

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18209038
 研究課題名（和文）遺伝子発現定量による双極性障害の検査法の開発
 研究課題名（英文）Development of a diagnostic test of bipolar disorder using gene expression analysis
 研究代表者
 加藤 忠史 (KATO TADAFUMI)
 独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・チームリーダー
 研究者番号：30214381

研究成果の概要（和文）：

双極性障害モデルマウスと患者死後脳で遺伝子発現解析を行い、共通の変化を示す遺伝子を同定した。これらを含む候補遺伝子 17 個をリンパ芽球様細胞で測定したところ、感度 76%、特異度 85%で患者群と健常群の判別が可能であった。独立サンプルにこの判別関数を適用したところ、感度 41%、特異度 81%で判別される傾向 ($p=0.05$) が見られた。この結果は、双極性障害における遺伝子発現診断法の有用性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported that neuron-specific mutant Polg1 (mitochondrial DNA polymerase) transgenic (Tg) mice exhibited bipolar disorder (BD)-like phenotypes. We searched for the genes differentially expressed between post-mortem brains of BD patients and control subjects, and between the brains of Tg and wild-type mice. Gene ontology analysis showed that 16 categories overlapped in the altered gene expression profiles of BD patients and the mouse model. In the brains of Tg mice, 33 genes showed similar changes in the frontal cortex and hippocampus compared to wild-type mice. Among the 33 genes, SFPQ and PPIF were differentially expressed in post-mortem brains of BD patients compared to control subjects. These genes and other candidate genes were used for the gene expression analysis in lymphoblastoid cells obtained from patients with bipolar disorder and control subjects. Using 17 genes, the first sample were classified into patients and controls. Using this discriminate function, the second sample set was classified. Discrimination of the second sample was close to significance ($p=0.05$). These findings suggest that gene expression analysis may be useful for the diagnosis of bipolar disorder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2007 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2008 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009 年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
総計	37,500,000	11,250,000	48,750,000

研究分野：精神神経科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 ・精神薬理学

キーワード：双極性障害（躁うつ病）・遺伝子発現・培養リンパ芽球・ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

気分障害（双極性障害とうつ病）は、がん、生活習慣病と並んで三大国民病と呼ぶべき、社会的影響の大きな疾患である。しかしながらその研究は著しく遅れており、未だ精神疾患の特異的検査法は存在しない。

若年重症うつ病患者の半数近くは双極性障害の初発であるが、現在こうした患者はうつ病として治療されているため、適切な治療の開始が遅れ、予後を悪化させている。双極性障害では、発症から診断に 10 年、診断から維持療法開始に 10 年を要するのが現状であり、診断検査法があれば、診断・治療の遅れによる予後悪化を防ぐことができる。

我々は、双極性障害患者の培養リンパ芽球および死後脳で網羅的遺伝子発現解析を世界に先駆けて行ってきた。その結果、培養リンパ芽球において、ストレス反応関連遺伝子群（HSPF1）、細胞内 Ca^{2+} シグナル関連遺伝子（PDLIM5）、ミトコンドリア関連遺伝子（NDUFV2）などの発現変化を見出した。PDLIM5、HSPF1 の発現変化は、より多くのサンプルで確認され、双極 I 型障害、双極 II 型障害で共通に見られた。PDLIM5 の低下は最近、うつ病患者の末梢リンパ球でも確認されている。

一方我々は、変異型ミトコンドリア DNA ポリメラーゼを脳特異的に発現させた結果、周期的な輪廻し行動量の変化を示すマウスを作成し、これにリチウムが奏効することを示した。このマウスで、遺伝子発現を解析することにより、生物学的マーカーを同定できると期待される。

臨床研究では攪乱因子の除外が困難であるが、臨床研究を基盤としつつ、動物モデルを利用することで、マーカーの同定が可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、これらの候補マーカーの有用性について検討すると共に、モデルマウスを用いて、新たなマーカー候補分子を同定し、その妥当性を臨床サンプルで確認する。

3. 研究の方法

1) マーカー探索

双極性障害の遺伝子発現定量法による検

査法開発のため、双極性障害モデルマウス（変異 Polg トランスジェニックマウスの前頭葉および海馬、双極性障害患者死後脳（前頭葉）において遺伝子発現解析を行い、共通に変化している遺伝子群を探索した。

マウスは、我々が作成した CAMKII α プロモーター下に変異 (D181A) ポリメラーゼ γ (Polg1) を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを用いた。Tg マウス、および同腹の野生型マウス、各群 5 匹ずつを用いた。遺伝子発現解析には、Affymetrix 社の MG_430 2.0 アレイを用いた。

ヒト死後脳では、スタンレー財団ブレインバンクの双極性障害患者、および対照群の前頭葉を用い、HGU133A アレイにより遺伝子発現解析を行った。

得られた結果は、定量的 RT-PCR 法により確認した。マウス、およびヒトで、有意な遺伝子発現差異を認める遺伝子を絞り込んだ。遺伝子オンロジー (GO) 解析には、DAVID を用いた。

統計解析には、SPSS 11.0J を用いた。

2) 診断法の検討

見出されたマーカーの診断的意義を確認するため、これまでに見出されたマーカー分子および、今回見出されたマーカー分子について、末梢血由来培養リンパ芽球様細胞を用いて、遺伝子発現解析を行った。

対象は、これまでに報告したサンプル (1st サンプル、双極性障害患者 22 名 [52.6 \pm 14.9 歳、女性 10 名、男性 12 名]、対照群 21 名 [47.6 \pm 12.0 歳、女性 5 名、男性 16 名]) および、新たなサンプル (2nd サンプル、双極性障害患者 37 名 [42.2 \pm 11.3 歳、女性 14 名、男性 23 名]、対照群 38 名 [48.0 \pm 14.6 歳、女性 20 名、男性 18 名]) である。

患者より採血し、EB ウイルスを用いて細胞を作成し、いったん凍結保存し、融解する操作を 2 回行った細胞を用いた。細胞から RNA を抽出し、逆転写により cDNA を作成し、リアンプ法により増幅し、TaqMan プローブを用いた定量的 PCR 法に供した。リファレンス遺伝子として、ACTB を用いた。

4. 研究成果

1) マーカー探索

モデルマウスと患者死後脳の両者において発現変化が見られる遺伝子を探索したところ、ヒト死後脳では、発現している 11920 遺伝子中、764 遺伝子において、有意な発現変動 ($p < 0.05$) が見られた。これらの遺伝子について、GO 解析を行った。

マウス前頭葉でも同様の GO 解析を行ったところ、22,643 遺伝子中、1471 遺伝子に有意な ($p < 0.05$) 発現変動が観察された。

ヒト死後脳では、30 の GO カテゴリー、マウスでは 30 の GO カテゴリーに有意な発現変動が見られ、うち 16 のカテゴリーにおいて、重なりが見られた。両者において重複したカテゴリーは、細胞内小器官、RNA プロセッシング、およびその他の一般的なカテゴリーであった。

モデルマウスでは、海馬で 922 プローブ、前頭葉で 1471 プローブに有意な変動が見られ、これらのうち、60 個が重なっており、うち 33 個は同方向の変動が見られた。15 は共通に上昇しており、18 は共通に低下していた。

これらの 33 個のプローブは、ヒトでは 39 プローブに対応していた。このうち 3 個は、ヒト死後脳でも有意な発現変動が見られた。これらのプローブは、RNA プロセッシングに関わる遺伝子である SFPQ、およびミトコンドリア PTP (permeability transition pore) に関わるシクロフィリン D をコードする遺伝子、PPIF であった。

PPIF の発現量は、死後脳では年齢、発症年齢、罹病期間、死後時間、性別などと相関していなかった。無服薬患者 (4 名) でも同様の傾向が見られ、薬剤の影響ではないと考えられた。

2) 診断法の検討

調べた遺伝子は、以下の通りである。

今回の研究により得られた候補遺伝子

PPIF SFPQ

Tg マウスにおけるミトコンドリア関連遺伝子の発現解析より得られた候補遺伝子

TOP1MT GLUD1

我々がバイオマーカーとして報告したもの

NDUFV2 PDLIM5 DNAJB1 (HSPF1)

ミトコンドリア DNA 欠失を引き起こす遺伝子

POLG WFS1 POLG2 SLC25A4 Twinkle

死後脳の遺伝子発現解析で見出されたもの (Iwamoto et al, Hum Mol Genet 2005)

AK2

モノサイトでマーカーとして報告された遺伝子 (Padmos ら AGP2009)

PDE4B

バイオマーカーとして報告された遺伝子 (Le-Niculescu Mol Psychiatry. 2009)

MBP

ゲノムワイド関連研究で見出された遺伝子

ANK3 RASGRP1

調べたサンプルのうち、一枚のプレートでは、データが得られなかったため、再度測定を行ったところ、はずれ値を示したため、解析から除外した。

その結果、人数は、

1st サンプル

対照群 21 名 (M16、F5) 47.6 ± 12.0 歳、

双極性障害 13 名 (M12、F1) 53.2 ± 14.9 歳

2nd サンプル

対照群 37 名 (M17、F20) 47.6 ± 14.6 歳

双極性障害 24 名 (M20、F4) 42.1 ± 11.7 歳

となった。

調べたマーカーのうち、PPIF、SFPQ、Twinkle、POLG2、AK2 が、1st サンプルにおいて、患者群で有意に ($p < 0.01$) 低値を示した。しかし、この所見は、2nd サンプルでは確認できなかった。

1st サンプルにおいて、診断 (双極性障害 [BD]、健常 [C]) を従属変数として、全遺伝子および年齢、性別を独立変数とし、ステップワイズ法 (変数増加法) によるロジスティック回帰分析を行った。

その結果、POLG1、ANK3、RASGRP1 の 3 つのみが変数として選択された。これら 3 つの変数を用いた判別を行った結果、有意に 2 群が区別され、(カイ二乗 = 12.6、 $p = 0.00037$) 感度 76%、特異度 85% であった。

	診断	
検査	BD	C
陽性 (BD)	10	3
陰性 (C)	3	18

次に、この判別関数を用いて、2nd サンプルの判別を行った。その結果、感度 41%、特異度 81% で、2 群で判別結果が異なる傾向 (カイ二乗 = 3.74、 $p = 0.05$) が見られた。

	診断	
検査	BD	C
陽性 (BD)	10	7
陰性 (C)	14	30

なお、ANK3 は患者で高く、POLG、RASGRP1 は患者で低い値を示した。最もエフェクトサイズが大きいのは、ANK3 であった。

考察

患者死後脳とモデルマウスで共通に変化している遺伝子を選択することにより、死後変化、Agonal factor (死の直前の身体的状態)、服薬などの要因を除外して、疾患関連遺伝子変化を同定できると考えた。このアプローチにより、PPIF および SFPQ という、2 つの遺伝子が候補遺伝子として選択された。これらについて、末梢血由来培養リンパ芽球で定量を行ったところ、有意な低下が見られた。しかし、この所見は独立サンプルでは確認されなかった。また、これまでに報告したバイオマーカーについては、同じサンプルでも所見が確認されなかったが、これは今回の測定で脱落したサンプルが多かったためと思われる。

一方、調べた 17 の遺伝子を用いて、判別関数を作成し、判別を試みたところ、1st サンプルでは比較的高い感度と特異度で判別が可能であった。2nd サンプルでは、感度は低いものの、有意に判別できる傾向が見られた。この判別関数に選択され

た変数のうち2つは、ANK3 および RASGRP1 で、双極性障害のゲノムワイド関連研究で見出された候補遺伝子である。これらの遺伝子の発現を末梢血あるいは培養リンパ芽球で測定した報告はなく、今回の研究はこれらの遺伝子がバイオマーカーとして有用である可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Kubota M, Kasahara T, Iwamoto K, Komori A, Ishiwata M, Miyauchi T, Kato T (2010) Therapeutic implications of down-regulation of cyclophilin D in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 1-14(epub) (査読あり)
2. Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ishiwata M, Ueda J, Kakiuchi C, Ishigooka J, Kato T (2010) Effect of mood stabilizers on gene expression in lymphoblastoid cells. *Journal of Neural Transmission* 117:155-164 (査読あり)
3. Bundo M, Iwamoto K, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T (2010) Mutation screening and assessment of the effect of genetic variations on expression and RNA editing of serotonin receptor 2C in the human brain. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 64:57-61 (査読あり)
4. Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2009) Serotonin receptor 2C and mental disorders: genetic, expression and RNA editing studies. *RNA Biology* 6: 248-253 (査読なし)
5. Hayashi A, Kasahara T, Kametani M, Toyota T, Yoshikawa T, Kato T (2009) Aberrant endoplasmic reticulum stress response in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 12:33-43 (査読あり)
6. Washizuka S, Iwamoto K, Kakiuchi C, Bundo M, Kato T (2009) Expression of mitochondrial complex I subunit gene *NDUFV2* in the lymphoblastoid cells derived from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience Research* 63: 199-204 (査読あり)
7. Kato T, Ishiwata M, Yamada K, Kasahara T, Kakiuchi C, Iwamoto K, Kawamura K, Ishihara H, Oka Y (2008) Behavioral and gene expression analyses of *Wfs1* knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neuroscience Research* 61:143-158 (査読あり)
8. Hayashi A, Kasahara T, Kametani M, Kato T (2008) Attenuated BDNF-induced upregulation of GABAergic markers in neurons lacking *Xbp1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376:758-763 (査読あり)
9. Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Ozaki N, Iwata N, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Imamura A, Okazaki Y, Kato T (2008) Up-regulation of *ADM* and *SEPX1* in the lymphoblastoid cells of patients in monozygotic twins discordant for schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 147B:557-564 (査読あり)
10. Iwamoto K, Ueda J, Bundo M, Nakano Y, Kato T (2008) Effect of a functional single nucleotide polymorphism in the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene on the expression of oligodendrocyte-related genes in schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 62: 103-108 (査読あり)
11. Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Komori A, Sasaki T, Kato N, Kato T (2008) Methylation status of the *reelin* promoter region in the brain of schizophrenic patients. *Biological Psychiatry* 63:530-533 (査読あり)
12. Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Sasaki T, Kato N, Kato T (2008) Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neuroscience Research* 60:184-191 (査読あり)
13. Hayashi A, Kasahara T, Iwamoto K, Ishiwata M, Kametani M, Kakiuchi C, Furuichi T, Kato T (2007) The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced *XBPI* splicing during brain development. *The Journal of Biological Chemistry* 282:34525-34534 (査読あり)
14. Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T (2007) Association analysis of *HSP90B1* with bipolar disorder. *Journal of Human Genetics* 52: 794-803 (査読あり)
15. Kato T, Kakiuchi C, Iwamoto K (2007) Comprehensive gene expression analysis in bipolar disorder. *The Canadian Journal of Psychiatry* 53: 763-771 (査読あり)

16. Kubota M, Kasahara T, Nakamura T, Ishiwata M, Miyauchi T, Kato T (2006) Abnormal Ca^{2+} dynamics in transgenic mice with neuron-specific mitochondrial DNA defects. The Journal of Neuroscience 26:12314-12324 (査読あり)
17. Iwamoto K, Kato T (2006) Gene expression profiling in schizophrenia and related mental disorders. Neuroscientist 12: 349-361 (査読なし)

[学会発表] (計3件)

1. 菅原裕子、岩本和也、文東美紀、石渡みずほ、上田順子、垣内千尋、石郷岡純、加藤忠史 (2009) HDAC阻害薬バルプロ酸投与による遺伝子発現変化の網羅的解析. 第3回日本エピジェネティクス研究会 東京 2009年5月22日~23日
2. 菅原裕子、岩本和也、文東美紀、石渡みずほ、上田順子、垣内千尋、石郷岡純、加藤忠史 (2009) リンパ芽球細胞を用いた気分安定薬による遺伝子発現変化の網羅的解析. 第31回日本生物学的精神医学会 京都 2009年4月23日~25日
3. 数野安亜、岡崎祐士、辻田高宏、加藤忠史 (2009) 一卵性双生児双極性障害不一致例におけるリンパ芽球由来ミトコンドリアのプロテオミクス解析. 第31回日本生物学的精神医学会 京都 2009年4月23日~25日

[その他]

ホームページ等

<http://www.brain.riken.go.jp/labs/mdmd/topics.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 忠史 (KATO TADAFUMI)

独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・チームリーダー

研究者番号：30214381

研究協力者

笠原和起、窪田美恵、福家聡、石渡みずほ、磯野蒔子、上田(林)順子、亀谷瑞枝、小森敦子、宮内妙子、数野安亜、高田篤、菅原裕子、岩本和也、文東美紀、垣内千尋、林朗子、中野陽子