

## 精神疾患とセロトニン受容体遺伝子多型の分子病態解明

●岩田 伸生

藤田保健衛生大学医学部精神医学教室

### 〈研究の目的と進め方〉

**〔目的〕** 統合失調症を代表とする主要な精神疾患は多因子遺伝疾患と考えられているが現時点で確証的な要因は見いだされていない。我々はセロトニン (5-HT) 受容体遺伝子5Aサブユニットに存在するアミノ酸置換を伴う多型を新たに同定した。5-HT受容体5A遺伝子は脳のみ発現しており、脳の高次機能を含む何らかの中樞神経作用に介在しているものと考えられている。しかし現時点で脳の病態生理との関連は不明である。5A遺伝子を欠損させたマウスでは精神病様状態を引き起こす薬剤LSDを投与した際の反応性が、細胞レベルから行動レベルに亘って差異が見いだされた。本研究では、動物レベルでの傍証から本遺伝子と統合失調症或いは精神病様症状の発現に本遺伝子及び多型がどのように関与していくのかを、詳細に検討する。引き続き5-HT系神経伝達、特に5-HT受容体遺伝子多型から精神疾患病態解明・治療薬開発に至る解析法のプロトタイプを構築する。

**〔進め方〕** 診断・薬剤反応性・副作用出現に関する詳細な臨床データを備えた患者DNAデータセットを構築する。5-HT受容体遺伝子の変異検索・同定し、表現型と関連する変異を探索する。既報のものに加えゲノム遺伝子配列情報から新規の5-HT受容体遺伝子候補を推定し解析する。得られた変異の機能解析を網羅的に行う解析法を開発する。

### 〈研究開始時の研究計画〉

**1. 薬理遺伝学研究目的の精神疾患患者サンプルの収集と整備：**統合失調症患者、気分障害患者、及び正常対照者から精神科的評価とDNA抽出（同意の得られたものからはBリンパ球を不死化株化させる）を行う。薬剤反応性は、非定型抗精神病薬リスペリドンの治療反応性をPANSSで、また抗うつ薬のSSRIフルボキサミンに関してはHAM-Dを用いて計量化する。

#### **2. 5-HT受容体遺伝子多型検索同定：**

5-HT受容体遺伝子での多型検索をDHPLC法で行う。同定した変異を大量・迅速・簡便にgenotypeできる方法を開発。

**3. 遺伝子多型と精神疾患及び薬剤反応性との関連性検討**

#### **4. 5-HT5A15S多型の細胞レベルでの分子病態の検討：**

①C6グリオーマ細胞にPro型・Ser型の5-HT5Aを発現、受容体の発現量および種々の抗精神病薬への親和性を結合実験を行い検討する。

②forskolinで細胞を活性化した場合の5-HT5A受容体数増加や5-HTに対する親和性変化について比較する。

③C6グリオーマ細胞にstable transfectionした5-HT5A受容体の活性をマイクロフィジオメータ（細胞外pH測定用機器）を用いて測定する方法を確立し、Pro型・Ser型の5-HT5Aの機能を比較する。

④5-HT5Aでの各リガンド及び抗精神病薬に対する細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化をPro型・Ser型での差異を測定・検討する。

### 〈研究期間の成果〉

本研究計画は三省庁「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に則り、藤田保健衛生大学倫理委員会の承認を得ている。遺伝カウンセリング体制についても整備が完了し遺伝医療部門が開設されている。

1. 非定型抗精神病薬（統合失調症約100名）及びSSRI（大うつ病性障害約150名）での薬剤反応性、副作用を検討した検体を収集した。同意が得られた患者からはBリンパ球を株化保存している。

2. サブタイプ2B、4、5A、7遺伝子のアミノ酸翻訳領域の新規変異検索・同定を行った。アミノ酸置換を起こすcSNPs5個を含む計21個のSNPsを同定し、日本人集団での頻度、連鎖不平衡について検討した。

3. 統合失調症患者は変異型であるSer型5-HT5Aを正常対照者と比べ有意に多く持っていることを見いだした（9）。5-HT4遺伝子との有意な関連を見出した（表1）（6）。

リスペリドンの反応性について、HTR2A、DRD2、COMT各遺伝子でのSNPsマーカーと関連性を検討し、DRD2のハプロタイプが治療反応性を予測することを見出した（5）。

4. ①transient発現での125I-LSD結合実験を行った。LSD親和性の違いは認められなかったが、Ser型の受容体発現量はPro型の半分以下であった。安定発現も行い同様の結果を得た。②Pro型はフォルスコリンによる分化が抑制されたがSer型では分化が誘導された。マイクロフィジオメーターでのフォルスコリン感受性ではPro型・Ser型で差が認められた。

③5-HT5Aへの5-HT刺激反応は内因性β受容体と比べ非常に弱く高濃度（100μM）の5-HTが必要だった。結合実験でも5-HT親和性は他の5-HT受容体サブタイプに比較して低く、他の内因性伝達物質がある可能性が考えられた（4）。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

精神疾患に関する臨床データ収集から遺伝子多型解析、それに引き続き機能解析をセロトニン系に関して系統的に行っているグループは内外に見あたらない。本研究の成果は診断・投与薬剤決定予測のみならず、新規薬剤開発にとっても重要な知見となることが期待されている。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を測定し細胞内シグナル伝達の効率の差異を評価すること：5-HT5Aは細胞内シグナル伝達機構が不明でCa<sup>2+</sup>の測定だけではシグナル伝達を詳細に検討できない。そこで同時にcAMP、細胞内pHを同時に測定できる手法を開発すべく方針転換した。

〈今後の課題〉

- ①引き続きDNAデータセットの構築整備を充実させる
- ②変異検索・同定については全てのサブタイプについて行う。
- ③細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度と同時にcAMP、細胞内pHを同時に測定できる手法を開発し、5-HT<sub>5A</sub>の細胞内シグナル伝達機構について解明する。
- ④Pro型とSer型とでのシグナル伝達の際について検討し各種薬剤の影響や疾患病態生理との関連について検討する。
- ⑤バイオインフォマティクスを導入し新規5-HT受容体遺伝子候補を予測する。また5-HT<sub>5A</sub>との新規内在性伝達物質予測を行う。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
1. Ikeda M, Iwata N, Kitajima T, Suzuki T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N. Positive Association of the Serotonin 5-HT<sub>7</sub> Receptor Gene with Schizophrenia in a Japanese Population. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Sep 28; [Epub ahead of print]
2. Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N. No association of serotonin transporter gene (SLC6A4) with schizophrenia and bipolar disorder in Japanese patients: association analysis based on linkage disequilibrium. *J Neural Transm*. [Epub ahead of print] (2005)
3. Iidaka T, Ozaki N, Matsumoto A, Nogawa J, Kinoshita Y, Suzuki T, Iwata N, Yamamoto Y, Okada T, Sadato N. A variant C178T in the regulatory region of the serotonin receptor gene HTR3A modulates neural activation in the human amygdala. *J Neurosci*. 25(27):6460-6.(2005)
4. Okada M, Goldman D, Linnoila M, Iwata N, Ozaki N, Northup JK. Comparison of G-Protein Selectivity of Human 5-HT<sub>2C</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> Receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Nov;1025:570-7.
5. Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M, Ozaki N. Effect of DRD2, 5-HT<sub>2A</sub>, and COMT Genes on Antipsychotic Response to Risperidone: The *Pharmacogenomics Journal* 2003; 3(6): 356-61.
6. Suzuki T, Iwata N, Kitamura Y, Kitajima T, Yamanouchi Y, Ikeda M, Nishiyama T, Kamatani N, Ozaki N. Association of Novel Genetic Variants in the Serotonin 5-HT<sub>4</sub> Receptor Gene (HTR4) with Japanese Schizophrenia. *Am. J. Med. Genet*. 2003 Aug 15;121B(1):7-13.
7. Okada M, Irie S, Sawada M, Urae R, Urae A, Iwata N, Ozaki N, Nakanishi H. Pepstatin A Induces the Microglial Extracellular Acidification Distinct from Aspartic Proteases Inhibition: *Glia* 43(2): 167-174 (2003)
8. Noda M, Yasuda S, Okada M, Higashida H, Shimada A, Iwata N, Ozaki N, Nishikawa K, Aoki, Wada K. Recombinant human 5-HT<sub>5A</sub> receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways: *J. Neurochem*. 84, 222-232 (2003)
9. Iwata N, Ozaki N, Inada T, Goldman D: An Association of a 5-HT<sub>5A</sub> Receptor Polymorphism, Pro15Ser, to Schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 6, 217-219 (2001)

表1：HTR5A-Pro15Ser 多型と統合失調症との関連

	Genotype frequency			Allele frequency	
	P/P	P/S	S/S	P	S
精神分裂病 (n=249)	214 (0.86)	34 (0.14)	1 (0.00)	462 (0.93)	36 (0.07)
正常対照者 (n=253)	244 (0.96)	9 (0.04)	0	497 (0.98)	9 (0.02)

genotype frequency ; Schizophrenia vs controls c<sup>2</sup>=17.47, df=2, P=0.0002

allele frequency ; Schizophrenia vs controls c<sup>2</sup>=17.42, df=1, P<0.0001 Odds ratio: 4.30