

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19591343
 研究課題名（和文）スペクトロスコピー・ゲノミクス：脳代謝物を中間表現型とした統合失調症のゲノム研究
 研究課題名（英文）Spectroscopy Genomics: Exploring an Effect of Single Nucleotide Polymorphism on Brain Metabolites as Intermediate Phenotypes of Schizophrenia
 研究代表者：北村 秀明(KITAMUR HIDEAKI)
 新潟大学・医歯学総合病院・講師
 研究者番号：00361923

研究成果の概要：

MRSにより測定されたグルタミン酸・グルタミン（Glx）とGABAの脳内濃度を統合失調症の中間表現型とみなし、これに影響を与える遺伝子の一塩基変異（SNP）を探索するために、ドパミンD3受容体（DRD3）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューレグリン1（NRG1）の遺伝子の計8つのSNPを調べた。同時に脳局所体積と脳白質拡散異方性も測定した。結果、前部帯状回、後部帯状回、小脳のN-アセチルアスパラギン酸、コリン含有物、Glx、GABA濃度は野生型と非野生型で有意差はなかった。脳局所体積についても同様であった。しかし脳白質の拡散異方性指標fractional anisotropy（FA）については、NRG1遺伝子のSNPの一つrs39249993の非野生型では右前頭連合野白質のFA値が有意に低かった。またこの変異を持つ統合失調症患者の右前頭連合野白質のFA値は、さらに低値であった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：精神神経科学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：統合失調症、脳、核磁気共鳴画像、ゲノム、一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床症候群から中間表現型へ

統合失調症の発症に遺伝が関与することに疑いの余地はないが、いまだ有力な疾患感

受性遺伝子の同定には至っていない。近い将来、より大規模な遺伝子サンプルやより鋭敏な分析技法を用いることでいずれ同定されるであろうとする楽観的見方もある。しかし

遺伝子解析における疾病性の基準である統合失調症という臨床症候群は、精神医学の長い伝統により抽出され100年以上の時間経過に耐えてきたものの、確固たる生物学的指標によって他の症候群と区別されるわけではない。統合失調症は観察可能な臨床症状と経過のみで決定されるいわば症候群であり、しかも身体疾患のような客観的所見や検査成績を参照することはない（診断に役立つ客観的所見や検査成績がない）。このような事情が、統合失調症の発症者および発症していない保因者に共通する真の原因を同定する妨げとなってきた可能性がある。中間表現型を利用した遺伝子研究は、まさにこの疑問に答えうる一つの方法論である。

(2) Spectroscopy Genomics

本研究では、プロトン磁気共鳴スペクトロスコピー法（Proton Magnetic Resonance Spectroscopy; 1H-MRS）による脳代謝物濃度を中間表現型として利用する。超高磁場MRIの普及により最も恩恵をあずかる手法の一つがMRSであることは意外と知られていない。それは静磁場強度にほぼ比例してNMRスペクトルのシグナルノイズ比が上昇するからである。超高磁場MRSによる脳代謝物の定量値は、従来の1.5テスラのそれより格段に信頼性が高いデータとなり、これを中間表現型として利用する優位性は明らかである。MRSを用いて、統合失調症患者と発症していない血縁者では成熟ニューロンのマーカーであるNアセチルアスパラギン酸（N-acetylaspartate; NAA）が大脳皮質・白質、基底核・視床などで減少していることが報告されてきたが、最近では興奮性神経伝達を担うアミノ酸であるグルタミン酸や抑制性神経伝達を担うγアミノ酪酸（GABA）の脳内濃度の変動しているとの報告が相次いでいる。

統合失調症の中間表現型と見なしうるグルタミン酸やGABAの脳内濃度に影響を与えうる遺伝子変異の影響を調べることは、臨床症候群である統合失調症と遺伝子変異の関係をしらべる従来の関連研究を補完するものといえよう。脳の非侵襲的測定値を中間表現型として遺伝子研究と結び付ける実験パラダイムはimaging genomicsとも呼ばれ、健常人においてはこれまで脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor; BDNF）の遺伝子多型（val66met）と記憶課題に対する海馬活動の減少、カテコールメチルトランスフェラーゼ（Catechol O-methyltransferase; COMT）の遺伝多型（val108/158met）と作業記憶課題に対する前頭前野賦活の増大、セロトニントランスポーター（Serotonin Transporter; 5-HTT）のshort alleleと恐怖刺激に対する扁桃体活動の増大などの報告があるが、グルタミン酸やGABAなど測定の難しい脳内アミノ酸と遺伝子研究を組み合わせた、いわばSpectroscopy Genomicsは類がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、3テスラMRI装置によるMRS法を用いて脳内アミノ酸、すなわちグルタミン酸とGABAを定量し、それを統合失調症の中間表現型とみなし、その定量値にプラスあるいはマイナスの影響を与え得る分子の一塩基変異（Single Nucleotide Polymorphism; SNP）を同定することである。候補遺伝子としてドパミンD3受容体（DRD3）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、ニューレグリン1（NRG1）を選択する。DRD3は死後脳研究において、抗精神病薬非服用者の辺縁系において有意に増加しており、またDRD3遺伝子が位置する3q13.3は、日本人統合失調症大家系サンプルを用いた全ゲノム連鎖解析により同定した候補領域内にある。Ser9Glyは

最も良く知られた多型で、Gly/Gly ではドパミンへの親和性が他の遺伝子型よりも高い。BDNF は神経可塑性や記憶の形成に深い関連をもち、val66met 多型の met アレルは BDNF 機能を低下させるといわれる。NRG1 はアイスランド住民の連鎖解析・連鎖不平衡解析により同定された遺伝子で、NMDA 受容体遺伝子の発現・活性への関与が示唆されている。統合失調症の遺伝的ハイリスク者において、rs243177 多型と fMRI による内側前頭前野皮質・側頭後頭連合皮質機能の関連を見出した研究もある。これら先行研究の結果は、DRD3、BDNF、NRG1 の SNP を探索する十分な根拠があることを示している。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

被験者は研究内容について十分な説明を受け、全員が研究参加に対する書面による同意を提出した。51 名の対照正常人は主に社会人で、精神疾患の既往歴、家族歴を有していなかった。12 名の統合失調症患者は新潟大学医歯学総合病院の統合失調症専門外来通院中および精神科病棟に入院中で、DSM-IV-TR の統合失調症診断規準に従い診断確定された。

(2) MRI 装置

新潟大学脳研究所所有の 3 テスラ MRI (General Electric; GE 社)。

(3) 磁気共鳴スペクトロスコーピー (1H-MRS)

MEGA-PRESS シークエンスを用いた。信号局在のための PRESS 法、水抑制のための CHESS 法、スペクトル編集を組合せた MEGA-PRESS では、半数の計測で editing pulse を照射し (A)、もう半数の計測では editing pulse を照射しない (B)。A と B の差分スペクトルにより、N アセチルアスパラギン酸 (NAA)、コリン含有物 (Cho) に加

えて、従来の方法では同定と定量が困難であったグルタミン酸・グルタミン (Glx) と γ アミノ酪酸 (GABA) からの信号も計測できる。関心領域は前部帯状回 (ACC、256 回信号加算)、後部帯状回 (PCC、196 回信号加算)、小脳 (CBLL、196 回信号加算) に定めた。妥当性と信頼性の十分な検討がなされているスペクトル定量ソフトウェアの一つ SA/GE (GE 社) を用いて、クレアチン・クレアチンリン酸 (Cr) に対する相対濃度 (NAA/Cr、Cho/Cr、Glx/Cr、GABA/Cr) を測定した。また研究領域で頻用される LC-Model を用いて、絶対濃度の推定値 (mM) の定量も行った。

(4) 拡散テンソル画像 (Diffusion Tensor Imaging; DTI)

中間表現型としての 1H-MRS の特異性を検討するため、脳白質の微細構造的異常を評価することが可能な DTI を同時に施行した。撮影シーケンスは超高速撮影法であるエコープラナー法を組み込んだスピネコー系の拡散強調画像法を用いた。水分子の自己拡散の程度を画素輝度に反映させるために、相互に異なる方向から傾斜磁場を印加された 6 種類の拡散強調画像と傾斜磁場を印加しない画像から、コンピュータ演算により拡散テンソル画像 (マトリックスサイズ: 256 × 256、スライス厚: 5mm、スライス間隙: 2.5mm 脳梁を含む 5 軸位断) を作成した。異方性拡散の程度を示す fractional anisotropy (FA) を、左右前頭葉白質、左右内包後脚、脳梁膝部の正中部、脳梁膨大部の正中部、左右頭頂葉白質の 8 箇所に関心領域から求めた。

(5) 局所脳体積測定 (Voxel-Based Morphometry; VBM)

中間表現型としての 1H-MRS の特異性を検討するため、局所脳体積の相対的減少を

VBM 法を用いて評価した。撮影シーケンスはグラディエントエコー系の高速撮影 3D-SPGR を用いた。全脳にわたる 1.5mm 冠状断 T1 強調画像を取得し、MatLab 上で駆動するソフトウェア (SPM、VBM tool) を用いて optimized VBM を実施した。

(6) DRD3、BDNF、NRG1 遺伝子の SNP の選択と決定

各被験者の末梢血の白血球分画から DNA を採取し、TaqMan 法を用いて SNP の genotyping を行った。DRD3 (選択した SNP 数: 1、rs 番号: 2630350、変異: Ser9Gly)、BDNF (選択した SNP 数: 1、rs 番号: 6265、変異: val66met)、NRG1 (選択した SNP 数: 6、rs 番号: 108062, 243177, 221533, 241930, 2954041, 3924999)。

4. 研究成果

(1) SNP genotyping

健常人 51 名の DRD3 については野生型が 39 名、非野生型 (Ser/Gly+Gly/Gly) が 12 名、BDNF については野生型が 31 名、非野生型 (Val/Met+Met/Met) が 20 名、NRG1 遺伝子の rs108062 については野生型が 38 名、非野生型が 13 名、NRG1 遺伝子の rs221533 については wild type が 40 名、非野生型が 11 名、NRG1 遺伝子の rs241930 については野生型が 40 名、非野生型が 11 名、NRG1 遺伝子の rs243177 については野生型が 12 名、非野生型が 39 名、NRG1 遺伝子の rs2954041 については野生型が 44 名、非野生型が 7 名、NRG1 遺伝子の rs3924999 については野生型が 29 名、非野生型が 22 名であった。

統合失調症 12 名については、野生型が 9 名、非野生型 (Ser/Gly+Gly/Gly) が 3 名、BDNF については野生型が 7 名、非野生型 (Val/Met+Met/Met) が 5 名、NRG1 遺伝子の rs108062 については野生型が 9 名、非野生型が 3 名、NRG1 遺伝子の rs221533 につ

いては wild type が 10 名、非野生型が 2 名、NRG1 遺伝子の rs241930 については野生型が 9 名、非野生型が 3 名、NRG1 遺伝子の rs243177 については野生型が 3 名、非野生型が 9 名、NRG1 遺伝子の rs2954041 については野生型が 10 名、非野生型が 2 名、NRG1 遺伝子の rs3924999 については野生型が 6 名、非野生型が 6 名であった。

(2) MRS

健常人において、前部帯状回、後部帯状回、小脳に設置された 27cm³ の関心領域から得た N-アセチルアスパラギン酸、コリン含有物、Glx、GABA の定量値は、すべての SNP の野生型と非野生型の 2 群間で有意差を認めなかった。統合失調症患者においても、野生型と非野生型の 2 群間で明らかな差はないようであった。

(3) DTI

健常人において、左右の前頭葉白質、脳梁膝部、内包後脚、脳梁膨大部、左右頭頂葉白質における fractional anisotropy (FA) を算出して 2 群間で比較したところ、NRG1 遺伝子の SNP の一つ rs3924999 の非野生型では右前頭葉白質の FA 値が有意に低かった ($p < 0.05$)。この SNP が前頭葉白質の拡散異方性に影響を与えることが分かったので、統合失調症患者 12 名について調べたところ、この変異を持つ統合失調症患者の右前頭連合野白質の FA 値はさらに低値であることが判明した。

(4) VBM

健常人において、VBM を用いた全脳を対象とした脳局所体積についても、すべての SNP の 2 群間で有意差を認めなかった。統合失調症患者においても、野生型と非野生型の 2 群間で明らかな差はないようであった。

まとめ: 3 テスラ MRS によって測定された脳代謝物濃度に影響を与える DRD3、BDNF、

NRG1のSNPを見出すことはできなかった。しかし拡散テンソル画像法により測定された右前頭葉白質の健常人のFA値は、NRG1遺伝子のrs3924999の非野生型でより低値を示し、統合失調症ではさらに低値であった。これは前頭葉白質の線維構築の統合性に対する遺伝的影響を示唆し、しかもその影響力は統合失調症においてより大きい。ただしrs3924999でのみ統計学的有意差を得たのは、野生型と非野生型の分離比がほぼ均等であるといった統計学的に有利な条件が強く影響したと考える。ゆえに本研究の成果は予備的なものとみなすべきであり、統合失調症のサンプル数をさらに増やして再解析する必要がある。

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 1件)

①Itoh K, Kitamura H, Fujii Y, Nakada T. Neural substrates for visual pattern recognition learning in Igo. Brain Res 1227: 162-173, 2008.

[学会発表] (計 1件)

①Kitamura H, Tamura R, Endo T, et al. Measuring fractal dimension of cerebellum in autism spectrum disorders by magnetic resonance imaging. 2nd World Federation of Societies of Biological Psychiatry. 2008/09/11-13, Toyama, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 秀明 (KITAMURA HIDEAKI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：00361936

(2) 研究分担者

塩入 俊樹 (SHIOIRI TOSHIKI)
岐阜大学・医学部、教授
研究者番号：40235487

渡部雄一郎 (WATANABE YUICHIRO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：90401744