

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790855
 研究課題名 (和文) 概日リズム障害と気分障害を包括的にとらえたゲノム医学的研究
 研究課題名 (英文) Genetic studies comprehensively viewing circadian disorders and mood disorders
 研究代表者
 北島 剛司 (KITAJIMA TSUYOSHI)
 藤田保健衛生大学・医学部・講師
 研究者番号：40360234

研究成果の概要：

生体リズムの病態への関与が指摘されている気分障害の疾患脆弱性あるいは薬物反応性に関して、時計関連遺伝子との関連解析を行った。時計遺伝子機構の主要因子である CLOCK 遺伝子の多型と大うつ病性障害における抗うつ薬 Fluvoxamine への反応性との間に関連を見出した。また概日リズム機構の出力因子である prokineticin 2 の受容体遺伝子 PKR2 の多型と、大うつ病性障害および双極性障害の双方との間に関連を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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：精神生理学、ゲノム医科学的研究

1. 研究開始当初の背景

概日リズム障害は社会不適應の大きな原因として注目されているが、病態は不明な部分が多い。心理・社会要因あるいは気分障害、統合失調症、人格障害などの精神疾患においても睡眠覚醒リズムの乱れをしばしば生じ、これらを「二次性」のリズム障害とする他方、純粋に生物学的なものを「一次性」として区別されているが、実際の臨床ではこれらの二者は種々の程度に混じっており、また「一次性」リズム障害の患者においても同時に抑うつを中心とした気分障害を続発す

ることが多い。他方、うつ病・躁うつ病などの気分障害に関しても、a) 気分障害において睡眠相、ホルモン、体温などの位相が前進、あるいは症状の日内変動の存在 b) 双極性障害に対するリチウムの作用点である GSK3 が生体リズムと関係 c) 不眠がうつ病のリスクであることが疫学的に立証されると同時に時差症候群や睡眠相後退症候群などにおいてうつ症状をしばしば併発する d) 時間療法、断眠療法、光療法が気分とリズムとの双方に効果を及ぼす e) 季節性気分障害の存在、などからリズム障害の側面を持つと考えられ

る。以上よりリズム障害と気分障害はなんらかの共通する生物学的基盤を持つことが推察され、これを明らかにすることで双方の病態や治療に関して解明が進むと考えられる。

概日リズムを刻む体内時計の機構は基本的なところは人と動物においてほぼ共通しており、Per、CLOCK、Bmal、Cry などのいわゆる時計遺伝子の転写・フィードバック機構がほぼ明らかになっている。動物実験ではこうした時計遺伝子の変異ないし欠損が概日リズムの障害をもたらすことが明らかにされており、また人の睡眠覚醒リズム障害でも家族性睡眠相前進症候群 (ASPS) が per2 遺伝子多型によって生じること、また睡眠相後退症候群 (DSPS) が per3 多型と関連することが報告されている。しかしながら、これらで人の概日リズム障害を説明出来るのは一部であり、実際に上記の様に心理・社会的要因や精神疾患などが複雑に関連していると考えられ、他の精神疾患の脆弱性が概日リズム障害発症にも関与している可能性がある。動物レベルでも、時計遺伝子産物以外の神経伝達物質受容体 (セロトニン 1A、1B、2A、2C、5A、7、GABAA、GABAB など) の視交叉上核への発現あるいはその概日リズムへの関与の知見が蓄積されつつある。これまでこれら受容体の機能と時計遺伝子による概日リズムの機構との関係は図式化されておらず、これらの多型が概日リズム障害への脆弱性に寄与している可能性が考え得るが、実際の患者群ではこれまでほとんど検討されていない。また、気分障害における時計遺伝子の関与については、CLOCK のうつ病発症脆弱性、抗うつ薬への反応性、双極性障害の再発性などについての検討がこれまでなされているが、他の時計遺伝子に関しては極めて報告が少ない。

2. 研究の目的

この研究では概日リズム睡眠障害と気分障害に共通する病態を明らかにする為、分子遺伝学的手法を用いて a) 概日リズム障害患者を対象としたセロトニン・GABA 系候補遺伝子についての関連研究、および b) 気分障害患者を対象とした時計遺伝子系候補遺伝子についての関連研究を行い、これらの候補遺伝子のそれぞれの病態への関与を検討するのが目的である。概日リズム障害と気分障害等の脆弱性遺伝子多型との共通部分を明らかにすることで、概日リズム障害と気分障害のそれぞれの病態解明に資すると共に、概日リズム障害から気分障害へあるいはその逆の進展可能性に関する指標を得ることや、セロトニン作動作用のある抗うつ薬や非定型抗精神病薬のリズム障害への、逆に時間生物学的な治療の気分障害への治療応用に結びつけようとされる。

3. 研究の方法

以下の2つにわけて施行した。

a) リズム障害患者を対象としたセロトニン・GABA 系候補遺伝子についての関連研究

b) 気分障害患者を対象とした時計遺伝子系候補遺伝子についての関連研究

<対象>a) 本学あるいは関連施設を受診し ICSD (睡眠障害国際分類) によって診断された睡眠相後退症候群、または非 24 時間睡眠覚醒症候群の患者

b) 本学あるいは関連施設を受診し DSM IV によって診断された気分障害 (大うつ病性障害、双極性障害) の患者

a) b) とも健常被験者を対照群として用いた。

<方法>

1) 患者群・対照群共に、対象被験者についてインフォームドコンセントの上 DNA サンプルを採取、集積した。大うつ病性障害群にてフルボキサミン等の特定の抗うつ薬の使用患者においては、HAM-D による症状評価を投与開始時と 8 週目に行った。

2) a) b) それぞれの候補遺伝子について、変異検索の結果発見された SNP、あるいは既存のデータベースに基づく SNP につき、RFLP 法、Primer extension 法、Taqman 法、direct sequence 法などによって遺伝子型をタイプングした。SNP の選定にあたっては HapMap データベースから日本人における LD ブロックを推測し、これに基づいて頻度の高い一塩基多型 (SNP) を htSNP として選定した。

3) 患者群と健常者群の間でそれぞれの SNP について遺伝子型と疾患との関連を統計学的に解析し、発症脆弱性に対するその遺伝子の関与などの検討を行った。また、抗うつ薬に対する反応性との関連については、8 習字点で HAM-D が 7 点以下のものを寛解・それ以外を非寛解、あるいはスコアの 50% 減少を反応・それ以外を非反応として 2 群に分けて解析を行った。

<倫理的配慮>

本研究は 3 省庁による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、藤田保健衛生大学倫理審査委員会にて承認を得ている内容に沿って行った。その中には、患者に対して文書によってインフォームドコンセントを得た上で DNA 提供を受けること、プライバシーの保護に対しては、個人情報と遺伝子・臨床データなどの間の連結匿名化などの措置にて十分な配慮をした。

4. 研究成果

a) リズム障害患者を対象としたセロトニン・GABA 系候補遺伝子についての関連研究 サンプル収集を行ったが 30 例程度に留まり、現在の水準の遺伝学的検討に耐えられないため、解析を断念した。

b) 気分障害患者を対象とした時計遺伝子系候補遺伝子についての関連研究
以下の4つの時計関連遺伝子(CLOCK、NR1D1、PK2、PKR2)について検討を行った。

ア) CLOCK

CIRCADIAN LOCOMOTOR OUTPUT CYCLES KAPUT(CLOCK)は4q12に位置する遺伝子で、古典的時計遺伝子フィードバックループの主要な因子である。ヒトにおいてはそのT3111C(rs1901260)多型と朝型・夜型特性との関連、あるいは気分障害における睡眠障害あるいは病相の反復との関連が報告されている。今回の研究では、CLOCKについてrs1901260を加えた6つのhtSNPを解析対象とし、これらと双極性障害149名、大うつ病性障害324名、および健常者795名との間の関連解析、および大うつ病性障害でセロトニン選択性再取り込み阻害剤(SSRI)であるフルボキサミンにて治療を行った121名において治療反応性との関連解析を行った。

CLOCKの多型と双極性障害と大うつ病性障害との間に有意な関連は認められなかった。しかし、フルボキサミン反応性とrs3736544との間には有意な関連が認められ、更にハプロタイプ解析でも有意な関連が認められた。日本人の大うつ病性障害のSSRI反応性にCLOCK多型が予測因子となることが示唆された。ただし、従来ヒトにおける体内リズム関連事象との関連が示唆されてきたrs190126との間には有意な関連は認められず、今後CLOCKの他の部位に機能的意義を検討する必要性も示唆された。

①) NR1D1

NR1D1は17q11に位置する遺伝子で、nuclear receptor familyの一つでGSK3 β を介して時計遺伝子機構の調整に関与していることが知られている。Reb-erb α をコードしている。ヒトにおいては気分障害の治療薬であるリチウムあるいはバルプロ酸の作用点であることが判明している。今回の研究ではNR1D1について3つのhtSNPを選択し、これらと双極性障害147名、大うつ病性障害322名、健常者360名との間の関連解析、および大うつ病性障害でフルボキサミンにて治療を行った118名において治療反応性との関連解析を行った。

双極性障害のうち女性群とrs939347との間に有意な関連が認められたが、Bonferroni collectionにて有意差は消失した。海外の報告でNR1D1との関係が強いGSK3 β と女性の双極性障害との関連が示唆されており、今回の研究でもサンプルサイズが小さいことによる検出限界の可能性もあり、今後女性の双極性障害における病態への関与をより大きなサンプルサイズで検証し治す必要性が示唆された。大うつ病性障害、あるいはフルボキサミン反応性との間に有意な関連はみられ

なかった。

ウ) PK2、PKR2

prokineticin 2 (PK2)およびそのレセプター(PKR2)は遺伝子はそれぞれ3p13および20p12に位置し、時計遺伝子概日リズム機構の出力因子であることが近年判明し、かつ動物実験で不安・抑うつとの関連が指摘されている。今回の研究では、PK2の4つのhtSNPおよびPKR2の5つのhtSNPと、双極性障害151名、大うつ病性障害319名、及び健常者360名との間で関連解析を行い、またフルボキサミンで治療を行った116名について治療反応性との関連解析を行った。

PKR2について、双極性障害とrs17721321およびrs3746682との間に有意な関連が認められ、また大うつ病性障害とrs4815787との間に有意な関連が認められた。多重比較補正を行った後にも有意差は保持され、また両疾患群ともハプロタイプ解析でも有意な関連が認められた。2つの気分障害群との関連が認められたことからPKR2が気分障害の病態に関与している可能性が示唆されたが、今後別のより大きな群でのreplicationおよび具体的に病態に関与するところの機能を解明する必要があると考えられる。PKR2とフルボキサミン反応性、およびPK2と両疾患およびフルボキサミン反応性との間には有意な関連は認められなかった。

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13件)

- ① Kishi T, Kitajima T, Ikeda M, Yamanouchi Y et. al. Association study of clock gene (CLOCK) and schizophrenia and mood disorders in the Japanese population. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2009 (in press) (査読有)
- ② Kishi T, Kitajima T, Ikeda M, Yamanouchi Y et. al. CLOCK may Predict the Response to Fluvoxamine Treatment in Japanese Major Depressive Disorder Patients. Neuromolecular Med. 2009 Apr 4. (in press) (査読有)
- ③ Kishi T, Kitajima T, Ikeda M, Yamanouchi Y et. al. The orphan nuclear receptor Rev-erb alpha gene (NR1D1) and fluvoxamine response in major depressive disorder in the Japanese population. Neuropsychobiology 2009 (in press) (査読有)
- ④ Kishi T, Kitajima T, Tsunoka T, Ikeda M et. al. Possible association of prokineticin 2 receptor gene (PROKR2) with mood disorders in the Japanese

- population. *NeuroMolecular medicine* 2009 (in press) (査読有)
- ⑤ Kishi T, Kitajima T, Ikeda M, Yamanouchi Y, et. al. Association analysis of nuclear receptor Rev-erb alpha gene (NR1D1) with mood disorders in the Japanese population. *Neurosci Res.* 2008 Dec;62(4):211-5 (査読有)
- ⑥ Ikeda M, Ozaki N, Suzuki T, Kitajima T et.al. Possible association of beta-arrestin 2 gene with methamphetamine use disorder, but not schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 6(1):107-12, 2007 (査読有)
- ⑦ Ikeda M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Suzuki T, Kitajima T et.al. No association between the glutamate decarboxylase 67 gene (GAD1) and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res.* 91(1-3):22-6, 2007 (査読有)
- ⑧ Maeno N, Kitajima T, Yamanouchi Y et. al. Association of SOX10 with schizophrenia in the Japanese population. *Psychiatr Genet.* 2007 Aug;17(4):227-31. (査読有)
- ⑨ 北島剛司、目片隆宏、服部美穂、奥田明子他：睡眠覚醒リズム障害評価尺度作成の試み。不眠研究 2007 17-24, (2007) (査読無)
- ⑩ Usui H, Takahashi N, Saito S, Ishihara R, Aoyama N, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T et.al. The 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and oligodendrocyte lineage transcription factor 2 genes do not appear to be associated with schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res.* 88(1-3):245-50, 2006 (査読有)
- ⑪ Aoyama N, Takahashi N, Saito S, Maeno N, Ishihara R, Ji X, Miura H, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, et.al. Association study between kynurenine 3-monooxygenase gene and schizophrenia in the Japanese population. *Genes Brain Behav.* 5(4):364-8, 2006 (査読有)
- ⑫ Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Maeno N, Aoyama N, Ji X, Miura H, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, et.al. Association between chromogranin A gene polymorphism and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res.* 83(2-3):179-83 2006 (査読有)
- ⑬ Saito S, Takahashi N, Ishihara R, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T et.al. Association study between vesicle-associated membrane protein 2 gene polymorphisms and fluvoxamine response in Japanese major depressive

patients. *Neuropsychobiology.* 54(4):226-30, 2006 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kishi T, Kitajima T et.al. Association study of clock gene (CLOCK) and schizophrenia in the Japanese population. XVIth World Congress for Psychiatric Genetics (2008.10.11~15) 大阪
- ② Kishi T, Kitajima T et.al. SNPs of CLOCK gene may predict the response of fluvoxamine treatment in Japanese major depressive disorder patients. 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会 (2008.10.1~3) 東京
- ③ Kishi T, Kitajima T et.al. Association analysis of Rev-erb alpha gene (NR1D1) with the fluvoxamine therapeutic response in major depressive disorder in the Japanese population 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会 (2008.10.1~3) 東京
- ④ Kishi T, Kitajima T et.al. Association study of clock gene (CLOCK) and schizophrenia and mood disorders in the Japanese population 第 51 回日本神経化学学会大会 (2008.9.11~13) 富山
- ⑤ 岸太郎、北島剛司 他 No association between Nuclear Receptor Rev-erb α gene (NR1D1) and Bipolar disorder in the Japanese population 日本睡眠学会第 32 回定期学術集会 (2007.11.8) 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 剛司 (KITAJIMA TSUYOSHI)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：40360234