

平成22年4月29日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790844

研究課題名（和文） 気分障害の発症機序における選択的スプライシング異常の検討

研究課題名（英文） Role of splicing factors in the pathogenesis of mood disorders

研究代表者

内田 周作（UCHIDA SHUSAKU）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10403669

研究成果の概要（和文）：気分障害患者末梢白血球における主要な選択的スプライシング制御因子であるSRタンパクファミリー遺伝子群、PTB遺伝子群(PTB, nPTB)、遺伝子発現制御因子HDAC遺伝子群(HDAC1-11)についての発現量を健常群と比較検討した。その結果、気分障害患者におけるSRp20、nPTB、HDAC遺伝子群のmRNA発現量は健常群に比し有意に変化していた。これらの結果から、気分障害患者におけるnPTBやHDACを介した選択的スプライシング異常・遺伝子発現制御異常の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the expression analyses of genes which are involved in the regulation of splicing and transcription in mood disorder patients. We found that the expression of SRp20, nPTB, and HDACs mRNAs were altered in patients with mood disorders. Thus our results suggest the aberrant regulations of alternative splicing and transcription in mood disorder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：気分障害、選択的スプライシング、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトの成果により、ヒト遺伝子数は当初予想されていた数よりもはるかに少ないことが明らかとなった。約2万2000の限られた遺伝子から数10万種類のタンパク質が産生されることから、1種類の遺伝子から複数のメッセンジャー

RNA(mRNA)を産生する選択的スプライシング制御機構の遺伝子発現制御システムに対する重要性が伺える。

特に、脳は末梢組織に比べて選択的スプライシング制御が活発に行われていることから、選択的スプライシング制御のシナプス可塑性、構造的可塑性への関与が示唆

されている。

最近、統合失調症や神経変性疾患の発症脆弱性に選択的スプライシング異常が関与していることが報告されている。しかし、ストレス脆弱性、気分障害の発症脆弱性に対する選択的スプライシング制御の役割は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究課題では、気分障害の発症機序における選択的スプライシング機構の役割を解明することを目的とした。我々のこれまでの先行研究結果として、気分障害患者末梢白血球における様々な遺伝子発現変動が観察されている。このことは、末梢白血球における遺伝子発現変動が、気分障害の発症予測・治療・予後を予測可能なバイオロジマーカーの確立に繋がる可能性を秘めている。

我々は以前、気分障害患者末梢白血球サンプルを用いて、同一遺伝子から選択的スプライシングによって産生されるグルコルチコイド受容体(GR α 、GR β mRNAの発現量を解析した。その結果、健常者群でみられたGR α とGR β mRNA発現量の逆相関が、気分障害患者群では認められなかった。この結果から、GR遺伝子の発現制御(選択的スプライシング)機構の異常が気分障害の病態に関与していることが示唆された。

そこで本研究では、GR遺伝子の選択的スプライシング制御に関与することが示唆されているSRp20を含むSRファミリー遺伝子群等の発現量を気分障害患者と健常者で比較検討した。また、気分障害患者における選択的スプライシング異常がstate-dependentかtrait-dependentかを検討した。

3. 研究の方法

(1)、単極性・双極性気分障害患者及びその第一度血縁者における末梢白血球由来のmRNAを用いて定量的リアルタイムPCR法によりSRタンパク群10種類、PTBファミリー2種類およびHDAC遺伝子群の発現量を測定した。

①、対象

気分障害と診断された当科の入院患者、外来患者及びその第一度血縁者から研究参加に同意の得られた者を対象とした。健常者としてボランティアを募り、研究参加に同意の得られた者を対象とした。気分障害患者に関しては、抗うつ薬投与前、投与2、4ヵ月後に採血した。性別・年齢を一致させた健常者28名、単極性うつ病患者20名、双極性うつ病患者12名、及び各々の第一度血縁者を対象とした。

②、採血・サンプル調整

当科医師により気分障害患者および健常者から全血40mlを採血した。Lymphoprepを用いてリンパ球を分離し、総RNA、タンパク質を抽出した。もう一方をQIAmp RNA mini kitを用いて総RNAを調製した。

③、定量的リアルタイムPCR法

定量的リアルタイムPCR機Light Cyclerを使用し、QuantiTect SYBR PCR kitを用いて標的遺伝子mRNA発現量を定量解析した。標的遺伝子群mRNA発現量はGAPDH mRNA発現量により補正した。

4. 研究成果

気分障害患者の末梢白血球におけるSR蛋白質遺伝子群(SRp20, SRp30c, SC35, SRp40, SRp46, SRp54, SRp55, SRp75, ASF/SF2, 9G8)のmRNA発現量について検討したところ、SRp20 mRNA発現量が双極性障害患者群において健常者群より有意に高い値を示した。その他のSR蛋白質遺伝子mRNAの発現量については、SC35 mRNA発現量も同様に双極性障害患者群において高い値であったが有意ではなかった。SRp30c, SRp40, SRp46, SRp54, SRp55, SRp75, ASF/SF2, 9G8 mRNA発現量は健常者群、うつ状態の双極性障害患者群および大うつ病性障害患者群の3群間に明らかな差を認めなかった。性別および年齢の違いによるSRp20 mRNA発現量の変化について検討したが、健常者群、うつ状態の双極性障害患者群および大うつ病性障害患者群の3群間に明らかな差を認めなかった。

寛解状態における双極性障害患者群および大うつ病性障害患者群の末梢白血球を用いて同様の検討を行ったところ、双極性障害患者群においてSRp20 mRNAの発現量が有意に高い値を示した。SC35 mRNAの発現量に関しては健常者群、寛解状態の双極性障害患者群および大うつ病性障害患者群の3群間に明らかな差を認めなかった。

我々は以前、GR α mRNA発現量が双極性障害患者第一度血縁者でも有意に低い値を示すことを報告しているため、今回も双極性障害患者第一度血縁者について同様の検討を行ったが、SRp20 mRNAの発現量に有意な変化を認めなかった。

SRp20 mRNA発現量と投与薬剤との関連について検討したところ、抑うつ状態における双極性障害患者群では13人中10人が気分安定薬(リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン)を内服していた。そのため、気分安定薬を内服していない患者群とそれぞれの気分安定薬を内服している患者群にわけて、SRp20 mRNAの発現量について変化がないか検討したが、

いずれも高い値を示し有意な差を認めなかった。また、気分安定薬の投与を受けていない10人と気分安定薬の投与を受けている3人のSRp20 mRNAの発現量についても検討したが、有意な差を認めなかった。次にSRp20 mRNAの発現量と内服している抗うつ薬との関連を検討したところ、三環系抗うつ薬および選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)を内服している抑うつ状態の気分障害患者群と抗うつ薬を内服していない抑うつ状態の気分障害患者群で有意な差を認めなかった。寛解状態においても同様にSRp20 mRNA発現量と気分安定薬、抗うつ薬との関連を検討したが、いずれも有意な差を認めなかった。以上の結果から、気分障害患者におけるSRp20を介した選択的スプライシング異常の存在が示唆された。

今回我々は抑うつ状態にある気分障害患者から採取した末梢白血球を用いてSR蛋白質遺伝子群10種類のmRNA発現量を検討した。その結果、SRp20 mRNAの発現量は双極性障害患者群において有意に増加していた。更に、寛解状態にある気分障害患者から採取した末梢白血球を用いて解析したところ、同様の結果を得た。この結果から、双極性障害患者末梢白血球におけるSRp20 mRNA発現量の上昇は状態依存性ものではないと考えられる。

また、スプライシング制御遺伝子のPTB, nPTB mRNA発現量を検討したところ、気分障害患者におけるnPTB発現量は健常者に比して有意に減少していた。さらに、nPTBの候補標的遺伝子として、気分障害との関連が強く示唆されているBDNFの可能性を示唆する結果を得ている。

さらに、HDAC遺伝子発現量の発現を検討したところ、大うつ病性障害患者うつ状態におけるHDAC2, -5 mRNA発現量は健常群に比し有意に増加していた。また、双極性障害患者におけるHDAC4, -6 mRNA量は健常者に比して有意に減少していた。

今回の我々の結果から得られたもう一つの重要な知見は健常者においてGR β , GR β /GR α とSRp30c mRNA発現量に相関関係が認められたことである。このことは、これまで*in vitro*でしか証明されていなかったSRp30cとGR β の関係を*in vivo*の研究でも証明した初めての結果である。更には、この相関関係が大うつ病性障害患者群および双極性障害患者群で認められなかったことは、健常者ではSRp30cによってGR α とGR β mRNA発現量のバランスが調節されているものの、気分障害患者群では単純にSRp30c mRNA発現量の変化によってGR α と β mRNAの発現量が調節されていないことを示している。このことは、以前我々が報

告したGR α とGR β mRNA発現量の負の相関関係が健常者においてのみ認められ、気分障害患者では認められなかったことから示唆されたGRの選択的スプライシングが気分障害患者では適切に行われていないとする我々の仮説を支持するものである。しかしながら、健常者におけるGR β およびGR β /GR α とSRp30c mRNA発現量との負の相関関係は、好中球ではSRp30cがGR β mRNAの発現を増加させると考えられているため期待された結果ではなかった。この不一致の原因は定かではないが、選択的スプライシングは組織特異的に行われる場合も多いため、実験に用いる細胞系の違いにより異なっているのかもしれない。

今回の我々の結果から、双極性障害患者の末梢白血球でSRp20を介した選択的スプライシング異常の可能性が考えられる。事実、SRp20を介した選択的スプライシングによってカルシトニン(CT)/カルシトニン関連ペプチド(CGRP)遺伝子から産出されるCTの発現が変化していた。げっ歯類の中樞や末梢にCGRPを投与すると、血中のコルチコステロン量が増加したり、食事摂取量が減少したりするというストレス負荷状態、抑うつ状態に類似した状態を呈することが報告されている。興味深いことに、大うつ病性障害患者の髄液においてCGRP濃度の増加が報告されている。更に大うつ病性障害患者の髄液においてCTのみが減少し、CGRPが変化していないためCGRP/CT比の割合が増加していることが報告されており、大うつ病性障害患者におけるCT mRNAの選択的スプライシングの異常が示唆されている。これらの結果はSRp20を介した選択的スプライシングの異常が気分障害の病態生理に関連しているかもしれないとする我々の仮説を強く支持している。

また、ストレス応答において中心的役割を担うグルココルチコイド活性に関連するmultidrug resistance protein(MRP)1もSRp20による選択的スプライシングの影響を受けるため、興味ある分子の一つである。MRP1にはいくつかのsplicing variantが存在するが代表的なものはmdr1a, mdr1bの2つである。MRP1はグルココルチコイドの細胞外流出を促進させることによってグルココルチコイドの細胞内濃度を減少させることが報告されている。mdr1aは血液脳関門(BBB)において多く発現しているが、グルココルチコイドの排出はしない。逆にmdr1bは副腎や卵巣で多く発現しているが、脳でも発現しており、グルココルチコイドの細胞外への輸送を担っている。抗うつ薬はMRP1の細胞外輸送を阻害することによって細胞内のグルココルチコイ

ド濃度を上昇させ、GR を介した転写活性や GR の核内移行を促進させることが報告されている。SRp20 の発現が増加した場合、MRP1 (特に mdr1b) の発現に変化が生じ、GR を介した転写活性が減弱する可能性が考えられるが、このことは大うつ病性障害患者の抑うつ状態よりも双極性障害患者の抑うつ状態の方が一般的な抗うつ薬に反応しにくいという臨床的特徴を説明することになるかもしれない。双極性障害患者の脳で SRp20 の発現が変化しているかどうかは、我々の調査からでは計り知れないが、近年 GR α mRNA や熱ショック蛋白、LIM 蛋白などのように気分障害患者の脳と末梢血の両方において発現が変化していると報告されている分子の数が増加傾向にあることは注目に値する。

今回得られた我々の結果は、気分障害における SRp20、nPTB を介した選択的スプライシングの異常および HDACs を介した遺伝子調節異常を示唆する最初の報告である。SRp20 は患者の状態像に関係なく、双極性障害患者群の末梢白血球でのみ上昇しているため、単極性の気分障害と双極性の気分障害を末梢で区別することを可能にする trait marker となりうる。このことは日常臨床において、初回エピソードの大うつ病性障害患者が躁転する危険性を予測する重要なマーカーとなる可能性を秘めている。

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 8 件)

①Hobara T, Uchida S, Otsuki K, Matsubara T, Funato H, Matsuo K, Suetsugi M and Watanabe Y. Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. *Journal of Psychiatric Research* 2010 44: 378-384, 査読有

②Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Otsuki K, Hobara T, Yamagata H, and Watanabe Y. Maternal and genetic factors in stress-resilient and -vulnerable rats: A cross-fostering study. *Brain Research* 2010 1316: 43-50, 査読有

③ Otsuki K, Uchida S, Wakabayashi Y, Matsubara T, Hobara T, Funato H and Watanabe Y. Aberrant REST-mediated transcriptional regulation in major depressive disorder. *Journal of*

Psychiatric Research 2010 44: 263-270, 査読有

④Uchida S, Nishida A, Hara K, Kamemoto T, Suetsugi M, Fujimoto M, Watanuki T, Wakabayashi Y, Otsuki K, McEwen BS and Watanabe Y. Characterization of the vulnerability to repeated restraint stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. *European Journal of Neuroscience* 2008 27: 2250-2261, 査読有

⑤ Otsuki K, Uchida S, Watanuki T, Wakabayashi Y, Fujimoto M, Matsubara T, Funato H and Watanabe Y. Altered expression of neurotrophic factors in patients with major depression. *Journal of Psychiatric Research* 2008 42: 1145-1153, 査読有

⑥ Fujimoto M, Uchida S, Watanuki T, Wakabayashi Y, Otsuki K, Matsubara T, Suetsugi M, Funato H and Watanabe Y. Reduced expression of glyoxalase-1 mRNA in mood disorder patients. *Neuroscience Letters* 2008 438: 196-199, 査読有

⑦ Wakabayashi Y, Uchida S, Funato H, Matsubara T, Watanuki T, Otsuki K, Fujimoto M, Nishida A. and Watanabe Y. State-dependent changes in the expression levels of NCAM-140 and L1 in the peripheral blood cells of bipolar disorders, but not in the major depressive disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2008 32: 1199-1205, 査読有

⑧Watanuki T, Funato H, Uchida S, Matsubara T, Kobayashi A, Wakabayashi Y, Otsuki K, Nishida A, Watanabe Y. Increased expression of splicing factor SRp20 mRNA in bipolar disorder patients. *Journal of Affective Disorders* 110: 62-69, 2008, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①Shusaku Uchida et al. HDAC2-mediated epigenetic repression of the GDNF gene in the ventral striatum modulates behavioral vulnerability to stress. Society for Neuroscience. 2009年10月19日. シカゴ

②Shusaku Uchida et al. HDAC2-mediated epigenetic repression of the GDNF gene in the striatum modulates behavioral vulnerability to stress. 第32回日本神経科学会年会. 2009年9月17日. 名古屋

③Shusaku Uchida et al. Epigenetic regulation of GDNF gene in a mouse model of depression and antidepressant action. 第31回日本生物学的精神医学会年会. 2009年4月24日. 京都

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 周作 (UCHIDA SHUSAKU)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10403669

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし