

精神分析的接近. トピックフォーラム 18「各種ゲームと社会適応能力」, 第 109 回日本精神神経学会学術総会, 2013.5.25, 福岡サンパレスホテル&ホール, 福岡

・加藤隆弘: 気分障害と糖尿病のクロストークとその病態基盤. 精神疾患と糖尿病研究会, 2013.5.29, ホテルオークラ, 福岡

・加藤隆弘: 脳内酸化ストレス反応を介した精神疾患の病態・治療機序の解明. 第 7 回九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点フォーラム, 2013.6.4, イイノホール&カンファレンスセンター, 千代田区, 東京

・加藤隆弘, 鈴木志麻子, 佐藤玲子: サイコロジストに役立つ、こころの応急対応 (メンタルヘルス・ファーストエイド). 神奈川大学特別講義, 2013.6.8, 神奈川大学, 横浜, 神奈川

・加藤隆弘, 神庭重信: ミクログリア仮説に基づく気分障害の病態解明に向けたアプローチ. シンポジウム「気分障害におけるグリアの異常」, Neuro 2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会 合同大会) 2013.6.22, 国立京都国際会館, 京都

・加藤隆弘: フロイトの欲動理論と融合脳科学ー ミクログリアは無意識的欲動の起源か? ー. 鹿児島県精神科学術講演会, 2013.9.14, 城山観光ホテル, 鹿児島

・加藤隆弘: 認知症・気分障害の神経免疫病態仮説と糖尿病の関与, 第 3 回 Endocrine and Diabetes Expert Meeting, 2013.8.5, 福岡武田ビル, 福岡

・早川宏平, 加藤隆弘, 神代正臣, 神庭重信: 終末期癌患者のせん妄に対して抗生物質ミノサ

イクリンが著効した 2 例. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 2013.10.24, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄

・佐方功明, 加藤隆弘, 大和真由美, 芝武志, 峰宝, 関善弘, 扇谷昌宏, 山田健一, 門司晃, 神庭重信: メタンフェタミン投与マウスの逆耐性現象に対するミノサイクリン単回投与の抑制効果. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 2013.10.25, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄

・加藤隆弘: 精神神経疾患におけるミクログリアに焦点付けた橋渡し研究. 第 7 回川棚神経科学の会, 2013.12.7, 長崎川棚医療センター, 長崎県川棚町

・加藤隆弘: フロイトのエネルギー経済論を現代の融合脳科学で解明するーミクログリアは無意識的欲動の起源か?ー. 基調講演, 第 17 回実験社会科学カンファレンス, 2013.12.23, 高知工科大学, 香美市, 高知

・加藤隆弘: フロイトの欲動理論とミクログリアー融合社会脳科学研究ー. 第五回先端精神医学セミナー, 2014.2.12, 肥前精神医療センター, 吉野ヶ里町, 佐賀

・加藤隆弘: 安心して相談支援にのぞむためにー相談支援における「メンタルヘルス・ファーストエイド」の理解と活用ー. 北九州市立精神保健福祉センター主催・平成 25 年度自殺対策支援者研修会, 2014.2.26, 北九州市総合保健福祉センター「アシスト 2 1」, 北九州市

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む。)

1. 特許取得

・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.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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  
分担研究報告書

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 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。

#### 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様細胞株

(LCL) のオミックス解析 (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 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。

## C. 研究結果

これまで、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、22 種類の候補分子を同定し (特願 2010-147017)、Western blotting 法により 8 種類の分子について有意な発現変化を再確認した。さらに、統合失調症患者群と健常者群を 4 ないし 6 種類の分子で予測する統計モデルを見出してきた。

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。

## D. 考察

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む必要がある。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、精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。

## E. 結論

網羅解析により客観的なバイオマーカーの

可能性が見出され、今後の検証により生化学的な診断方法が確立すれば、精神疾患の診断が容易となり、誤診の低減に加えて早期発見・早期治療を可能にし、病勢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

### 1. 論文発表

1. Shiino T, Koide T, Kushima I, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Aleksic B, Banno M, Kikuchi T, Kohmura K, Adachi Y, Kawano N, Okada T, Inada T, Ujike H, Iidaka T, Suzuki M, Iwata N, Ozaki N: Common variants in bcl9 gene and schizophrenia in a Japanese population: Association study, meta-analysis and cognitive function analysis. *J Med Biochem* 32 (4):351-357, 2013
2. Sasada K, Iwamoto K, Kawano N, Kohmura K, Yamamoto M, Aleksic B, Ebe K, Noda Y, Ozaki N: Effects of repeated dosing with mirtazapine, trazodone, or placebo on driving performance and cognitive function in healthy volunteers. *Hum Psychopharmacol* 28 (3):281-6, 2013
3. Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, Seshadri S, Hikida T, Matsumoto Y, Cascella NG, Kano S, Ozaki N, Nabeshima T, Sawa A: Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. *Science* 339 (6117):335-9, 2013
4. Miyata S, Noda A, Iwamoto K, Kawano N, Okuda M, Ozaki N: Poor sleep quality impairs cognitive performance in older adults. *J Sleep Res* 22 (5):535-41, 2013
5. Kohmura K, Iwamoto K, Aleksic B, Sasada K, Kawano N, Katayama H, Noda Y, Noda A, Iidaka T, Ozaki N: Effects of sedative antidepressants on prefrontal cortex activity during verbal fluency task in healthy subjects: a near-infrared spectroscopy study. *Psychopharmacology (Berl)* 226

(1):75-81, 2013

6. Kawano N, Awata S, Ijuin M, Iwamoto K, Ozaki N: Necessity of normative data on the Japanese version of the Wechsler Memory Scale-Revised Logical Memory subtest for old-old people. *Geriatr Gerontol Int* 13 (3):726-30, 2013
  7. Iwamoto K, Kawano N, Sasada K, Kohmura K, Yamamoto M, Ebe K, Noda Y, Ozaki N: Effects of low-dose mirtazapine on driving performance in healthy volunteers. *Hum Psychopharmacol* 28 (5):523-8, 2013
  8. Aleksic B, Kushima I, Ohye T, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Koide T, Iritani S, Kurahashi H, Iwata N, Ozaki N: Definition and refinement of the 7q36.3 duplication region associated with schizophrenia. *Sci Rep* 3 2587, 2013
  9. Aleksic B, Kushima I, Hashimoto R, Ohi K, Ikeda M, Yoshimi A, Nakamura Y, Ito Y, Okochi T, Fukuo Y, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Ujike H, Suzuki M, Inada T, Takeda M, Kaibuchi K, Iwata N, Ozaki N: Analysis of the VAV3 as Candidate Gene for Schizophrenia: Evidences From Voxel-Based Morphometry and Mutation Screening. *Schizophr Bull* 39 (3):720-8, 2013
- ### 2. 学会発表
1. 野田 幸弘, 毛利 彰, 松本 友里恵, 肥田 裕, 鍋島 俊隆, 久島 周, 吉見 陽, 尾崎 紀夫: 統合失調症モデル動物におけるニコチンの役割 統合失調症におけるニコチン関連遺伝子との関係. 日本アルコール・薬物医学会 2013
  2. 谷口 将, 鶴飼 麻, 肥田 裕, 長谷川 章, 森 健, 山田 清, 鍋島 俊, 尾崎 紀夫, 毛利

- 彰, 野田 幸: 幼若期マウスへの社会敗北ストレス負荷による社会性行動障害と神経新生低下におけるグルココルチコイドの関与. 日本薬理学学会 2013
3. 岩本邦弘, 野田明子, 阪野正大, 河野直子, 尾崎紀夫: ヒトおよび動物における睡眠時非侵襲的記録の最前線精神疾患における感圧センサシートによる睡眠時生体信号測定の臨床的意義. 第 38 回日本睡眠学会定期学術集会 シンポジウム 秋田, 2013
4. 尾崎紀夫: ランチョンセミナー: 妊産婦のうつ病の理解とその対応: 前向きコホート研究の成果から. 日本臨床精神神経薬理学会・神経精神薬理学会合同年会 沖縄, 2013
5. 尾崎紀夫: 精神疾患を性差の観点から考える: 妊産婦のうつ病と摂食障害を中心に. 社会神経科学研究会 生理研, 2013
6. 尾崎紀夫: 早期診断シンポジウム: 周産期リエゾン精神医学における気分障害の早期診断. 日本精神科診断学会 大津, 2013
7. 尾崎紀夫: 社会参加を目指したうつ病治療の留意点—presenteeism の解消. うつ病リワーク研究会年次研究会ランチョンセミナー 東京, 2013
8. 尾崎紀夫: No mental health without physical health-統合失調症診療における身体的側面-. 第 7 回日本統合失調症学会: ランチョンセミナー 浦河, 2013
9. 尾崎紀夫: 不安障害の治療計画策定-診断と評価の重要性. 不安障害学会 札幌, 2013
10. 尾崎紀夫: 双極性障害への心理教育的アプローチ: 我々が知るべきこと、伝えるべきこと. 第 109 回日本精神神経学会学術総会教育講演 福岡, 2013
11. 尾崎紀夫: 出産後の気分障害: 妊産婦を対象とした前向きコホート研究結果から. 第 6 回性差医学・医療学会 シンポジウム 脳科学から見た性差医学・医療 仙台, 2013
12. Mako Morikawa, Okada, T, Chika Kubota, Branko Aleksic, Ozaki N: Reliability and validity of Social Support Questionnaire in Japanese women in pregnancy and postpartum periods. WFSBP2013KYOTO Congress 京都, 2013
13. Kubota C, Aleksic B, Ando M, Ozaki N: Factor structure of the Japanese version of the Edinburgh Postnatal Depression Scale in postpartum period. WFSBP Kyoto, 2013
14. Chenyao Wang, Hiroki Kimura, Takayoshi Koide, Masahiro Banno, Jingrui Xing, Shohko Kunimoto, Akira Yoshimi, Itaru Kushima, Branko Aleksic, Ozaki N: Novel rare variants in F-box protein 45 (FBXO45) in schizophrenia. WFSBP2013KYOTO Congress 京都, 2013
15. Banno M, Koide T, Aleksic B, Okada T, Kikuchi T, Kohmura K, Adachi Y, Kawano N, Iidaka T, Ozaki N: Wisconsin card sorting test scores and clinical and sociodemographic correlates in schizophrenia: Multiple logistic regression analysis. WFSBP Congress 2013: ポスター発表 Kyoto, 2013

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
・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
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
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  
分担研究報告書

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

研究分担者 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)

## 研究要旨

本研究の目的は、うつ病のバイオマーカーを開発することである。今年度はうつ病、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。

### A. 研究目的

本研究課題の最終目標は、うつ病の血液バイオマーカーの開発・実用化であるが、本分担課題では、その候補分子を得るため、より脳に近い脳脊髄液を用いた探索を行うことにした。

脳脊髄液は脳組織と連続しているため脳由来の物質を多く含んでおり、他の臓器との接触が少なく影響を受けにくい。このため、脳疾患の分子病態を、より良く反映していると考えられる。我々は、これまでに500検体以上の精神疾患の脳脊髄液を研究目的で収集してきた。これらの脳脊髄液を用い、うつ病のバイオマーカー探索を目標とした。

### B. 研究方法

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。

### C. 研究結果

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。

### D. 考察

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、測定の再現性の確認と前向きの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。

#### E. 結論

脳脊髄液中で、うつ病をはじめとする精神疾患の有望なマーカー候補が複数得られた。今後、ELISAの別の解析法、独立した別の症例を用いて前向きに検証するとともに、再現の確認できた分子については血液検体（脳脊髄液と同時に採取されている）でも解析する予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sasayama D, Hori H, Yamamoto N, Nakamura S, Teraishi T, Tatsumi M, Hattori K, Ota M, Higuchi T, Kunugi H. ITIH3 polymorphism may confer susceptibility to psychiatric disorders by altering the expression levels of GLT8D1. *Psychiatry Clin Neurosci*. Epub 2013
- 2) Sasayama D, Hori H, Teraishi T, Ota M, Hattori K, Matsuo J, Kinoshita Y, Ishida I, Nagashima A, Koga N, Higuchi T, Kunugi H. Psychological coping in depressed outpatients: association with cortisol response to the combined dexamethasone/CRH test. *J Affect Disord*. 152-154:441-7, 2014
- 3) Sasayama D, Hori H, Nakamura S, Miyata R, Teraishi T, Hattori K, Ota M, Yamamoto N, Higuchi T, Amano N, Kunugi H. Identification of single nucleotide polymorphisms regulating peripheral blood mRNA expression with genome-wide significance: an eQTL study in the Japanese population. *PLoS One*. 8:e54967, 2013

##### 2. 学会発表

###### (1) 国際学会

- 1) Yoon HS, Hattori K, Sasayama D, Kunugi H: The change of Cocaine- and

amphetamine-regulated transcript (CART) peptide levels in human cerebrospinal fluid (hCSF) of major depressive disorder (MDD) and the role of CART to modulate basal anxiety-related behaviors in rats. Society For Neuroscience, San Diego, USA, 11.9-13, 2013

(2) 一般学会

1) 服部功太郎、篠山大明、吉田寿美子、功刀浩: うつ病患者における脳脊髄液fibrinogen濃度の上昇, 第32回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、熱海、11.22-23, 2013

2) 服部功太郎、篠山大明、寺石俊也、藤井崇、吉田寿美子、有馬邦正、功刀浩: 統合失調症、気分障害の脳脊髄液中モノアミン代謝産物の解析、Neuro2013、京都、6.20-23, 2013

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  
分担研究報告書

双極性障害のバイオマーカー候補同定

研究分担者 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)

## 研究要旨

双極性障害は、遺伝的基盤を元に発症し、躁状態、うつ状態を繰り返す疾患である。初発のうつ状態では、うつ病と診断する他ないが、双極性障害では抗うつ薬により悪化する可能性があることから、双極性障害を診断するバイオマーカーの開発を行う必要がある。本研究では、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。

### A. 研究目的

双極性障害は、一卵性双生児の一致率が約80%と高く、遺伝要因がその発症に大きく関与することが明らかにされている。

我々はこれまで、一卵性双生児不一致例における遺伝子関連解析、エピゲノム解析により、双極性障害関連分子の同定を目指してきた。

### B. 研究方法

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)ー質量分析あるいは高速液体クロマトグラフィー(LC)ー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。

### C. 研究結果

メタボローム解析については、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。

### D. 考察

血漿バイオマーカーについては、平成26年度中に双極性障害患者のうつ状態と寛解期、および一卵性双生児不一致例の解析を進め、動物実験の結果と比較して、候補を絞り込む予定である。

### E. 結論

双極性障害の血漿バイオマーカー探索を進めた。死後脳における双極性障害のバイオマーカー探索を行った。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

原著論文

Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Bundo M, Kato T. A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia. *Mol Brain*. 2014 Jan 21;7(1):5

Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T,

Kato T, Iwamoto K. Increased 11 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron*. 2014 Jan 22;81(2):306-13.

Mehta D, Iwamoto K, Ueda J, Bundo M, Adati N, Kojima T, Kato T. Comprehensive survey of CNVs influencing gene expression in the human brain and its implications for pathophysiology. *Neurosci Res*. 2013 Nov 6.

#### 総説論文

Kato T, Iwamoto K. Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders. *Neuropharmacology*. 2014 Jan 2.

Sugawara H, Bundo M, Ishigooka J, Iwamoto K, Kato T. Epigenetic regulation of serotonin transporter in psychiatric disorders. *J Genet Genomics*. 2013 Jul 20;40(7):325-9.

#### 2 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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

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

分担研究者 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）

研究協力者 佐々木 剛

（千葉大学大学医学部附属病院 こどものこころ診療部）

研究協力者 松木 悟志

（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）

#### 研究要旨

我々は、児童思春期のうつ病エピソード（ICD-10）の補助診断に有用な血液バイオマーカーを開発するために、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。

#### A. 研究目的

脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor：BDNF）は、うつ病の病因に重要な役割を果たしていることを示唆するデータが示されてきた（Nestler et al., 2002）。我々は、未治療うつ病患者の血清 BDNF 濃度が、健常者と比較して有意に減少している一方で、抗うつ薬治療中のうつ病患者では、健常者と同レベルであることを報告した

（Shimizu et al., 2003）。児童・思春期に発症する大うつ病性障害の頻度は、時点有病率が7～12歳では一般人口の1～2%、13歳から18歳では1～7%とされているが、成人の大うつ病性障害に比べて、診断が困難で、見逃されやすい点が強調されている。最近、我々は、男児うつ病では血清 BDNF が低下することを世界で初めて報告したが、現在、児童思春期の気分障害（大うつ病性障害および双極性障

害)の補助診断に有用な血液バイオマーカーを開発するために、構造化面接法(小児・青年用)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、さらに血液サンプル収集をすすめていくこととした。

また、大うつ病性障害に関しては、薬物療法と認知行動療法が、同等の有効性を有するというエビデンスが蓄積されてきているが、どのような患者に対して、薬物療法が有効であり、どのような患者に対して、認知行動療法が有効であるかといった、治療反応性に対するバイオマーカーの検討は進んでいない。そこで、我々は、成人の気分障害に対する認知行動療法の介入前後で症状改善とともに変化する血液バイオマーカーを探索し、認知行動療法の反応性を予測しうるかを検討することとした。

## B. 研究方法

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—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

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

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、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、健常者群 (BMI が 19-26kg/m<sup>2</sup>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

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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Niitsu T, Ishima T, Yoshida T, Hashimoto T, Matsuzawa D, Shirayama Y, Nakazato M, Shimizu E, Hashimoto K, Iyo M. A positive correlation between serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor and negative symptoms in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2013 Dec 14. pii: S0165-1781(13)00772-5.
2. Sutoh C, Nakazato M, Matsuzawa D, Tsuru K, Niitsu T, Iyo M, Shimizu E. Changes in self-regulation-related prefrontal activities in eating disorders: a near infrared spectroscopy study. *PLoS One.* 2013;8(3):e59324. doi: 10.1371.
3. Sasaki T, Hashimoto K, Tachibana M, Kurata T, Okawada K, Ishikawa M, Kimura H, Komatsu H, Ishikawa M, Hasegawa T, Shiina A, Hashimoto T, Kanahara N, Shiraishi T, Iyo M. Tipeptide in children with attention deficit/hyperactivity disorder: a 4-week, open-label, preliminary study. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014 Jan 24;10:147-51.
4. Sasaki T, Hashimoto K, Okawada K, Tone J,

- Machizawa A, Tano A, Nakazato M, Iyo M. Ifenprodil for the treatment of flashbacks in adolescent female posttraumatic stress disorder patients with a history of abuse. *Psychother Psychosom.* 2013;82(5):344-5.
5. Hashimoto K, Sasaki T, Kishimoto A. Old drug ifenprodil, new hope for PTSD with a history of childhood abuse. *Psychopharmacology (Berl).* 2013 May;227(2):375-6.
6. Okita, K., Kobori, O., Sasaki, T., Nakazato, M., Shimizu, E., and Iyo, M. Cognitive behavioural therapy for somatoform pain disorder in adolescents: a case study. *Asia Pacific Journal of Counselling and Psychotherapy.* 2013, 4(2), 109-115
7. Ishikawa R, Kobori O, Shimizu E. Unwanted sexual experiences and cognitive appraisals that evoke mental Contamination. *Behavioural & Cognitive Psychotherapy* 2013 Aug 7:1-15
8. Tomizawa H, Matsuzawa D, Matsuda S, Ishii D, Sutoh C, Shimizu E. A Transient Fear Reduction by Pair-Exposure with a Non-Fearful Partner during Fear Extinction Independent from Corticosterone Level in Mice. *Journal of Behavioral and Brain Science,* 2013, 3, 415-421.
9. Kanahara N, Yoshida T, Yoshida T, Oda Y, Yamanaka H, Moriyama T, Hayashi H, Shibuya T, Nagaushi Y, Sawa T, Sekine Y, Shimizu E, Asano M, Iyo M. Onset Pattern and Long-Term Prognosis in Schizophrenia: 10-Year Longitudinal Follow-Up Study *PLoS One,* 2013; 8(6):e67273.
10. Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, Tomizawa H, Sajiki J, Shimizu E. Perinatal exposure to bisphenol A enhances contextual fear memory and affects the serotonergic system in juvenile female mice. *Hormones and Behavior.* 2013 63(5):709-716.
2. 学会発表
1. Ishikawa R, Kobori O, Shimizu E. Comparing the roles of washing and non-washing behaviour on the mental contamination. *European Association for Behavioural and Cognitive Therapies, Marachu, September, 2013.*
2. Ishikawa R, Kobori O, Komuro H, Shimizu E. The roles of washing and non-washing behaviour on the reduction of mental contamination. *The 4th Asian Cognitive Behavior Therapy (CBT) Conference 2013 Tokyo.*
3. Oshima F, Nishinaka H, Iwasa K, Ito E, Shimizu E. Autism spectrum traits in adults affect the mental health status via early maladaptive schemas. *The 4th Asian Cognitive Behavior Therapy (CBT) Conference 2013 Tokyo.*
4. Nagaoka S, Asano K, Shimizu E. The effect of metaphors in psychoeducation for Cognitive Behavioral Therapy *The 4th Asian Cognitive Behavior Therapy (CBT) Conference 2013 Tokyo, Japan 2013/8/23-8/24*



5. 永田 忍, 志津 雄一郎, 清水 栄司. 寛解期にある大うつ病性障害患者に対する認知行動療法の有効性 第13回日本認知療法学会 帝京平成大学 2013/8/24

Factor in Male Pediatric Patients with Depression. The Open Clinical Chemistry Journal, (4) 28-33

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

#### I. 参考文献

1. Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J. and Monteggia, L.M.. (2002) Neurobiology of depression. *Neuron*, 34: 13-25.
2. Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., and Iyo, M. (2003) Alterations of Serum Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Depressed Patients without or with Antidepressants. *Biol. Psychiatry* 54(1):70-5
3. Sasaki, T., Niitsu, T., Hashimoto, T., Kanahara, N., Shiina, A., Hasegawa, T., Kimura, H., Ishikawa, M., Tone, J., Yamauchi, A., Hosoda, Y., Kunou, M., Takahashi, J., Ishima, T., Fujita, Y., Nakazato, M., Hashimoto, K., and Iyo, M. (2011) Decreased Levels of Serum Brain-Derived Neurotrophic

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

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

研究分担者 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)

### 研究要旨

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。精神疾患の診断は医師が症状を診ることによりなされており、客観的な検査等による診断法は未だ確立しておらず、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。

microRNA(miRNA)は、21-23塩基という比較的小さなNon-coding RNAであり、時空間特異的に生体内で発現し、標的RNAの翻訳抑制を行うとされている。精緻な脳神経回路の制御にかかわっていると考えられ、気分障害をはじめとする様々な精神疾患の死後脳におけるmiRNAの発現異常が報告されており、その病態における役割が想定されている。最近、がんの領域において、血中のmiRNAがバイオマーカーの候補として盛んに研究されるようになり、精神科領域での応用が期待されている。

初年度、我々は、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。

### 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。精神疾患の診断は、医師が症状を診ることによりなされており、客観的な検査等による診断法はいまだ確立したとはいえない。現在、DSM-IVやICD-10による操作的診断法が汎用されるようになってきているが、従来の外因、内因、心因の原因を想定した診断法が実際の臨床場面では有用な場合が少なくない。そこで精神科臨床、精神科以外の診療あるいは健診でも有用な客観的・科学的なバイオマーカーの開発の開発が、待ち望まれている。

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多数の研究が行われてきたが、気分障害の病態を反映することが確実なものとは同定されていない。

一方、末梢サンプルを対象とした研究を行う場合に、見出されたバイオマーカー候補が、他のサンプルにおいても同様の感度や特異度を有するかという再現性の研究が非常に重要である。さらに、より多数のサンプルにおいても確認されることが、臨床応用には必須であると言える。

microRNA(miRNA)は、近年見出されて注目を浴びている21-23塩基という比較的小さなNon-coding RNA（生体内で発現するRNAのうち、タンパクをコードしないRNAの総称）であり、時空間特異的に生体内で発現し、標的RNAの翻訳抑制を行うとされている。その翻訳抑制は、RNAi(RNA interference: 約21塩基のRNAが配列特異的に標的RNAの分解を引き起こす分子機構)と非常によく似た機構であり、発生、アポトーシス、アミノ酸代謝などを調節することで知られている。miRNAは、多種多様の標的RNAの翻訳抑制を行う可能性があるため、精緻な脳神経回路の制御にかかわっている可能性が高いと考えられる。実際に神経系では、発生における神経分化や記憶・学習に関与していることが報告されているが、ヒトの脳機能において果たす

役割についてはよく知られていない。しかし、最近では、気分障害をはじめとする様々な精神疾患の死後脳や末梢血中におけるmiRNAの発現異常が報告されており、その病態における役割が想定されている。

血清中のmiRNA（マイクロRNA）発現レベルがガンの病的な状態を直接反映することが、2008年に報告された。その後、抹消循環液中のmiRNAの存在が多数報告されている。これらは、安定で、簡便に測定でき、新たな非侵襲的なバイオマーカーとして様々な病気において注目を浴びている。精神疾患では、統合失調症においていくつかの血清中のmiRNAの発現異常が報告されている。

これらのことから、本研究においては、miRNAに着目して、気分障害のリスク遺伝子等を対象に末梢サンプルによるバイオマーカー開発を行うことを第一の目的とし、次に、血液サンプルのバンク化に向けて被験者の血液サンプル収集・蓄積を行うことを第二の目的とする。

## B. 研究方法

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。

（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。

## C. 研究結果

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 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 $\pm$ 13.3 歳）、双極性障害（55.7 $\pm$ 13.1 歳）、健常者（54.7 $\pm$ 5.7 歳）、統合失調症（54.7 $\pm$ 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 $\alpha$  receptor II (TNF- $\alpha$ )、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- $\alpha$ 、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)。

	EGF (pg/ml) <i>p</i> value	BDNF (pg/ml) <i>p</i> value	sTNF R II (pg/ml) <i>p</i> value	MPO (ng/ml) <i>p</i> value	$\alpha$ -1-AT ( $\mu$ g/ml) <i>p</i> value
HC	9.28 $\pm$ 4.38	808.3 $\pm$ 399.6	1911 $\pm$ 476	81.89 $\pm$ 23.51	842.4 $\pm$ 128.5
BPI	28.51 $\pm$ 19.51 <0.001	978.7 $\pm$ 405.9 0.14	2858 $\pm$ 880 <0.001	147.7 $\pm$ 171.5 <0.001	834.8 $\pm$ 118.0 0.83
MDD	10.00 $\pm$ 10.06 0.11	635.7 $\pm$ 289.4 0.047	2143 $\pm$ 540 0.015	85.03 $\pm$ 19.32 0.21	882.9 $\pm$ 130.5 0.051
SCZ	18.11 $\pm$ 32.42 0.43	686.2 $\pm$ 451.1 0.23	2516 $\pm$ 842 <0.001	99.78 $\pm$ 64.72 0.074	849.2 $\pm$ 159.1 0.39

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き、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。

#### D. 考察

我々は、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 $\alpha$  receptor II (TNF- $\alpha$ )、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。

#### E. 結論

我々は、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、血漿中の miRNA の発現解析法を検討した。一定の成果が得られており、今後の発展が期待される。

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. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yasuda Y, Hashimoto R, Ohi K, Yamamori H, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Fujino H, Horiguchi M, Takeda M, Ichinose. A functional polymorphism of the GTP cyclohydrolase I gene predicts attention performance. Neuroscience Letters (in press)
- 2) Fujino H, Sumiyoshi C, Sumiyoshi T, Yasuda Y, Yamamori H, Ohi K, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Higuchi A, Hibi Y, Matsuura Y, Hashimoto R, Takeda M, Imura O. Performance on the Wechsler Adult Intelligence Scale-Third Edition in Japanese patients with schizophrenia. Psychiatry and Clinical Neurosciences (in press)
- 3) Haba R, Shintani N, Onaka Y, Kanoh T, Wang H, Takenaga R, Hayata A, Hirai H, Nagata K, Nakamura M, Kasai A, Hashimoto R, Nagayasu K, Nakazawa T, Hashimoto H, Baba A. Central CRTH2, a second prostaglandin D2 receptor, mediates emotional impairment in the lipopolysaccharide and tumor-induced sickness behavior model. The Journal of Neuroscience (in press)
- 4) Horiguchi M, Ohi K, Hashimoto R, Hao Q, Yasuda Y, Yamamori H, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Takeda M, Ichinose H. A functional polymorphism