

(hypo)manic episodes based on DSM-IV-TR criteria. *J Affect Disord* 150: 546-550, 2013.

Kimura H, Osaki A, Kawashima R, Inoue T, Nakagawa S, Suzuki K, Asakura S, Tanaka T, Kitaichi Y, Masui T, Kitagawa N, Kako Y, Abekawa T, Kusumi I, Yamanaka H, Denda K, Koyama T: Differences between bipolar and unipolar depression in the Rorschach test. *Neuropsych. Dis. Treat.* 9:619-627, 2013.

Mitsui N, Asakura S, Shimizu Y, Fujii Y, Kako Y, Tanaka T, Oba K, Inoue T, Kusumi I: Temperament and character profiles of Japanese university students with depressive episodes and ideas of suicide or self-harm: a PHQ-9 screening study. *Compr Psychiatry* 54 (8):1215-1221, 2013.

Kitaichi Y, Inoue T, Mitsui N, Nakagawa S, Kameyama R, Hayashishita Y, Shiga T, Kusumi I, Koyama T: Selegiline remarkably improved stage 5 treatment-resistant major depressive disorder: a case report. *Neuropsych. Dis. Treat.* 9: 1591-1594, 2013.

Nakai Y, Inoue T, Toda H, Toyomaki A, Nakato Y, Nakagawa S, Kitaichi Y,

Kameyama R, Hayashishita Y, Wakatsuki Y, Oba K, Tanabe H, Kusumi I: The influence of childhood abuse, adult stressful life events and temperaments on depressive symptoms in the non-clinical general adult population. *J Affect Disord* 158:101-107, 2014.

Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Kataoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T, Mimura M: The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. *J Psychiatr Res* 53:47-53, 2014.

2. 学会発表

Nakai Y, Inoue T, Toyomaki A, Toda H, Yasuya Nakato Y, Nakagawa S, Kitaichi Y, Kameyama R, Hayashishita Y, Kusumi I. The Influence of childhood stress, life events and temperament on depression in general adults. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 2013.6.25.

中井幸衛、井上 猛、豊巻敦人、戸田裕之、中川 伸、仲唐安哉、北市雄士、林下善行、若槻 百美、久住一郎：不安に対する子供の時のストレス、気質、成人期ライフイベントの影響。第6回日本不安障害学会学術大会、東京、2014.2.1.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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－

研究分担者 関山敦生 大阪市立大学大学院医学研究科・客員研究員

要旨

うつ病の的確な診断は、社会全体の急務である。また、うつ発症者の検出に加え、誘因かつ増悪因子である精神的ストレスの的確な評価もきわめて重要と考えられる。本研究は、ごく微量の血液から血液中のタンパク質量を一括解析するプロテインアレイ技術を用いてうつ病患者と健常者を解析した結果、うつ病患者において血中濃度が変化している生理活性分子を発見し、それらを利用して健常者と識別可能であることが判明した。うつ病患者を対照群から識別するためには、10種程度のタンパク質測定で十分であることも判明した。平成25年度には、産業衛生フィールドにおいてストレスおよびうつ病に関する上記バイオマーカーの検討を行い、うつ病による休職者と、過去に研究分担者が蓄積したうつ病血液データとの一致、ならびに、上記血液検査とよく相関する心理テスト質問項目を見いだした。

A. 研究目的

精神、内分泌、免疫系は、相互に制御し合っており、生体防御機構を形成している。本研究は、生体防御機構の主要なメディエーターであるサイトカインが、心身のストレスに応じて特有の血中濃度プロファイルを示すことに注目。大きな社会的問題でありながら、生物学的、客観的な把握や評価が困難であったうつ病ならびに、その誘因かつ増悪因子である精神的ストレスに注目し、うつ病患者と健常者とを区分のため、また、ストレスの有無や強度を評価するための血中サイトカイン濃度パターンを明らかにする。

B. 研究方法

大阪市交通局の産業医面談に参加あるいは関山診療所にて受診または集団検診を受検した健常者、うつ病患者のうち、本研究に参加することについて文書により説明し同意が得られたものを対象とした。診断は、DSM-IV、または同TRに準拠し、重症うつ病エピソードに合致するもののほか、精神病症状をとともなう重症うつ病エピソードおよび双極性障害うつ病エピソードも対象とした。重篤な身体合併症を有するもの、および身体疾患治療薬を服用しているものは除外した。うつ病の評価にはハミルトン評価尺度を用い、集団検診受検者の評価には、職業性ストレス簡易調査票、GHQ28、Zung-SDSを用いた。血液2mlを採取、血

漿を遠心分離し、ミリポア社製サイトカイン・ケモカインサスペンションアレーシステムを用いての解析まで、ディープフリーザーに保管した。

測定毎、あるいは測定プレート毎のデビエーションが結果に影響することを防ぐため、全てのプレートの一部に同一のサンプルをロードし、基準サンプルとした。

うつ病者と健常者との血液サイトカインプロファイルを比較、うつ病者における血液サイトカインプロファイルをHAM-D結果と比較、健常者における血液サイトカインプロファイルを心理テスト結果とそれぞれ比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

検体については、連結可能匿名化を行ってプライバシーを保護した。対応票は、大市大における本研究の倫理面管理者(関山敦生)が厳重に保管し、解析を行う研究者チームには番号のみを通知する。希望者のみを対象とし、本研究の目的、方法、危険性、得られる分析結果、及びその情報の管理について説明し、書面で合意を取得した。尚、研究計画は兵庫医科大学倫理委員会ならびに、大阪市立大学倫理委員会の承認を平成17年に受け、以後研究体制の変更と研究経過を審査委員会に報告し、継続承認を得ている。

C. 研究結果

平成18年までに、大うつ病(ハミルトンうつ病スケール 17.1 ± 6.3 , 年齢 40.9 ± 10.6) 200人の被験者群を形成しており、さらに、その被験者群の中か

ら、うつ症状軽快(HAM-D正常化により判定)した後にも内服を続けている通院症例47名の被験者群の協力を得ている。以後の追跡検討において、サイトカイン・ケモカイン血中濃度プロファイルを用いてうつ期と回復期とを判別することができた。判別分析上でうつ病時の同プロファイルからの相違をあらわすパラメータは、HAM-D正常化に伴って増加し、健常者との相違は減少した。

今回の検討で新規にエントリーしたうつ病患者17名は、これまでに得られた判定方法で健常群と分離することができ、かつ、過去のうつ病データとの分離はできなかった(データの再現)。

精神的ストレスに関しては、これまでに120例を対象とした実験的検討によって精神的ストレス暴露者の典型的サイトカイン血中濃度プロファイルを得ており、以後はフィールドワークによって、東北太平洋沖地震救援活動従事者2800名を含む約5000名のさまざまなストレス暴露後のデータを蓄積している。

本研究においては、就労者からの集団検診受検者から、本研究に110例のエントリーを得、うち約20%に強い精神的ストレスが検出された。ほかに、健常者パターンを逸脱しているもの8名がおり、そのうち4名がうつ病の治療中で、2名は適応障害のために緩和勤務中で、2名は詳細不明ながら定時に退社するよう産業医に判断されていた(データ照合の直前までは盲検的に手順を進めた)。

心理テスト等との照合の結果ではサイトカイン血中濃度プロファイルの

みによる教師なしクラスタリングの結果が、職業性ストレス簡易調査票の、職場のストレスや周囲との関係性を反映する質問枝群から得られるスコアによるグレード分けと良く一致（被検者フィールドを問わず80-85%の一致率）した。被検者の雇用元で分類すると、心理テスト上で抑うつを表す指標とサイトカインによるクラスタリングがよく一致する雇用元（78%）と、まったく一致しない雇用元（31%）とがあった。

過去のうつ病患者の追跡は現在も行っているが、難治例や精神病症状の出現など、サブタイプの変化は観察されず、よって病型の変化と血液中サイトカインマーカーとの関連を検討することはできなかった。

D. 考察

平成25年度に重点的に取り組んだのは今後複数年にわたって追跡可能な前向き研究フィールドの形成ならびに、うつ・ストレスバイオマーカーによる検討とうつ・ストレス心理テストによる検討の照合による検討であった。過去の検討の結果から、多変量解析モデルを用いることで軽中等症のうつ病および回復の評価ができる可能性が示唆されており。また、血中サイトカイン・ケモカイン濃度プロファイルは、マーカーとしての有用性のみならず病態に伴って変化することも示されていた。今年度の検討結果はこれらと一致した。ストレスに関する検討では、心理テスト（職業性ストレス簡易調査票）の主成分の一つとよく相関することが見いだされた。今後の血液検

査の用途として、他の指標の妥当性検討の一助となる可能性が示唆される。一方で就労者のグループによっては、抑うつを示す主成分との一致がきわめて低いことがあった。この理由や原因について評価を進めるとともに、結果の公開や運用方法に関しても慎重になる必要があるものとする。

E. 結論

血中サイトカイン・ケモカインは、回復の評価ならびに治療の評価に用いることができる可能性がきわめて高い。今後は、研究班で研究を推進している他のマーカーとの連携、組み合わせての適用を進め、簡便性とコスト面を考慮した測定法を完成させることにより、臨床現場で使用できるうつ病の客観的指標を確立することができると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

PCT 出願番号 PCT/JP2007/052887

生体負荷の指標剤および生体負荷の測定方法

筆頭出願人および発明者 関山敦生

平成25年度に

日本国（5069213号）、インド、ロシア EU 全域、中国にて特許査定（取得）

2. 実用新案登録

なし

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－

研究分担者 松尾幸治 山口大学大学院医学系研究科高次脳機能病態学分野准教授

要旨

本研究は、うつ病患者の白血球から抽出した遺伝子メチル化修飾解析により、診断的バイオマーカーを作成することを目的とする。うつ病に特徴的な、遺伝子メチル化修飾が健常者との区別ばかりでなく、双極性障害、難治性うつ病など気分障害患者の鑑別が可能になることを目的としている。また、診断的マーカーの精度を上げるために、特定遺伝子mRNA発現も組み合わせていく。

A. 研究目的

うつ病は、心身に著しい苦悩をもたらし、社会生活に甚大な支障をきたすばかりか、しばしば自殺企図に結びつく。年間3万人以上にもものぼる自殺者の多くがうつ病に罹患していたと推定される。また、怠学、失職、引きこもりなどの社会的問題やアルコール関連障害などの医学的問題にも深く関連している。生涯罹患率が10%にも上るこの疾患の的確な診断と適切な治療体制の確立は、国民生活の向上に必須であり、社会全体の急務である。

うつ病にはこうした社会的インパクトがあるにもかかわらず、現在のところ国際的診断基準でも主観的症状などを評価する診断面接のみである。そのため評価者間の診断のずれが生じやすく、不適切な治療となる危険性もあり、より客観的な診断法の確立が望まれている。われわれは、これまでも白血球の遺伝子発現からうつ病と双極性障害の異同を示

す臨床マーカーを報告してきた。

本研究は、うつ病患者の白血球から抽出した遺伝子メチル化修飾解析により、診断的バイオマーカーを作成することを目的とする。うつ病に特徴的な、遺伝子メチル化修飾が健常者との区別ばかりでなく、双極性障害、難治性うつ病など気分障害患者の鑑別が可能になることを目的としている。また、診断的マーカーの精度を上げるために、特定遺伝子mRNA発現も組み合わせていく。

B. 研究方法

対象は、山口大学医学部附属病院精神科神経科にて通院および入院中のうつ病患者。またポスター等により健常者を募集する。この中で、本研究に参加することについて文書および口頭にて説明をうけ、研究内容を十分理解し文書にて同意を得たものを対象とする。患者は、米国精神医学会にて定められた診断基準（DSM-IV）に基づいて診断される。20歳以上の成人のみを

対象とし性別は問わない。うつ病の重症度はハミルトンうつ病スケールを用いて評価する。重篤な身体合併症および気分に影響を与えるような身体疾患（例：甲状腺機能低下症、全身性エリテマトーデスなど）を有するもの、およびステロイド薬など気分に影響を与える治療薬を服用しているものは除外する。採血は、午前8時から午前12時までの間に行う。キアゲン社製 mRNA抽出用試験管を用いてmRNAを抽出する。

（倫理面への配慮）

研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言（2008年ソウル修正）および「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年7月31日厚生労働告示第415号）に従って実施する。遺伝子研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って実施する。

本研究により得られた被験者のデータについては、研究対象者は連結可能匿名化し、データをみるだけでは個人の特定ができないよう配慮する。対応表は本研究の研究分担医師（松尾）が管理し、研究分担医師の許可なくして他の研究者が容易にアクセスできないようにする。研究成果の発表時は、解析データは集団として扱うため、個人情報特定されることはない。また、研究の本目的以外に研究で得られた被験者のデータを使用しない。共同研究施設とデータ共有する可能性があるが、その場合も個人が特定できない様に匿名化した状態でデータの提供をE-mailまたは郵送にて行う

遺伝情報は開示しない。その理由とし

て本研究は、多数の人および遺伝子の遺伝情報を相互に比較することにより、気分障害と遺伝子の関連や遺伝子の機能を明らかにしようとする研究であり、これらの遺伝情報がその人個人の健康状態等を評価するための情報としての精度や確実性に欠けていることから、開示することにより被験者または第三者の生命、身体などの権利利益を損なうおそれがあるためである。遺伝カウンセリングを希望の被験者は山口大学医学部附属病院遺伝外来に紹介する。

本研究は、山口大学医学部附属病院 Institutional Review Board、山口大学医学部及び医学部附属病院遺伝子解析研究審査委員会にて承認を受けている。

C. 研究結果

主研究施設の徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部と1回の合同会議および何度かメールのやりとりを行った。上記の研究体制を整えた。また今回の研究プロトコールに準じた血液分析の確認など予備的検討を行った。

D. 考察

被験者リクルート方法、血液分析などこの研究プロトコールを進めるめどがなかった。

E. 結論

予備的検討を行い、被験者リクルート方法、血液分析などこの研究プロトコールを進めるめどがなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（主任研究者分のみ）

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yoshimura R, and Nakamura J	Blood Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels and Mood Disorders	Kiruthiga	Handbook of Neurotoxicity	Springer	NY	2014	1634-1640
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.	功刀 浩	別冊・医学のあゆみ うつ病—治療・研究の最前線	医歯薬出版株式会社	東京	2014	148-151

雑誌

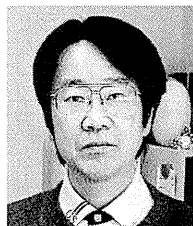
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Imoto I, Ohmori T.	Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia.	Epigenetics.	8(6)	584-90	2013
Kaneda Y, Ohmori T, Okahisa Y, Sumiyoshi T, Pu S, Ueoka Y, Takaki M, Nakagome K, Sora 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
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
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.		Epub ahead of print]	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura J et al.	Serum levels of brain-derived neurotrophic factor at 4 weeks and response to treatment with SSRI.	Psychiatry Investigation			2014, In press
Nakamura J et al.	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
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
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 (hypo)manic episodes based on DSM-IV-TR criteria	J Affect Disord	150	546-550	2013
Kimura H, Osaki A, Kawashima R, Inoue T, Nakagawa S, Suzuki K, Asakura S, Tanaka T, Kitaichi Y, Masui T, Kitagawa N, Kako Y, Abekawa T, Kusumi I, Yamanaka H, Denda K, Koyama T	Differences between bipolar and unipolar depression in the Rorschach test.	Neuropsych. Dis. Treat	9	619-627	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mitsui N, Asakura S, Shimizu Y, Fujii Y, Kako Y, Tanaka T, Oba K, Inoue T, Kusumi I	Temperament and character profiles of Japanese university students with depressive episodes and ideas of suicide or self-harm: a PHQ-9 screening study.	Compr Psychiatry	54(8)	1215-1221	2013
Kitaichi Y, Inoue T, Mitsui N, Nakagawa S, Kameyama R, Hayashishita Y, Shiga T, Kusumi I, Koyama T	Selegiline remarkably improved stage 5 treatment-resistant major depressive disorder: a case report	Neuropsych. Dis. Treat.	9	1591-1594	2013
Nakai Y, Inoue T, Toda H, Toyomaki A, Nakato Y, Nakagawa S, Kitaichi Y, Kameyama R, Hayashishita Y, Wakatsuki Y, Oba K, Tanabe H, Kusumi I	The influence of childhood abuse, adult stressful life events and temperaments on depressive symptoms in the non-clinical general adult population	J Affect Disord	158	101-107	2014
Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Kataoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T, Mimura M	The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression.	J Psychiatr Res	53	47-53	2014

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

DNA methylation profile of the BDNF gene as a diagnostic biomarker in major depression



森信 繁(写真) 淵上 学 瀬川昌弘 岡田 怜

Shigeru MORINOBU¹, Manabu FUCHIKAMI², Masahiro SEGAWA³ and Satoshi OKADA³

高知大学医学部神経精神科学教室¹, Yale University School of Medicine, Laboratory of Molecular Psychiatry², 広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門精神神経医学³

◎精神疾患の診断法は臨床症状に基づいて構成されており、身体疾患の診断と比較して客観性に欠けるため、病態解明や標準的治療法開発のための客観的診断法が開発が求められている。著者らはうつ病BDNF(脳由来神経栄養因子)仮説に準拠して、末梢血由来DNAを用いてBDNF遺伝子のエクソンI、IVのプロモーター領域のシトシン・メチル化プロファイルを解析したところ、未治療うつ病群と健常人群が分類できることを発見した。本研究の結果は、発症に環境因が密接に関与している精神疾患の診断には、従来から用いられてきた遺伝子多型などのジェネティックバイオマーカーではなく、DNAメチル化などのエピジェネティックバイオマーカーが有用であることを示唆している。

Key word : うつ病バイオマーカー, 脳由来神経栄養因子(BDNF), DNAメチル化, エピジェネティクス, 未治療うつ病

わが国でも五大疾患のなかに精神疾患が取り上げられており、その予防も含めた早期対策が必要とされている。なかでもうつ病のもたらす健康への被害は、先進国での障害調整平均余命低下要因の第2位に2020年にはなることが予想され¹⁾、大きな社会問題となっている。日本のうつ病の生涯有病率は約6%と報告されており²⁾、日本での大うつ病の患者数は、厚生労働省の調査で1999年が24万人であったものが2008年には70万人となっており、急増していることがわかる³⁾。

精神科医療における診断バイオマーカーの開発

その一方で現在の精神科医療では、アメリカ精神医学会(American Psychiatric Association)の提唱する診断分類であるDiagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition-TR(DSM-IV-TR)や、WHOの提唱する診断分類であるInternational Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th edition

(ICD-10)に基づいて臨床診断が行われている。上記診断分類は基本的に問診による患者および家族からの情報と医師の主観的な理解により診断がなされるため、治療者間で診断が異なることもまれではない。このような精神疾患をめぐる診断上の混乱は薬物治療の標準化への障害ともなっており、客観的なバイオマーカーを用いた診断法が開発が必要とされている。

このため、世界的にも精神疾患のバイオマーカーの開発は重要な研究課題となっており、fMRIや光トポグラフィなどを用いた脳画像研究のほかに、末梢血からのバイオマーカーの開発などが行われている。これまでの大うつ病の血中バイオマーカーの研究として視床下部-下垂体-副腎系(hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis)に関連して、デキサメタゾン抑制試験(the dexamethasone suppression test: DST)や、デキサメタゾン/コルチコトロピン遊離ホルモン試験(the combined dexamethasone/corticotrophin-releasing hormone test: DEX/CRH test)による

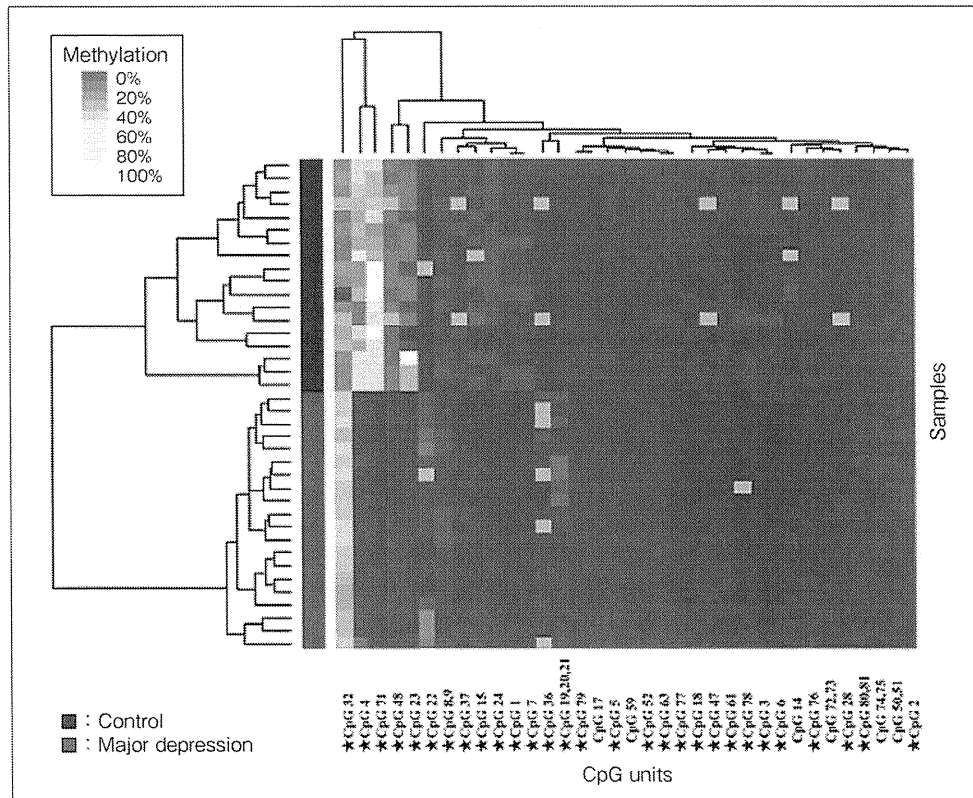


図 1 BDNF遺伝子エクソン I のプロモーター上の関心領域のメチル化を階層的クラスタリング解析したヒートマップ⁸⁾

診断の可能性が模索されてきたほか、セロトニン受容体やインターロイキン、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) などを対象として血液中の蛋白質や RNA, DNA の計測が行われてきたが、いずれも健常人との間に大幅なオーバーラップがあるなどの問題から、診断バイオマーカーにはなっていない⁴⁾。

大うつ病の一卵性双生児研究を対象とした疫学研究ではうつ病発症一致率が約 40% であり⁵⁾、これをうつ病の生涯有病率 6% という数字から考えると、発症脆弱性を形成する遺伝的要因はあるものの、成長過程での環境因の病態形成への密接な関与が考えられる。

環境因がどのようなメカニズムで生体の脳内の遺伝子発現を制御するのかについては長年の疑問であった。これに対してマギル大学の Meaney らのグループ⁶⁾が、低養育環境が仔ラットの海馬グルココルチコイド受容体 (GR) のプロモーターの

DNA メチル化の亢進を引き起こし、成長後のストレス曝露に対して GR 遺伝子の転写が抑制され、HPA 系のネガティブフィードバックの不全を導くことを報告して以来、環境因によるエピジェネティック機構の変化が盛んに研究されるようになってきた。

エピジェネティクスとは、DNA の塩基のひとつであるシトシンのメチル化や、ヒストンの修飾によってクロマチンの構造変化が導かれ遺伝子の転写を調整する機序のことであり、塩基配列の変化を介さない遺伝子転写調節機構と考えられる。

著者らは大うつ病の BDNF 仮説⁷⁾に準拠して、BDNF 遺伝子のプロモーター上の DNA メチル化プロファイルがうつ病の診断マーカーとならないかと考え、エピジェネティクス研究を行っており、本稿ではその結果を報告する。

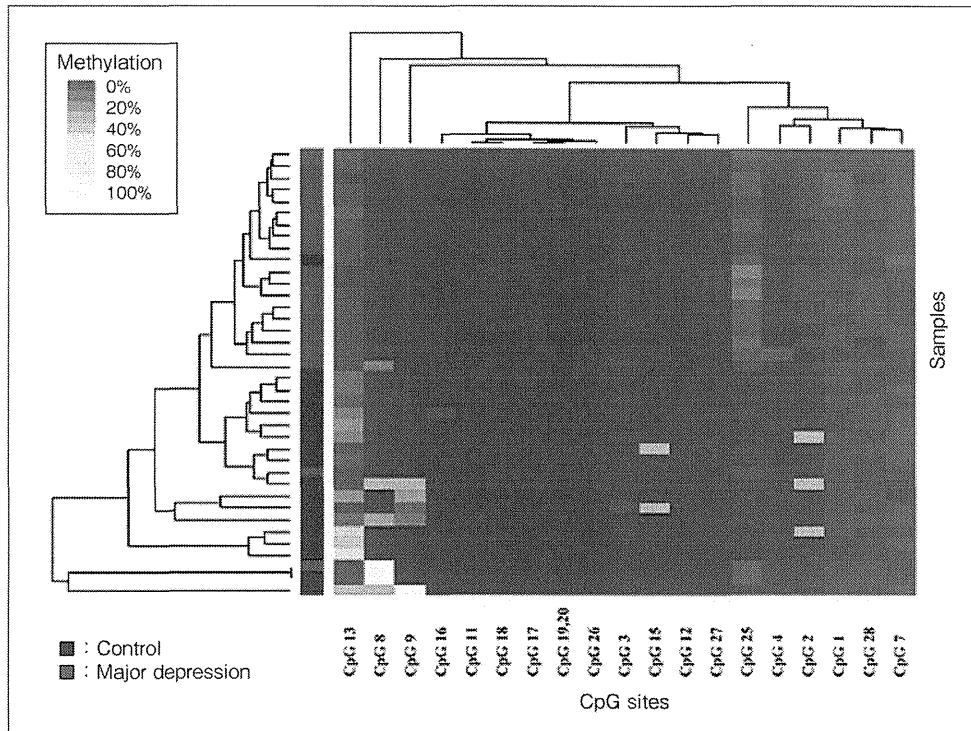


図 2 BDNF遺伝子エクソンIVのプロモーター上の関心領域のメチル化を階層的クラスタリング解析したヒートマップ⁸⁾

うつ病BDNF仮説に基づいた バイオマーカー研究⁸⁾

本研究には DAM-IV に準拠した構造化面接である MINI を用いて診断された未治療うつ病患者 20 名と、身体疾患および精神疾患の既往がない健康対照者 18 名の参加を得て行った。大うつ病患者の症状評価はハミルトンうつ病評価尺度 (Hamilton rating scale for depression : HAM-D) で行った。本研究は広島大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承諾を受けて行っている。同時に、世界医師会によるヘルシンキ宣言に示された倫理規範を踏まえ、インフォームドコンセントを行い、同意を得られた人を対象とし、個人情報保護に十分留意して行っている。

BDNF のプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化に注目して実験計画を立案した。検索領域の配列については UCSC (University of California, Santa Cruz) ゲノムブラウザを用いて、BDNF 遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドを検索した。本検索にて 11 番染

色体上に存在する BDNF 遺伝子の 5' 側に存在する、エクソン I, IV のプロモーター領域の CpG アイランドを対象にメチル化の計測を行った (chr11 : 27743473-27744564, %GC=60.3)。この関心領域の塩基配列の情報をもとに、Epidesigner ソフトウェア (<http://www.epidesigner.com/>) を用いて、メチル化を解析するためのプライマーを設計した。

末梢血から DNeasy[®] Blood and Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出後に、EZ DNA methylation kit (Zymo Research, Orange, CA) を用いてバイサルファイト処理を行い、処理後の DNA とプライマーを用いて領域特異的 PCR を行った。Epidesigner ソフトウェアにて設計したプライマーのうち一方は T7 プロモーターのタグ配列が付属したものを使用し、PCR 後に *in vitro* transcription および塩基特異的切断を行った。レジン反応液と混合させた後、10~20 nL を Mass ARRAY Nanodispenser を用いて、silicon matrix-preloaded

chip(SpectroCHIP; SEQUENOM)にスポットし、MassARRAY Compact System matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometer(SEQUENOM)を用いて定量的にメチル化を解析した。

エクソン I のプロモーター解析領域内には 81 カ所の、エクソン IV のプロモーター解析領域には 28 カ所の CpG 配列が存在していた。得られた結果を、“R”ソフトウェア(available at CRAN, <http://cran.r-project.org/>)のうち、R cluster package の“hclust”を使用し、ユークリッド距離の最速法で階層的クラスタ解析を行った。

研究の結果⁸⁾

BDNF 遺伝子エクソン I のプロモーター領域の CpG のメチル化を二次元階層的クラスタ解析で解析し、ヒートマップで視覚化した(図 1)。その結果、エクソン I 上流の DNA メチル化プロフィールによって、うつ病群と健常対照者群とが重なりなく分類されることがわかった。同様にエクソン IV のプロモーター領域の CpG のメチル化を解析したところ、図 2 のような結果となった。

バイオマーカーの可能性と今後の課題

今回の研究結果では、末梢血由来 DNA の BDNF 遺伝子のプロモーター上のシトシンのメチル化(とくにエクソン I のプロモーター領域)を解析することで、臨床診断と一致した結果が得られたことから、大うつ病のバイオマーカーとなりうる可能性が発見された。しかし、本研究では今後の解析を必要とする事項が複数あげられる。

第 1 には本研究は健常人群、大うつ病群ともに少数で検討したため、今後さらなる大規模な検討が必要なことである。2 つ目としては今後バイオマーカーとして使用していくためには今回は未治療のうつ病を対象としたが、今後は薬物をはじめとした治療によりメチル化がどのように変化するのか、今回の結果と比較する必要がある。3 つ目としては今回の研究の対照群は全例日本人のみで行っており、人種間の違いを検討する必要もあると考える。

また、大うつ病は単一の遺伝子疾患ではなく、複合的な要素が関係していると考えられており、今回検討した BDNF 遺伝子以外にセロトニン・トランスポーター遺伝子など大うつ病に密接な関連が報告されている遺伝子についても同様の解析を行っていく必要があると考える。

おわりに

うつ病の診断バイオマーカーの探索という観点から末梢血由来の BDNF 遺伝子を対象とした DNA メチル化プロフィールの解析を行うことで、メチル化プロフィールが大うつ病のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。本研究で試みたような精神疾患を対象とした DNA メチル化の解析による結果を、臨床症状や脳機能画像検査と組み合わせることによって、客観的な精神疾患の診断の開発に貢献することが期待される。

謝辞：本研究を行うに際しまして、未治療うつ病患者の研究参加に協力いただきました先生方に深謝申し上げます(敬称略)。岡本泰昌，山脇成人(広島大学)，井上 猛，久住一郎，小山 司(北海道大学)，土山幸之助，寺尾 岳(大分大学)。

文献

- 1) Murray, C. J. and Lopez, A. D.: Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, **349**: 1436-1442, 1997.
- 2) 国立精神・神経医療研究センター: こころの健康についての疫学調査に関する研究, 2006.
- 3) 厚生労働省: 患者調査, 2008.
- 4) Mossner, R. et al.: Consensus paper of WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. *World J. Biol. Psychiatry*, **8** (3): 141-174, 2007.
- 5) Sullivan, P. F. et al.: Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am. J. Psychiatry*, **157**: 1552-1562, 2000.
- 6) Weaver, I. C. et al.: Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.*, **7**: 847-854, 2004.
- 7) Duman, R. S. and Monteggia, L. M.: A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry*, **59**: 1116-1127, 2006.
- 8) Fuchikami, M. et al.: DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor(BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. *PLoS ONE*, **6**(8), 2011.

Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia

Makoto Kinoshita,^{1†} Shusuke Numata,^{1†,*} Atsushi Tajima,² Shinji Shimodera,³ Issei Imoto² and Tetsuro Ohmori¹

¹Department of Psychiatry; Course of Integrated Brain Sciences; Medical Informatics; Institute of Health Biosciences; The University of Tokushima Graduate School; Tokushima, Japan; ²Department of Human Genetics; Institute of Health Biosciences; The University of Tokushima Graduate School; Tokushima, Japan; ³Department of Neuropsychiatry; Kochi Medical School; Kochi University; Kochi, Japan

[†]These authors contributed equally to this work.

Keywords: homocysteine, epigenetics, DNA methylation, schizophrenia, psychosis, 450K, microarray

Abbreviations: SCZ, schizophrenia; CGI, CpG island; UTR, untranslated region; VMAT2, vesicular transporter type2

Schizophrenia (SCZ) is a devastating psychiatric disorder with a median lifetime prevalence rate of 0.7–0.8%. Elevated plasma total homocysteine has been suggested as a risk factor for SCZ, and various biological effects of hyperhomocysteinemia have been proposed to be relevant to the pathophysiology of SCZ. As increased attention is paid to aberrant DNA methylation in SCZ, homocysteine is attracting additional interest as a potential key substance. Homocysteine is formed in the methionine cycle, which is involved in one-carbon methyl group-transfer metabolism, and it acts as a methyl donor when it is converted to S-adenosyl-methionine. To date, no studies have examined the relationship between homocysteine and genome-wide DNA methylation in SCZ. We examined the relationship between plasma total homocysteine and DNA methylation patterns in the peripheral leukocytes of patients with SCZ (n = 42) using a quantitative high-resolution DNA methylation array (485,764 CpG sites). Significant homocysteine-related changes in DNA methylation were observed at 1,338 CpG sites that were located across whole gene regions, including promoters, gene bodies and 3'-untranslated regions. Of the 1,338 sites, 758 sites (56.6%) were located in the CpG islands (CGIs) and in the regions flanking CGIs (CGI: 15.8%; CGI shore: 28.2%; CGI shelf: 12.6%), and positive correlations between plasma total homocysteine and DNA methylation were observed predominantly at CpG sites in the CGIs. Our results suggest that homocysteine might play a role in the pathogenesis of SCZ via a molecular mechanism that involves alterations to DNA methylation.

Introduction

Schizophrenia (SCZ) is a devastating psychiatric disorder with a median lifetime prevalence rate of 0.7–0.8%.¹ Elevated plasma total homocysteine has been suggested as a risk factor for SCZ,^{2,3} and hyperhomocysteinemia has been proposed to contribute to the pathophysiology of SCZ via various biological effects, such as a partial antagonist of the glutamate site of the N-methyl-D-aspartate receptor,⁴ the interferer of oxygen delivery by damaging placental vasculature,² DNA damage and cell cytotoxicity,⁵ neuronal apoptosis⁶ and mitochondrial nitric oxide accumulation.⁷

Recently, accumulating evidence has shown that DNA methylation is also implicated in SCZ.^{8–27} As more attention is paid to DNA methylation, homocysteine has been recognized as a potentially key substance. Homocysteine is formed during the methionine cycle, is involved in one-carbon methyl group-transfer metabolism and acts as a methyl donor when it is converted to S-adenosyl-methionine. Several studies have reported an association between hyperhomocysteinemia and aberrant

DNA methylation in several diseases, including atherosclerosis, osteoporosis, uremia and alcoholism.^{28–31} Furthermore, Fryer and colleagues reported a significant correlation between cord blood-plasma total homocysteine and DNA methylation at numerous CpG sites.³² These studies led us to hypothesize that hyperhomocysteinemia in SCZ might have an impact on the DNA methylation levels in specific genes. However, to date, there are no reports that examine the relationship between homocysteine and genome-wide DNA methylation in SCZ.

To gain further insight into the pathogenic mechanisms that underlie hyperhomocysteinemia in SCZ, we examined the relationship between plasma total homocysteine and DNA methylation patterns in the peripheral leukocytes of patients with SCZ by using a quantitative high-resolution DNA methylation array.

Results

Differences in plasma total homocysteine between patients with SCZ and controls. The mean plasma total homocysteine

*Correspondence to: Shusuke Numata; Email: shu-numata@umin.ac.jp
Submitted: 02/17/13; Revised: 04/05/13; Accepted: 04/09/13
<http://dx.doi.org/10.4161/epi.24621>

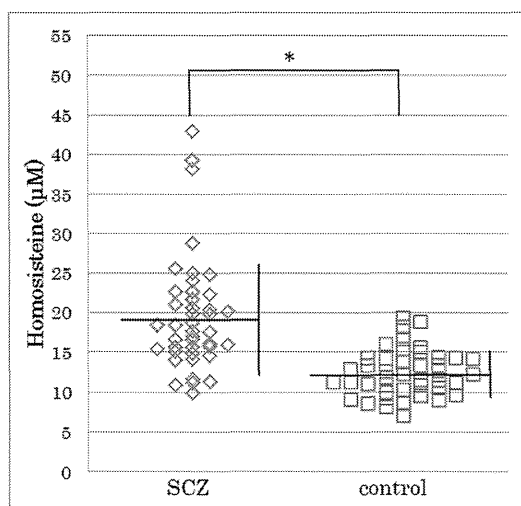


Figure 1. Plasma total homocysteine levels of patients with schizophrenia and controls. Blue dots represent plasma total homocysteine levels of patients with SCZ. Red dots represent plasma total homocysteine levels of controls. The mean plasma total homocysteine level in patients with SCZ ($n = 42$) was 19.5 ± 7.2 nmol/mL (mean \pm SD), and the level in the control subjects ($n = 42$) was 12.4 ± 2.9 nmol/mL (mean \pm SD). The plasma total homocysteine levels of the patient group were significantly higher than those of the control group (Mann–Whitney U test, $p < 0.0001$).

level in patients with SCZ ($n = 42$) was 19.5 ± 7.2 nmol/mL (mean \pm SD), and the level in the control subjects ($n = 42$) was 12.4 ± 2.9 nmol/mL (mean \pm SD). The plasma total homocysteine levels of the patient group were significantly higher than those of the control group ($p < 0.0001$), as shown in Figure 1.

Relationship between plasma total homocysteine and genome-wide DNA methylation patterns in patients with SCZ. Of the 164,657 CpG sites analyzed, significant plasma total homocysteine-related changes in DNA methylation were observed at 1,338 sites ($p < 0.01$). The top 10-ranking CpG sites significantly associated with plasma total homocysteine are shown in Table 1, and the top 100-ranking CpG sites are shown in Table S1. Examples include two CpG sites in the *SLC18A2* and the *GNAL* genes (Fig. 2). Both of these genes have been implicated in SCZ.^{33–36} When these 1,338 CpG sites were classified into four different categories according to their location in the genes [promoter, gene body, 3'-untranslated regions (UTRs) and intergenic region], 425 sites (31.8%) were located in the promoter regions, 414 sites (30.9%) in gene bodies and 34 sites (2.5%) in 3'-UTRs (Fig. 3A). When these 1,338 CpG sites were classified into four categories according to the CpG content in the genes [CpG island (CGI), CGI shore, CGI shelf, and others], 212 sites (15.8%) were located in the CGIs, 377 sites (28.2%) in CGI shores, and 169 sites (12.6%) in CGI shelves (Fig. 3B; Table S2). Of the significant 212 CpG sites in the CGIs, 74 sites (34.9%) were located in the promoter regions.

Of the 1,338 significant CpG sites, positive correlations of plasma total homocysteine with DNA methylation were observed at 580 sites (43.3%), and negative correlations were observed at

758 sites (56.7%). Positive correlations were found predominantly at CpG sites in the CGIs. The percentage of the CpG sites with positive correlations, which were located in the CGIs, CGI shores, and CGI shelves, were 71.7%, 50.1% and 23.7%, respectively (Fig. 4).

Discussion

In this study, we demonstrated that patients with SCZ had significantly elevated plasma total homocysteine levels compared with the controls' levels, and this result is consistent with the results of a previous meta-analysis.³ We also performed a genome-wide DNA methylation profiling of the peripheral leukocytes in the same subjects with SCZ, and examined the relationship between plasma total homocysteine and DNA methylation patterns. We identified plasma total homocysteine-related changes in DNA methylation at numerous CpG sites. To our knowledge, this is the first study to examine the relationship between plasma total homocysteine and genome-wide DNA methylation in SCZ.

The present study demonstrated that significant correlations between plasma total homocysteine and DNA methylation were observed at CpG sites not only in the promoter regions but also in the gene bodies, and 3'-UTRs. Thus, plasma total homocysteine might affect DNA methylation across whole gene regions. Furthermore, plasma total homocysteine was significantly correlated with DNA methylation at CpG sites not only in the CGIs but also in CGI shores and CGI shelves. Consistent with a previous genome-wide DNA methylation study using cord blood-plasma total homocysteine,³² both positive and negative correlations between plasma total homocysteine and DNA methylation were observed in this study. Notably, the proportions of the CpG sites with positive correlations differed among these three categories (CGI: 71.7%; CGI shore: 50.1%; and CGI shelf: 23.7%). These results suggest that plasma total homocysteine might influence DNA methylation depending on CpG densities.

To date, only one study has examined an association between homocysteine and DNA methylation in patients with SCZ: Bromberg and colleagues measured plasma total homocysteine and global blood DNA methylation in patients with SCZ by using a modification of the radiolabeled [³H]dCTP-extension assay, and they failed to find a significant association.¹⁰ This result suggests that DNA methylation must be analyzed at a gene-specific level in studies of SCZ. When we focused on specific genes that demonstrated significant correlations in our study, several genes of these genes, such as *SLC18A2*, *GNAL*, *KCNH2* and *NTNG2*, have been implicated in SCZ. *SLC18A2* encodes the vesicular transporter type2 (*VMAT2*), which transports monoamines into the synaptic vesicles.³⁷ Genetic variations of this gene have been associated with SCZ and cognitive functioning in patients with psychotic disorder.^{34,36,38} *GNAL* encodes guanine nucleotide-binding protein G subunit α , and altered expression of this gene in the brain is associated with functional changes of dopamine D1 receptor.³³ This gene is located in the region of chromosome 18p11.2, and this region has been implicated in susceptibility to bipolar disorder and SCZ.^{33,35,39} *KCNH2* is a member of a family that provides instructions for making potassium channels and

Table 1. The top 10-ranking of CpG sites significant associated with plasma homocysteine

Ranking	Probe ID	Minimum β value across samples	Maximum β value across samples	Standardized coefficient of plasma total homocysteine	P-value of plasma total homocysteine	Coefficient of age	P-value of age	Coefficient of CP equivalent dose	P-value of CP equivalent dose	Chromo-some	Position*	UCSC RefGene name	UCSC RefGene group	Relation to UCSC CpG island
1	cg04579505	0.123	0.272	0.765	5.98E-07	2.10.E-02	2.80.E-01	-5.39.E-04	2.49.E-02	16	67261564	<i>LRRC29</i>	Promoter	CGI shore
2	cg01546563	0.132	0.302	0.701	8.66E-06	7.59.E-02	6.71.E-04	-7.42.E-04	4.63.E-03	8	11567189	<i>GATA4</i>	Gene body	CGI shore
3	cg12423733	0.107	0.375	0.707	1.12E-05	2.22.E-02	2.97.E-01	-4.30.E-04	9.64.E-02	6	29454623	<i>MASTL</i>	Promoter	Others
4	cg03004330	0.126	0.366	0.695	1.53E-05	6.04.E-02	6.66.E-03	-7.19.E-04	7.19.E-03	10	13934438	<i>FRMD4A</i>	Gene body	CGI shore
5	cg08607821	0.825	0.897	-0.697	2.06E-05	-7.35.E-02	1.55.E-03	2.05.E-04	4.35.E-01	13	24915164	—	Intergenic	CGI shore
6	cg04364311	0.671	0.824	-0.682	3.07E-05	-7.71.E-02	1.01.E-03	2.33.E-04	3.76.E-01	3	101231003	<i>SENP7</i>	Gene body	CGI shore
7	cg23158877	0.131	0.431	-0.685	3.24E-05	-6.68.E-02	4.01.E-03	4.66.E-04	8.42.E-02	11	86012876	<i>C11orf73</i>	Promoter	Others
8	cg05360577	0.134	0.279	0.672	3.62E-05	7.58.E-02	1.17E-03	-5.40.E-04	4.43.E-02	11	17717629	—	Intergenic	CGI
9	cg24606762	0.101	0.391	0.674	4.10E-05	4.10.E-02	6.80.E-02	-5.92.E-04	3.01.E-02	20	61806972	—	Intergenic	CGI
10	cg11653336	0.756	0.894	-0.675	4.30E-05	-2.80.E-02	2.10.E-01	-1.22.E-05	9.63.E-01	12	133465188	<i>CHFR</i>	Promoter	CGI shore

*Positions refer to Genome Research Consortium human genome build 37 (GRCh37)/UCSC human genome 19 (hg19).

that modulates neuronal firing. Altered *KCNH2* expression in the hippocampus in SCZ, and a genetic association of this gene with SCZ and SCZ-related neuropsychological deficits in healthy subjects have been reported.^{40,41} The *NTNG2* gene plays a role in synaptic formation and maintenance.^{42,43} Altered the *NTNG2* gene expression in postmortem brains in SCZ and the genetic associations of this gene with SCZ have been reported.⁴⁴

There are several limitations to the present study. First, the sample size was not large and the risk of potential false-positive results due to multiple testing must be considered. Replication studies with larger samples are necessary. Second, the number of CpG sites that have been analyzed was limited, although the 450K microarray is one of the most powerful tools currently available for assessing DNA methylation changes. Third, the subjects analyzed were chronic patients with SCZ who were receiving treatment with various antipsychotic medications. Antipsychotic drugs are known to influence DNA methylation status.^{19,20,45,46} Fourth, some genetic variants, clinical symptoms, and other components of the methionine cycle, such as S-adenosyl-methionine, folic acid, and vitamin B₁₂, might be involved in variations of DNA methylation and plasma total homocysteine.^{21,47-52} Finally, hyperhomocysteinemia has been identified as an independent risk factor for several neurological disorders, such as depression and dementia, in addition to SCZ,^{3,53-55} so further disease-specific DNA methylation analysis will be necessary.

In summary, significant correlations between plasma total homocysteine and DNA methylation were identified at numerous CpG sites in patients with SCZ, and these results suggest that homocysteine might play a role in the pathogenesis of SCZ via a molecular mechanism involving alterations to DNA methylation.

Materials and Methods

Subjects. Forty-two male patients with SCZ (mean age: 51.8 ± 6.7 y) were recruited from Tokushima and Kochi University Hospitals in Japan. The diagnosis of SCZ was made according to DSM-IV criteria by at least two expert psychiatrists on the basis of extensive clinical interviews and a review of medical records. None of the patients had any psychiatric comorbidity or cardiovascular diseases. All patients were treated with various antipsychotic drugs. The mean chlorpromazine equivalent dose was 829.2 ± 498.2 mg/d. Forty-two male control subjects, well matched for age (mean age: 51.9 ± 5.5 y), were selected from volunteers who were recruited from hospital staff, students, and company employees documented to be free from psychiatric problems, past histories of mental illness and medications, including vitamin supplements. All subjects who participated in this study were of unrelated Japanese origin. All subjects signed written informed consent approved by the institutional ethics committees of the University of Tokushima Graduate School and Kochi Medical School.

Plasma total homocysteine analysis. Plasma total homocysteine levels were measured by high performance liquid chromatography. Homocysteine was labeled with 4-fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan and detected by a fluorescent detector according to the method of previous studies.¹⁰

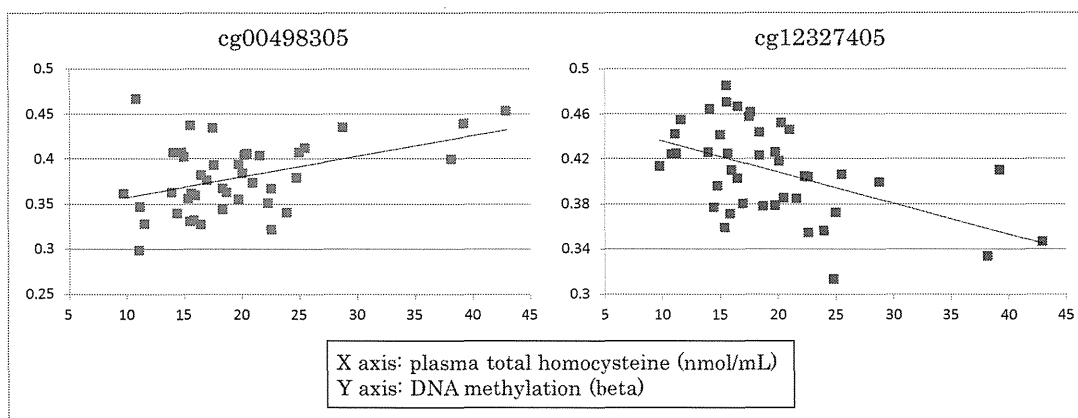


Figure 2. Two CpG sites in the *SLC18A2* (cg00498305) and *GNAL* (cg12327405) genes, which have been implicated in SCZ. A significant positive correlation of plasma total homocysteine with DNA methylation was observed at cg00498305 located in the CGI shore in the promoter region of the *SLC18A2* gene ($p = 1.67E-03$). A significant negative correlation of plasma total homocysteine with DNA methylation was observed at cg12327405 in the CGI in the promoter region of the *GNAL* gene ($p = 2.85E-04$). [X-axis: plasma total homocysteine (nmol/mL); Y-axis: DNA methylation (β)].

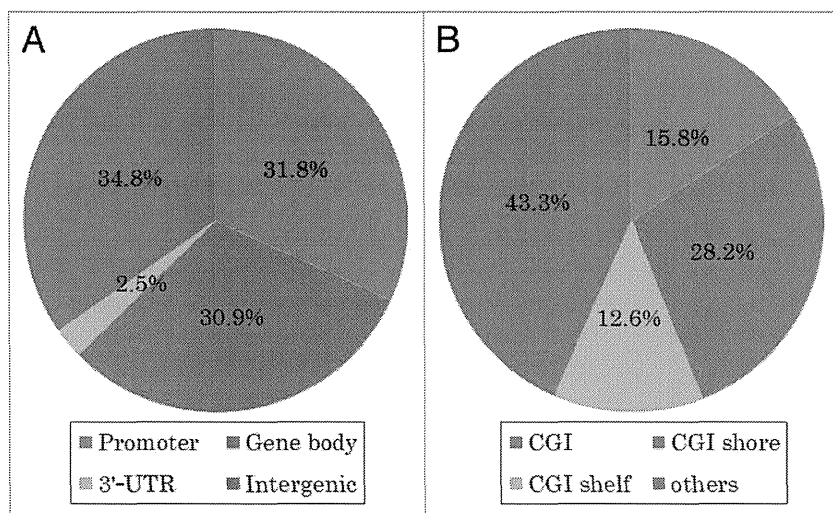


Figure 3. Percentages of 1,338 CpG sites at which plasma total homocysteine and DNA methylation were significantly correlated. (A) Of the 1,338 CpG sites, 425 (31.8%) were located in promoter regions, 414 (30.9%) were located in gene bodies and 34 (2.5%) were located in 3'-UTRs. (B) Of the 1,338 CpG sites, 212 (15.8%) were located in CGIs, 377 (28.2%) were located in CGI shores and 169 (12.6%) were located in CGI shelves.

DNA methylation methods. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the phenol-chloroform method. Bisulfite conversion of 500 ng of genomic DNA was performed with the EZ DNA methylation kit (Zymo Research). DNA methylation level was assessed with Infinium® HumanMethylation450 BeadChips (Illumina Inc.) according to the manufacturer's instructions. The technical schemes, accuracy, and high reproducibility of this array have been described in previous papers.⁵⁶⁻⁵⁸ Quantitative measurements of DNA methylation were determined for 485,764 CpG dinucleotides

that covered 99% of the RefSeq genes and were distributed across whole gene regions, including promoters, gene bodies, and 3'-UTRs. The arrays also covered 96% of the CGIs from the UCSC database with additional coverage in CGI shores (0–2 kb from CGI) and CGI shelves (2–4 kb from CGI). Detailed information on the contents of the array is available in the Infinium HumanMethylation450 User Guide, HumanMethylation450 manifest (www.illumina.com) and recent papers.^{56,58} DNA methylation data was analyzed using the methylation analysis module within the BeadStudio software (Illumina Inc.). DNA methylation status of the CpG sites was calculated as the ratio of the signal from a methylated probe relative to the sum of both methylated and unmethylated probes. This value, known as β , ranges from 0 (completely unmethylated) to 1 (fully methylated). For intra-chip normalization of the probe intensities, colored balance and background corrections in every set of 12 samples from the same chip were performed using internal control probes. X chromosome CpG sites in the CGIs in the *AR* gene as well as the internal control probes were checked to validate the DNA methylation measurements, as in a previous study.⁵⁹ Of the 485,764 CpG sites, the loci that have β -values of < 0.1 or > 0.9 were eliminated, as in previous studies.^{32,60} The loci that are potentially confoundable with single nucleotide polymorphisms with a minor allele frequency of > 0.1 in the HapMap-JPT population were also removed because DNA methylation is associated with genotypic variants.⁶¹ The final data set includes 164,657 CpG sites.

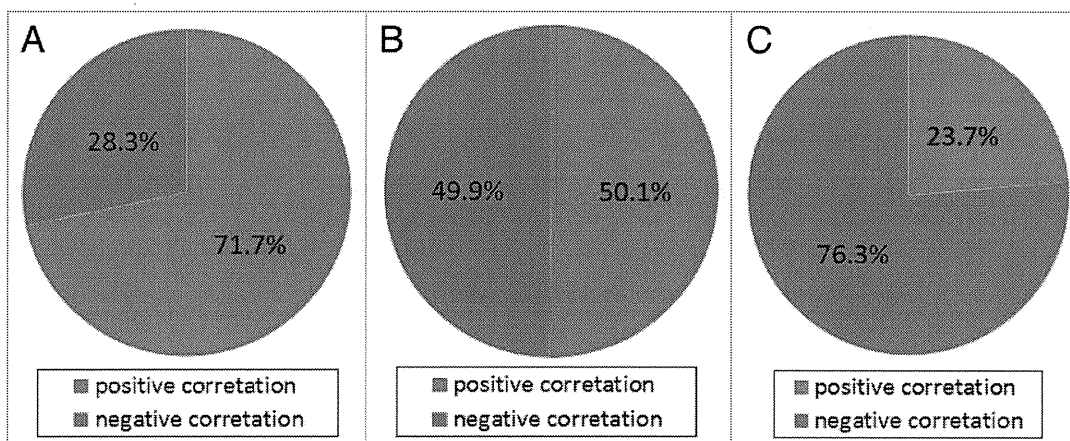


Figure 4. Percentage of CpG sites with positive correlations, located in CGIs, CGI shores and CGI shelves. (A) Of the 212 CpG sites located in the CGIs, 152 (71.7%) showed positive correlations between plasma total homocysteine and DNA methylation. (B) Of the 377 CpG sites located in the CGI shores, 189 (50.1%) showed positive correlations between plasma total homocysteine and DNA methylation. (C) Of the 169 CpG sites located in the CGI shelves, 40 (23.7%) showed positive correlations between plasma total homocysteine and DNA methylation.

Statistical methods. Differences in plasma total homocysteine levels between the two groups were examined using a Mann–Whitney U test. The influences of plasma total homocysteine on DNA methylation was examined with a multiple linear regression analysis adjusted for age and chlorpromazine equivalent dose as potential confounders, after standardizing DNA methylation β and plasma total homocysteine values with Z-scores across the samples.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors would like to thank all the volunteers, who understood our study purpose and participated in this study, and the

physicians, who helped us to collect clinical data and blood samples at the mental hospitals. The authors would also like to thank Akemi Okada and Kumiko Kikuchi for their technical assistance. The authors also thank Dr Jörg Tost for his valuable comments and suggestions on SNP-associated probes in the Illumina HumanMethylation450 platform. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (24791216), SENSHIN Medical Research Foundation and the Research Group For Schizophrenia.

Supplemental Materials

Supplemental materials may be found here:

www.landesbioscience.com/journals/epigenetics/article/24621

References

- Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med* 2005; 2:e141; PMID:15916472; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0020141>.
- Brown AS, Borgiglieri T, Schaefer CA, Quesenberry CP Jr, Liu L, Bresnahan M, et al. Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64:31-9; PMID:17199052; <http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.64.1.31>.
- Muntjewerff JW, Kahn RS, Blom HJ, den Heijer M. Homocysteine, methyltetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2006; 11:143-9; PMID:16172608; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001746>.
- Dietrich-Muszalska A, Malinowska J, Olas B, Głowacki R, Bald E, Wachowicz B, et al. The oxidative stress may be induced by the elevated homocysteine in schizophrenic patients. *Neurochem Res* 2012; 37:1057-62; PMID:22270909; <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-012-0707-3>.
- Liu CC, Ho WY, Leu KL, Tsai HM, Yang TH. Effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage and cell cytotoxicity in murine hepatic and microglia cell lines. *J Biochem Mol Toxicol* 2009; 23:349-56; PMID:19827130; <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.20298>.
- Kruman II, Culmseer C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 2000; 20:6920-6; PMID:10995836.
- Tyagi N, Moshal KS, Ovechkin AV, Rodriguez W, Steed M, Henderson B, et al. Mitochondrial mechanism of oxidative stress and systemic hypertension in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem* 2005; 96:665-71; PMID:16149054; <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20578>.
- Abdolmaleky HM, Cheng KH, Faraone SV, Wilcox M, Glatt SJ, Gao F, et al. Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 2006; 15:3132-45; PMID:16984965; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl253>.
- Abdolmaleky HM, Yaqubi S, Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Sivaraman V, et al. Epigenetic dysregulation of HTR2A in the brain of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res* 2011; 129:183-90; PMID:21550210; <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2011.04.007>.
- Bromberg A, Levine J, Nemetz B, Belmaker RH, Agam G. No association between global leukocyte DNA methylation and homocysteine levels in schizophrenia patients. *Schizophr Res* 2008; 101:50-7; PMID:18276118; <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2008.01.009>.
- Carrard A, Salzmann A, Malafosse A, Karege F. Increased DNA methylation status of the serotonin receptor *5HTR1A* gene promoter in schizophrenia and bipolar disorder. *J Affect Disord* 2011; 132:450-3; PMID:21453976; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2011.03.018>.
- Chen Y, Zhang J, Zhang L, Shen Y, Xu Q. Effects of MAOA promoter methylation on susceptibility to paranoid schizophrenia. *Hum Genet* 2012; 131:1081-7; PMID:22198720; <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-011-1131-5>.
- Dempster EL, Mill J, Craig IW, Collier DA. The quantification of COMT mRNA in post mortem cerebellum tissue: diagnosis, genotype, methylation and expression. *BMC Med Genet* 2006; 7:10; PMID:16483362; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-7-10>.
- Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, et al. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 2011; 20:4786-96; PMID:21908516; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr416>.