

平成 21 年 4 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390300

研究課題名（和文） 包括的分子遺伝学的解析による気分調整薬奏効機序の同定

研究課題名（英文） Comprehensive Molecular Genetics to Elucidate The Mechanism of Action of Mood Stabilizers

研究代表者 富田 博秋（TOMITA HIROAKI）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90295064

研究成果の概要：躁うつ病(双極性障害)の治療薬(気分調整薬)が効く機構を解明してより有効な薬剤の開発に繋げるため、主な気分調整薬 4 剤を脳内細胞に由来する培養細胞 3 種に投与後、各細胞の数万種の遺伝子の発現量を測定し、薬剤間で共通に発現変化を受ける遺伝子を特定した。更に末梢血の単球に気分調整薬を投与し脳内変化に関連する発現変化の特定を行った。これらの知見により気分調整薬の奏効機序に関わる機構の解明が進むと期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2008 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学・気分調整薬・気分安定薬・リチウム・双極性障害・遺伝子発現・機能ゲノム・マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、世界的にリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンが抗躁作用及び再燃予防作用を持つ双極性障害の治療薬として使われている。しかし、これらの気分調整薬の奏効機序には不明な点が多く、また、これらの薬剤が有効でない症例も多いことから奏効機序の解明とその知見に基づくより有効な薬剤の開発が待たれる。

(2) これまでの気分調整薬の奏効機序に関する研究としてはリチウムのGSK3ベータ抑制、バルプロ酸のヒストン修飾やリチウムの日内変動に関与する転写因子への関与、気分調整薬のBCL2、BAG1、AMPA遺伝子発現への影響、イノシトールリン酸系の気分調整薬の奏効機序への関与が示唆されている。しかし、これまでに気分調整薬の奏効機序への関与が示唆されている分子がどのように奏効機序に

関わっているのか、気分調整薬の奏効機序に関わるはずの多数の分子群の中でどの程度の重要性を担っているのかは不明で、マイクロアレイを始めとする包括的な分子遺伝学的な研究が進むことでより重要で治療法開発に有効な分子が同定されることが期待される。

(3)これまでのところマイクロアレイ研究による気分調整薬研究としては気分調整薬を投与した齧歯類の脳組織における発現を解析しているものがあるが、げっ歯類とヒトでは遺伝子発現の調節機構に大きな違いがある、解析に用いられる組織ブロックは神経細胞、グリア細胞の多種細胞種複合体であるため偽陽性を引き起こす、細胞特異的变化を検出できないなどの大きな問題を残している。

2. 研究の目的

(1) ヒト脳の神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに由来する培養細胞に気分調整薬であるリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンの各々を脳内における適正治療濃度で投与した場合と気分調整薬を混入しない培養溶液中で同一期間培養した場合での遺伝子発現をマイクロアレイ解析し、各気分調整薬につき神経細胞、グリア細胞の各々で発現レベルに影響を受ける遺伝子群を調べ、複数の薬剤間で共通に発現調節をうける遺伝子群を特定する。

(2) 末梢血液から単離した単球を樹状細胞に分化させる際にリチウム投与を行い、リチウム投与を行った細胞と行わない細胞とで脳内細胞における発現調節と同様の発現調節を顕著に受ける遺伝子群をリチウムの脳内変化を推測する末梢血バイオマーカーの候補分子として特定する。

3. 研究の方法

(1) 4 種気分調整薬による脳内細胞遺伝子発

現プロファイルへの影響の解析：

ヒトの神経細胞由来の培養細胞 SK-N-SH 細胞、ヒト・アストロサイト由来の UG-87 MG 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。ヒト・オリゴデンドロサイト由来の培養細胞 OL 細胞は Scripps 研究所の Juan Carlos De La Torre 先生のご厚意により提供を受けた。SK-N-SH 細胞および UG87MG 細胞は 10% ウシ胎児血清を添加した Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)、OL 細胞は 10% ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて 37°C、5% CO₂ 濃度の CO₂ インキュベーター内で培養した。塩化リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンを各々の治療域濃度(0.75 mM, 0.5 mM, 50 μM, 5 μM)で混入した培養液を準備した。この際、カルバマゼピンとラモトリジンは難溶性のため一旦 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶媒に溶解した上で各培養液に混入した。この際、培養液中の DMSO の最終濃度は 0.15% であったので、カルバマゼピンとラモトリジン混入溶液の対照として、溶媒である DMSO を 0.15% 濃度に混入した培養液を準備した。上記、3 種の培養細胞を①塩化リチウム、②バルプロ酸、③カルバマゼピン、④ラモトリジン、⑤DMSO、⑥薬剤非添加の 6 種類の培養液中で 5 日間培養を行った。18 種 (3 細胞種×6 条件の薬剤投与) の細胞の各々から総 RNA を Qiagen 社 RNeasy Mini Kit と RNase-free DNase I を用いて抽出・精製し、2100 BioAnalyzer にて RNA のクオリティーを確認した。500 ng の総 RNA から Illumina 社が提供するプロトコルに従ってビオチン化した cRNA を合成し、Human-6 V2 microarray に 16 時間ハイブリダイズした後、非特異的な結合を洗浄除去し、専用のスキャナーで、各アレイの信号強度を測定した。各アレイのプロープの信号強度を BeadStudio

3.1 ソフトウェアで算出し、各薬剤、各細胞種に特異的に発現変化を示す遺伝子群や、薬剤間、細胞種間に共通に発現変化を示す遺伝子群を特定した。GeneSpring GX version 8.0等のソフトウェアを用いて、投与薬剤間や遺伝子間の発現プロファイルの階層クラスター等の検討を行った。また、Expression Analysis Systematic Explorer を用いて、気分安定薬投与により顕著に発現変化を起こす遺伝子カテゴリの検討を行った。

(2) リチウムの末梢血単球由来樹状細胞遺伝子発現プロファイルへの影響の解析：

研究の趣旨を理解した上で同意を得た6名の健常者からヘパリン採血したヒト末梢血を、フィコールの処理により、単核球層を分離し、CD14+ マイクロビーズを用いて CD14 抗原陽性の単球を分離した。生理食塩水で洗浄した後、500万細胞 / 3.66 cm² (well) となるように調整し、下記の3つの条件で培養を行った。①顆粒球単球コロニー刺激因子 GM-CSF 800 units/ 500万細胞/mL + インターロイキン4 IL-4 1000 unit/ 5×10⁶ cells/mL を添加して一週間培養、②上述した条件に 1 mmol/L の塩化リチウム LiCl を添加して培養、③同様に 5 mmol/L の LiCl を添加して培養、④ GM-CSF 及び IL-4 無添加の単球培養。各培地を1回のみ交換し、1週間後に各細胞を EDTA 添加生理食塩水を用いて回収した。

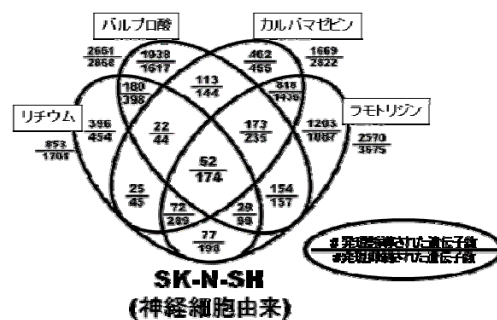
細胞回収後、総 RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、Agilent 2100 Bioanalyzer にてクオリティーを確認後、Human-6 V2 Beadchips (Illumina) を用いて全ゲノムの遺伝子発現を測定した。各プローブの Signal Intensity (信号強度) を Illumina® BeadStudio 3.1 ソフトウェアにて抽出し、Average Normalization を行なった後、GeneSpring GX 10.0 ソフトウェア等にて発

現プロファイルの解析を行った。

4. 研究成果

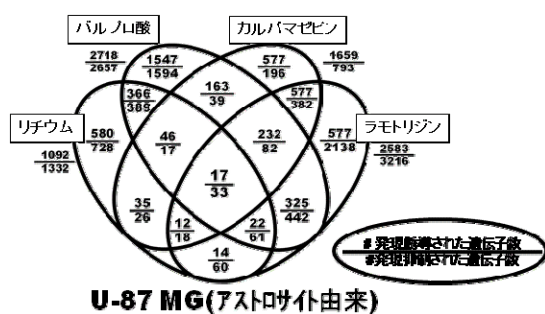
(1) 4 種気分調整薬による脳内細胞遺伝子発現プロファイルへの影響の解析：

ヒト神経細胞由来の SK-N-SH 細胞にリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジン投与した結果、各々853 個、2661 個、1669 個、2570 個の遺伝子が 20%以上発現誘導され、1701 個、2868 個、2822 個、3675 個の遺伝子が 20%以上発現を抑制された。SK-N-SH 細胞において各投与薬剤間で共通して発現が誘導（上段）または抑制（下段）される遺伝子の数を下図に示す。リチウムとバルプロ酸との間に共通して 180 個の遺伝子が誘導、398 個の遺伝子が抑制され、カルバマゼピンとラモトリジンとの間に共通して 810 個の遺伝子が誘導、1436 個の遺伝子が抑制された。これらの薬剤間の共通性は期待値よりも有意に高く、他の薬剤間の組み合わせではこのような高い共通性は認められなかった。4 剤に共通して 52 個の遺伝子が誘導され、174 個の遺伝子が抑制された。

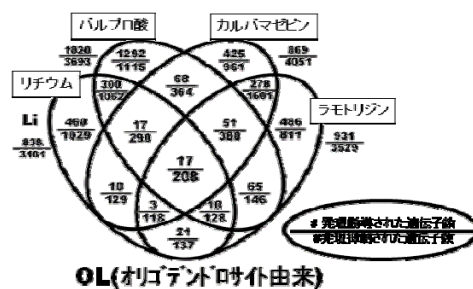


ヒト・アストロサイト由来の UG-87 MG 細胞にリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジン投与した結果、各々1092 個、2718 個、1659 個、2583 個の遺伝子が 20%以上発現誘導され、1332 個、2657 個、793 個、3216 個の遺伝子が 20%以上発現を抑制された。UG-87 MG 細胞において各投与薬剤間で

共通して発現が誘導（上段）または抑制（下段）される遺伝子の数を下図に示す。リチウムとバルプロ酸との間に共通して366個の遺伝子が誘導、389個の遺伝子が抑制され、カルバマゼピンとラモトリジンとの間に共通して577個の遺伝子が誘導、382個の遺伝子が抑制された。これらの薬剤間の共通性は期待値よりも有意に高く、他の薬剤間の組み合わせではこのような高い共通性は認められなかった。4剤に共通して17個の遺伝子が誘導され、33個の遺伝子が抑制された。



ヒト・オリゴデンドロサイト由来の OL 細胞にリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンを投与した結果、各々838個、1820個、869個、931個の遺伝子が20%以上発現誘導され、3101個、3693個、4051個、3529個の遺伝子が20%以上発現を抑制された。SK-N-SH細胞において各投与薬剤間で共通して発現が誘導（上段）または抑制（下段）される遺伝子の数を下図に示す。リチウムとバルプロ酸との間に共通して300個の遺伝子が誘導、1062個の遺伝子が抑制され、カルバマゼピンとラモトリジンとの間に共通して278個の遺伝子が誘導、1601個の遺伝子が抑制された。これらの薬剤間の共通性は期待値よりも有意に高く、他の薬剤間の組み合わせではこのような高い共通性は認められなかった。4剤に共通して17個の遺伝子が誘導され、208個の遺伝子が抑制された。



各気分安定薬投与により発現変化を受ける遺伝子群がどのような機能カテゴリ、細胞分画に属するかを Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) で解析した結果、細胞外基質と連携する細胞膜タンパクで細胞外情報を細胞内に伝達すると一連の機能に関する「細胞間情報交換」「信号伝達機構の活性」「細胞外分画」「細胞外基質」「細胞膜タンパク」「細胞表面受容体関連信号伝達」などのカテゴリに属する遺伝子群が、全細胞種、全気分安定薬に共通して発現変化を受けていた。細胞機能への影響としては「形態形成」「器官形成」「発達」に関わる遺伝子、「免疫反応」に関わる遺伝子群が全細胞種、全気分安定薬に共通して発現変化を受けていた。

今回の研究結果から、気分安定薬4剤のうちリチウムとバルプロ酸は相互に遺伝子発現プロファイルに比較的に類似した及ぼし、また、カルバマゼピンとラモトリジンは相互に比較的に類似した影響を及ぼしていることが分かった。

4種気分安定薬投与により共通に遺伝子発現変化を受ける遺伝子群が属するカテゴリには細胞外基質と連携する細胞膜タンパクで細胞外情報を細胞内に伝達する機能に関するものと、形態・器官の形成、発達に関するものが多く、気分安定薬が細胞外から細胞内に伝わる情報伝達系に関わる遺伝子群の発現調節を調節することで、脳内細胞の構造・機能のフォーメーションを変化させることが、気分安定薬の奏功機序に関わる可

能性を示している。また、免疫反応に関わる遺伝子群も全細胞種、全気分安定薬に共通して発現変化を受けていた。従来の研究から気分安定薬はモノサイト系細胞やミクログリアに影響し、サイトカイン放出能を調節することが知られ、免疫系を介した奏功機序が示唆されているが、今回の研究で神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトにおいても免疫反応に関連する遺伝子発現が大きく変化を受けることは興味深い。

今後、本研究により観察された複数の気分安定薬に共通してみられる神経細胞や各種グリア細胞に特異的に起きる発現変化を受ける遺伝子群の機能を解析し、また、発現変化を引き起こす機序を解明することで、気分安定薬の奏功機序が明らかになり、これらの分子機構を標的とするより合理的な薬剤開発が可能になることが期待される。

(2) リチウムの末梢血単球由来樹状細胞遺伝子発現プロファイルへの影響の解析：
治療域濃度のリチウム投与により 184 個遺伝子の発現度の増加及び 1009 個遺伝子の減少が見られ、このうち 102 個遺伝子及び 564 個遺伝子は用量依存性に变化していた。変動遺伝子のカデコリーを EASE 解析した結果、免疫応答、防御応答、障害応答、外部刺激応答などのカデコリーの遺伝子の発現量が大きく影響を受けていた。これらの遺伝子と中枢神経系細胞と共通な発現変化を認める遺伝子はリチウムの中枢神経への影響を末梢血由来の単球を用いて推定するためのバイオマーカーとして期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① **富田博秋**、田中千秋、兪志前、小松浩、木村好、曾良一郎、Helen B. Kim, William E.

Bunney. 気分安定薬奏功機序解明のための包括的遺伝子発現解析. 臨床薬理の進歩 30, 2009. 査読無

② **富田博秋**. 気分障害の網羅的遺伝子発現解析. 医学のあゆみ. 229(3), 8121-8125, 2009. 査読無

③ **富田博秋**、田中千晶. 精神疾患研究におけるミトコンドリア関連遺伝子の発現変化～病態か、アーチファクトか? 脳と精神の医学. 19(2): 97-106, 2008. 査読無

④ Atz M, Walsh D, Cartagena P, Li J, Evans S, Choudary P, Overman K, Stein R, **Tomita H**, Potkin S, Myers R, Watson SJ, Jones EG, Akil H, Bunney WE Jr, Vawter MP. Methodological considerations for gene expression profiling of human brain. J Neurosci Methods, 163(2), 295-309, 2007. 査読有

⑤ Li JZ, Meng F, Tsavaler L, Evans SJ, Choudary PV, **Tomita H**, Vawter MP, Walsh D, Shokoochi V, Chung T, Bunney WE Jr, Jones EG, Akil H, Watson SJ, Myers RM. Sample matching by inferred agonal stress in gene expression analyses of the brain. BMC Genomics. 8(1): 336 [Epub ahead of print], 2007. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

① 兪志前・田中千晶・小松浩・高橋怜史・木村好・曾良一郎・**富田博秋**. 気分安定薬のアストロサイトにおける遺伝子発現変化の包括的検討. 第 31 回日本生物学的精神医学会. 京都[2009/4/23-25]

② 兪志前, 田中千晶, 小松浩, 木村好, 曾良一郎, **富田博秋**. 気分安定薬リチウムの樹状細胞における遺伝子発現変化の包括的検討. 第 30 回リチウム研究会, 東京 [2009/4/18]

③ Takahashi S, Tanaka C, Yu Z, Kimura K, Sora I, **Tomita H**. Time-dependent

genome-wide gene expression study of neural cells after lithium treatment. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸[2008/12/9-12]

- ④ **Tomita H.** Effect of mood stabilizers on genome-wide gene expression profiles of human CNS-derived cell lines. Symposium “Genome-wide studies of bipolar disorder and mood stabilizaion”. World Congress of Psychiatric Genetics 15th annual meeting, Osaka, Japan. October 11-15, 2008
- ⑤ 兪志前・田中千晶・小松浩・高橋怜史・木村好・**富田博秋**. 双極性障害治療薬の神経細胞およびグリア細胞における遺伝子発現変化の包括的検討 第53回日本人類遺伝学会, 横浜[2008/9/27-30]
- ⑥ Yu Z, Tanaka C, Komatsu H, Takahashi S, Kim HB, Kimura K, Sora I, Bunney WE, **Tomita H.** Microarray gene expression profiles in neuronal and glial cell lines after lithium, valproate, carbamazepine and lamotrigine treatment. World Federation of Societies of Biological Psychiatry 2nd Asia-Pacific Congress, Toyama, Japan. September 11-13, 2008.
- ⑦ 小松浩, 田中千晶, 兪志前, 木村好, 高橋怜, 曾良一郎, 松岡洋夫, **富田博秋**. 気分調整薬がヒト神経由来細胞およびグリア由来細胞の各BDNF転写物バリエーションに及ぼす影響の検討. 第30回日本生物学的精神医学会, 富山 [2008/9/11]
- ⑧ **富田博秋**, 田中千秋, Helen B. Kim, William E. Bunney. 神経細胞およびグリア細胞における遺伝子発現プロファイルへのリチウムの影響. 第31回日本神経科学会, 東京[2008/7/9-11]
- ⑨ **Tomita H.**, Tanaka C, Kim HB, Bunney WE. Neuron- and glia- specific gene expression

profiles after lithium treatment. Collegium internationale neuro-psychopharmacologicum 50th congress, Munich, Germany. July 13-17, 2008

- ⑩ **富田博秋**. ゲノム精神医学の現状と明日～統合失調症・気分障害から消化器心身症まで～ 東三河消化器病懇話会学術講演会, 豊橋[2008/5/10]
- ⑪ **富田博秋**. 気分安定薬～開発と奏効機序研究の歴史と現状～ 第65回石川県神経科精神科医学会 学術講演会, 金沢 [2008/4/10]
- ⑫ **富田博秋**. 気分安定薬は双極性障害に何故効くのか?～基本から最新の研究情報まで～ デパケン双極性障害適応拡大5周年記念講演会, 仙台[2008/2/1]
- ⑬ **Tomita H.**, Tanaka C, Kim HB, Bunney WE. Microarray gene expression profiles in neuronal and glial cell lines after lithium treatment. Society for Neuroscience 37th annual meeting, San Diego CA., USA. November 3-7, 2007

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] 特記すべきことなし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 博秋 (TOMITA HIROAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 90295064

(2)研究分担者 : なし

(3)連携研究者 : なし