

201334002A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者
神 庭 重 信

平成26 (2014) 年 3 月

目 次

はじめに	1
I. 総括研究報告	
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)	
II. 分担研究報告	
1. 新規ツールによる気分障害バイオマーカー検索システムの構築	15
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	22
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	26
服部 功太郎 (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・室長)	
4. 双極性障害のバイオマーカー候補同定	30
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	32
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	37
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) (小児発達学研究所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)	
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	50

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の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、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きた。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）を作製し、本神経の特性もバイオマーカー候補として測定してきた。本年度は、ヒト血液由来の直接誘導ミクログリア（induced microglial cells; iMG 細胞）の作製に成功したため、近年話題になっている脳内免疫系の異常に関しても、末梢血由来細胞から解析できるシステムを開発した。並行して、阪大から提供していただいた気分障害患者の血清サンプルを用いて、ノンターゲットによる網羅的メタボローム解析を実施し、健常者、大うつ病患者及び双極性障害を判別しうる候補分子を幾つか見出した。

名大の尾崎紀夫は、統合失調症患者 152 例、双極性障害患者 92 例、大うつ病性障害患者 32 例、健常者 97 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。外部データ検証によりモデルの予測性能が確認された。また、統合失調症、双極性障害、健常者を対象とした解析から、39 種類の候補分子を同定し、双極性障害の候補分子 14 種類について Western blotting 法による確認を実施している。トランスクリプトーム解析では統計学の専門家によりデータマイニングを実施しており、候補遺伝子を選別して再現性確認を実施していく。

国立精神神経医療研究センターの服部功太郎は、うつ病、双極性障害、統合失調症、健常対照を含む 106 例の脳脊髄液を用い、プロテオーム解析を行った。その結果、うつ病で顕著に亢進ないし低下している分子、うつ病の一部症例で異常値を示す分子、重症度と相関する分子など延べ 32 分子の、うつ病マーカー候補分子が得られた。この中には脳特異的な分子だけでなく Fibrinogen のように血液中に多く存在する分子も含まれていた。今後、別の症例で前向きに検

証するとともに、同時に採取した血液でも解析する予定である。

理化学研究所の加藤忠史は、双極性障害患者由来血漿を用いて、動物モデルで見いだされたバイオマーカー候補物質の所見が見いだされるかを検討すると共に、患者死後脳において、新たなバイオマーカー候補を探索した。

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 miRNA の測定法を検討中である。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、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患者群および年齢・性別をマッチさせた健常群から、血液サンプルを収集した。8歳から17歳までのうつ病エピソード患者（合計37例、うち薬物治療群14例、未治療群23名）および健常コントロール群（7歳から17歳）の25例の血清サンプルの pro-BDNF, mature-BDNF, MMP-9（マトリックスメタロプロテイナーゼ-9：pro-BDNF から mature BDNF への変換を行う酵素）の測定を ELISA 法により行った。うつ病エピソードのうち薬物治療群の mature-BDNF、MMP-9 は未治療群と比較し、いずれも有意に高値であり、また薬物治療群のうち pro-BDNF 高値となる対象者が数名存在した。

以上のように、各施設は、連携しながら、当初の計画に沿って、2年度研究を進めた。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）

服部 功太郎（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・室長）

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）およびミクログリア（iMG）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、単球からiMG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およびiMG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。

最終度は、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】

24年度には、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創出のため、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目指している。

本年度は、iN神経に加えて、我々独自でヒト血液由来の直接誘導ミクログリア細胞（induced microglial cells; iMG細胞）作製システムを開発した（特願済）。近年気分障害の病態生理においてミクログリアを中心とした脳内免疫系異常が示唆されており、開発したiMG細胞を気分障害患者の血液から作製・解析することで、それぞれの患者の脳内免疫系異常に関しても、末梢血採取により解析できるようになった。

他方、我々は、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、血液の網羅的メタボローム解析システムを構築している。

【尾崎紀夫】

対象：

統合失調症患者152例、双極性障害患者92例、大うつ病性障害患者32例、健常者97例を対象として末梢血液由来LCL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LCLを調製した。
2. プロテオーム解析

LCLよりタンパク質を抽出・精製後、2D-DIGE法によりタンパク質の網羅的発現比較解析を行った。

scannerにより可視化し、PDQuestにて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を行い、発現量の変化を比較検討した。

統計解析 (Student's t-test) にて見出された候補スポットはLC-MS/MSを用いて候補分子を同定した。候補分子については、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判別可能な統計モデルの構築を行った。

3. トランスクリプトーム解析

LCLよりtotal RNAを抽出・精製し、GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array (以下、Exon Array)を用いて遺伝子・エクソンレベルの発現量を比較した。発現量の比較解析にはPartekにて実施し、疾患特異的な発現変化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判別可能な統計モデルを構築し、外部データ検証によるモデルの検証を行う。

(倫理面への配慮) 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。

【服部功太郎】

年齢・性をマッチさせた統合失調症30例、うつ病30例、双極性障害16例および健常対照30例の脳脊髄液を用いてプロテオーム解析を行った。

患者は二人以上の精神科医による面接と病

歴からDSM-IVに準拠した診断がなされた。健常対照者は精神疾患簡易構造化面接法(MINI)にて精神疾患を除外した。被験者には、研究目的や検体の流れ、副作用の頻度などについて説明し、書面にて同意を得た。

眼底検査を含む神経学的検査の後、局所麻酔下に無外傷性針にて腰椎穿刺を行い、脳脊髄液を採取した。脳脊髄液は直ちに氷冷、遠心し、上清を低タンパク質吸着チューブに分注後、使用するまで-80度の超低温槽で保存した。

脳脊髄液中のタンパク質の解析は米国SomaLogic社の提供する解析サービス、Somascan premiumを利用した。本解析では同社の保有する1129種の改変型のアプタマー(特定の分子と特異的に結合する一本鎖核酸分子)であるSOMAmerを用いる。脳脊髄液中のタンパク質と結合したSOMAmerを、マイクロアレイで測定することで、各々のタンパク質の定量を行った。統計解析はSPSS (IBM, Ver20)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

●対象者と説明同意

参加希望者には十分な説明を行い文書で同意を得た。医療保護入院患者や未成年患者、同意能力に問題がある患者に検査を行う場合は、本人だけでなく保護者にも説明し書面で同意を得た。同意はいつでも文書によって撤回できるようにした。

●個人情報保護

試料・臨床情報については当センター、バイオリソース管理室において、専用のデータベースにて連結可能匿名化を行い、以後、試

料や臨床情報（病名・年齢・性別・投薬歴など）を記号のみで扱った。対応表や個人が特定できるような情報は暗号化装置（ハードウェアVPN）で守られた専用サーバか管理室内の鍵付ロッカーに保存し、各端末には保有しなかった。

●腰椎穿刺時の苦痛低減と安全性の確保

穿刺前に眼底検査等の神経内科的診察にてリスク要因（脳圧亢進、髄膜兆候など）を除外した。脊髄を損傷することがないようにL3/4ないしL4/5にて熟練した医師が局所麻酔下に腰椎穿刺を行った。穿刺針には22Gの無外傷性針を用い頭痛のリスクを軽減した。

●副作用への対応と補償

外来の参加者には医師の連絡先を知らせ、24時間対応できる体制とした。副作用発生時には必要に応じ当センターにて医療補償（治療）を行った。

【加藤忠史】

双極性障害患者4名のうつ状態および寛解期において、ほぼ同一の服薬内容の際に採血を行い、メタボローム解析を行った。また、メタボローム解析のため、一卵性双生児不一致例において採血を行った。

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次元ディファレンシャルゲル電気泳動を行った。

血漿は、キャピラリー電気泳動（CE）－質量分析あるいは高速液体クロマトグラフィー（LC）－質量分析により行った。

また、双極性障害患者死後脳を用いて、新たなバイオマーカー候補を探索した。

【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、不死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 α receptor II、Epidermal growth factor を候補として追加する。

(倫理面への配慮)

本研究は、精神疾患患者を対象とした遺伝子解析研究である。試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、研究施設での倫理委員会において承認を受けた上で研究を行った。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理 (匿名化) などを徹底させた。また、遺伝子解析研究においては、大阪大学倫理審査委員会において承認を受けている。

本研究の説明を行う過程や試料等提供の過程で、強制的な態度や同意の強要をしないことはいうまでもない。試料提供の依頼を拒否したからといって、診療行為等に不合理または不公平なことが行われることは全くない。また、同意はいつでも文書によって撤回する

ことができ、その場合、試料等は廃棄される。治療中の患者様に関しては、試料提供を依頼することが主治医によって不適切であると判断された場合は、試料提供の依頼は行わない。

【清水栄司】

本研究は、千葉大学大学院医学研究院の倫理審査委員会によって承認され、対象者には Informed Consent を書面にて得た。

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、血液サンプルを収集した。

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、心理検査などを行う。認知行動療法の質については、認知療法尺度一改定版を用いて評価し、定期的なスーパービジョン・システムにより行うことで担保する。

C. 研究結果

(1) 九大グループは、現在まで関連医療機関を含め約 150 名の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。

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 iN 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。iMG ミクログリア細胞に関しては、双極性障害患者において特性を評価している段階にある。

阪大（研究分担者：橋本亮太准教授）から提供していただいた気分障害患者のサンプルを用いた網羅的メタボローム解析により、幾つかの有用な判別分子を見出しており、わずか 3, 4 種類の分子で疾患を判別できるアルゴリズム作製に成功している。

(2) 尾崎のグループは、新たに統合失調症患者と健常者各 30 例の独立サンプル群を対象に 8 分子の発現変化の再確認を実施し、3 分子について再現性が確認された。統計モデルの予測性能について検証したところ、4 変数モデル、6 変数モデルともに再現性が高く、なかでも 2 分子が有力な因子であることが確認され

た（特願 2012-228417、PCT/JP2013/076918）。企業との診断キット共同開発に関する契約を締結し、末梢バイオマーカーとしての検証に着手している。

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から、39 種類の候補分子を同定し、双極性障害の候補分子として有力な 14 種類について Western blotting 法による発現量再確認の検討に着手している。

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 LCL から total RNA を抽出・精製し、品質を確認した後に Exon Array による網羅的発現解析を実施した。さらに、既存の統合失調症患者と健常者各 10 例の Exon Array のデータを加え、各群間の発現変化について統計学の専門家に解析を依頼している。

(3) 国立精神神経医療研究センターでは、脳脊髄液中の 1129 分子のタンパク質解析を行ったところ、うつ病で顕著に亢進ないし低下している分子、うつ病の一部症例で異常値（健常対照者の 5~95 パーセンタイルを正常として）を示す分子、重症度（HAMD）と相関する分子など、うつ病のバイオマーカーとして利用できる可能性のある候補分子を 32 個選択した。この中には Fibrinogen（うつ病のみで、異常高値を 7 例含み、HAMD と相関していた）のように、中枢神経系だけでなく血液

中にも多く存在する分子も含まれていた。うつ病の Fibrinogen 高値群は、正常値群と比べ高年齢で身体的な不安が強い傾向があった。この他に双極性障害のマーカー候補分子を 12 個、統合失調症のマーカー候補分子を 35 個も選択した。

(4) 理研では、メタボローム解析を行い、現在解析中であり、結果が得られ次第、これまでに施行してきた動物モデルにおける結果と比較対照して検討を行う予定である。

死後脳研究においては、ADAR2 (Adenosine deaminase acting on RNA 2) 発現の減少が認められ、ADAR2 の発現低下は AMPA 型グルタミン酸受容体の R/G サイトの RNA 編集率の低下と関連していることを見いだした。

また、レトロトランスポゾン LINE1 のコピー数が、統合失調症では確実に増加しており、双極性障害でも同様の増加傾向が見られた。

(5) 阪大グループでは、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 85 例、双極性障害 45 名、健常者 565 名、統合失調症 153 例、広汎性発達障害 65 例である。

この中から、うつ病、双極性障害、健常者、統合失調症に関して、年齢、性別が一致した 40 例のサンプルセットを作成した。男性 14 例、女性 26 例のうつ病 (54.9±13.3 歳)、双極性障害 (55.7±13.1 歳)、健常者 (54.7±5.7 歳)、統合失調症 (54.7±12.9 歳) である。このサンプルを用いて、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 Epidermal growth factor (EGF)、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、Soluble TNF α receptor II (TNF- α)、Myeloperoxidase (MPO)、Alpha 1 antitrypsin の血漿中の濃度を HC40 例、MDD40 例、BPI40 例、SCZ40 例のサンプルセットで測定し、マーカーとしての有用性を検証した。その結果、EGF、BDNF、TNF- α 、MPO について、気分障害にて、健常者や統合失調症との違いが認められた (下図)。

また、本サンプルは、九州大学に送付し、メタボロミクス解析に用いていただいております。非常に興味深い結果が出ているとのことである。

Micro RNA については、測定系の検討を行い、miR142-5p、miR148b、miR20b、miR20a、miR34b、miR34a について、測定系を立ち上げた。今後、4 グループ、40 サンプルのサンプルを用いて、検討する予定である。

(6) 千葉大グループでは、児童思春期の気分障害患者については、8 歳から 17 歳までのうつ病エピソード患者 (合計 37 例、うち薬物治療群 14 例、未治療群 23 名) および健常コントロール群 (7 歳から 17 歳) の 25 例の血清サンプルの pro-BDNF、mature-BDNF、MMP-9 (マトリックスメタロプロテイナーゼ-9 : pro-BDNF から mature BDNF への変換を行う酵素) の測定を ELISA 法により行った。

うつ病エピソードのうち薬物治療群の mature-BDNF、MMP-9 は未治療群と比較し、いずれも有意に高値であり、また薬物治療群のうち pro-BDNF 高値となる対象者が数名存在

した。現在までに、20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。来年度は、九大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、グループ間のデータをつきあわせながら、最も適切な気分障害のバイオマーカー検索を進めてゆく。

尾崎らの研究からは、統合失調症、健常者のプロテオーム解析より有力な統計モデルの構築、末梢バ

イオマーカーとしての有用性検証に着手している。現状として、サンプルサイズが少なく、規模の拡大と外部データ検証の再検を重ね、判別モデルの信頼性・再現性の確認を行う必要があると考えられる。また、他の疾患におけるマーカーの挙動を確認し、疾患特異性を検証することも重要である。

一方、統合失調症、双極性障害、健常者のプロテオームの解析から、双極性障害特異的なバイオマーカー候補が同定された。再現性、疾患特異性の検証、精神疾患と健常者の判別モデルの構築を進めることにより、両疾患の鑑別の一助となる可能性がある。

また、トランスクリプトーム解析については、得られるデータ量が大きく、統計学的により有力な候補遺伝子を絞り込める必要がある。

統計解析の結果から候補遺伝子群について定量的 PCR 法により発現変化を再確認し、統計モデル構築、外部データ検証を重ねて遺伝子マーカーとしての有用性検証を実施する必要がある。

本研究より得られたマーカーを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。一方、同定された候補分子・候補遺伝子について、病因・病態への関連性を検証し、分子生物学的意義を解明することも重要と考えられる。

NCNPの服部らの研究からは、今回の解析で得られた候補分子の多くは、これまでに報告がないものであり、中枢神経系に近い脳脊髄液で得られたことから、うつ病の脳病態に関与している可能性も考えられた。ただし、測定の実現性の確認と前向きな検証が必要であると考えられた。

また、血漿 Fibrinogen 値については、心血管障害等のうつ状態と相関するという報告や、ストレスにより上昇するという報告が複数みられるが、脳脊髄液中の測定は見当たらない。本研究では、Fibrinogen 高値が、うつ病の一部症例において中枢神経系にも生じていること示唆していた。動物実験では Fibrinogen の脳内への注入が軸索の損傷を引き起こすという報告もあり、脳脊髄液中の Fibrinogen 高値が脳の機能異常に関与する可能性もあると考えられた。

橋本らの研究では、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。さらに、これらのサンプルを用いて、Epidermal growth factor (EGF)、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、Soluble TNF α receptor II (TNF- α)、Myeloperoxidase (MPO)、Alpha 1 antitrypsin を測定した。これらは、先行研究では、うつ病に関して、BDNF 以外についてはすべて違いが出ていたが、再現されたのは一部であった。また、新たに双極性障害や統合失調症においても、発現異常が認められたことは、意義ある所見と思われる。今後、新たなサンプルを収集して、再現性を確認していく必要があると思われる。

清水らの研究では、児童思春期のうつ病エピソード患者をさらに幅広く研究の協力を募り、症例の蓄積を進め、平成 26 年度には、pro-BDNF、mature BDNF、MMP-9 の結果解析をすすめて、論文発表する。またさらに高感度の pro BDNF ELISA Kit を用いて、測定を行う予定である。個人認知行動療法に関しては、30 例程度の症例の収集を行い、介入前後での pro-BDNF、mature BDNF、MMP-9 の測定を行う。

さらに、児童思春期の女性に多い摂食障害患者において、血清 BDNF が低下していることを報告してきたので、摂食障害患者におけるうつ症状、認知機能障害と血清 BDNF について、平成 26 年度の重要課題として検討を加える。倫理委員会の承認のもと、対象者には、本研究の主旨についてインフォームド・コンセントを得た 18 歳～35 歳の女性で、DSM-IV-TR の診断基準に基づいてリクルートを行う。神経

性無食欲症患者群、神経性大食症患者群、健康者群 (BMI が 19-26kg/m²で、精神疾患の既往歴及び家族歴がない者) をそれぞれ 20 名ずつ 3 群の計 60 名を対象とし、提供された血液サンプルを ELISA により血清 BDNF を測定、さらにうつ症状、認知機能 (Iowa Gambling Task (決断能力)、Wisconsin Card Sorting Test (認知の柔軟性)、Stroop Test (認知の柔軟性) との関連を検討する予定である。

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 神経と iMG ミクログリア細胞の解析を可能にしている。血液のメタボローム解析において、疾患分類のための候補分子の同定に成功している。小児期のうつ病や認知行動療法の治療反応性において、pro BDNF や mature BDNF、MMP-9 が関与している可性を検討する。

拠点形成による気分障害研究の推進により、新たな気分障害のバイオマーカー開発が可能となり、気分障害の早期発見・早期介入が可能となり、最終的には、こうした成果により国民の医療・精神医療の発展が大きく期待される。

F. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

加藤隆弘, 扇谷昌宏, 神庭重信: Method of producing microglial cells. (整理番号: P13-0218, 特願: 2014-002129) 特許出願日 2014. 1. 9.

尾崎紀夫, 永井拓, 平川晃弘, 國本正子, 吉見陽, 松本友里恵, 山田真之亮: 統合失調症マーカーセット及びその利用. 国立大学法人名古屋大学 特願 2012-228417, PCT/JP2013/76918 (リンパ球を用いた統合失調症の診断キット開発): 2012. 10. 15, PCT 出願 2013. 10. 03

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
分担研究報告書

新規ツールによる気分障害バイオマーカー検索システムの構築

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・特任准教授）

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經由し、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、健診でも有用な血液バイオマーカーの開発を目指す。

初年度、我々は、気分障害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、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きた。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）を作製し、本神経の特性もバイオマーカー候補として測定してきた。本年度は、ヒト血液由来の直接誘導ミクログリア（induced microglial cells; iMG 細胞）の作製に成功したため、近年話題になっている脳内免疫系の異常に関しても、末梢血由来細胞から解析できるシステムを開発した。並行して、阪大から提供していただいた気分障害患者の血清サンプルを用いて、ノンターゲットによる網羅的メタボローム解析を実施し、健常者、大うつ病患者及び双極性障害を判別しうる候補分子を幾つか見出した。来年度は、九大でのサンプル・データ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、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經由し、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; iPS) 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、iPS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している（対象の被験者全員に同意説明行い、文書にて同意を得ている）。

24年度には、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創出のため、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目指している。

本年度は、iN 神経に加えて、我々独自でヒト血液由来の直接誘導ミクログリア細胞 (induced microglial cells; iMG 細胞) 作製システムを開発した（特願済）。近年気分障害の病態生理においてミクログリアを中心とした脳内免疫系異常が示唆されており、開発した iMG 細胞を気分障害患者の血液から作製・解析することで、それぞれの患者の脳内免疫系異常に関しても、末梢血採取により解析できるようになった。

他方、我々は、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、血液の網羅的メタボローム解析システムを構築している。

C. 研究結果

現在まで関連医療機関を含め約 150 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。

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 iN 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。iMG ミクログリア細胞に関しては、双極性障害患者において特性を評価している段階にある。

阪大（研究分担者：橋本亮太准教授）から提供していただいた気分障害患者のサンプルを用いた網羅的メタボローム解析により、幾つかの有用な判別分子を見出しており、わずか3, 4種類の分子で疾患を判別できるアルゴリズム作製に成功している。

D. 考察

来年度は、九大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 神経と iMG ミクログリア細胞の解析を可能にしている。血液のメタボローム解析において、疾患分類のための候補分子の同定に成功している。本拠点による気分障害研究により、新たな気分障害のバイオマーカー開発が可能となり、気分障害の早期発見・早期介入が可能となり、最終的には、こうした成果により国民の医療・精神医療の発展が大きく期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Hayakawa K, Kato TA, Kojiro M, Monji A, Kanba S: Minocycline, a microglial inhibitor, diminishes terminal patients' delirium? American Journal of Geriatric Psychiatry, 22(3), 314-315, 2014
- ・ Watabe M, Kato TA, Tsuboi S, Ishikawa K, Hashiya K, Monji A, Utsumi H, Kanba S: Minocycline, a microglial inhibitor, reduces 'honey trap' risk in human economic exchange. Scientific Reports 3, 1685, 2013
- ・ Kato TA, Balhara YPS, Chawla JM, Tateno M, Kanba S: Undergraduate medical students' attitudes toward psychiatry: an international cross-sectional survey between India and Japan. International Review of Psychiatry, 25 (4), 378-384, 2013
- ・ Seki Y, Kato TA, Monji A, Mizoguchi Y, Horikawa H, Sato-Kasai M, Yoshiga D, Kanba S: Aripiprazole and minocycline, but not haloperidol, suppress oligodendrocyte damage from interferon- γ -stimulated microglia in co-culture model. Schizophrenia Research, 151(1-3), 20-28, 2013
- ・ Fujisawa D, Suzuki Y, Kato TA, Hashimoto N, Sato R, Aoyama-Uehara K, Fukasawa M, Tomita M, Watanabe K, Kashima H, Otsuka K: Suicide intervention skills among medical residents. Academic Psychiatry, 37(6):402-407, 2013

- Umene-Nakano W, Kato TA, Kikuchi S, Tateno M, Fujisawa D, Hoshuyama T, Nakamura J: Nationwide Survey of Work Environment, Work-Life Balance and Burnout among Psychiatrists in Japan. 8(2): e55189, 2013
 - Kato TA, Kanba S: Are microglia minding us? Digging up the unconscious mind-brain relationship from a neuropsychanalytic approach. Frontiers in Human Neuroscience, 7, 13, 2013
 - Kato TA, Hayakawa K, Monji A, Kanba S : Missing and Possible Link between Neuroendocrine Factors, Neuropsychiatric Disorders and Microglia. Frontiers in Integrative Neuroscience, 7: 53, 2013
 - Kato TA, Watabe M, Kanba S: Neuron-glia interaction as a possible glue to translate the mind-brain gap: A novel multi-dimensional approach toward psychology and psychiatry. Frontiers in Psychiatry (Frontiers in Neuropsychiatric Imaging and Stimulation), 4, 139, 2013
 - Monji A, Kato TA, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, Yamauchi Y, Yamada S, Kanba S: Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 42, 115-121, 2013
 - Isomura S, Monji A, Sasaki K, Baba S, Onitsuka T, Ohara T, Mizoguchi Y, Kato TA, Horikawa H, Seki Y, Kanba S: A case of FTD with catatonia-like signs that temporarily resolved with zolpidem. Neurology: Clinical Practice, 3:354-357, 2013
 - 加藤隆弘, 大塚耕太郎, 鈴木友理子, 藤澤大介, 佐藤玲子, 青山久美, 橋本直樹, 鈴木志麻子, 神庭重信: こころの応急対応 (メンタルヘルス・ファーストエイド)―日常臨床場面における、うつ病の早期介入と自殺予防―. 臨床と研究, 91(2), 289-294, 2014
 - 加藤隆弘, 神庭重信: ミクログリアと精神疾患. 生命の科学, 65(1), 37-42, 2014
 - 早川宏平, 加藤隆弘, 神庭重信: 精神免疫学から見た身体疾患と精神疾患の生物学的共通基盤. 精神科治療学, 29(2), 171-178, 2014
 - 加藤隆弘, 館農勝, 新福尚隆, 神庭重信: ひきこもりに関する初の国際共同調査の紹介: ひきこもりは海外にも存在するのか? 精神神経学雑誌, SS529-SS540, 2013
 - 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? ―. 臨床精神病理, 34 (2), 233-240, 2013
 - 大塚耕太郎, 鈴木友理子, 藤澤大介, 加藤隆弘, 佐藤玲子, 青山久美, 橋本直樹, 鈴木志麻子, 黒澤美枝: Mental Health First Aid-Japan チームの活動について. 精神神経学雑誌, 115(7), 792-796, 2013
- 2.学会発表
- Kato TA, Kanba S: Neuroleptics as a modulator of microglial inflammatory/oxidative stress response from both in vitro and in vivo studies. Symposium of "Molecular Mechanisms of Neuroleptic Action" (Organized by Cascella NG & Sawa A), 14th International Congress on Schizophrenia Research, 2013.4.15-20, JW Marriott Orlando Grande Lakes, Florida, USA

- Kato TA, Nagahara Y (Co-organizers): International Symposium 4 - "International Case Discussion of Japan's Modern Depression (I) Sociocultural Background and Diagnosis", The 109th Annual Meeting of the Japanese Society of Psychiatry and Neurology, 2013.5.24, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka
- Kato TA, Watabe M, Kanba S: Microglial contribution to psychological development and psychosocial activities. Symposium of "Brain-immune interaction in psychopathology and psychological development" (Organized by Mueller N & Kato TA), The 11th World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP), 2013.6.25, Kyoto, Japan
- Horikawa H, Kato TA, Yamauchi Y, Hayakawa K, Sato-Kasai M, Mizoguchi Y, Seki Y, Monji A, Kanba S: Microglia and depression from psychopharmacological perspective. Symposium of "Immune system: The bridge between brain and mental disorders (Organized by Mueller N & Horikawa H)", 11th World Congress of Biological Psychiatry, 2013.6.27, Kyoto, Japan
- Ohgidani M, Kato TA, Kanba S: Antipsychotics and minocycline as a possible modulator of microglial inflammatory/oxidative stress response in schizophrenia. 4th European Conference on Schizophrenia Research, 2013.9.27, Berlin, Germany
- Kato TA: Translational research to dig up the mind-brain gap. The 14th Korea- Japan Young Psychiatrists' Conference (KJYPC), 2013.10.17, Park Hyatt Hotel, Busan, Korea
- Kato TA, Yamato M, Shiba T, Mine T, Seki Y, Ohgidani M, Sagata N, Yamauchi Y, Mizoguchi Y, Yamada K, Monji A, Kanba S: A single minocycline administration suppresses methamphetamine-induced behavioral sensitization in mice. The 43th Society for Neuroscience Annual Meeting, 2012.11.10, San Diego, USA
- 加藤隆弘, 関善弘, 兵藤文紀, 門司晃, 神庭重信: 統合失調症における神経グリア関連の異常と、その修復薬としてのアリピプラゾールの可能性. 第9回ドパミンパーシャルアゴニスト(DPA)研究会, 2013.2.2, ホテルラフォーレ東京, 東京
- 加藤隆弘, 鈴木志麻子: 平成24年度自殺対策関係者研修会 (メンタルヘルス・ファーストエイド研修). 2013.2.13, 鹿児島県精神保健福祉センター, 鹿児島市
- 加藤隆弘: こころの応急対応 (メンタルヘルス・ファーストエイド) 一日常臨床場面における、うつ病の早期介入と自殺予防- 筑紫医師会学術講演会, 2013.5.16, 筑紫医師会館, 筑紫野市, 福岡
- 加藤隆弘: 集団精神療法の基礎-グループの基本的観点-. ワークショップ5「グループ療法の基本と応用」, 第109回日本精神神経学会総会, 2013.5.23, 福岡サンパレスホテル&ホール, 福岡
- 早川宏平, 加藤隆弘, 神代正臣, 神庭重信: 抗生物質ミノサイクリン投与によりせん妄が改善した一例. 第109回日本精神神経学会, 2013.5.24, 福岡国際会議場, 福岡
- 加藤隆弘, 渡部幹, 神庭重信: 社会的相互性と信頼ゲーム: ミクログリア仮説に基づく神経