

200833056A

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

プライマリーケアで使用可能な、DNAチップを用いた
うつ病の診断指標の作成

平成20年度 総括・分担報告書
主任研究者 大森 哲郎

平成21(2009)年 4月

目次

I. 総括研究報告	
プライマリーケアで使用可能な、DNAチップを用いたうつ病の診断指標の作成 大森哲郎	----- 1
II. 分担研究報告	
1. プライマリーケアで使用可能な、DNA チップを用いたうつ病の診断指標の 作成 —電気けいれん療法（ECT）による mRNA 発現の変化に関する研究— 岡本長久	----- 8
2. プライマリーケアで使用可能な、DNA チップを用いたうつ病の診断指標の作成 —うつ病の経過と病態との関連— 中川 伸	----- 16
3. 気分障害患者末梢白血球における遺伝子発現変動の解析 内田周作	----- 21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 30

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。本研究は、遺伝子mRNAの発現量を一括解析するDNAチップという最新技術を、うつ病の診断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。網羅的DNAチップを使用し、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た結果、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21,895中631種あった。そのうちの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。平成20年度は新たに共同研究体制を組み直し、この結果を再検するために徳島大学および共同研究施設においてサンプル収集を継続し、解析に取り掛かった。それとともに定量性に優れるリアルタイムPCRを用いていくつもの特定標的遺伝子のmRNA発現量の解析を進めた。

分担研究者

岡本長久	国立精神・神経センター病院 精神科医長
中川 伸	北海道大学大学院医学研究科精神医学分野 講師
内田周作	山口大学大学院医学系研究科高次脳機能病態学分野 助教

A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらす、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。

うつ病患者は初期にはプライマリーケア医を受診することが多い。そこでも使用可能な客観的な診断指標の確立は、プライマリーケアにおけるうつ病診断精度を向上させ、うつ病の早期発見と早期治療導入を促進する。本研究は、従来の限られた測定値に依拠するものと異なり、DNAチップを応用して白血球内のmRNA発現を網羅的に解析し、その発現パターンを基にプライマリーケアで使用

可能なうつ病の診断指標を確立するものである。

我々は、白血球を試料とする DNA チップ(2色法)による mRNA 発現解析研究から、1) うつ病未治療例において、全例にほぼ共通して発現の増減する遺伝子群が存在する、2) 発現増減遺伝子の多くは症状改善後に回復する、3) 所見は疾患特異的であり、統合失調症の所見とは重ならず、急性ストレス時の変化とも異なる、ことを見出した。平成 18 年度からは、現実的な臨床応用を視野に入れ、対照者の不要なチップ(1色法)に解析方法を切り替えて検討を続け、未治療うつ病を、感度 83%、特異度 92%という高い精度で、健常者から識別することに成功した。平行してリアルタイム RT-PCR 法を用いて、特定遺伝子の発現変動を確認した。これらの所見は、白血球 mRNA 発現を指標として、うつ病の診断マーカーの確立が可能であることを示している。

平成 20 年度は、新たに共同研究体制を組み直し、この結果を再検するためにサンプル収集を徳島大学および共同研究施設において継続し、解析に取り掛かった。それとともに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 発現量の解析を進めた。

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-IV に準拠し、中等症または重症うつ病エピソードに合致するもののほか、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も対象とした。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 を行い、アジレント社製 DNA チップを用いて遺伝子 mRNA 発現量を網羅的に解析し、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 チップの解析は徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ストレス制御医学分野(六反一仁教授)の研究室において遂行する体制をとった。

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 20 年度には、phosphodiesterase 4B (PDE4B) 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クエンス及び 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、チップ解析を行うストレス制御医学分野の研究室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、研究体制の変更と研究経過を審査委員会に報告し、平成18年と20年に継続承認を得ている。また共同研究施設の国立精神・神経センター、北海道大学、山口大学ともそれぞれの倫理委員会における承認を受けている。

C. 研究結果

これまでに治療後の再検査検体を含め200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集積している。うつ病以外の疾患でも、未服薬例を中心に、統合失調症や強迫性障害については30例ほどの臨床データと血液サンプルを収集している。

本研究に先立つ平成18年までの研究では2色法のチップを用い、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種存在すること、2) 変動遺伝子のいくつかは、治療後に正常方向へと変化すること、3) これらの所見は統合失調症とは異なり、急性ストレスに由来する変化とも異なることを明らかにした。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つた変化が捉えられることを意味している。平成18年度以降は、現実的な臨床応用を視野に入れ、対照者の不要なチップ（1色法）に解析方法を切り替えて検討を続けた。平成19年度までに46例の未治療うつ病と122例の健常者を解析して集計し、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21,895中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、感度83%、特異度92%という高い精度でうつ病を健常者から区別できた。

この所見を確認し、さらに識別精度の高い解析法を確立するために、症例集積を継続した。集積した遺伝子発現パターンと臨床データとの関連を解析し始めている。症状特性、重症度、治療反応、予後との関連を検討する。同時に、双極性障害、不安障害および精神病性障害の解析を行う。

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。LIM発現量は未治療統合失調症ではうつ病と

は逆に増加していた。さらに、うつ病未治療時には、histone deacetylase 5 (HDAC5) および cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB) が有意に上昇していたが、抗うつ薬による治療後には減少することも見出した。本年度の検討からは、phosphodiesterase 4B (PDE4B) 遺伝子発現がうつ病において増加し、治療によって対照群の値まで下がること、transforming growth factor- β receptor 2 (TGFBR2) 遺伝子発現はうつ病においては対照群と変わらないが、統合失調症では増加していることなどを見出した。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。また、いくつかの遺伝子発現の性周期による発現変動を検討し、セトロニントランスポーターや COMT 遺伝子発現には変化がないが、FKBP5 は有意な変化があることを見出した。これらは性周期に伴う心身変化と関連する可能性がある。

これらの 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核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。

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。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 の発現パターンを用いて、うつ病の指標の作成が可能であることを強く示唆している。

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。数多くの mRNA 発現量から生体機能を多面的に把握する本方法は、従来の限られた因子を測定する方法に比べ、うつ病のような複雑な疾患の評価方法として、原理的にも適切である。同時に、患者負担は少量通常採血のみであり、臨床応用が現実的である。これらの mRNA 発現変化は、うつ病で見られる神経内分泌系、精神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、うつ病の中核異常と直接関連する変化を含む可能性もある。現在の研究を発展させ、搭載遺伝子を絞り、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、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。診断精度を向上させ、うつ病のための二次的な医学的・社会的問題を減少させることにつながる。

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

Yasui T, Yamada M, Uemura H, Ueno S, Numata S, Ohmori T, Tsuchiya N, Noguchi M, Yuzurihara M, Kase Y, Irahara M. Changes in circulating cytokine levels in midlife women with psychological symptoms with selective serotonin reuptake inhibitor and Japanese traditional medicine. *Maturitas*. 2009 Feb 20;62(2):146-52.

Tayoshi S, Sumitani S, Taniguchi K, Shibuya-Tayoshi S, Numata S, Iga J, Nakataki M, Ueno S, Harada M, Ohmori T. Metabolite changes and gender differences in schizophrenia using 3-Tesla proton magnetic resonance spectroscopy ((1)H-MRS). *Schizophr Res*. 2009 Mar;108(1-3):69-77.

Iga J, Ueno S, Ohmori T. Molecular assessment of depression from mRNAs in the peripheral leukocytes. *Ann Med*. 2008;40(5):336-42.

Numata S, Iga JI, Nakataki M, Tayoshi

S, Taniguchi K, Sumitani S, Tomotake M, Tanahashi T, Itakura M, Kamegaya Y, Tatsumi M, Sano A, Asada T, Kunugi H, Ueno SI, Ohmori T. Gene expression and association analyses of the phosphodiesterase 4B (PDE4B) gene in major depressive disorder in the Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. Published Online 10 Sep [PMID: 18785206] 2008

Kunika K, Tanahashi T, Numata S, Ueno S, Ohmori T, Nakamura N, Tsugawa K, Miyawaki K, Moritani M, Inoue H, Itakura M. Common coding variant in the TCF7L2 gene and study of the association with type 2 diabetes in Japanese subjects. *J Hum Genet*. 2008;53(11-12):972-82.

Yamamoto M, Tomotake M, Ohmori T. Construction and reliability of the Japanese version of the Adolescent Egocentrism-Sociocentrism (AES) scale and its preliminary application in the Japanese university students. *J Med Invest*. 2008 Aug;55(3-4):254-9.

Yamauchi K, Aki H, Tomotake M, Iga J, Numata S, Motoki I, Izaki Y, Tayoshi S, Kinouchi S, Sumitani S, Tayoshi S, Takikawa Y, Kaneda Y, Taniguchi T, Ishimoto Y, Ueno S, Ohmori T. Predictors of subjective and objective quality of life in outpatients with

schizophrenia. Psychiatry Clin Neurosci. 2008 Aug;62(4):404-11.

Numata S, Ueno S, Iga J, Song H, Nakataki M, Tayoshi S, Sumitani S, Tomotake M, Itakura M, Sano A, Ohmori T. Positive association of the PDE4B (phosphodiesterase 4B) gene with schizophrenia in the Japanese population. J Psychiatr Res. 2008 Nov;43(1):7-12.

Kinouchi S, Iga J, Ueno S, Yamauchi K, Numata S, Song H, Sumitani S, Shibuya-Tayoshi S, Haku M, Yasui T, Irahara M, Morita K, Rokutan K, Ohmori T. FKBP5, SERT and COMT mRNA expressions in the peripheral leukocytes during menstruation cycle in healthy reproductive females. Neurosci Lett. 2008 Mar 21;434(1):124-8.

Aki H, Tomotake M, Kaneda Y, Iga J, Kinouchi S, Shibuya-Tayoshi S, Tayoshi SY, Motoki I, Moriguchi K, Sumitani S, Yamauchi K, Taniguchi T, Ishimoto Y, Ueno S, Ohmori T. Subjective and objective quality of life, levels of life skills, and their clinical determinants in outpatients with schizophrenia. Psychiatry Res. 2008 Feb 28;158(1):19-25.

(2) 学会発表

第2回アジア・太平洋生物学的精神医学会, 第30回日本生物学的精神医学会

(2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP)
2008.9.11-13 富山 Assessment of Depression Using mRNA Expression in the Peripheral Leukocyte Tetsuro Ohmori, Jun-ichi Iga, Shusuke Numata, Shu-ichi Ueno, Toshiro Saito, Kazuhito Rokutan

第2回アジア・太平洋生物学的精神医学会, 第30回日本生物学的精神医学会

(2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP)
2008.9.11-13 富山 日本人におけるうつ病患者の PCNT2 遺伝子関連解析 Positive Association of the PCNT2 gene with Major Depressive Disorder in the Japanese Population. 中瀧理仁, 伊賀淳一, 棚橋俊仁, 板倉光夫, 上野修一, 大森哲郎

第2回アジア・太平洋生物学的精神医学会, 第30回日本生物学的精神医学会

(2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP)
2008.9.11-13 富山 多チャンネル近赤外線スペクトロスコープを用いた強迫性障害の認知機能の検討 住谷さつき, 宮田幸奈, 秋山麻衣, 谷口京子, 大森哲郎

第2回アジア・太平洋生物学的精神医学会, 第30回日本生物学的精神医学会

(2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP)

2008.9.11-13 富山) 統合失調症と Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase1 遺伝子の関連解析 中瀧理仁, 上野修一, 沼田周助, 伊賀淳一, 田吉伸哉, 田吉純子, 宋鴻偉, 棚橋俊仁, 板倉光夫, 大森哲郎

14th World Congress of Psychiatry 2008.9.20-25 チェコ, プラハ Subjective quality of life and cognitive function in people with schizophrenia. Tomotake M, Ueoka Y, Tanaka T, Kaneda Y, Yamauchi K, Taniguchi K, Takikawa Y, Nakataki M, Numata S, Tayoshi S, Sumitani S, Izaki Y, Ohmori TS, Ueno S, Ohmori T

14th World Congress of Psychiatry 2008.9.20-25 チェコ, プラハ Clinical factors related to cognitive function in people with schizophrenia. Ueoka Y, Tomotake M, Tanaka T, Kaneda Y, Kawahara K, Iwasaki H, Okamoto A, Hase A, Ikebuchi M, Mori N, Momo K, Ohmori T

14th World Congress of Psychiatry, 2008.9.20-25, チェコ, プラハ Predictors of objective quality of life in people with schizophrenia. Ueoka Y, Tomotake M, Tanaka T, Kaneda Y, Yamauchi K, Taniguchi K, Takikawa Y, Nakataki M, Numata S, Tayoshi S, Sumitani S, Ohmori TS, Ueno S, Ohmori T

14th World Congress of Psychiatry 2008.9.20-25 チェコ, プラハ Subjective well-being and its clinical determinants in outpatients with schizophrenia. Aki H, Tomotake M, Kaneda Y, Iga J, Kinouchi S, Shibuya-Tayoshi S, Tayoshi S, Motoki I, Moriguchi K, Sumitani S, Yamauchi K, Taniguchi KT, Ishimoto Y, Ueno S, Ohmori T.

第 18 回日本臨床精神神経薬理学会 2008.10.1-3 東京 Quality of life and cognitive function in outpatients with schizophrenia. 統合失調症外来患者の QOL と認知機能 Tomotake M, Ueoka Y, Tanaka T, Kaneda Y, Yamauchi K, Taniguchi K, Takikawa Y, Nakataki M, Numata S, Tayoshi S, Sumitani S, Izaki Y, Ohmori TS, Ueno S, Ohmori T.

第 18 回日本臨床精神神経薬理学会 2008.10.1-3 東京 Relationship between cognitive function and clinical factors in people with schizophrenia. Ueoka Y, Tomotake M, Tanaka T, Kaneda Y, Nakataki M., Numata S, Tayoshi S, Sumitani S, Ueno S, Ohmori T.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
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

プライマリーケアで使用可能な、DNA チップを用いたうつ病の診断指標の作成

—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 岡本長久 国立精神・神経センター病院 精神科医長

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。死亡率に死亡時年齢や生活への影響を考慮した DALYs (Disability Adjusted Life Years) を用いた各疾患の経済的損失についての WHO の報告では、うつ病が 2020 年までに全疾患中第 2 位になると予測されている。現在、すでに 15~44 歳勤労者層では男女ともにうつ病が DALY の第 2 位である。このような背景から、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。

一方で近年、うつ病は「薬で治る」病気と考えられていたが、その考え方を変えないといけなことが分かってきた。Keitner らによると、薬物療法での反応率は 50~65%、寛解率は 28~47%、精神療法での反応率は 50~58%、寛解率は 30~48%であった。実に初回の治療で寛解にいたるのは半分以下である。薬物療法で改善しない（一般的に異なる 2 種類の抗うつ薬を十分量十分期間使用して無効である場合を言うことが多い）、治療抵抗性うつ病の問題は大きくなってきている。従来、治療抵抗性うつ病はうつ病の 10~15%と少なく見積もられていたが、最近のメタ解析では約 40%を占める。近年米国で行われた大規模薬物治療アルゴリズム研究である Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR*D) 研究の結果でも、抗うつ薬投与で寛解に至らず、さらに別の抗うつ薬への置換、増強療法、併用療法など 4 つの治療段階を経ても寛解にいたらない患者が、約 3 分の 1 いることが示された。現在、このような「薬で治らない」治療抵抗性うつ病に対する治療戦略が非常に大きな課題となっており、ECT (electroconvulsive therapy ; ECT) は自殺企図や全身衰弱などを合併する重症例だけでなく、薬物治療抵抗性または遷延性のうつ病に対する根本的な治療法としても期待されるようになってきている。

このように、生涯罹患率が 10%にも上り社会経済的損失の大きいこの疾患の早期発見と的確な診断・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、同時に ECT を含めた治療抵抗性うつ病患者の治療戦略の確立およびうつ病の病態生理の解明が同時に行わなければ、いくらうつ病患者の精神科医療受診率が向上したとしても薬物治療抵抗性の問題が残されることになる。

電気けいれん療法は、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。Folkerts らは、薬物治療抵抗性うつ病患者に対する右片側性 ECT の反応率は 71% と高いことを報告している。平成 17 年度に当院で ECT を行った薬物治療抵抗性うつ病患者 63 名の調査では、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ている。

このように ECT によって改善する多くの治療抵抗性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せず、ECT によるうつ病の改善が遺伝子レベルで検証されれば、ECT の奏功機序の解明およびうつ病の病態生理の解明につながるものと考えられる。

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。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血液サンプルより DNA チップを用いた解析を行い、「ECT によるうつ症状の改善」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従来明らかにならなかったうつ病の病態の理解が進み、②今後、特化した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られる。次年度より施行する ECT 前後の DNA チップの血液サンプル採取は、ECT の奏功機序を解明する可能性があるが、ECT 施行方法の違いによって、mRNA の発現パターンに影響を及ぼしてしまいバイアスを生じさせる可能性がある。このため本年度は次年度の血液サンプル採取に向けて、通常診療で行われている ECT 施行手技のバリエーションを統一するため、通常 ECT において用いられている麻酔法の違いなど ECT 施行方法の違いで、ECT 効果に差異を生じるかどうかを検討した。

A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらす、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確か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、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」の関係を明らかにし、ECTの奏功機序およびうつ病の病態生理を解明することである。

B. 研究方法

本年度は研究方法に関する予備的研究を行ったため、DNAチップ血液サンプルの採取は行っていないが、次年度の研究プロトコルは以下の通りである。国立精神・神経センター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する予定である。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する。また、重篤な身体合併症を有するものも除外する。DNAチップ血液サンプルの採取のための採血は、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回行う予定である。うつ病の重症度はハミルトン評価尺度で評価する。なお、ECT施行中は薬物療法の処方内容は変更しない。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を抽出する。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う。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する。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。

倫理面への配慮としては、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を行い、連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護する予定である。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年に受けている。

DNAチップはECTの奏功機序を解明する可能性があるが、通常診療で行っているECT施行方法の違いによって、効果に違いを生じmRNAの発現パターンに影響を及ぼす可能性がある。初年度である今年度は研究方法の確立を行うため、ECTにおいて通常用いられている麻酔法の違いなどECT施行方法の違いで、ECT効果に差異を生じるかどうかを検討した。2006年4月から2007年4月までの期間、国立精神・神経センター病院うつ・ストレスケア病棟に入院し通常診療においてmECTを受けた治療抵抗性うつ病患者で、ともに診療で使用されているプロポフォール麻酔とケタミン麻酔において1)うつ病評価尺度改善率、2)刺激強度とけいれん持続

時間、3)有害事象発現の差異があったかについて解析を行った。

DSM-IVおよびSCID-Iで、大うつ病性障害の診断基準をみたす患者を対象とし、1)当院 mECT マニュアルに基づき mECT の適応があると判断され、2)mECT に関して書面でのインフォームドコンセントが得られ、かつ 3)本調査に関しても書面での同意が得られた患者を対象とした。通常の前検査(問診、採血、胸腹部レントゲン、心電図、頭部 CT)を行い、各麻酔薬過敏症の既往、脳血管障害、高血圧、脳圧亢進症、緑内障、重症身体症不全、痙攣発作の既往は調査から除外した。安全に電気けいれん療法を行えると主治医が判断した場合、精神症状を知らない麻酔科医が麻酔科学的に麻酔を選択し、当院で採用している mECT マニュアルに基づき計 8 回の mECT を行った。通常通り mECT 施行中には薬剤変更は行なわず、うつ病の改善については、ハミルトンうつ病評価尺度 17 項目(HAM-D17)により mECT 開始直前、2 回(1 週間後)、4 回(2 週間後)、6 回(3 週間後)、8 回(4 週間後)終了後に評価し、有害事象は発生時に適宜評価した。ケタミン群 11 名(男性 5 名、女性 6 名)、プロポフォール群(N=20、男性 10 名、女性 10 名)であり、ベースラインの解析では、平均年齢はケタミン群 59.3 ± 13.5 歳、プロポフォール群 55.1 ± 15.4 歳、現在のうつ病相の長さはケタミン群 2.8 ± 2.1 年、プロポフォール群 2.7 ± 2.0 年、試みられた適切な十分量十分期間の抗うつ治療の数はケタミン群 6.5 ± 2.7 、プロポフォール群 6.7 ± 2.2 、過去の ECT の既往歴はケタミン群で 2 例、プロポフォール群で 3 例、

HDS-R17 は、ケタミン群で 31.9 ± 4.5 、プロポフォール群で 30.3 ± 5.4 で有意な差はなかった。また開始時の服用薬についても有意な差はなかった。

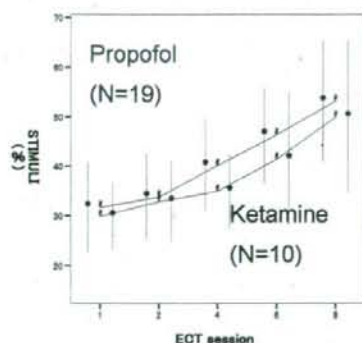
C. 研究結果

2 回の ECT 終了時にプロポフォール群でせん妄のため ECT を 1 名が中断し、ケタミン群で覚醒時の悪夢の訴えが強くチオペンタールに麻酔薬を変更した 1 例が存在した。プロポフォール群で 2 名、ケタミン群で 2 名、症状が著明に改善したため 6 回で ECT を終了した。ケタミン群では麻酔薬平均使用量は 0.86 mg/kg 、プロポフォール群では 0.94 mg/kg であった。ECT 回数と刺激強度の時間的推移を【図 1】に示す。縦線は 95% 信頼区間を示している。両群共に ECT 回数を重ねるたびに刺激強度が増加したが、これは線形モデル反復測定において有意な差を認めなかった。【図 2】は ECT 回数と脳波上のけいれん持続時間との関係を示しているが、両群に有意な差を認め ($P=0.019$)、それぞれの時点でを行った解析ノンペアード T 検定では、1 回目、2 回目において持続時間が有意にケタミン群のほうが長かったが、4 回目以降は有意差を認めなかった。【図 3】は横軸が ECT 終了回数、縦軸がベースラインの得点からそれぞれの時点における HAM-D 得点を減じた値で、ベースラインからのうつ症状の改善度を示している。両群に有意な差を認め ($P=0.002$)、2 回目終了後、4 回目終了後においてプロポフォール群に比してケタミン群が有意に HAM-D の減少率が高かった ($P<0.01$) が、以降は抗うつ効果は同等であった。臨床的有害

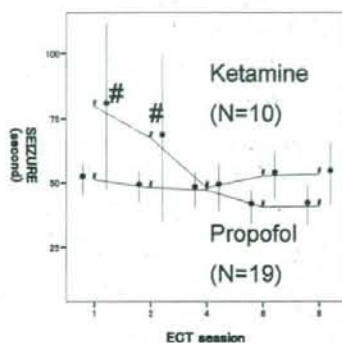
事象は、ケタミン群、プロポフォール群にそれぞれ頭痛(36%対 40%)、嘔気(9%対 15%)、麻酔薬注射時血管痛(0%対 45%)、術中高血圧(45%対 20%)、覚醒時悪夢(27%対 0%)、短期の術後もうろ状態(9%対 15%)、

遷延性のせん妄(0%対 5%)が認められた。血管痛は有意にプロポフォール群で多く($P < 0.01$)、術中高血圧、覚醒時悪夢は有意にケタミン群に多かった($P < 0.05$)が、両群共に重大な副作用はなかった。

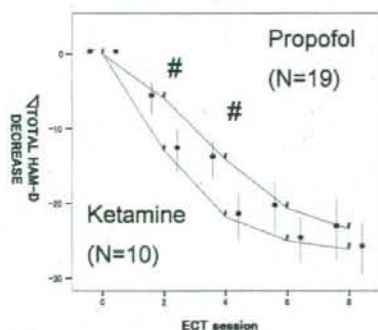
【図 1】ECT 回数と刺激強度(%)



【図 2】ECT 回数とけいれん持続時間(秒)



【図 3】ECT 回数と HAM-D 総得点減少



D. 考察

プロポフォール群でも 6 回目 ECT 終了時には抗うつ効果が統計的にケタミン群に追いついており、最終的な効果は変わらなかったが、ケタミンは ECT における早期の抗うつ反応をプロポフォールよりも増強することが示され、ECT 麻酔薬による効果の差異が見られた。これはケ

タミンの持つけいれん閾値低下作用による ECT 効果の増強あるいは、ケタミンそのものが持つ抗うつ効果の影響によると考えられた。

E. 結論

DNA チップは ECT の奏功機序を解明する可能性があるが、通常診療で行ってい

る ECT 施行方法の違いによって、ECT の効果発現パターンに差異があることが示された。これは mRNA の発現パターンに影響を及ぼす可能性があり、mECT 施行方法（刺激強度決定方法や麻酔法）を統一して、次年度より DNA チップ血液サンプルを採取し解析を行っていく予定である。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 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」の関連を明らかにしていく。また本研究は、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り、今後の臨床及び研究応用が期待される。なお 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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

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』、朝日新聞社、2007.5.

岡本長久：Star*D 研究から得られるもの：精神科治療学 23 巻 2007.3.

岡本長久、佐藤真由美、中井哲慈：ケタミンと電気けいれん療法の併用による難治性うつ病の治療：depression frontier 2008.10.

佐藤真由美、岡本長久：抗うつ薬と電気けいれん療法の併用療法 (Combination Therapy of Electroconvulsive Therapy and Antidepressants)：臨床精神薬理第 12 巻第 02 号、2009.2.

岡本長久：うつ病 Q&A、p.122-145

岡本長久：躁うつ病治療の実際：躁うつ病はここまで分った、日本評論者、p.89-120、2007.8.

松田太郎、長房裕子、坂本広太、岡本長久：双極性障害の心理療法：心療内科第 12 巻第 3 号、p.192-202、2008.5.

長房裕子、岡本長久：うつ病～難治性うつ病の治療戦略～：Medicament News 第 1958 号、2008.10.15

長房裕子、岡本長久、樋口輝彦：うつ病と不安障害の併存：Medical Tribune、2008.11.6.

ケタミンと電気けいれん療法の併用による難治性うつ病の治療 Depression Frontier Vol.6 No.2:74-78: 2008

(2) 学会発表

堀弘明、沢村香苗、岡本長久、大森まゆ、樋口輝彦、功刀浩：「外来うつ病、一般成人におけるストレスと DEX/CRH テス

ト」、生物学的精神医学会、2007年7月、札幌

市川亮、坂本広太、牧安紀、元永悠介、佐藤真由美、岡本長久：「ビデオを用いた修正型電気痙攣療法の説明を行って～患者のmECTのイメージの評価」、第103回日本精神神経学会総会、2007年5月、高知

岡本長久、佐藤真由美、坂本広太、長房裕子、森崎洋平、伊藤暢厚、中井哲滋：「うつ病における修正型電気けいれん療法の術中麻酔薬の差異の検討～ケタミン麻酔およびプロポホル麻酔とのオープン試験による比較～」、第103回日本精神神経学会総会、2007年5月、高知

長房裕子、佐藤真由美、山下典生、森崎洋平、伊藤暢厚、坂本広太、岡本長久：「うつ病における疾患特異的SPECT所見の検討」、第103回日本精神神経学会総会、2007年5月、高知

堀弘明、沢村香苗、岡本長久、大森まゆ、樋口輝彦、功刀浩：「外来うつ病、一般成人におけるストレスとDEX/CRHテスト」、第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会合同年会、2007年7月12日、札幌

市川亮、坂本広太、佐藤真由美、岡本長久、樋口輝彦：「SSRI誘発性重症・遷延性セロトニン症候群にmECTが奏効した一例」、東京精神医学会、2007年6月13日、東京

牧安紀、市川亮、元永悠介、坂本広太、岡本長久、佐藤真由美、樋口輝彦：「診断に難渋した遷延性抑うつ状態の一例」、東京精神医学会、2007年6月13日、東京
長房裕子、山下典生、佐藤真由美、坂

本広太、岡本長久：「うつ病におけるSPECT所見の検討～罹病期間との関連～」、第49回日本心身医学会総会、2008年6月13日、札幌

松田太郎、長房裕子、坂本広太、岡本長久：「セロトニン症候群にm-ECTが奏効した二例」、第49回日本心身医学会総会、2008年6月13日、札幌

築詰健次郎、岡本長久、松田太郎、長房裕子、坂本広太、樋口輝彦：「精神疾患による昏迷状態と鑑別が困難であった症候性疾患の3症例」、第49回日本心身医学会総会、2008年6月13日、札幌

(3) 講演など

岡本長久：「成人期に出会う広汎性発達障害」、2007年度政策医療ネットワーク精神疾患研修会、2007年2月9日、東京

岡本長久：「双極性障害治療の実際」、NPO不安・抑うつ臨床研究会主催第13回都民講演会、2007年2月3日、東京

堀弘明、沢村香苗、橋倉都、尾関祐二、岡本長久、大森まゆ、寺田純雄、樋口輝彦、功刀浩：「DEX/CRHテストにおける過抑制とストレスとの関連」、第27回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、2008年6月21日、箱根

岡本長久：「職場におけるうつ」、市民公開講座講演、2008年10月19日、大阪

岡本長久：「ECTの未来と展望～ケタミンを用いた難治性うつ病のECT」多摩精神科治療懇話会、2009年1月23日、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

- なし
- 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

プライマリーケアで使用可能な、DNA チップを用いたうつ病の診断指標の作成

—うつ病の経過と病態との関連—

分担研究者 中川 伸 北海道大学大学院医学研究科精神医学分野 講師

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、しばしば自殺企図に結びつく。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患に対してプライマリーケア医においても早期診断可能な診断・治療体制を確立すること、その病態を解明することは、社会全体の急務である。主任研究者らはうつ病患者の白血球における mRNA 発現パターンを DNA チップにより解析し、未治療うつ病を、感度 83%、特異度 92%という高い精度で、健常者から識別することに成功している。本研究は1色法チップの解析を単極うつ病の別集団で再検するとともに、他の生物学的指標である神経内分泌学的、脳画像的指標との関連を検討するものである。

A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらす、社会生活に甚大な支障をきたし、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・治療体制の確立、病態解明は、社会全体の急務である。うつ病患者は初期にはプライマリーケア医を受診することが多い。そのため、早期診断に応用できる簡便かつ客観的な指標は、うつ病の発見率と治療率を向上させるとされる。現在までに研究代表者である大森らは白血球を試料とする DNA チップ(2色法)による mRNA 発現解析研究から、1) うつ病未治療例において、全例にほぼ共通して発現の増減する遺伝子群が存在する、2) 発現増減遺伝子は、症状改善後に回復する、3) 所見は疾患特異的であり、統合失調症の所見とは重ならず、急性ストレ

ス時の変化とも異なる、ことを見出した。さらに平成 18 年度からは、現実的な臨床応用を視野に入れ、対照者の不要なチップ(1色法)に解析方法を切り替えて検討を続け、未治療うつ病を、感度 83%、特異度 92%という高い精度で、健常者から識別することに成功している。また、平行してリアルタイム RT-PCR 法を用いて、特定遺伝子の発現変動を確認している。本研究はこの技術を臨床応用し、さらに病態解析を進めるために、当科における未治療のうつ病(別集団のうつ病)での症状特性、重症度、治療反応、予後とともに一色チップの結果を再検する。さらに神経内分泌学的(デキサメサゾン・CRH 負荷試験: DEX/CRH test)、脳画像的(MRI)な指標との関連をも検討する

B. 研究方法

北海道大学病院精神科神経科を受診しており DSM-IV にて大うつ病エピソードと診断され、かつ HAM-D 17 項目で 15 点以上の患者のうち、当研究について文書により説明し、参加の同意を得られたものを対象とした。脳器質性疾患や内分泌疾患の既往を有する患者は対象から除外した。研究開始時に症状評価 (BDI: Beck Depression Inventory、SIGH-D: Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale、MADRS: Montgomery Åsberg Depression Scale)、機能評価 (SASS: social adaptation self-evaluation scale, GAF: Global Assessment of Functioning)、治療効果評価 (CGI: Clinical Global Impression) を用いて状態を多角的に評価した。

DNA チップによる mRNA 発現解析研究において、採血は、医師または看護師が、安静下に肘静脈より血液 10ml を採取し、凍結保存した後、徳島大学医学部神経精神医学講座に送付した。その後、一部は抽出キット (キアゲン社、PAX Gene Blood RNA キット) で RNA を抽出し、DNA チップでメッセンジャー-RNA を測定した。

MRI 撮像は SIEMENS 製 Symphony 1.5T にて MPRAGE (magnetization prepared rapid gradient echo) シーケンス、冠状断 1mm 厚スライスにて撮像し、Dr. View (旭化成、Linux 版) ソフトウェアを用いて、Watson et al (1992) および Convit et al (1999) の方法に従い手動的関心領域法により海馬及び扁桃帯の体積測定を施行した。

DEX-CRH test は Heuser et al (1994) の方法に従った。抑制型/非抑制型の判別は

Kunugi et al (2004) の基準に従い、血漿コルチゾール濃度がいずれかの採血時点で $5\mu\text{g/dl}$ を上回った場合に非抑制型とし、それ以外を抑制型とした。

(倫理面への配慮)

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、書面で同意を取得した。研究参加を断っても診療上なんらの不利もないことを十分に説明した。サンプルは連結可能匿名化を行いプライバシーを保護している。本研究計画は北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を平成 20 年 6 月 27 日に受けている。

C. 研究結果

本期間において未治療のうつ病患者をリクルートすることはできなかった。しかしながら、治療薬の大きな影響を受けないと考えられている海馬及び扁桃帯の体積測定並びに DEX-CRH test を対象に合致する患者 30 名 (男性 15 名、女性 15 名、平均年齢 44 歳) に施行できた。その結果、大うつ病エピソード患者の 50% (15/30) が DEX-CRH test で非抑制型を示した。特に女性患者では 67% (10/15) が非抑制型を示し、既報同様に高率に認められた。大うつ病エピソード患者群では健常対照群と比較して両側海馬体積は有意に減少しており、特に非抑制群ではより顕著な減少が認められた。また非抑制群では、健常対照群と比較して右扁桃帯体積の減少も認められた。

D. 考察

今回、予想以上に未治療のうつ病患者

をリクルートする事が困難であることが判明した。北海道大学病院は特定機能病院でもあり、殆どの外来患者が他院からの紹介により、受診する。したがって、必然的に治療中の患者が多くなる。リクルートの手段を再検討することも必要になると考えられた。また、後者の結果は単一のうつ病と診断される病態にも異なるエンドフェノタイプが見られることを、改めて確認する結果となった。

E. 結論

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。さらに症状特性、重症度、治療反応、予後や神経内分泌学的、脳画像的な指標との関連を検討することにより、うつ病の病態生理の解明、生物学的指標による治療を目指すものである。社会的・医療行政的意義は大きく、今後も幅広く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

Boku S, Nakagawa S, Masuda T, Nishikawa H, Kato A, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T: Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through GSK-3 β and β -catenin/TCF pathway. *Neuropsychopharmacology* 34, 805-815, 2009.

Nishikawa H, Inoue T, Masui T, Izumi T, Nakagawa S, Koyama T: Pharmacokinetic interaction between tandospirone and fluvoxamine in the rat contextual conditioned fear stress model and its functional consequence: Involvement of cytochrome P4503A4. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 62, 591-596, 2008.

Abekawa T, Ito K, Nakagawa S, Nakato Y, Koyama T: Olanzapine and risperidone block a high dose of methamphetamine-induced schizophrenia-like behavioral abnormalities and accompanied apoptosis in the medial prefrontal cortex. *Schizophr. Res.* 101, 84-94, 2008.

Takahashi T, Oono H, Inoue T, Boku S, Kako Y, Kitaichi Y, Kusumi I, Masui T, Nakagawa S, Suzuki K, Tanaka T, Koyama T, Radford MH: Depressive patients are more impulsive and inconsistent in intertemporal choice behavior for monetary gain and loss than healthy subjects—an analysis based on Tsallis' statistics. *Neuro Endocrinol Lett.* 29, 351-8, 2008.

Izumi T, Inoue T, Kato A, Kitaichi Y, Nakagawa S, Koyama T: Changes in amygdala neural activity that occur with the extinction of context-dependent conditioned fear