

201241002A

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

---

うつ病の病態を反映する血中バイオマーカーの  
開発・実用化研究

---

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者  
神庭重信

平成25(2013)年3月

## 目 次

はじめに .....	1
<b>I. 総括研究報告</b>	
うつ病の病態を反映する血中バイオマーカーの開発・実用化研究 .....	3
神庭 重信 (九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野・教授)	
<b>II. 分担研究報告</b>	
1. 気分障害外来によるバイオマーカー検索システムの構築 .....	13
神庭 重信 (九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野・教授)	
2. 末梢リンパ球の網羅的解析による気分障害のバイオマーカー開発 .....	17
尾崎 紀夫 (名古屋大学大学院医学系研究科精神医学 親と子どもの心療学分野・教授)	
3. オミックスと多次元生物学的指標によるバイオマーカー探索 .....	23
功刀 浩 (国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第三部・部長)	
4. 双極性障害のバイオマーカー候補蛋白質同定 .....	27
加藤 忠史 (理化学研究所 脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム・チームリーダー)	
5. 小児・思春期うつ病および認知行動療法の血中バイオマーカーに関する研究 .....	29
清水 栄司 (千葉大学大学院医学研究院認知行動生理学・子どものこころの発達研究センター・教授)	
6. マイクロ RNA を用いた気分障害の血中バイオマーカーへの応用 .....	33
橋本 亮太 (大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学・千葉大学・福井大学連合) 小児発達学研究科附属子どものこころの分子統御機構研究センター・准教授	
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....</b>	<b>40</b>
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....</b>	<b>43</b>

## はじめに

近年のうつ病の急増は、地域社会・産業界・教育現場を問わず、深刻な社会問題と化している。しかし、客観的な補助診断法が確立していないため、精神科臨床、精神科以外の診療あるいは健診でも有用なバイオマーカーの開発が急務となっている。

患者の脳内動態を間接的に探る手法として機能的MRIなどを用いることができるが、精神疾患以外のバイオマーカーの成功例の多くは末梢サンプルである。より簡便に施行できる血液検査等を開発することにより、精神保健の向上に役立てることができる。

これまで末梢サンプルを対象として網羅的に行われてきたが、気分障害の病態を反映することが確実なものは同定されていない。一方我々は、より中枢機能を反映する脳脊髄液サンプルやTraitを直接的に反映する患者由来リンパ芽球の予備的なオミックス解析（トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボローム）により、気分障害のバイオマーカー候補物質を幾つか見出している。

また、最近iPS細胞を介さずに、体細胞から直接的に神経（iN神経）を作成する技術が開発された。本技術は、これまで不可能であった患者由来の神経を短期間で直接的に解析可能とし、脳内動態を探る新たなツールとして、すでにアルツハイマー病患者由来のiN神経で、その有用性が示唆されている。

本研究の特色は、このように、より中枢機能や病態に近い系からバイオマーカー候補を絞り込み、そのバイオマーカーに特化した測定方法を開発することにより、今まで成功しなかったバイオマーカーを同定することである。

最終的には、患者と健常者、あるいは患者間を高感度かつ高精度に区別するアルゴリズムを構築し、気分障害の診断とその重症度に特異的なバイオマーカーを同定し、日常診療に応用可能な血液サンプルを用いたキットを開発したい。

研究代表者

神庭重信

厚生労働科学研究（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）

うつ病の病態を反映する血中バイオマーカーの開発・実用化研究

総括研究報告

研究代表者 神庭 重信

（九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野・教授）

**研究要旨** 九大（神庭重信、加藤隆弘）では、気分障害における橋渡し研究の国内拠点を築くべく、国内初の気分障害外来を九州大学病院内に立ち上げた。本専門外来では、精度の高い気分障害の診断・重症度評価を多軸的に行い、血液サンプルはじめ各種バイオマーカーを測定している。並行して、一部の患者からは同意の下で皮膚サンプルを提供してもらい、誘導神経細胞（induced neuronal cells; iN 神経）を作成し、本神経の特性もバイオマーカー候補として測定している。来年度以降は、サンプルを増やし蓄積することで、各種データとの相関解析を行い、有用なバイオマーカー検索を可能にし、最終的には血液で測定可能な気分障害バイオマーカー開発を目指す。

名大の尾崎紀夫は、患者末梢血液由来リンパ芽球様細胞株のオミックス解析により、病態の特性を直接的に反映するバイオマーカー候補を見出し、簡便に施行できる血液検査等を開発することで、精神医療・精神保健の向上に貢献することを試みた。これまでに、統合失調症患者 120 例、双極性障害患者 85 例、大うつ病性障害患者 28 例、広汎性発達障害患者 110 例、健常者 91 例よりリンパ芽球様細胞株を樹立し、プロテオーム解析およびトランスクリプトーム解析を実施してバイオマーカー候補の探索を進めてきた。統合失調症を対象としたプロテオーム解析の結果、統合失調症マーカーの候補として 22 種類を特定し、4 ないし 6 種類の組み合わせにより統合失調症を判別する統計モデルを構築した。また、統合失調症と双極性障害の両疾患を対象とした解析において、各疾患に特異的あるいは両疾患に共通の変化を示すマーカー候補が認められ、分子の同定を進めている。今後、得られた結果の再現性の確認とトランスクリプトーム解析による遺伝子マーカーの探索を進め、客観的指標としての臨床応用性を検討する。

国立精神神経医療研究センターの功刀は、うつ病患者の血中トリプトファン濃度は、健常対照群と比較して、有意に低下していることを見出した。また脳脊髄液中の IL-6 濃度は、血中 IL-6 濃度と比較して高く、うつ病と統合失調症の脳脊髄液中 IL-6 濃度は健常者と比較して有意に高いことを見出した（J Psychiatr Res, in revision）。HPA 系

の過剰抑制を呈するうつ病患者では、非抑制を呈する者に比べてクローニンジャーの気質・性格尺度で報酬依存が高く、協調性が低いことが明らかになり、類型化に役立つことを明らかにした(J Affect Disord, 2012)。脳脊髄液のプロテオーム解析では、うつ病 10 例と健常者 10 例の解析により、バイオマーカー候補分子を少なくとも 19 分子同定した。

理化学研究所の加藤忠史は、一人だけが双極性障害に罹患した一卵性双生児より、培養リンパ芽球を樹立し、蛋白質差異を同定した。同定された蛋白質のうち、phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1)は、症例対照研究でも、双極性障害患者で有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。PGAM1 は、双極性障害のバイオマーカー候補になりうると考えられた。

阪大の橋本亮太は、うつ病、双極性障害、健常者、統合失調症、広汎性発達障害の血液サンプルを収集した。さらに、血漿中のmicroRNA(miRNA)の測定法を検討中である。miRNAは、21-23塩基という比較的小さなNon-coding RNAのことである。来年度以降、血漿中のmiRNAの測定法を開発し、実際の気分障害患者サンプルでの測定を行う予定である。このような研究は、気分障害の新たな血液バイオマーカーの開発に役立つものと考えられる。

千葉大の清水栄司は、診断の困難な小児、思春期のうつ病患者において、血中バイオマーカーとしてのBDNFの有効性について検討していく予定で、8歳から17歳までの気分障害(大うつ病 45例、双極性障害 4例)49例および正常コントロール群(7歳から17歳)の30例の血液サンプルと構造化面接による臨床データを集積しており、さらに、症例を蓄積していく予定である。また、うつ病の認知行動療法の有効性の予測指標としての血中バイオマーカーの有効性についても、症例を集積して、検討を進めていく予定である。

以上のように、施設により、研究の内容、進捗度はまちまちであるが、当初の計画に沿って、初年度研究を立ち上げており、順調に滑り出している。各施設で集積したサンプルは、今後プールして、大規模サンプルとして利用することも視野に入れ、研究を連携して行く予定である。

研究分担者：

神庭 重信（九州大学大学院医学研究院  
精神病態医学分野・教授）  
尾崎 紀夫（名古屋大学大学院医学系研  
究科精神医学 親と子ども  
の心療学分野・教授）  
功刀 浩（国立精神・神経医療研究セ  
ンター神経研究所疾病研究  
第三部・部長）  
加藤 忠史（理化学研究所脳科学総合研  
究センター精神疾患動態研  
究チーム・チームリーダー）  
清水 栄司（千葉大学大学院医学研究院  
認知行動生理学・子どものこ  
ころの発達研究センター・教  
授）  
橋本 亮太（大阪大学大学院大阪大学・  
金沢大学・浜松医科大学・千  
葉大学・福井大学連合小児発  
達学研究科附属子どものこ  
ころの分子統御機構研究セ  
ンター・准教授）

A. 研究目的

近年のうつ病の急増は、地域社会・産業界・教育現場を問わず、深刻な社会問題と化している。しかし、客観的な補助診断法が確立していないため、精神科臨床、精神科以外の診療あるいは健診でも有用なバイオマーカーの開発が急務となっている。患者の脳内動態を間接的に探る手法として機能的MRIなどを用いることができ

るが、精神疾患以外のバイオマーカーの成功例の多くは末梢サンプルである。より簡便に施行できる血液検査等を開発することにより、精神保健の向上に役立てることができる。しかしながら、実用化段階のうつ病のバイオマーカーがないため、適切な診断に基づく治療が遅れ、自殺、長期休務・休学に至る、あるいは難治化している症例が少なくない。バイオマーカーの開発が厚生労働行政上急務である。

すでに我々は、気分障害患者の末梢血由来のDNA、RNA、リンパ芽球様細胞株及び髄液サンプルを多数集積しており（500検体以上）、予備的なオミックス解析（トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボローム）により、気分障害のバイオマーカー候補物質を幾つか見出している。これらが、不眠、食欲低下等の症状による二次的変化ではなく、患者の脳内動態を反映していることを解明することにより、実用化・普及につなげることが可能となる。

一方、遺伝子改変技術の進歩に伴い、ヒト体細胞（皮膚線維芽細胞など）由来の体細胞から直接的に短期間で神経（iN神経）を作成する技術が開発された。本技術は、これまで不可能であった患者由来の神経を短期間で直接的に解析可能とし、脳内動態を探る新たなツールとして、すでにアルツハイマー病患者由来のiN神経で、その有用性が示唆されている。この技術は、末梢マーカーの中で、患者の脳内動態を反映しているマーカーを同定す

る上で有用である。

初年度～第2年度は、気分障害の診断とその重症度評価のためのバイオマーカーを確認するために、末梢由来のサンプルをオミックス解析することに加え、一部の被験者においては皮膚組織からiN神経を作成し、iN神経の機能解析（電気生理学的検索など）・オミックス解析を行う。本研究の独創的な点は、末梢のマーカー候補とiNから得られる神経細胞マーカーとを相互につきあわせることで、これまでの網羅的なマーカー検索で同定してきたマーカー候補の有用性を確認できることである。

第2～3年度は、バイオマーカーとモデル動物での知見を融合し、臨床データ（構造化診断・重症度評価・自殺リスク評価など）、脳画像データ（MRIなど）、脳生理学的データ（脳波・脳磁図など）との相関を解析し、最終的には、患者と健常者、あるいは患者間を高感度かつ高精度に区別する特異的なバイオマーカーを同定し、気分障害の診断と治療に有用で、広く日常診療に応用可能な血液サンプルを用いたキットを開発する。

## B. 研究方法

以下のすべての施設における研究は、それぞれの倫理委員会の承認を得て行われた。

### 【神庭重信、加藤隆弘】

双極性障害に関して不一致な一卵性双生児 1 ペアより採血を行い、リンパ球を単離し、EB ウイルスを感染させることにより、培養リンパ芽球様細胞を樹立した。プロテオミクス解析により、バイオマーカー候補分子を同定した。培養リンパ芽球より蛋白質を抽出し、2次元ディフアレンシャルゲル電気泳動を行った。得られた結果を、双極 I 型障害患者 8 名および年齢のマッチした対照群 8 名由来の培養リンパ芽球様細胞を用いて確認した。

### 【尾崎紀夫】

統合失調症患者 120 例、双極性障害患者 85 例、大うつ病性障害患者 28 例、広汎性発達障害患者 110 例、健常者 91 例を対象として末梢血液由来リンパ芽球様細胞株を樹立した。疾患群と健常者群を高精度で判別可能な統計モデル（ロジスティックモデルなど）の構築を行う。その上で、より中枢機能や病態に近い系からバイオマーカー候補を絞り込み、そのバイオマーカーに特化した測定方法を開発し、さらに簡便に施行できる血液検査等を開発する。リンパ芽球様細胞株の調製、プロテオーム解析、トランスクリプトーム解析は標準的な方法を用いた。

### 【功刀浩】

#### 1) アミノ酸解析

アミノ酸は神経伝達物質そのもの、あるいは前駆体となる。そこで、うつ病患

者(N=96)と健常対照群(N=83)について血中アミノ酸分を行った。

## 2) IL-6 濃度

うつ病では、中枢神経系の炎症が関与するという仮説に基づき、統合失調症患者 32 人、大うつ病患者 30 人、健常者 35 人の脳脊髄液中の IL-6 濃度について、血中 IL-6 濃度と比較しつつ検討した。

## 3) HPA 系反応性とうつ病の亜型

DEX/CRH test によって、非抑制と過剰抑制を呈するうつ病の臨床特性の違いについてクローンニージャーの気質・性格尺度を用いて検討した。

## 4) 脳脊髄液のプロテオーム解析

血中バイオマーカーを見出すのを最終目標とするが、血液より脳病態をよく示すと考えられる脳脊髄液について解析し、その結果から血液マーカーを探索する戦略をとっている。オミックス研究では、候補分子の絞り込みが困難であることから、有効なアプローチであると考えている。うつ病 30 例(双極性障害 4 例を含む)、健常者 30 例のデータ収集が終了した。

### 【加藤忠史】

双極性障害に関して不一致な一卵性双生児 1 ペアより採血を行い、リンパ球を単離し、EB ウイルスを感染させることにより、培養リンパ芽球様細胞を樹立した。プロテオミクス解析により、バイオマーカー候補分子を同定した。培養リンパ芽球より蛋白質を抽出し、2 次元ディフアレンシャルゲル電気泳動を行った。

得られた結果を、双極 I 型障害患者 8 名および年齢のマッチした対照群 8 名由来

の培養リンパ芽球様細胞を用いて確認した。

### 【橋本亮太】

気分障害のバイオマーカーを開発するためには、まず健常者との比較、次に、統合失調症や広汎性発達障害などの他の精神障害との鑑別、最後にうつ病と双極性障害との鑑別を行う必要がある。そこで、大阪大学医学部附属病院にて、うつ病と双極性障害の血液サンプルに加え、その対象として健常者、統合失調症、広汎性発達障害の血液サンプルを収集した。血液サンプルは、DNA、RNA、血漿、不活化リンパ芽球として、保存・蓄積した。

バイオマーカーの候補を順にあげる。miR-520c-3p と miR-889 は双極性障害患者の前頭前皮質において発現異常が報告されている。また、抑うつ症状があった自殺者において、いくつかの miRNA の発現異常が認められその下流のタンパク発現の制御異常が報告されている (miR-148b と DNMT3B、miR-20b, miR-20a, miR-34b-5p と VEGFA、miR34a と BCL2)。さらに、リンパ芽球に抗うつ薬処理を行うことにより制御される miRNA として、miR-151-3p, let-7b, miR-212, miR-132, let-7c, miR30b が報告されている。これらを候補として、血漿中の miRNA を定量する。

次に、うつ病のメガ GWAS (Genome wide association study: 全ゲノム関連研究) において、双極性障害のサンプルも加えた時にゲノムワイドに有意であった 3p21.1 にある BAP1、TNNC1、GNL3、PRKCD、TKT、CACNA1D などの多数の遺伝子が報告されている。また、双極性障害の GWAS とそのメタアナリシスから見いだされた TRANK1 (LBA1)、LMAN2L、PTGFR、ANK3、CACNA1C とうつ病の GWAS と同じ部

位である 3p31 の遺伝子 (PPM1M) が報告されている。これらの遺伝子を対象に、その制御を行う miRNA の候補を抽出し、血漿中にて miRNA を測定する。さらに、血中の RNA を用いてターゲットとなる遺伝子発現を検討し、リスク遺伝子多型を同定して、リスクの有無しによる層別の解析を行う。

最後に、また、うつ病のマーカーとして独立した二つのコホートで血漿中濃度の違いが報告されている Alpha 1 antitrypsin、Myeloperoxidase、Soluble TNF  $\alpha$  receptor II、Epidermal growth factor を候補として追加する。

#### 【清水栄司】

精神疾患簡易構造化面接法 (小児・青年用) MINI-KID により気分障害と診断された、18 歳未満の患者および年齢・性別をマッチさせた正常コントロール群から、書面にて同意を得て、血液サンプルを収集する。Children's Depression Rating Scale, Revised (CDRS-R)、Young Mania Rating Scale (YMRS)、Depression Self-Rating Scale for Children (DSRS-C) による症状評価を行っている。

さらに、治療中の経過観察の中で、同意が得られた患者から、複数回の血液サンプルを収集する。一方、Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) および MINI による気分障害の診断を行い、大うつ病性障害および双極性うつ病に対して、HAM-D (Hamilton Depression Scale) および BDI-II (Beck Depression Inventory) のような評価尺度を用いて、個人認知行動療

法の効果判定をしていく。本臨床研究参加の適格性を満たし、本研究に同意を得られた被験者に 2 週間の待機期間を経た後、1 回 50 分、週 1 回の頻度で、厚生労働省から推奨されているパンフレットに基づく計 16 回の認知行動療法を提供する。試験期間中は、基本的に薬物の種類・用法・用量の変更を認めない。治療前後に、血液検査、心理検査、MRI 検査を行う。評価時期は、アセスメント時 (0 週)、介入開始 (2 週)、介入中期 (10 週)、介入終期 (18 週) である。認知行動療法質の担保については、成人の大うつ病性障害に対する、エビデンスに基づいた、16 セッションにおけるプロトコルを、定期的なスーパービジョン・システムにより提供する。

#### C. 研究結果

(1) 九大では、現在まで関連医療機関を含め 106 名のお気分障害患者からの生体試料を採取している。気分障害外来においては、気分障害患者の多軸的な臨床評価および生体試料の採取を行っている。なお、九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点と連携し、再生医療技術を用いたヒト皮膚線維芽細胞由来の iN 神経の樹立に成功したため、現在、数名の健康者および精神疾患患者由来の皮膚細胞から神経細胞を樹立し、その神経の特性を電気生理学実験・免疫染色等を駆使して検索している。

(2) 名大では、これまでに統合失調症患者、健常者各 29 例を対象としたプロテオーム解析において、発現量に差異が認められた 20 スポットから、22 種類のタンパク質を同定してきた (特願 2010-147017)。新たに Western blotting 法による発現変化の再検証を完遂し、8 種類のタンパク質について有意な発現変化を再確認した [Student' s t-test ( $p < 0.05$ )]。ロジスティックモデルにより統合失調症患者群と健常者群を判別する統計モデルを構築し、統合失調症の診断を 4 ないし 6 種類のタンパク質で予測する統計モデルを見出した (特許出願準備中)。

一方、統合失調症患者、双極性障害患者、健常者各 20 例を対象としたプロテオーム解析の結果として、解析対象スポットは統合失調症患者群  $1168.3 \pm 25.6$  スポット、双極性障害患者群  $1162.7 \pm 27.7$  スポット、健常者群  $1165.3 \pm 20.0$  スポット、内部標準  $1203.0 \pm 17.5$  スポットが認識され、1291 スポットについて統計学的な検討を行った。PDQuest による粗解析において、統合失調症患者群と健常者群との比較では、60 スポットについて有意な発現変化が認められた (発現量増加: 27 スポット、発現量減少 33 スポット) [Student' s t-test ( $p < 0.05$ )]。双極性障害患者群と健常者群との比較では、44 スポットについて有意な発現変化が認められた (発現量増加: 18 スポット、発現量減少 26 スポット) [Student' s t-test ( $p < 0.05$ )]。統合失調症患者群

と双極性障害患者群とのオーバーラップを確認したところ、23 スポットが確認され [Student' s t-test ( $p < 0.05$ )]、健常者群に対する発現量変化の方向性は全て同一方向であった (発現量増加: 10 スポット、発現量減少 13 スポット)。

トランスクリプトーム解析については、統合失調症患者、双極性障害患者、健常者各 20 例のリンパ芽球様細胞株より total RNA を抽出・精製して品質の確認を行った。RIN、リボソーム RNA 比率、濃度の平均はそれぞれ  $9.2 \pm 0.4$  (RIN)、 $2.2 \pm 0.2$  (28s/18s)、 $535.3 \pm 121.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (濃度) であった。

(3) 国立精神神経医療研究センターでは、特にセロトニンの前駆物質であるトリプトファンについて詳細な検討を行ったところ、うつ病患者の血中トリプトファン濃度は、健常対照群と比較して、有意に低下していた ( $p=0.03$ )。さらに、過去の 24 研究のメタアナリシスでも、うつ病患者におけるトリプトファン濃度の低下は、効果量は中等度であるものの、有意差を認めた (論文準備中)。

また、統合失調症患者、大うつ病患者のいずれも、健常者とくらべて脳脊髄液中の IL-6 濃度が高かった。脳脊髄液中の IL-6 濃度は血液中 IL-6 濃度よりも高く、さらに、脳脊髄液中濃度と血液中濃度との間に有意な相関関係を認めなかった。これらの結果より、統合失調症患者、大うつ病患者における脳脊髄液中 IL-6 濃度

の上昇は、末梢血液で産生が増加した IL-6 が中枢に拡散したことが原因であるとは考えにくく、中枢神経内における免疫細胞の IL-6 産生増強が関与していることが示唆された (J Psychiatr Res, 2013)。DEX/CRH test の結果、過剰抑制を呈するうつ病患者では、非抑制を呈する者比べてクロニンジャーの気質・性格尺度で報酬依存が高く、協調性が低いことが明らかになり、類型化に役立つことを明らかにした (J Affect Disord, 2012)。

さらに、第一サンプル(うつ病 10 例、健常者 10 例)の解析では、①発現量の平均に差がある分子、②うつ病の一部で変化の大きい分子、③症状と相関の強い分子に着目し、少なくとも 19 分子を同定した。

(4) 理研では、2次元ディファレンシャルゲル電気泳動の結果、200 の蛋白スポットが有意に異なっていた。これらのスポットより、高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析により、蛋白質を同定した結果、細胞死関連、および解糖系関連蛋白の変化が大きいことがわかった。

これらの蛋白質が双極性障害のバイオマーカーとなりうるかどうかを検討するため、ウェスタンブロット解析により、症例対照研究を行った。その結果、解糖系に関わる蛋白質である、phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1) が双極性障害患者で有意に増加していた ( $p <$

0.05)。PGAM1 は、双極性障害のバイオマーカー候補になりうると考えられた。

(5) 阪大では、まず、本研究の基盤となる被験者のリクルートとサンプル収集を行った。その結果、現在保有しているサンプル数は、うつ病 83 例、双極性障害 37 名、健常者 411 名、統合失調症 102 例、広汎性発達障害 53 例である。特に健常者においては、抑うつ症状のある健常者と抑うつ症状のある健常者を鑑別するため、37 名について PHQ9 を施行した。平均年齢 26.7 歳  $\pm$  9.7 (標準偏差)、男 24 名、女 13 名、教育歴 14.65 年  $\pm$  1.7 年、PHQ9 平均値 1.9、標準偏差 2.2、0 が 10 名、1 が 6 名、2 が 11 名、3 が 6 名、4 が 2 名、6 が 1 名、11 が 1 名であった。PHQ9 が 5 点以上の被験者の 2 名については SCID を行い、HAMD を行ったが、うつ病ではなく、どちらも HAMD2 点であった。

(6) 千葉大では、児童思春期の気分障害患者については、現在までに、8 歳から 17 歳までの気分障害患者 (大うつ病 45 例、双極性障害 4 例) 49 例および正常コントロール群 (7 歳から 17 歳) の 30 例の血清サンプルを収集した。また、治療中の経過観察の中で、16 例の患者の複数回の血液サンプルを収集している。現在までに、3 例の個人認知行動療法のエントリーを得て、血液サンプルを収集し、介入を開始している。

#### D. 考察

研究班は、多数のサンプルの収集に成功し、気分障害のバイオバンクの構築に

貢献したと思われる。また、班毎の進捗には、違いが見られているが、すでに下記のような貴重な結果が得られている施設もある。

統合失調症、双極性障害、健常者のプロテオームの粗解析から、解析対象スポットに統合失調症特異的、双極性障害特異的、疾患群共通のバイオマーカー候補が含まれている可能性が示された。今後、再現性の確認に加え疾患特異性を検証し、統合失調症と双極性障害の判別に有用なバイオマーカーの特定と判別モデルの構築を進めることにより、これまで困難であった両疾患の鑑別診断の一助となる可能性がある。同様にして、トランスクリプトーム解析を進めることで遺伝子発現マーカーの特定や遺伝子発現パターンからの疾患の判別を可能にする技術が開発される可能性がある。上述のバイオマーカーと組み合わせることにより、確度が高く客観的な指標に基づく診断の実現に近づく可能性がある。

うつ病患者で血中トリプトファンの低値、CSF 中 IL-6 高値が認められ、DEX/CRH test が病前性格と相関することを見いだし、これらは、大規模サンプルで確認する価値がある。

双極性障害患者の死後脳研究で、PGAM1 を含む解糖系の蛋白質の変化が指摘されているが、一致した見解には至っていない (Novikova et al, Neurobiol Dis 2006, English et al, Biol Psychiatry 2011)。PGAM1 は、3-phosphoglycerate を 2-phosphoglycerate に変換する解糖系の酵素である。理研での研究では、PGAM1 が高値を示していた。培養リンパ芽球様細胞を用いたが、培養リンパ芽球様細胞

の樹立には 1 ヶ月程度を要する。実際の検査においては、血液等、より得やすい試料を用いることが望ましいため、今後、他の試料における測定も検討する必要がある。また、今回は 8 例と症例数が少なく、今後、症例数を増やした検討が必要である。また、測定法についても、ウェスタンブロットを用いた方法では煩雑なため、今後検討する必要がある。

抑うつ症状の有無のある健常者のサンプリングにおいては、抑うつ症状があまり認められない健常者はたくさんいるが、抑うつ症状をもつ健常者は少なく、後者を対象として解析することが今後の課題である。PHQ9 ではうつ病のスクリーニングとして有用すぎて、軽度の抑うつ症状を持つ健常者を除いてしまっている可能性がある。よって、今後は患者と合わせるために、HAMD を健常者全員施行することも検討したい。

精神疾患の血漿中の miRNA の測定は、まだ本邦では報告がなく、有望であるがチャレンジングな研究であると言える。まずは、方法論の検討を十分に行って、来年度の成果につなげたい。

児童思春期の気分障害患者に関しては、症例の蓄積を進め、pro-BDNF および mature BDNF の測定を行う予定である。同様に、20 例の気分障害の個人認知行動療法の介入前後の血液サンプルを収集し、その前後の血液 pro-BDNF および mature BDNF の変化を測定し、検討する予定である。

## E. 結論

うつ病のバイオマーカー候補を多数同定した。気分障害のバイオバンク構築に向けたサンプル収集を行い、本年度実施した方法に基づき、生化学的な診断方法を確立することにより、大うつ病性障害および双極性障害の診断が容易となり、統合失調症など他の精神疾患との鑑別により誤診の可能性を低減できると考えられる。また、これらの疾患のスクリーニングに応用することで、疾患の早期発見・早期治療を可能にし、病勢の進行を阻止できる可能性が期待される。気分障害のバイオマーカーは、医療行政上、大変有意義であり、国民の保健・精神医療において多大なる貢献ができると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
うつ病の病態を反映する血中バイオマーカーの開発・実用化研究  
分担研究報告

気分障害外来によるバイオマーカー検索システムの構築

研究分担者 神庭 重信

(九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野・教授)

研究協力者 加藤 隆弘

(九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野・九州大学先端融合医療レドックスナビ研  
究拠点・特任助教)

**研究要旨** 近年、大うつ病をはじめとする気分障害の増加とその病態の多様化は、医療現場のみならず、地域社会、職域、教育現場に深刻な影響を及ぼしている。精神疾患を持つ者が最初から精神科を受診することは稀で、多くは精神科以外の医療機関や産業医を経由し、精神科受診は遅れがちであり、予後に影響を与えている。しかるに、本研究では、健診でも有用なバイオマーカーの開発を目指す。

初年度、我々は、気分障害における橋渡し研究の国内拠点を築くべく、国内初の気分障害外来を九州大学病院内に立ち上げた。本専門外来では、精度の高い気分障害の診断・重症度評価を多軸的に行い、血液サンプルはじめ各種バイオマーカーを測定している。並行して、一部の患者からは同意の下で皮膚サンプルを提供してもらい、誘導神経細胞 (induced neuronal cells; iN 神経) を作成し、本神経の特性もバイオマーカー候補として測定している (九州大学倫理審査委員会承認済)。来年度以降は、サンプルを増やし蓄積することで、各種データとの相関解析を行い、有用なバイオマーカー検索を可能にし、最終的には血液で測定可能な気分障害バイオマーカー開発を目指す。

**A. 研究目的**

近年、大うつ病をはじめとする気分障害の増加とその病態の多様化は、医療現場のみならず、地域社会、職域、教育現場に深刻な影響を及ぼしている。精神疾患を持つ者が最初から精神科を受診することは稀で、多くは精神科以外の医療機関や産業医を経由し、精神科受診は遅れが

ちであり、予後に影響を与えている。しかるに、本研究では、健診でも有用なバイオマーカーの開発を目指す。患者の脳内動態を間接的に探る手法として機能的 MRI などを用いることができるが、精神疾患以外のバイオマーカーの成功例の多くは末梢サンプルである。より簡便に施

行できる血液検査等を開発することにより、精神保健の向上に役立てることができる。

これまでバイオマーカー開発は末梢サンプルを対象として網羅的に行われてきたが、気分障害の病態を反映することが確実なものは同定されていない。近年、人工多能性幹細胞

(induced pluripotent stem cell; iPSC) を介した神経の樹立が、精神疾患バイオマーカー開発の新たなツールと注目されている。さらに最近、iPSC細胞を介さずに、体細胞(主に皮膚線維芽細胞由来)から直接的に神経(induced neuronal cells; iN 神経)を作成する技術が開発された。本技術は、これまで不可能であった患者由来の神経を短時間で直接的に解析可能とし、脳内動態を探る新たなツールとして、すでにアルツハイマー病患者由来の iN 神経で、その有用性が示唆されている。本研究では、こうした技術を取り入れ、より中枢機能や病態に近い系からバイオマーカー候補を絞り込み、そのバイオマーカーに特化した測定方法を開発することにより、今まで成功しなかったバイオマーカー同定を目指す。

## B. 研究方法

本研究は、九州大学病院倫理審査委員会による承認下で実施する(対象となる被験者全員に同意説明行い、文書にて同意を得る)。

まず、気分障害のトランスレーショナル研究における国内拠点を創出するため、24年度には、国内初となる気分障害外来を九州大学病院に立ち上げた。本外来では、双極性障害、大うつ病、その他の気分障害をもつ患者及び健常者を対象にして、臨床データの精度向上のため、Structured Clinical Interview for

DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I)を含む精神医学的診断面接、各種心理検査を行い、各種生体試料(DNA/RNA/リンパ芽球樹立のための血液、線維芽細胞樹立のための皮膚生検による皮膚組織)の採取、MRIなどの脳画像検査等を実施し、多軸的な見地から病態を評価し、気分障害のバイオマーカー検出に繋がることを志している。

本気分障害外来に際して、24年度には、気分障害、特に大うつ病の診断の精度向上のための「抑うつ・興味の消失簡易評価票 Days」を開発した。本調査票を現在、本専門外来患者に施行している。

## C. 研究結果

現在まで関連医療機関を含め106名のお気分障害患者からの生体試料を採取している。気分障害外来においては、気分障害患者の多軸的な臨床評価および生体試料の採取を行っている。

なお、九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点と連携し、再生医療技術を用いたヒト皮膚線維芽細胞由来の iN 神経の樹立に成功したため、現在、数名の健常者および精神疾患患者由来の皮膚細胞から神経細胞を樹立し、その神経の特性を電気生理学実験・免疫染色等を駆使して検索している。

## D. 考察

来年度に向けて、気分障害外来を軸にして、症例数を増やし、臨床データの取得、生体試料の採取を行い、気分障害のバイオマーカー検索を進めてゆく。

## E. 結論

これまで困難であった気分障害のバイオマーカー開発に向けて、我々は、トランスレーショナル研究拠点を気分障害外来として九州大学病院に設立し、精度の高い臨床データの取得、血液サンプルの取得、および、脳内病態を反映させることが期待される iN 神経の樹立を可能にしている。本拠点による気分障害研究は、新たな気分障害のバイオマーカー開発を可能とし、気分障害の早期発見・早期介入の一助となり、こうした成果は国民の医療・精神医療の発展に大きく寄与することが期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Motomura K, Kanba S: Lost in translation: Confusion about depression and antidepressant therapy in Japan. *Psychiatry Clin Neurosci.* 67(1): 1-2, 2013

・ Takata A, Iwayama Y, Fukuo Y, Ikeda M, Okochi T, Maekawa M, Toyota T, Yamada K, Hattori E, Ohnishi T, Toyoshima M, Ujike H, Inada T, Kunugi H, Ozaki N, Nanko S, Nakamura K, Mori N, Kanba S, Iwata N, Kato T, Yoshikawa TA: Population-Specific Uncommon Variant in GRIN3A Associated with Schizophrenia. *Biol Psychiatry.* S0006-3223(12)00951-1, 2012

・ Kato TA, Yamauchi Y, Horikawa H, Monji A, Mizoguchi Y, Seki Y, Hayakawa K, Utsumi H, Kanba S: Neurotransmitters, Psychotropic Drugs

and Microglia: Clinical Implications for Psychiatry. *Current Medicinal Chemistry*, 20 (3), 331-344, 2013

・ Anderson G, Berk M, Dodd S, Bechter K, Altamura AC, Dell'osso B, Kanba S, Monji A, Fatemi SH, Buckley P, Debnath M, Das UN, Meyer U, Müller N, Kanchanatawan B, Maes M: Immuno-inflammatory, oxidative and nitrosative stress and neuroprogressive pathways in the etiology, course and treatment of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012 Oct 18. doi:pii: S0278-5846(12)00263-1.

・ Oda Y, Onitsuka T, Tsuchimoto R, Hirano S, Oribe N, Ueno T, Hirano Y, Nakamura I, Miura T, Kanba S. Gamma band neural synchronization deficits for auditory steady state responses in bipolar disorder patients. *PLoS One.* 7(7): e39955, 2012

・ Kato TA, Tateno M, Shinfuku N, Fujisawa D, Teo AR, Sartorius N, Akiyama T, Ishida T, Choi TY, Balhara YPS, Matsumoto R, Umene-Nakano W, Fujimura Y, Wand A, Chang JPC, Chang RYF, Shadloo B, Ahmed HU, Lerthattasilp T, Kanba S: Does the 'hikikomori' syndrome of social withdrawal exist outside Japan? A preliminary international investigation. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 47(7): 1061-1075, 2012

・ Kato TA, Watabe M, Tsuboi S, Ishikawa K, Hashiya K, Monji A, Utsumi H, Kanba S: Minocycline Modulates Human Social Decision-Making: Possible Impact of Microglia on Personality-Oriented Social Behaviors. *PLoS ONE*,

7(7): e40461, 2012

・ Watabe M, Kato TA, Monji A, Horikawa H, Kanba S: Does minocycline, an antibiotic with inhibitory effects on microglial activation, sharpen a sense of trust in social interaction? *Psychopharmacology*, 220(3): 551-557, 2012

・ Tateno M, Park TW, Kato TA, Umene-Nakano W, Saito T: Hikikomori as a possible clinical term in psychiatry: a questionnaire survey. *BMC Psychiatry* 12:169, 2012

## 2.学会発表

・加藤隆弘, 館農勝, 新福尚隆, 神庭重信: ひきこもりに関する国際共同調査: ひきこもりは海外にも存在するのか? シンポジウム—ひきこもりの精神医学的意義: 文化依存症候群か普遍的現象か—, 第108回日本精神神経学会学術総会, 2012.5.25, 札幌コンベンションセンター, 札幌

・ Kato TA, Watabe M, Kanba S: Microglia Hypothesis of Unconscious, Personality and Social Activities. Research Session 'The Neurochemistry of the Mind', 13th International Congress of Neuropsychanalysis, 2012.6.15, The Eugenides Foundation, Athens, Greece

・加藤隆弘: 国際共同調査を通じて見えてきた、ひきこもりと現代型うつ. シンポジウム『時代の病理: ひきこもりと現代型うつ』. 第19回多文化間精神医学会学術総会、2012.6.24, 九州大学医学部百年講堂, 福岡

・加藤隆弘: 精神分析と脳科学—ミクログリアは『死の欲動』の起源か?—. シンポジウム—精神病理と脳 (追加発言), 第35回日本精神

病理・精神療学会, 2012.10.6, 九州大学医学部百年講堂, 福岡

・ Kato TA, Seki Y, Monji A, Mizoguchi Y, Horikawa H, Sato-Kasai M, Hayakawa H, Yamauchi Y, Yoshiga D, Kanba S: Minocycline and aripiprazole inhibit oligodendrocyte damage from interferon- $\gamma$ -stimulated microglia in a co-culture model. The 42th Society for Neuroscience Annual Meeting, 2012.10.16, New Orleans, USA

・ Wilson AM, Kato TA, Tharakan R, Kano SI, Sawa A: Induced neuronal cells in psychiatry. The 42th Society for Neuroscience Annual Meeting, 2012.10.17, New Orleans, USA

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 末梢リンパ球の網羅的解析による気分障害のバイオマーカー開発

研究分担者 尾崎 紀夫

(名古屋大学大学院医学系研究科精神医学 親と子どもの心療学分野・教授)

**研究要旨** 気分障害(大うつ病性障害や双極性障害)や統合失調症に代表される精神疾患は、発症後の未治療期間が予後不良の予測因子であり、発症早期に治療的介入を行うことの重要性が強調されている。しかしながら、客観的な補助診断法が確立しておらず、未治療期間が延びる結果、経過不良となる症例が多く、有用なバイオマーカーの開発が求められている。本研究では、患者末梢血液由来リンパ芽球様細胞株のオミックス解析により、病態の特性を直接的に反映するバイオマーカー候補を見出し、簡便に施行できる血液検査等を開発することで、精神医療・精神保健の向上に貢献することを試みている。これまでに、統合失調症患者120例、双極性障害患者85例、大うつ病性障害患者28例、広汎性発達障害患者110例、健常者91例よりリンパ芽球様細胞株を樹立し、プロテオーム解析およびトランスクリプトーム解析を実施してバイオマーカー候補の探索を進めてきた。統合失調症を対象としたプロテオーム解析の結果、統合失調症マーカーの候補として22種類を特定し、4ないし6種類の組み合わせにより統合失調症を判別する統計モデルを構築した。また、統合失調症と双極性障害の両疾患を対象とした解析において、各疾患に特異的あるいは両疾患に共通の変化を示すマーカー候補が認められ、分子の同定を進めている。今後、得られた結果の再現性の確認とトランスクリプトーム解析による遺伝子マーカーの探索を進め、客観的指標としての臨床応用性を検討する。

### A. 研究目的

気分障害(大うつ病性障害や双極性障害)や統合失調症に代表される精神疾患は、発症後の未治療期間 [duration of untreated illness (DUI)] が予後不良の予測因子であるとの知見は定説となっており、本人の生活の質(QOL)や生産性を損なうだけではなく、自殺に繋がる可能性があり、発症早期に治療的介入を行うことの重要性が強調されている。

一方、精神疾患の診断は、医師の問診や患者の訴えを基にした症候学によって行われており、生理・生化学的な検査による診断法は確立していない。診断に有用な検査法がないため治療が遅れ、その結果、自殺等の問題に至る、あるいは難治化している症例が少なくないのが現状である。したがって、精神疾患の診断に有用な客観的検査法の開発が待望されている。

本研究では、疾患の特性 (trait) を直接的に反映する患者由来リンパ芽球の予備的なオミックス解析(トランスクリプトーム・プロテオーム)により、簡便に施行できる血液検査等を開発することで、より中枢機能や病態に近い系からバイオマーカー候補を絞り込み、そのバイオマーカーに特化した測定方法を開発し、精神医療・精神保健の向上に貢献することを目指す。

### B. 研究方法

#### 対象:

統合失調症患者 120 例、双極性障害患者 85 例、大うつ病性障害患者 28 例、広汎性発達障害患者 110 例、健常者 91 例を対象として末梢血液由来リンパ芽球様細胞株を樹立した。

#### 方法

##### 1. リンパ芽球様細胞株の調製

対象者より研究同意を取得し、採取した末梢血液からリンパ球を分離・精製後に Epstein-Barr virus により不死化してリンパ芽球様細胞株を調製した。

##### 2. プロテオーム解析

リンパ芽球様細胞株よりタンパク質を抽出・精製後、2D-DIGE (two dimensional fluorescence difference gel electrophoresis) 法によりタンパク質の網羅的発現比較解析を行った。

各検体を Cy3 または Cy5 で、内部標準検体(各検体の等量混合物)を Cy2 で蛍光標識し、同一ゲル内で等電点電気泳動および SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) を展開して等電点・分子量による分離を行うことにより、再現性・感度・定量性の高い発現比較解析を実施した。

泳動後のタンパク質はバリアブルイメージアナライザー (Typhoon 9400 scanner) による多重蛍光検出により可視化し、スポット発現解析ソフト (PDQuest Advanced 8.0 Software) にて各タンパク質スポットの認識および泳動ゲル間の位置調整 (スポットマッチング処理) を行い、発現量の変化を直接比較検討した。

統計学的解析には、粗解析として各群間の発現量の平均値の差を Student's t-test にて比較した。追加検討として、スポットフィルタリング (欠損値があるスポットおよび発現量の最小値と最大値の比が 1.5 未満であるスポットを解析から除外) を行い、発現量の対数変換の後に Student's t-test 及び SAM (significance analysis of microarrays) にて比較検討を行った。

統計学的な検討にて見出された候補スポットについては、発現量、発現量変化率、泳動像の目視確認にてタンパク質同定対象スポットを絞り込んだ。タンパク質の同定には二次元電気泳動後に銀染色を行い、スポットの可視化、切り出し、トリプシン消化を行い、質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いてアミノ酸配列を決定してデータベース (Mascot) 照合により実施した。同定されたタンパク質については、Western blotting 法により発現変化を再確認してバイオマーカー候補を絞り込んだ。疾患群と健常者群を高精度で判別可能な統計モデル (ロジスティックモデルなど) の構築を試みた。

### 3. トランスクリプトーム解析

リンパ芽球様細胞株より total RNA を抽出・精製し、2100 バイオアナライザにより RIN (RNA Integrity Number: 濃度や機器、分析対象物に左右されない客観的な評価手法)、リボソーム RNA 比率、濃度を測定して total RNA の品質を定量的に評価した。今後、遺伝子の網羅的発現解析には GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array (以下、Exon Array) を用い、遺伝子レベルに加えエクソンレベルの発現量を比較する。T7-(N)<sub>6</sub> プライマーにより cDNA を合成し、ラベル化処理を行いハイブリダイゼーションさせる。プローブの蛍光シグナルは GeneChip® Scanner 3000 7G にて測定する。発現量の比較解析には Partek® Genomics Suite にて実施し、疾患特異的な発現変化やスプライシングバリエーションが認められた遺伝子については、real-time PCR 法により発現変化を再確認してバイオマーカー候補を絞り込む。疾患群と健常者群を高精度で判別可能な統計モデル (ロジスティックモデルなど) の構築を行う。

(倫理面への配慮)

なお、本研究は名古屋大学大学院医学系研究科生命

倫理審査委員会の承認内容に従い実施した。

## C. 研究結果

これまでに統合失調症患者、健常者各 29 例を対象としたプロテオーム解析において、発現量に差異が認められた 20 スポットから、22 種類のタンパク質を同定してきた (特願 2010-147017)。新たに Western blotting 法による発現変化の再検証を完遂し、8 種類のタンパク質について有意な発現変化を再確認した [Student's t-test ( $p < 0.05$ )]。ロジスティックモデルにより統合失調症患者群と健常者群を判別する統計モデルを構築し、統合失調症の診断を 4 ないし 6 種類のタンパク質で予測する統計モデルを見出した (特許出願準備中)。

一方、統合失調症患者、双極性障害患者、健常者各 20 例を対象としたプロテオーム解析の結果として、解析対象スポットは統合失調症患者群  $1168.3 \pm 25.6$  スポット、双極性障害患者群  $1162.7 \pm 27.7$  スポット、健常者群  $1165.3 \pm 20.0$  スポット、内部標準  $1203.0 \pm 17.5$  スポットが認識され、1291 スポットについて統計学的な検討を行った。PDQuest による粗解析において、統合失調症患者群と健常者群との比較では、60 スポットについて有意な発現変化が認められた (発現量増加: 27 スポット、発現量減少 33 スポット) [Student's t-test ( $p < 0.05$ )]。双極性障害患者群と健常者群との比較では、44 スポットについて有意な発現変化が認められた (発現量増加: 18 スポット、発現量減少 26 スポット) [Student's t-test ( $p < 0.05$ )]。統合失調症患者群と双極性障害患者群とのオーバーラップを確認したところ、23 スポットが確認され [Student's t-test ( $p < 0.05$ )]、健常者群に対する発現量変化の方向性は全て同一方向であった (発現量増加: 10 スポット、発現量減少 13 スポット)。

トランスクリプトーム解析については、統合失調症患者、双極性障害患者、健常者各 20 例のリンパ芽球様細胞株より total RNA を抽出・精製して品質の確認を行った。RIN、リボソーム RNA 比率、濃度の平均はそれぞれ  $9.2 \pm 0.4$  (RIN)、 $2.2 \pm 0.2$  (28s/18s)、 $535.3 \pm 121.3 \mu\text{g}/\text{uL}$  (濃度) であった。

## D. 考察

統合失調症、健常者のプロテオーム解析において、統計モデルの構築により、バイオマーカー候補が見いだされたことから、統計学的な検証により高精度に判別できる可能性があることが示された。現状ではサン

プルサイズが少ないため、今後外部データ検証による判別モデルの再現性の確認が必要と考えられる。

一方、統合失調症、双極性障害、健常者のプロテオームの粗解析から、解析対象スポットに統合失調症特異的、双極性障害特異的、疾患群共通のバイオマーカー候補が含まれている可能性が示された。今後、再現性の確認に加え疾患特異性を検証し、統合失調症と双極性障害の判別に有用なバイオマーカーの特定と判別モデルの構築を進めることにより、これまで困難であった両疾患の鑑別診断の一助となる可能性がある。同様に、トランスクリプトーム解析を進めることで遺伝子発現マーカーの特定や遺伝子発現パターンからの疾患の判別を可能にする技術が開発される可能性がある。上述のバイオマーカーと組み合わせることにより、確度が高く客観的な指標に基づく診断の実現に近づく可能性がある。

## E. 結論

本年度実施した方法に基づき、生化学的な診断方法を確立することにより、大うつ病性障害および双極性障害の診断が容易となり、統合失調症など他の精神疾患との鑑別により誤診の可能性を低減できると考えられる。また、これらの疾患のスクリーニングに応用することで、疾患の早期発見・早期治療を可能にし、病勢の進行を阻止できる可能性が期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Y. Watanabe, J. Egawa, Y. Iijima, A. Nunokawa, N. Kaneko, M. Shibuya, T. Arinami, H. Ujike, T. Inada, N. Iwata, M. Tochigi, H. Kunugi, M. Itokawa, N. Ozaki, R. Hashimoto, T. Someya: A two-stage case-control association study between the tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene and schizophrenia in a Japanese population. *Schizophr Res* 137 (1-3):264-6, 2012
2. Y. Uno, T. Uchiyama, M. Kurosawa, B. Aleksic, N. Ozaki: The combined measles, mumps, and rubella vaccines and the total number of vaccines are not associated with development of autism spectrum disorder: The first case-control study in Asia. *Vaccine* 30 (28):4292-8, 2012

3. K. Ukai, A. Okajima, A. Yamauchi, E. Sasaki, Y. Yamaguchi, H. Kimura, B. Aleksic, N. Ozaki: Total palliative care for a patient with multiple cerebral infarctions that occurred repeatedly in association with gastric cancer (Trousseau's syndrome). *Palliat Support Care* 1-4, 2012

4. Y. Torii, S. Iritani, H. Sekiguchi, C. Habuchi, M. Hagikura, T. Arai, K. Ikeda, H. Akiyama, N. Ozaki: Effects of aging on the morphologies of Heschl's gyrus and the superior temporal gyrus in schizophrenia: A postmortem study. *Schizophr Res* 134 (2-3):137-42, 2012

5. A. Tamaji, K. Iwamoto, Y. Kawamura, M. Takahashi, K. Ebe, N. Kawano, S. Kunimoto, B. Aleksic, Y. Noda, N. Ozaki: Differential effects of diazepam, tandospirone, and paroxetine on plasma brain-derived neurotrophic factor level under mental stress. *Hum Psychopharmacol* 27 (3):329-33, 2012

6. K. Ohi, R. Hashimoto, Y. Yasuda, M. Fukumoto, H. Yamamori, S. Umeda-Yano, T. Okada, K. Kamino, T. Morihara, M. Iwase, H. Kazui, S. Numata, M. Ikeda, T. Ohnuma, N. Iwata, S. Ueno, N. Ozaki, T. Ohmori, H. Arai, M. Takeda: Functional genetic variation at the NRG1 gene and schizophrenia: Evidence from a gene-based case-control study and gene expression analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 159B (4):405-13, 2012

7. C. Nakazaki, A. Noda, Y. Koike, S. Yamada, T. Murohara, N. Ozaki: Association of insomnia and short sleep duration with atherosclerosis risk in the elderly. *Am J Hypertens* 25 (11):1149-55, 2012

8. W. Nagashima, H. Kimura, M. Ito, T. Tokura, M. Arao, B. Aleksic, K. Yoshida, K. Kurita, N. Ozaki: Effectiveness of duloxetine for the treatment of chronic nonorganic orofacial pain. *Clin Neuropharmacol* 35 (6):273-7, 2012

9. S. Matsunaga, M. Ikeda, T. Kishi, Y. Fukuo, B. Aleksic, R. Yoshimura, T. Okochi, Y. Yamanouchi, Y. Kinoshita, K. Kawashima, W. Umene-Nakano, T. Inada, H. Kunugi, T. Kato, T. Yoshikawa, H. Ujike, J. Nakamura, N. Ozaki, T.