

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20～22年度 総合研究報告書
研究代表者 大森 哲郎

平成23(2011)年 5月

目次

I. 総合研究報告

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	----- 13
2. うつ病の経過と病態との関連 中川 伸	----- 22
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	----- 30
4. うつ病の指標としての発現遺伝子に絞った解析研究、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	----- 37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 46
---------------------	----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 58
-----------------	----------

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

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ことを意図して研究を開始した。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、そのためには多穴式リアルタイムRT-PCR法（PCRアレイ）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、うつ病の指標という目的に最適な方法であると判断された。研究期間後半では、PCRアレイ法の検討に取り掛かり、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、全例には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 21 年度から準備に取り掛かり、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、20年、22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。

研究開始時においては、mRNAの主要解析方法をDNAチップとし、特定遺伝子の解析をリアルタイムRT-PCRとしていた。研究後半には両方法の長所を折衷した方法であり、ここ数年で一般化した多穴式リアルタイムRT-PCR(PCRアレイ)を採用することにした。以下に研究結果を方法別に要約して記述する。

DNA チップの結果

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。

リアルタイムRT-PCRの結果

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RT-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 (TGFB2) 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。

共同研究者の山口大学の内田らは、同じくリアルタイム RT-PCR 法を用いて、グリア細胞由来栄養因子(GDNF)、NCAM、L1、HDAC2 と HDAC5、DNAメチル基転移酵素群(DNMTs) mRNA などの発現量のうつ病相における有意な変化を見出している。

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

するとき、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。

PCR アレイの結果

研究期間後半の平成21年度後半から平成22年度にかけて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という難点を抱えている。また、うつ病で見られる変化は通常は20－50％程度の増減であり、それほど大きくない変化である。この程度の変化を測定するためには、特に経年的に実験を行う場合には実験間の誤差なども無視できなくなり、DNAチップ法は必ずしも十分な再現性を確保できないという危惧も生じた。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。これらのことから、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と判断するに至った。

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可能である。PCRアレイならばカスタム化も比較的安価に行うことができる。平成21年度から検討を開始し、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、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、搭載遺伝子発現の相当数でうつ病患者と対照群との間に有意差を示した。

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、複数の mRNA 発現を組み合わせるうつ病を評価した国際的にも緒に付いたばかりの試みである。類似の研究が平成 22 年に発表された (Spijker et al. Biol Psychiatry 2010 R. Belzeaux et al. J. Psychiatric Research 2010)。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、うつ病の中樞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

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.

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

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.

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.

Numata S, Iga J, Nakataki M, Tayoshi S, Tanahashi T, Itakura M, Ueno S, Ohmori T. Positive association of the pericentrin (PCNT) gene with major depressive disorder in the Japanese population. *J Psychiatry Neurosci.* 2009 May;34(3):195-8.

Numata S, Iga J, 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 S, 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.* 2009 Jun 5;150B(4):527-34.
DOI:10.1002/ajmg.b.30852
- Nakataki M, Numata S, Iga J, Tayoshi S, Tayoshi-Shibuya S, Song H, Tanahashi T, Itakura M, Ueno S, Ohmori T. No association between Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase1 gene and schizophrenia in the Japanese population. *Psychiatr Genet.* 2009 Jun;19(3):162.
- Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Yoshida T, Takahashi H, Iike N, Fukumoto M, Takamura H, Iwase M, Kamino K, Ishii R, Kazui H, Sekiyama R, Kitamura Y, Azechi M, Ikezawa K, Kurimoto R, Kamagata E, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Ogasawara M, Okochi M, Tokunaga H, Numata S, Ikeda M, Ohnuma T, Ueno S, Fukunaga T, Tanaka T, Kudo T, Arai H, Ohmori T, Iwata N, Ozaki N, Takeda M. Association study of the G72 gene with schizophrenia in a Japanese population: a multicenter study. *Schizophr Res.* 2009 Apr;109(1-3):80-5. Epub 2009 Feb 23.
- Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Yoshida T, Takahashi H, Iike N, Iwase M, Kamino K, Ishii R, Kazui H, Fukumoto M, Takamura H, Yamamori H, Azechi M, Ikezawa K, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Yamada K, Numata S, Ikeda M, Tanaka T, Kudo T, Ueno S, Yoshikawa T, Ohmori T, Iwata N, Ozaki N, Takeda M. The chitinase 3-like 1 gene and schizophrenia: evidence from a multi-center case-control study and meta-analysis. *Schizophr Res.* 2010 Feb;116(2-3):126-32. Epub 2010 Jan 3.
- 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.
- Nakataki M, Iga J, Numata S, Yoshimoto E, Koderia 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.

(2) 学会発表

Tetsuro Ohmori, Jun-ichi Iga, Shusuke Numata, Shu-ichi Ueno, Toshiro Saito, Kazuhito Rokutan. Assessment of Depression Using mRNA Expression in the Peripheral Leukocyte.

第2回アジア・太平洋生物学的精神医学学会, 第30回日本生物学的精神医学学会

(2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP) 2008.9.11-13 富山

中瀧理仁, 伊賀淳一, 棚橋俊仁, 板倉光夫, 上野修一, 大森哲郎 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.

第2回アジア・太平洋生物学的精神医学学会, 第30回日本生物学的精神医学学会

(2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP) 2008.9.11-13 富山

住谷さつき, 宮田幸奈, 秋山麻衣, 谷口京子, 大森哲郎 多チャンネル近赤外線スペクトロスコピーを用いた強迫性障害の認知機能の検討

第2回アジア・太平洋生物学的精神医学学会, 第30回日本生物学的精神医学学会

(2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP) 2008.9.11-13 富山

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

統合失調症と Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine

kinase1 遺伝子の関連解析 第2回アジア・太平洋生物学的精神医学学会, 第30回

日本生物学的精神医学学会 (2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th

Annual Meeting of JSBP) 2008.9.11-13 富山)

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. Subjective quality of life and cognitive function in people with schizophrenia.

14th World Congress of Psychiatry 2008.9.20-25 チェコ, プラハ

Ueoka Y, Tomotake M, Tanaka T, Kaneda Y, Kawahara K, Iwasaki H, Okamoto A, Hase A, Ikebuchi M, Mori N, Momo K, Ohmori T. Clinical factors related to cognitive function in people with schizophrenia. 14th

World Congress of Psychiatry 2008.9.20-25 チェコ, プラハ

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. Predictors of

objective quality of life in people with schizophrenia.

14th World Congress of Psychiatry,
2008.9.20-25, チェコ, プラハ

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.

Subjective well-being and its clinical determinants in outpatients with schizophrenia. 14th World Congress of Psychiatry 2008.9.20-25 チェコ, プラハ

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. 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
第 18 回日本臨床精神神経薬理学会
2008.10.1-3 東京

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

谷口京子、宮田幸奈、田中恒彦、田吉伸哉、住谷さつき、大森哲郎

多チャンネル近赤外線スペクトロスコピーを用いた統合失調症患者の前頭葉血流変化の検討

第 31 回日本生物学的精神医学会 京都、
2009 年 4 月 24 日

住谷さつき、原田雅史、久保 均、田吉伸哉、大森哲郎

3T proton MRS を用いた強迫性障害の基底核における代謝物質の左右差の検討
第 31 回日本生物学的精神医学会 京都、
2009 年 4 月 25 日

住谷さつき、大森哲郎 強迫性障害の薬物応答性と臨床特徴について

第 19 回日本臨床精神神経薬理学会 京都、2009 年 11 月 15 日

中瀧理仁、大森哲郎 SSRI から 3,4 環系抗うつ薬に変更後 activation syndrome を示した 2 症例

第 19 回日本臨床精神神経薬理学会
京都、2009 年 11 月 15 日

Nakataki, M., Tayoshi, S., Sumitani, S., Harada M., Ohmori, T.

Antipsychotic medication affects the GABA concentration in schizophrenic patients: A proton magnetic resonance spectroscopy study, The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology 京都、
2009 年 11 月 13 日

Tanaka, T., Ueoka, Y., Tomotake, M., Kaneda, Y., Ohmori, T.

Relationship between cognitive function and clinical symptoms in people with schizophrenia.

The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology 京都, 2009 年 11 月 13 日

Ueoka, Y., Tomotake, M., Tanaka, T., Kaneda, Y., Nakataki, M., Sumitani, S., Ueno, S., Ohmori, T.

Quality of life and cognitive dysfunction in people with schizophrenia.

The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology 京都, 2009 年 11 月 13 日

Iga J, Ueno S, Numata S, Tayoshi S, Song H, Ohmori T.

HDAC5 and CREB mRNA expression in the peripheral leukocytes of major depression before and after SSRI treatment.

The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology 京都, 2009 年 11 月 13 日

桐野 靖、寺岡和彦、久次米敏英、水口和生、大森隆史、大森哲郎

徳島大学病院における非定型抗精神病薬の体重増加についての解析

第 19 回日本臨床精神神経薬理学会 京都、2009 年 11 月 14 日

亀岡尚美、友竹正人、大森隆史、大森哲郎 摂食障害患者に見られる Refeeding syndrome について

第 29 回日本精神科診断学会 東京、2009 年 10 月 17 日

住谷さつき、秋山麻衣、大森哲郎

徳島大学病院における成人 PDD 診断の現状について

第 29 回日本精神科診断学会 東京、2009 年 10 月 17 日

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
ペクトロスコープ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

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かったことが分かってきた。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%を占めるようになってきている。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、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至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。このような薬物療法や精神療法で改善しない治療抵抗性・難治性うつ病の治療戦略は我が国でも診断率の向上につれて大きな課題となってきた。増大する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治療戦略の確立を行わなければ、いくらうつ病啓蒙活動が普及し患者の精神科受診率が向上してもうつ病の診断率が向上したとしても薬物治療抵抗性うつ病の問題が医学的・社会的な問題として残されることになる。このような状況の中、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重症例に対する治療としてだけでなく、薬物治療抵抗性(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注目されるようになってきている。当院でECTを行った薬物治療抵抗性うつ病の調査では、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た。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、我々はECTの多様な臨床効果を検討・蓄積すると共に、主任研究者らが開発した遺伝子のmRNAの発現量を一括解析するDNAチップを用いて、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の効果に関する遺伝子的発現の変化を検証しようとした。3年間の研究を通じ事前準備と予備的研究を行う必要があり、患者のリクルートが実質1年間に限られたため遺伝子発現パターンの変化については解析に耐え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術中麻酔薬によるECTの効果の差異、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。

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疾患である。WHOの調査では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)を用いた疾患の経済的損失について、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った。しかし、3 年間の研究を通じ、事前準備と予備的研究を行う必要があり、また新病院と電子カルテ移行に伴う ECT パス作成などで患者のリクルートが実質 1 年間に限られたため遺伝子発現パターンの変化については解析に耐えうるサンプルを蓄積できなかった。しかし、本研究の予備的研究を通じ、治療抵抗性うつ病に関する ECT の有効性、ECT 術中麻酔薬による ECT の効果の差異、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。

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。

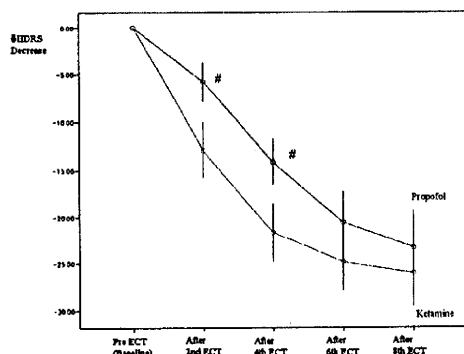
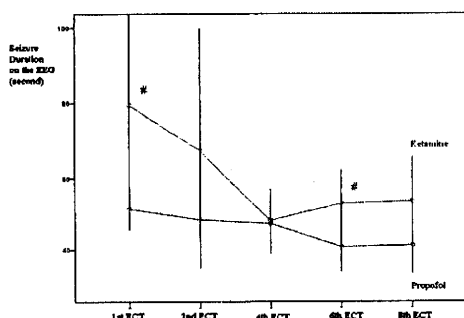
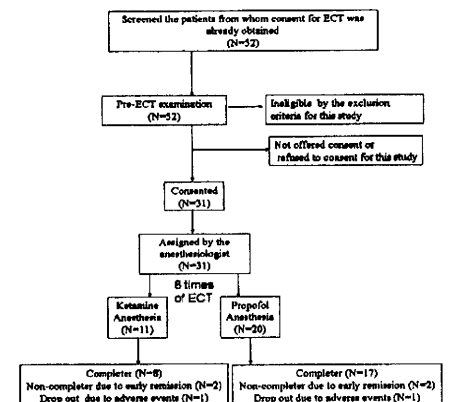
なお、1) 麻酔および mECT により許容できない臨床的副作用が出現した場合、2)

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

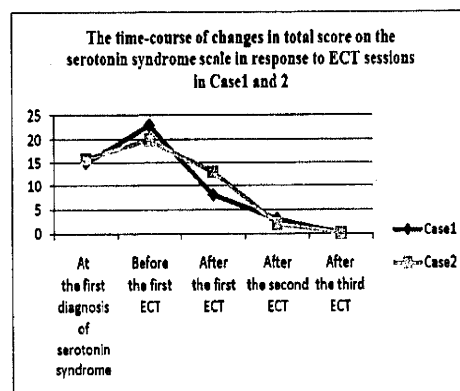
(1) 治療抵抗性うつ病に関する ECT の有効性と ECT 術中麻酔薬による ECT の効果の差異の検討 (Okamoto N et al, J ECT. 2010) DNA チップは ECT の奏功機序を解明する可能性があるが、通常診療で行っている ECT 施行方法の違いによって、効果に違いを生じ mRNA の発現パターンに影響を及ぼすバイアスを生じる可能性がある。このため通常診療で行われている ECT 施行手技のバリエーションの効果的統一について調査検討し、ECT 施行時におけるプロポフォル麻酔とケタミン麻酔で ECT のハミルトンうつ病評価尺度におけるけいれん持続時間および抗うつ効果に差異があることを示した。



(2) 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)

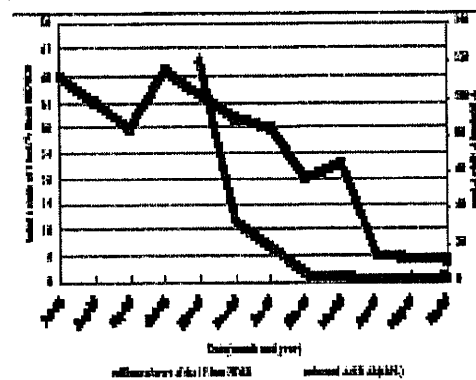
ドパミン系が関与すると考えられる神経毒性症候群である悪性症候群には修正型 ECT が有効であることが報告されている。セロトニン症候群はセロトニン系が関与すると考えられる同様な神経毒性症候群であるが、ECT の有効性に関して、その報告はほとんどない。我々は、抗うつ薬

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。



(3) 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。3 年間の研究を通じ事前準備と予備的研究を行う必要があり、患者のリクルートが実質 1 年間に限られたため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 術中麻酔薬による ECT の効果の差異、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.