Oxidative stress induced by cigarette smoking. *最新精神医学*. 特集号「精神障害者と喫煙」16: 431-439, 2011.
- 31) 今吉理恵子, 岡本竜哉, 永尾潤一, 長環, 松永勝政, 赤池孝章, 上西秀則. 植物精油 citral のインフルエンザウイルス感染能抑制効果について: Experimental study of a citral on the preventive effect of influenza virus infection. *医学と生物学*. 155: 489-494, 2011.
- 32) Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Kit I. Tong, Tomoaki Ida, Tatsuya Okamoto, Ahmed Khandaker Ahtesham, Yu Ishima, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto, and Takaaki Akaike. The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. *J Biol Chem*. 285: 23970-23984, 2010.
- 33) Takaaki Akaike, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, and Hideshi Ihara. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. *Nitric Oxide*. 23: 166-174, 2010.
- 34) Tatsuya Okamoto, Shahzada Khan, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, and Takaaki Akaike. A new paradigm for antimicrobial host defense mediated by a nitrated cyclic nucleotide. *J Clin Biochem Nutr*. 46: 14-19, 2010.
- 35) Tomohiro Sawa, Hiorokazu Arimoto, and Takaaki Akaike. Regulation of redox signaling involving chemical conjugation of protein thiols by nitric oxide and electrophiles. *Bioconjug Chem*. 21: 1121-1129, 2010.
- 36) Yu Ishima, Shuichi Hiroyama, Ulrich Kragh-Hansen, Toru Maruyama, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, Toshiya Kai, and Masaki Otagiri. One-step preparation of S-nitrosated human serum albumin with high biological activities. *Nitric Oxide*. 23: 121-127, 2010.
- 37) 藤井重元, 澤智裕, 赤池孝章. 8-Nitro-cGMP の発見と生理機能の解明. *化学と生物*. 48: 22-27, 2010.
- 38) 澤智裕, 赤池孝章. 毒性説から脱した活性酸素研究-シグナル分子としての活躍-. *現代化学*. 469: 34-38, 2010.
- 39) 岡本竜哉, 赤池孝章. 呼吸器疾患における酸化ストレスと制御シグナルの分子基盤: Molecular mechanisms of nitric oxide- and reactive oxygen species-mediated signalings in the respiratory diseases. *呼吸*. 29: 859-866, 2010.
- 40) 岡本竜哉, 澤智裕, 赤池孝章. Nitric oxide (NO) および NO 関連物質. *日本臨床増刊号 広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査*-4. 982: 839-842, 2010.

2. 学会発表

- 1) Takaaki Akaike, Motohiro Nishida, and Tomohiro Sawa. Nitrated cyclic nucleotide mediates endogenous electrophilic signaling for Ras-dependent senescence and autophagy. The 33rd Naito Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases. (Sapporo, JAPAN), June 26-29, 2012.
- 2) 赤池孝章. 硫化水素によるレドックスシグナル制御: 新しいセカンドメッセンジャー 8-SH-cGMP の発見. 第12回日本 NO 学会学術集会. 神戸市, 6月, 2012.
- 3) Takaaki Akaike, Hideshi Ihara, and Tomohiro Sawa. 8-SH-cGMP endogenously formed from 8-nitro-cGMP as a second messenger of hydrogen sulfide. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application

- of Nitric Oxide. (Edinburgh, UK), July 22-26, 2012.
- 4) Takaaki Akaike. Hydrogen sulfide regulation for electrophile-mediated ROS signaling. Second International Conference on H₂S Biology and Medicine. (Atlanta, USA), September 20-22, 2012.
 - 5) 赤池孝章. 感染防御における活性酸素シグナル制御と破綻. 第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会. 徳島市, 10 月, 2012.
 - 6) 赤池孝章. レドックスシグナル制御と酸化ストレスバイオマーカー. 第 20 回日本精神科救急学会学術総会. 奈良市, 10 月, 2012.
 - 7) Takaaki Akaike. Persulfide regulation of redox signaling involving unique polysulfur biology. 第 85 回日本生化学会大会. 福岡市, 12 月, 2012.
 - 8) Takaaki Akaike. Electrophilic cellular signaling regulated by H₂O₂-mediated sulfhydration. 第 11 回日本 NO 学会学術集会. 東京都町田市, 5 月, 2011.
 - 9) 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 河内正治, 布井博幸, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh Nguyen, 中島典子, 鈴木和男, 赤池孝章. 小児致死性 ARDS 症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの解析 -Detection of protein-bound 3-nitrotyrosin in plasma from pediatric patient with fulminant ARDS and avian influenza virus infection-. 第 11 回日本 NO 学会学術集会. 東京都町田市, 5 月, 2011.
 - 10) 赤池孝章. 活性酸素シグナル伝達と加齢. 第 11 回日本抗加齢医学会総会. 京都市, 5 月, 2011.
 - 11) Takaaki Akaike. Cellular signaling mediated by nitrated cyclic nucleotide and regulated by hydrogen sulfide. 5th International Conference on cGMP. (Halle, Germany), June 24-26, 2011.
 - 12) 赤池孝章. 内因性硫化水素イオンによる親電子シグナル制御. 第 64 回日本酸化ストレス学会学術集会. 留寿都, 7 月, 2011.
 - 13) 赤池孝章. 親電子シグナルと硫化水素. 九州大学生体防御医学研究所共同利用研究集会「活性酸素によるシグナル伝達制御の新展開」. 福岡市, 7 月, 2011.
 - 14) 岡本竜哉, 松永哲郎, Shahzada Khan, 井上博文, 小山耕太, 藤井重元, 澤智裕, 赤池孝章. オートファジーを介した細胞内殺菌と 8-ニトロ-cGMP による制御: 感染症治療への応用をめざして. 第 4 回感染症研究フロンティア. 吹田市, 8 月, 2011.
 - 15) 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 河内正治, 布井博幸, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh Nguyen, 中島典子, 鈴木和男, 赤池孝章. 小児致死性 ARDS 症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの解析. 第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会. 門司市, 8 月, 2011.
 - 16) 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 河内正治, 布井博幸, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh Nguyen, 中島典子, 鈴木和男, 赤池孝章. 小児致死性 ARDS 症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの解析: Detection of protein-bound 3-nitrotyrosin in plasma from pediatric patient with fulminant ARDS and avian influenza virus infection. 第 84 回日本生化学会大会. 京都市, 9 月, 2011.
 - 17) 岡本竜哉, 松永哲郎, Shahzada Khan, 小野勝彦, 小山耕太, 吉武 淳, 井上博文, 藤井重元, 澤智裕, 赤池孝章. サルモネラ感染におけるオートファジーを介した細胞内殺菌と内因性硫化水素イオンによる抑制. 第 17 回 MPO 研究会. 熊本市, 10 月, 2011.
 - 18) 岡本竜哉, 赤池孝章. 硫化水素によるオートファジー制御と感染防御シグナル: Hydrogen sulfide regulation of autophagy-mediated host defense signaling. 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎市, 3 月, 2012.
 - 19) Takaaki Akaike. Protein S-guanlylation: a new post-translational regulation for re-dox signaling. The 20th World Congress of the International Society for Heart Research. (Kyoto, Japan), May, 2010.
 - 20) Tatsuya Okamoto, Tomohiro Sawa, Shi-gemoto Fujii, Mie Tateyama, Shoji Ka-wachi, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh Nguyen, Kazuo Suzuki, Takaaki Akaike. Detection of protein-bound 3-nitrotyrosine in plasma from pediatric patients with fulminant ARDS and avian influenza infection. 6th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of NO 2010. (Kyoto, Japan), June, 2010.
 - 21) 岡本竜哉, 藤井重元, 澤智裕, 赤池孝章. インフルエンザウイルス肺炎・ARDS における血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの定量的解析. 第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会. 宮崎市, 9 月, 2010.
 - 22) 澤智裕, 赤池孝章. 核酸分子の化学修飾による活性酸素シグナルのケミカルセンシング. 第 83 回日本生化学会大会. 神戸市, 12 月, 2010.
 - 23) Takaaki Akaike. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. International

Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine. (Kyoto, Japan), January, 2011.

- 24) Takaaki Akaike. Cellular signaling by nitrated cyclic nucleotides and regulation of its biological effects. Gordon Research Conference on Nitric Oxide: Understanding the Biology and Chemistry of Its Formation, Action, and Signaling. (Ventura, USA), February, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

統合失調症患者の喫煙に関する予後の疫学調査

分担研究者 新貝憲利 成増厚生病院院長

研究要旨

【目的】統合失調症患者の予後に対して、喫煙が与える影響について評価を行う。

【方法】入院中の統合失調症患者を対象とし、その退院時をベースライン、エンドポイントを再入院、あるいは退院後 600 日までと設定し、喫煙群と非喫煙群にわけて再入院率を検討する。

【結果・結論】奈良県立医科大学附属病院精神科、成増厚生病院、秋津鴻池病院、万葉クリニックから計 153 名の統合失調症の退院患者の経過をおった。統合失調症患者の喫煙群では非喫煙群に比べて、再入院率が高い傾向が認められた。

A. 研究目的

喫煙の健康被害は周知のところであり、2003年には健康増進法が公布された。一般の喫煙率は25-33%であるのに対し統合失調症患者の喫煙率は70-90%と高く、禁煙の成功率も低い。また、精神科病院の非喫煙患者は受動喫煙の被害に常時曝されており、被る健康被害は深刻である。喫煙患者にはタバコによる健康被害だけでなく、喫煙行動に潜在する火災等の危険性から住居確保に困難があるなどの生活権被害も生じている。精神科においては、喫煙は比較的好ましい嗜好品として職員にも患者にも愛されてきた歴史があり、「喫煙をよし」とする独特の文化がある。このような状況で、精神障害者の禁煙対策が健常人と同様に行われる必要があるが、現実には簡単ではない。喫煙により感覚情報処理機能の改善や、抗精神病薬による副作用の軽減、認知機能の改善を認めることが報告されており、保護的な役割がある一方で、健康被害や予後の面から悪影響を及ぼす可能性が示唆されており、精神科における禁煙対策は重要な課題である。

我々が以前行った後方視的な調査では、統合失調症において喫煙群が非喫煙群に比べて再入院率

が高いというものであった。一時的には上記のように自己治療的な効果は認められているが、喫煙により予後が悪化する可能性が考えられる。このことについてプロスペクティブに再度調査することは、統合失調症患者に禁煙を勧める上での重要な根拠になり得ると考える。

B. 研究方法

入院中の統合失調症患者が退院した時点をベースラインとして、その退院患者を対象とし、エンドポイントを再入院時あるいは、平成 25 年 1 月 16 日の

ベースラインでは、患者背景として、1 日の喫煙本数、喫煙期間、ファガストロームニコチン依存テスト (FTND) を測定した。

最終的には、喫煙群と非喫煙群とに分け、症状の経過を比較し、統合失調症患者における喫煙による予後への影響について評価する。

C. 結果

平成 22 年 4 月 1 日から平成 23 年 3 月 31 日までの奈良県立医科大学附属病院精神科を退院した統合失調症患者 62 名と平成 23 年 1 月 1 日から平成 23 年 5 月 31 日までに成増厚生病院、秋津鴻池病院、万葉クリニックを退院した統合失調症患者、

それぞれ 14 名, 26 名, 51 名について喫煙, 非喫煙による予後の影響について評価した.

対象患者の統計学的特徴は表に示した. 喫煙群, 非喫煙群で年齢, 性別, 再入院数, 入院回数で有意差を認めた.

また, 経過観察中に再入院していない割合を Kaplan-Meier の生存曲線を用いて図に示した. ログランク検定では $p=0.010$ で喫煙者の方が再入院率が高い傾向が認められた.

(表) 対象者の統計学的特徴

	喫煙者	非喫煙者
N(%)	62(40.5)	91(59.5)
年齢*	45.1±13.1	43.7±16.5
性別(女性. %)*	22(35.5)	51(56.0)
平均入院回数(回)*	4.3±3.4	3.2±2.6
平均退院時GAF	64.1±9.1	67.5±8.9
再入院者数*	34(54.8)	30(33.0)

(* $p<0.05$)

D. 考察

非喫煙者に比べ, 喫煙者で再入院率が高い傾向が示された. このことは喫煙者の方が予後が悪いことを示唆している可能性も有り, 統合失調症患者に禁煙を勧める一つの根拠となり得ることが考えられる. さらに調査施設からのデータを基に解析をすすめていくことを考えている.

E. 結論

統合失調症患者の喫煙群では非喫煙群に比べて, 再入院率が高い傾向が認められた.

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

特記事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

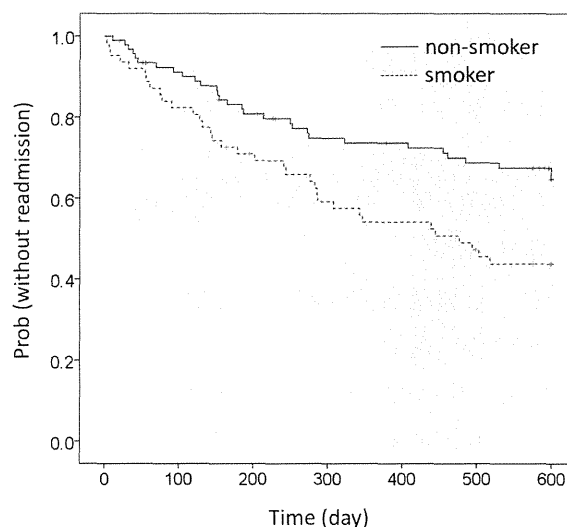
該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし



(図) 再入院率の比較

統合失調症患者における長期禁煙についての臨床的研究

研究代表者 岸本年史 奈良県立医科大学精神医学講座 教授

研究要旨

【目的】禁煙治療を行い、長期禁煙が統合失調症に与える影響について調査する。

【方法】「禁煙治療のための標準手順書（第4版）」に基づきバレニクリンを用いて12週間の禁煙治療を行う。この間の精神症状、感覚情報処理機能について評価する。

【結果】11名に禁煙治療を導入した。禁煙治療終了時点で禁煙を継続できていたのは4名で、そのうち禁煙治療終了後4週間で禁煙を継続できていたのは1名であった。後の7名は途中で中断、もしくは治療終了時点において喫煙を継続していた。感覚情報処理機能については統計学的な有意差は認めなかったものの、禁煙治療開始後、禁煙によって感覚情報処理機能は悪化するものの、12週間の禁煙治療終了時には改善し、禁煙治療終了後においても禁煙の継続でそれが維持される可能性が示された。

研究協力者 橋本和典 奈良県立医科大学精神医学講座 助教

A. 研究目的

喫煙の健康被害は周知のところであり、2003年には健康増進法が公布された。一般の喫煙率は25-33%であるのに対し統合失調症患者の喫煙率は70-90%と高く、禁煙の成功率も低い。また、精神科病院の非喫煙患者は受動喫煙の被害に常時曝されており、被る健康被害は深刻である。喫煙患者にはタバコによる健康被害だけでなく、喫煙行動に潜在する火災等の危険性から住居確保に困難があるなどの生活権被害も生じている。精神科においては、喫煙は比較的好ましい嗜好品として職員にも患者にも愛されてきた歴史があり、「喫煙をよし」とする独特の文化がある。このような状況で、精神障害者の禁煙対策が健常人と同様に行われる必要があるが、現実には簡単ではない。喫煙により感覚情報処理機能の改善や、抗精神病薬による副作用の軽減、認知機能の改善を認めることが報告されており、保護的な役割がある一方で、健康被害や予後の面から悪影響を及ぼす可能性が示唆されており、精神科における禁煙対策は重要な課題である。

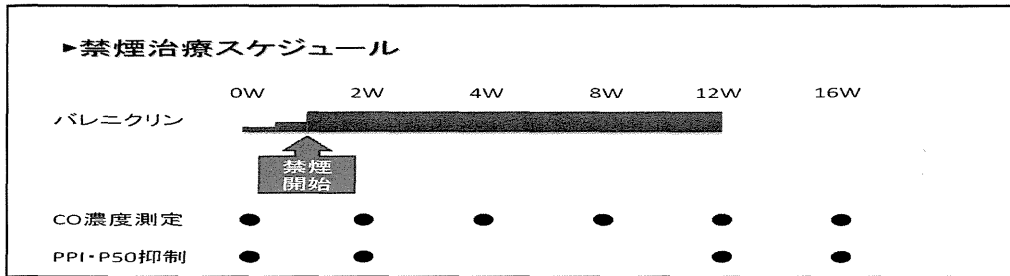
これまでに、統合失調症患者を対象に、短期間の禁煙後の再喫煙による影響について感覚情報処理機能を指標に評価した。今回は長期間の禁煙が精神症状、感覚情報処理機能などにどのような影響を与えるかを検討する。

B. 研究方法

対象は喫煙をしている統合失調症患者で、禁煙希望のある11名である。

禁煙治療のための標準手順書（第4版）に基づきバレニクリン（チャンピックス®）を用いて12週間の禁煙治療を行い、その間の変化について評価を行った。評価項目としては、精神症状の評価はPositive and Negative Syndrome Scale (PANSS)を用いた。感覚情報処理機能の評価についてはプレパルスインヒビション (PPI) 及び事象関連電位の一つであるP50抑制を用いた。また、喫煙状況及び、禁煙中の評価についてはファガストロームニコチン依存テスト (FTND)、呼気中CO濃度、ミネソタ式ニコチン禁断症状調査票 Minnesota Nicotine Withdrawal Scale (MNWS)、喫煙衝動に関する調査票 Brief Questionnaire of

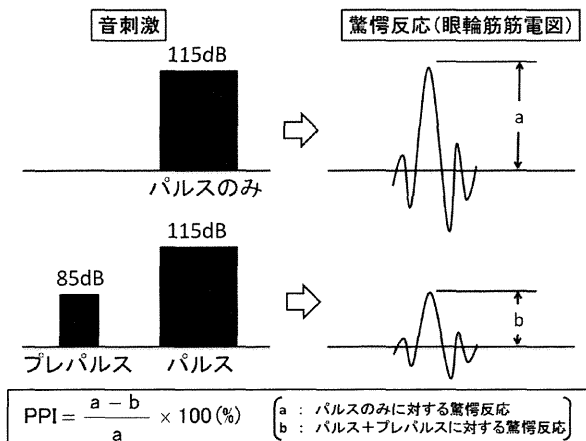
Smoking Urges (BQSU) によって評価した。



1. プレパルスインヒビション (PPI)

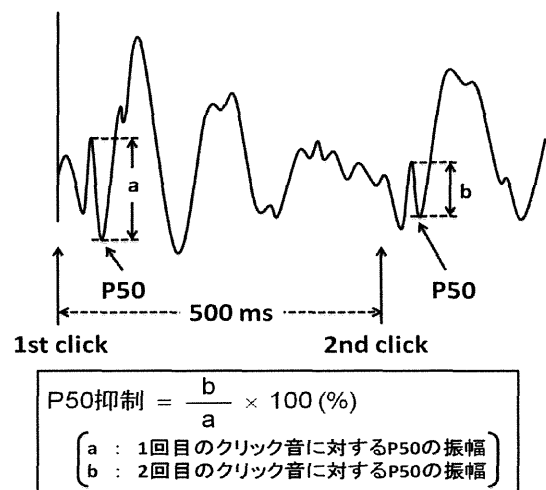
PPI では音性驚愕刺激に対して相対的に弱い刺激を先行させた場合の瞬目反応の変化をみる。音刺激は最初の 2 分間は順応のために 70dB の広域ホワイトノイズを聴かせ、引き続きテスト終了まで背景音として使用した。その後の音刺激は 3 ブロックに分けた。第 1 ブロックではプレパルスを与えないパルス (115dB の広域ホワイトノイズで持続時間 40ms) のみを 3 回あたえた。第 2 ブロックではパルスのみを試行と、パルスに先行して 85dB で持続時間 20ms のプレパルスを与える試行を行った。プレパルスとパルスの刺激間の間隔

(interstimulus interval ; ISI) は 30, 60, 120ms でランダムに出現させ、それぞれの試行を 6 回ずつ合計 24 回の行った。第 3 ブロックでは第 1 ブロックと同様にパルスのみを 3 回与えた。PPI は眼輪筋の筋電図の振幅を用い $PPI(\%) = \{(\text{パルスのみに対する驚愕反応}) - (\text{プレパルス+パルスに対する驚愕反応})\} / (\text{パルスに対する驚愕反応}) \times 100$ で求めた。



2. P50 抑制

P50 抑制は、2 つの聴覚刺激 (試験刺激) をある間隔をおいて与えると 1 つめの聴覚刺激 (条件刺激) に比べて P50 の振幅が著しく減弱するというものである。2 つの刺激音には 90dB で持続時間 10 ms のクリック音を用い、刺激間の間隔は 500 ms と設定した。刺激音はヘッドホンより呈示し、10 秒間隔で 60 回程度与えた。記録電極は国際 10-20 法の Fz, Cz, Pz の 3 部位に置き、基準電極は両耳朶の平均電位とした。また、アースは前額部とした。P50 の同定については Nagamoto らの方法を用いて、1 回目の刺激に対する P50 は刺激後 40 ms から 90 ms の間で最大の陽性ピークとし、2 回目の刺激にたいする P50 は 1 回目の刺激により誘発された P50 の潜時の ± 10 ms の範囲にある最大陽性ピークとした。P50 の振幅についてはそれぞれ直前の陰性波のピークとの差と定めた。P50 抑制については $(P50 \text{ 抑制}(\%)) = \{ (2 \text{ 回目の刺激に対する } P50) / (1 \text{ 回目の刺激に対する } P50) \} \times 100$ で求めた。



<倫理面での配慮>

本研究は奈良県立医科大学倫理委員会で承認を受けた上で実施された。

C. 研究結果

対象者 11 名中 5 名は治療期間終了までに本人の希望により中止となっている。4 名は禁煙治療終了時点で禁煙を継続できていたものの、そのうち 3 名は治療終了後 4 週の時点で喫煙を再開していた。禁煙治療は終了したものの禁煙に至らなかった対象者は 2 名であった。ベースラインでの 11 人の統計学的背景を表 1 にまとめた。

バレニクリンの服用状況と喫煙状況別に PPI、P50 抑制の結果を表 2 に示す。varenicline - /smoking - は禁煙治療終了 4 週間後においても禁煙を継続していたという状態を表しているが、その対象は 1 名であった。このため、各バレニクリン、喫煙の状況の違いによる統計学的検討は行うことができなかった。

図 2 では治療開始からの週数別に喫煙状況の違いによる PPI のベースラインからの変化量をグラフにした。統計学的に有意な変化は認められなかったが、禁煙治療開始 2 週間後（禁煙開始 1 週間後）に禁煙できていた場合は PPI は悪化する傾向があり、さらに禁煙治療開始 12 週間後（禁煙治療終了時）に禁煙している群では禁煙治療開始 2 週間後に比べて改善している傾向がみられた。また、禁煙治療開始 2 週間後（禁煙開始 1 週間後）に喫煙を続けていた場合は PPI に悪化はみられなかったが、禁煙治療開始 12 週間後（禁煙治療終了時）では PPI の悪化が見られた。また、禁煙終了 4 週間後（治療開始 16 週間後）では喫煙を行っていた場合、ベースラインより PPI の悪化していた。

対象者 11 人中、禁煙治療終了後 4 週間の時点で禁煙を続けていたのは 1 名であった。その 1 名の結果を表 3 に示した。禁煙開始後では感覚情報処理機能は悪化するものの、禁煙治療開始 12 週間後（禁煙治療終了時）ではベースラインの水準もしくはそれ以上の改善を示し、禁煙治療終了後もそ

れを維持することができていた。

バレニクリンの服用状況と喫煙状況別に BQSU、MNWS の結果を図 2、3 に示す。BQNS では各状態により有意差を認め ($F = 5.1, p < 0.05$)、喫煙している状態より禁煙しているときの方が喫煙衝動は低いことがわかった。また、NMWS では各状態で有意差は認めなかった ($F = 1.0, p = 0.40$)。

D. 考察

11 名中禁煙治療の終了時点で禁煙を行っていたのは 4 名で、そのうち禁煙治療終了後 4 週間の時点で禁煙を継続できていたのは 1 名であった。対象症例数は少ないものの、統合失調症患者の禁煙は困難であることがわかる。

調査期間中の感覚情報処理機能の変化については、本来であれば、同じような禁煙治療経過を示した対象者について統計学的な検討をすべきであったが、個々により禁煙治療経過は様々であり、さらに症例数も少なかったため、行うことができなかった。そこで、今回はバレニクリンの投与の有無と喫煙状況別、あるいは、喫煙治療開始後の週数と喫煙状況別についての検討を行った。バレニクリンの投与の有無と喫煙状況別に感覚情報処理機能を検討したが、統計学的に有意な傾向は認めなかった。さらにバレニクリンの投与の有無だけでは、禁煙治療開始直後なのか、終了が近い時点なのか不明であるため、治療開始からの週数と喫煙の有無について PPI を用いて検討した。禁煙開始直後では PPI は悪化するものの、治療開始 12 週間後ではそれが改善している傾向があった。唯一禁煙治療終了 4 週間後においても禁煙を継続できていた症例の経過を見ても、一旦禁煙によって悪化した感覚情報処理機能は禁煙治療終了時には元のレベル改善し、さらにその 4 週間後においても、その状態を維持できており、長期禁煙によって、感覚情報処理機能は改善していく可能性が示唆された。

このことについては、統合失調症患者に禁煙を

推進する大きな根拠となり得ることが期待される。

E. 結論

11名の統合失調症患者を対象に禁煙治療を行ったが、禁煙治療終了時点で禁煙できていたのはそのうち4名で終了後4週間でも禁煙を継続できていたのは1名であった。今回の研究から、長期禁煙によって感覚情報処理機能が改善していく可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

【学会発表】

橋本和典. 統合失調症と喫煙. 第20回日本精神科救急学会. 2012.10 奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況なし

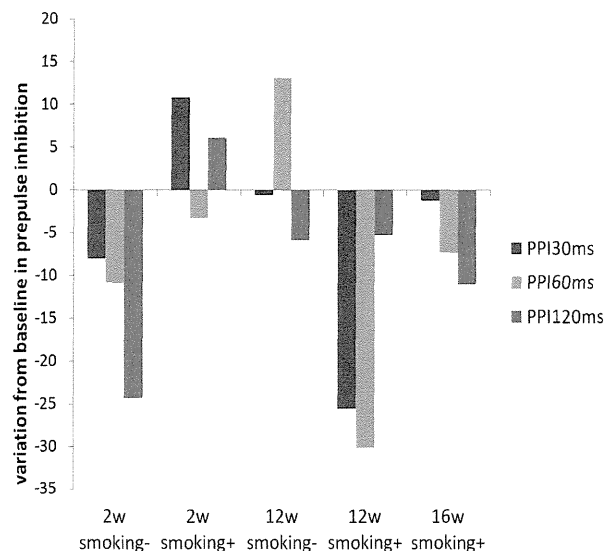
(表1) 統計学的背景

性別(男性)	7
年齢	42.9 ± 10.0
FTND	6.1 ± 1.6
呼気中CO濃度(ppm)	25.0 ± 9.5
罹病期間(年)	18.18 ± 7.7
PANSS	68 ± 9.3
BQNS	41.7 ± 16.8

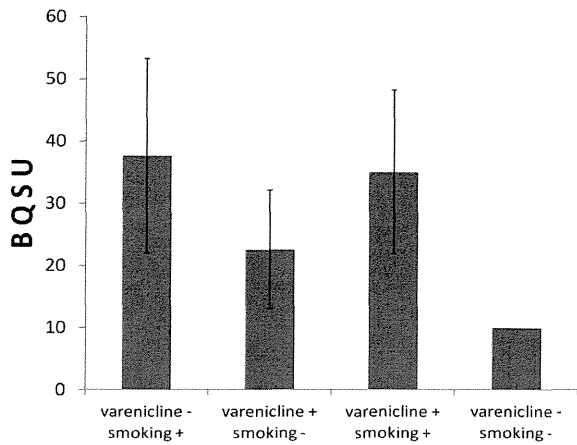
(表2) バレニクリン服用、喫煙状況別、感覚情報処理機能

	valenicrine - smoking +	valenicrine + smoking -	valenicrine + smoking +	valenicrine - smoking -
n	15	9	7	1
PPI 30ms	16.7 ± 18.9	12.1 ± 22.1	19.7 ± 21.7	21.9
PPI 60ms	38.1 ± 28.8	37.4 ± 27.3	33.7 ± 28.4	63.7
PPI 120ms	36.6 ± 31.2	31.4 ± 27.4	43.7 ± 31.6	65.6
Habituation	73.9 ± 27.0	67.1 ± 35.7	75.3 ± 69.4	65.7
P50 suppression	107.0 ± 81.0	68.4 ± 44.8	93.2 ± 64.8	6.8

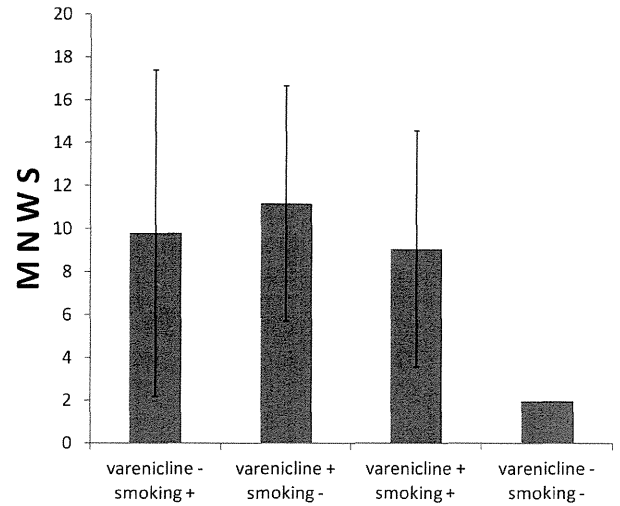
Data shows mean ± SD



(図1) 週数、喫煙状況別、PPIのベースラインから絵の変化量



(図2) バレニクリン服用, 喫煙状況別の BQSU



(図3) バレニクリン服用, 喫煙状況別の MNWS

(表3) 禁煙終了4週間後で禁煙を継続していた

1例の経過

	0w	2w	12w	16w
PPI 30ms (%)	38.1	17.8	38.6	21.9
PPI 60ms (%)	51.6	27	63.1	63.7
PPI 120ms (%)	59.1	9.2	59.5	65.6
P50 suppression (%)	45.2	149.7	5.9	6.9
呼気中CO濃度(ppm)	11	4	4	4

統合失調症モデルマウス QTL 解析による統合失調症行動異常を 修飾するニコチン感受性遺伝子の同定

分担研究者 谷垣 健二 滋賀県立成人病センター研究所

研究要旨：統合失調症者での喫煙率の高さから統合失調症とニコチンの関係が示唆されている。我々は統合失調症と関係すると考えられている，NMDA 受容体拮抗薬 MK801 投与時の pre-pulse inhibition，行動量亢進の異常といった行動異常を指標に，ニコチンの急性投与，慢性投与によるこれらの行動異常の修飾に関与する遺伝子座を，マウスを用いて遺伝学的に解析を行い以下の知見を得た。

- 1) ヒトで高頻度に統合失調症を発症する 22q11 欠損症候群のモデルマウスを用い，遺伝学的解析を行った結果，MK801 による統合失調症様行動異常を用いた場合と異なる遺伝的背景がニコチンの相互作用に影響を及ぼすことが示唆された。
- 2) QTL 解析によって見出されたニコチンの相互作用影響を及ぼす遺伝子座 D18Mit186.1 と DXMit19.1 の近傍に C57Bl6 と 129Sv で異なる SNP がそれぞれ 5901 個と 816 個存在することを *in silico* の解析にて見出した。
- 3) この見出された数多くの SNP の中から，統合失調症様行動異常に与える SNP の影響を効率よくスクリーニングするため，我々は，レンチウイルスを用いて生体内神経細胞遺伝子導入法を利用し，統合失調症様行動異常を指標とした遺伝子機能解析が成体で可能であることを示した。

A. 研究目的

統合失調者は喫煙率が高く，禁煙することが難しいことが報告されていることから，統合失調症とニコチンの関与が着目されている。ニコチンにて認知機能が向上することから，統合失調症者のニコチン過剰摂取は，一種の self medication ではないかという仮説が提唱されている。統合失調症に対するニコチンが及ぼす影響を明らかにし，その作用に関与する遺伝子群を同定できれば，統合失調症者においても，禁煙を可能とする新たな治療法の開発に結びつくのみならず，ドーパミン，グルタミン酸のシグナル伝達以外をターゲットとした抜本的に異なる治療法の開発につながるものと期待される。我々は，NMDA 受容体拮抗薬である MK801 を

用いた統合失調症モデルマウスを用いて，統合失調症様行動異常とニコチンの相互作用に影響を及ぼす遺伝子群を同定するために，C57Bl6 と 129Sv の遺伝的背景の違いの違いを利用し，quantitative trait loci (QTL) 解析を行い，染色体 18 番 D18Mit186.1 と X 染色体 DXMit19.1 の近傍に MK801 とニコチンの相互作用影響を及ぼす遺伝子座を見出してきた。我々は，ヒトで統合失調症を多発する 22q11 欠損症候群のモデルマウスを用い，その統合失調症様行動異常とニコチンの相互作用が同様の遺伝的背景の違いによる影響を受けるか検討を行い，その遺伝子座が持つ影響の普遍性の検討を行った。また，この遺伝子座の候補遺伝子を同定するため，C57Bl6 と 129Sv のゲノム情報のデータバン

クの情報を用い、*in silico* にてDXMit19.1とD18Mit186.1の近傍に認められるC57Bl6と129Svで異なるSNPの検索を試みた。

B. 研究方法

[動物・行動試験]

マウスはC57Bl6, 129Svのオスのみを用いた。行動試験は12-18週齢で行った。prepulse inhibition (PPI) の測定, Nicotine 1mg/Kg, MK801 0.1mg/Kg i.p.後のPPI測定, Nicotine 1mg/Kg, MK801 0.32mg/Kg i.p.後のopen field の測定を1週間ごとに行った後に, osmotic pump (Alzet) を用いて Nicotine 2.4mg/Kg/dayを21日間投与した後, Nicotine 投与を継続しつつMK801 0.32mg/Kg i.p.後のopen field の測定, PPI測定, MK801 0.1mg/Kg i.p.後のPPI測定を3日ごとに行った。

[マイクロアレイ]

マイクロアレイはアジレント・テクノロジーのMouse whole Genome Microarray を用いた。C57Bl6, 129Svの前頭前野, 海馬歯状回からtotal RNA を抽出し解析した。

[レンチウイルス]

機能解析を行う遺伝子を導入したレンチウイルスをstereotacticに前頭前野に注入することにより前頭前野特異的に遺伝子導入を行った。レンチウイルス感染後2週間にて, MK801 0.32mg/Kg i.p.後のopen field の測定を行い, 統合失調症様行動異常に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は, 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針及び滋賀成人病センター研究所が定め

る動物取り扱い倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

C57Bl6, もしくは, C57Bl6と129SvのF1, F2の遺伝学的背景の22q11欠損症候群モデルマウスを用いた行動試験によって, PPI に対し遺伝的背景の違いはコントロールマウスにおいては全く影響を与えないが, 22q11欠損症候群モデルマウスにおいては大きな影響を与えることがわかった。また, Open Field においては, ニコチンの慢性投与は, MK801が惹起する行動量亢進を, コントロールマウスの場合では遺伝学的背景にかかわらず憎悪するが, 22q11欠損症候群モデルマウスでは, F2の遺伝学的背景においてのみ憎悪の効果がC57Bl6, F1の背景では反対に改善させる影響があった。このことは, MK801による統合失調症モデルと, 22q11欠損症候群モデルマウスによる統合失調症モデルでは, 影響を受ける遺伝子座が異なる可能性を示唆している。次に, C57Bl6と129Svのゲノム情報のデータバンクの情報を用い, *in silico* にてDXMit19.1とD18Mit186.1の近傍に認められるC57Bl6と129Svで異なるSNPの検索を行った。行動異常に影響を及ぼしうるゲノム上の変異としてcopy number variation (CNV)とsingle nucleotide polymorphismがある。Timothy A. Graubertらにより報告された純系マウスに認められるCNVのデータバンクでは, QTLの近傍にC57Bl6と129Svで差異が認められるCNVは見出されなかった。HapMap projectのデータバンクでは, DXMit19.1近傍に, 816個のSNPを見出し, そのうち14個のSNPが遺伝子のcoding regionに認められた。また, D18Mit186.1の近傍には5901個のSNPを見出し, うち18個がcoding regionに認められることが明らかに

なった。

最後に、我々は、どのSNPが統合失調症様症状とニコチンの相互作用するのかを効率よくスクリーニングするために、レンチウイルスによる生体内での遺伝子導入法を確立した。前頭前野特異的に遺伝子を導入することによって統合失調症様行動異常を指標にその影響を解析できるかを検討するため、22q11欠損症候群モデルマウスを用いて解析を行った。22q11欠損症候群で欠損する染色体領域に存在しているComt遺伝子をレンチウイルスを用いて、前頭前野特異的に過剰発現させたところ、22q11欠損症候群モデルマウスが示す統合失調症様行動異常を正常化できることがわかった。さらに、Comtの発現レベルが介在神経細胞の活性に影響を与える可能性を見出した。

D. 考察

22q11欠損症候群モデルマウスの統合失調症様行動異常とニコチンの相互作用もC57Bl6と129Svの遺伝的背景の違いを受けることが、その遺伝的背景の違いのニコチンとの相互作用への影響は、MK801投与による統合失調症様行動異常に対するものと大きく異なることが明らかとなった。その原因となる候補遺伝子群の同定は、2つの統合失調症モデルの質的差異の解明につながると思われる。

MK801による統合失調症モデルのQTL解析で明らかになった統合失調症様行動異常とニコチンの相互作用に影響を及ぼすQTLの候補SNPは6000-7000にも及び、さらなるwetな実験によって、原因となるSNPの同定を試みていかなければならない。我々は、生体内部位特異的レンチウイルス遺伝子導入法を用いれば、統合失調症様行動異常を指標とした遺伝子の機能解析が可能であることを示した。本手法により、統合失調症様症状とニコチンの相互作用に影響

を与える染色体部位に存在する遺伝子群のSNPの生理的意義が、近い将来解明されうると考えられる。

E. 結論

今回の解析で明らかとなった22q11欠損症候群モデルマウスの統合失調症様行動異常とニコチンの相互作用に影響を及ぼす候補遺伝子群をQTL解析によって同定を進めている。候補遺伝子のリストが作成できれば、共同研究者の岸本年史教授の研究によって、ヒトでの対応遺伝子の同定、ヒトでの統合失調症の病態とニコチン消費状況と同定された対応遺伝子の関係を明らかにしていただくことを計画している。マウスでは、ゲノム情報のデータベースが完備されているため、QTL解析によって見出された遺伝子座の候補遺伝子を同定することが簡便になってきている。しかし、*in silico*の解析から得られる候補遺伝子の数は膨大となるため、効率の良いスクリーニング方が必要となる。部位特異的レンチウイルス遺伝子導入法は、統合失調症様行動異常を指標として遺伝子機能を生体内で直接検討することができるため、統合失調症様症状とニコチンの相互作用に影響を及ぼすSNPの同定に貢献できるのみならず、次世代シーケンサーの発展により次々に同定されつつある統合失調症特異的SNPの統合失調症発症への関与をスクリーニングする良い手法を提供すると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Notch signaling regulates the development of a novel type of Thy1-expressing dendritic cell in the thymus.