

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16～18年度 総合研究報告書
主任研究者 大森 哲郎

平成19(2007)年 4月

目次

I. 総合研究報告	
1. DNAチップを用いたうつ病の診断と病態解析 大森哲郎	----- 1
2. 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 平成 16, 17 年度 岡本長久 平成 18 年度	----- 13
3. 精神病性障害の評価と解析 橋本亮太	----- 20
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 43
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 49

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総合研究報告書

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

生涯罹患率が10%にも上るうつ病的確な診断は、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。本研究はこのDNAチップを発展させ、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を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。平成16年度と17年度には、1500遺伝子を搭載する2色法のチップを用い、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、うつ病で有意に変化している遺伝子を数十見出した。平成18年度は、2色法から対照者の不要な1色法に解析方法を切り替えて検討を続けた。これまでに、46例の未治療うつ病と122例の健常者を解析している。その結果、約20,000の遺伝子を搭載するチップで解析した場合、うつ病患者において発現量が有意に減少している遺伝子が数百種あった。そのうちの24種を指標とすると、うつ病群と健常群の差異がもっとも顕著となり、82.6%の感度でうつ病を正しく判定できた。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（平成16-17年度）

岡本長久 国立精神・神経センター武蔵病院（平成18年度）

橋本亮太 大阪大学（平成16-18年度）

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。平成16年度と17年度は、このDNAチップを用い、うつ病患者と健常対照者のほかに統合失調症など他の精神疾患の解析をおこなって、うつ病に特有の遺伝子発現の増減を見出した。実用的なマーカーとするためには、対照が不要な1色法のチップに切り替える必要があるため、平成17年度から方法論的検討をはじめ、平成18年度においては、全面的に1色法に切り替えて、うつ病患者のサンプルの解析を行った。

本研究の目的は、DNAチップを用いて白血球中のmRNA発現量を解析し、うつ病に特有の増減を指標とすることにより、実用的な診断マーカーを作製するとともに、mRNA発現量を糸口として病態解析研究にも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。平成18年度は徳島市周辺の精神科クリニックを受診した未治療のうつ病患者で、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も対象に加えた。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、精神病症状をとともう重症

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た。

平成16年から17年にかけて用いたDNAチップは、本研究の研究協力者の六反一仁が、日立製作所と共同で開発したものであり、ストレスで変動しうる遺伝子1500種を搭載したDNAチップであり、特許を取得している(特許2001-53465)。心理的ストレスによって100種以上の遺伝子mRNA発現が変動し、鋭敏性に優れた評価法となることを確認し、論文発表済みである。平成17年から18年にかけては、方法論的検討を行い、これまでの1色法チップから対照の不要な1色法チップに切り替えた。1色法チップは2種類用意し、ひとつは日立製作所の作製したもの、いまひとつはアジレント社製のものである。測定のコэффициент变异(CV)値は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。セロトニントランスポーター、LIM、Histone deacetylase 5 (HDAC5)、cyclic AMP response element-binding protein 1 (CREB)、vascular endothelial growth factor (VEGF)など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)

本研究の本体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。平成18年度におこなった徳島周辺の精神科クリニックからも臨床データと血液サンプルを採取することに関しても、平成18年6月26日に徳島大学病院倫理委員会の承認を得た。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。

リアルタイムPCRで発現変動を確認し

た遺伝子に関する遺伝子多型解析に関しても、別途に徳島大学ゲノム倫理審査委員会の承認を得て、同意書も別途に取得して行った。

C. 研究結果

平成16年と17年度に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た。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。これらを試料として、1色法チップで解析を行った。

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) うつ病全例には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った変化が捉えられることを意味している。

平成18年度の解析対象は徳島大学病院

または徳島市周辺の精神科クリニックを受診した単極性うつ病患者である。うつ病の診断はこれまで同様に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、熱タンパク質などと関連する約2万の遺伝子の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た。平成18年度は日立ライフサイエンス事業部で試作した1色法チップとアジレント社の1色法チップの両方でチップ解析を行った。得られたデータの解析については、搭載遺伝子数の多いアジレント社の解析を先行させている。

これまでに、46例の未治療うつ病と122例の健常者を解析している。その結果、うつ病患者において発現量が有意に減少している遺伝子が631種あった。それらのうち、統計学的な有意差が大きい順にいくつか組み合わせて判定すると最もうつ病群を識別するかを検討したところ、上位24種を平均したときが、うつ病群と健常群の差異がもっとも顕著となり、82.6%の感度でうつ病を正しく判定できた。うつ病の診断方法として特許申請中である。

以上の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。これまでに、うつ病未治療時にはセロトニントランスポ

ーターの発現が増加し治療により減少すること、逆にLIMが未治療時は低下し治療により増加することを明らかにした。また、HDAC5とCREBは、治療前には増加しており、治療後には健常対照レベルまで減少していた。VEGFも同様に治療前に高く、治療後には減少していた。これらはうつ病の病態に重要な関与を持つと推定される分子のmRNAである。統合失調症でもいくつかの遺伝子発現の変動を見出したが、変動はうつ病と同一ではなかった。

D. 考察

以上のDNAチップやリアルタイムPCRを用いた検討により得られた所見は、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、かつ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。DNAチップを用いた死後脳病態研究は数多いが、試料として末梢白血球を用い、病態研究よりも診断指標としての応用を優先したところに本研究の独創と特色がある。数多くのmRNA発現量を同時測定することによって、単一因子の測定では捉え切れなかったうつ病特異的な所見を的確に捕捉することを目指している。遺伝子mRNA発現変動は、うつ病で見られる神経内分泌系、神経免疫系あるいは自律神経系などの異常を反映していると思われるが、より直接的にうつ病の中樞異常と関連している可能性もある。リアルタイムRT-PCR法により発現変動を確認したいくつかの遺伝子については、SNP多型を検索し、疾患対照多型解析も行った

が、遺伝子多型の差異に基づくものではなかった。

以上の研究は、DNAチップの特徴を最大限に生かした独創的かつ先端的な研究であり、同時に、少量の通常採血以上には被験者の協力を要しないため、臨床応用と直結する実用的な研究である。現時点でもきわめて有望な所見であるが、さらに継続して検討する必要がある。

我々のグループが使用したDNAチップは、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ものである。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。平成16年度と17年度は、このDNAチップを用い、うつ病患者と健常対照者のほかに統合失調症など他の精神疾患の解析をおこなって、うつ病に特有の遺伝子発現の増減を見出した。しかし、実用的なマーカーとするためには、対照が不要な1色法のチップに切り替える必要があるため、平成17年度から方法論的検討をはじめ、平成18年度においては、日立製作所の試作した1色法DNAチップとアジレント社の1色法DNAチップを使用し、解析を全面的に1色法に切り替えて、うつ病患者のサンプルの解析を行った。現時点では、遺伝子発現をより幅広く網羅するアジレント社製の解析を優先させている。

これまでに、アジレント社製のチップを使用して、46例の未治療うつ病と122例の健常者を解析している。その結

果、うつ病患者において発現量が有意に減少している遺伝子が631種あった。それらのうち、統計学的な有意差が大きい順にいくつ組み合わせて判定すると最もうつ病群を識別するかを検討したところ、上位24種を平均したときが、うつ病群と健常群の差異がもっとも顕著となり、82.6%の感度でうつ病を正しく判定できた。うつ病の診断方法として特許申請中である。

このことは、また、うつ病を判定するのにさいし、20-30種の遺伝子発現を解析すれば十分であることを示唆している。他疾患との鑑別などを考慮しても、発現解析の必要な遺伝子種は100-200程度かと推定される。高い、簡便な、搭載遺伝子を絞り込んだDNAチップを開発し、実用化することが、うつ病の診断マーカーとしては適切である。

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。

うつ病の診療には専門医だけでなくプライマリケア医師の関与が必要である。しかし、うつ病の診断は精神科医にとっても常に必ずしも容易ではなく、まして精神医学的診察に習熟していないプライマリケア医師にとっては正確な診断は至難である。診断を補助する客観的指標の確立には計り知れない意義がある。本研究は、DNAチップを用いてうつ病を評価した世界初の試みである。研究結果は、白血球mRNA発現を指標として、うつ病の診断に有用な生物学的マーカーの確立が可能であることを示している。患者負担が少量採血のみである点は、臨床応用のための重要な条件である。現在の研究をさらに発展させ、簡便性とコスト面を考慮した実用型チップを完成させることにより、感度と特異性を両立させた臨床現場で使用できるうつ病の客観的指標を確立することができる。うつ病の診断精度と治療率を向上させ、二次的な医学的・社会的問題を減少させることにつながる。

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。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。

申請者が本研究に着手した時点では、白血球を試料とする精神神経疾患のmRNA発現解析研究は世界にほとんど類例がなく、まさしく先駆的な研究であったが、ここ2-3年の間にリアルタイムRT-PCR法によって、うつ病や統合失調症における特定遺伝子発現の変化が我々自身を含め国内外から少なからず報告されるようになった。またDNAチップによる白血球mRNA発現パターンによって病態や疾患を識別する試みも、我々自身による試み(Morita他Neurosci Lett

2005, Ohmori他J Med Invest. 2005)のほか、国外から慢性疲労症候群 (KaushikらJ Clin Pathol 2005 など) や統合失調症 (Bowdenら、Schizophrenia Res. 2006など) に関して報告され始めた。末梢と中枢の発現は必ずしも同じではないが、ある程度の相関があることも知られており (SullivanらAm J Med Gen B 2006)、現在、注目度の増している研究領域である。

我々は、病態研究よりも生物学的マーカーという観点を優先させて研究を行ってきた。そのため、RNA抽出のために必要な採血量を最小化できる、キアゲン社のキットを用いている。抽出されるのは全血球のRNAである。発現変動を認める遺伝子の意味付けのためには、どの血球由来であり、その変動が何を意味するのかを明らかにしなくてはならない。本研究で得られた所見を病態研究に生かすためには、変動遺伝子の由来細胞を明らかにする必要がある。われわれは予備的な検討から、抽出されてくるRNAが、その種類によって、主としてT細胞、B細胞、好中球などに分かれることは把握できている。病態研究を進めることによって、マーカーとしての意義もいつそう明らかになるであろう。

平成 18 年度にある程度の完成をみた対照の不要な1色法を、さらに発展させ、簡便化することにより、実用的な診断ツールとしての DNA チップが完成すると思われる。

E. 結論

DNAチップを用い、白血球中に発現する mRNA を指標として、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。平成18

年度は、対照者を必要としない1色法のチップに方法論を切り替えて、未治療うつ病を対象に解析を行い、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 5HTT、LIM、HDAC5、CREB な特定遺伝子発現の増減と、治療後の正常化を確認している。

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

Ueno S, Yamauchi K, Iga J, Nakamura M, Sano A, Ohmori T

Serotonin transporter gene in relation to psychiatric disorders.

pp185-197、in Dynamical Genetics. Transworld Research Network 2004

Eiji Takeda, Junji Terao, Yutaka Nakaya, Ken-ichi Miyamoto, Yoshinobu Baba,

Hiroshi Chuman, Ryuji Kaji, Tetsuro Ohmori, and Kazuhito Rokutan. Stress control and human nutrition. J Med. Investigation 51: 139-145, 2004

大森哲郎、森田恭子、上野修一、谷口隆英、木内佐和子、田吉純子、斉藤俊郎、太田雅之、六反一仁. DNAチップを用いたうつ病の診断と病態解析 精神神経学雑誌 106 : 1045-1049, 2004

大森哲郎 臨床現場と臨床エビデンスの近くて遠い距離 精神神経学雑誌 106 : 923-927, 2004

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

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

Iga J, Ueno S, Yamauchi K, Numata S, Motoki I, Tayoshi S, Kinouchi S, Ohta K, Song H, Morita K, Rokutan K, Tanabe H, Sano A, Ohmori T. Gene expression and association analysis of LIM (PDLIM5) in major depression. *Neurosci Lett* 400(2006) 203-207

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 Reserch: Neuroimaging*, 154(1); 85-92, 2007

Takahide Taniguchi, Satsuki Sumitani, Michitaka Aono, Junichi Iga, Sawako

Kinouchi, Hiroshi Aki, Mami Matsushita, Kyoko Taniguchi, Mami Tsuno, Kazunari Yamanishi, Masahito Tomotake, Yasuhiro Kaneda, Tetsuro Ohmori. Effect of antipsychotic replacement with quetiapine on the symptoms and Quality of Life of schizophrenic patients with extrapyramidal symptoms. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 2006 Oct;21(7):439-45.

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* 401; 1-5, 2006

M. Tomotake, Y. Kaneda, J. Iga, S. Kinouchi, S. Tayoshi, I. Motoki, S. Sumitani, K. Yamauchi, T. Taniguchi, Y. Ishimoto, S. Ueno, T. Ohmori. Subjective and objective measures of quality of life have different predictors for people with schizophrenia. *Psychological Reports* 99: 477-487, 2006

S. Numata, S. Ueno, J. Iga, K. Yamauchi,

- S. Hongwei, S. Kinouchi, S. Shibuya-Tayoshi, S. Tayoshi, H. Aki, S. Sumitani, M. Itakura, T. Ohmori. Interaction between catechol-O-methyltransferase (COMT) Val108/158Met and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphisms in age at onset and clinical symptoms in schizophrenia. *J Neural Transm* 114, 255-259, 2006
- J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S. Kinouchi, S. Tayoshi, H. Song, T. Ohmori. Altered HDAC5 and CREB mRNA expressions in the peripheral leukocytes of major depression. *Progress Neuro-Psychopharmacol Biological Psychiatry* 31: 628-632, 2007
- J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, S. Tayoshi, S. Kinouchi, M. Nakataki, H. Song, K. Hokoishi, H. Tanabe, T. Ohmori. Gene expression and association analysis of vascular endothelial growth factor in major depressive disorder. *Progress Neuro-Psychopharmacol Biological Psychiatry* 31: 658-663, 2007
- S. Numata, S. Ueno, J. Iga, K. Yamauchi, S. Hongwei, S. Kinouchi, Hashimoto R, Takeda M, Kunugi H, Itakura M, T. Ohmori. Gene expression in the peripheral leukocytes and association analysis of PDLIM5 gene in schizophrenia. *Neurosci Lett* 415: 28-33, 2007
- H. Aki, M. Tomotake, Y. Kaneda, J. Iga, S. Kinouchi, S. Shibuya-Tayoshi, S. Tayoshi, I. Motoki, K. Moriguchi, S. Sumitani, K. Yamauchi, T. Taniguchi, Y. Ishimoto, S. Ueno, Ohmori T. Subjective and objective quality of life, levels of life skills, and their clinical determinants I outpatients of schizophrenia. *Psychiatry Research* 2007 (in press).
- (2) 学会発表
日本精神神経学会 2004.5.20. 札幌 DNAチップによるうつ病の評価と解析 大森哲郎、上野修一、谷口隆英、六反一仁他
- 第101回日本精神神経学会 2005.5.20 大宮 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 Marker 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.

36th Annual meeting, Society for Neuroscience. Atlanta, 2006.10.14-18, Atlanta USA. Gene expression and association analysis of LIM (PDLIM5) in major depression. J. Iga, S. Ueno, K. Yamauchi, S. Numata, I. Motoki, S. Tayoshi, S. Kinouchi, K. Ohta, H. Sou, K. Morita, K. Rokutan, H. Tanabe, A. Sano, T. Ohmori.

36th Annual meeting, Society for Neuroscience. Atlanta, 2006.10.14-18, Atlanta USA. Gene expression and association analysis of LIM (PDLIM5) in schizophrenia. Shusuke Numata, Shu-ichi Ueno, Jun-ichi Iga, Ken Yamauchi, Song Hongwei, Ryota Hashimoto, Masatoshi Takeda, Hiroshi Kunugi, Mitsuo Itakura, Tetsuro Ohmori

第28回日本生物学的精神医学会 2006.9.14-16 名古屋 うつ病患者の末梢白血球 *LIM (PDLIM5)* 遺伝子発現と遺伝子関連解析 伊賀淳一 上野修一 山内健 宋鴻偉 沼田周助 木内佐和子 田吉純子 大森哲郎

第28回日本生物学的精神医学会 2006.9.14-16 名古屋 3T proton MRS を用いた OCD の脳内代謝物の検討 住谷さつき 原田雅史 久保均 田吉伸哉 田吉純子 木内佐和子 上野修一 大森哲郎

第28回日本生物学的精神医学会 2006.9.14-16 名古屋 BDNF Val66Met polymorphism in schizophrenia is associated with age of onset and symptoms. S. Numata, S. Ueno, J. Iga, K. Yamauchi, S. Hongwei, S. Kinouchi, S. Shibuya-Tayoshi, S. Tayoshi, S. Sumitani, T. Ohmori.

第28回日本生物学的精神医学会 2006.9.14-16 名古屋 Gene expression in the peripheral leukocytes in mental

disorders. S. Ueno, T. Ohmori:

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願中
特願 2006-262903
US Patent Application No 11/091,674,
European Patent Application No
05006769

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）

総合研究報告書

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

分担研究報告書

分担項目 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 精神科医長

平成 16, 17 年度

岡本長久 国立精神・神経センター武蔵病院 精神科医長

平成 18 年度

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ため、うつ病はわが国に限らず世界各国で重要政策課題としてとりあげられている。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が、うつ病患者の中で抗うつ薬による初回治療に反応しない患者が40-50%存在し、うつ病患者の10-20%程度が、複数の作用機序の異なる抗うつ剤によって改善しない薬物治療抵抗性うつ病であることが知られており、現在の薬物療法には限界が存在している。

一方、電気けいれん療法(electroconvulsive therapy ; ECT)は、メタ解析においてうつ病に対して薬物療法より高い有効性が証明され、薬物治療抵抗性うつ病に対しても高い有効性と迅速な効果発現を有する治療法であることが知られている。ECTの歴史は古く、ECTによって改善する多くの患者が存在するものの、ECTの作用機序の本質的解明に結びつく臨床研究は未だ存在しない。

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、ECT の遺伝子レベルで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。

平成 16 年度および 17 年度は、原田誠一が分担研究者を勤めたが、18 年度は原田の転出のため、岡本長久が後を引き継いだ。平成 18 年度までに、ECT を施行した 7 症例の検体を採取し、現在その解析を進めている。

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) でを行い、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 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。

(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

平成16年度に2例の検体を採取した。17年度に対象被験者を再検討し、当院うつ・ストレスケア病棟でECTを行った薬物治療抵抗性うつ病患者63名のうち、開始時より50%以上のハミルトンうつ病評価尺度17項目の減少を認める治療反応群93%（寛解群74%を含む）と9割以上の治療抵抗性うつ病患者に症状改善を認めた。

18年度は、分担研究者が原田誠一の転出のため岡本長久に引き継がれた。ECTを受けた7名の薬物療法抵抗性うつ病患者の参加を得て、サンプルの解析を行っている。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対象群は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。

現時点では、3症例に関し、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回のチップ解析を終了し、予備的にクラスター解析も試みた。各症例ごとにECT前後あるいは、ECT経過にしたがって、発現の増減する遺伝子を多数認めるものの、3症例ではECTによる変動として明確なことをいえなかった。

遺伝子発現変動は、急性ストレスによっても、うつ状態によっても、うつ状態の改善によっても変化するので、今後、それらの要因にも十分な注意を払いながら、まず症例数を増やす必要がある。

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行った。本研究は、DNAチップを用いて白血球遺伝子発現を指標に、うつ病でのECT実施前後の生体変化を把握を試みる世界で最初の試みであり、今後追求する価値がある。症例数を増やし、ECTの反応との関連や、1回のECT施行による変化、ならびに1クール治療前後の変化などを明確にし、ECTの生体に及ぼす影響や、作用機序に関し研究を進めたい。

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、佐藤博俊、小堀修、松本武典、大森まゆ、勝倉りえこ、稲森晃一、高島知昭：統合失調症の治療と認知行動療法の活用。精神療法 30：639-645, 2004

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。精神経誌 107：45-51, 2005

原田誠一：統合失調症の個人精神療法－3つのキーワードによる三題噺。こころの科学 120：99-106, 2005

原田誠一、岡崎裕士、西田淳志、小堀修、勝倉りえこ、松本武典、大森まゆ：統合失調症の早期発見・発症予防の可能性。精神科治療学 20：11-18, 2004

原田誠一：境界性人格障害治療における認知療法の実践。精神科治療学 19：709-718, 2004

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－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

岡本長久：難治性うつ病への対応. 医学の歩み 219: 955-962, 2006

岡本長久：うつ病の薬物療法-最新の知見を踏まえて-. 調剤と情報 686-691, 2006

岡本長久、野田隆政：期待される新規抗うつ薬と併用療法：エビデンスに基づく難治性うつ病の治療. 新興医学出版社、82-104, 2006

野田隆政、岡本長久：電気けいれん療法(electroconvulsive therapy;ECT)：エビデンスに基づく難治性うつ病の治療. 新興医学出版社、82-104, 2006

功刀浩、柳沢ひろみ、田中美穂、岡本洋平、堀弘明、橋本亮太、中林哲夫、岡本長久、大森まゆ、沢村香苗、斎藤治、樋口輝彦、廣中直行：統合失調症とうつ病におけるプレパルスインヒビションと関連指標：予備的報告、精神医学 49、2007

岡本長久：電気けいれん療法：AERA MOOK『新版 職場のうつ』（仮題）、2007年5月(予定)、朝日新聞社

(2) 学会発表

Harada S. Cognitive therapy for schizophrenia. World Congress of Behavioral and Cognitive Therapies 2004,

Kobe, July 20-24(20), 2004

勝倉りえこ、小堀修、原田誠一；抑うつを伴う全般性不安障害の1症例：八ヶ岳シンポジウム 2004. 8. 21 茅野

佐藤博俊、原田誠一：強迫性障害を合併した統合失調症で認知行動療法が奏功した2症例：八ヶ岳シンポジウム 2004. 8. 21 茅野

原田誠一、大森まゆ；認知療法の視点からみた統合失調症の精神病理とリハビリテーション：日本精神病理学会 2004. 10. 7 小諸

大森まゆ、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—心理教育や予防に役立つ統合失調症の精神病理・啓蒙用ツールの開発：日本精神病理学会 2004. 10. 7 小諸

原田誠一、本田秀夫：精神科面接の基本；日本コミュニケーション学会 2004. 10. 16 横浜

原田誠一；指定討論「精神医学の立場から」：シンポジウム「患者(クライエント)の語りを聴くことの意味—ナラティブ・アプローチの現在」 2004. 10. 30 東京

原田誠一、小堀修、勝倉りえこ；薬物療法抵抗性の幻覚妄想症状に認知療法が有効であった慢性統合失調症の1症例：日本認知療法学会 2005. 2. 19 札幌

勝倉りえこ、小堀修、原田誠一；コラム法の技法論：日本認知療法学会 2005. 2. 19 札幌

小堀修、勝倉りえこ、原田誠一；抑うつを伴う全般性不安障害の1症例－「女三界に家なし」から「ここは私たちの家だ」へ：日本認知療法学会 2005. 2. 19 札幌

吉田統子、大森まゆ、原田誠一；精神科デイケアにおける生活機能レベル評価－本人・スタッフ間の評価の差に着目して：日本認知療法学会 2005. 2. 19 札幌

稲森晃一、小堀修、勝倉りえこ、大森まゆ、原田誠一；幻聴・自我障害があり生活に支障をきたしていた統合失調症に認知療法が奏功した1症例：日本認知療法学会 2005. 2. 19 札幌

堀達、小宮山徳太郎、松本武典、原田誠一；行動薬理学を基盤としたアルコール依存症のbio-cognitive model：日本認知療法学会 2005. 2. 19 札幌

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－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の効果高めるために－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1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？－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

Nagahisa Okamoto；An MRI study of neurodevelopmental risk factors for psychosis: a relationship between discordant birth weight and morphological brain development in healthy monozygotic twins, 5th International Early Psychosis Association conference, 6October.2006,