〈抄録〉 第 23 回 日本臨床薬理学会年会 2002 年 12 月 10~11 日 大阪

ADRG34/kf-1 をモデルとしたうつ病治療 反応性に関わる遺伝子多型の探索

山田 光彦^{*1} 開発 めぐみ^{*2} 高橋 弘^{*2} 平野 美保^{*2}
角田 美果^{*2} 西岡 玄太郎^{*3} 工藤 謙太郎^{*3} 山田 美佐^{*2}
百瀬 和享^{*2} 上島 国利^{*3} 樋口 輝彦^{*4}

うつ病の病態を探る研究はモノアミン仮説を中心に進められているが、抗うつ薬の有効性は約 70%に過ぎず治療抵抗性うつ病は臨床において大きな問題となっている。そこで我々は、うつ病治療機転において重要な役割を果たしているヒト蛋白分子を網羅的に単離しその機能を決定する手法により、うつ病治療反応性に関わるメカニズムの解明を試みることを試みた。つまり「うつ病治療反応性の低い患者ではうつ病が治癒するのに重要な機能分子システムがうまく機能しない」という作業仮説の検証を進めている。本研究では、我々が独自のマイクロアレイを用いて実験動物脳より単離した抗うつ薬関連候補遺伝子 ADRG34/kf-1 について詳細に検討し、そのヒトホモログの翻訳領域に存在する遺伝子多型 (SNP) の検索を行った。

ADRG microarray による ADRG#34 の発現解析：

これまで我々は、うつ病の病態に関するさまざまな仮説にとらわれることなく、抗うつ薬の奏効機転に関与する蛋白質をスクリーニングす

るために、Differential Cloning 法を用いて、対照群に比べ抗うつ薬 3 週間投与群において特異的に発現が増減する複数の cDNA 断片 (Antidepressant-related Genes, ADRGs) を ESTs (Expressed Sequence Tags) として同定し塩基配列を決定してきた。得られたクローンについて再現性の確認及び定量を行ってきたが、非常に労力を要するものであった。そこで我々は、この過程の効率化と迅速化を図るため、ADRG 遺伝子をスポットした独自の ADRG microarray を自主開発した。

ADRG microarray 解析の結果、ラット前頭葉皮質において、抗うつ薬の長期投与後に多岐にわたる遺伝子群の発現の変化が示された。その中の 1 つ ADRG#34 について RT-PCR 法を行ったところ、イミプラミン、サートラリンの長期投与、長期 ECT 負荷により有意な発現の増加が認められ、ADRG microarray を 2 次スクリーニングとして用いることの有効性が確認された。抗うつ薬、ECT による治療効果発現には数週間が必要であることより、ADRG#34 の発現増加が臨床効果を反映している可能性が示唆された。

ADRG#34 の発現分布の検討：

^{*1} 昭和大学附属烏山病院精神科
〒157-8577 東京都世田谷区北烏山 6-11-11

^{*2} 昭和大学薬学部薬理学

^{*3} 昭和大学医学部精神医学

^{*4} 国立精神・神経センター国府台病院

ADRG#34 フラグメントを [^{32}P]-dCTP 存在下ランダムプライム法によりラベルし、ラット全身における ADRG#34 の発現分布について Northern Blotting 法を行ったところ、心臓、脳、肝臓、腎臓に多く発現し、肺にも認められるが、脾臓、骨格筋には非常に少なくまたは発現していないことが明らかとなった。

ADRG#34 の全塩基配列決定と SNP 探索：

得られた ADRG#34 の部分塩基配列をもとに全塩基配列を決定したところ、全長 3262 bp であり、783-2828 bp が open reading frame であると考えられ、約 79kDa のタンパクをコードすると考えられた。同定した ADRG#34 の全塩基配列及び予想アミノ酸配列は、EMBL-GeneBank に登録した (AF306394)。

さらにモチーフ検索を行った結果、618-659 AA の位置に、Zinc finger family の一つである Ring-H2 finger モチーフが存在することが明らかとなった。次に、予想される ADRG#34 の RING-H2 finger モチーフの2次構造を解析したところ、systeine 及び histidine が2価の金属イオンと錯体を形成すると考えられた。

Ring-H2 finger モチーフは、Zinc finger の変形モチーフとして報告され、細胞内の機能調節や分化に関連した核内蛋白質中でファミリーを形成し、ウイルスからヒトまで広範にわたってよく保存されていることが明らかとなっている。Zinc finger は、TFIIIA の DNA 結合モチーフとして提唱されて以来、sp1、核内レセプター群、GATA 因子群、癌遺伝子産物 ErbA などの転写因子中に見出されているが、DNA 結合性を示さないとの報告もあり、現在までのところ詳細は明らかとなっていない。最近、Ring-H2

finger モチーフを有する数種類のタンパク質が細胞内で不要となったタンパクのユビキチン化(分解)に関与しているとの報告もある。

ヒト ADRG34/kf-1 遺伝子は 685 アミノ酸よりなる蛋白質をコードしており、第 2 染色体 (2p11.2) にマッピングされている。文書により同意の得られた健常ボランティアの染色体 DNA サンプルをもとに direct sequence 法により SNP の検討を行った結果、RING-H2 finger モチーフ周辺に SNP を発見した。今後は、患者サンプルを用い、抗うつ薬治療反応性に関わる系統的遺伝子多型比較検討を行うことで、新しい診断法、治療法の開発のための基盤的知識が集積されと考えている。

我々は、ADRG#34 のような個々の抗うつ薬関連遺伝子の一連の研究成果により、うつ病の治療機転の分子システム・分子メカニズムが解明されることを期待している。また、うつ病の病態の解明、副作用の少ない新しい作用機序の抗うつ薬の創薬、ECT のもつ生化学的作用、神経科学的効果を模倣しながら有害作用の少ない薬物の開発につながると期待される。

本研究は、昭和大学医学部「医の倫理委員会」により承認されたプロトコールに則り収集された試料を用いて行われた。

参考文献

- *Nishioka et al., Journal of Neural Transmission, in press, 2002
- *Yamada et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 278, 150-157, 2000