

200500777A

厚生労働科学研究費補助金  
こころの健康科学研究事業

DNA チップを用いたうつ病の診断と病態解析

平成17年度 総括・分担報告書  
主任研究者 大森 哲郎

平成18(2006)年 4月

## 目次

### I. 総括研究報告

DNA チップを用いたうつ病の診断と病態解析

大森哲郎 ----- 1

### II. 分担研究報告

1. DNA チップを用いたうつ病の診断と病態解析

—電気けいれん療法（ECT）による mRNA 発現の変化に関する研究—

原田誠一 ----- 11

2. 精神病性障害の評価と解析

橋本亮太 ----- 16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

DNA チップを用いたうつ病の診断と病態解析

主任研究者 大森哲郎 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授

#### 要旨

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたし、自殺企図に結びつく。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断は、社会全体の急務である。主任研究者らは、ストレス反応と関連する遺伝子の mRNA の発現量を一括解析する DNA チップを開発した。これを用いた研究から学位審査などのストレスに曝されると、共通の遺伝子発現が増減し、翌日には回復することが判明している。本研究はこの DNA チップをうつ病の診断と病態解析に応用するものである。分子生物学的な先端技術に応用した先駆的な研究でありながら、患者負担は最少 2.5ml の通常採血のみであることから臨床応用が容易である。これまでの検討から、うつ病と健常者とを識別することに成功している。またリアルタイム PCR 法によっても、うつ病における特定遺伝子 mRNA 発現の変化を確認している。本研究は、DNA チップという新たな方法論を導入して、うつ病の早期診断、治療評価および病態研究に画期的な進歩をもたらすものである。

#### 分担研究者

原田誠一 国立精神・神経センター武蔵病院 外来部長

橋本亮太 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第三部室長

#### A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつく。年間3万人以上にものぼる自殺者の多くがうつ病に罹患していたと推定される。また、怠学、失職、引きこもりなどの社会的問題やアルコール関連障害などの医学的問題にも深く関連している。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務で

ある。病態の評価、早期診断、及び治療評価に応用できる簡便かつ客観的な指標の確立の意義は絶大であり、その必要性は高い。

我々のグループは、神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などと関連する遺伝子1500種のmRNAの発現量を、白血球を試料として一括解析するDNAチップを開発した。学位審査発表などの心理的ストレスにさらされると、特定の遺伝子発現が増減し、翌日には回復することを見出し、ストレスに鋭敏に反応する測定系とな

ることを確認している。本研究の目的は、このDNAチップを用いて白血球中のmRNA発現量を解析し、うつ病の診断と病態解析へ応用することである。

## B. 研究方法

徳島大学精神科神経科を受診した未治療のうつ病患者のうち、本診断法開発のための研究に参加することについて文書により説明し同意を得たものを対象とした。診断は、DSM-Vの中等症または重症うつ病エピソードに合致するものとし、精神病症状をともなう重症うつ病エピソードおよび双極性障害うつ病エピソードは今回の解析対象からは除外した。また精神科合併症を有するもの、重篤な身体合併症を有するもの、および身体疾患治療薬を服用しているものは除外した。採血は、午前10時から午後1時までの間に医師または看護師が、安静下に肘静脈より行った。うつ病の重症度はハミルトン評価尺度で評価した。外来診察終了後に血液5-10mlを採取した。キアゲン社製mRNA抽出用試験管を用いてmRNAを抽出した。抽出したmRNAの増幅と蛍光ラベルを行い、DNAチップを用いて神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などに関連する1500種類の遺伝子のmRNAの発現量を解析し、クラスター解析を行った。血液からのmRNAの抽出は徳島大学医学部ストレス制御医学分野(六反一仁教授)で行い、DNAチップの解析は、日立ライフサイエンス事業部に委託して行っている。測定のコэффициентは20%以下であり、信頼性と再現性は良好である。

平行してリアルタイムPCRを用い、Taqman probeにて特定標的遺伝子の発現

を、glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNAを内部標準として測定した。平成17年度には5HTT mRNAとLIM遺伝子mRNAを含むいくつかの遺伝子発現を解析対象とした。必要に応じ、遺伝子多型について放射性同位元素を利用したシーケンス及びsingle strand conformation polymorphism法で解析を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は遺伝子多型解析ではなく、すべての人に発現している mRNAの発現量を測定するものであり、いわゆる遺伝子解析研究ではない。しかし、倫理面への配慮は十分に行い、連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護する。対応票は、研究代表者(大森哲郎)が厳重に保管し、解析を行う日立ライフサイエンス事業部には番号のみを通知する。希望者のみを対象とし、本研究の目的、方法、危険性、得られる分析結果、及びその情報の管理について説明し、書面で合意を取得する。尚、研究計画は徳島大学病院倫理委員会の承認を平成13年に受けている。

また共同研究施設の国立精神・神経センターの倫理委員会へも倫理審査を求め、平成16年2月13日付けで承認を受けている。

## C. 研究結果および考察

平成16年度の解析対象は徳島大学病院を受診した単極性うつ病患者である。うつ病の診断はDSM-IVに従い、ハミルトン評価尺度で重症度を評価した。血液10mlを採取し、キアゲン社製mRNA抽出用試験管を用いてmRNAを抽出した。抽出したmRNAの増幅と

蛍光ラベルを行い、DNAチップを用いて神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などに関連する1500種類の遺伝子のmRNAの発現量を解析し、クラスター解析を行った。血液からのmRNAの抽出は徳島大学医学部ストレス制御医学分野（六反一仁教授）で行い、DNAチップの解析は、日立ライフサイエンス事業部に委託して行っている。測定のコエフィシエントは20%以下であり、信頼性と再現性は良好である。

平成17年度までに160検体以上のうつ病患者血液を採取し、診断、重症度、治療前後などの臨床データをデータベース化している。うつ病以外の疾患でも、未服薬例を中心に、統合失調症30例、双極性障害15例、パニック障害35例、強迫性障害25例のサンプルの臨床データと血液サンプルを収集している。

このうち身体合併症および精神科的合併症のない当該病相未治療の単極性うつ病45例を、性年齢のマッチした非喫煙健康対照者と比較して解析した。1) うつ病全例にほぼ共通して変化している遺伝子が約20種見出された。2) 同時に、うつ病の半数でのみ変化している遺伝子群も数10種存在するため、遺伝子発現パターンからうつ病が2群に分かれた。この2群間の臨床症状には差がなく、両群を分ける臨床指標は現在のところ明らかではない。3) 変動遺伝子のいくつかは、治療後に正常方向へと変化した。4) これらの所見は疾患特異的であり、急性ストレスに由来する変化とは異なる。

以上の所見は、mRNAの発現パターンを指標として、うつ病を健康成人および精神科他疾患から識別できること、および治療経

過にそつた変化が捉えられることを意味している。日米の特許を申請している。現在双極うつ病、パニック障害などについても順次解析を進めている。うつ病マーカーとして臨床応用可能な実用型チップの開発とDNAチップのうつ病病態解析への応用に向けて研究を継続している。

DNAチップ解析と平行して、定量性に優れるリアルタイムPCRを用いていくつかの特定標的遺伝子のmRNA発現量の解析を行った。その結果、未治療うつ病では白血球セロトニントランスポーター遺伝子mRNA量が健常ボランティアと比較し有意に増加していた。セロトニントランスポーター遺伝子には機能性多型が存在するので、性、年齢に加え遺伝子多型も一致した各10名で比較したが、ここでも有意に増加しており、この増加は遺伝子多型に基づくものではなかった。パロキセチン投与により臨床症状は有意に改善し、平行して5HTT mRNA量は減少し、8週後には健常対照群と差がなくなった。

また、カルシウムシグナルを調節するLIM(PDLIM5)タンパクの白血球mRNA発現は、健常ボランティアと比較し有意に減少していた。パロキセチン投与により臨床症状は有意に改善し、平行してLIM mRNA量は増加し、8週後には健常対照群と差がなくなった。

定量性に優れるリアルタイムPCR測定によつても、未治療うつ病ではいくつかの遺伝子発現に増減が認められること、および治療経過にそつて増減が正常化することは、白血球内のmRNA測定がうつ病の診断および治療経過の指標として妥当であることを示している。

分担研究者の原田誠一は、国立精神・神経センター武蔵病院において、電気けいれん療法（ECT）前後のうつ病患者を対象としてDNAチップを用いた調査を行い、「ECTによる抑うつ症状の改善」と「mRNA発現の変化」の関連を明らかにして、ECTの奏功機序を解明する研究を進めている。

分担研究者の橋本亮太は、うつ病と同様に、自殺企図の頻度が高い重篤な精神疾患である精神病性障害（統合失調症）を対象として、同じDNAチップを用いて統合失調症の早期診断、治療評価および病態研究に応用することを目的とする研究を進めている。

また、使用するDNAチップの発明者である徳島大学ストレス制御医学分野の六反一仁およびDNAチップ解析を委託している日立ライフサイエンス事業部と共同し、増減の見られた遺伝子発現の確認作業と、実用化へ向けてのサンプル抽出条件の再検討を行った。

#### D. 考察

うつ病は生涯罹患率が10%前後の頻度の高い疾患であり、その頻度は現代社会の構造やストレスの影響を受けて今後さらに増加することが予想される。この疾患は、罹患者の精神と身体に著しい苦悩をもたらし、その社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、自殺企図に結びつくことも少なくない重大な疾患である。年間3万人以上にもものぼる自殺者の大半はうつ病に罹患していたと推定されている。また、怠学、失職、引きこもりなどの社会的問題やアルコール関連障害などの医学的問題にも深く関連している。こ

の疾患を的確に診断し、すみやかに治療する体制を確立することは、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。

うつ病の診断は、しかし決して簡単ではない。うつ病の主症状は、抑うつ気分、意欲低下、興味と喜びの喪失、集中力と注意力の減退、自己評価と自信の低下、罪責感と無価値感、将来への悲観、自殺念慮、睡眠障害、食欲不振などである。これらの症状には特有の特徴があり、誰でもが経験する気分の落ち込みとは異なっているし、身体疾患罹患時の疲弊感に伴う精神活動低下とも異なっている。うつ病の症状を把握するためには、詳しく病歴を聴取し、心理行動面に表れる症状がいつからどのように出現し、社会生活や家庭生活の上でどのような支障が生じているのかを聞きとり、受診時の患者の態度や会話内容などから、諸症状を確認することが主体となる。家族歴、既往歴、身体的健康状態、生育歴、生活史、性格傾向、病前社会適応状況、きっかけとなった出来事の有無、などは重要な参考事項となる。これらを的確に把握するためには、十分に熟練した精神科専門医による一時間ほどの面接が必要となる。さらに一般的身体状態および神経学的状態に大きな異常のないことを確認し、必要に応じて脳波や脳画像検査によって脳器質性疾患を除外して診断に至る。得られた所見を、世界保健機構（WHO）やアメリカ精神医学会による診断基準と照合し、診断を確定することが一般的である。

このような従来の診断方法の大きな問題点は、診断には熟練した技能を要する

ことである。うつ病に関する十分な知識と経験が必要であることはいうまでもないが、うつ病には該当しなくともうつ状態を呈する心理的、精神科のおよび身体的状態は数多い。それらとの鑑別診断も必須となる。したがって、診断には十分な研修と積んだ精神科専門医師があたりねばならない。しかし、生涯罹患率が10%前後というありふれた病気であるうつ病は、プライマリーケア医師を受診することが多い。精神科的な診察に習熟していない一般医師にとって、客観的検査所見のないうつ病の診断は必ずしも容易ではない。また、臨床心理士などの臨床心理学の専門家や保健婦などの精神保健活動従事者にとっては、薬物療法をはじめとする身体（脳）に対する治療が必要である医学的疾患であるうつ病は、単独では診断治療することは困難である。

診断に習熟を要するのは、簡便かつ客観的な症状評価方法が存在しないことが大きな要因となっている。現在も、自己記入式の質問紙によるスクリーニング方法もあるが、あくまで主観的に記入されるため、性格要因、環境要因あるいは身体状態不良による気分の落ち込と本来のうつ病を区別することはできない。医師の用いる症状評価尺度もあり、重症度の判定にはしばしば使用されるが、これも各項目の評価には適切な問診が必要であって、診察に代わる物ではない。

客観的な指標を目指して、これまでもいくつかの検査方法が試みられている。うつ病は、脳内のモノアミン系の機能的変調があり、その変調は心身相関作用を通して、神経内分泌系、神経免疫系、自

律神経系に少なからぬ影響を及ぼしていることが知られている。特に、神経内分泌的な異常のひとつである軽度の副腎皮質ホルモン分泌亢進をデキサメサゾン抑制試験によつて的確に把握してうつ病の診断に応用する試みは、1980年代以降に精力的に研究されたが、試験薬服用という煩雑さおよび感度や特異性の限界から臨床応用には至らなかった。研究段階では、その他の神経内分泌系、神経免疫系、自律神経系、日内リズムや睡眠構築の異常なども報告されている。最近では、脳画像を用いた脳血流や脳内モノアミン受容体の変化なども指摘されはじめているが、いずれも感度や再現性に問題が残る。いずれに着目するにしても、限られた因子を測定する方法ではうつ病という複雑な心身疾患を評価することそのものが困難であるとも言える。また、従来の検査は、施行と評価には膨大な時間と労力が必要であり、簡便性という観点をも考慮すると、日常診療への応用はとうてい望むことが出来ないのが現状である。

本研究は、DNAチップを用いてうつ病を評価する世界で最初の試みである。これを可能とした技術的基盤は、独自に開発したプローブ配列設計ソフトウェア、半導体ナノテクノロジーを駆使したスポットティング技術、並びに解析ソフトであり、CV値20%以下の極めて信頼性の高いチップを実現している。この技術に加え、神経伝達・免疫・内分泌あるいはストレス反応と関連する1500種類の遺伝子を搭載するという独創的なアイデアによって本研究で用いるチップが実現した。

末梢血白血球中のRNA発現量をDNAチ

チップによって一括定量することによってうつ病に特有の所見を得た本研究結果は、うつ病の診療に画期的な向上をもたらす可能性がある。本法は、患者の特別な協力を必要とせず、通常の採血による2.5mlの血液をもとに解析可能であり、非侵襲的で簡便な日常的に行うことのできる検査法である。数多くのRNA発現量から生体機能を多面的に把握する本法は、従来の限られた因子を測定する方法に比べ、うつ病のように心と身体にまたがる複雑な心身疾患の評価方法として原理的にも適切である。

本研究の結果は、未治療うつ病患者の白血球内のmRNAが、特有の発現パターンを示すことを示している。しかも、それらの変化の一部は症状改善後には特徴的な反転パターンを示している。これらの所見は疾患特異的であり、統合失調症では見られず、ストレス時の変化とも異なる。これらの所見は、mRNAの発現パターンを指標として、うつ病を健康成人および精神科他疾患から識別できること、および治療経過にそった変化が捉えられることを意味している。

平成17年度には、DNAチップ解析と平行して、リアルタイムPCR法によって特定遺伝子を標的とするmRNA発現解析も行った。その結果、セロトニントランスポーター遺伝子発現が未治療うつ病で増加していた。5HTT遺伝子にはプロモーター上流の遺伝子多型である5HTT linked polymorphic regionと第2イントロンのvariable number of tandem repeat多型があり、遺伝子発現を変化させる機能性多型であることが報告されている。そこで遺伝子多型も調べたが、セロトニントランスポーター

遺伝子発現量の増加はこれらの多型によっては説明がつかなかった。この変化は、これまでに報告された血小板セロトニントランスポーターの減少とはむしろ逆方向の変化であるが、PET研究で報告されたうつ病脳内セロトニントランスポーターの増加とは合致する所見である。発現量の増加は、治療後には健常者レベルに減少していたのでこの変化は状態依存的な変化であると推定される。抗うつ薬長期使用の影響も考えられる。

また、カルシウムシグナルを調節するLIMタンパクのmRNA発現量は、未治療うつ病では健常者と比較して減少していた。この変化は治療後には健常者レベルに戻っていた。この所見と関連するものとして、双極性障害および統合失調症患者由来のリンパ芽球では、LIMタンパクのmRNA発現量が減少していたという報告がある。

我々のほかにも、精神疾患の末梢血mRNA発現をリアルタイムPCR法によって測定している研究は少なくない。たとえば、うつ病と双極性障害におけるグルココルチコイド $\alpha$ mRNA発現の低下、双極性障害におけるイノシトールリン酸化酵素遺伝子発現の低下、統合失調症におけるドパミン3型受容体遺伝子発現の増加などが報告されている。これらのリアルタイムPCR法による特定遺伝子発現の増減の報告は、末梢血中のmRNA発現量の測定が疾患マーカーとして妥当であることを示している。

今後、現在までに変動が判明している遺伝子群を中心に、治療前後において発現量の変動する遺伝子の検索を継続する。層別解析によって発症状況、症状特性、

重症度、治療反応、予後との関連を検討する。治療経過としては、薬物療法のみでなく、電気けいれん療法施行前後における解析も推進する。同時に、うつ病と関連の深い双極性障害とパニック障害、強迫性障害についても解析を行い、統合失調症に関してもある程度の症例数を解析する。うつ病の病状の消長と治療経過に沿った縦断的な解析も行って、再発との関連や、治療薬剤の影響を明らかにする。

これらの結果をもとに、搭載遺伝子を絞り込み、安価で簡便な実用型の DNA チップを作成する。うつ病の客観的な指標としてプライマリーケア医師が容易に使用でき、診断の確立や治療の導入にきわめて有用となる。また、職場、学校及び地域の検診時や人間ドック等で、集団の中からハイリスクグループを簡便かつ高精度に、しかも安価に選び出すことにより、うつ病の早期発見が可能となり、予防医学的見地から国民のこころの健康の向上にも大きく寄与することができる。本法の有用性はプライマリーケアと検診に限らない。精神科専門医師にとっても、うつ病発症に関わる心理社会環境因子の検索、病態の評価、診断、及び治療評価、予後判定に応用することができ、精神医学の分野でも革新的な検査技術となる。本研究の成果は、DNA チップによる末梢白血球中 mRNA 発現の測定によって、うつ病の評価が可能であることを示した点で大きな意義がある。

#### E. 結論

神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、

熱タンパク質などに関連する遺伝子1500種のmRNAを解析する革新的なDNAチップを用い、うつ病の新しい評価方法の確立を目指して研究を行った。うつ病に特異的なmRNA発現パターンを見出し、健康対照者および精神科他疾患から識別に成功している。平行して、リアルタイムPCR法によってうつ病未治療時の特定遺伝子発現の増減を確認している。

本研究は、DNAチップを用いてうつ病を評価する世界で最初の試みである。先端的かつ独創的なものであるが、一方で患者負担は少量通常採血のみであり、うつ病評価への臨床応用が現実的である。プライマリーケア、健康診断、精神科診療施設などの場で早期診断、病態評価および治療評価に応用可能である。うつ病の診断や治療に客観的な指標の導入を実現させることが期待され、社会的・医療行政的意義は大きい。本研究の成果は、DNAチップによるうつ病評価が可能であることを示している。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表（主任研究者分のみ）

##### （1）論文発表

Morita K, Saito T, Ohta M, Ohmori T, Kawai K, Teshima-Kondo S, Rokutan K. Expression analysis of psychological stress-associated genes in peripheral blood leukocytes. *Neurosci Lett*. 2005;381(1-2):57-62.

Iga J, Ueno S, Yamauchi K, Motoki I, Tayoshi S, Ohta K, Song H, Morita K,

- Rokutan K, Ohmori T. Serotonin transporter mRNA expression in peripheral leukocytes of patients with major depression before and after treatment with paroxetine. *Neurosci Lett*. 2005 Nov 25;389(1):12-6.
- Nakahira H, Tomotake M, Ohmori T. Fluvoxamine induced complex partial seizure in the treatment of bulimia nervosa. *Gen Hosp Psychiatry*. 2005 Mar-Apr;27(2):148-50
- Kaneda Y, Ohmori T. Relation between estradiol and negative symptoms in men with schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2005 Spring;17(2):239-42.
- Numata S, Kato O, Misawa H, Tokuda H, Kasahara T, Ohmori T. Left atrial thrombosis associated with antipsychotic drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Jan;29(1):153-5.
- Tetsuro Ohmori, Kyoko Morita, Toshio Saito, Masayuki Ohta, Shu-ichi Ueno and kazuhito Rokutan. Assessment of human stress and depression by DNA microarray analysis. *J Med Invest*. 2005, 52 Suppl:266-271.
- Jun-ichi Iga, Takahide Taniguchi and Tetsuro Ohmori. Mood swing from severe depression to mania following acute alteration of thyroid status. *Gen Hospital Psychiatry* 27:451-453, 2005
- Satsuki Sumitani, Tsunehiko Tanaka, Shin' Ya Tayoshi, Koshi Ota, Naomi Kameoka, Mizuki Morimune, Sumiko S Tayoshi, Sawako Kinouchi, Shu-ichi Ueno, Tetsuro Ohmori. Hemodynamic changes in the prefrontal cortex during mental works as measured by multi channel near-infrared spectroscopy (NIRS). *J. Medical Investigation* 2005; 52: 302-3
- Kaneda Y, Kawamura I, Ohmori T. Correlation between the plasma homovanillic acid levels and the response to atypical antipsychotics in male patients with schizophrenia. *Clinical Neuropharmacology*, 28(6): 262-264, 2005
- Kaneda Y. Suicidality in schizophrenia as a separate symptom domain that may be independent of depression or psychosis. *Schizophrenia Research*, 81(1): 113-114, 2006
- Satsuki Sumitani, Tsunehiko Tanaka, Shin' Ya Tayoshi, Koshi Ota, Naomi Kameoka, Shu-ichi Ueno, Tetsuro Ohmori. Activation of the Prefrontal Cortex during the Wisconsin Card Sorting Test as Measured by Multichannel Near-Infrared Spectroscopy. *Neuropsychobiology* 2006; 53: 70-76

Shusuke Numata, Shu-ichi Ueno, Jun-ichi Iga, Ken Yamauchi, Song Hongwei, Koji Ohta, Sawako Kinouchi, Sumiko Shibuya-Tayoshi, Shin-Ya Tayoshi, Michitaka Aono, Naomi Kameoka, Satsuki Sumitani, Masahito Tomotake, Yasuhiro Kaneda, Takahide Taniguchi, Yasuhito Ishimoto, Tetsuro Ohmori. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism in schizophrenia is associated with age at onset and symptoms. *Neurosci Lett* 2006 Mar 11; [Epub ahead of print] PMID: 16533563

Iga J, Ueno S, Yamauchi K, Numata S, Motoki I, Tayoshi S, Kinouchi S, Ohta K, Song H, Morita K, Rokutan K, Tanabe K, Sano A, Ohmori T. Gene expression and association analysis of LIM(PDLIM5) in major depression. *Neurosci Lett*. 2006 Apr 1; [Epub ahead of print] PMID: 16595163

Satsuki Sumitani, Masafumi Harada, Hitoshi Kubo, Tetsuro Ohmori. Proton magnetic resonance spectroscopy reveals an abnormality in the anterior cingulate of a subgroup of obsessive-compulsive disorder patients. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 2006 (in press)

## (2) 学会発表

日本精神神経学会 さいたま 5.20.05  
シンポジウム 精神疾患の生物学的マ

カー

DNA チップによるうつ病の新しい診断マ  
ーカー

大森哲郎、上野修一、木内佐和子、田吉  
純子、斉藤俊郎、太田雅之、森田恭子、  
六反一仁

8th World Congress of Biological  
Congress 2005. 6.27-7.7 Vienna  
Symposium :New Diagnostic Maker of  
Psychiatric Disorders Microarray  
analysis of leukocyte mRNA expression  
in depression

Tetsuro Ohmori, Shu-ichi Ueno, Kyoko  
Morita, Kazuhito Rokutan, Toshiro Saito,  
Masayuki Ohta

8th World Congress of Biological  
Congress 2005. 6.27-7.7 Vienna  
The effect of milnacipran on memory  
in Korsakoff ' s syndrome after  
encephalitis.

Shusuke Numata, Song Hongwei, Jun-ichi  
Iga, Ken Yamauchi, Takahide Taniguchi,  
Shu-ichi Ueno, Tetsuro Ohmori,

8th World Congress of Biological  
Congress 2005. 6.27-7.7 Vienna  
5HTT mRNA Expression in Leukocytes  
is Elevated in Depressive Patients.

Jun-ichi Iga, Shu-ichi Ueno, Ken  
Yamauchi, Sumiko ]Tayoshi, Koshi Ohta,  
Hongwei Song, Tetsuro Ohmori

8th World Congress of Biological  
Psychiatry 2005. 6.27-7.7 Vienna

Paroxetine with risperidone improved  
social phobia with OCD symptoms  
K. Yamauchi, K. Ohta, T. Taniguchi, T.  
Ohmori

COE International Conference -  
Biological Mechanism for Stress  
Control- 8.18.05 Tokushima  
Assessment of human stress and  
depression by DNA chip analysis. T.  
Ohmori.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特願 2005-042534、発明者：六反一仁、  
大森哲郎、森田恭子、斉藤敏郎、大田雅  
之

発明の名称：うつ病の評価法

出願日：平成 17 年 2 月 18 日

US Patent Application No 11/091,674.  
March 29, 2005.

Method of diagnosing depression  
Kazuhito Rokutan, Tetsuro Ohmori,  
et al.

European Patent Application  
No 05006769. March 29, 2005.  
Method of diagnosing depression  
Kazuhito Rokutan, Tetsuro Ohmori,  
et al.

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

DNAチップを用いたうつ病の診断と病態解析

—電気けいれん療法（ECT）による mRNA 発現の変化に関する研究—

分担研究者 原田誠一 国立精神・神経センター武蔵病院 外来部長

要旨

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつく。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。主任研究者らは、ストレス反応と関連する遺伝子の mRNA の発現量を一括解析する DNA チップを開発した。本研究の目的は、電気けいれん療法（ECT）前後のうつ病患者を対象として DNA チップを用いた調査を行い、「ECT による抑うつ症状の改善」と「mRNA 発現の変化」の関連を明らかにして、ECT の奏功機序を解明することである。また、ECT 対象群の多くが薬物療法抵抗性のうつ病患者であるため、「ECT と薬物療法による DNA チップ所見の変化パターンの異同」を詳しく調べることで、①従来明らかになっていなかったうつ病の病態の理解が進み、②今後、新しい抗うつ薬を開発していく際の示唆が得られる可能性もあると考えている。現在、ECT を施行した2症例の検体の解析を行っているところである。

A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつく。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。病態の評価、早期診断、及び治療評価に応用できる簡便かつ客観的な指標の確立の意義は絶大であり、その必要性は高い。

主任研究者らは、神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などに関連する遺伝子1500種のmRNAの発現量を、白血球を試料として一括解析するDNAチップ

を開発した。学位審査発表などの心理的ストレスにさらされると、特定の遺伝子発現が増減し、翌日には回復することを見出し、ストレスに鋭敏に反応する測定系となることを確認している。本研究の目的は、電気けいれん療法（ECT）前後のうつ病患者を対象としてDNAチップを用いた調査を行い、「ECTによる症状の改善」と「mRNA発現の変化」の関係を明らかにすることである。

B. 研究方法

国立精神・神経センター武蔵病院精神科を受診してECTを受けるうつ病患者のうち、本診断法開発のための研究に参加するこ

とについて文書により説明し同意を得たものを対象とした。診断は、ICD-10(International Classification of Diseases 10th edition)の中等症または重症うつ病エピソードに合致するものとし、精神病症状をともなう重症うつ病エピソードおよび双極性障害うつ病エピソードは除外した。また、重篤な身体合併症を有するものも除外した。採血は、ECT前、初回ECT前・後、3回目ECT前、5回目ECT前、8回目ECT前、ECT終了後の計7回行った。うつ病の重症度はハミルトン評価尺度で評価した。なお、ECT施行中は薬物療法の処方内容は変更しないこととした。得られた血液サンプルから、キアゲン社製

mRNA抽出用試験管を用いてmRNAを抽出した。抽出したmRNAの増幅と蛍光ラベルを行い、DNAチップを用いて神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などと関連する1500種類の遺伝子のmRNAの発現量を解析し、クラスター解析を行った。血液からのmRNAの抽出は徳島大学医学部ストレス制御医学分野(六反一仁教授)で行い、DNAチップの解析は、日立ライフサイエンスセンターに委託して行っている。測定のCV値は20%以下であり、信頼性と再現性は良好である。

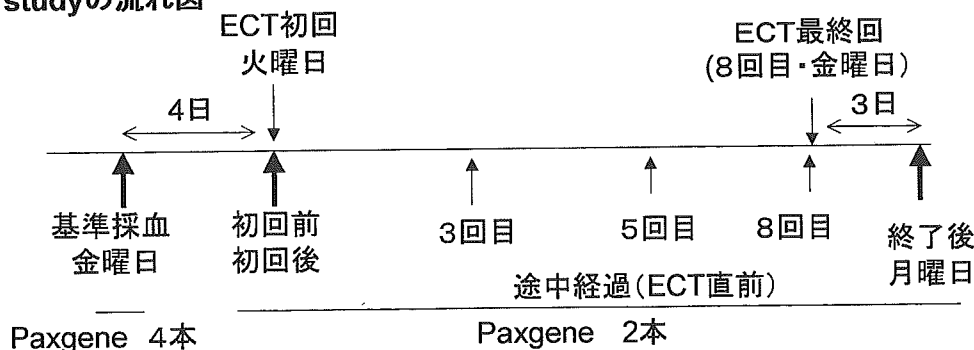
図に、国立精神・神経センター武蔵病院における本研究のプロトコル概要を示す。

## NCNP DNAチップ ECT study

1. 対象：気分障害でECTを受ける患者様（パニック障害の合併のみ可）
2. ECTスケジュール：週2回（火、金）で計8回で行う。
3. 薬剤：ECT中変更しない（できれば一週間前より一定が望ましい）。
4. 採血：Paxgene(4本または2本)と血液検査(血球：患者負担)を計7回行う。  
ECT前、初回前・後、3回目前、5回目前、8回目前、終了後
5. 臨床データ：採血の度に臨床データシート、血液検査、HAMDをつける
6. Paxgeneの処理：採血後、2時間からオーバーナイト室温で放置し、その後臨床検査部・臨床研究室の冷凍庫(\*)に保存する。
7. Paxgeneの採血管：患者ID、名前、採血日、採血回を記入する。
8. ECT studyセット：プロトコル、同意書、臨床データシート(6枚)、HAMD(6枚)、血液検査(6枚)、補足(DSMIV診断用)、Paxgeneの採血管(16本)

(\*)臨床研究室のディープフリーザーに入っているA2「精神科DNAチップ研究用」と書いてあるラックに入れてください。臨床研究室の鍵は医局にあります。

### ECT studyの流れ図



#### (倫理面への配慮)

本研究は遺伝子多型解析ではなく、すべての人に発現している mRNA の発現量を測定するものであり、いわゆる遺伝子解析研究ではない。しかし、倫理面への配慮は十分に行い、連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護する。対応票は、研究代表者（大森哲郎）が厳重に保管し、解析を行う日立ライフサイエンスセンターには番号のみを通知する。希望者のみを対象とし、本研究の目的、方法、危険性、得られる分析結果、及びその情報の管理について説明し、書面で合意を取得する。尚、研究計画は徳島大学病院倫理委員会の承認を平成 13 年に、国立精神・神経センター武蔵病院倫理委員会の承認を平成 16 年 2 月 13 日に受けている。

#### C. 研究結果および考察

本年度は、ECT を受けた 2 名のうつ病患者の参加を得て、サンプルの解析を開始した。今後、更に患者数を増やして研究を進めていく予定である。

本研究を通して、「ECT による抑うつ症状の改善」と「DNA チップ所見の変化」の関連を明らかにして、ECT の奏功機序を解明することを目標としている。また、ECT 対象群の多くが薬物療法抵抗性のうつ病患者であるため、「ECT と薬物療法による DNA チップ所見の変化パターンの異同」を詳しく調べることで、①従来明らかになっていなかったうつ病の病態の理解が進み、②今後、新しい抗うつ薬を開発していく際の示唆が得られる可能性もあると考えている。

#### D. 結論

神経伝達物質、サイトカイン、ホルモン、熱タンパク質などに関連する遺伝子 1500 種の mRNA を解析する革新的な DNA チップを用いて、「ECT によるうつ病の改善」と「mRNA 発現パターンの変化」の関係についての調査研究を開始した。本研究は、DNA チップを用いてうつ病での ECT の奏功機序を調査する世界で最初の試みである。今後症例数を増やして、研究を継続する予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

原田誠一、小堀修、勝倉りえこ：統合失調症の陽性症状の認知療法—初診～慢性期リハビリテーションでの心理教育・認知療法の活用. 臨床精神医学 34: 775-782, 2005

原田誠一：統合失調症の認知療法と薬物療法—精神療法と薬物療法の進歩の好ましい相互作用. Schizophrenia Frontier 6: 139-142, 2005

原田誠一：統合失調症の当事者・家族への心理教育、病名告知. 上島国利編：精神科ニューアプローチ 4 統合失調症と類縁疾患. メジカルビュー社、2005

原田誠一：精神病理体験への対処・コーピング. 上島国利編：精神科ニューアプローチ 4 統合失調症と類縁疾患. メジカルビュー社、2005

原田誠一：統合失調症と境界性人格障害の心理教育・認知療法の試み。精神経誌 108: 35-39, 2006

原田誠一：共感と違和感のダイナミクスー共感フォロースルーと共感連続技。臨床精神医学 1625-1633, 2005

原田誠一：目のさめるケースカンファレンスとは？精神科 7: 42-45, 2005

原田誠一：看護の仕事に認知行動療法の視点を取り入れてみませんか？精神看護 9 (2) : 14-21, 2006

原田誠一：妄想とのじょうずな付き合い方。こころの科学 126: 45-49, 2006

原田誠一：統合失調症の治療方針の立て方。上島国利編：精神科ニューアプローチ4 統合失調症と類縁疾患。メジカルビュー社、2005

原田誠一：統合失調症の当事者・家族への心理教育、病名告知。上島国利編：精神科ニューアプローチ4 統合失調症と類縁疾患。メジカルビュー社、2005

原田誠一：精神病理体験への対処・コーピング。上島国利編：精神科ニューアプローチ4 統合失調症と類縁疾患。メジカルビュー社、2005

## (2) 学会発表

原田誠一：統合失調症と境界性人格障害の認知療法の試み。第101回日本精神神

経学会 シンポジウム「精神療法のこれから：課題と展望」。2005年5月20日、大宮

原田誠一：幻覚妄想症状を疑似体験できるバーチャルハルシネーション (VH) の制作ー心理教育や予防に役立つ統合失調症の精神病理・啓蒙用ツールの試み。第101回日本精神神経学会 シンポジウム「サイバー精神医療の未来」。2005年5月22日、大宮

原田誠一：幻覚妄想体験への対処を援助するための診断治療ガイド。第25回日本精神科診断学会研修セミナー。2005年9月29日、新潟

原田誠一：認知療法からみた統合失調症の治療とリハビリテーション。第10回SST学術集会 シンポジウム「SSTの効果をもとめるためにー認知障害を克服する多角的アプローチ」。2005年11月26日、福島

原田誠一、小堀修、勝倉りえこ：薬物療法抵抗性の初期統合失調症で認知療法が有効であった一症例。第5回日本認知療法学会。2005年12月9日、名古屋

原田誠一：境界性人格障害の心理教育と認知療法。第18回日本総合病院精神医学会・教育講演。2005年11月11日

原田誠一：正体不明の声って何？ー統合失調症の認知療法入門。第8回富山県民こころの日特別講演会。2005年6月9日

H. 知的所有権の出願・登録状況	なし
1. 特許取得	3. その他
なし	なし
2. 実用新案登録	

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

精神病性障害の評価と解析

分担研究者 橋本亮太 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第三部室長

要旨

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつく。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。主任研究者らは、神経伝達物質、サイトカイン、ホルモンとそれらの受容体や情報伝達分子に加え、ストレスタンパク質などのストレス反応と関連する遺伝子の mRNA の発現量を一括解析する DNA チップを開発した。これを用いた研究から学位審査などのストレスに曝されると、共通の遺伝子発現が増減し、翌日には回復することが判明している。主任研究者らのグループはこの DNA チップをうつ病の早期診断、治療評価および病態研究に応用することに成功している。うつ病と同様に、自殺企図の頻度が高い重篤な精神疾患として、精神病性障害（統合失調症）がある。本研究では、DNA チップを用いて統合失調症の早期診断、治療評価および病態研究に応用することを目的とする。

A. 研究目的

統合失調症はおよそ人口の100人に1人が罹患する common disease であるが、思春期～成人早期に発症し、慢性・再発性の経過をたどる難治性疾患である。入院患者は全国で20万人を超え、あらゆる病気の中で最も多い。平成10年度の日本の精神医療費は1兆6千億円であるが、その半分以上が統合失調症の治療に費やされる。この疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。病態の評価、早期診断、及び治療評価に応用できる簡便かつ客観的な指標の確立の意義は絶大であり、その必要性は高い。

我々の目的は、ヒトの約3万に上るといわれる mRNA の発現量を測定できるアフィ

メトリクス社の DNA チップを用いて、白血球中の mRNA 発現量を解析し、統合失調症の診断と病態解析へ応用することである。

B. 研究方法

国立精神・神経センターと徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部精神医学にて、統合失調症患者、健常被験者に、本診断法開発のための研究に参加することについて文書により説明し同意を得たものを対象とした。診断は DSM-IV にて行い、症状評価スケールによる評価（PANSS: Positive and Negative symptoms scale）や異常不随意運動スケールによる遅発性ジスキネジアの評価（DIEPS: Drug induced extrapyramidal symptoms scale）等を用いて症状評価を行った。採血は、医

師または看護師が、安静下に肘静脈より行った。外来診察終了後に血液5mlを採取した。キアゲン社製RNA抽出用試験管を用いてRNAを抽出した。

本研究は、それぞれの施設の倫理審査委員会において承認を受けており、それに基づいて、試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理（匿名化）などを徹底させた。

DNAチップは、約3万あるといわれるヒトのmRNAを網羅的に定量解析できるアフィメトリクス社のものを用いた。抽出したRNA 1ugをcDNAにしたうえで、1サイクル法にて増幅し、その後ラベリングを行ってチップに乗せて解析を行った。

#### （倫理面への配慮）

本研究は遺伝子多型解析ではなく、すべての人に発現しているmRNAの発現量を測定するものであり、いわゆる遺伝子解析研究ではない。しかし、倫理面への配慮は十分に行い、遺伝子解析に準じた連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護する。個人情報、書類に記載されたもの（書類情報）とデータ・ベースに入力されたもの（電子情報）とがあり、前者は、研究参加への同意書と、個人情報や臨床データが記入された個人データ・シートである。書類情報のうち、同意書は2枚綴りであり、1枚をカルテに保管し、もう1枚は個人情報管理者（武蔵病院副院長、補助者：臨床検査室山下智子氏）のもとに集められ、匿名化ID番号を付与されて、臨床検査室内に金庫に保管される。個人データ・シートは武蔵地区の精神科医師がカルテ情報を基に記入した後に一旦臨床検査室のもとに集

められ、原本を臨床検査室内の金庫に保管し、データ・シートから氏名、生年月日、院内IDなどの個人識別情報を削除し、匿名化ID番号を付与した後に研究所に送られる。

電子情報は、上記の個人識別情報が削除された個人データ・シートに基づいて研究員が外部と切り離されたコンピュータにおいて入力し、フロッピー・ディスクないしMOディスクなどの外部記憶装置を用いて研究責任者が厳重に管理する。また、解析作業を行う場合にも他の一切のコンピュータと切り離された状態で行う。なお、これらの電子情報のファイルには暗証番号を付け、外部記憶装置を紛失した場合でも他人がファイルを開けないような措置を講じる。

#### C. 研究結果および考察

武蔵病院医師と連携して精神病性障害患者や健常被験者のリクルートを行い、収集したサンプル（精神病性障害約160症例と健常被験者約150症例）のうち、性・年齢をマッチさせた統合失調症38例と健常者36例を選んだ。最初にそれぞれの郡のRNA 0.3ugずつをプールして1ugずつをそれぞれ3つのDNAチップにて検討した。血中のmRNA発現は、このチップを用いると約3万の遺伝子転写産物のうち約13000から16000程度検出された。統合失調症で同じ処理をした3つのサンプルによるDNAチップにおける遺伝子発現の違いを検討すると遺伝子発現が確認されたもののうち約1%が2倍以上異なっていた。健常者サンプルにおいても同様の結果が認められた。このことは、遺伝子発現の違いのカッ

トオフを2倍に設定すると1%が擬陽性になることをさす。次に、統合失調症と健常者における比較をそれぞれのチップ間において行くと（全部で9通り）、それぞれ30から150程度の遺伝子発現が2倍以上変化していた。次に、それぞれのセットにおいて変化が認められる分子を検討すると、すべての組み合わせにおいて2倍以上の変化が認められる分子はなく、最高が8通りのものがひとつであり、半分以上である5通り以上にて変化が認められたものが、全部で10あった。

さらに、未治療の統合失調症が10例と年齢と性をマッチさせた健常者10例における検討と、未治療の統合失調症7例について治療前後（約8週間）における検討を行っている。これらの未治療の統合失調症においては、すべてPANSSによる症状評価を行っており、これからの結果が待たれるところである。

#### D. 考察

精神病性障害は、うつ病とともに、罹患者の精神と身体に著しい苦悩をもたらすばかりか、その社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、自殺企図に結びつくことも少なくない重大な疾患である。よってこの疾患を的確に診断し、すみやかに治療する体制を確立することは、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。

しかし、精神病性障害の診断は簡単なものではなく、十分に熟練した精神科専門医による一時間ほどの面接により、その症状を的確に把握することが必要である。さらに一般的身体状態および神経学的状態に大きな異常のないことを確認し、

必要に応じて脳波や脳画像検査によって脳器質性疾患を除外して診断に至る。得られた所見を、世界保健機構（WHO）やアメリカ精神医学会による診断基準と照合し、診断を確定することが一般的である。診断に習熟を要するのは、簡便かつ客観的な症状評価方法が存在しないことが大きな要因となっている。

本研究班の成果として、mRNAの発現パターンを指標として、うつ病を健康成人および統合失調症から識別できること、および治療経過にそった変化が捉えられることが得られている。よって統合失調症においても同様に、白血球内のmRNAが、特有の発現パターンを示すことを見出せる可能性がある。本研究においては、うつ病とは異なるチップを用いているが、そのチップはヒトのmRNAを網羅したものであり、よりスクリーニングに適していると考えられる。しかし、チップ間の結果が完全に一致するわけではないことから、大きく発現レベルが動く生物学的なマーカーのスクリーニングとして有用であると考えられる。今回得られた結果を元に、発現レベルに変化のあったmRNAに関して、それぞれのサンプル（統合失調症38例、健常者36例）についてリアルタイムPCR法などを用いて結果の確認をする必要がある。また、未治療の統合失調症患者における検討は、精神疾患研究でいつも問題となる服薬の影響を除くことが可能であるため、大変有望であると考えられる。また治療前後における詳細な症状評価のあるサンプルを収集したことから、そのサンプルを用いて治療に反応する生物学的なマーカーを見出すことができる可能性があり、これからの結果が期待さ