

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791132

研究課題名（和文）ストレス応答を制御する HPA 系に着目した自殺関連遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of suicidal-behavior related genes in the HPA axis regulating stress response

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）：現在、日本国内で社会問題となっている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に、我々はストレス反応を主に制御する HPA axis（視床下部一下垂体一副腎皮質系）関連遺伝子に着目し自殺との関連解析を行った。我々は FKBP5 遺伝子の特定のハプロタイプと自殺に有意な相関を認め、自殺行動には遺伝的脆弱性が関与していることを明らかにした。さらに ALDH2、NOS1 遺伝子と自殺、NOS1 遺伝子と統合失調症との有意な相関を認めた。これらの知見より自殺行動のバイオマーカーとしていくつかの遺伝子変異が利用できる可能性があることを示した。

研究成果の概要（英文）：We explored a positive association of suicidal behavior with certain haplotypes of FKBP5 gene which regulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in stress response. We additionally explored associations of suicidal behavior with polymorphisms of ALDH2 and NOS1 genes. We also found a positive association of schizophrenia with polymorphisms of NOS1 gene. 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
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：臨床精神分子遺伝学

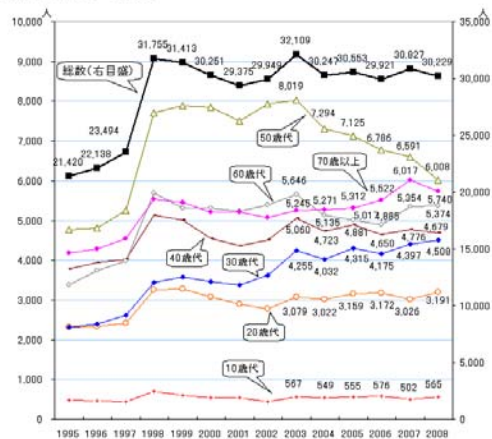
1. 研究開始当初の背景

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今まさに講じられようとしている。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ものと考えられる。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いるとされ、遺伝要因が関与していることが、家族研究、双生児研究等から示されている。

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と一致しない。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。しかしながら、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

自殺の生物学的基盤を明らかにし、自殺行動の生物学的マーカーを同定することを目的とする。今回、我々はストレス応答に関する HPA 系 (視床下部-下垂体-副腎皮質系) を制御する遺伝子に着目し、自殺との相

関研究を行った。これまでも生体ストレス応答制御に関する遺伝子に着目し、自殺との関連研究を行い、有意な結果を得てきたが、今回はストレス応答の主要な系である HPA 系に着目し、HPA 系応答制御に関する遺伝子群を選定し、自殺との関連研究を行うことで、ストレス応答を規定する自殺感受性遺伝子の同定を試みた。相関の見られた遺伝子については、自殺者死後脳と健常対照者死後脳を用いて、蛋白質解析を行い、ストレス負荷から自殺にいたる生物学的メカニズムを明らかにする。

また自殺を引き起こす精神疾患 (統合失調症やパニック障害) についても同様の関連解析を行い、生物学的基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

HPA 系応答制御に関する遺伝子群; 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)、CRH 受容体、バゾプレッシン受容体、糖質コルチコイド受容体、硬質コルチコイド受容体、オキシトシン受容体などをコードする遺伝子群の機能的一塩基多型をマーカーとして自殺との関連研究を試みる。またすでに報告されている HPA 系応答制御に関する FKBP5, a glucocorticoid receptor-regulating cochaperone of hsp-90 遺伝子の機能的多型もタイピングし、自殺との相関を調べる。相関解析により有意差が同定された遺伝子について、自殺者死後脳での脳内発現を調べ、自殺既遂者における変化を検証する。さらに統合失調症やパニック障害のサンプルについても同様の関連研究、発現解析実験を行う。

① 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関連研究

自殺既遂者 220 名、統合失調症 350 名、パニック障害 150 名、正常対照者各 380 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 度で保存している。HPA 系応答制御に関する遺伝子群に関して、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関連解析を行い、この遺伝子と自殺との相関の可能性を検討する。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。統合失調症やパニック障害のサンプルについても同様の解析を行った。

② 自殺既遂者・統合失調症者死後脳における免疫定量

相関解析により有意差が同定された遺伝子について、自殺既遂者の死後脳を用いて、Western Blotting 法により同遺伝子の免疫定量を行い、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。研究成果については順次、学会、国際誌上で発表を行う。

4. 研究成果

平成 21 年度はストレス応答を制御する HPA 系に着目した自殺関連遺伝子として、既に HPA 系制御との関連が報告されている FKBP5 遺伝子の 3 つの一塩基多型に着目して自殺企図者との相関研究を行った。さらに糖質コルチコイド受容体、硬質コルチコイド受容体、オキシトシン受容体についてもタグ SNP を選定し自殺との関連研究を行った。また相関研究の検出力を高めるためサンプル収集に努め、自殺企図者 DNA を 300 検体近く収集した。

① FKBP5 と自殺との関連解析

Haplotype block analyses among completed suicide and control groups.

Block	Haplotype	Ratios		χ^2	p values ^a
		Suicides (N = 219)	Controls (N = 228)		
FKBP5 block	rs3800373 TT	0.707	0.766	3.912	0.048 (0.294)
	rs1360780 GC	0.188	0.192	0.016	0.898 (1.000)
	TC	0.065	0.025	8.021	0.005 (0.034)
	GT	0.040	0.017	4.161	0.041 (0.263)
NR3C1 block	rs6196 AG	0.927	0.927	0.001	0.980 (1.000)
	rs10052957 GA	0.056	0.055	0.001	0.980 (1.000)
	GG	0.017	0.018	0.008	0.927 (1.000)
NR3C2 block	rs5525 GAG	0.735	0.711	0.648	0.421 (0.997)
	rs5522 AGC	0.188	0.186	0.009	0.923 (1.000)
	rs2070951 GAC	0.082	0.092	1.224	0.267 (0.908)

上に示したように特定のハプロタイプ TC が自殺と有意に相関していることを見出し、世界に先駆けて国際医学雑誌に報告した。自殺企図者と関連遺伝子の相関研究においてサンプル数も比較的多く、他の研究グループでも同遺伝子の自殺行動への関与を示唆する報告が続いており、今後、この遺伝子の機能異常がストレス環境下でどのように情動や行動に影響を及ぼすかを解明すれば自殺行動の病態解明につながる可能性がある。現在、動物モデルを用いてストレスとこの遺伝子の関連を解明する研究を準備中である。

② TPH2 と自殺の相関研究

自殺者においてはセロトニン神経系の生化学的な変化が報告されているが、その律速合成酵素である tryptophan hydroxylase (TPH) について、神経系での優勢な発現が確認されている TPH2 と自殺との相関を解析した。15 の tag SNP を用い、ハプロタイプ解析を行ったが、有意な相関は認められなかった。自殺の背景疾患として重要である統合失調症において、TPH2 に加え、TPH1 についても tag SNP を用いてハプロタイプ解析を行ったが、いずれの解析においても有意な関連は認められなかった。自殺と相関が報告されている。

Table 1
tagSNP association results.

Marker	dSNP ID ^a , variations	Position ^b	MAF in suicides	MAF in controls	SNP in controls	Sample power	Genotypic p values	Abs ^c , p values
1	rs428271, A/C	70618270	0.498	0.465	1.000	0.110	0.319	0.248
2	rs17923, T/C	70618190	0.483	0.446	0.471	0.130	0.301	0.289
3	rs1170992, T/A	70618420	0.504	0.503	0.959	0.090	0.831	0.950
4	rs1170986, A/C	70618362	0.516	0.502	0.957	0.090	0.663	0.462
5	rs1170995, A/C	70618327	0.498	0.471	1.000	0.090	0.340	0.400
6	rs130984, C/A	70618350	0.514	0.502	0.742	0.070	0.600	0.516
7	rs138493, C/T	70614446	0.503	0.502	0.968	0.030	0.531	0.572
8	rs138494, C/A	70614460	0.522	0.520	1.000	0.080	0.513	0.425
9	rs130515, C/A	7060120	0.440	0.439	0.310	0.070	0.662	0.543
10	rs138498, C/A	70614430	0.560	0.561	0.146	0.090	0.110	0.628
11	rs149278, T/C	7060118	0.263	0.172	0.961	0.220	0.230	0.682
12	rs1170984, T/C	7060114	0.513	0.501	0.201	0.120	0.214	0.242
13	rs428270, T/A	70618262	0.482	0.468	0.200	0.090	0.970	0.981
14	rs1170984, C/A	7076318	0.203	0.185	0.010	0.080	0.491	0.405
15	rs1170982, C/A	7073220	0.380	0.340	0.481	0.140	0.230	0.315

^a SNP identification number and position are determined by NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbSNP/>).

③ ALDH2 と自殺との関連解析

自殺にアルコール乱用、依存症の合併が高頻度に認められる。アジア人で認められる代謝酵素の多型は、アルコール依存症の発症に関与することが知られるためアルコール代謝に関わる ADH1B 及び ALDH2 における機能的多型と自殺との関連を調べた。ALDH2 の非活性型遺伝子多型の頻度が男性自殺者で有意に低いこと、さらにアルコール依存症との関連が報告されている ADH1B の活性型遺伝子多型と ALDH2 の活性型遺伝子多型の組み合わせが、男性自殺者で対照に比べ 10 倍高いことを見出した (下図)。つまり飲酒行動にプロテクティブに働く遺伝子型は自殺のリスクが低いことを示している。これは自殺行動を制御するマーカーとして有用な可能性があり、さらなる追試が必要と考える。

Table 2: Combined genotype of ALDH2 Glu487Lys and ADH1B Arg17His polymorphisms and OR (95% CI) for completed suicides

Male	ALDH2 Glu487Lys vs 10-to-A polymorphisms			
	ALDH2 GG	ALDH2 GA	ALDH2 AA	
	SVCT (%)	OR (95% CI)	SVCT (%)	OR (95% CI)
ADH1B His47Arg (A-to-G polymorphism)				
ADH1B AA	74 (58.5/86 (32.2))	1.0 (reference)	34 (17.7/50 (24.3))	0.61 (0.35-1.05)
ADH1B AG	41 (21.4/36 (17.1))	1.04 (0.60-1.83)	20 (10.4/28 (13.7))	0.63 (0.33-1.23)
ADH1B GG	10 (5.2/14 (2.8))	2.22 (0.67-7.45)	9 (5.1/12 (1.8))	2.68 (0.52-13.7)
Female				
ADH1B His47Arg (A-to-G polymorphism)				
ADH1B AA	29 (50.0/36 (31.0))	1.0 (reference)	28 (30.8/21 (18.4))	1.71 (0.81-3.43)
ADH1B AG	19 (20.9/21 (18.4))	1.16 (0.53-2.57)	9 (9.9/18 (15.8))	0.64 (0.25-1.65)
ADH1B GG	10 (10.0/7 (6.1))	NA [†]	0 (0.0/4 (3.5))	NA [†]

SV, suicide victims; CT, controls; OR, odds ratio; 95% CI, confidence interval.

[†]Not available due to lack of subjects within the categories.

^aP < 0.05.

④ NOS1 と自殺・統合失調症との関連解析と死後脳を用いた研究

自殺と有意に相関する統合失調症患者血液サンプルを用いた自殺や統合失調症関連遺伝子の探索も行い、神経型一酸化窒素合成酵素 NOS1 遺伝子と自殺、統合失調症両者の有意な関連を発見した。統合失調症においては女性患者の特に早期発症群でプロモーター上の機能的な一塩基多型との相関を認め、ま

たこの一塩基多型はヒト死後脳における NOS1 蛋白発現とも有意な関連があることを確認した。

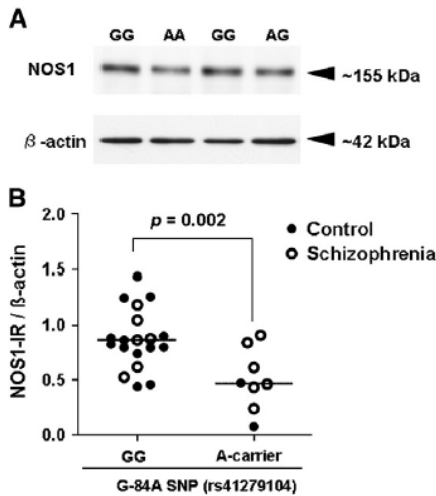


Fig. 2. A, Immunoblots of NOS1 and β -actin in individuals with AA, AG, GG carriers of the A-84G SNP. B, Comparison of NOS1 immunoreactivity between GG carriers and A-allele carriers of the G-84A SNP. Solid and open circles indicate control subjects and schizophrenia subjects, respectively.

これらも国際医学誌に報告した。とくに統合失調症の病態機序における一酸化窒素の関わりはほとんど研究が進んでおらず、神経発達、神経可塑性、記憶、神経障害など様々な領域に関わることが予想され、今後、生物学的マーカーや治療の創薬ターゲットになる可能性もある。

⑤ その他の研究と展望

当初の研究目的通り、HPA 系関連遺伝子の糖質コルチコイド受容体、硬質コルチコイド受容体、オキシトシン受容体と自殺の関連解析を試みたがいずれも有意な関連は認められなかった。；副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)、CRH 受容体、バゾプレッシン受容体、に関しては解析中である。FKBP5 と自殺の関連を発見したことにより、現在、動物モデルでのストレス下での FKBP5 変化を調べる実験を遂行中である。

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 14 件)

- ① Cui H, Supriyanto I, Sasada T, Shiroyiwa K, Fukutake M, Shirakawa O, Asano M, Ueno Y, Nagasaki Y, Hishimoto A (correspondent), Association study of EPL gene polymorphisms with suicide completers in the Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011 (epub). 査読有

- ② Sasai K, Tanaka K, Hishimoto A (correspondent), Alexithymia and its Relationships with Eating Behavior, Self-esteem, and Body esteem in College Women, *Kobe Journal of Medical Sciences* 2011 (in press). 査読有
- ③ Supriyanto I, Sasada T, Fukutake M, Asano M, Ueno Y, Nagasaki Y, Shirakawa O, Hishimoto A (correspondent), Association of FKBP5 gene haplotypes with completed suicide in the Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(1):252-6, 2011. 査読有
- ④ Huxing Cui, Naoki Nishiguchi, Masaya Yanagi, Masaaki Fukutake, Kentaro Mouri, Noboru Kitamura, Takeshi Hashimoto, Osamu Shirakawa, Akitoyo Hishimoto (correspondent), A putative cis-acting polymorphism in the NOS1 gene is associated with schizophrenia and NOS1 immunoreactivity in the postmortem brain. *Schizophrenia Research* 121(1-3):172-178, 2010. 査読有
- ⑤ Huxing Cui, Irwan Supriyanto, Migiwa Asano, Yasuhiro Ueno, Yasushi Nagasaki, Naoki Nishiguchi, Osamu Shirakawa, Akitoyo Hishimoto (correspondent). A common polymorphism in the 3'-UTR of the NOS1 gene was associated with completed suicides in Japanese male population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(6):992-996, 2010. 査読有
- ⑥ Kyoichi Shiroyiwa, Akitoyo Hishimoto (correspondent), Kentaro Mouri, Masaaki Fukutake, Irwan Supriyanto, Naoki Nishiguchi, Osamu Shirakawa, Kiyoshi Maeda. Common genetic variations in TPH1/TPH2 genes are not associated with schizophrenia in Japanese population. *Neuroscience Letters* 472(3):194-198, 2010. 査読有
- ⑦ Akitoyo Hishimoto (correspondent), Kentaro Mouri, Masaaki Fukutake, Yasushi Nagasaki, Migiwa Asano, Yasuhiro Ueno, Naoki Nishiguchi, Osamu Shirakawa. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and risk for suicide; A preliminary

observation in the male Japanese population. *Genes, Brain and Behavior* 9(5):498-502, 2010. 査読有

- ⑧ Mouri K, Hishimoto A (correspondent), Fukutake M, Shirakawa O, Nishiguchi N, Maeda K. Association Study of RGS2 Gene Polymorphisms with Panic Disorder in Japanese. *Kobe Journal of Medical Sciences* 55(5):116-121, 2010. 査読有
- ⑨ Mouri K, Hishimoto A (correspondent), Fukutake M, Shiroiwa K, Asano M, Nagasaki Y, Ueno Y, Shirakawa O, Nishiguchi N, Maeda K. TPH2 is not a susceptibility gene for suicide in Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 33(8), 1546-1550, 2009. 査読有
- ⑩ Qing-Rong Liu, Chun-Hung Pan, Akitoyo Hishimoto, Chuan-Yun Li, Zheng-Xiong Xi, Alvaro Llorente-Berzal, Maria-Paz Viveros, Hiroki Ishiguro, Tadao Arinami, Emmanuel Shan Onaivi, and George R. Uhl. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression, and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes, Brain and Behavior* 8(5), 512-530, 2009. 査読有
- ⑪ 「精神科外来における統合失調症患者に対するblonanserinの使用経験」菱本明豊, 福武将映, 山本泰司, 他. *臨床精神薬理誌*Vol. 12 No. 9, 1999-2009, 2009. 査読有
- ⑫ 細胞接着因子と精神疾患. 菱本明豊, 石黒浩毅. *日本生物学的精神医学会誌*Vol. 21. No.2, 97-104, 2010. 査読無
- ⑬ アルコール依存の生物学. 菱本明豊. *日本生物学的精神医学会誌*Vol. 21 No. 1, 39-46. 2010. 査読無
- ⑭ 「病歴の取り方」菱本明豊. *精神科*Vol. 15 No. 1, 16-24, 2009. 査読無

[学会発表] (計5件)

- ① Association of FKBP5 gene haplotypes with completed suicide in Japanese population; Akitoyo Hishimoto, Toru Sasada, Masaaki Fukutake, Kyoichi Shiroiwa, Irwan Suoriyanto, Osamu Shirakawa, 19th European Congress

Psychiatry-EPA2011, 2011. 3. (Austria)

- ② A putative cis-acting polymorphism in the NOS1 gene is associated with schizophrenia and NOS1 immuno-reactivity in the postmortem brain; Akitoyo Hishimoto, Taiwanese Society of Biological Psychiatry and Neuropsychopharmacology 2010 Fall Meeting, 2010. 9. (Taiwan)
- ③ Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and risk for suicide. Akitoyo Hishimoto, Kentaro Mouri, Osamu Shirakawa 18th European Congress Psychiatry-EPA 2011, 2010. 3. (Germany)
- ④ A genetic variation of NOS1 is associated with schizophrenia and NOS1 expression in the brain; Akitoyo Hishimoto, Cui huxing, Naoki Nishiguchi, Masaya Yanagi, Masaaki Fukutake, Kentaro Mouri, Noboru Kitamjura, Kenji Hashimoto, Osamu Shirakawa, 第32回日本生物学的精神医学会, 2010. 10. (福岡)
- ⑤ 自殺とBDNF遺伝子多型との相関研究; 吉田正邦、白岩恭一、イルワンスプリヤント、江口典臣、福武将映、笹田徹、菱本明豊, 第32回日本生物学的精神医学会, 2010. 10. (福岡)

[図書] (計4件)

- 1) 脳(ブレイン)バンク 精神疾患の謎を解くために, 加藤忠史&ブレインバンク委員会 光文社新書, 2011.
- 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.
- 3) 『子どもの心の診療シリーズ、4巻、子どもの不安障害と抑うつ(松本英夫、傳田健三編)』「自殺の生物学」.菱本明豊, 辻井農丞, 白川治, 中山書店, 2010
- 4) プロナンセリン100の症例「統合失調症の再発再燃例へのプロナンセリンの効果」菱本明豊, 星和書店, 99-101, 2009.

[その他]

生物学的精神医学会ブレインバンク委員会委員として一般書『脳(ブレイン)バンク 精神疾患の謎を解くために, 加藤忠史&ブレインバンク委員会 光文社新書, 2011』を執筆担当し、精神医学研究の啓蒙を行った。

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