

201334005A

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）

DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

平成25年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 大森 哲郎

平成26(2014)年 5月

目次

I. 総括研究報告

DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

大森哲郎 ----- 1

II. 分担研究報告

1. Fluvoxamine の血中 BDNF に関する大うつ病性患者での検討

中村 純 ----- 8

2. DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

森信 繁 ----- 11

3. DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—：治療反応性と病態解析

久住一郎 ----- 15

4. DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

関山敦生 ----- 21

5. DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

松尾幸治 ----- 24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 30

平成 25 年度 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）
総括研究報告書

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
— 双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して —

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

研究要旨

本研究は、うつ病に認められる遺伝子メチル化修飾変化を利用して、うつ病の診断マーカーを作成することを目的とする。平成 25 年度までの予備的な所見では、研究代表者らが網羅的メチル化修飾解析により統合失調症を健常者から区別する所見を認め (Kinoshita 他, 2013)、研究分担者 (森信) らは、うつ病に特有の BDNF 遺伝子メチル化修飾変化を報告していた (Fuchikami 他, 2011)。

研究代表者らは、平成 25 年度には、未治療うつ病 20 名と対照 19 名の第一集団を対象として網羅的メチル化解析を行い、うつ病群でいくつかの遺伝子の低メチル化を認めた。低メチル化を認めた遺伝子のなかにはうつ病病態と関連性が推定されるものを含んでいた。低メチル化を示す十数種の遺伝子を組み合わせることで判別分析を行うことにより、うつ病群と対照群との区別が可能であった。第一集団の判別分析で使用した十数種の低メチル化遺伝子を利用することで、うつ病 12 名と対照 12 名の第 2 集団においても両群の区別が可能であり、マーカーとしての再現性が示された。特許申請手続きに着手し、論文発表を準備している。

また、以前から取り組んでいた mRNA 発現を用いる診断マーカーでは、PCR アレイによる 13 種の mRNA 発現を指標とするうつ病マーカーを作成し、特許を出願した (特願 2014 - 035813)。第 2 集団における再現性も確認でき、現在論文を作成中である。

今後、これらを発展させて、単極うつ病を健常者から区別するだけでなく、双極性うつ病や難治性うつ病との区別の可能なうつ病診断マーカーを目指している。メチル化修飾解析に加え、特定遺伝子 mRNA 発現などを第 2 の指標軸とし、生物学的マーカーの弱点となりがちな群間のオーバーラップの回避を狙っている。

分担研究者

中村 純	産業医科大学医学部・教授
森信 繁	高知大学医学部・教授
久住一郎	北海道大学大学院・教授
関山敦生	大阪市立大学大学院・客員研究員
松尾幸治	山口大学大学院・准教授

A. 研究目的

うつ病を健常者から分ける診断指標の確立は、その早期発見と治療導入を促進する。しかし、うつ病には異種性があり、双極と単極では治療方針が異なり、前者には気分安定薬が後者には抗うつ薬が第一選択薬となる。しかも単極うつ病には、抗うつ薬に反応せず電気痙攣療法が有効な一群がある。診断指標はそれらを区別するものが望ましい。本研究は、治療反応の異なっうつ病の鑑別が可能な診断指標を確立することを目的とする。

本研究の第一の特色は、DNA メチル化修飾を主要指標とすることである。DNA メチル化修飾は、遺伝的にも規定されるが、遺伝子配列とは異なり胎生期や幼小児期の環境で変化し、また成人期の諸要因でも変化する。遺伝と環境との両要因が密接に関与する精神疾患の病態の背景として有望視されている。本研究では白血球をサンプルとしてこれを疾患マーカーとして応用する。

本研究の第二の特色は、第 2 の指標軸を設定し、単一の指標軸では避けがたい群間のオーバーラップを出来る限り回避する。本研究では、これまでの報告からみてマーカーとして最も有望な BDNF とサイトカインおよび特定遺伝子 mRNA 発現を第 2 の指標軸をして設定する。BDNF は研究分担者の中村が、サイトカインは関山が、mRNA 発現解析は大森が、それぞれ検討を進めてきている。本研究ではこれら

の研究を踏まえ、複数指標によるうつ病マーカーを作成する。

本研究は高度の先端技術を応用した企画であるが、患者負担は一度の少量の採血のみなので、臨床現場で使用しやすい指標とすることができる。網羅的解析を起点とするが、最終的には数十以内の測定指標に絞り込む見通しであり、今後の測定技術の進歩と相まって、安価かつ安定した指標とすることができる。

B. 研究方法

研究計画の骨子は、各施設でうつ病治療前後のサンプルを収集し、徳島大学において網羅的メチル化解析を行い、平行して特定遺伝子 mRNA 発現解析および BDNF とサイトカイン測定を各施設において行い、素因 (trait) と状態 (state) の区別のもとに対照群と比較し、診断指標を作成することである。この研究を効率的に進めるべく、平成 25 年度の採択決定後、主任および全共同研究者が集まって意見交換した。

研究代表者は、平成 25 年度はすでに収集済みのサンプルを用いて解析を進めた。文書による同意を得た患者を対象として、診断確定と重症度評価を行い、10-20ml の静脈血を採血した。末梢白血球からフェノール・クロロフォルム法で抽出するゲノミック DNA をメチル化解析に、PAXgene Blood RNA キットを用いて精製する total RNA を mRNA 発現解析に供する。

メチル化解析は、バイサルファイト処理を行った後、Infinium HumanMethylation450 Beadchip

(Illumina 社)を用いて 485,764CpG サイトの DNA メチル化修飾レベルを調べた。特定遺伝子 mRNA 発現は大森らの既報の方法で解析する。PCR アレイは、ABI 社の TaqMan array plate (96well) に候補遺伝子と内因性コントロール (GAPDH, HPRT, ACTB, B2M) を搭載し duplicate で測定した。

大用量情報からのデータ抽出には、バイオインフォマティクス専門の石井一夫東京農工大学特任教授 (研究協力者) の協力を得た。

(倫理面への配慮)

研究の目的、方法、危険性、得られる分析結果、及びその情報の管理について説明し、書面で同意を取得する。研究参加を断っても診療上なんらの不利もないことを十分に説明する。サンプルは連結可能匿名化を行いプライバシーを保護する。研究計画は、徳島大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会、徳島大学病院倫理委員会の承認を既に受けている。共同研究施設においては DNA メチル化解析を含む本研究企画を、施設における倫理審査委員会に提出し、その承認を得たのちに研究を開始する。

C. 研究結果

平成 25 年度には、未治療うつ病 20 名と対照 19 名の第一集団を対象として網羅的メチル化解析を行い、うつ病群でいくつかの遺伝子の低メチル化を認めた。低メチル化を認めた遺伝子のなかにはグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 β 遺伝子

などのうつ病病態と関連性が推定されるものを含んでいた。

低メチル化を示す 17 種の遺伝子を組み合わせることで判別分析を行うことにより対照との区別が感度と特異度とも 100% で可能であった。第 1 集団の判別分析で使用した 17 種の低メチル化遺伝子を利用することで、うつ病 12 名と対照 12 名の第 1 集団とは独立した第 2 集団においても、両群の区別が感度と特異度とも 100% で可能であり、結果の再現性が示された。

平行して進めている PCR アレイによる mRNA 発現を指標とする診断マーカーでは、25 名のうつ病と 25 名の対照を対象として解析を行い、13 種の mRNA 発現を組み合わせることで指標を作成した。これにより感度 72%、特異度 84% の高精度でうつ病を識別することができた。この指標を、うつ病 20 名と対照 18 名の独立した別集団にあてはめたところ、感度 70%、特異度 72% の高い精度で判別できるという再現データを得た。

D. 考察

平成 25 年度の研究において網羅的方法を用いて単極のうつ病の遺伝子メチル化変化を検討した。その結果、健常対照者と比較して、低メチル化を認めるサイトを数多く認めた。そのうちの統計学的有意差の大きい 17 種の遺伝子メチル化サイトを利用することにより、うつ病と健常対照との区別が可能であった。この 17 種のメチル化変化を用いた判別方法は、独立した別のうつ病集団に対しても再現性があった。特許申請手続きに着手し、論文発表を準備している。

PCR アレイによる mRNA 発現を指標とする診断マーカーでは、13 種の mRNA 発現を組み合わせた指標を作成し、高精度でうつ病を識別することができた。この指標は、独立した別集団においても高い精度でうつ病を判別できた。すでに特許を出願し（特願 2014 - 035813）、論文発表を予定している。特許出願後に、mRNA 発現遺伝子数を減らした分析によって、さらに感度と特異度が上昇する結果を得ている。mRNA 発現遺伝子の最適な選択にはまだ検討の余地が残っている。

また主任研究者らの研究で、血漿ホモシステイン濃度と一部の DNA メチル化修飾変化とが相関することが統合失調症において示された。気分障害でのホモシステイン濃度の変化も国外から報告されており、両者の関連は今後の検討課題となる。幼小児期の環境、現在の環境、抗うつ薬や気分安定薬の服薬の有無などがメチル化修飾に与える影響についてもできるかぎり明確化しなくてはならない。

メチル化修飾変化は比較的安定度が高く、採血、抽出、保存などの影響を受けにくく、疾患マーカーとして扱いやすい。mRNA も特定チューブで採血することによって、どこの診察室でも簡便に安定化できる。本研究で測定する各指標の解析は、技術的進歩によって次第に安価で迅速となっている。両指標を測定しても被験者負担は最終的には数 ml の採血に抑えることができることは、実用化において大きな利点となる。

E. 結論

うつ病の診断マーカー確立の試みはデキサメサゾン抑制試験をはじめとこれまでにも数多い。しかし、単一の測定値での判別はうつ病群と対照群のオーバーラップを避けることが難しく、そのため感度と特異度に限界が生じた。本研究では、複数の遺伝子サイトのメチル化修飾変化や複数の遺伝子の mRNA 発現を複合して指標とすることによって、高い感度と特異度を持つ指標の開発を目指している。平成 25 年度の研究成果は、メチル化解析においても mRNA 発現解析においても、単極うつ病と健常者の間の区別は高い精度で可能であることを示している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（主任研究者分のみ）

1. 論文発表

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Imoto I, Ohmori T. Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia. *Epigenetics*. 8(6):584-90,2013 doi: 10.4161/epi.24621. Epub 2013 Apr 26.

Kaneda Y, Ohmori T, Okahisa Y, Sumiyoshi T, Pu S, Ueoka Y, Takaki M, Nakagome K, Sora I. Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia Consensus Cognitive Battery: validation of the

Japanese version. *Psychiatry Clin Neurosci.* 67(3):182-8,2013 doi: 10.1111/pcn.12029.

Watanabe S, Iga J, Nishi A, Numata S, Kinoshita M, Kikuchi K, Nakataki M, Ohmori T. Microarray analysis of global gene expression in leukocytes following lithium treatment. *Hum Psychopharmacol.* 29(2):190-8,2014 doi: 10.1002/hup.2381. Epub 2014 Jan 7.

Nishi A, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Kikuchi K, Shimodera S, Tomotake M, Ohi K, Hashimoto R, Imoto I, Takeda M, Ohmori T. Meta-analyses of Blood Homocysteine Levels for Gender and Genetic Association Studies of the MTHFR C677T Polymorphism in Schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2014 Feb 17. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

Numata S. DNA Methylation Signatures of Prefrontal Cortex and Peripheral Leukocytes in Schizophrenia. Society of Biological Psychiatry 68th Annual Meeting, San Francisco, 2013.5.18

Iga J, Watanabe S, Nishi A, Numata S, Kinoshita M, Kikuchi K, Nakataki M, Ohmori T. Microarray analysis of the leukocyte global gene expression profile following lithium treatment. *Neuro*

2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会) 京都, 2013.6.21

Nishi A, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Shimodera S, Ohi K, Hashimoto R, Imoto I, Takeda M, Ohmori T. Functional variants of the MTHFR gene and schizophrenia in the Japanese population. *Neuro 2013* (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学会大会・第 23 回日本神経回路学会大会, 京都, 2013.6.22

Iga J. Biomarkers and drug response makers for mood disorders from human leukocytes gene expression. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, Japan, 2013.6.24

Numata S, Kikuchi K, Tajima A, Kinoshita M, Shimodera S, Tomotake M, Imoto I, Ohmori T. Plasma homocysteine and schizophrenia: A gender-specific meta-analysis. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, Japan, 2013.6.24

Numata S, Kinoshita M, Tajima A, Shimodera S, Iga S, Watanabe S, Imoto I, Ohmori T. Genome-wide methylation status of human leukocytes in mood disorders. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, Japan, 2013.6.24

Kinoshita M, Numata S, Tajimia A, Shimodera S, Imoto I, Ohmori T. Genome-wide association study of plasma homocysteine and DNA methylation in patients with schizophrenia. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, Japan, 2013.6.24

Watanabe S, Iga J, Numata S, Kinoshita M, Ohmori T. Biological diagnostic test for major depressive disorder based on the leukocytes gene expression: Preliminary study. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, Japan, 2013.6.26

Sumitani S, Ohmori T. Clinical features and response to pharmacotherapy in patients with obsessive-compulsive disorder. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, Japan, 2013.6.27

Nakataki M, Sumitani S, Kubo H, Numata S, Iga J, Watanabe S, Kinoshita M, Harada M, Ohmori T. Structural brain asymmetry in obsessive-compulsive disorder. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, Japan, 2013.6.27

Nakataki M, Harada M, Ohmori T. Glutamate and GABA concentrations in schizophrenia patients and the effects of antipsychotic medication: results

from proton magnetic resonance spectroscopy studies. The 3rd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, China, 2013.9.11

沼田周助, 木下誠, 大森哲郎. ゲノム・ワイドメチル化解析からみた統合失調症の病態. 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, 沖縄, 2013.10.25

沼田周助, 木下誠, 田嶋敦, 下寺信次, 橋本亮太, 井本逸勢, 武田雅俊, 大森哲郎. 治療抵抗性統合失調症のバイオマーカー. 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, 沖縄, 2013.10.25

Nishi A, Numata S, Tajima A, Kikuchi K, Kinoshita M, Shimodera S, Tomotake M, Imoto I, Ohmori T. Plasma total homocysteine and schizophrenia: Gender and MTHFR C677T genotypes. Neuroscience, San Diego, 2013.11.11

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Nishi A, Ohi K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Takeda M, Ohmori T. The effect of MTHFR C677T on DNA methylation of peripheral leukocytes in schizophrenia. Neuroscience 2013, San Diego, 2013.11.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特願 2014-035813 平成 26 年 2 月

26 日出願

精神疾患マーカーおよびその用途

発明者 大森哲郎ほか

出願人 徳島大学

2) メチル化を指標としたうつ病と統合

失調症の指標

出願準備中

発明者 大森哲郎ほか

出願人 徳島大学ほか

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Fluvoxamine の血中 BDNF に関する大うつ病性患者での検討

分担研究者 中村 純 産業医科大学精神医学教室教授

研究要旨

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)の前駆型(proBDNF)と成熟型(mBDNF)の血清中濃度を大うつ病性障害患者(MDD)群と健常者(HC)群とで比較検討した。さらに MDD 群では、fluvoxamine 投与が proBDNF, mBDNF に及ぼす検討も加えた。MDD 群では mBDNF 濃度が HC 群と比較して有意に低値であったが、proBDNF には両群間に差はなかった。

A. 研究目的

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は脳内に最も豊富に存在する神経栄養因子である。matureBDNF(mBDNF)はうつ病の病態とも深く関連している。BDNF はその precursor である proBDNF から産生される。mBDNF は神経新生やシナプス可塑性、proBDNF は神経のアポトーシスと関係している。さらに mBDNF はうつ病では低下、proBDNF は増加しているという報告もある。本研究では、大うつ病性障害(MDD)と健常者の proBDNF および matureBDNF (mBDNF)血清濃度を比較検討した。さらに MDD 患者では fluvoxamine の血清 proBDNF および mBDNF 濃度への影響も検討した。

B. 研究方法

DSM-IV の MDD の診断基準を満たす初発患者 50 例(M/F:18/32, Age: 38±19 歳)と健常者(HC)群 50 例(M/F: 16/24, Age: 35±16 歳)。MDD 群は前例 fluvoxamine 単剤で治

療された（なお benzodiazepine 系薬物の使用は 1 剤のみ可能とし研究期間中の変更は不可とした）。Endo-point は 4 週後とした。HAMD17 得点で 50%以上改善を反応群、7 点以下までの改善を寛解群と定義した。うつ状態評価はハミルトンうつ病評価尺度 17 項目(HAMD17)を用い、血清 proBDNF, mBDNF 濃度は ELISA 法、fluvoxamine 血中濃度は HPLC を用いた。本研究は産業医科大学倫理委員会の承認を受けた。

C. 結果

①50 例中 25 例(50%)が 4 週間後までに反応群、9 例(18%)が寛解となった。②MDD 群では HC 群と比較して有意に mBDNF 濃度が低値であった(HC:10169±3917pg/ml, MDD: 8389 ± 1904pg/ml, t=3.046, p=0.0018, 1-β=82.3%)(図 1)。③MDD 群と HC 群では proBDNF に差はなかった(t=-0.979, p=0.8333)(図 2)。④fluvoxamine

への反応群と非反応群間に mBDNF ($t=1.19$, $p=0.23$) と proBDNF ($t=1.83$, $p=0.07$) に差はなかった。⑥ fluvoxamine は mBDNF 濃度 ($F=0.579$, $p=0.561$) も proBDNF 濃度 ($F=2.580$, $p=0.080$) も共に 4 週間では増加させなかった。⑥ proBDNF/mBDNF ratio と HAMD17 改善との間には相関はなかった ($r=-0.130$, $p=0.190$) ⑦ proBDNF/mBDNF ratio と血中 fluvoxamine 濃度との間にも相関はなかった ($r=0.114$, $p=0.898$)

D. 考察

MDD 群では HC 群より血清 mBDNF が低値であったことは、これまでの我々の先行研究やメタ解析結果と矛盾しなかった。血清 mBDNF 濃度は MDD の state marker として有力な候補と考えられる。さらに我々は、MDD 患者では再発 3 か月前から mBDNF が低下することを報告している (J Clin Psychopharmacol, 2013)。以上のことから、mBDNF は MDD 患者を follow-up する際に再発予測マーカーとしても有用である可能性がある。今回の研究では、血清 proBDN 濃度は MDD 群と HC 群には差は認められなかった。その一因として、今回用いた ELISA kit の検出率の低さ(50%以下)が考えられる。より検出感度の高い ELISA kit や Western Blotting 法での検討が必要である。

E. 結論

血清 mBDNF 濃度は MDD の生物学的 marker として有用である。一方、proBDNF に関しては、そのアッセイ方法も含めてさ

らなる検討を要すると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

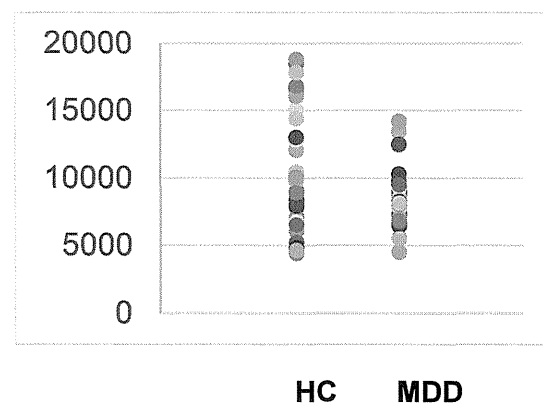
Nakamura J (他 10 名 11 番目) Serum levels of brain-derived neurotrophic factor at 4 weeks and response to treatment with SSRI. *Psychiatry Investigation*, 2014, *in press*.

Nakamura J (他 16 名 17 番目) COMT gene Val158Met, but not BDNF Val66Met, is associated with white matter abnormalities of the temporal lobe in patients with first-episode, treatment-naïve major depressive disorder: A diffusion tensor imaging study. *Neuropsychiatry Disease and Treatment*, 2014, *in press*.

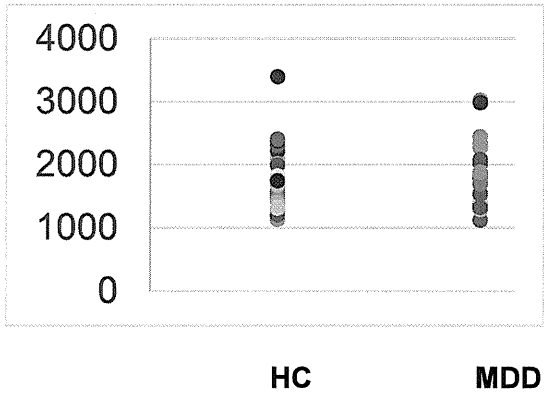
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

(図 1) mBDNF (pg/ml)



(图 2) proBDNF(pg/ml)



分担研究報告書

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
— 双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して —

分担研究者 森信 繁 高知大学医学部神経精神科学 教授

研究要旨

うつ病は ICD-10 或いは DSM-IV-TR にて診断されるが客観性に乏しく、客観的な診断バイオマーカーの開発が望まれている。うつ病発症には遺伝要因のみならず環境因の密接な関与が提唱されおり、環境因により可塑的に変化して遺伝子の転写を調節するエピジェネティクス機構の解明から、精神疾患発症の環境因として DNA メチル化の変動が注目されている。本研究では、うつ病の病態に関与し抗うつ薬の標的分子である脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子とその受容体 TrkB 遺伝子に注目し、エクソン I 上流及びエクソン I 内の CpG アイランドのメチル化の解析を行った。BDNF 遺伝子の階層的クラスター解析によるメチル化プロファイルの解析から、エクソン I 上流及び内の CpG のメチル化解析によって、うつ病と健康対照者を分類できることがわかった。BDNF 遺伝子で計測できた 35 ヶ所の CpG のメチル化率とうつ病重症度との間に有意な関連は検出されなかった。TrkB 遺伝子のメチル化解析では、2 群を分類することはできなかった。

A. 研究目的

うつ病は世界での障害調整生命年低下要因の第二位にランクされ、自殺との密接な関与も指摘され、適切な診断や治療法の確立が必須の問題となっている。うつ病は ICD-10 或いは DSM-IV-TR にて診断されるが、客観性に乏しく診断バイオマーカーの開発が望まれている。一卵性双生児のうつ病発症一致率は最大 40% であり、うつ病発症には遺伝要因のみならず環境因の密接な関与が提唱されている。近年、環境因により可塑的に変化して遺伝子の転写を調節するエピジェネティクス機構の解明から、精神疾

患発症の環境因として DNA メチル化の変動が注目されている。先行研究から、うつ病の病態との関連が認められている脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子の、エクソン I 上流及びエクソン内にある CpG アイランド領域のメチル化を解析することで、うつ病の診断バイオマーカーとなる可能性が示唆されている。先行研究の結果を受けて本研究では、うつ病の病態に関与し抗うつ薬の標的分子である脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子と BDNF の受容体 TrkB 遺伝子に注目し、エクソン I 上流及びエクソン I 内の CpG アイランドのメチル化の解析を行

い、診断及びうつ病重症度のマーカーとしての検討を行った。

B. 研究方法

未治療うつ病患者 30 名及び選択的セロトニン再取り込阻害薬単剤治療中のうつ病患者 8 名と健康対照群 30 名を対象に、末梢血を採取した。うつ病の診断は DSM-IV-TR を用いて行った。うつ病の重症度は HAM-D (Hamilton Rating Scale for Depression) で、幼少期ストレスは ETISR-SF (Early Trauma Inventory Self Report-Short Form) で評価した。

末梢血よりの genomic DNA の抽出は、DNeasy (Quiagen) を用いて行った。その後の DNA メチル化解析は、SEQUENOM 社の MassARRAY® System を用いて行った。システム内の sodium bisulfite 処理キットを用い、非メチル化シトシンのウラシルへの置換を行った。University of California, Santa Cruz (UCSC) genome browser と Genbank より取得した、BDNF, TrkB 遺伝子の遺伝子のエクソン I 上流及びエクソン I 内に存在する CpG アイランド領域の情報から、各 CpG アイランドをカバーする複数の PCR 用プライマーを MassARRAY® System 上の Epidesigner を用いて設計した。BDNF 遺伝子の解析領域は Chr 11: 27700049 - 27701140 で、この中にある 81 ヶ所の CpG を対象とした。TrkB 遺伝子の解析領域は Chr 9: 87282548 - 87286336 で、この中にある 206 ヶ所の CpG を対象とした。Methylation specific PCR 後、In

vitro transcription を施行した。U 特異的切断の後、MassARRAY MALDI-TOF MS を用いて DNA メチル化を質量分析法にて定量した後、EpiTyper を用いて DNA メチル化のデータを取得した。メチル化プロファイルによる群間分類は階層的クラスタリング法で、うつ病群と健康対照群における各 CpG メチル化率の群間差は Mann-Whitney U test で、各 CpG メチル化率と臨床症状の相関は Spearman rank correlation test で解析した。

C. 研究成果

BDNF 遺伝子のエクソン I 上流及びエクソン I 内の各 CpG のメチル化率を用いた階層的クラスタ解析から、うつ病群 (未治療うつ病群と抗うつ薬治療中群を含む) と健康対照群は 2 群に分類できることが明らかとなった。今回の解析でメチル化率の計測できた 35 ヶ所の各 CpG のメチル化率の比較は、うつ病群で 21 ヶ所のメチル化率が健康対照群と比べて有意に低下しており、逆に 7 ヶ所でのメチル化率がうつ病群で有意に増大していた。BDNF 遺伝子の CpG メチル化率と HAM-D 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。BDNF 遺伝子の CpG メチル化率と ETISR-SF 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。

TrkB 遺伝子のエクソン I 上流及びエクソン I 内の各 CpG のメチル化率を用いた階層的クラスタ解析から、うつ病群 (未治療うつ病群と抗うつ薬治療中群を含む) と健康対照群は 2 群に分類でき

ないことが明らかになった。TrkB 遺伝子の CpG メチル化率と HAM-D 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。TrkB 遺伝子の CpG メチル化率と ETISR-SF 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。

D. 考察

本年度の研究結果から、BDNF 遺伝子のエクソン I 及びエクソン I 内の CpG アイランドにある 35 ヶ所の CpG のメチル化プロファイルの解析によって、未治療うつ病及び抗うつ薬治療中のうつ病患者と健康対照者を分類できることが明らかとなった。今後の多数例での解析が必要ではあるが、BDNF 遺伝子のメチル化プロファイルがうつ病診断のバイオマーカーとなる可能性が提唱された。BDNF 遺伝子の各 CpG のメチル化率と HAM-D を用いたうつ病重症度との間には有意な関連はなく、メチル化率はうつ病の重症度を示すバイオマーカーには該当しないことが示唆された。幼少期の不遇な環境を評価する ETISR-SF 総得点と BDNF 遺伝子のメチル化率との間に有意な関連はなく、この結果は多くの疫学研究から幼少期の不遇な環境がうつ病発症の危険因子と報告されている点を考えると、BDNF 遺伝子のメチル化率はうつ病発症脆弱性のバイオマーカーには該当しないことを示していると考ええる。今後は抗うつ薬治療による BDNF 遺伝子のメチル化の変動と臨床症状の変化の関連を解析することによって、BDNF 遺伝子のメチル化率が抗うつ薬治療反応性を示す

サロゲートマーカーになる可能性を解析する必要があると考えられる。

その一方で BDNF の受容体である TrkB 遺伝子のメチル化も同様の方法にて解析したが、BDNF 遺伝子とは異なり TrkB 遺伝子のメチル化プロファイルではうつ病群と健康対照群を分類することはできず、うつ病診断バイオマーカーには応用できないことがわかった。BDNF 遺伝子のメチル化率と同様に、TrkB 遺伝子のメチル化率は、うつ病の重症度のバイオマーカーやうつ病発症脆弱性のバイオマーカーには応用できないことがわかった。

E. 結論

うつ病の病態関連遺伝子として注目されている BDNF 遺伝子の、エクソン I のプロモーター領域からエクソン I の 5'側に及ぶ CpG アイランド上にある 35 ヶ所の CpG のメチル化率を、うつ病患者と健康対照者の末梢血から抽出した DNA を用いて解析した。得られたメチル化率を階層的クラスター解析を用いて解析した結果、うつ病群と健康対照者群の 2 群に分類されることが明らかとなった。このような結果は、BDNF 遺伝子のエクソン I のプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化プロファイルが、うつ病診断用のバイオマーカーとなりうる可能性を提唱している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1) 森信 繁. エピジェネティクスからみたうつ病の病態. 精神神経学雑誌 115: 1101-1112, 2013.

2) 森信 繁, 淵上 学, 瀬川昌弘, 岡田 怜. BDNF 遺伝子のメチル化を用いたうつ病バイオマーカーの開発. 別冊・医学のあゆみ 148-151, 2014.

G-2. 学会発表

シンポジウム

1) Morinobu S. Searching for epigenetic biomarkers in PTSD. VI Japanese Society of Anxiety Disorder Academic Conference. Tokyo, 2014.2.1-2.

一般講演

1) Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Okada S, Okamoto Y, Yamawaki S. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. XXI World Congress of Psychiatric Genetics. Boston USA, 2014.10.17-21.

2) Segawa M, Morinobu S, Fuchikami M, Fujita Y, Okada S, Okamoto Y, Yamawaki S. Searching for epigenetic biomarkers in major depression: focusing on the serotonin signal transduction. XXI World Congress of Psychiatric Genetics. Boston USA, 2014.10.17-21.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 25 年度 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）
分担研究報告書

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の
識別を目指して—：治療反応性と病態解析

分担研究者 久住 一郎 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座精神医学
分野教授

要旨

うつ病の発症要因は、遺伝要因と虐待を含む養育環境、人格・気質、うつ病発症前のライフイベントの4つの因子であり、それぞれが複雑に影響し合うことが多くの臨床研究により明らかになってきた。しかし、子供の時の虐待と気質、成人期ライフイベントの抑うつ気分に対する相互作用はこれまで検証されていないため、本年度は一般成人でこの相互作用を検証し、仮説モデルを作成した。子供のときの虐待のうち特にネグレクトが直接的にではなく、抑うつ、循環、焦燥、不安の4つ感情気質を介して間接的に一般成人の抑うつ気分を高め、これらの4つ感情気質は過去1年間のライフイベントの否定的な評価を強め、否定的なライフイベントは抑うつ気分に対して気質よりはかなり小さいが有意な影響を与えていた。今後は、気分障害でもこの仮説モデルを検証するとともに、DNAメチル化に及ぼす子供の時の虐待の影響と他要因との相互作用を検討していく予定である。

A. 研究目的

うつ病の発症要因は、遺伝要因と虐待を含む養育環境、人格・気質、うつ病発症前のライフイベントの4つの因子であり、それぞれが複雑に影響し合うことが多くの臨床研究により明らかになってきた。これらの4因子のうち、遺伝要因と養育環境、遺伝要因と発症前ライフイベント、人格と発症前ライフイベントの3つの組み合わせについてはうつ病発症に対して相互作用を示す(Caspi et al. Science, 2003; Kendler et al. Am J Psychiatry, 2004)。しかし、それ以外の3つの組み合わせ（遺伝と人格、人格と養育環境、養育環境とライフイベン

ト）のうつ病発症に及ぼす相互作用についてはこれまで報告されていない。

うつ病発症に関与する遺伝要因は従来、出生後不変であると考えられてきた。しかし、最近 DNA メチル化が幼少期のストレス（虐待）によって惹起され、遺伝子発現が出生後に修飾されることが明らかになった（Zhang et al. Neuropsychopharmacology, 2013）。このことは養育環境によって遺伝要因が後天的に変化をうける可能性を示唆しており、前述した遺伝要因(G)と環境要因(E)の相互作用(G x E相互作用)が後天的な環境変化によってさらに変化しうることを意味している。

以上に紹介した最近の知見から、うつ病の病態、治療反応性に遺伝要因と虐待を含む養育環境、人格・気質、うつ病発症前のライフイベントの4つの因子がどのように相互作用を示すのかを検討することは重要であり、特に遺伝要因をDNAメチル化から研究することは遺伝と環境の相互作用の解明につながることで期待される。本研究では、うつ病患者群と健常者群の白血球中のmRNA発現、DNAメチル化を多施設共同で検討を行うのと並行して、両群の子供のときの虐待、気質、成人期ライフイベントを質問紙で定量的に評価し、うつ症状、不安症状、難治性との関連を検討する。平成25年度には、まず白血球を使った生物学的マーカー以外の要因について多数例の一般成人で検討し、仮説モデルの作成、妥当性検証を行った。

B. 研究方法

募集した一般成人294名を対象として、抑うつ症状(PHQ-9)、虐待的養育環境CATS (Sanders & Becker-Lausen, 1995)の日本語版(全38項目版)、最近1年間のライフイベントに対する肯定的あるいは否定的評価Life Experiences Survey (LES) (Sarason et al., 1978)、感情気質であるTemperament Evaluation of the Memphis, Pisa, Paris, and San Diego Autoquestionnaire (TEMPS-A) (Akiskal et al., 2005)の日本語版(Matsumoto et al., 2003)による質問紙調査を匿名で行

った。なお、精神科治療歴がある被験者は除外した。

エクセル統計(エスミ)を使用し、各変数の相関とうつ症状に対する重回帰分析を行い、うつ症状に大きく影響する因子を抽出し、仮説モデルを作成した。IBM SPSS Amos 20.0を使用し、共分散構造分析最尤推定法で仮説モデルの検証を行った。

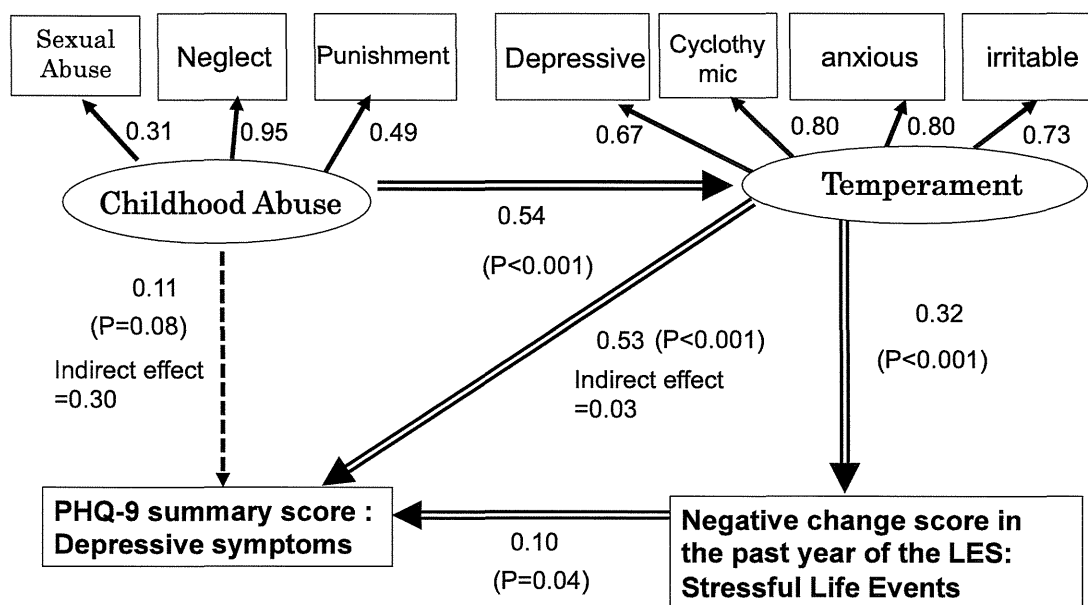
C. 研究結果

294名の一般成人は、平均年齢42.4歳、男性171例、女性123例、就労中241例、家庭の主婦43例、無職6例であった。PHQ-9総点は平均3.5点であり、大部分では大うつ病エピソードを疑われなかったが、7例のみ大うつ病エピソードを有していることが疑われた。したがって、本研究で対象とした一般成人の社会機能は十分に高く、ほとんどが非臨床集団であるといえる。

抑うつ症状は、女性、非婚姻、単身生活者、子供の時の虐待(ネグレクト/否定的家庭環境、罰)、抑うつ・循環・焦燥・不安の4感情気質、過去1年間の否定的なライフイベントによって高値となった。他方、教育年数、子供の数、身体疾患の合併、第一度親族の精神疾患家族歴、子供の時の性的虐待、発揚の感情気質、過去1年間の肯定的なライフイベントは抑うつ症状には影響を与えなかった。

抑うつ症状に統計学的に有意に関連する因子を選択して、抑うつ症状を目的変数とする重回帰分析を行った。循環気

Covariance structure analysis in 294 general adult subjects



square sums of multiple correlation coefficient = 0.41

質、不安気質、子供の時のネグレクト、過去1年間の否定的なライフイベントの4つの因子のみが、抑うつ症状を以下のような重回帰式で統計学的に有意に予測していた。

$$\text{抑うつ症状 (PHQ-9 総点)} = 5.78 \times \text{循環気点数 (1~2)} + 1.34 \times \text{CATS ネグレクト平均点数} + 0.15 \times \text{LES 否定的ライフイベント合計点数} - 9.05$$

CATS のネグレクトと罰は TEMPS-A の抑うつ、循環、不安、焦燥気質と、性的虐待は循環、不安気質と有意に相関していた。CATS の3種の虐待亜項目は相互に相関するため、それぞれの気質に対する子供のときの虐待の影響を重回帰分析したところ、ネグレクトのみが有意に

4感情気質の点数を予測していた。

以上の結果から、上の図のような構造方程式モデルを作成し、IBM SPSS Amos 20.0 を使用して共分散構造分析最尤推定法によりモデルの妥当性を確認したところ、適合度は高く、この仮説モデルは妥当であると結論した。

大うつ病性障害、双極性障害患者と健康群の区別、両気分障害の難治性と非難治性の区別にも同様の仮説モデルを当てはめたところ、良好な適合度が得られた。

D. 考察

本研究の結果から、子供のときの虐待のうち特にネグレクト（日本語では育児怠慢、育児放棄とも呼ばれる）が直接的にではなく、4つの感情気質を介して間

接的に一般成人の抑うつ気分を高めていることが明らかになった。意外なことに過去1年間の否定的なライフイベントは抑うつ気分には有意であるが、小さな影響しかもたらさなかった。さらに、抑うつ、循環、焦燥、不安の4感情気質は抑うつ気分**に強く影響を与えるとともに**、ライフイベントの否定的な評価を強めていた。このことは、気質が否定的なライフイベントを増やしているともいえるし、同じライフイベントでも感受性を高めているともいえるが、どちらの機序を介しているかは本研究の結果からは結論できない。

これまで、遺伝要因と子供の時の虐待、成人期ライフイベントが相互作用して抑うつ気分を高めているということが前方視的コホート研究で報告されてきた(Caspi et al. Science, 2003)。しかし、子供の時の虐待が気質や成人期ライフイベントとどのように相互作用して抑うつ気分**に影響を与えているか**については報告されたことがなかった。したがって、本研究は、子供のときの虐待と気質、子供のときの虐待と成人期ライフイベントが抑うつ気分**に相互作用することを明らかにした**最初の報告である。

神経症的傾向が成人期ライフイベントと相互作用してうつ病発症に促進的に働くことが前方視的研究で報告されている(Kendler et al. Am J Psychiatry, 2004)。本研究では、神経症的傾向ではなく、TEMPS-Aで評価する5つの感情気質と抑うつ気分との関連を検討した。発揚を除く4気質が抑うつ

気分と正に相関し、さらに成人期ライフイベントと相互作用して、抑うつ気分を高めていた。この結果はKendlerらの先行研究と一致した結果である。

E. 結論

うつ病発症には多因子が影響しているが、本年度の研究ではこれまで明らかではなかった子供の時の虐待と気質、成人期ライフイベントの抑うつ気分に対する相互作用を一般成人で検証し、図のような仮説モデルを提案した。今後は、気分障害でもこの仮説モデルを検証するとともに、DNAメチル化に及ぼす子供の時の虐待の影響と他要因との相互作用を検討していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (分担研究者分のみ)

1. 論文発表

Mitsui N, Asakura S, Inoue T, Shimizu Y, Fujii Y, Kako Y, Tanaka T, Kitagawa N, Kusumi I: Temperament and character profiles of Japanese university student suicide completers. *Compr Psychiatry* 54:556-561,2013.

Kameyama R, Inoue T, Uchida M, Tanaka T, Kitaichi Y, Nakato Y, Hayashishita Y, Nakai Y, Nakagawa S, Kusumi I, Koyama T: Development and validation of a screening questionnaire for present or past