

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(精神疾患関係分野)

双極性障害の神経病理学に基づく診断法の開発
に関する研究

(課題番号 H25 - 精神 - 実用化(精神) - 一般 - 004)

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 加藤 忠史

(独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター)

平成26(2014)年3月

目 次

I．総括研究報告

「双極性障害の神経病理学に基づく診断法の開発」
独立行政法人理化学研究所 精神疾患動態研究チーム 加藤 忠史

II．研究成果の刊行に関する一覧表

III．資料

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(精神疾患関係研究分野)

双極性障害の神経病理学に基づく診断法の開発
平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 加藤忠史
独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム チームリーダー

平成26(2014)年3月

研究要旨：

福島県立医科大学では、ブレインバンク事業において、双極性障害患者の生前登録を進め、2014年5月までに、23名の双極性障害患者が登録された。登録者の分布は、北海道から九州まで全国に及んでいた。一方、実際の死後脳の集積に関しては、2014年5月現在で、5名の双極性障害患者の脳が集積された。国立精神・神経医療研究センターでは、リサーチリソースネットワークを基盤とした精神神経疾患患者の脳集積を続けており、リサーチリソースネットワークと東京都健康長寿医療センター・高齢者ブレインバンクを合わせて、13例の双極性障害症例の脳を集積している。これらの脳について、高齢者ブレインバンクにおける対照群との比較を行い、双極性障害における嗜銀顆粒の蓄積について、定量的な観点より確認すると共に、その分布の特徴について、詳細な検討を行った。また、東京都健康長寿医療センター・高齢者ブレインバンクでは、移転に伴う剖検数の一時的低下がある中でも、1例の新規双極性障害例の剖検を行い、脳の集積を進めた。理化学研究所脳科学総合研究センターでは、モデルマウスを用いて、ミトコンドリア機能障害を有する細胞を検出する方法を確立し、ヒト死後脳に応用した。その結果、ミトコンドリアDNA(mtDNA)欠失に伴うシトクロムc酸化酵素(COX)蛋白サブユニット減少を免疫組織化学的に検出できることを確認した。また、マウスでCOX陰性細胞が見られる候補部位について、ヒト脳で検討するため、抗カルレチニン抗体および抗アセチルコリンエステラーゼ抗体を用いた免疫染色を行った。これらの方法を用いて、今後双極性障害患者死後脳において検討を進める予定である。しかしながら、ホルマリン固定の期間によって、染色性の低下が予想されるため、慎重に方法論的検討を進めていく必要がある。

研究分担者

加藤忠史 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター 精神疾患動態研究チーム
チームリーダー

村山繁雄 東京都健康長寿医療センター神経内科・
バイオリソースセンター(高齢者ブレインバンク)部長

齊藤祐子 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター臨床検査部 医長

國井泰人 福島県立医科大学医学部 講師

A 研究目的

双極性障害は、躁状態、うつ状態を繰り返し、社会生活の障害を引き起こす重大な精神疾患である。他の精神疾患に比べて、比較的均一な一群であると考えられたことから、ゲノム研究、脳画像研究が進められてきたが、未だ確実な所見は乏しく、その原因については不明な点が多い。そのため、確実な生物学的診断法がなく、診断は面接によって行われるため、初発のうつ状態は大うつ病と診断せざるを得ない。そのため、潜在的な双極性障害患者において、抗うつ薬治療によって躁転・急速交代化などの問題が引き起こされる可能性があり、これが経過の悪化につながっている。初発時に双極性障害と診断できるような診断法の開発が急務である。

我々は、双極性障害患者における磁気共鳴スペクトロスコピー研究、死後脳研究、遺伝学研究、及び動物モデルの研究などから、双極性障害にミトコンドリア機能障害が関与することを示した。

さらに、平成21～23年度の厚生労働科学研究費（気分障害の神経病理学に基づく分類を目指した脳病態の解明）により、脳内の情動関連部位へのミトコンドリア機能障害細胞の蓄積が、気分障害の病態に関与する可能性を示した。一方、双極性障害患者死後脳と気分障害モデル動物の遺伝子発現解析により共通点を探索した結果、Sfpq/PSFが共通に変化していることを突き止めた(Kubota et al, 2010)。最近、SFPQがタウ遺伝子のスプライシングに関与することが見いだされ(Ray et al, J Mol Neurosci 2011)。リチウムがタウリン酸化酵素であるGSK-3

の阻害作用を持つことと併せ、タウと双極性障害の関連が注目された。

村山らは、同研究費により気分障害患者の脳を蓄積し、最近、齊藤らと共に、タウ蓄積による嗜銀顆粒(Saito et al, JNEN 2004)が双極性障害患者死後脳で脳幹部などに多い可能性を示した。

死後脳において、特定の脳部位のこれらの変化が双極性障害に特異的な変化であることが確認されれば、双極性障害の脳画像診断が可能になると期待される。

本研究の目的は、双極性障害における局在性ミトコンドリア機能障害およびタウ蓄積の意義について、患者死後脳を用い、動物モデルと比較しながら明ら

かにすることである。

B. 研究方法

本研究では、病態としては、ミトコンドリア機能障害とタウを中心として解析し、研究の手法としては、死後脳の収集と、その免疫組織化学的な解析に焦点を絞る。

加藤は、死後脳および動物モデルにおける定量的かつハイスループットな免疫組織化学的解析法を開発すると共に、モデルマウスを用いて、病変候補脳部位を同定する。一方、國井と共に、双極性障害患者の献脳登録の推進に向けて、啓発活動を行う。啓発活動は、これまでに進めてきた福島精神疾患ブレインバンクを基盤として、生物学的精神医学会のブレインバンク委員会と連携して進める。

村山、齊藤、國井は、各々が関わるブレインバンク（高齢者ブレインバンク、リサーチリソースネットワーク、福島精神疾患ブレインバンク）において、生前登録した患者の剖検を推進し、双極性障害患者の死後脳の蓄積を進めると共に、既に得られた試料を用いた神経病理学的な解析を行う。

（倫理面への配慮）

本研究については、参加施設の倫理委員会の承認を受けている。これらの研究においては、ヒトゲノム指針、死体解剖保存法など、関連の法規および指針を遵守して行う。

動物実験においては、施設内の動物実験委員会の承認を得て研究を進めると共に、3Rの原則に基づき、使用する動物を最小にすること、可能な限り代替法を利用すること、苦痛を軽減することに努める。

生前登録者には、献脳について説明の上、書面にてインフォームドコンセントを得ると共に、家族の同意を得る。死亡後は家族のインフォームドコンセントに基づいて剖検を行う。剖検は、基本的に、東京都健康長寿医療センター、国立精神神経医療研究センター、福島県立医科大学の3カ所で行う。

C. 研究結果

福島県立医科大学では、ブレインバンク事業において、双極性障害患者の生前登録を進め、2014年5月までに、福島県内からの5名に加え、福島県外からも18名の登録を受け、合計23名の双極性障害患者が登録された。これは、生前登録者160名の14.3%を占め、2007年まで（77名中1名、1.2%）に比べ、大きく増加している。登録に至った内訳は、加藤忠史の著書（47%）、福島ブレインバンクのホームページ（17%）、ウォールポケットを活用したパンフレット配布（17%）の他、ネット検索、講演会などであった。登録者の分布は、北海道から九州まで全国に及んでいた。一方、実際の死後脳の集積に関しては、2014年5月現在で、5名の双極性障害患者の脳が集積された。これは、同ブレインバンクに脳が集積された48例の10.4%を占めている。5例のうち1名は悪性腫瘍に罹患したことを機に生前登録し、剖検に至ったケースであった。現在のところ、これらの症例の脳については、肉眼所見を得ているのみであり、今後、神経病理学的な検討を進め、診断確定を行う必要がある。

国立精神・神経医療研究センターでは、同センター主導によるリサーチリソースネットワークを基盤として、精神神経疾患患者の脳集積を進めている。これまでに、リサーチリソースネットワークおよび東京都健康長寿医療センター・高齢者ブレインバンクで集積された双極性障害患者13例について、診療録を元に臨床情報を後方視的に検索し、神経病理学的検索との対応付けを行うと共に、高齢者ブレインバンクにおける1241例の剖検例の所見との比較を行った。BBARプロトコールに基づいて、嗜銀顆粒に関する評価（ステージング）を行ったところ、双極性障害ではステージIIIが5名、IIが3名、Iが3名、0が0名であり、対照群（IIIが6.9%、IIが8.9%、Iが16.7%、0が68.0%）に比して、嗜銀顆粒のステージが高く、双極性障害では、対照群に比して、若年より、高いステージの嗜銀顆粒を示すことが確認された。また、若年の双極性障害患者群における嗜銀顆粒の分布は、扁桃核、縫線核、青斑核等に多い傾向が見られた。

東京都健康長寿医療センター・高齢者ブレインバンクにおいては、これまでの東京都健康長寿医療セ

ンター病院症例の剖検に加え、リサーチリソースネットワークの生前登録拠点としての機能も担うこととなり、生前登録も進めつつある。新施設への移転に伴い、2013年度の剖検例は39例と、前年度の63例よりやや減少したため、今後再び剖検を促進していく必要がある。また、福島医科大学ブレインバンク検体における神経病理学的診断も担っている。双極性障害患者の剖検に関しては、2013年度には新たに1名の剖検を行った。38歳にて躁状態で発症し、その後躁状態、うつ状態を反復し、41歳にて双極性障害と診断された症例である。本症例は、リチウムにて治療されていたが、71歳時、仮面様顔貌、筋強剛などを認め、パーキンソニズムが疑われた。しかし、剖検では神経病理学的な異常所見は認められなかった。

理化学研究所脳科学総合研究センターでは、気分障害モデルマウスにおいて、ミトコンドリアDNA (mtDNA)欠失蓄積に伴い、mtDNAにコードされたシトクロムc酸化酵素 (COX) 蛋白サブユニットが減少している細胞 (COX陰性細胞) を免疫組織化学的に検出する方法を開発すると共に、視床室傍部に mtDNA欠失が蓄積していることを見いだした。これらの所見を元に、COX陰性細胞をヒト死後脳で検出する方法の確立を進めた。ミトコンドリア病である Kearns Sayer 症候群において、COX陰性細胞が多く蓄積していることを観察すると共に、年齢のほぼ一致した対照群では、COX陰性細胞ははるかに少ないことを確認した。一方、ミトコンドリア病でも、mtDNA欠失蓄積が見られない MELAS においては、こうした所見は見られなかった。ヒト視床室傍部の解剖学的特徴を明らかにするため、マウスでこの部位の同定に用いられている、抗カルレチニン抗体および抗アセチルコリンエステラーゼ抗体を用いた免疫染色を行って、その解剖学的な特徴付けを進めた。

今後、これらの所見を元に、今後、福島医科大学ブレインバンク、リサーチリソースネットワーク、高齢者ブレインバンクの検体を用いて、COX陰性細胞の分布の検索を進め、嗜銀顆粒の所見との比較を行う予定である。しかし、ホルマリン固定期間により、染色性の低下が予想されるため、どの程度の固定期間であれば免疫染色が行えるか、方法論的な点

を確認しながら進めていく予定である。

D. 考察

啓発活動により、双極性障害患者の生前登録は確実に増加しており、実際に生前登録を経て剖検に至ったケースもあった。

双極性障害患者死後脳において、嗜銀顆粒が多く見られることが多数例の対照群との比較で明らかとなった。

双極性障害の原因脳部位として疑われている部位である視床室傍部については、これまでマウスでは特徴づけられている一方、人における解剖学的な特徴付けが十分なされていなかったが、本研究により、人での検討が可能になると期待される。

なお、各施設で集積された双極性障害患者の死後脳については、本研究班における研究に限らず、幅広く研究者に提供される予定である。また、本研究で開発された免疫組織化学的手法は、今後ヒト死後脳の神経病理学的検索に用いることができる。

更に、ヒト視床室傍部の解剖学的な検証により、これまで神経病理学的な所見の記載が困難であった視床室傍部についてより詳細な所見を記載できるようになると期待される。

今後、集積した双極性障害患者死後脳を用いて、候補部位である視床室傍部を含め、タウの蓄積およびミトコンドリア機能障害に関する神経病理学的な検討を進めていく予定である。

E. 結論

双極性障害患者死後脳の蓄積は困難であるが、進んでいる。本年度の研究により、今後、双極性障害の神経病理学的所見として、候補脳部位におけるタウ蓄積およびミトコンドリア機能障害について、検討を進めていくための基礎的知見を得ることができた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

(平成25年度)

Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2014) A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia. *Molecular Brain*, 7:5

Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K (2014) Increased L1 Retrotransposition in the Neuronal Genome in Schizophrenia. *Neuron*, 81: 306-313

Mehta D, Iwamoto K, Ueda J, Bundo M, Adati N, Kojima T, Kato T (2014) Comprehensive survey of CNVs influencing gene expression in the human brain and its implications for pathophysiology. *Neuroscience Research*, 79: 22-33

Kunii Y, Hyde TM, Ye T, Li C, Kolachana B, Dickinson D, Weinberger DR, Kleinman JE, Lipska BK. Revisiting DARPP-32 in postmortem human brain: changes in schizophrenia and bipolar disorder and genetic associations with t-DARPP-32 expression. *Mol Psychiatry*. 2014;19(2):192-9

Kunii Y, Miura I, Matsumoto J, Hino M, Wada A, Niwa SI, Nawa H, Sakai M, Someya T, Takahashi H, Kakita A, Yabe H. Elevated postmortem striatal t-DARPP expression in schizophrenia and associations with DRD2/ANKK1 polymorphism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 ;53:123-128

Hasegawa M, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DM, Saito Y, Murayama S. 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2014 Feb;127(2):303-5.

Nagao S, Yokota O, Ikeda C, Takeda N, Ishizu H, Kuroda S, Sudo K, Terada S, Murayama S, Uchitomi Y: Argyrophilic grain disease as a

neurodegenerative substrate in late-onset schizophrenia and delusional disorders. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 2013; Nov 23, eprint ahead of print

2. 学会発表
(国際学会)

Kato T (2014) Neurobiological basis of bipolar disorder. 16th annual conference of the international society for bipolar disorders, South Korea, Seoul, Mar. 18-21

Yasuto Kunii, Thomas M.Hyde, Tlanzhang Ye, Chao Li, Ran Tao, Whitney McFadden, Daniel R.Weinberger, Joel E.Kleinman, and Barbara K.Lipska; Expression levels of CHRNA7 and CHRFA7A are altered in postmortem dorsolateral prefrontal cortex in major psychiatric disorder. Neuroscience 2013 第 43 回米国神経科学会議, SanDiego, CA, USA, 2013/11/11

(国内学会)

國井泰人；統合失調症死後脳内タンパク質発現解析および発現量が変動したタンパク質の局在解析；質量分析法による網羅的及び標的指向的な二種の定量解析を用いて.第9回日本統合失調症学会,京都,2014/3/14-15

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

研究成果の刊行一覧表（平成 25 年度）

加藤 忠史

氏名	タイトル	雑誌 / 書籍名	巻	頁	年
Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Bundo M, Kato T	A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia.	Molecular Brain,	7	5	2014
Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K.	Increased L1 Neuron Retrotransposition in the Neuronal Genome in Schizophrenia	L1 Neuron	81	306-313	2014
Mehta D, Iwamoto K, Ueda J, Bundo M, Adati N, Kojima T, Kato T	Comprehensive survey of CNVs influencing gene expression in the human brain and its implications for pathophysiology.	Neuroscience Research,	79	22-33	2014
Kunii Y, Hyde TM, Ye T, Li C, Kolachana B, Dickinson D, Weinberger DR, Kleinman JE, Lipska BK.	Revisiting DARPP-32 in postmortem human brain: changes in schizophrenia and bipolar disorder and genetic associations with t-DARPP-32 expression	Mol Psychiatry	19(2)	192-9	2014

Kunii Y, Miura I, Matsumoto J, Hino M, Wada A, Niwa SI, Nawa H, Sakai M, Someya T, Takahashi H, Kakita A, Yabe H.	Elevated postmortem striatal t-DARPP expression in schizophrenia associations with DRD2/ANKK1 polymorphism.	Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.	53	123-128	2014
Hasegawa M, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DM, Saito Y, Murayama S.	3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease.	Acta Neuropathol.	127(2)	303-5.	2014
Nagao S, Yokota O, Ikeda C, Takeda N, Ishizu H, Kuroda S, Sudo K, Terada S, Murayama S, Uchitomi Y	Argyrophilic grain disease as a neurodegenerative substrate in late-onset schizophrenia and delusional disorders.	Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci epub ahead of print			2013 Nov 23