

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月6日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890026

研究課題名（和文） クロモグラニンの構造変化における精神神経疾患との関連

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

## 研究代表者

飯嶋 良味 (IIJIMA YOSHIMI)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70574648

研究成果の概要（和文）：本研究は、精神神経疾患に関与するクロモグラニン B (CHGB) の機能について、病態にどのように関与しているかを解明するため、ヒト高次脳レベル、マウス個体レベルの解析により進めている。CHGB の遺伝子変異が、統合失調症に有意に関連することを大規模なサンプルを用いて確認した。さらに、血中の CHGB タンパク濃度が、統合失調症患者において高値であること、さらにヒトのストレス反応の重症度と相関することを見いだした。

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 perform to functional analysis of CHGB using human sample and genetically modified animal. I confirmed that the gene variation of CHGB was significantly related to schizophrenia using a large-scale sample. Furthermore, I found that the plasma CHGB protein level is high in a schizophrenia patient, and the plasma CHGB protein level related to the severity of the stress reaction.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：人類遺伝学・分子精神医学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：クロモグラニン、関連解析、SNP、統合失調症、筋萎縮性側索硬化症、SOD1

## 1. 研究開始当初の背景

機能的な精神疾患の一つである統合失調症は、人口の約1%を冒す重症の精神疾患で、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的な精神疾患は、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。分子遺伝学的研究により、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。しかし、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い、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 (Kitao Y et al., *Psychiatr Genet*, 2000)。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。私は、クロモグラニン B を統合失調症の発症脆弱性に関わる重要な分子と考え研究を行い、これまで以下のことを明らかにした。

1) クロモグラニン B 遺伝子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、クロモグラニン遺伝子の転写開始点上流 2000bp と各エクソン領域について、PCR ダイレクトシーケンス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。クロモグラニン B 遺伝子より同定した 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、クロモグラニン B 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 (Iijima Y, al., *Biol Psychiatry*, 2004)。さらに、統合失調症における各種臨床症状とクロモグラニン B 遺伝子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、クロモグラニン B 遺伝子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、精神病におけるクロモグラニン B 遺伝子の関連解析: 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、クロモグラニン B 遺伝子と、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、

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、クロモグラニン B 遺伝子 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、クロモグラニン B 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合同年会 Outstanding Paper Award 2005, The 20th Congress of Korean Society of Biological Psychiatry Young Scientist Award 2005)

3) クロモグラニン B 遺伝子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、クロモグラニン B 遺伝子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クロモグラニン B 遺伝子の 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 assesment of schizotypal personality) を用いた。クロモグラニン B 遺伝子上流域に存在する 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。

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関与している (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) に関与する可能性が示された。

## 2. 研究の目的

私がこれまでの研究で発見した、統合失調症や覚醒剤依存症と関連するクロモグラニン B 遺伝子変異による構造変化が、精神神経疾患の病態にどのように関わっているかを解明するため、①ヒト検体を用いた大規模関連解析およびストレス反応性との関連研究、② *chgb* ノックアウトマウスのストレス反応性と精神疾患様行動の評価、③ CHGB の構造変化が ALS 病態に与える影響、の 3 点について研究を進める。より広範囲の精神神経疾患と関連する同遺伝子変異のヒト高次脳レベル、マウスの個体レベルの解析により、CHGB の構造変化を手がかりとした神経伝達物質の放出調整や神経毒性による精神神経疾患の分子基盤と、行動への影響の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

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ている。①ヒト検体を用いた大規模関連解析およびストレス反応性との関連研究：当研究室で所有する統合失調症患者-健常対照者検体を対象に、*CHGB* 遺伝子領域とその上流・下流それぞれ 2kb について、Haploview プログラムを用い 8 つの Tag-SNP を選出し、遺伝子型を決定する。各遺伝子型の出現頻度について、 $\chi^2$  乗検定を行い統合失調症との関連を検討する。有意な結果の見られた SNP については、共同研究室内の所持する検体を用いて追認実験を行う。血中の CHGB 濃度については対象者の血漿サンプルを用い、ELISA 法にて測定する。ストレス反応評価については、自己質問紙法である HSCL (Hopkins Symptom Checklist) を用い、心身症状・強迫症状・対人関係過敏症・不安症状・抑うつ症状の 5 つの下位症状について評価を行った。② *chgb* ノックアウトマウスのストレス反応性と精神疾患様行動の評価：*chgb*-KO マウス作製のための ES 胚を外部研究機関より導入し、個体の作製を行う。*chgb*-KO

マウスについて、精神神経行動学的解析を行い、精神疾患様行動を評価する。さらにストレス負荷状態における行動変化を評価する。③ CHGB の構造変化が ALS 病態に与える影響：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。

## 4. 研究成果

(1) ヒト検体を用いた大規模関連解析およびストレス反応性との関連研究：統合失調症患者 506 名と健常者 941 名を対象に、*CHGB* の 8 つの Tag-SNP について遺伝子型を決定した。その結果、5' 調節領域に位置する 3 SNP (rs236137、rs236140、rs236141) において、統合失調症との有意な関連が見られた。続いて、統合失調症患者 2413 名と健常者 2852 名を対象に追認試験を行ったところ、rs236141 において有意な結果が確認された。対象を男性のみに限ると関連はさらに強くなった。続いて、統合失調症患者 179 名および健常者 357 名について血漿 CHGB を測定し、HSCL によるストレス反応評価を行い、疾患と血漿 CHGB 濃度との検討、および血漿 CHGB 濃度と精神症状スコアとの関連の検討を行った。その結果、この遺伝子型と血漿 CHGB の間には関連は認められなかったが、血漿 CHGB 濃度は統合失調症患者群において有意に高かった。ストレス反応評価において、心身症状・対人関係過敏症・抑うつ症状の重症度と CHGB 濃度は有意に相関していた。

(2) *chgb* ノックアウトマウスのストレス反応性と精神疾患様行動の評価：*chgb*-KO マウスを作製するべく、遺伝子変異導入 ES 胚の譲渡を受け、キメラマウスの作製を行った。キメラマウスより、生殖細胞系列に変異を伝達された個体を得て、Cre ドライバーマウスとの交配後、全身 *chgb*-KO 個体を得る予定であったが、キメラマウスより、生殖細胞系列に変異を伝達された個体を得ることができなかった。(キメラマウスに精巣奇形があったため)。そこで、*chgb*-KO マウスを有する研究機関より、KO マウスの精子を輸入し、KO 個体の発生を進めている。

(3) CHGB の構造変化が ALS 病態に与える影響：本年度は、ALS モデルマウスとして、B6.Cg-Tg (SOD1\*G93A) 1Gur/J の ♂へミ個体を導入し繁殖を行った。筋力の観察を行い病態の進行を評価している。今後は、*chgb*-KO 個体が得られ次第、実験テーマ②③を進めていく予定である。

## 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6件)

- ①Adachi N, Numakawa T, Kumamaru E, Itami C, Chiba S, Iijima Y, Richards M, Katoh-Semba R, Kunugi H. Phencyclidine-Induced Decrease of Synaptic Connectivity via Inhibition of BDNF Secretion in Cultured Cortical Neurons. (*Cereb Cortex*. 2012 Mar 30. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22467667]) 査読有り。
- ②Watanabe Y, Egawa J, Iijima Y, Nunokawa A, Kaneko N, Shibuya M, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N, Tochigi M, Kunugi H, Itokawa M, Ozaki N, Hashimoto R, Someya T. A two-stage case-control association study between the tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene and schizophrenia in a Japanese population. (*Schizophr Res*. 2012 Feb 17. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22342331]) 査読有り。
- ③Uezato A, Kimura-Sato J, Yamamoto N, Iijima Y, Kunugi H, Nishikawa T. Further evidence for a male-selective genetic association of synapse-associated protein 97 (SAP97) gene with schizophrenia. (*Behav Brain Funct*. 2012 Jan 6;8(1):2. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22225629]) 査読有り。
- ④Horiuchi Y, Iida S, Koga M, Ishiguro H, Iijima Y, Inada T, Watanabe Y, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Tochigi M, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Association of SNPs linked to increased expression of SLC1A1 with schizophrenia. (*Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2012 Jan;159B(1):30-7. doi: 10.1002/ajmg.b.31249.) 査読有り。
- ⑤Sasayama D, Hori H, Teraishi T, Hattori K, Ota M, Iijima Y, Tatsumi M, Higuchi T, Amano N, Kunugi H. Possible association between Interleukin-1beta gene and schizophrenia in a Japanese population. (*Behav Brain Funct*. 2011 Aug 16;7(1):35. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843369]) 査読有り。
- ⑥Sasayama D, Hori H, Iijima Y, Teraishi T, Hattori K, Ota M, Fujii T, Higuchi T, Amano N, Kunugi H. Modulation of cortisol responses to the DEX/CRH test by polymorphisms of the interleukin-1beta

gene in healthy adults. (*Behav Brain Funct*. 2011 Jul 5;7(1):23. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726461]) 査読有り。

[学会発表] (計6件)

- ①飯田周平, 堀内泰江, 飯嶋良味, 石黒浩毅, 稲田俊也, 渡部雄一郎, 染谷俊幸, 氏家寛, 岩田仲生, 尾崎紀夫, 功刀浩, 栃木衛, 糸川昌成, 新井誠, 新里和弘, 入谷修司, 柿田明美, 高崎均, 那波宏之, 有波忠雄「SLC1A1 遺伝子多型と統合失調症との関連解析」第56回日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会 共同大会 (幕張メッセ 2011年11/12)
- ②安達直樹, 沼川忠広, 熊丸絵美, 伊丹千晶, 千葉秀一, 飯嶋良味, Misty Richards, 仙波りつ子, 功刀浩「フェンサイクリジンが引き起こすシナプス減少に BDNF の機能障害が関与する: Possible involvement of BDNF dysfunction in the synaptic loss caused by phencyclidine.」第34回日本神経科学学会 (パシフィコ横浜 2011年9/17)
- ③Adachi N, Numakawa T, Kumamaru E, Itami C, Iijima Y, Richards M, Katoh-Semba R and Kunugi H: Possible involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) dysfunction in synaptic loss caused by phencyclidine. BIT Life Sciences' 4th Annual Protein and Peptide Conference. (Beijing, China, 3/23/2011.)
- ④飯嶋良味, 内山博文, 山本宣子, 荒木俊弥, 堀弘明, 巽 雅彦, 有馬邦正, 有波忠雄, 功刀浩「ChromograninB 遺伝子プロモーター領域の多型と統合失調症との性特異的関連」第55回日本人類遺伝学会 (大宮ソニックシティ 2010年10/28)
- ⑤Adachi N, Numakawa T, Kumamaru E, Itami C, Iijima Y, Richards M, Katoh-Semba R, and Kunugi H: PHENCYCLIDINE DECREASES EXCITATORY SYNAPSES: POSSIBLE INVOLVEMENT OF DYSFUNCTION OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR. The Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN). (Phuket Island, Thailand, 10/17/2010.)
- ⑥飯嶋良味, 内山博文, 山本宣子, 堀弘明, 巽 雅彦, 有馬邦正, 有波忠雄, 功刀浩「ChromograninB の発現調節に影響する多型と統合失調症との関連解析」第18回日本精神行動遺伝学会 (東北大学医学部 5号館 201号 総合研究棟会議室 2010年9/18)

[その他] (計1件)

総説  
飯嶋良味, 有波忠雄: 統合失調症-最近のGWAS研究の成果. *Bio Clinica*, Vol. 25, No. 6, 34-39, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯嶋 良味 (IIJIMA YOSHIMI)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70574648

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：