

## 精神疾患の遺伝子発現データベースの構築と分子病態解析\*

●那波 宏之<sup>1)</sup> ◆斎藤 真子<sup>1)</sup> ◆水野 誠<sup>1)</sup> ◆高橋 均<sup>1)</sup> ◆村竹 辰之<sup>2)</sup> ◆高橋 誠<sup>2)</sup> ◆豊岡 和彦<sup>2)</sup>

1) 新潟大学脳研究所、2) 新潟大学大学院医歯学総合研究科、3) 新潟大学大学院医歯学総合研究科付属病院

### 〈研究の目的と進め方〉

統合失調症（精神分裂病）を始めとする精神疾患は、近代のストレス社会において、極めて多くの人が発症する難病である。現在、一部の遺伝性を呈する病系において遺伝解析がなされているが、多遺伝子支配であり生活環境に影響を受けている可能性が高く、病原遺伝子の特定には至っていない。ヒトの全ゲノム配列が解読されようとしている現在でも、その病態や診断基準を科学的に定義できていない。本課題では、申請者が保有する貴重な死後脳検体や患者血液をゲノム資源として用い、多因子疾患である精神疾患（うつ病、統合失調症）の遺伝子病態変化をRNAレベルで評価できるシステムを、申請者らの実績にもとづくDNAアレイ法により構築する計画を立てた。更に、これら遺伝子発現の変動情報（分子プロファイル）をデータベース化することは、各病態の総合的解明につながるばかりでなく、当該精神疾患のゲノム多型解析の標的遺伝子に関する情報も与えるものと考えられる。

精神疾患、中でも統合失調症や双極性障害、大うつ病などは、ヒトに多発するきわめて社会的インパクトの大きな疾患であるにもかかわらず、その生物学的理解や研究は他の末梢性疾患と比べて、大きく立ち遅れている。なかでも、大きな問題点の一つに、精神疾患の臨床学的定義が、心理症候学に準拠して分類されていることで、その定義や分類に生物学的根拠がどれほどあるか、はっきりしていないことである。研究者の中には、これら精神疾患の一元論を提唱するひともいて、実際にも1つの遺伝家系に統合失調症や双極性障害が重複して見られることも少なくない。極論を言えば、同じ上皮性腫瘍を胃癌、食道がん、十二指腸癌と分別しているのにも近いことなのかもしれないのである。このような問題を解決する一つの手段に、トランスクリプトーム解析がある。当該組織のmRNA発現パターンの変化を捉えることにより、同じような遺伝子変化をしているのならば、生物学的には同じ病気と定義できるかもしれないのである。特にDNAアレイを使ったハイスループットのトランスクリプトーム解析を用いてこれまでの仮説に左右されない脳内の遺伝子変化を捉えることにより、精神疾患を分子のレベルで客観的に研究するアプローチは、今後、この研究領域を変革する可能性を秘めている。

### 〈研究開始時の研究計画〉

精神疾患の死後脳を利用してRNAを抽出し、高品質のサンプルを選別することで、高品位の遺伝子プロファイリングを実施した。得られた各遺伝子の発現レベル情報は、qPCRで確認するとともに、統計解析、クラスター解析等に向け、病歴、病形、薬物治療歴等に対してその関連性を探る計画を立てた。加えて患者の末梢血からのRNAについても同様の遺伝子発現プロファイリングを試み、精神疾患の診断にも役立つかもしれない遺伝子プロファイル実験も計画した。なお、多くの患者は抗精神病薬を長期に服用しているため、この薬の影響を別途、評

価する必要がある。このためサルに対し抗精神病薬の長期投与を実施し、その脳よりRNAを抽出、同様にDNAマクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングを実施し、コントロールデータとした。当初計画した主なる実験は以下の通りである。

1) 放射能ラベルを用いたDNAマクロアレイの感度と特異性の検討

〉 DNAチップや蛍光DNAマイクロアレイと感度、特異性を比較し、脳内RNAのプロファイリングに適した手法を評価した。

2) 保管されている統合失調症患者の死後脳の評価

〉 どうしてもヒトの剖検組織を用いる場合には、死後変化が不可避である。DNAアレイを用いた場合に許容されるRNAの品質限界を検定した。

3) 統合失調症患者の脳における遺伝子発現プロファイリング

〉 統合失調症における精神機能変化と関係するといわれている脳部位、線条体と帯状回について遺伝子発現プロファイリングを実施し、統計解析により変動する遺伝子RNAの傾向を調べた。

4) 抗精神病薬（ハロペリドール）の脳内遺伝子発現への影響

〉 慢性患者サンプルでは、どうしても抗精神病薬の影響を否定できない。そこでハロペリドール投与したサルの脳から遺伝子プロファイリングを実施した。

5) 統合失調症の末梢血RNAの遺伝子発現変化

〉 脳組織同様、患者の末梢血（単核球）よりRNAを抽出し、精神疾患に伴い特異的に発現変化するRNAの同定を試みた。

6) PCR法をもちいた精神分裂病・病態候補遺伝子の多検体の検定

〉 上記のDNAアレイからのデータを検定する目的でqPCR法を用いて、各遺伝子からのmRNA量を定量した。

7) 統合失調症における遺伝子発現プロファイルのデータベース化と臨床精神症状の相関解析

〉 上記のDNAアレイによる遺伝子プロファイル結果をデータベースとして公表するとともに、クラスター解析や相関解析を試みる計画であった。

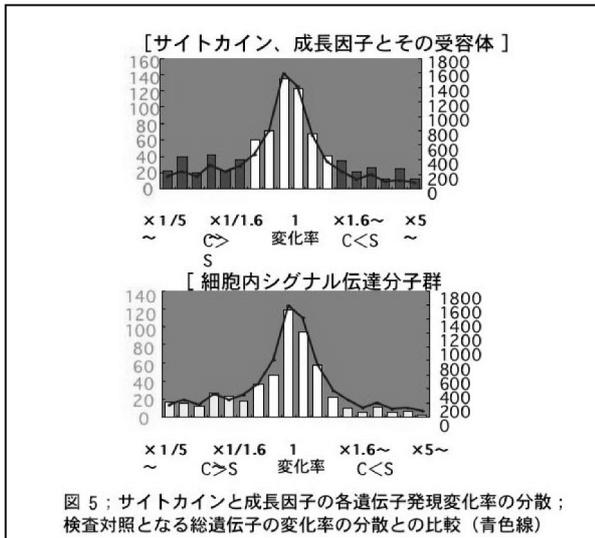
### 〈研究期間の成果〉

1) 放射能ラベルを用いたDNAマクロアレイの感度と特異性の検討

一般に現在トランスクリプトーム解析に用いられるDNAアレイは大きく3種類に大別される。最初にスタンフォード大学のブラウン博士ら中心となって開発されたsDNAや合成オリゴsDNAをガラス基盤に固着化したcDNAマイクロアレイで、現在、Genome System社、Imagene社、アジレント社など、多くの会社から販売されている。もう一つは、これら遺伝子sDNAをナイロンメンブレンに固定したDNAマクロアレイとも呼ばれるもので、放射化したcDNAやcRNAなどハイブリさせて、そ

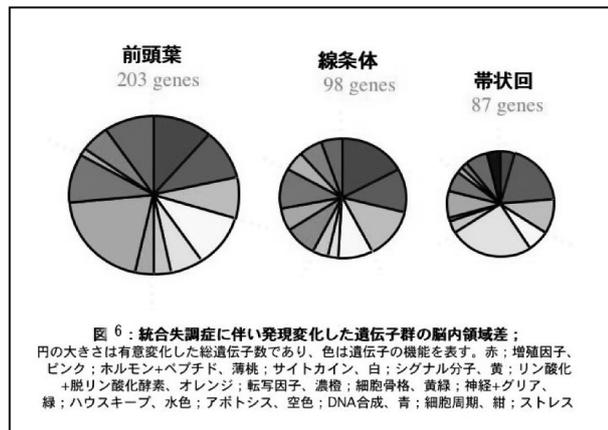


く、次いで、トランスポーター受容体チャンネル群の遺伝子群の8.2%、神経細胞特異的タンパク遺伝子群の6.0%等々と続いた。他の脳部位、線条体や前頭葉におけるプロファイリング結果とは、そのRNAプロファイルがおおきく異なり、統合失調症において帯状回は特異な脳形態



を示すことが判明した。これまでの統合失調症に伴う脳内遺伝子発現変化率を、脳全体（前頭前野と線条体と帯状回を合わせて）で、各遺伝子グループ間で比較してみた。図5にあるように、最も顕著な発現変化を示した遺伝子タイプはサイトカイン・成長因子の関連遺伝子であった。調べた遺伝子全体の発現変化率分布と比較して、これらの遺伝子mRNAの発現は、統合失調症に伴ってより大きく変化していた。

さらに、プロファイルした3つの脳部位（前頭前野、線条体、帯状回）間でも、その傾向も比較してみた（図6）。有意変化と定義した遺伝子は、ここで1.5倍以上、もしくはそれ以下の変化のもので、サンプル数（N=6）づつのTテストで有意（P<0.05）を示したものである。最も大きな遺伝子発現変化を呈したのは前頭葉であって、約3000の既知遺伝子のうち約200遺伝子が発現変化を示して



いる。なかでも、この前頭葉で顕著な発現変化を呈したグループはグリア細胞・神経細胞に特異的な遺伝子群であった。一方、帯状回での遺伝子発現変化は、この調べた脳3部位の中でもっとも緩和であった。この帯状回では、統合失調症に伴って蛋白リン酸化・脱リン酸化を担う酵素類が、もっとも大きな遺伝子発現変化を示していることが特徴的であった。

#### 4) 抗精神病薬（ハロペリドール）の脳内遺伝子発現への影響

の影響

サルとの遺伝子とヒトのそれは、90%以上の相同性があることが報告された。この事実から、ヒトのDNAアレイをもちいてサルの遺伝子プロファイリングを実施して支障の無いことが判明した。そこでカニクイザルを用いて、抗精神病薬の慢性作用を前頭葉において遺伝子プロファイリングした。これにより上記の抗精神病薬の標的遺伝子の同定と病態遺伝子の弁別を試みたのである。カニクイザルのRNAに対しても、ヒト用のDNAマクロアレイは十分、交差シグナルを与えて、サル遺伝子のRNAプロファイリングにも応用できることが判明した。

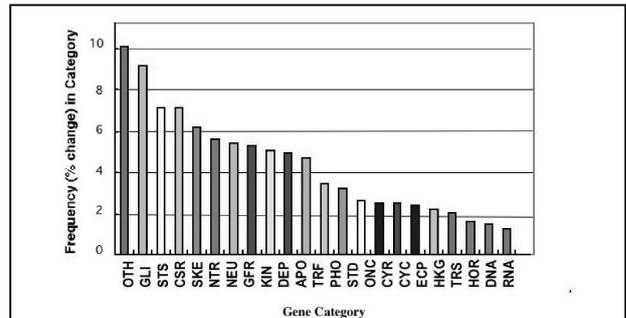


図7: 抗精神病薬を投与されたカニクイザル前頭前野の遺伝子プロファイリング  
 遺伝子数3; 統計関数P<0.10 GFR: 成長因子(107), DNA: DNA合成(31), ECP: 細胞外基質(93), APO: アポトシス(82), ST: ストレス(17), DEV: 分化因子(37), CYC: 細胞周期(66), CYR: サイトカイン(92), CSR: 表面抗原(76), OTH: その他(47)  
 KIN: キナーゼ(94), STD: シグナル分子(103), TRF: 転写因子(105), TRS: チャンネル(36), NEU: 神経分子(38), SKE: 細胞骨格(80), HKG: ハウスキープ(78), NTR: 神経伝達(86), HOR: ホルモン+ペプチド(23), PHO: 脱リン酸化(48), RNA: RNA結合(4), ONC: 癌遺伝子(18)

サルでの実験ではサンプル数（N）が3つつであったので、有意水準をP<0.10まで緩くし、ヒト患者でのN=6比較での検出力と対応させた。カニクイザルへの抗精神病薬の慢性投与においても、グリア細胞に関連する遺伝子の発現変化が前頭葉で顕著であった。従って、前述の患者前頭葉におけるグリア関連遺伝子の発現変化も、ドパミン受容体D2の遮断薬（抗精神病薬）の影響を反映している可能性を示唆していた。

#### 5) 統合失調症の末梢血RNAの遺伝子発現変化

これまでに実施した統合失調症の死後脳3領域における病態遺伝子プロファイル結果から、いずれの脳部位でも、サイトカインなどの液性分化因子mRNAの発現変化が際立っていた。このことは、本疾患が単なる脳機能異常に由来するのではなく、免疫系を含む全身性の疾患であることを示唆していた。

統合失調症の末梢血マーカー遺伝子を統合失調症患者と健常者の単核球RNA発現プロファイルと比較することで同定する計画を実施した。ハイスループットの信頼性の高い検索できるアフィメトリクス社のDNAチップを用いて、約12000個の遺伝子発現プロファイリングを既知遺伝子対象とした。サンプルは最終的に患者・家族の同意のもと慢性統合失調症患者14例、未治療の急性統合失調症患者9名、健常者コントロール12例の血液を収集し、血球のRNAを用いた。その結果、各患者群と健常者の比較で約100種類mRNAが統計学的有意に2倍以上の変化を呈した。そのうちの約半数の遺伝子が、慢性患者群にのみ強い相関を示したことから、抗精神病薬の下流遺伝子だと推定された。

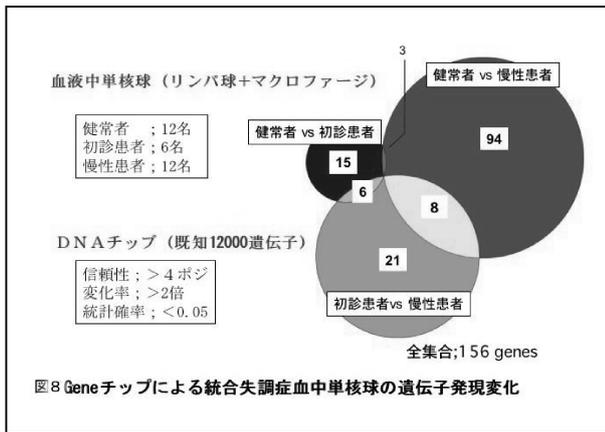


図8 Geneチップによる統合失調症血中単核球の遺伝子発現変化

実施した統合失調症患者の末梢血球のプロファイリングによると、確かに患者の免疫系、血球系シグナルに機能異常が存在することが確認できる。実際、患者血球で変化していたサイトカインmRNAの一部は、確かにSNP解析において統合失調症との有意な連鎖が報告されていたニューレグリン1遺伝子を含んでいた。しかし、これらmRNA変化が他の精神疾患等にもともなう心理ストレスなどの変化を反映している可能性、薬物治療の影響を受けている可能性は依然として残る。そこで、更に感情障害の患者を含めて弁別できるかどうかを、他の精神疾患患者のRNAサンプルを含めて下記のように実施した。

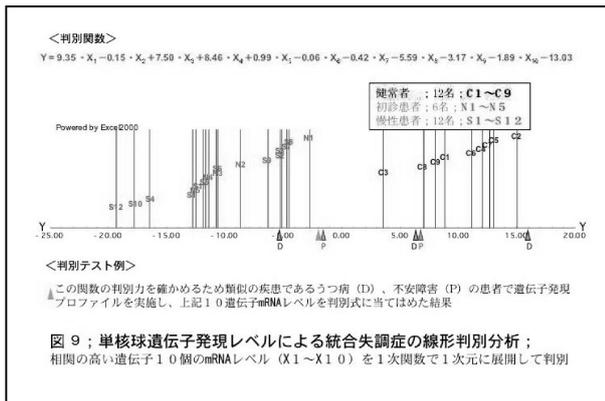


図9 単核球遺伝子発現レベルによる統合失調症の線形判別分析；  
相関の高い遺伝子10個のmRNAレベル (X1~X10) を1次関数で1次元に展開して判別

候補遺伝子のなかから、急性期から慢性期の経過の中で変動する遺伝子を中心に、病態との相関性及び個体間差の少ない遺伝子を十個選別し、1次線形判別式を図9のように策定した。さらに統合失調症患者でみられた末梢単核球内の遺伝子変化が、ストレスなどの一般的精神状態を反映している可能性を検定するため、健康者に加え、大うつ病患者や不安障害の患者のサンプルも追加的に検定した。別途、同様の遺伝子プロファイリングを実施し、これらの遺伝子のmRNA量を割り出し、この1次線形判別式にかけた。6例中、5例は健康者領域の数値を得たので、選別した10遺伝子からなる遺伝子群は、統合失調症に極めて特異性が高いと推察された。

#### 8) PCR法をもちいた精神分裂病・病態候補遺伝子の多検体の検定

統合失調症患者の脳内で変化した遺伝子について、他のサンプルを加えてqPCR法によりmRNAを定量したが、半分近くに遺伝子が、PCRと異なる結果を出した。実験者の技量にもよるが、qPCRの定量限界は2倍以上の変化しか正確に検出できないことが判明した (下記参照)。

#### 9) 統合失調症における遺伝子発現プロファイルのデー

#### データベース化と臨床精神症状の相関解析

色々な種類の変数で順位付けしたデータを、所属機関のWEB上に公開し、外部の利用を可能とした。残念ながら、高品質の剖検脳や未治療患者血液が20例を越えるほど収集できなかったために、臨床症状との相関解析は実施できずに終わった (下記参照)。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

現在、我が国では、300万人近い精神障害者がいて、35万人が入院を余儀なくされている。また医療費の面からも、社会的健全性からかかえている問題は計り知れない。その意味で、本研究所所蔵のヒトゲノム資源を駆使して、精神疾患の病態を遺伝子レベルで把握、分類できたことは有用な情報を与えたと考える。同定した末梢血内統合失調症関連遺伝子には、アイスランドでの家系連鎖解析で統合失調症との連鎖が報告されたニューレグリン1遺伝子が含まれていたことも、この解析がそれなりの精度を有していたことを示唆している。

実際、これまでに実施した統合失調症の死後脳3領域における病態遺伝子プロファイル結果から、いずれの脳部位でも、サイトカインなどの液性分化因子mRNAの発現変化が際立っていた。このことは、本疾患が単なる脳機能異常に由来するのではなく、免疫系を含む全身性の疾患であることを示唆していた。これまでに実施した統合失調症患者の末梢血球のプロファイリングによると、確かに患者の免疫系、血球系シグナルに機能異常が存在することが確認できる。加えて、本成果は各種精神疾患を末梢血レベルで診断しうる可能性を与えた。これらの結果に基づいて、医療検査会社が精神疾患の末梢血プロファイリングにより分子診断する試みが現在進行している。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1) 遺伝子発現変化のみられた数百遺伝子に対してその検証を試みた。変化率が大きい遺伝子については、このリアルタイムPCR法で追試が効いたが、変化率の小さなものは出来なかった。これは、本来qPCRでの変化定量限界が2倍以上必要であり、DNAアレイの定量検出感度の方が勝っているためだと考えられる。今後発現変化率の小さいRNAについてどの様に追試してゆくか、課題を残している。

2) 本プロジェクト発足当初は、遺伝子倫理規定の概念も曖昧であって、自由度も高かったが、以後の遺伝子倫理規定の発布に伴い、遺伝子プロファイリングはその規定での境界研究とみなされ、本学では、その審査を余儀なくされた。審査の結果は、「該当せず」との結論であったが、相当な時間、研究がとどこうってしまった。コントロールとする対象群の剖検組織についても確保がむづかしく、法医学の教室の協力を要請した。しかし自殺者の法医解剖例の利用は、同意のないものであり法医学会自身もその結論を先送りしていることもあって、結局、遺伝子倫理審査にも掛けられなかった。過去の経緯を考えるとなかなか微妙な問題であるが、当該学会において統一的な見解、方針がいち早くでることが望まれた。

3) 認知障害などを伴う統合失調症の患者本人に詳細な研究目的とプライバシーなどの詳細を正確に理解してもらうことは容易ではなかった。統合失調症を含め対象とした病気が精神疾患であったこともあり、血液サンプルの採取も、結局、病型との相関解析が出来るほどサンプル数が確保できなかった。

## 〈今後の課題〉

上記の統合失調症患者における遺伝子発現変化とは何を意味しているのであろうか。我々が捕らえた遺伝子発現変化は、①統計学的ノイズや②死後変化を含め、③統合失調症の患者さん脳内の病態を反映する遺伝子群や④病原を反映する遺伝子群、⑤それらの感受性変化を規定する遺伝子群、⑥抗精神病薬の下流遺伝子群、⑦その副作用を担う遺伝子群などの複数トランスクリプトーム群の変化傾向を反映していたと考えられる。

これら各トランスクリプトーム群を弁別するためにも今後、投薬のトランスクリプトーム解析の他、死後経過時間の異なるサンプルの解析などを実施して、各トランスクリプトームとその変化要因を識別していくことが重要になるであろう。また、ゲノム創薬という観点でも、これらの各トランスクリプトームを創薬分子ターゲットとして設定することも考えられる。たとえば、③の統合失調症の病態トランスクリプトームの発現変化や機能変化を逆転させる薬は、治療薬としての可能性を秘めている。このように総合失調症に関連する各トランスクリプトームを見つけ出すことで③は対処薬、④根治治療薬、⑤予防薬、⑦副作用防止薬を開発できるかもしれないのである。このように、精神疾患であっても、末梢組織のトランスクリプトーム解析が病態や診断マーカーの候補遺伝子の情報を与える可能性がある。

これまで、統合失調症の治療薬の分子標的といえどパミンやセロトニンの受容体や代謝に関連するものがほとんどであった。しかし、この分子標的は30年来、変わっておらず画期的な新薬の開発は行き詰っているのが現状である。しかし、このようなトランスクリプトーム解析が進めば、新規の分子標的をターゲットとして開発された新薬を口にする日もそう遠くないかもしれない。

## 〈謝 辞〉

ここで紹介した生データが由来するプロジェクト研究は、御協力いただいた患者家族の皆さまと以下の研究者との共同の成果であり、この場を借りて感謝したい。新潟大学脳研究所、須貝哲二、今井千奈、若林孝一、三菱ウェルファーマ、二村隆史、新潟大学医学部、染矢俊幸、国立療養所犀潟病院、巻淵隆夫、高橋康男、神戸大学医学部、白川治、北村登、橋本健志、都立松沢病院、入谷修司、新里和弘、黒木規臣、中村亮介（敬称略）。

## 〈研究期間の全成果公表リスト〉

### 1. 英論文

① 0208071556;  
Watakabe A, Sugai T, Nakaya N, Wakabayashi K, Takahashi H, Yamamori T, Nawa H. (2001) Similarity and variation in gene expression among human cerebral cortical subregions revealed by DNA macroarrays: technical consideration of RNA expression profiling from postmortem samples. *Mol Brain Res.* 88:74-82.

② 0208071513;  
Imai C, Sugai T, Iritani S, Niizato K, Nakamura R, Makifuchi T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H. (2001) A quantitative study on the expression of synapsin II and N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein in schizophrenic patients. *Neurosci Lett.* 305(3):185-188.

③ 0403261413;  
Sugai T, Kawamura M, Iritani S, Araki K, Makifuchi T, Imai C, Nakamura R, Kakita A, Takahashi H, Nawa H. (2004) Prefrontal abnormality of schizophrenia revealed by

DNA microarray: impact on glial and neurotrophic gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Oct;1025:84-91.

④ Yanagi M, Shirakawa O, Kitamura N, Okamura K, Sakurai K, Nishiguchi N, Hashimoto T, Nushida H, Ueno Y, Kanbe D, Kawamura M, Araki K, Nawa H, Maeda K. (2005) Association of 14-3-3 epsilon gene haplotype with completed suicide in Japanese. *J Hum Genet.* In press.

⑤ 0501291821;  
Watakabe, A., Komatsu, Y., Nawa, H., Yamamori T. (2005) Gene expression profiling of primate neocortex: molecular neuroanatomy of cortical areas. *Genes Brain Behav.* In press.

## 2. 特許申請

⑥ 0501291959;

公開番号 : 特許公開2004-135667

公開日 : 2004年5月13日

出願人 : 新潟大学、科学技術振興機構

発明者 : 那波宏之、川村名子、染矢俊幸

発明の名称 : 血液を用いた統合失調症の診断方法

⑦ 0501292007;

公開番号 : 特許公開2003-235557

公開日 : 2003年8月26日

出願人 : 新潟大学長外1名

発明者 : 那波宏之、入谷修司、高橋均

発明の名称 : 精神分裂病により発現量に変化する遺伝子を規定する核酸を解析する方法

## 3. データベース

⑧ 0504280949;

Sugai, T., Kawamura, M., Iritani, S., Araki, K., Makifuchi, T., Imai, C., Nakamura, R., Kakita, A., Takahashi, H., Nawa, H. (2005) 前頭前野 データベース; 統合失調症における脳内遺伝子発現プロファイル

[http://brain.bri.niigata-u.ac.jp/~molecular/db\\_A1.html](http://brain.bri.niigata-u.ac.jp/~molecular/db_A1.html)

⑨ 0504280953;

Iritani, S., Sugai, T., Kawamura, M., Araki, K., Makifuchi, T., Imai, C., Nakamura, R., Kakita, A., Takahashi, H., Someya, T., Nawa, H. (2005) 線条体 データベース; 統合失調症における脳内遺伝子発現プロファイル

[http://brain.bri.niigata-u.ac.jp/~molecular/db\\_A2.html](http://brain.bri.niigata-u.ac.jp/~molecular/db_A2.html)

⑩ 0504280959;

Kawamura, M., Iritani, S., Sugai, T., Makifuchi, T., Nakamura, R., Kakita, A., Takahashi, H., Someya, T., Nawa, H. (2005) 統合失調症における脳内遺伝子発現プロファイル; 帯状回 データベース

[http://brain.bri.niigata-u.ac.jp/~molecular/db\\_A3.html](http://brain.bri.niigata-u.ac.jp/~molecular/db_A3.html)

\*注) 本研究は、年度ごとに課題名や分担者が若干修正されている:

平成12年度 那波 宏之(代表)、高橋 均、齋藤 真子、「DNAアレイと最新 PCR法を用いた精神疾患の分子病態解析とデータベース構築」

平成13年度 那波 宏之(代表)、高橋 均、齋藤 真子、「精神疾患の脳内遺伝子発現データベースの構築と分子病態解析」

平成14年度 那波 宏之(代表)、高橋 均、高橋 誠、水野 誠、豊岡 和彦「精神疾患の遺伝子発現データベースの構築と分子病態解析」

平成15年 那波 宏之(代表)、高橋 均、豊岡 和彦「精神疾患の遺伝子発現データベースの構築と分子病態解

析]

平成16年 那波 宏之(代表)、村竹 辰之、水野 誠  
「精神疾患の遺伝子発現データベースの構築と分子病態解  
析」