

201027053A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業精神障害分野

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22年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 大森 哲郎

平成23(2011)年 5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. ECT（ECT）による mRNA 発現の変化に関する研究 岡本長久	8
2. 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
4. 抗うつ薬ミルタザピンの作用機序に関する研究 上野修一	26

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	32
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	39
-----------------	----

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
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%にも上るうつ病の的確な診断は、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。DNAチップおよびリアルタイムRT-PCR法を駆使し、未治療うつ病と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多数存在し、それらを利用して健常者と識別可能であることが判明した。この過程で、うつ病患者を対照群から識別するためには、10種から数10種程度の遺伝子mRNA 発現で十分であることも判明し、そのためにはPCRアレイ法がDNAチップよりも精度と再現性が高く、しかも測定が簡便で安価であって、最適な方法であると判断された。平成22年度には、40種の遺伝子を搭載したうつ病判別用PCRアレイを試作し、30例のうつ病患者の治療前後のサンプルの測定を完了し、有望な結果を得た。

分担研究者

岡本長久	国立精神神経医療研究センター病院
中川 伸	北海道大学
内田周作	山口大学
上野修一	愛媛大学

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。

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、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 年度から共同研究体制を組み直し、さらに平成 21 年度には徳島大学から愛媛大学に転出した上野修一を新たに共同研究者と加えて、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。

ここまでの研究過程で、うつ病判別のためには、数十種類の遺伝子発現解析で十分であることが判明し、そのためには多穴式のリアルタイム RT-PCR (PCR アレイ) が最適な方法となると判断した。平成 22 年度には、独自に 40 種の搭載遺伝子を選定したうつ病判別用 PCR アレイを試作し、うつ病サンプルで検討を進めた。

B. 研究方法

徳島大学精神科神経科あるいは共同研究施設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。統合失調症も研究対象とした。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。

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22年度には、数十の遺伝子発現を同

時に解析できる多穴式のリアルタイム RT-PCR法(PCRアレイ)による検討を進め、搭載遺伝子を独自に選定したうつ病判別用PCRアレイを試作し、うつ病を対象に検討を進めた。

(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、研究に遺伝子多型解析を含む場合には、それを含む説明を行い、文書による同意を得る。遺伝子多型解析に関しては徳島大学ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得ている。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、愛媛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250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50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っ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) が有意に上昇し抗うつ薬による治療後には減少すること、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、また双極性障害の白血球（単球）では増加していると報告された epithelial membrane protein 1 (EMP1) の mRNA 発現はうつ病では減少していることが明らかとなった。

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。

薬物の影響としては、双極性障害治療薬でありうつ病の増強療法としても用いられるリチウムの作用を検討した。健常者がリチウムを 2 週間服用したさいに、白血球中の inositol monophosphatase や glycogen synthase kinase3 の遺伝子 mRNA 発現には変化を認めなかったが、vascular endothelial growth factor (VEGF) や epithelial membrane protein 1 (EMP1) などの mRNA は減少することが判明した。これら mRNA 発現を診断指標とすると、リチウム服用患者においてはそのまま適用できないことを示唆している。VEGF はうつ病において発現が増加し、EMP1 は発現が減少することを見出していることと考え合わせて、治療薬による変化と病態との関連は興味深い。薬物の影響は今後も検討を続けるべき課題である。

平成22年度に重点的に取り組んだのは多穴式のリアルタイムRT-PCR (PCRアレイ) による検討である。これまでの研究過程から、白血球を試料とした mRNA 発現解析によって、うつ病の診断指標の作成が可能であるという結果を得たが、DNA チップ法は万単位の遺伝子発現の一括測定という利点と裏腹に、高コストと煩雑な解析、さらには測定精度と再現性の限界という問題を抱えている。一方で、DNA チップを用いたとしても、診断指標に使用する mRNA 発現は

10種から数10種程度の遺伝子で十分であることが判明した。数10種程度のmRNA発現の測定ならば、再現性、簡便性、コストと実用性からみて、最近汎用されるようになった多穴式のリアルタイムRT-PCR（PCRアレイ）を使用するのが適切である。これまでのDNAチップおよびリアルタイムPCRを使用した研究から、うつ病において白血球mRNA発現に変化の見られる遺伝子を数10種同定している。これを搭載したPCRアレイを作成することにより、多数の遺伝子発現の同時測定という利点を残しつつ、コストと簡便性にすぐれ、しかも測定精度と再現性の高い、うつ病の診断指標を作成することができる。平成22年度には40種の搭載遺伝子を独自に選定したうつ病判別用のPCRアレイの試作を試みた。搭載遺伝子の種類について何度か改良を加え、予備的にうつ病判別用のPCRアレイを完成させ、30名のうつ病患者と同数の対照者の測定を終了し、きわめて有望な結果を得ている。

遺伝子発現を指標に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。研究期間終了後もPCRアレイを使用した研究を継続し、実用性のあるうつ病判別用

PCRアレイの完成を目指す。

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。これをもとに、実用性を考慮し、独自に搭載遺伝子を選定したうつ病判別用PCRアレイを試作し、実際にうつ病を対象に解析し、有望な結果を得た。

本研究は、多数のmRNA発現を組み合わせで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。うつ病で変化を見出したいくつかの遺伝子発現が治療薬のリチウムでも変化するものであったことは、それらの遺伝子発現が治療経過と関連があったことを示唆している。数十種類の遺伝子発現を同時解析することが可能な、多穴式のリアルタイムRT-PCRを使用し、測定遺伝子mRNAを的確に選定し、簡便性とコスト面を考慮した測定法を完成させる

ことにより、臨床現場で利用できるうつ病の客観的指標を確立することができる。

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

Nakataki M, Iga J, Numata S, Yoshimoto E, Kodera K, Watanabe SY, Song H, Ueno S, Ohmori T.

Gene expression and association analysis of the epithelial membrane protein 1 gene in major depressive disorder in the Japanese population.

Neurosci Lett. 2011 Feb 4;489(2):126-30.

Tayoshi S, Nakataki M, Sumitani S, Taniguchi K, Shibuya-Tayoshi S, Numata S, Iga J, Ueno S, Harada M, Ohmori T.

GABA concentration in schizophrenia patients and the effects of antipsychotic medication: a proton magnetic resonance spectroscopy study.

Schizophr Res. 2010 Mar;117(1):83-91.

Numata S, Nakataki M, Iga J, Tanahashi T, Nakadoi Y, Ohi K, Hashimoto R, Takeda M, Itakura M, Ueno S, Ohmori T. Association study between the pericentrin (PCNT) gene and schizophrenia.

Neuromolecular Med. 2010 Sep;12(3):243-7.

（２）学会発表

中瀧 理仁, MRS. スタディグループ 5 脳画像から見た精神薬理—マクロとミクロの接点, 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会, 仙台, 2010.9.16.

中瀧理仁、大森哲郎, 統合失調症研究における MRS, シンポジウム 画像研究は統合失調症の病態をどこまであきらかにしたか, 第 32 回日本生物学的精神医学会, 小倉, 2010.10.9.

Junichi Iga, Kumiko Kikuchi, Masahito Nakataki, Shinya Watanabe, Shusuke Numata, Tetsuro Ohmori. Lithium decreases VEGF mRNA expression in leukocytes of healthy subjects and bipolar patients. 第20回日本臨床精神神経薬理学会 仙台国際センター 2010.9.17.

渡部真也,伊賀淳一,中瀧理仁,菊地久美子,大森哲郎.「日本人における cannabinoid receptor 1 遺伝子多型と body mass index、および統合失調症との関連研究」第32回日本生物学的精神医学会, 小倉, 2010.10.8.

住谷さつき, 上西優介, 渡邊周平, 渡部幸奈, 秋山麻衣, 大森哲郎. 近赤外線スペクトロスコピーを用いた課題の難易度と前頭葉血流変化の関連, 第32回日本生物学的精神医学会, 小倉, 2010.10.9.

Shin-ya Watanabe, Jun-ichi Iga, Masahito Nakataki, Kumiko Kikuchi, Tetsuro Ohmori. Association study of cannabinoid receptor 1 gene and

schizophrenia and body mass index in a Japanese population. CINP. HONG KONG , 2010.6.8.

Junichi Iga, Kumiko Kikuchi, Sumiko Tayoshi, Masahito Nakataki, Shinya Watanabe, Shusuke Numata, Tetsuro Ohmori. Effect of lithium on gene expression in leukocytes of healthy subjects. XXVII CINP CONGRESS 2010 WORLD CONGRESS HONG KONG 2010.6. 6-10.

Masahito Nakataki, Jun-ichi Iga, Shusuke Numata, Eriko Yoshimoto, Kanami Kodera, Shin-ya Watanabe, Hongwei Song , Shu-ichi Ueno, Tetsuro Ohmori. Gene expression and association analysis of the epithelial membrane protein 1 gene in major depressive disorder in the Japanese population, CINP , HONG KONG , 2010.6.8.

Tomotake M, Ueoka Y, Tanaka T, Kaneda Y, Ohmori T : Effect of cognitive dysfunction on subjective quality of life in people with schizophrenia. British Association for Behavioural & Cognitive Psychotherapies: 38th Annual Conference, Manchester, UK, 2010.7.20-23.

Tomotake M, Kataoka M, Chiba S : Cognitive restructuring of negative old memories of parents was effective in the

treatment of an adolescent patient with marked social withdrawal. British Association for Behavioural & Cognitive Psychotherapies: 38th Annual Conference, Manchester, UK, 2010.7.20-23.

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

－ECT（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 国立精神神経医療研究センター病院 精神科医長

要旨

近年、電気けいれん療法(electroconvulsive therapy ; ECT)は自殺企図や全身衰弱などのうつ病重症例に対する治療としてだけではなく、薬物治療抵抗性（難治性・遷延性）うつ病に対する根本的な治療法としても注目されるようになってきている。しかし、ECT の作用機序の本質的解明に結びつく臨床研究は未だ世界的に存在せず、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 の奏功機序の解明につながるものと考えられる。我々は昨年度、通常診療で行っている ECT 施行方法の違いによって、臨床的效果に違いを生じ mRNA の発現パターンに影響を及ぼすバイアスを生じる可能性について検討した。このため昨年度は通常診療で行われている ECT 施行手技のバリエーションの効果的統一について調査・検討し、臨床的事象として ECT 施行時における臨床麻酔の違いで ECT のハミルトンうつ病評価尺度におけるけいれん持続時間および抗うつ効果に差異があることを示し報告した。

今年度我々は ECT の多様な臨床効果を継続して検討・蓄積すると共に、ECT 前後のうつ病患者を対象として血液サンプルを蓄積し、遺伝子の mRNA の発現量を一括解析する DNA チップを用いて解析する予定であったが、国立精神・神経センター病院の新病院移行、当該研究病棟・ECT ユニットの棟移、電子カルテ化に伴う ECT パスの標準化・電子カルテ化などにより、血液サンプルの集積は十分に進まず、関連研究として、ECT 無効症例での潜在的器質性疾患の存在への注意喚起、また重症型セロトニン症候群への ECT の有効性など治療抵抗性うつ病の ECT に関する有用な報告を行った。

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。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。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、社会全体の急務であり、このような背景から、うつ病に関する啓蒙活動や診断率の向上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。

その病態の評価、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高く、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。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。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が確認されており、うつ病の病態評価、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となる可能性がある。

一方で、従来、うつ病は「薬で治る」病気と考えられていたが、我々はその考え方を変えないといけないことが分かってきた。Keitner らによると、うつ病の薬物療法での寛解率は 28~47%、精神療法での寛解率は 30~48%であり、初回治療で寛解にいたるのは実は半分以下である。薬物療法で改善しない治療抵抗性うつ病（難治性うつ病）の問題は我が国でも診断率の向上につれて大きくなってきている。従来、難治性うつ病はうつ病の 10~15%と少なく見積もられていたが、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) 研究の結果では、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、認知行動療法、増強療法、併用療法など 4 つの治療オプションを経ても寛解にいたらないうつ病患者が、約 3 分

の 1 存在することが示された。現在、このような「薬や精神療法で治らない」治療難治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に対する治療としてだけではなく、薬物治療抵抗性（または難治性・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。

うつ病の診断率の進歩につれ増大するこのような薬物治療抵抗性うつ病について、薬物療法以外の手段によって ECT を含めた治療戦略の確立を行わなければ、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うつ病が医学的・社会的な問題として残されることになる。

難治性うつ病に対する当院での ECT の治療効果に関する調査では、治療反応群 93%（寛解群 74%）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。しかし ECT によって改善する多くの難治性うつ病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。

本研究の目的は、難治性うつ病に関する多様な ECT 症例の臨床効果を蓄積・検討すると共に、ECT（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」の関連を検討し、ECT の遺伝子レベルでの

奏功機序を解明することである。今年度我々は ECT の多様な臨床効果を継続して検討・蓄積すると共に、ECT 前後のうつ病患者を対象として血液サンプルを蓄積し、遺伝子の mRNA の発現量を一括解析する DNA チップを用いて解析する予定であったが、国立精神・神経センター病院の新病院移行、当該研究病棟・ECT ユニットの棟移行、電子カルテ化に伴う ECT パスの標準化・電子カルテ化などにより、血液サンプルの集積は十分に進まず、関連研究として、ECT 無効症例での潜在的器質性疾患の存在への注意喚起、また重症型セロトニン症候群への ECT の有効性など治療抵抗性うつ病の ECT に関する有用な報告を行った。

B. 研究方法

研究の対象は以下の 1) から 5) をすべて満たす患者のうち、本研究の書面での十分な説明にて、参加に書面での同意をいただいた患者を対象とした。1) 国立精神・神経医療研究センター病院に入院した患者で 20 歳以上の成人。2) 米国精神医学会の診断基準 DSM-IV-TR にて大うつ病性障害の診断を満たす患者。3) 主治医およびその他の常勤医師 1 名により当院修正型 ECT マニュアルに基づき修正型 ECT の適応があると判断された患者。4) mECT の当院書式の書面での説明を行い書面での治療同意が得られた患者。5) mECT 施行前の問診及び術前検査（問診、採血、胸腹部レントゲン、心電図、頭部 CT）などにより mECT を安全に受けることができると判断された患者。術前検査および問診にて、過去 6 ヶ月以内の心筋梗

塞・不安定狭心症・うつ血性心不全などの重篤な心血管疾患、脳血管障害、頭蓋内圧亢進症状、重度の慢性閉塞性肺疾患・喘息・肺炎などの呼吸器疾患、重度の骨折の既往が有る場合、ペースメーカーや頭蓋内電極・クリップなどの電気伝導性異物が体内にある場合、血圧上昇による破裂する可能性のある動脈瘤または血管奇形のある場合、けいれん発作の既往のある場合、覚醒剤乱用やアルコール乱用または依存の既往がある場合、米国麻酔学会水準 4 または 5 と評価される状態（水準 4: 日常生活を大きく制限する全身疾患があり、常に生命を脅かされている患者、水準 5: 手術をしなくとも、24 時間以上生存しないと思われる瀕死の患者）、麻酔薬でアレルギーなどの麻酔に関連した重篤な副作用の既往がある場合、大うつ病性障害以外の精神疾患が並存する場合、妊産婦、未成年、その他主治医により mECT を行うことが治療上不適切であると判断された場合は研究への参加を依頼しなかった。

患者の入院加療は当院病棟で行い、mECT は国立精神・神経医療研究センター mECT マニュアルに基づき、当院書式の mECT の説明文書を用いて同意書を取得し、通常臨床同様に当院内 ECT ユニットで当院 mECT マニュアルを順守して 1 クール週 2 回のペースで行った。mECT 初回施行前のデータとして、mECT 初回施行前日に、うつ病評価尺度として HAM-D (Hamilton Rating Scale for Depression) を評価し、DNA チップ用の検体として静脈血 10ml を通常の方法で採血した。mECT 初回後のデータとして、mECT 初回終了後 3 日以内に

DNA チップ用の検体として静脈血 10ml を通常の方法で採血した。mECT 1 コース終了後のデータとして、mECT 1 コース終了後 3 日以内に、うつ病評価尺度として HAM-D を評価し、DNA チップ用の検体として静脈血 10ml を通常の方法で採取した。

得られた血液検体から、キアゲン社製 PAX Gene Blood RNA キットを用いて 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 の発現量の解析を匿名化した検体で徳島大学医学部ストレス制御医学分野に委託して行った。

なお、1) 麻酔および mECT により許容できない臨床的副作用が出現した場合、2) 偶発的に重篤な合併症を併発した場合、3) 患者より mECT 施行の同意の撤回があった場合、4) 患者より研究参加の同意の撤回があった場合、5) その他、主治医または麻酔科医により本研究の mECT もしくは本研究参加の継続が困難と判断された場合は、その患者において研究を中止することとした。

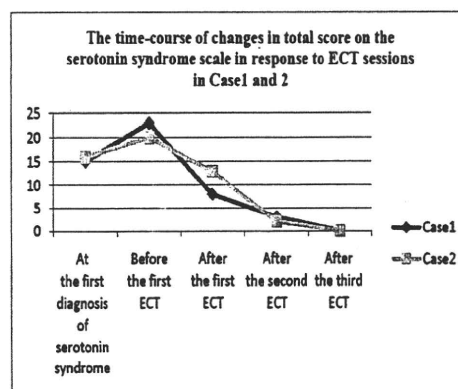
施行前に十分な書面でのインフォームドコンセントを行い文書同意を得た。ECT 施行は、麻酔科医の全身管理下で、前処置に硫酸アトロピンを、麻酔にはプロポホルを、筋弛緩にはサクシニルコリンを用い、半年齢法で刺激強度を決定し、THYMATRON SYSTEM IV を用いて短矩形波で ECT を行った。

C. 研究結果

(1) 重症型セロトニン症候群への ECT

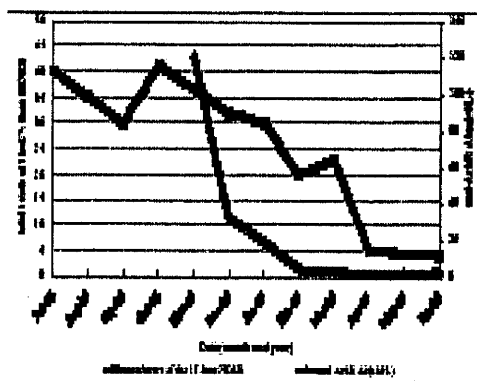
の有効性 (Okamoto N et al, Journal of Clinical Psychopharmacology. 2010)

ドパミン系が関与すると考えられる神経毒性症候群である悪性症候群には修正型 ECT が有効であることが報告されている。セロトニン症候群はセロトニン系が関与すると考えられる同様な神経毒性症候群であるが、ECT の有効性に関して、その報告はほとんどない。我々は、抗うつ薬誘発性の重症セロトニン症候群に対し serotonin syndrome scale (SSS) の減少において ECT が潜在的に有効であることを示し重症型セロトニン症候群の治療選択肢として提示した。



(2) ECT 無効症例での潜在的器質性疾患の存在への注意喚起 (Okamoto N et al, lancet. 2010)

ECT 無効が無効であった老年期うつ病症例で、抗うつ薬の投与なしで重症筋無力症の抗アセチルコリンレセプターの改善に伴いうつ症状が改善した症例を提示し ECT 無効の治療抵抗性うつ病では、様々な器質性・症候性疾患を念頭に置かなければならず、潜在的器質性疾患症例の蓄積を行っていく重要性を示唆した。



D. 考察

「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うえで、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ったため、ECT 手技の標準化を行う必要があった。今年度遺伝子発現パターンの変化については解析に耐えうる十分なサンプルを蓄積できなかったが、予備的研究を通じ、治療抵抗性うつ病に関する ECT の有効性、ECT 無効症例での潜在的器質性疾患の存在への注意喚起、また重症型セロトニン症候群への ECT の有効性など治療抵抗性うつ病の ECT に関する臨床的に有意義な報告を行うことができた。

E. 結論

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、非常に有意義な研究である。サンプルが蓄積されれば ECT に関しても臨床的応用が高く期待される。また研究的応用としても、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 チップを用いることで、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の症例を蓄積しつつ今後検討することで検討することで、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が高いと考えている。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

Difference in Temperament and Character Inventory scores between depressed patients with bipolar II and unipolar major depressive disorders.

Sasayama D, Hori H, Teraishi T, Hattori K, Ota M, Matsuo J, Kawamoto Y, Kinoshita Y, Hashikura M, Koga N, Okamoto N, Sakamoto K, Higuchi T, Amano N, Kunugi H. *J Affect Disord.* 2011 Mar 23. [Epub ahead of print]

Major Depressive Disorder Complicated with Spinocerebellar Ataxia: Report of 2 Cases.

Okamoto N, Ogawa M, Murata Y, Sakamoto K, Nagai T, Yamada M, Higuchi T. *Case Rep Neurol.* 2010 May 12;2(2):52-56.

Electroconvulsive therapy as a

potentially effECtive treatment for severe serotonin syndrome: two case reports.

Okamoto N, Sakamoto K, Nagafusa Y, Ichikawa M, Nakai T, Higuchi T. J Clin Psychopharmacol. 2010 Jun; 30(3):350-2.

Major depression: what caused the crisis?

Okamoto N, Furusawa Y, Sakamoto K, Yamamoto T, Kondo Y, Nagafusa Y, Higuchi T. Lancet. 2010 Jan 23; 375(9711):346.

Rapid antidepressant effect of ketamine anesthesia during electroconvulsive therapy of treatment-resistant depression: comparing ketamine and propofol anesthesia.

Okamoto N, Nakai T, Sakamoto K, Nagafusa Y, Higuchi T, Nishikawa T. J ECT. 2010 Sep; 26(3):223-7.

築詰健次郎, 岡本長久 うつ病治療の実際 - 最近の Augmentation 療法, Depression Frontier 8 巻 2 号 p65-71. 2010.

岡本長久, 坂本広太【最新うつ病のすべて】難治性うつ病への対応, 別冊・医学のあゆみ p89-99. 2010.

岡本長久, 大柄昭子 うつ病の治療と援助, 医療の広場 49 号 p. 4-10. 2009.

岡本長久, 石原年幸, 玉浦明美 薬物治療・修正型 ECT 抵抗性の病識欠如が clozapine により軽減され blonanserin 置換後も改善が持続したため長期入院からの地域移行が可能であった 1 症例, 臨床精神薬理 13 巻 3 号 p628-632. 2010.

長房裕子, 岡本長久【病状悪化!? 急な変化にどう対応するか】こんな変化が急に起きたら、どう対応すればいい? 急な躁転に対する対応, 精神科臨床サービス 10 巻 1 号 p38-40. 2010.

中林哲夫, 中村治雅, 岡本長久 本邦における国際共同治験の現状と課題-抗うつ薬開発の最近の動向-, 臨床精神薬理 13 巻 2 号 p255-263. 2010.

高橋晶, 伊藤ますみ, 岡崎光俊, 渡辺雅子, 元永悠介, 高木希奈, 長岡寛敦, 岡本長久, 朝田隆 統合失調症の経過中に spike-wave stupor を合併した 3 例, 精神科治療学 24 巻 8 号 p. 987-995. 2009.

佐藤真由美, 岡本長久 抗うつ薬と ECT の併用療法 (Combination Therapy of Electroconvulsive Therapy and Antidepressants), 臨床精神薬理 12 巻 2 号 p74-78. 2009.

岡本長久, 佐藤真由美, 中井哲慈 ケタミンと ECT の併用による難治性うつ病の治療, depression frontier 6 巻 2 p74-78. 2008.

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 p192-202. 2008.

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.

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.

岡本長久 うつ病 Q&A, 日本医事新報社 p. 122-145. 2009.

岡本長久 ECT AERA MOOK『新版職場のうつ』朝日新聞社. 2009. 5.

岡本長久, 坂本広太, 長房裕子 STAR*D 研究から得られるもの-アメリカでのうつ病の sequential treatment を知る, 精神科治療学 23 巻 3 号 p277-284. 2008.

(2) 学会発表

Rapid antidepressant effect of ketamine anesthesia during electroconvulsive therapy of treatment-resistant depression: Open label trial comparing ketamine anesthesia and propofol anesthesia, M.Yamada, N.Okamoto, T.Nakai, K.Sakamoto, Y.Nagafusa, CINP, Hong Kong, 2010.6.8.

長房裕子, 坂本広太, 森崎洋平, 山田麻紀, 岡本長久, 「ECT施行後, 著明な起立性

低血圧の悪化を認めたコタール症候群を伴う大うつ病の1症例」, 日本精神神経学会総会, 広島, 2010年5月11日.

元永悠介, 坂本広太, 山田麻紀, 大町佳永, 岡本長久, 「成人期の広汎性発達障害に合併する大うつ病における寛解予測因子の後方視的研究」, 日本精神神経学会総会, 広島, 2010年5月11日.

山田麻紀, 坂本広太, 長房裕子, 森崎洋平, 岡本長久, 「ECTとパロキセチンの併用によるセトロニン症候群の誘発」, 日本精神神経学会総会, 広島, 2010年5月11日.

坂本広太, 長房裕子, 山田麻紀, 森崎洋平, 岡本長久, 「うつ症状を呈した重症筋無力症の1症例報告 うつ症状は大うつ病の合併か?重症筋無力症そのものに由来するか?」, 日本精神神経学会総会, 広島, 2010年5月11日.

松尾淳子, 木下裕紀子, 川本由実子, 須藤志保, 橋倉都, 堀弘明, 寺石俊也, 篠山大明, 服部功太郎, 尾関祐二, 有馬邦正, 石川正憲, 岡本長久, 樋口輝彦, 兼田康宏, 功刀浩, 「統合失調症患者とうつ病患者の認知機能に関する日本語版統合失調症認知機能簡易評価尺度(BACS-J)による検討」, 日本精神神経学会総会, 広島, 2010年5月11日.

川本由実子, 松尾淳子, 橋倉都, 木下裕

紀子, 須藤志保, 堀弘明, 寺石俊也, 篠山大明, 服部功太郎, 尾関祐二, 有馬邦正, 石川正憲, 岡本長久, 樋口輝彦, 功刀浩, 「統合失調症患者の運動機能障害に関するペグボードと握力検査による検討」, 日本精神神経学会総会, 広島, 2010年5月11日.

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～」, 日本心身医学会, 札幌, 2008年6月12日.

松田太郎, 長房裕子, 坂本広太, 岡本長久 日本心身医学会総会 「セロトニン症候群にm-ECTが奏効した二例」, 日本心身医学会, 札幌, 2008年6月12日.

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51回日本神経化学学会大会&第30回日本生物学的精神医学会, 富山, 2008年9月11日.

(3) 講演など

岡本長久 市民公開講座「ともに支えあう地域づくりをめざして～楽に生きるためのヒント～」, 小平地域精神保健福祉業務連絡会, 小平市中央公民館ホール (東京). 2009年11月28日.

岡本長久 市民公開講座「うつってなあ

に?」, 国立精神神経センター、国立精神神経センターコスモホール (東京). 2009年5月26日.

岡本長久 「ケタミンとECTの併用による難治性うつ病の治療」, 多摩精神科懇話会、立川パレスホテル (東京). 2009年1月23日.

岡本長久 市民公開講座「職場のうつ」, 平成20年度厚生労働省こころの健康科学研究推進事業研究成果啓発事業, 梅田スカイビルホール (大阪). 2008年10月19日.

岡本長久 「成人期に出会う広汎性発達障害」, 政策医療ネットワーク精神疾患研修会、国立精神神経センターコスモホール (東京). 2008年2月9日.

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, 早稲田大学国際会議場井深大記念ホール(東京), 2007年2月4日.

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

ーうつ病の経過と病態との関連ー

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、しばしば自殺企図に結びつく。生涯罹患率が10%にも上るため、個人生活に大きな支障をもたらすばかりではなく、社会にも大きな影響を与える。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ことから、以前より早期診断に応用できる簡便かつ客観的な指標が求められていた。研究代表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。本年度は単極性うつ病の別集団で1色法チップの解析結果を再検するために、抗うつ薬を未服用の患者の血液検体を集め、さらには他の生物学的指標である脳 MRI 画像（特に Diffusion tensor image : DTI）との関連を検討することを目的とした。その結果 19 名（その中で採血に同意したのは 8 名）の未治療うつ病患者をリクルートすることができた。

A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、しばしば自殺企図に結びつく。生涯罹患率は10%にも上るため、個人生活に大きな支障をもたらすばかりではなく、社会にも大きな影響を与える。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。

しかしながら、現在うつ病の診断は症状診断であり、専門的な知識・経験が必要な状況である。このため以前より早期診断に応用できる簡便かつ客観的な指標が求められていた。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ている。さらに、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 種あり、上位 24 種を平均すると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ている。本年度は単極性うつ病の別集団で1色法チップの解析結果を再検するために、抗うつ薬を未服用の患者の血液検体を集め、さらには他の生物学的指標である脳 MRI 画像（特に

Diffusion tensor image : DTI) との関連を検討することを目的とした。

B. 研究方法

北海道大学病院精神科神経科を受診し、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 点以上の大うつ病患者のうち、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 (PHQ-9: Patient Health Questionnaire-9, BDI: Beck Depression Inventory, HAM-D: Hamilton Depression Rating Scale, MADRS: Montgomery Åsberg Depression Scale, YMRS: Young Mania Rating 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 DTI を TR 5100ms, TR 139ms, NEX 2, single shot spin-echo EPI $b=1000\text{s/mm}^2$, gradient direction:12 の条件にて撮像した。

(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し、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

本年度は抗うつ薬未服薬の単極性うつ病患者 19 名 (男性 11 名、女性 8 名) をリクルートすることができた。前年度リクルートできた 6 名を合わせた臨床データでは年齢は 39.2 ± 2.8 歳 (平均 $\pm$ 標準誤差)、うつ病罹患期間は 17.8 ± 5.3 ヶ月、今回の病相における罹病期間は 8.3 ± 2.5 ヶ月であった。精神科疾患の家族歴が 7 名に認められている。症状評価では PHQ-9: 18.4 ± 1.4 、BDI-II: 32.5 ± 2.7 、HAM-D17: 19.1 ± 1.0 、MADRS: 26.6 ± 1.4 、YMRS: 1.1 ± 0.4 、CGI-S: 4.6 ± 0.2 、であり、中等度の重症度であった。一方、機能評価では SASS: 23.8 ± 2.1 、GAF: 44.2 ± 1.8 であった。19 名中 8 名が採血に同意してサンプルが得られ、データを解析中である。また、DTI 解析には萎縮、梗塞など大きな器質的な問題のない (25 名中の) 19 名がエントリーできた。fractional anisotropy (FA) 値および mean diffusivity (MD) 値を性別、年齢を合わせたコントロール群と比較したところ、voxel-based analysis では有意差が出なかったものの、histogram analysis

ではうつ病群の FA 中間値、FA のヒストグラムピーク値が有意に減少していた。

D. 考察

北海道大学病院は特定機能病院であり、殆どの外来患者が他院からの紹介により受診する。このため、抗うつ薬を未服用の患者をリクルートすることは非常に困難であったが、本年度は 19 名（その中で採血に同意したのは 8 名）をリクルートすることができた。DTI 解析においては histogram analysis で、うつ病群とコントロール群に違いが見出された。今後遺伝子発現パターンとの関連を見ていくつもりである。

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。今後、今までエントリーした患者の症状経過、治療経過を追い、遺伝子発現パターンの変化を検討することが必要となろう。また、DTI 所見との関連性から新たな病態解析の視点が得られる可能性がある。

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, Toda H, Song N, Kitaichi Y, Inoue T, Koyama T: Effects of mood stabilizers on adult dentate gyrus-derived neural precursor cells.

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35, 111-117, 2011.

Inoue T, Abekawa T, Nakagawa S, Suzuki K, Tanaka T, Kitaichi Y, Boku S, Nakato Y, Toda H, Koyama T: Long-term naturalistic follow-up of lithium augmentation: Relevance to bipolarity. J Affect Disord. 125, 77-87, 2011.

Abekawa T, Ito K, Nakagawa S, Nakato Y, Koyama T: Effects of aripiprazole and haloperidol on progression to schizophrenia-like behavioural abnormalities and apoptosis in rodents. Schizophr Res. 125, 77-87, 2011.

Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S, Kakuta A, Izumi T, Koyama T: Sertraline increases extracellular levels not only of serotonin, but also of dopamine in the nucleus accumbens and striatum of rats. Eur J Pharmacol. 25, 647, 90-6, 2010.

Inoue T, Kitaichi Y, Masui T, Nakagawa S, Boku S, Tanaka T, Suzuki K, Nakato Y, Usui R, Koyama T: Pramipexole for stage 2 treatment-resistant major depression: An open study. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 637, 77-82, 2010