

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：82644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461722

研究課題名(和文) 精神神経疾患におけるクロモグラニンの機能の解明

研究課題名(英文) The functional analysis of Chromogranin in the neuropsychiatric diseases

研究代表者

飯嶋 良味 (Iijima, Yoshimi)

公益財団法人神経研究所・研究部・研究員

研究者番号：70574648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：私は、これまでの研究によりクロモグラニンB遺伝子(CHGB)のアミノ酸置換を伴う変異が、統合失調症を初めとする精神疾患と有意に関連することを報告した。さらにCHGBは、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)において、異常凝集タンパクと共存し、病態の進展と増悪に関与することが示唆されている。本研究では、chgb-KOマウスの行動解析、ALSモデルマウスにおけるchgbの役割の検討、CHGBの遺伝子型におけるストレス反応性の個人差の検討、について実験を行った。

研究成果の概要(英文)：In our previous genome-wide association studies, a significant association with schizophrenia was observed at the chromogranin B (CHGB) gene locus. CHGB is a widespread family of proteins in the neurosystem, whose function is guiding the sorting and secretion of neuropeptides. In this study, I performed analyses as follows: The behavioral analyses of chgb-KO mice, The functional analyses of CHGB in the amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using genetically modified mice, The relationship between psychological stress symptoms and the gene variation of CHGB.

研究分野：精神神経化学

キーワード：バイオストレスマーカー 統合失調症 筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

機能性精神疾患の一つである統合失調症は、人口の約 1%を占める重症の精神疾患で、日本国内の全科入院患者の約 15%を占め、その社会経済的影響は計り知れない。統合失調症や双極性障害などの機能性精神疾患は、多因子性の症候群であり、家族集積性が高く、民族・国を超えて生涯罹患率(約 1%)が一致していることから、環境要因のみならず遺伝要因が強く関与することが古くから示されている。統合失調症には多くの遺伝子変異が関与していることが明らかになっているが、病態の生物学的指標がないため分子メカニズムの解明や、発症機序とのかかわりの解明は困難なものがほとんどである。

私は、統合失調症の発症脆弱性に関連する遺伝子座位を同定する目的で、DNA マーカーを用いた症例・対照群の比較によるゲノムスキャンを行った。その結果、20 番染色体上のマーカー D20S95 において統合失調症との有意な関連を見いだした。最も近傍に存在する遺伝子はクロモグラニン B (Chromogranin B; *CHGB*)であった。さらに以下のことを明らかにした。

(1) *CHGB* の変異検索および関連解析：統合失調症患者 24 名を用いて、*CHGB* の転写開始点上流 2000bp と各エクソン領域について、PCR ダイレクトシーケンシング法により遺伝子変異の検索を行った。その結果、合計 22 個の遺伝子多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP)を同定し、9 個はアミノ酸置換を伴うものであった。*CHGB* より同定した 22 個の SNP のうち、5'側調節領域の 5 個の SNP と、エクソン 4 内に存在する 11 個の SNP について、統合失調症患者 192 名と健常対照者 192 名を用いて関連解析を行った。その結果、1058G/C 多型、1104A/G 多型、1250G/A 多型においてアレル頻度、遺伝子型頻度共に症例対照間で有意な差が得られた。このことから、*CHGB* は統合失調症の病態生理や発症脆弱性に何らかの影響を及ぼす重要な遺伝子であることが示唆された (Lijima Y, et al., Biol Psychiatry, 2004)。さらに、統合失調症における各種臨床症状と *CHGB* 多型の影響を検討したところ、抗精神病薬投与初期における錐体外路症状発症群、若年発症群、初回エピソード時に解体の症状がみられた群において、健常対照者群との間でアレル頻度に有意な差が見られた。この結果は、*CHGB* が統合失調症の危険因子であるのみならず、各種臨床症状に影響を及ぼすタンパクである可能性を示唆するものである。

(2) 覚醒剤依存、精神病における *CHGB* の関連解析：依存性精神疾患における精神病症状の発症パターンやその治療反応性の違いには、遺伝的要因の深く関わっていることが示されている。精神病症状の発症と密接に関わるカテコールアミンの分泌に関与している

クロモグラニンは、覚醒剤依存症・精神病の病態生理や発症脆弱性に関連する有力な候補遺伝子の一つと考えられる。そこで、*CHGB* と、統合失調症と類似の精神病症状が認められる覚醒剤精神病患者との関連を検討した。対象は、Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse (JGIDA)の各サンプル収集施設において収集された覚醒剤依存症患者 185 名と健常対照者 267 名で、*CHGB* Exon 4 に位置する 11 個の多型について検討を行った結果、疾患と有意に関連するハプロタイプを見いだした。さらに症例群を臨床症状別に分け検討したところ、精神病症状発症までの期間と関連する SNP が存在した。このことから、覚醒剤使用者における精神病症状発症の機序において、*CHGB* が何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された (第 27 回日本生物学的精神医学会年会 Outstanding Paper Award 2005, The 20th Congress of Korean Society of Biological Psychiatry Young Scientist Award 2005)。

(3) *CHGB* 多型とヒトの認知機能との関連解析：統合失調症をはじめとする精神疾患患者において、記憶・学習能力、および知能指数 IQ (intelligence quotient) の低下が観察される。ヒトの高度な脳機能であり、精神疾患のエンドフェノタイプとして注目されている認知機能 (記憶・知能) と、*CHGB* 多型との関連を検討した。健常被験者について神経心理学的検査試行と *CHGB* の SNP タイピングを行った。用いた検査は Wisconsin Card Sorting Test (WCST), Wechsler Memory Scale, revised version (WMS-R) および Wechsler Adult Intelligence Scale, revised (WAIS-R) である。さらに人格特性の評価として Temperament and Character Inventory (TCI) および SPQ (scale for the assessment of schizotypal personality) を用いた。*CHGB* 上流域に存在する 2 SNP について、各種検査結果のスコアとの共分散分析を行ったところ、言語性記憶および人格特性のうち新規性追求との関連傾向がみられた。

(4) 統合失調症患者末梢 B リンパ芽球における発現解析：統合失調症患者末梢 B リンパ球を EB ウイルスにより不死化させ、網羅的遺伝子発現解析を行った。統合失調症患者 15 名と、年齢性別をマッチさせた健常対照者 15 名の実験および解析を行い、さらに 2nd set として統合失調症患者 15 名と健常対照者 15 名の実験および解析を行った。統合失調症患者と健常対照者間にクロモグラニン B の有意な発現の差は認められなかった。

クロモグラニンファミリー (A, B, C) は、内分泌細胞および神経細胞に広く分布する酸性可溶性タンパク質で、ホルモンや神経伝達物質とともに分泌顆粒中に蓄えられ、trans-Golgi network における分泌タンパク

の凝集(Taupenot et al., 2003)と分泌顆粒の新生に關与している(Kim et al., 2001)。さらにホルモンやニューロペプチドの分泌(放出)の調整を行っていると考えられており、中枢神経系においては、ドーパミンの神経終末からの放出がクロモグラニンによって抑制されるという報告もある(Brudzybski et al., 1994)。このため、クロモグラニンの機能不全によってシナプスの機能不全を生じ、結果として精神疾患の発症に至る可能性が想定される。また、クロモグラニンはミクログリアを活性化し、サイトトキシンの放出を促進することで、神経毒性作用を有することが知られており(Taupenot et al., 1996; Taylor et al., 2002)、アルツハイマー病の老人班(Lechner T et al., 2003)、Lewy 小体症の Lewy body および Pick 病の風船細胞(Yasuhara et al., 1994)において異常凝集タンパクと共存することが報告されている。さらにクロモグラニン A、B が、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因となるスーパーオキシドジスムターゼ 1(SOD1)の変異型タンパクに結合し、細胞外分泌を介した運動ニューロン死を促進することが示された(Urushitani et al., 2006)。このときクロモグラニンは、変異型 SOD1 タンパクにのみ結合し、野生型 SOD1 との結合を示さなかったことから、クロモグラニンは、ミスホールディング等による異常タンパクの細胞外への分泌(または排出)に關与する可能性が示された。

2. 研究の目的

私の研究を含め、クロモグラニン B は精神疾患、神経疾患の病態に關わっている可能性が高い上、頻度の高いアミノ酸変化を伴う変異が多く存在していることから、その変異には進化的にも意味のある分子である。自然に存在している変異の精神、神経疾患に対する分子メカニズムを解析し、これらの疾患に対する個別化医療に役立つ情報を得る。さらに、異常凝集タンパクが觀察される ALS 等の神経変性疾患において、異常タンパクを選択的に放出するクロモグラニンの役割を解明することで、新しい治療法の可能性が示されると考える。

3. 研究の方法

(1) *chgb-KO* マウスの解析: *chgb-KO* マウスは、膵島においてインシュリン分泌阻害を示し 2 型糖尿病様の症状を持ち、統合失調症患者は 2 型糖尿病に罹患しやすいことが知られている。これまで、精神神経学的異常の検討はなされていないため、行動学的解析を行い同遺伝子の精神神経系への影響を検討する。行う解析は、自発的運動量の測定、新規探索テスト、社会性行動テスト、プレパルスインヒビションテスト、zero 迷路、強制水泳テスト等である。

(2) 異常タンパク病としての神経変性疾患

における *Chgb* の役割の検討: ALS モデルマウスとして確立されているヒト変異型 *SOD1-Tg* マウスと *chgb-KO* マウスとの交配実験を行い、*SOD1-Tg* × *chgb-KO* 遺伝子型個体について組織や行動の変化を解析し、ALS 症状が改善されるかを検討する。

(3) CHGB の遺伝子型と発現量との関連、およびストレス反応性の個人差の検討: ストレス付加により、唾液中および血中のクロモグラニン A、カテコールアミンおよびコルチゾール濃度が上昇することが知られているが、クロモグラニンは、身体的ストレスよりも精神的ストレスにより鋭敏に反応するといわれている。クロモグラニン B もクロモグラニン A とともに放出されているが、ストレスマーカーとしての知見はない。精神疾患患者群および一般被験者に対して、ストレス反応性に対する質問紙を採血と共に施行し、各自のストレス状況、コーピング処方の評価を行う。評価は、HSCL (Hopkins Symptom Checklist) および WCCL コーピングスケールを用いて行う。血漿サンプルについてはエンザイムイムノアッセイ (EIA) 法によりクロモグラニン B タンパクの定量を行い、個人の精神的ストレス反応性、およびコーピング処方について、クロモグラニン量や遺伝子型による違いが見られるかを検討する。

4. 研究成果

(1) *chgb-KO* マウスの解析: *chgb-KO* マウスは、海外研究機関より譲渡を受け、繁殖を行った。*chgb-KO* 個体とコントロールマウスを比較し、外観、繁殖能、寿命等の差は見られなかった。*chgb-KO* マウスの精神神経行動学的解析を行い、同遺伝子の精神神経系への影響を検討した。行った解析は、自発的運動量の測定、PPI テスト、zero 迷路である。解析の結果、PPI テストにおいては *chgb-KO* 個体において変化が認められたが、個体数を増やし再解析を行ったところ、いずれのテストにおいても、有意差には至らなかった。

(2) 異常タンパク病としての神経変性疾患における *Chgb* の役割の検討: ヒト変異型 *SOD1-Tg* 雄マウスと、*chgb-KO* 雌マウスとの交配を進め、ヒト変異型 *SOD1-Tg (+)/chgb(+,-)* 雄個体、およびコントロールとして、変異のないヒト *SOD1-Tg (+)/chgb(+,-)* を用意した。運動能力と平衡感覚を測定するため、Rotalod テストを施行し、合わせて後肢伸長反応テストを行った。生存日数については、*chgb-KO* 個体において長くなる傾向が見られた。解析の結果いずれの項目についても *chgb-KO* 個体において改善傾向が見られたが、有意差までは至らなかった。

(3) CHGB の遺伝子型と発現量との関連、およびストレス反応性の個人差の検討: 統合失調症患者および一般被験者に対してストレス

反応性に 関する質問紙を採血と共に施行し、各自のストレス状況、コーピング処 方の評価を行った。評価は、HSCL および WCCL コーピングスケールを用いた。血漿サンプルについてはEIA 法によりクロモグラニン A および B タンパクの定量を行った。血中 CHGB 濃度は統合失調症の男性で特に 高かった。また、ストレスとの関係では、心身症状、対人関係過敏症、抑うつ症状の点数が高いほど、血中 CHGB が高かった。また CHGA タンパクにおいては、望ましいコーピングスキルの点数高値群において濃 度が低い傾向が見られた。

なお、本研究は全て当該施設の倫理委員会による承認のもと実施した。

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 3 件)

Choi Y, Miura M, Nakata Y, Sugawara T, Nissato S, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Kawakami Y, Shimano H, Iijima Y, Tanaka K, Kuno S, Allu PK, Mahapatra NR, Maeda S, Takekoshi K. A common genetic variant of the chromogranin A-derived peptide catestatin is associated with atherogenesis and hypertension in a Japanese population. *Endocr J*. 2015;62(9):797-804. doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0471. Epub 2015 Jul 25. 査読有。

Watanabe Y, Iijima Y, Egawa J, Nunokawa A, Kaneko N, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N, Kunugi H, Itokawa M, Sasaki T, Ozaki N, Hashimoto R, Shibuya M, Igeta H, Someya T. Replication in a Japanese population that a MIR30E gene variation is associated with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2013 Nov;150(2-3):596-7. doi: 10.1016/j.schres.2013.08.028. Epub 2013 Sep 8. 査読有。

Horiuchi Y, Ishikawa M, Kaito N, Iijima Y, Tanabe Y, Ishiguro H, Arinami T. Experimental evidence for the involvement of PDLIM5 in mood disorders in hetero knockout mice. *PLoS One*. 2013 Apr 8;8(4):e59320. doi: 10.1371/journal.pone.0059320. Print 2013. 査読有。

[学会発表] (計 2 件)

布川綾子、渡部雄一郎、飯嶋良味 「TPH2 遺伝子と日本人統合失調症との 2 段階関連解析」第 36 回日本生物学的精神医学会 (奈良県 奈良市 2014 年 09 月 29 日)

Iijima Y, Kuriyama Y, Hori H, Hattori K, Yamamoto N, Matsuo J, Kunugi H, Arinami T. Relationships between psychological stress symptom and blood Chromogranin B (CHGB) level. 11th World Congress of Biological Psychiatry. (Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan 2013 年 06 月 23 日)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

飯嶋 良味 (IIJIMA YOSHIMI)

公益財団法人神経研究所・研究部・研究員
研究者番号 : 70574648