

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591357

研究課題名（和文）末梢血白血球遺伝子発現からの機能性精神障害の解明

研究課題名（英文）Analysis of mental disorders using leukocyte mRNA expression

研究代表者

上野 修一 (UENO SHUICHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80232768

研究成果の概要：

機能性精神障害（統合失調症、気分障害など）を対象に、末梢血白血球遺伝子発現を指標にして病因候補遺伝子を抽出し、候補遺伝子との相関研究を行った。その結果、末梢血白血球の mRNA 量は、統合失調症では、PDLIM5 および TGFBR2 遺伝子発現量が、うつ病では、HDAC5 および CREB、VEGF 遺伝子発現量が変化しており、状態像を示す候補遺伝子マーカーとして挙げられた。一方、疾患対照相関解析から、統合失調症では PDE4B 遺伝子、うつ病では PCNT2 遺伝子が、その発症の脆弱性に関与する疾患特異的のマーカーと思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：神経化学、脳・神経、ストレス、ゲノム、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

1) 機能性精神障害は、体質と環境が関わる

多因子疾患である。精神障害の発症や予後に関わる因子を明らかにするため、遺伝子連鎖

研究、遺伝子相関研究などの分子生物学的検討に加え、最近では、臨床症状と遺伝子を組み合わせた解析が進みつつある。

2) 我々は、これまで連鎖解析から遺伝性てんかんの遺伝子座位の決定や、遺伝性器質性精神障害の遺伝子を決定する研究を行ってきた。また、機能性精神障害では、候補遺伝子を絞った関連解析や遺伝子発現を調節する多型を用いて、遺伝子と精神障害との関連について検討してきている。

2. 研究の目的

1) 機能性精神障害は、中枢神経系を冒す疾患であるが、免疫系、神経系、内分泌系を通して、身体症状を起こす全身疾患である。末梢血白血球で発現している遺伝子変化に注目し、**機能性精神障害の生物学的指標**を明らかにする。

2) 末梢血白血球発現量に変化している遺伝子解析の結果や報告されている遺伝子情報から、疾患対照遺伝子解析を用いて、**状態像マーカー (state marker)** か、**疾患特異的マーカー (trait marker)** であるかを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 対象者

精神障害および健常ボランティア群から採血し、末梢血白血球 RNA および遺伝子 DNA を分画し、回収し、保存する。精神障害では、診断は DSM-IV を用いて行い、統合失調症、気分障害と診断された方を対象とした。研究用の採血に加え評価尺度を用い状態像を確認する。統合失調症では、Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) もしくは、Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS)、気分障害ではハミルトン抑うつ尺度を用い精神状態を定量化する。健常ボランティア群は、第一親等に精神障害のいない方を対象とする。性周期と遺伝子発現変化の関係を明らかにするためには、20代の健常女性ボランティアを対象に、すべての対象者には、倫理委員会承認されたインフォームドコンセントを用いて、書面で説明し、研究内容を理解し、同意された方のみを解析の対象とした。

2) 末梢血白血球の遺伝子発現解析

末梢血白血球 mRNA 分画より逆転写酵素を用いて cDNA を作成した。標的遺伝子に絞った解析を行うため、遺伝子特異的な Taqman probe を用い real-time PCR 法にて行った。

3) 遺伝子 DNA を用いた疾患対照遺伝子関連解析

末梢血遺伝子発現および論文発表の情報に基づき標的遺伝子を絞った後に、HapMap データをもとに Haploview ソフトウェアを用いて解析する遺伝子一塩基多型 (snps) を選択

し、疾患対照研究を行った。解析は、Taqman probe を用いた蛍光による一塩基多型検出法を用いた。統計解析には、SPSS および SNPAlize ソフトウェアを用いた。

4. 研究成果

1) 統合失調症の遺伝子発現と疾患対照研究
①PDLIM5 遺伝子産物は、カルシウム系に関与し、神経機能に関係する重要な因子である。DNA マイクロアレイを用いた研究から機能性精神障害における発現変化が報告されている。我々は、うつ病においてその発現量が低下しており、治療によって正常に回復する傾向をすでに報告している (Neurosci Lett 400: 203-207, 2006)。今回、PDLIM5 遺伝子 mRNA 発現量を初発未治療統合失調症患者で調べたところ、健常対照者と比較して増加しており、逆に慢性統合失調症患者では、低下していた。この遺伝子と統合失調症との疾患対照関連解析では有意な差は確認できず、末梢血白血球の PDLIM5 遺伝子発現量の変化は、状態像を反映する **state marker** と推定された (図 1 未服薬統合失調症患者; drug free pat で健常群; Control と比較して有意に高く、慢性期患者; chronic treated では低下傾向にある)。

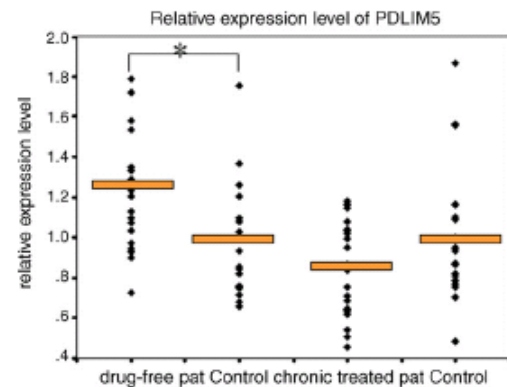


図 1 末梢血での PDLIM5 発現

②統合失調症では、がんの発生率が少ないことが知られているため、癌抑制遺伝子ファミリー遺伝子 TGFBR2 遺伝子の末梢血白血球発現量を検討した。未服薬の統合失調症患者では健常者に比較して有意に発現量が高いことが確認された。一方、未投薬のうつ病では、変化はなかった。疾患関連解析にて TGFBR2 遺伝子と統合失調症との関連は否定されたため、統合失調症の病態を示す **state marker** であると考えられた。しかし、統合失調症では、これらの遺伝子発現量と精神症状尺度との関連は確認できなかった (図 2 未服薬統合失調症患者; medication-free でのみコントロール; control に比較して有意に高いが、うつ病; medication-free では有意差なし)。

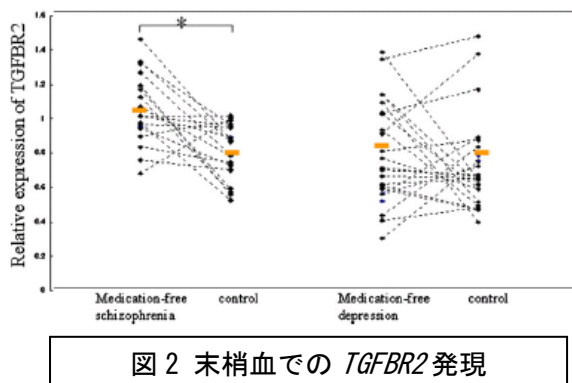


図2 末梢血での *TGFBR2* 発現

③均衡転座を持つ精神障害家系の解析から、統合失調症との関連が報告された *DISC1* (disrupted in schizophrenia 1) 遺伝子産物に結合する *PDE4B* (phosphodiesterase 4B) は、それ自身も精神障害家系の均衡転座との関連の報告があること、*DISC1* と結合して cAMP 量を調節すること、*PDE4B* 阻害薬 *rolipram* が精神症状を改善することなどから統合失調症との関連が推定される。疾患対照遺伝子解析から、統合失調症と *PDE4B* 遺伝子の間に有意な相関がみられ、統合失調症の **trait marker** と考えられた。

2) 気分障害 (うつ病) の遺伝子発現と疾患対照研究

ヒストンのメチル化に関する *HDAC5* 遺伝子、二次メッセンジャーである *CREB* 遺伝子、血管系の栄養因子である *VEGF* 遺伝子、*PDE4B* 遺伝子の末梢血白血球での mRNA 発現量を検討し、これらの遺伝子 mRNA 発現量がうつ病の状態像と関連し、*VEGF* 遺伝子では mRNA 発現量と精神症状尺度の改善との関連が認められた。しかし、これらの遺伝子の疾患対照研究では、有意な差は確認できなかったことから、うつ病の状態像を示す **state marker** であると予想された。

①図3 *HDAC5* 遺伝子発現 うつ病の治療前 baseline で control に比して有意に高く、8週間の治療により低下傾向である。

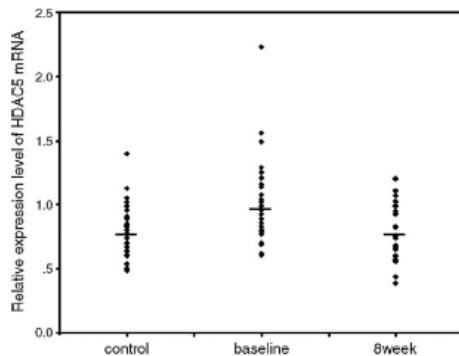


図3 末梢血での *HDAC5* 発現

②図4 *CREB* 遺伝子発現 うつ病の治療前 baseline で有意に高く、8週間の治療により低下傾向である。

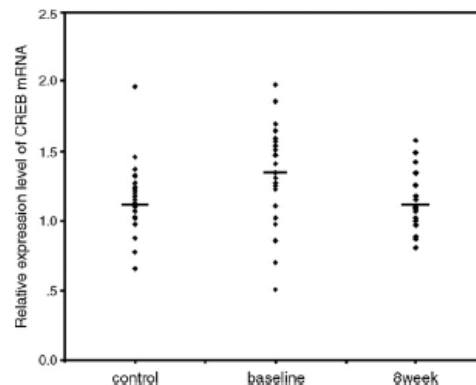


図4 末梢血での *CREB* 発現

③図5 *VEGF* 発現 うつ病 patients で健常対照者 controls に比べ有意に高い

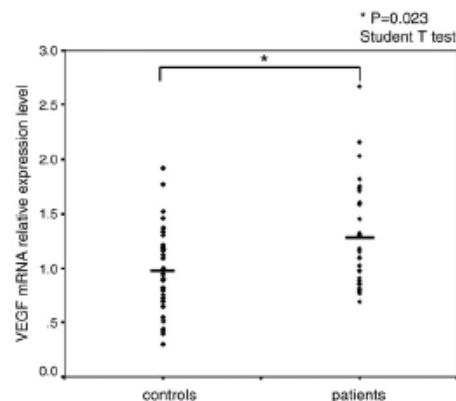


図5 末梢血での *VEGF* 発現

一方、*DISC1* 遺伝子に結合する別のタンパク質 *PCNT2* の末梢血白血球遺伝子発現は、うつ病患者の末梢血白血球で増加しているとの報告 (*Biol Psychiatry* 63, 678-685, 2008) に基づき、疾患対照研究を行ったところ、うつ病と *PCNT2* 遺伝子の間に有意な相関を見出した。

3) 女性の性周期における末梢血白血球遺伝子発現変化

女性においては、性周期に一致してホルモンの変動が起こるが、月経前後の期間にのみ、精神症状が出現する月経前症候群は良く知られており、その中でも *PMDD* (premenstrual dysphoric disorder) はうつ病類似の機能的な精神障害である。月経周期におけるホルモン変化と精神症状の変化をみる末梢血白血球での遺伝子発現に関連がないかどうかを調べるため、健常成人女性を用い、性周期に合わせて遺伝子発現を検討したところ、セロト

ニトランスポーター遺伝子; *SERT*, *COMT* 遺伝子; *COMT*には発現量の変化は認められず、これらの遺伝子発現は性周期の影響を受けないと考えられた。

図6 健康女性での性周期における遺伝子発現変化 月経期; Menstrual、卵胞期; Follicular、黄体期; Luteal の変化。性周期関連遺伝子 *FKBP5*のみ有意に変化しているが、セロトニントランスポーター遺伝子 *SERT* および *COMT* 遺伝子 *COMT*は変化していない

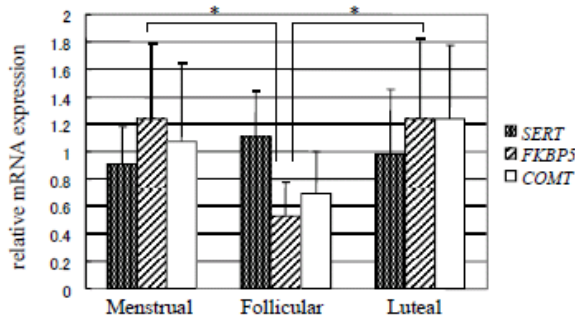


図6 女性の性周期による末梢血での遺伝子発現変化

以上の結果から、機能性精神障害での **state marker** として、統合失調症においては *PDLIM5* および *TGFBR2* 遺伝子が、うつ病においては *HDAC5* および *CREB*, *VEGF* 遺伝子がその候補と考えられた。一方、**trait marker** として、統合失調症では *PDE4B* 遺伝子、うつ病では *PCNT2* 遺伝子が想定された。ただ、症状との相関は認められないものも多く、症例数も少ないため、今後、例数を増やして検討することが望ましいと思われた。

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 12 件)

1. S. Numata, J. Iga, M. Nakataki, S. Tayoshi, T. Tanahashi, M. Itakura, S. Ueno, T. Ohmori. Positive Association of the *PCNT2* gene with Major Depressive Disorder in the Japanese Population. *J Psychiatry Neurosci in press* 査読有

2. S. Numata, J. Iga, M. Nakataki, S. Tayoshi, K. Taniguchi, S. Sumitani, M. Tomotake, T. Tanahashi, M. Itakura, Y. Kamegaya, M. Tatsumi, A. Sano, T. Asada, H. Kunugi, S. Ueno, T. Ohmori. Gene expression and association analyses of the *PDE4B* (Phosphodiesterase 4B) gene in major depressive disorder in the Japanese Population. *Am J Med Genet in press* 査読有

3. S. Numata, S. Ueno, J. Iga, S. Hongwei, M. Nakataki, S. Tayoshi, S. Sumitani, M. Tomotake, M. Itakura, A. Sano, T. Ohmori. Positive Association of The *PDE4B* (Phosphodiesterase 4B) gene with Schizophrenia in the Japanese Population. *J Psychiatric Res* 43, 7-12, 2009 査読有

4. S. Kinouchi, J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, H. Song, S. Sumitani, S. Shibuya-Tayoshi, M. Haku, T. Yasui, M. Irahara, K. Morita, K. Rokutan, T. Ohmori. *FKBP5*, *SERT* and *COMT* mRNA expressions in the peripheral leukocytes during menstruation cycle in healthy reproductive females. *Neurosci Lett* 434: 124-128, 2008 査読有

5. J. Iga, S. Ueno, T. Ohmori. Molecular assessment of depression from mRNAs in the peripheral leukocytes. *Annals of Medicine* 40, 336-342, 2008 査読有

6. S. Numata, S. Ueno, J. Iga, M. Nakataki, T. Tanahashi, M. Itakura, A. Sano, K. Ohi, R. Hashimoto, M. Takeda, T. Ohmori. No association between the *NDE1* gene and schizophrenia in the Japanese Population. *Schizophr Res* 99:367-369, 2008 査読有

7. H. Song, S. Ueno, S. Numata, J. Iga, S. Shibuya-Tayoshi, M. Nakataki, S. Tayoshi, K. Yamauchi, S. Sumitani, T. Tomotake, T. Tada, T. Tanahashi, M. Itakura, T. Ohmori. Association between *PNPO* and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res* 97: 264-270, 2007 査読有

8. S. Numata S, S. Ueno, J. Iga, K. Yamauchi, H. Song, R. Hashimoto, M. Takeda, H. Kunugi, M. Itakura, T. Ohmori. *TGFBR2* gene expression and genetic association with schizophrenia. *J Psychiatr Res* 42, 425-432, 2007 査読有

9. J. Iga J, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S. Tayoshi-Shibuya, S. Kinouchi, M. Nakataki, H. Song, K. Hokoishi, H. Tanabe, A. Sano, T. Ohmori. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene is associated with psychotic feature and suicidal behavior in Japanese major depressive patients. *Am J Med Genet* 144B, 1003-1006, 2007 査読有

10. S. Numata, S. Ueno, J. Iga, K. Yamauchi, S. Hongwei, S. Kinouchi, Hashimoto R, Takeda M, Kunugi H, Itakura M, T. Ohmori. Gene expression in the peripheral leukocytes and association analysis of *PDLIM5* gene in schizophrenia. *Neurosci Lett* 415: 28-33, 2007 査読有

1 1 . J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S. Tayoshi, S. Kinouchi, M. Nakataki, H. Song, K. Hokoishi, H. Tanabe, T. Ohmori. Gene expression and association analysis of vascular endothelial growth factor in major depressive disorder. Progress Neuro-Psychopharmacol Biological Psychiat 31: 658-663, 2007 査読有

1 2 . J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S. Kinouchi, S. Tayoshi, H. Song, T. Ohmori. Altered HDAC5 and CREB mRNA expressions in the peripheral leukocytes of major depression. Progress Neuro-Psychopharmacol Biological Psychiatry 31: 628-632, 2007 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1 . M. Nakataki, J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S. Tayoshi-Shibuya, S. Kinouchi, H. Song, K. Hokoishi, H. Tanabe, A. Sano, T. Ohmori. Gene expression and association analysis of vascular endothelial growth factor in major depressive disorder. Society for Neuroscience. San Diego, CA USA 2007 年 11 月 15 日

2 . S. Numata, S. Ueno, J. Iga, S. Hongwei, M. Nakataki, M. itakura, A. Sano, T. Ohmori. Positive association of the PDE4B (Phosphodiesterase 4B) gene with schizophrenia and major depressive disorder in Japanese population. Society for Neuroscience. San Diego, CA USA 2007 年 11 月 15 日

3 . 上野修一、伊賀淳一、沼田周助、宋鴻偉、田吉伸哉、中滝理仁、山内健、大森哲郎：うつ病の心因、内因、器質因：うつ病を遺伝子から考える 日本精神神経学会 シンポジウム 高知 2007 年 5 月 19 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 修一 (UENO SHUICHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80232768

(2) 研究分担者

大森 哲郎 (OMORI TETSURO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：00221135

沼田 周助 (NUMATA SHUSUKE)

徳島大学・医学部歯学部附属病院・助教

研究者番号：10403726