

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791333

研究課題名（和文）自殺者死後脳におけるストレスタンパク質CRFと関連遺伝子の発現変化

研究課題名（英文）Differential expression of CRF and its stress-related genes in the postmortem brains of suicide victims

研究代表者

菱本 明豊（HISHIMOTO AKITOYO）

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50529526

研究成果の概要（和文）：自殺行動の生物学的機序を解明し、自殺予防のための治療モデルを開発する為、我々は自殺者死後脳を用いてストレス関連遺伝子を中心に網羅的発現解析を行った。CRF関連遺伝子群では健常対照群との有意差は認めなかったが神経栄養因子BDNF、統合失調症関連遺伝子DISC1の有意な低下を同定した。そこで対象に統合失調症も含め一塩基多型を用いた関連解析を行い、DISC1、EP1で関連を同定した。これらの知見より自殺行動の新たなバイオマーカーとなる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We explored the differential expression of stress-related genes in the postmortem brains of suicide victims and conducted genetic associations of the candidate genes of suicide and schizophrenia. Although we found no evidence of expression difference of stress-related genes such as CRH, we found significant reduced expression of BDNF and DISC1 immunoreactivity in the suicide victims. In addition, we found significant genetic association of DISC1 and EP1 with suicide and schizophrenia. Our findings suggest that suicidal behavior is involved in the genetic vulnerability and that certain polymorphisms might be useful for a biomarker of suicidal behavior.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：臨床精神分子遺伝学

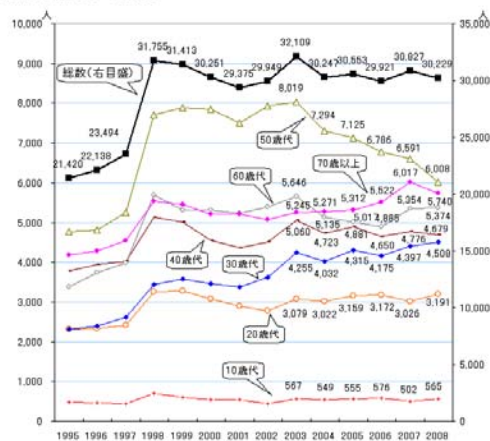
1. 研究開始当初の背景

平成20年の警察統計によれば、本邦では平成10年度以降10年連続で年間自殺者が3万人（平成19年度33,093人）を超えている。交通事故犠牲者が同時期において年々減少し、平成19年度5,744名と比べると実に6倍近くに達しており、大きな社会問題となっている。自殺のリスクは65歳以上の高齢者層で

最も高く、今後さらなる高齢者社会を迎えるにあたり、深刻な問題であり続けることが予想される（下図）。自殺のもたらす影響は個人にとどまらず、家族や社会が受ける有形無形の損失は大きく、自殺予防は急務の課題となっている。わが国においては、こうした背景から2006年6月に「自殺対策基本法」が成立し、2007年7月に「自殺総合対策大綱」が

閣議決定し、国家をあげた対策が講じられている。自殺に対する取り組みは様々な方面からなされているが、自殺者の9割でなんらかの精神医学的問題があるといわれており、精神医学的介入が大きな効果をもたらすと考えられる。自殺は心理社会的要因を含んだ複雑な行動形式の障害と考えられるが、自殺にいたる脆弱性には生物学的基盤が存在しており、家族研究、双生児研究等から遺伝要因が関与していることが示されている。

年齢別自殺者数の年次推移



(注) 年齢不詳があるため年齢別の合計が必ずしも総数に一致しない。08年推定。
(資料) 人口動態統計

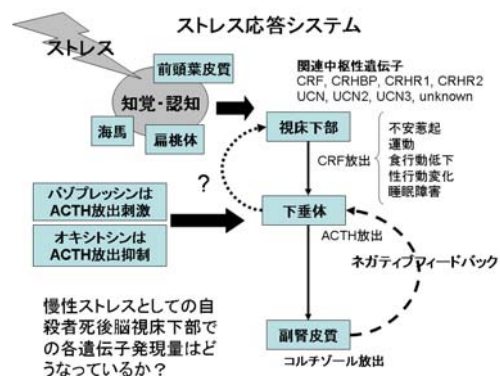
疾患で見た場合、自殺はうつ病との関連が強く示唆されている。うつ病は選択的セロトニン阻害剤 (SSRI) の開発に代表される治療法の進歩により、短期的には病状の改善が見込まれるようになり、また精神科受診への関も低くなった。しかし、自殺者数は減少していないという事実がある。これは自殺者が精神科などの専門機関に受診せず (自殺者の10%程度しか精神科医の診察を受けていないという報告がある)、むしろ身体症状などを訴えて内科などプライマリケア医の診察を受けていることが一因である。このことからプライマリケア医であっても自殺リスクを簡便に推し量ることができるバイオマーカーの開発が急務であり、そのためには自殺の生物学的基盤を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

自殺者に見られる生物学的所見で最も一致したものとして、脳内セロトニン神経系の低活性がある。我々はこれまでセロトニン神経伝達に関わる主要遺伝子と、自殺との関連解析を行ってきたが、個々の遺伝子との直接の相関は見出せなかった (Mouri K and Hishimoto A, et al. 2009)。自殺者における脳内のセロトニン神経系の低活性は、遺伝要因ではなく状態依存性に変化するものと考えられた。

自殺のもう一つの指標にHPA系 (視床下

部-下垂体-副腎皮質系) の機能亢進が示唆されており、このHPA系の反応性は動物実験から一部は遺伝的に決定されていると考えられている。HPA系機能異常 (副腎皮質ホルモン分泌過剰、分泌リズムの異常、デキサメザン抑制テストでの非抑制、種々の負荷テストに対するコルチゾールの異常反応等) は個人のストレス応答の指標、うつ病の治療反応性、転帰等の指標として精力的に調べられてきた。しかし自殺の生物学的研究においてHPA系を制御する遺伝子研究は少ない。我々は過去に生体のストレス応答に関係するレニン-アンジオテンシン系を制御しているアンジオテンシン転換酵素 (ACE) の機能的 insertion/deletion 多型と自殺で有意な相関を見出した (Hishimoto A, et al. 2006)。またHPA系を視床下部レベルで間接的に制御している脳内エンドルフィン受容体であるオピオイド受容体のアミノ酸置換を伴う多型と自殺との相関を見出した (Hishimoto A, et al. 2008)。最近ではストレス応答を遺伝的に制御するFKBP5遺伝子のハプロタイプと自殺の相関を見出した (Hishimoto A, et al. 2011)。今回はさらにこの自殺とHPA系の関連を探る研究を推し進め、ストレス応答に対してHPA系亢進を引き起こす際の中心的な役割を果たすCRFを制御する遺伝子群に着目し、自殺との関連解析・発現解析を行う。さらに自殺者死後脳・対照群を用いてDNAチップによる網羅的mRNA発現解析を試み、慢性ストレス下における未知のCRF制御蛋白を同定する。



3. 研究の方法

自殺既遂者死後脳における mRNA/免疫定量

(1) CRF (corticotrophin-releasin factor) 遺伝子や関連遺伝子群について、自殺既遂者の死後脳を用いて、遺伝子特異のタックマンプローブを作成し、real-time PCR法にて mRNA 発現を測定する。また Western Blotting 法により同遺伝子群の免疫定量を行い、自殺

既遂者特異的発現変化を検討する。加えて、これらの発現変化がうつ病罹患による変化を影響しているかサブカテゴリーでの比較検討を行う。

(2) 自殺感受性遺伝子と統合失調症感受性遺伝子における多型を用いた相関研究

自殺既遂者 400 名、統合失調症 500 名、正常対照者各 500 名分について、それぞれの血液サンプルからヨウ化カリウム法を用いて DNA を抽出し、-20 度で保存。CRF 遺伝子群に関して、同遺伝子内に存在する機能的と推測されるアミノ酸置換を伴う多型、および発現に変化を与える可能性をもつプロモーター領域に存在する多型について、上記血液サンプルを用いて相関解析を行い、この遺伝子と自殺との相関の可能性を検討する。さらにその他の候補遺伝子

(BDNF, DISC1, EP1, IL1B, cell adhesion molecule-related genes) についても遺伝子関連解析、発現解析を行った。具体的には、Hapmap データを含めた既報告の同遺伝子内およびプロモーター領域内の多型を選出し、各々の多型に関して Taqman 法および PCR-RFLP 法により遺伝子多型解析を行う。結果、自殺既遂者群と正常対照群について多型頻度の分布を比較検討する。統合失調症サンプルについても同様の解析を行った。

4. 研究成果

(1) CRF 遺伝子とその関連遺伝子解析

CRF と関連する遺伝子群 (CRF, CRHB, CRHR1, CRHR2, UCN1 (ウロコルチン), UCN2, UCN3, バズプレッシンとその受容体、オキシトシンとその受容体) の mRNA をリアルタイム PCR 法にて測定した。またウェスタンブロッティング法により各蛋白質発現量も測定し、二群間での差を測定した。さらにプロモーター領域の遺伝子変異をデータベースから網羅的に調べ、機能的一塩基多型 (SNP) やタグ SNP を選別、タイピングし、機能的ハプロタイプを同定して自殺者との関連解析を行った。現時点で各遺伝子において健常者と対照群において有意な差や相関を認めていない。問題点として自殺者死後脳サンプルの死後時間や pH 変化が遺伝子 mRNA、蛋白質発現量に大きな影響を及ぼしていることが分かった。加えてサンプル数の少なさも問題点として挙げられた。

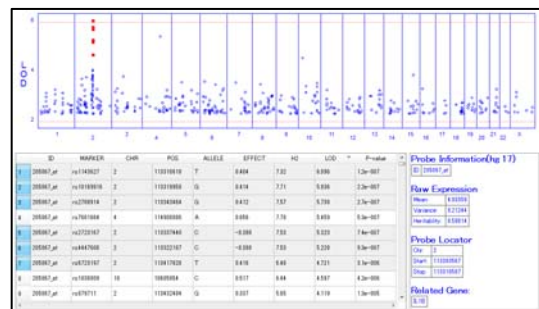
(2) プロスタノイド情報伝達系遺伝子解析

HPA 系を制御するその他の遺伝子群として、プロスタノイド情報伝達系 (PGE2-EP1 受容体カスケードに着目し、EP1 遺伝子と自

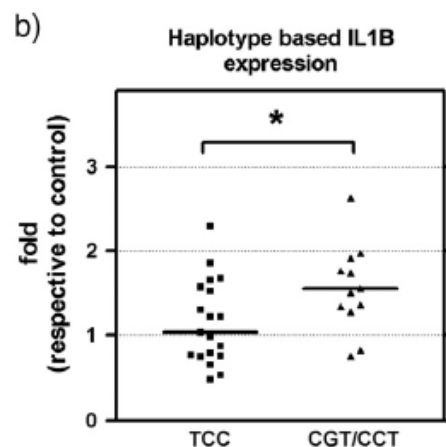
殺の関連解析を行った。特に 35 歳未満の女性自殺者で EP1 遺伝子 SNP (rs10416818) と有意な関連を同定した ($P = 0.0007$)。EP1 はプロスタグランジン (PG) E2 の受容体である。PGE2-EP1 受容体カスケードをはじめとするプロスタノイド系は免疫系のみならず神経系における役割が分かってきた。EP1 欠損マウスでは心理ストレス下においてドパミン放出を介して衝動性亢進が見られ、我々の自殺の関連研究とも合わせて自殺行動の有望な候補遺伝子、神経パスウェイである可能性がある。

(3) インターロイキン 1β 遺伝子解析

妊娠中の母親がインフルエンザなどの感染症を起こすと生まれてきた子供に統合失調症を始めとする精神疾患にり患しやすいことが知られている。胎児の神経発達に炎症性サイトカインが何らかの影響を及ぼしていると考えられている。我々は IL1B 遺伝子の、特にプロモーター領域にある eQTL-SNP (mRNA 発現に影響する一塩基多型) を同定し、それらと自殺者・統合失調症との関連研究を行った。(下図は eQTL-SNPs 赤点)



自殺との有意な関連は認めなかったが統合失調症と有意な関連を認めた。特にハプロタイプ解析により末梢血 IL1B-mRNA レベルが統合失調症と有意に関連した特定のハプロタイプと有意に関連していることを示し、末梢血でのバイオマーカーになる可能性を示した (下図)。



IL1B 遺伝子解析結果

Haplotype	Schizophrenia	Controls	χ^2	p Value*	Global p values	OR (95% CI)
1st set:			7.842	0.006	$\chi^2 = 32.25$	0.79 (0.67-0.93)
SCZ, n = 528	TCGCT	0.307	0.339	0.096	0.759	1.00 (0.97-1.03)
CTL, n = 708	TGCGT	0.302	0.332	0.096	0.759	1.00 (0.97-1.03)
	TCGCC	0.043	0.046	0.123	0.719	0.93 (0.87-1.07)
	TGCGC	0.053	0.057	0.236	0.625	2.27 (1.96-2.66)
	CGGCT	0.024	0.024	0.200	0.660	5.71 (2.97-10.6)
2nd set:			2.863	0.230	$\chi^2 = 5.34$	0.87 (0.77-1.00)
SCZ, n = 576	TCGCT	0.327	0.315	0.256	0.726	1.00 (0.97-1.03)
CTL, n = 708	TGCGT	0.304	0.322	0.019	1.000	1.02 (0.97-1.11)
	TCGCC	0.044	0.051	0.062	0.809	0.81 (0.67-1.0)
	TCGTC	0.019	0.028	0.078	0.717	2.47 (1.82-3.32)*
	TCGCT	0.461	0.453	0.629	0.429	0.85 (0.76-0.94)*
SCZ, n = 1194	TCGCT	0.343	0.322	2.312	0.126	1.10 (0.98-1.24)
CTL, n = 1477	TGCGT	0.303	0.309	0.260	0.610	1.04 (0.97-1.11)
	TCGCC	0.043	0.047	0.300	0.578	0.92 (0.79-1.0)
	TCGTC	0.021	0.030	0.154	0.693	2.87 (1.97-4.39)*
	CGGCT	0.017	0.026	0.155	0.694	2.88 (1.97-4.39)*

* This column shows corrected P values for multiple testing (for 10,000 permutations).

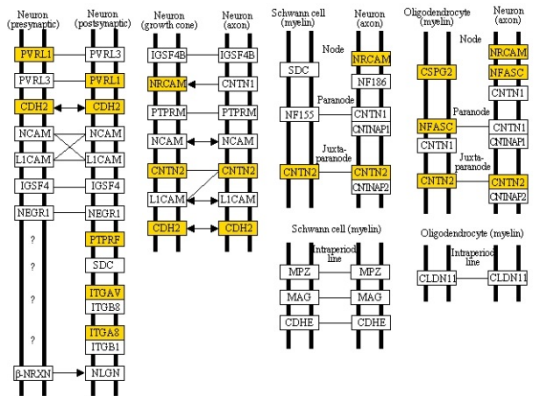
* The normally z value was 0.01.

(4) 神経細胞接着因子と統合失調症・自殺の関連解析

神経細胞接着因子は中枢神経発達に重要な役割を果たしていると考えられており、統合失調症をはじめ精神疾患の病態に関与すると考えられている。最近のゲノムワイド関連研究においても有意な関連を示す SNPs が神経細胞接着因子関連遺伝子領域に集積することが分かってきた。

我々はKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) を網羅的に探索し細胞接着因子遺伝子上のアミノ酸置換を伴う機能的多型を同定しそれらと統合失調症・自殺との関連研究を行った。

(<http://www.kegg.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04514.html>).



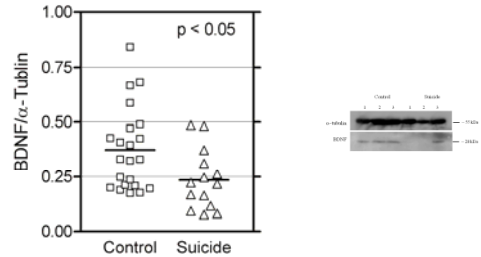
我々は 15 個のミスセンス多型を同定し、そのうち、ITGA8 遺伝子上の rs2298033 多型が

Combined	rs2298033	CON	0.266	0.499	0.235	0.515	0.485	1.000	0.666	0.668	1.028	0.058
NFASC	SCZ	0.250	0.517	0.233	0.509	0.491	0.425	0.855	0.916	1.005	(0.906-1.160)	
	CTL	0.268	0.509	0.239	0.519	0.481	0.848	0.951	0.916	1.005		
female	CON	0.244	0.497	0.208	0.518	0.482	0.136	0.565	0.561	1.056	(0.844-1.197)	
	SCZ	0.264	0.495	0.241	0.511	0.489	0.829	0.565	0.561	1.056	(0.880-1.266)	
ITGA8	CON	0.766	0.211	0.014	0.876	0.124	0.645	0.0632	0.0635	0.767	(0.667-0.877)	0.541
	SCZ	0.812	0.181	0.008	0.902	0.098	0.575	0.276	0.284	0.873	(0.680-1.120)	
male	CON	0.779	0.214	0.007	0.886	0.114	0.212	0.0624	0.0625	0.674	(0.521-0.871)	
	SCZ	0.807	0.183	0.010	0.899	0.101	1.000	0.0624	0.0625	0.674	(0.521-0.871)	
female	CON	0.753	0.238	0.030	0.866	0.134	0.785	0.0624	0.0625	0.674	(0.521-0.871)	
	SCZ	0.817	0.178	0.005	0.906	0.094	0.518	0.0624	0.0625	0.674	(0.521-0.871)	

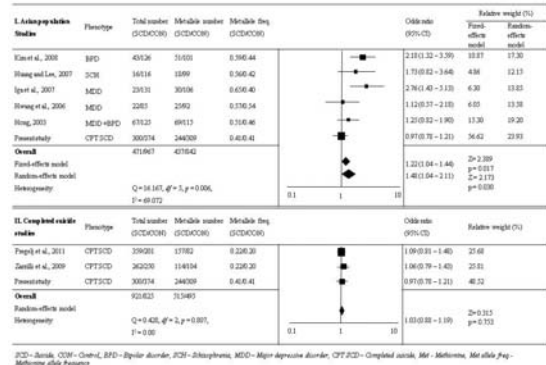
統合失調症の女性群と有意な関連があることを見出した(上図)。ITGA8 遺伝子はインテグリン α 8 サブユニットをコードしており細胞外マトリックスと結合する細胞接着受容体である。神経発達過程、特に皮質の神経発達に重要な働きをすることが知られている。統合失調症の病態機序には性差があり、ITGA8 は女性の統合失調症の病態機序に遺伝的に関与していることが考えられた。

(5) BDNF 遺伝子と自殺の関連解析

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は統合失調症・双極性障害・うつ病・自殺の病態機序に関与することが知られている。我々は自殺者死後脳と健常対照群との比較によって自殺者で BDNF の発現が有意に低下していることを確認した。

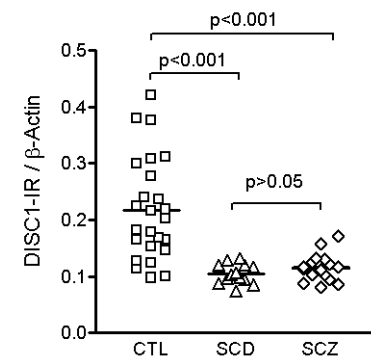


我々のサンプルを用いた関連研究では有意な関連を認めなかったが、これまでに発表されたサンプルを統合したメタ解析を行い Val66Met SNP が自殺で有意に関連していることを見出した。BDNF が自殺の病因に遺伝的に関与することを示しており Met アレルが危険因子であることから自殺企図の危険性が高い患者における BDNF の Val66Met 多型の同定は自殺予防の観点から臨床的にも意味のあることがあることが示す。



(6) DISC1 遺伝子と自殺・統合失調症

我々は自殺者死後脳と健常対照群との比較によって自殺者・統合失調症で DISC1 の発現が有意に低下していることを確認した。



DISC1 遺伝子と統合失調症・自殺の遺伝的関連は現在解析中である。

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9件)

(1) Ratta-apha W, Hishimoto A (correspondent), Yoshida M, Ueno Y, Asano M, Shirakawa O, Sora I. Association study of BDNF with completed suicide in the Japanese population. Psychiatry Research (掲載確定). 査読有

(2) 白岩恭一, 田中究, 大本暢子, 平井みどり, 菱本明豊. 一般身体科領域において投与されたMirtazapineの後方視的調査—せん妄との関連を中心に— 精神医学 (印刷中) 査読有

(3) Supriyanto I, Watanabe Y, Mouri K, Shiroiwa K, Ratta-Apha W, Yoshida M, Tamiya G, Sasada T, Eguchi N, Okazaki K, Shirakawa O, Someya T, Hishimoto A (correspondent). A missense mutation in the ITGA8 gene, a cell adhesion molecule gene, is associated with schizophrenia in Japanese female patients. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013Jan10;40:347-52. 査読有 doi:10.1016/j.pnpbp.2012.11.002.

(4) 全般性不安障害を合併した大うつ病性障害にエシタロプラムの付加療法が著効した一例; 菱本明豊, 荒賀哲也, 田中究. 臨床精神薬理誌Vol.16 No.2, 237-243, 2013. 査読有

(5) Ishiguro H, Hall FS, Horiuchi Y, Sakurai T, Hishimoto A, Grumet M, Uhl GR, Onaivi ES, Arinami T. NrCAM-regulating neural systems and addiction-related behaviors. Addict Biol. 2012 Jul 11. doi: 10.1111/j.1369-1600.2012.00469.x. [Epub ahead of print] 査読有

(6) Yoshida M, Shiroiwa K, Mouri K, Ishiguro H, Supriyanto I, Ratta-Apha W, Eguchi N, Okazaki S, Sasada T, Fukutake M, Hashimoto T, Inada T, Arinami T, Shirakawa O, Hishimoto A (correspondent). Haplotypes in the expression quantitative trait locus of interleukin-1 β gene are associated with schizophrenia. 査読有

Schizophr Res. 2012 Sep;140(1-3):185-91. doi: 10.1016/j.schres.2012.06.031.

(7) Ishiguro H, Hall FS, Horiuchi Y, Sakurai T, Hishimoto A, Grumet M, Uhl GR, Onaivi ES, Arinami T. NrCAM-regulating neural systems and addiction-related behaviors. Addict Biol. 2012 Jul 11. 査読有 doi: 10.1111/j.1369-1600.2012.00469.x.

(8) Sasai K, Tanaka K, Hishimoto A (correspondent). Alexithymia and its relationships with eating behavior, self esteem, and body esteem in college women. 査読有 Kobe J Med Sci. 2011 Mar 10;56(6):E231-8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937871

(9) Cui H, Supriyanto I, Sasada T, Shiroiwa K, Fukutake M, Shirakawa O, Asano M, Ueno Y, Nagasaki Y, Hishimoto A (correspondent). Association study of EP1 gene polymorphisms with suicide completers in the Japanese population. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2011 Jun 1;35(4):1108-11. 査読有 doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.03.010.

[学会発表] (計4件)

(1) Yoshida M, Mouri K, Hishimoto A. Haplotypes in the expression quantitative trait locus of interleukin-1 β gene are associated with schizophrenia. ASHG. 2012.11.6-10. (San Francisco).

(2) Hishimoto A. ALCOHOL AND ALDEHYDE DEHYDROGENASE POLYMORPHISMS AND RISK FOR SUICIDE. ISBRA.2012.7.9-11 (Hokkaido).

(3) Hishimoto A. The Use of Aripiprazole in Serotonin Reuptake Inhibitor Resistant Obsessive-Compulsive Disorder: A Naturalistic, Retrospective Case Study for 24 Patients. CINP annual meeting 2012.6.5-9 (Stockholm).

(4) Hishimoto A. Association study of EP1 gene polymorphisms with suicide completers in the Japanese population, 10th World Congress of Biological Psychiatry, 2011.5.6. (Prague).

〔図書〕(計2件)

(1) 精神疾患診断のための脳形態・機能検査法(三國雅彦・福田正人・功刀浩:編著)「自殺のバイオマーカー」西口直希, 菱本明豊, 白川治, 新興医学出版社. 2012. 350p.

(2) 『専門医のための精神科臨床リュミエール29』自殺予防の基本戦略(張賢徳編)「自殺の生物学的知見」; 福武将映, 菱本明豊, 白川治. 中山書店, 2011. 300p

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/psyneu/newfolder1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱本 明豊 (HISHIMOTO AKITOYO)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号: 50529526

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし