

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 a previous study.⁵²

MTHFR Genotyping

We genotyped the *MTHFR* C677T polymorphism by using a commercially available TaqMan probe with the Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System, according to the protocol recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, California, USA). Twelve percent of the genotypes were genotyped again, and there were no mismatches between the 2 genotyping steps.

Study Selection for the Meta-analysis of Association Studies Between Blood Homocysteine Levels and Schizophrenia

Eligible studies were identified using the PubMed search engine with the terms “homocysteine,” “hyperhomocysteinemia,” and “schizophrenia.” We also conducted an additional manual search of reference lists and review articles. Studies meeting the following criteria were included for further meta-analysis: (1) included laboratory assessment of serum or plasma homocysteine levels, (2) performed a case-control study (schizophrenia vs control), (3) provided raw data of homocysteine levels separately by gender, and (4) published in an English language. The 2 reviewers (N.S. and K.K.) selected the articles independently according to the inclusion criteria, and then discussed the articles until they reached a consensus on every study used for the meta-analysis.

Statistical Methods

A linear regression analysis was used to examine the effects of diagnosis, age, gender, and the *MTHFR* C677T genotypes on the plasma total homocysteine. An ANCOVA was performed to examine the presence of the differences in the plasma total homocysteine between the 2 groups (schizophrenia vs control) separately by gender and by the 3 *MTHFR* C677T genotypes (total of 6 strata). Allelic and genotypic frequencies of the *MTHFR* C677T polymorphism in patients and control subjects were compared using the χ^2 test. In order to quantify the strength of association between plasma total homocysteine and schizophrenia, an MR approach was used, as in a previous study.⁵³ The risk estimate in gene-schizophrenia association for the TT genotypes of the *MTHFR* C677T polymorphism (vs the CC genotypes; $OR_{SCZ/TT}$) was from the current meta-analysis of the Japanese genetic association studies. For gene-homocysteine association, the effect of the TT genotypes (vs

the CC genotypes) on plasma total homocysteine levels ($\beta_{\text{hcy/TT}}$) was estimated using the Japanese control subjects from the Tokushima homocysteine study under a multivariate linear regression model including age and gender as covariates. The effect for the TT genotypes in the gene-homocysteine association was expressed as 1-SD increase in plasma total homocysteine. From these 2 estimates, an MR estimate of the effect of plasma total homocysteine on the risk of schizophrenia ($OR_{SCZ/hcy}$) was calculated as follows: $\log OR_{SCZ/hcy} = (\log OR_{SCZ/TT})/\beta_{\text{hcy/TT}}$. The MR estimate represented the OR for schizophrenia risk per 1-SD increase in plasma total homocysteine. The standard error (SE) of the MR estimate was calculated by the Delta method.^{54,55}

Meta-analysis

The meta-analysis of association studies between the blood homocysteine levels and schizophrenia was performed on the standardized mean differences (SMD). The meta-analysis of association studies between the *MTHFR* C677T polymorphism and schizophrenia was performed for 5 genetic models, recessive (CC/CT vs TT genotypes), dominant (CC vs CT/TT genotypes), codominant (CC vs TT genotypes), codominant (CT vs TT genotypes), and allele frequency (C-allele vs T-allele), as had been done in a previous study.⁴⁵ Heterogeneity was assessed using the I^2 statistic. If heterogeneity across studies was found, then a random-effects model was applied; otherwise, a fixed-effects model was applied. Publication bias was assessed using funnel plots and a regression test.⁵⁶ OR and 95% CI were calculated by “metafor,” an R package.

Results

Differences in the Plasma Total Homocysteine Levels Between Patients With Schizophrenia and Controls

A linear regression analysis showed significant effects of diagnosis (higher in schizophrenic patients than in controls), *MTHFR* C677T genotypes (higher in CT carriers than in CC carriers, and higher in TT carriers than in CC carriers), age (decreases with age), and gender (higher in males than in females) on the plasma total homocysteine levels (diagnosis $P = 3.4 \times 10^{-29}$, genotype P [CT vs CC] = 4.7×10^{-3} , genotype P [TT vs CC] = 5.8×10^{-43} , age $P = 1.0 \times 10^{-2}$, and gender $P = 1.3 \times 10^{-26}$). Next, an ANCOVA was performed to examine the presence of the differences between the 2 groups in the plasma total homocysteine separately by gender and by the 3 *MTHFR* C677T genotypes (total of 6 strata), and a significant effect of diagnosis (higher in patients with schizophrenia than in the control) was still observed in all strata (diagnosis P of male-genotype CC = 2.4×10^{-8} , diagnosis P of male-genotype CT = 3.2×10^{-10} , diagnosis P of male-genotype TT = 2.3×10^{-4} , diagnosis P of female-genotype CC = 1.1×10^{-8} , diagnosis P of female-genotype CT = 3.2×10^{-8} , and diagnosis

P of female-genotype TT = 1.2×10^{-5} , respectively) after adjustment for age (figure 1).

A Meta-analysis of the Blood Homocysteine Levels in Schizophrenia

We performed a meta-analysis of previous association studies between the blood homocysteine levels and schizophrenia separately by gender. The studies included in this meta-analysis are shown in the supplementary table 1. For the meta-analysis of males, data were obtained from 12 association studies,^{5,6,8,10,11,13,17,20,21,25,28} including our data, for a total of 1079 patients with schizophrenia and 1559 control subjects. As shown in figure 2A, the random-effects model showed that the blood homocysteine levels were significantly higher in male patients with schizophrenia than in the male controls (SMD = 0.76; 95% CI = 0.30–1.22; $P = 1.2 \times 10^{-3}$) with significant heterogeneity among studies ($I^2 = 96.3\%$; $P < .05$). The funnel plot analysis indicated no evidence of publication bias in the male association studies ($P = .13$; supplementary figure 1). For the meta-analysis of females, data were obtained from 10 association studies,^{5,6,8,10,11,13,17,25,28} including our data, for a total of 615 patients with schizophrenia and 1461 control subjects. As shown in figure 2B, the random-effects model showed that the blood homocysteine levels were significantly higher in female patients with schizophrenia than in the female controls (SMD = 0.50; 95% CI = 0.31–0.70; $P = 5.9 \times 10^{-7}$) with significant heterogeneity among the studies ($I^2 = 65.7\%$; $P < .05$). The funnel plot analysis indicated no evidence of publication bias in the female association studies ($P = .73$; supplementary figure 2).

A Case-Control Association Study Between the MTHFR C677T Polymorphism and Schizophrenia

Two case-control data sets were evaluated: one is the Tokushima sample set (case = 1149, control = 2742), and the other is the Osaka sample set (case = 621, control = 486). The genotypic distributions of rs1801133 did not deviate significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the control groups of these 2 sample sets ($P > .05$). Significant difference was observed between the controls and patients with schizophrenia in the allelic frequencies of the Tokushima sample set ($P = .025$). On the other hand, no significant differences were observed in the genotypic and allelic frequencies of the Osaka sample set (genotype $P = .98$, and allele $P = .97$, respectively).

A Meta-analysis of Genetic Association Studies Between the MTHFR C677T Polymorphism and Schizophrenia

Six association studies on Japanese subjects, including the 2 data sets from this study, were used for the

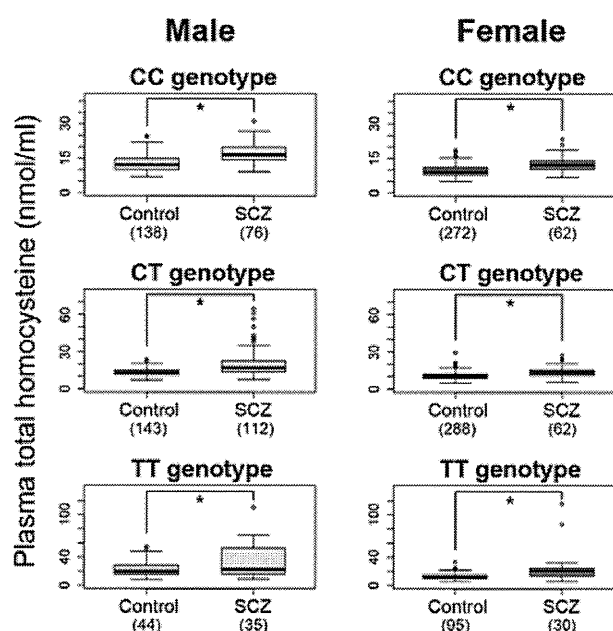


Fig. 1. Differences in the plasma total homocysteine levels between patients with schizophrenia and controls separately by gender and by the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T genotypes. The ANCOVA demonstrated that the plasma total homocysteine levels were significantly higher in patients with schizophrenia than in controls in each of the 6 strata (*age-adjusted $P < .001$).

meta-analysis.^{37–40} The genotypic distributions and allelic frequencies of rs1801133 in each study are shown in the supplementary table 2. The diagnosis of schizophrenia was made according to DSM-IV criteria in 5 studies, and it was made according to DSM-III criteria in the remaining study. A total of 4316 cases and 6062 controls were included in this analysis. Genotypic distribution of this SNP did not deviate significantly from the HWE in any control group across the 6 studies ($P > .05$). Significant heterogeneity was not detected at this SNP among the studies for the 5 genetic models ($P > .05$). The funnel plot analysis indicated no evidence of publication bias for all genetic models ($P > .05$). The results of ORs and CI analyzed by the fixed-effects model for all genetic models and the risk of schizophrenia are shown in table 1. Of these 5 genetic models, significant associations were found in 4 models. The highest OR was observed in the codominant model (CC vs TT genotypes; figure 3; OR = 1.16, 95% CI = 1.03–1.31, $P = 1.4 \times 10^{-2}$, in the fixed-effects model).

Effect of Plasma Total Homocysteine Levels on Schizophrenia Risk in an MR Study

From the current meta-analysis of the Japanese genetic association studies, the pooled OR (the TT vs CC genotypes) for the effect of the *MTHFR* C677T polymorphism on schizophrenia risk was 1.16 (95% CI = 1.03–1.31). In multivariate gene-homocysteine association analysis in the

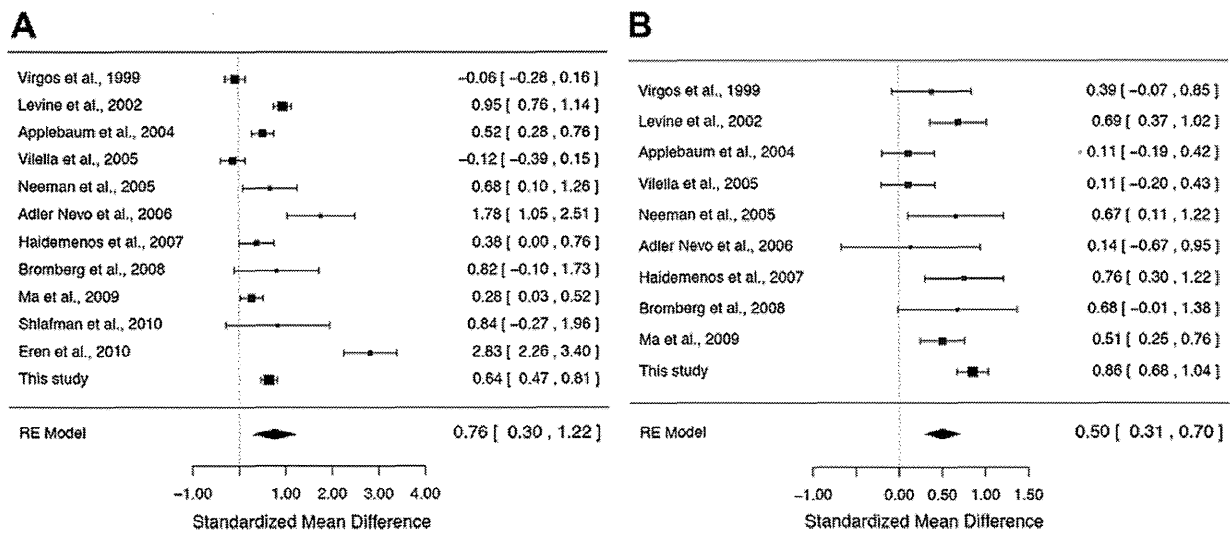


Fig. 2. Meta-analyses of association studies between the blood homocysteine levels and schizophrenia. (A) The result of the meta-analysis of 12 male association studies ($N = 2638$). The blood homocysteine levels were significantly higher in male patients with schizophrenia than in the male controls (standardized mean difference [SMD] = 0.76; 95% CI = 0.30–1.22; $P = 1.2 \times 10^{-3}$ in the random-effects model). (B) The result of the meta-analysis of 10 female association studies ($N = 2076$). The blood homocysteine levels were significantly higher in female patients with schizophrenia than in the female controls (SMD = 0.50; 95% CI = 0.31–0.70; $P = 5.9 \times 10^{-7}$ in the random-effects model).

Table 1. The Results of OR and 95% CI analyzed by the Fixed-Effects Model for All Genetic Models and each P Value in the Meta-analysis for methylenetetrahydrofolate reductase C677T

Model	OR	95% CI	P Value
Recessive (CC/CT vs TT)	1.14	1.03–1.27	.016
Dominant (CC vs CT/TT)	1.06	0.98–1.16	.147
Codominant (CC vs TT)	1.16	1.03–1.31	.014
Codominant (CT vs TT)	1.13	1.00–1.26	.042
Allelic (C vs T)	1.07	1.01–1.13	.022

Japanese control subjects genotyped ($n = 980$ with a SD for plasma total homocysteine levels of 4.84 nmol/ml), the effect on plasma total homocysteine levels, expressed as 1-SD increase in homocysteine, was estimated to be 1.14 (95% CI = 0.96–1.33; $P = 1.1 \times 10^{-29}$) for the TT genotypes of the *MTHFR* C677T polymorphism (vs the CC genotypes), after adjustment for age and gender. When combining these 2 estimates by an MR approach, the effect of plasma total homocysteine on schizophrenia risk was statistically significant, representing the OR of 1.14 (95% CI = 1.03–1.27; $P = 1.6 \times 10^{-2}$) for schizophrenia per 1-SD increase in plasma total homocysteine (figure 4).

Discussion

In this study, we performed an association study between the plasma total homocysteine and schizophrenia with stratification by gender and by the *MTHFR* C677T genotypes and demonstrated significantly elevated plasma total homocysteine levels in patients with schizophrenia compared with controls, in both male and female

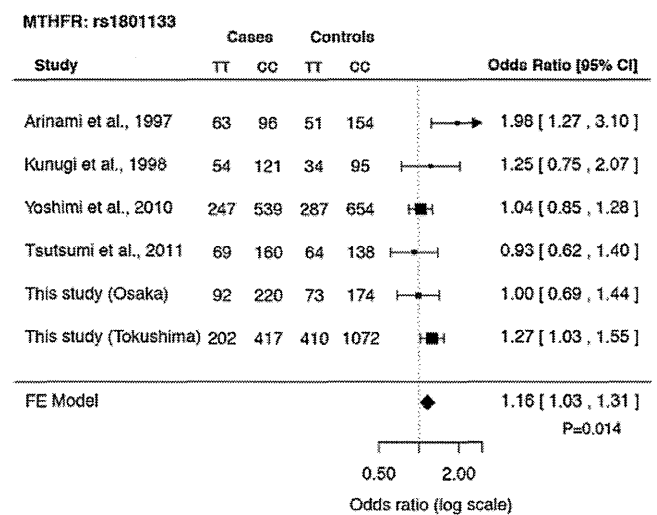


Fig. 3. A meta-analysis of genetic association studies on Japanese subjects between the *MTHFR* C677T polymorphism and schizophrenia. Six association studies on Japanese subjects, including the 2 data sets from this study, were used for the meta-analysis ($N = 10\ 378$). Significant associations between the *MTHFR* C677T polymorphism and schizophrenia were found in 4 models, and the result of the codominant model (CC vs TT genotypes) is shown (OR = 1.16, 95% CI = 1.03–1.31, $P = 1.4 \times 10^{-2}$ in the fixed-effects model).

subjects. The subsequent meta-analysis for gender supported this finding. To our knowledge, this is the first study to conduct a meta-analysis according to gender. The significant decrease in plasma total homocysteine levels with age in our multivariate linear regression

analysis was not consistent with a previous finding.³³ This discrepancy might be caused by disease status and gender of the subjects analyzed. When we examined the relationship between age and the plasma total homocysteine levels in a univariate linear regression model, a significant negative correlation was observed only in male subjects with schizophrenia (supplementary figure 3). Consistent with this finding, Levine et al⁵ reported that the difference in the plasma total homocysteine levels between patients and controls was attributable to young male patients with schizophrenia.

We also conducted a meta-analysis of genetic association studies between the *MTHFR* C677T polymorphism and schizophrenia based on Japanese subjects and demonstrated that the *MTHFR* C677T polymorphism was a risk factor for developing schizophrenia in the Japanese population, which is consistent with the results of previous meta-analyses.^{39,41–47,57} On the other hand, this polymorphism has not been identified as a risk locus for schizophrenia in the large genome-wide association studies.^{58,59} This discrepancy might be caused by ethnic differences (risk allele [T] frequencies from HapMap; Japanese 0.39, Caucasian 0.31, African American 0.12, and Mexican American 0.41) and a lack of adequate statistical power to detect the relatively small genetic effect of this polymorphism on schizophrenia at the genome-wide significant threshold.

Importantly, we demonstrated that increased homocysteine levels may be associated with an increased risk of developing schizophrenia by an MR approach. Hyperhomocysteinemia has been proposed as being part of the pathophysiology of schizophrenia due to its various biological effects, such as acting as a partial antagonist of the glutamate site of the *N*-methyl-D-aspartate receptor²³ and causing subtle placental vascular damage that interferes with oxygen delivery to the fetus,⁶⁰ DNA damage and cell cytotoxicity,⁶¹ neuronal apoptosis,⁶² and mitochondrial nitric oxide accumulation.⁶³ Homocysteine acts as a methyl donor when it is converted to *S*-adenosyl-methionine, and we recently demonstrated a significant association between the plasma total homocysteine and DNA methylation in schizophrenia, which suggests that homocysteine might play a role in the pathogenesis of schizophrenia via alterations to DNA methylation.⁶⁴ Homocysteine, *S*-adenosyl-methionine, DNA methylation, *MTHFR*, folate, and vitamin B12 are involved in 1-carbon metabolism, and abnormalities of these components in schizophrenia have been reported in previous studies.^{2,3,65} These lines of evidence suggest that disrupted 1-carbon metabolism may be an important role in the pathophysiology of schizophrenia.

The benefits of homocysteine-reducing strategies in schizophrenia have been shown in several studies. Levine et al⁶⁶ reported an improvement in the clinical symptoms of schizophrenic patients with hyperhomocysteinemia who were treated with folate, vitamin B12, and pyridoxine. Hill et al⁶⁷ reported an improvement in the negative symptoms

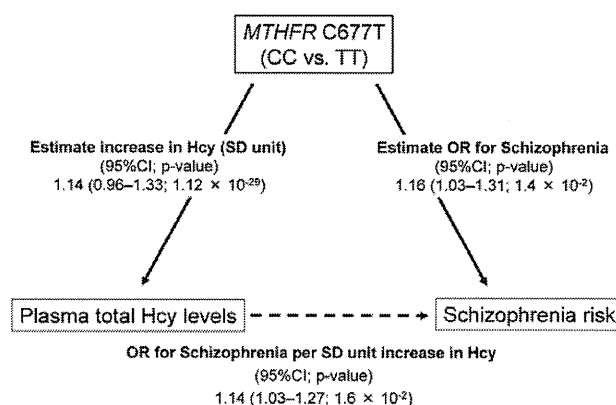


Fig. 4. Graphical representation of the mendelian randomization approach. The pooled OR (the TT vs CC genotypes) for the effect of the *MTHFR* C677T polymorphism on schizophrenia risk was 1.16 (95% CI = 1.03–1.31). The OR (the TT vs CC genotypes) for the effect of the *MTHFR* C677T polymorphism on plasma total homocysteine levels, expressed as 1-SD increase in homocysteine, was 1.14 (95% CI = 0.96–1.33; $P = 1.1 \times 10^{-29}$). The effect of plasma total homocysteine on schizophrenia risk by a mendelian randomization analysis was statistically significant, representing the OR of 1.14 (95% CI = 1.03–1.27; $P = 1.6 \times 10^{-2}$) for schizophrenia per 1-SD increase in plasma total homocysteine.

of schizophrenic patients who were treated with folate when the *MTHFR* C677T genotype was taken into account. Roffman et al⁶⁸ reported an improvement in the negative symptoms of schizophrenic patients who were treated with folate and vitamin B12 when 4 variants in the *FOLH1*, *MTHFR*, *MTR*, and *COMT* genes were taken into account. Further research will be necessary to identify the features of patients with schizophrenia who would benefit from homocysteine-reducing treatments. In cardiovascular diseases, which are also associated with hyperhomocysteinemia, clinical trials to identify a subgroup that appeared to benefit from homocysteine-lowering intervention have been performed^{69,70} although no benefits of homocysteine-lowering intervention on cardiovascular outcomes have been reported in randomized controlled trials.⁷¹

Many studies have indicated the potential contributions of the *MTHFR* C677T polymorphism to the pathophysiology of schizophrenia. This risk SNP has been associated with schizophrenic negative symptoms, aggressive behavior, and various phenotypes related to schizophrenia, such as cognitive function, episodic memory, gray matter density, and prefrontal function.^{72–80} Interestingly, pharmacogenetic studies have demonstrated that this risk SNP has also been involved in the antipsychotic drug response and metabolic syndrome treated with antipsychotics in schizophrenia.^{81–84}

There are some limitations to this study. First, we did not obtain genomic DNA from all participants in the association study between the plasma total homocysteine levels and schizophrenia. Second, all patients were treated with various antipsychotic drugs, and these medications might

influence the outcome. When we examined the relationship between equivalent dose and the plasma total homocysteine levels in subjects with schizophrenia by a univariate linear regression model, a positive correlation was observed in female subjects ($P = .03$). However, it did not reach statistical significance after correction for multiple comparisons. Third, there was heterogeneity among the studies in the meta-analysis for blood homocysteine, while significant heterogeneity was not observed in the meta-analysis for genetic association studies. This heterogeneity might be caused by other genetic variations, the clinical heterogeneity of the patients included, medications, and environmental factors, such as folic acid, vitamin B6, vitamin B12, obesity, smoking status, and caffeine consumption, although we did not take these confounding factors into consideration in our analysis. Fourth, the use of “well controls” in this case-control analysis might accentuate such confounding influences.⁸⁵ Fifth, this is a cross-sectional study, and MR has limitations on the ability to establish causal relationships between risk factors and outcomes.⁸⁶ So, the causality between schizophrenia and blood homocysteine levels must be still cautious. Notably, elevated maternal levels of homocysteine during the third trimester have been found to increase the risk of schizophrenia in the offspring.⁶⁰ Finally, hyperhomocysteinemia has been identified as an independent risk factor for several neurological disorders in addition to schizophrenia, such as depression and dementia.^{87,88} Further studies to examine how hyperhomocysteinemia is involved in the pathophysiology of each disease will be necessary.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first meta-analysis of association studies between blood homocysteine levels and schizophrenia according to gender, and we demonstrated elevated blood homocysteine levels in both male and female subjects with schizophrenia. The meta-analysis of genetic association studies using the Japanese subjects provided stringent evidence of association between the *MTHFR* C677T polymorphism and schizophrenia. Our MR analysis using the Japanese subjects suggests that increased plasma total homocysteine levels may be associated with an increased risk of developing schizophrenia.

Supplementary Material

Supplementary material is available at <http://schizophreniabulletin.oxfordjournals.org>.

Funding

Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency; Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (24791216); SENSHIN Medical Research Foundation; Research Group For Schizophrenia.

Acknowledgments

The authors would like to thank all of the volunteers who understood the purpose of our study and participated in this study, as well as the physicians who helped us to collect clinical data and blood samples at the mental hospitals. The authors would also like to thank Mrs Akemi Okada for her technical assistance. All authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

References

1. Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med*. 2005;2:e141.
2. Frankenburg FR. The role of one-carbon metabolism in schizophrenia and depression. *Harv Rev Psychiatry*. 2007;15:146–160.
3. Krebs MO, Bellon A, Mainguy G, Jay TM, Frieling H. One-carbon metabolism and schizophrenia: current challenges and future directions. *Trends Mol Med*. 2009;15:562–570.
4. Regland B, Johansson BV, Grenfeldt B, Hjelmgren LT, Medhus M. Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. *J Neural Transm Gen Sect*. 1995;100:165–169.
5. Levine J, Stahl Z, Sela BA, Gavendo S, Ruderman V, Belmaker RH. Elevated homocysteine levels in young male patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2002;159:1790–1792.
6. Applebaum J, Shimon H, Sela BA, Belmaker RH, Levine J. Homocysteine levels in newly admitted schizophrenic patients. *J Psychiatr Res*. 2004;38:413–416.
7. Muntjewerff JW, Hoogendoorn ML, Kahn RS, et al. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype, and the risk for schizophrenia: a Dutch population based case-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;135B:69–72.
8. Neeman G, Blanaru M, Bloch B, et al. Relation of plasma glycine, serine, and homocysteine levels to schizophrenia symptoms and medication type. *Am J Psychiatry*. 2005;162:1738–1740.
9. Lee YS, Han DH, Jeon CM, et al. Serum homocysteine, folate level and methylenetetrahydrofolate reductase 677, 1298 gene polymorphism in Korean schizophrenic patients. *Neuroreport*. 2006;17:743–746.
10. Adler Nevo G, Megeed S, Sela BA, Hanoch-Levi A, Hershko R, Weizman A. Homocysteine levels in adolescent schizophrenia patients. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006;16:588–591.
11. Haidemenos A, Kontis D, Gazi A, Kallai E, Allin M, Lucia B. Plasma homocysteine, folate and B12 in chronic schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31:1289–1296.
12. Akanji AO, Ohaeri JU, Al-Shammri SA, Fatania HR. Associations of blood homocysteine concentrations in Arab schizophrenic patients. *Clin Biochem*. 2007;40:1026–1031.
13. 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;101:50–57.
14. Petronijević ND, Radonjić NV, Ivković MD, et al. Plasma homocysteine levels in young male patients in the exacerbation and remission phase of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32:1921–1926.

15. Dietrich-Muszalska A, Olas B, Głowacki R, Bald E. Oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and thiols from patients with schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2009;59:1–7.
16. Feng LG, Song ZW, Xin F, Hu J. Association of plasma homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene variant with schizophrenia: A Chinese Han population-based case-control study. *Psychiatry Res*. 2009;168:205–208.
17. Ma YY, Shek CC, Wong MC, et al. Homocysteine level in schizophrenia patients. *Aust N Z J Psychiatry*. 2009;43:760–765.
18. García-Miss Mdel R, Pérez-Mutul J, López-Canul B, et al. Folate, homocysteine, interleukin-6, and tumor necrosis factor alfa levels, but not the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, are risk factors for schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2010;44:441–446.
19. Kale A, Naphade N, Sapkale S, et al. Reduced folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid and increased homocysteine and cortisol in never-medicated schizophrenia patients: implications for altered one-carbon metabolism. *Psychiatry Res*. 2010;175:47–53.
20. Shlafman N, Shaldubin S, Applebaum J, Belmaker RH, Levine J. No gross abnormality of plasma homocysteine after acute methionine loading in clinically stabilized patients with schizophrenia. *Asian J Psychiatr*. 2010;3:64–66.
21. Eren E, Yeğin A, Yilmaz N, Herken H. Serum total homocystein, folate and vitamin B12 levels and their correlation with antipsychotic drug doses in adult male patients with chronic schizophrenia. *Clin Lab*. 2010;56:513–518.
22. Kim TH, Moon SW. Serum homocysteine and folate levels in korean schizophrenic patients. *Psychiatry Investig*. 2011;8:134–140.
23. Dietrich-Muszalska A, Malinowska J, Olas B, et al. The oxidative stress may be induced by the elevated homocysteine in schizophrenic patients. *Neurochem Res*. 2012;37:1057–1062.
24. Kevere L, Purvina S, Bauze D, et al. Elevated serum levels of homocysteine as an early prognostic factor of psychiatric disorders in children and adolescents. *Schizophr Res Treatment*. 2012;2012:373261.
25. Virgos C, Martorell L, Simó JM, et al. Plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene variant: lack of association with schizophrenia. *Neuroreport*. 1999;10:2035–2038.
26. Muntjewerff JW, van der Put N, Eskes T, et al. Homocysteine metabolism and B-vitamins in schizophrenic patients: low plasma folate as a possible independent risk factor for schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2003;121:1–9.
27. Goff DC, Bottiglieri T, Arning E, et al. Folate, homocysteine, and negative symptoms in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2004;161:1705–1708.
28. Vilella E, Virgos C, Murphy M, et al. Further evidence that hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1289C polymorphisms are not risk factors for schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29:1169–1174.
29. Ozcan O, Ipcioğlu OM, Gültepe M, Başoğlu C. Altered red cell membrane compositions related to functional vitamin B(12) deficiency manifested by elevated urine methylmalonic acid concentrations in patients with schizophrenia. *Ann Clin Biochem*. 2008;45:44–49.
30. Bouaziz N, Ayedi I, Sidhom O, et al. Plasma homocysteine in schizophrenia: determinants and clinical correlations in Tunisian patients free from antipsychotics. *Psychiatry Res*. 2010;179:24–29.
31. Gysin R, Kraftsik R, Boulat O, et al. Genetic dysregulation of glutathione synthesis predicts alteration of plasma thiol redox status in schizophrenia. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15:2003–2010.
32. Muntjewerff JW, Kahn RS, Blom HJ, den Heijer M. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2006;11:143–149.
33. Nygård O, Vollset SE, Refsum H, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*. 1995;274:1526–1533.
34. Paré G, Chasman DI, Parker AN, et al. Novel associations of CPS1, MUT, NOX4, and DPEP1 with plasma homocysteine in a healthy population: a genome-wide evaluation of 13 974 participants in the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2:142–150. doi:10.1161/CIRCGENETICS.108.829804.
35. Hazra A, Kraft P, Lazarus R, et al. Genome-wide significant predictors of metabolites in the one-carbon metabolism pathway. *Hum Mol Genet*. 2009;18:4677–4687.
36. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;10:111–113.
37. Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Toru M. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. *Am J Med Genet*. 1997;74:526–528.
38. Kunugi H, Fukuda R, Hattori M, et al. C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene and psychoses. *Mol Psychiatry*. 1998;3:435–437.
39. Yoshimi A, Aleksic B, Kawamura Y, et al. Gene-wide association study between the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and schizophrenia in the Japanese population, with an updated meta-analysis on currently available data. *Schizophr Res*. 2010;124:216–222.
40. Tsutsumi A, Glatt SJ, Kanazawa T, et al. The genetic validation of heterogeneity in schizophrenia. *Behav Brain Funct*. 2011;7:43.
41. Allen NC, Bagade S, McQueen MB, et al. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet*. 2008;40:827–834.
42. Gilbody S, Lewis S, Lightfoot T. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2007;165:1–13.
43. Jönsson EG, Larsson K, Vares M, et al. Two methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) polymorphisms, schizophrenia and bipolar disorder: an association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008;147B:976–982.
44. Lewis SJ, Zammit S, Gunnell D, Smith GD. A meta-analysis of the MTHFR C677T polymorphism and schizophrenia risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;135B:2–4.
45. Peerbooms OL, van Os J, Drukker M, et al.; MTHFR in Psychiatry Group. Meta-analysis of MTHFR gene variants in schizophrenia, bipolar disorder and unipolar depressive disorder: evidence for a common genetic vulnerability? *Brain Behav Immun*. 2011;25:1530–1543.
46. Shi J, Gershon ES, Liu C. Genetic associations with schizophrenia: meta-analyses of 12 candidate genes. *Schizophr Res*. 2008;104:96–107.
47. Zintzaras E. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in schizophrenia, bipolar disorder and depression: a meta-analysis of genetic association studies. *Psychiatr Genet*. 2006;16:105–115.

48. Davey Smith G, Ebrahim S. What can mendelian randomisation tell us about modifiable behavioural and environmental exposures? *BMJ*. 2005;330:1076–1079.
49. Burgess S, Butterworth A, Malarstig A, Thompson SG. Use of Mendelian randomisation to assess potential benefit of clinical intervention. *BMJ*. 2012;345:e7325.
50. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, et al. Meta-analysis of association studies between DISC1 missense variants and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res*. 2012;141:271–273.
51. Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, et al. No association between the PCMI gene and schizophrenia: a multi-center case-control study and a meta-analysis. *Schizophr Res*. 2011;129:80–84.
52. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr*. 1987;422:43–52.
53. Pichler I, Del Greco M F, Gögele M, et al.; PD GWAS Consortium; International Parkinson's Disease Genomics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2; Genetics of Iron Status Consortium. Serum iron levels and the risk of Parkinson disease: a mendelian randomization study. *PLoS Med*. 2013;10:e1001462.
54. Bautista LE, Smeeth L, Hingorani AD, Casas JP. Estimation of bias in nongenetic observational studies using “mendelian triangulation”. *Ann Epidemiol*. 2006;16:675–680.
55. Thomas DC, Lawlor DA, Thompson JR. Re: Estimation of bias in nongenetic observational studies using “Mendelian triangulation” by Bautista et al. *Ann Epidemiol*. 2007;17:511–513.
56. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*. 1997;315:629–634.
57. Yue WH, Wang HF, Sun LD, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for schizophrenia in Han Chinese at 11p11.2. *Nat Genet*. 2011;43:1228–1231.
58. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, et al.; Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP). Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*. 2009;460:744–747.
59. Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet*. 2011;43:969–976.
60. Brown AS, Bottiglieri T, Schaefer CA, et al. Elevated prenatal homocysteine levels as a risk factor for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64:31–39.
61. 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;23:349–356.
62. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci*. 2000;20:6920–6926.
63. Tyagi N, Moshal KS, Ovechkin AV, et al. Mitochondrial mechanism of oxidative stress and systemic hypertension in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem*. 2005;96:665–671.
64. 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*. 2013;8:584–590.
65. Kirkbride JB, Susser E, Kundakovic M, Kresovich JK, Davey Smith G, Relton CL. Prenatal nutrition, epigenetics and schizophrenia risk: can we test causal effects? *Epigenomics*. 2012;4:303–315.
66. Levine J, Stahl Z, Sela BA, et al. Homocysteine-reducing strategies improve symptoms in chronic schizophrenic patients with hyperhomocysteinemia. *Biol Psychiatry*. 2006;60:265–269.
67. Hill M, Shannahan K, Jasinski S, et al. Folate supplementation in schizophrenia: a possible role for MTHFR genotype. *Schizophr Res*. 2011;127:41–45.
68. Roffman JL, Lamberti JS, Achtyes E, et al. Randomized multicenter investigation of folate plus vitamin B12 supplementation in schizophrenia. *JAMA Psychiatry*. 2013;70:481–489.
69. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention For Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291:565–575.
70. Spence JD, Bang H, Chambless LE, Stampfer MJ. Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis. *Stroke*. 2005;36:2404–2409.
71. Martí-Carvajal AJ, Solà I, Lathyris D, Karakitsiou DE, Simancas-Racines D. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;1:CD006612.
72. Dong ZQ, Tian YY, Guan X, et al. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and risk of aggressive behaviour in schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2012;200:1082.
73. Kontis D, Theochari E, Fryssira H, et al. COMT and MTHFR polymorphisms interaction on cognition in schizophrenia: an exploratory study. *Neurosci Lett*. 2013;537:17–22.
74. Roffman JL, Weiss AP, Deckersbach T, et al. Effects of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism on executive function in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2007;92:181–188.
75. Roffman JL, Gollub RL, Calhoun VD, et al. MTHFR 677C → T genotype disrupts prefrontal function in schizophrenia through an interaction with COMT 158Val → Met. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:17573–17578.
76. Roffman JL, Weiss AP, Purcell S, et al. Contribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms to negative symptoms in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2008;63:42–48.
77. Roffman JL, Brohawn DG, Friedman JS, et al. MTHFR 677C>T effects on anterior cingulate structure and function during response monitoring in schizophrenia: a preliminary study. *Brain Imaging Behav*. 2011;5:65–75.
78. Roffman JL, Nitenson AZ, Agam Y, et al. A hypomethylating variant of MTHFR, 677C>T, blunts the neural response to errors in patients with schizophrenia and healthy individuals. *PLoS One*. 2011;6:e25253.
79. Roffman JL, Brohawn DG, Nitenson AZ, Macklin EA, Smoller JW, Goff DC. Genetic variation throughout the folate metabolic pathway influences negative symptom severity in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2013;39:330–338.
80. Zhang Y, Yan H, Tian L, et al. Association of MTHFR C677T polymorphism with schizophrenia and its effect on episodic memory and gray matter density in patients. *Behav Brain Res*. 2013;243:146–152.
81. Ellingrod VL, Miller DD, Taylor SF, Moline J, Holman T, Kerr J. Metabolic syndrome and insulin resistance in schizophrenia patients receiving antipsychotics genotyped for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C/T and 1298A/C variants. *Schizophr Res*. 2008;98:47–54.

82. Ellingrod VL, Taylor SF, Dalack G, et al. Risk factors associated with metabolic syndrome in bipolar and schizophrenia subjects treated with antipsychotics: the role of folate pharmacogenetics. *J Clin Psychopharmacol*. 2012;32:261–265.
83. Vehof J, Burger H, Wilffert B, Al Hadithy A, Alizadeh BZ, Snieder H; GROUP investigators. Clinical response to antipsychotic drug treatment: association study of polymorphisms in six candidate genes. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2012;22:625–631.
84. Joobar R, Benkelfat C, Lal S, et al. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T missense mutation and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2000;5:323–326.
85. Schwartz S, Susser E. The use of well controls: an unhealthy practice in psychiatric research. *Psychol Med*. 2011;41:1127–1131.
86. Bochud M. On the use of Mendelian randomization to infer causality in observational epidemiology. *Eur Heart J*. 2008;29:2456–2457.
87. Almeida OP, McCaul K, Hankey GJ, Normand P, Jamrozik K, Flicker L. Homocysteine and depression in later life. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65:1286–1294.
88. Wald DS, Kasturiratne A, Simmonds M. Serum homocysteine and dementia: meta-analysis of eight cohort studies including 8669 participants. *Alzheimers Dement*. 2011;7:412–417.

エピジェネティクスからみたうつ病の病態

森 信 繁

Shigeru Morinobu : Epigenetic Mechanism of Major Depression

最近のゲノム・ワイドな大規模遺伝子研究の結果は、大うつ病が複数の遺伝子の障害による疾患であり、発症には多様な遺伝因と環境因が関与する病態であることを示唆している。DNAメチル化やヒストン修飾の解析法の開発という、昨今のエピジェネティクス研究の進歩は、環境因が脳内遺伝子発現を変動させて、その結果認知機能を変化させる、分子メカニズムの解明の端緒を開いてくれている。本稿では、グルココルチコイド受容体と脳由来神経栄養因子に注目して、ストレス脆弱性やレジリエンスの形成という観点を含め、我々の大うつ病の病態生理の理解を促進してくれたエピジェネティクス研究の成果を要約すると同時に、ヒストン脱アセチル化阻害薬などのエピジェネティック機構に関与する薬物の、大うつ病治療への可能性についても考察する。

<索引用語：DNAメチル化，ヒストン・アセチル化，ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬，グルココルチコイド受容体，脳由来神経栄養因子>

はじめに

厚生労働省は2011年7月に、これまでの医療計画の重点項目としてきた、がん・脳卒中・心筋梗塞・糖尿病の4大疾患に、新たに精神疾患を加えた5大疾患に改め、うつ病や認知症への重点的対策の必要を提唱している。中でもうつ病のもたらす健康への被害は、2020年には先進国での障害調整平均余命低下要因の第2位になることが予想され³⁹⁾、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⁴⁰⁾、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²⁹⁾。

このような健康への重大な被害をもたらすうつ病ではあるが、その病態機序に関しては未解明の点が多く、現時点で最も多くの研究者に評価され

ているメカニズムは、Yale大学のDr. Dumanらが提唱している、うつ病BDNF (brain-derived neurotrophic factor；脳由来神経栄養因子) 低下仮説である¹¹⁾。この仮説はげつ菌類を用いた抗うつ薬投与やストレス負荷実験から、①拘束ストレスをはじめ多様なストレスによって海馬や大脳皮質のBDNF発現が低下する、②慢性抗うつ薬投与や電気けいれん処置はBDNF発現を亢進させる、などの結果が得られたことから提唱されるようになってきた⁴³⁾。またこの仮説を支持するように、治療前のうつ病患者の末梢血中BDNF値は健康対照者に比べて低値であり、抗うつ薬治療によって症状に改善が得られると、BDNF値も回復することが報告されている^{8,48)}。

その一方でうつ病の病態解明を目的に、single nucleotide polymorphism (SNP) などの遺伝子多

型や変異をマーカーとした、多数の遺伝子研究がこれまでに行われてきた。しかしながら大規模なサンプルを用いたごく最近の2つのGWAS (genome-wide association study) の結果から、うつ病に特異的な変異は存在しないことが明らかとされ^{7,33)}、うつ病の発症機序を考えていく上では環境因>遺伝因である可能性が示唆されている。このようなうつ病の発症因を巡る主張は、古くから行われてきた双生児の疫学研究結果とも一致している。一卵性双生児を対象として精神疾患発症一致率を調査した研究では、自閉性障害の一致率が70~90%程度^{3,49)}なのに比べて、うつ病は最大40%程度であった^{35,50)}。このような結果はうつ病の生涯有病率が約10%という現状を考えると、うつ病の双生児発症一致率は小さい値とみなされ、うつ病発症に寄与する割合としてGWASの結果と同様、遺伝的関与に比べて環境因の関与の大きいことがわかってきた (図1)。

うつ病発症に関与する環境因を考えると、最も重要な環境因は心理社会的ストレスと思われる。げっ歯類からヒトまでを対象とした多様なストレス研究の中で、ほぼ共通して報告されている生体内変化は、視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 系の亢進である。実際に多くのうつ病患者を対象とした内分泌研究からも、うつ病群での血中・尿中コルチゾール分泌の亢進やデキサメサゾン抑制試験での抑制不全が報告され^{9,20,36)}、ストレスとうつ病の関連は密接と考えられる。末梢血中に分泌された副腎皮質ホルモンは細胞質内のグルココルチコイド受容体 (GR) と結合し、複合体となって核内に移行して、ゲノム上のグルココルチコイド結合部位 (GRE) に結合して下流の遺伝子転写を制御している (図2)¹⁸⁾。GRのようにゲノム上の特異的な結合部位に結合して、遺伝子の転写を調節している物質を、転写因子と総称している。GR以外にもストレスによって脳内での発現や機能が変化する転写因子に、cAMP response element binding protein (CREB)²⁾や activator protein-1 (AP-1)⁵⁹⁾などが報告されている。したがって、ストレスによる複数の転写因子を介した脳内の

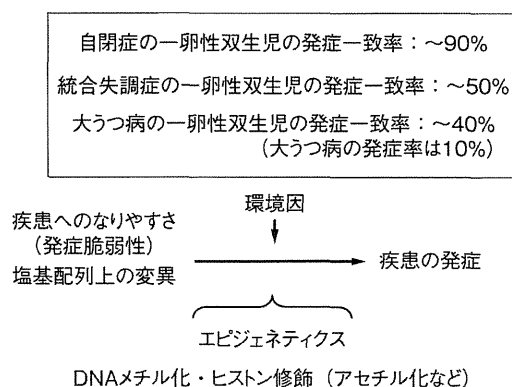


図1 精神疾患の発症機序とエピジェネティクス

BDNFをはじめとした遺伝子発現の変動が、うつ病の発症を導いていると推測される。

これらの転写因子群のゲノムへの結合に深く関連している機構が、クロマチン構造の変化であり、代表的なクロマチン構造変化を引き起こすメカニズムとしてDNAメチル化²⁶⁾とヒストン修飾²⁵⁾というエピジェネティック機構が挙げられる (図3)。エピジェネティクスという用語は1940年代にConrad Waddingtonが提唱した概念であり⁵⁷⁾、遺伝子型と表現型の不一致の原因として遺伝・環境の相互作用があるということの意味している。特に精神疾患では、遺伝子型と表現型の不一致はしばしばみられる現象であり、この点でうつ病の病態解明をエピジェネティックなアプローチから試みることは、新たな発見が期待される研究分野と思われる。本稿では代表的エピジェネティック機構であるDNAメチル化とヒストン・アセチル化の機序の簡単な紹介を行った後に、それらの機構の障害がどのようにうつ病発症機序と関連するかを、エピジェネティック・バイオマーカー探索も含めて紹介する。

I. エピジェネティクスとは

先にエピジェネティクスという用語の由来について紹介したが、現在、エピジェネティクスという用語の意味する内容は、遺伝子の塩基配列の変化を伴わない機序での遺伝子発現の変化を解析す

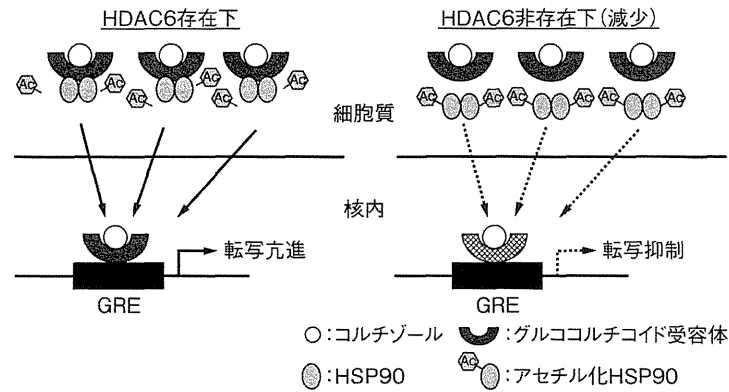


図2 HSP90のアセチル化によるGR情報系の調節機構

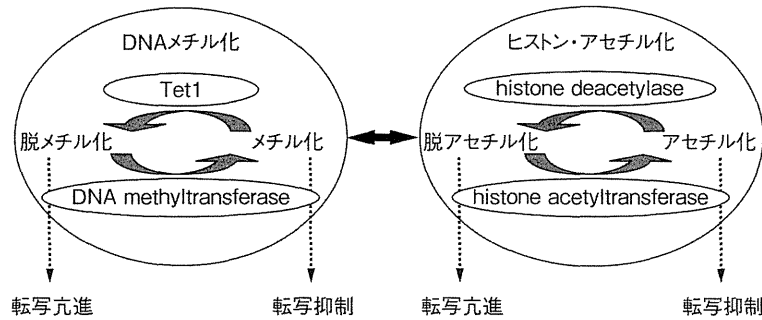


図3 エピジェネティクスによる遺伝子の転写調節機構

る研究分野と要約される。この分野の中で遺伝子の転写に対する制御機構が比較的解明されている反応が、DNAメチル化とヒストン・アセチル化である。このDNAメチル化およびヒストン・アセチル化は、クロマチン構造を変化させることによって、転写因子のDNA上の特異的結合部位への結合を制御するため、遺伝子の転写を調節することになる(図3)⁴¹⁾。

DNAメチル化はDNA methyltransferase (Dnmt)によって、DNAを構成する塩基の1つであるシトシンにメチル基の付く反応である²⁶⁾。このシトシンのメチル化の亢進は、クロマチン構造を凝集させるため転写因子の結合が抑制され、遺伝子の転写が抑制されることになる²⁶⁾。逆に、脱メチル化はTet methylcytosine dioxygenase (Tet1)によるhydroxymethylation反応後にcyti-

dine deaminaseであるactivation-induced deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex familyによって導かれることがわかってきた^{21,51)}。

一方のヒストン・アセチル化は核内タンパクであるヒストンにhistone acetyltransferase (HAT)によってアセチル基が付く現象であり、ヒストン・アセチル化の亢進はクロマチン構造を緩やかな形に導くため、転写因子のゲノムへの結合が容易となり、遺伝子の転写が促進されることになる^{25,41)}。逆に、脱アセチル化に関してはhistone deacetylase (HDAC)という酵素によって、ヒストンからアセチル基が取り除かれる反応である^{25,41)}。HDACは大きく分類するとクラスI、IIになり、クラスIIに属するHDAC6などは核内ではなく細胞内に発現して、遺伝子の転写ではなく細

胞内のタンパクのアセチル化による機能制御に関連している。このような可逆的な DNA メチル化反応やヒストン・アセチル化反応は、遺伝子の転写過程が可逆的な変化を呈する可能性を意味している。特に、ストレス体験の前駆することが報告されているうつ病の発症メカニズムには、ストレスによるこれらの酵素活性の変化からエピジェネティック機構を介して遺伝子の転写の変動することが推測されている。

II. うつ病発症脆弱性と DNA メチル化

これまでに行われてきた多数の疫学的研究の結果から、成長後のうつ病発症の危険因子として、幼少期の不遇な体験が報告されている^{4,6,60}。げっ歯類や霊長類を用いた動物実験からも、幼少期の不遇な環境は、成長後のストレス暴露に対して HPA 系機能のネガティブ・フィードバック機構の障害を導くことが明らかにされている^{12,31,52}。動物実験で得られた HPA 系のネガティブ・フィードバックの機能不全は、うつ病患者を対象にデキサメサゾン負荷試験を実施すると、約 50% の患者で血清コルチゾール値の抑制不全がみられるという結果と類似している⁹。このような観点から、幼少期の不遇な環境は、うつ病発症脆弱性の形成に密接に関与していると推測されている。

低養育環境による成長後のストレス負荷時の HPA 系のネガティブ・フィードバック機構の障害のメカニズムに関しては、未解明の点も多いが、Weaver ら⁵⁸の研究から、低養育環境では HPA 系のネガティブ・フィードバックに密接に関与する海馬の GR 遺伝子のエクソン 1₇領域の DNA メチル化が亢進することが報告されている (図 4)。メチル化の亢進している部位は、GR 遺伝子発現を制御する転写因子 NGF1A の結合部位になるため、この部位のシトシンのメチル化亢進は NGF1A の結合を阻害することになる。このような低養育による GR 遺伝子のメチル化率の亢進は、GR 遺伝子の転写機能の低下を導くため、ストレス負荷時に GR 遺伝子の転写の障害から GR 発現の増大が得られず、その結果としてネガティ

ブ・フィードバックの障害が引き起こされることになる (図 4)⁵⁸。同時に彼らは海馬の GR 遺伝子のヒストン・アセチル化が、低養育によって減少することも報告している。その上で彼らは低養育群に対して HDAC 阻害薬である Trichostatin A を海馬に投与することで、低養育によるヒストン・アセチル化の減少が回復して、GR 発現の減少やストレス負荷時の HPA 系のネガティブ・フィードバック不全も回復することを報告している⁵⁸。このような一連の研究結果から、不遇な養育環境が DNA メチル化やヒストン・アセチル化の障害を介して、HPA 系のネガティブ・フィードバック不全からストレス負荷時の高コルチコステロン血症を導き、うつ病発症脆弱性を形成することが推測される。

しかしながらヒトでのうつ病発症脆弱性と不遇な養育環境による GR 遺伝子のメチル化については、研究対象が死後脳であることも関連していると考えられるが、ラット海馬で発見された結果とは異なる報告もある。McGowan ら³⁴の自殺者の死後脳を用いた研究では、幼少期に虐待歴のある自殺者では、ラット同様に海馬での GR 遺伝子エクソン 1F 領域 (ラットのエクソン 1₇領域) のメチル化の亢進が報告されている。その一方で Moser ら³⁷は同様の研究を行い、GR 遺伝子エクソン 1F 領域のメチル化に亢進はなかった結果を報告している。

III. エピジェネティック機構による GR 遺伝子の修飾とうつ病の病態との関連について

うつ病の病態に関する神経内分泌学的研究から、末梢血中・尿中のコルチゾール値はうつ病患者群で有意に高値を示すことが古くから知られていた。同時にげっ歯類を用いたストレスの研究からも、ストレス負荷によって末梢血中コルチコステロン値が増大することもわかってきた。この他にもうつ病に関する HPA 系の障害を示す研究として、Carroll ら⁹が開発したデキサメサゾン負荷試験や Heuser ら²³が開発したデキサメサゾン/CRH (corticotropin-releasing hormone) 試験が

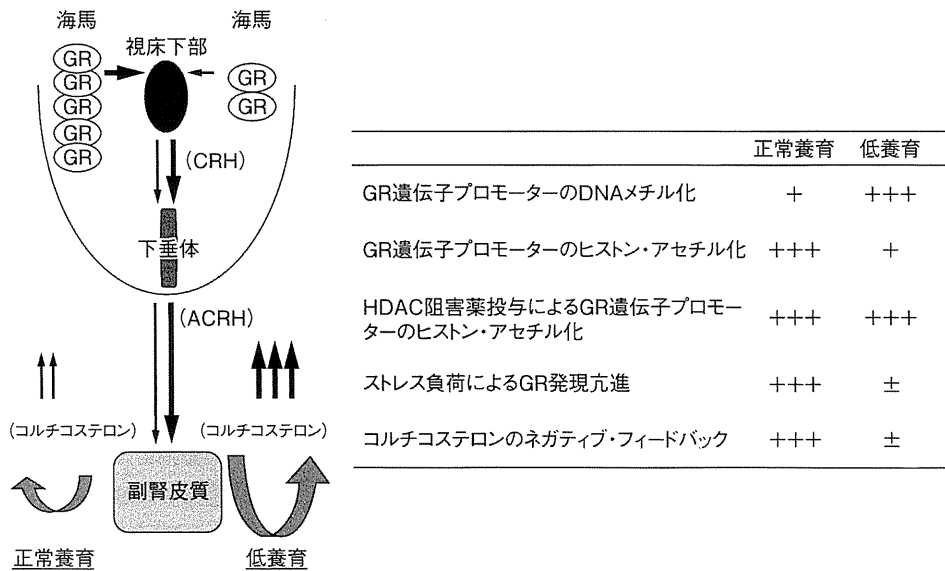


図4 養育環境によるエピジェネティクスを介した GR 遺伝子の発現変化と HPA 系のネガティブ・フィードバック機構の変動 (文献 58 から一部修正して引用)

ある。ストレスによるコルチゾール分泌亢進に対するネガティブ・フィードバックの減弱や、デキサメサゾン負荷に対するコルチゾール分泌抑制の不全・CRH負荷によるコルチゾール分泌の低反応などは、海馬での GR 数の低下あるいは GR を介した情報系の機能低下を示唆する所見である。

ストレスの低い環境では GR の大半は HSP90 や calcineurin と結合して細胞内にとどまっており、ストレス負荷やグルココルチコイドの投与などによって、GR にステロイドが結合すると、HSP90 や calcineurin との結合がはずれて GR は核内に移行して、ゲノム上の GR の特異的結合部位である glucocorticoid response element (GRE) に結合して、下流にある遺伝子の転写を調節している (図 2)^{18,42)}。したがって、GR の核内移行は GR を介した機能の初期反応として重要と考えられる。

GR の細胞内から核内への移行に重要な役割をはたす HSP90 は HDAC6 によってアセチル化を受けることがわかっており、アセチル化を受けることによって GR との結合能が変化して、GR を介する情報系の機能が変化する (図 2)³⁰⁾。HDAC6 を siRNA を用いてノックダウンした細胞では、GR

のアセチル化亢進が引き起こされ、その結果、GR の核内移行が促進され、GR を介した遺伝子の発現が顕著に増大することも報告されている³⁸⁾。同様に Pet1-Cre-driven deletion 法を用いてマウス脳内のセロトニン細胞から HDAC6 を減少させると、HSP90 のアセチル化の亢進や GR との結合が低下することも報告されている¹⁴⁾。特にこの実験で興味深いのは、コルチコステロン投与によってオープンフィールドや高架式十字迷路でみられる不安行動の亢進が、HDAC6 減少マウスでは抑制される点である。また HDAC6 のノックアウト・マウスや HDAC6 特異的な阻害薬投与によって、不安行動や抑うつ行動の減少が報告されている¹⁷⁾。この他にも、マウスの前頭前野の HDAC6 の阻害やノックダウンは、ストレスによるグルタミン酸神経系の興奮を抑制するため、急性ストレスに対して抵抗性のある行動を示すことも報告されている³²⁾。このような一連の研究結果は、HDAC6 機能による HSP90 のアセチル化が、GR の核内移行の調節を介して、不安や抑うつ行動に密接に関与することを示していると考えられる。

GR の核内移行に関しては、GR のリン酸化も重

要な役割をはたしている¹⁾。隔離飼育ストレスなどのような neurotoxic insults によって、GR は CDK5 を介してリン酸化され、核内移行が亢進し、HDAC2 遺伝子の転写を亢進させることが報告されている¹⁹⁾。HDAC2 発現の亢進は遺伝子プロモーター上のヒストンの脱アセチル化を促し、クロマチン構造を密に変化させるため、遺伝子の転写が抑制されることになる。同様の報告として、うつ病患者末梢血由来の RNA の解析から、HDAC2 mRNA の発現が亢進しているという報告もある²⁴⁾。その一方でうつ病動物モデルの一つでもある社会的敗北モデルでは、側坐核の HDAC2 発現の低下が報告されている¹⁰⁾。うつ病モデル動物を用いた研究では、海馬の BDNF 発現は低下するが、側坐核での BDNF 発現は亢進することも報告され⁵⁾、HDAC2 発現も部位によって異なることが推測される。HDAC2 発現亢進とうつ病発症への具体的なメカニズムは未解明であるが、馴化の困難な慢性ストレス状況下での GR 情報系を介した HDAC2 発現の亢進が、例えば BDNF 遺伝子の転写を抑制して低下を引き起こすために、うつ病の発症を導くことが推測される。HDAC2 のうつ病への関与については、改めて HDAC 阻害薬の抗うつ作用の項でも報告したいと考えている。

IV. エピジェネティック機構による BDNF 遺伝子の修飾とうつ病の病態との関連について

冒頭にも触れたように、げっ歯類を用いたストレスや抗うつ薬研究をはじめ、末梢血や死後脳を用いたヒトでの研究の結果から、うつ病の病態形成に関する BDNF 低下仮説が提唱されている¹¹⁾。このため BDNF の発現変動に関して、エピジェネティックな調節機構の関与が、少ないながらもいくつか報告されている。最初にうつ病の病態に関連した BDNF 遺伝子の転写変化と、エピジェネティック機構による調節を関連付けた研究は、ラットを用いた Tsankova らの電気けんれん (ECS) 処置の研究である⁵³⁾。この研究によって ECS の投与が、海馬 BDNF 遺伝子のエクソン III

のプロモーター領域のヒストン・アセチル化の亢進を引き起こし、BDNF mRNA 発現亢進に密接に関連していることが示された。この報告に引き続き Tsankova ら⁵⁴⁾は、うつ病動物モデルである社会的敗北モデルを用いて、うつ病様状態になったマウス海馬ではエクソン III, IV のプロモーター上のヒストン H3 の dimethylation の亢進と BDNF mRNA 発現低下の関連を示している。同時にうつ病様状態になったマウスに慢性イミプラミン投与を行うことで行動学的な回復がみられ、うつ病様状態からの回復時には BDNF mRNA 発現の低下も回復しており、この機序にヒストン H3, 4 のアセチル化の亢進が関連している可能性について報告している⁵⁴⁾。筆者らも単回の拘束ストレス負荷によってみられる、ラット海馬の BDNF mRNA の減少がエクソン I, IV, VI のプロモーター領域でのヒストン H3 のアセチル化の低下によって導かれることを報告している¹⁵⁾。

このような動物モデルを用いた BDNF 遺伝子のエピジェネティックな修飾に対して、ヒトでは自殺者死後脳を用いた BDNF 遺伝子メチル化の報告がみられる。Wernicke 部位を対象に BDNF 遺伝子のエクソン IV のプロモーター領域の 4 つの CpG のメチル化率を解析した研究によると、この中の 2 つの CpG のメチル化率が有意に自殺者で亢進しており、BDNF エクソン IV mRNA 発現の低下とも相関していたという報告である²⁷⁾。同様に Wernicke 部位を対象に、BDNF の受容体である TrkB 遺伝子のプロモーター上の 10 個の CpG のメチル化率を解析した研究もあり、この研究結果は BDNF 研究と違ってメチル化率の有意な低下を示している²⁸⁾。逆に前頭皮質を対象に TrkB 遺伝子プロモーターのメチル化を解析した研究では、2 カ所の CpG のメチル化が有意に増大しており、TrkB mRNA 発現低下と相関していたと報告している¹³⁾。ヒト脳を対象とした BDNF 情報系関連遺伝子のメチル化については、まだまだ今後の多数例での解析が必要である。同時にこれらの研究は全て自殺者を対象とした研究であるため、うつ病の病態をどこまで反映しているかという点で

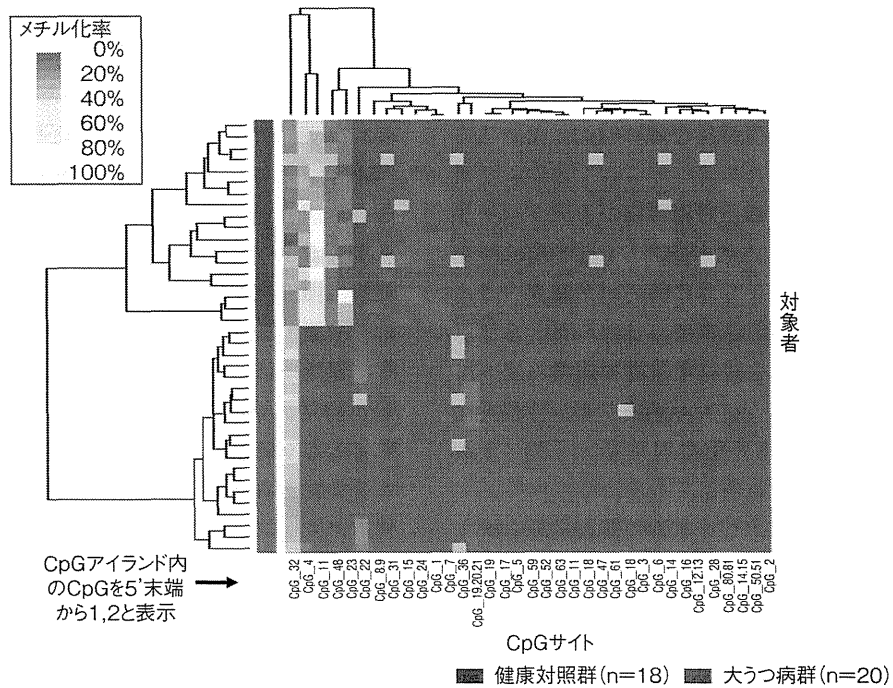


図5 BDNF 遺伝子エクソン I プロモーター領域の CpG アイランド内のシトシン・メチル化プロフィール (文献 16 から一部修正して引用)

疑問が残る。

このような死後脳を用いた研究に対して、末梢血由来の DNA を用いて遺伝子のメチル化プロフィールから、うつ病の病態解明ではなくバイオマーカーを探索する研究が試みられている。筆者らは未治療うつ病患者 20 名と健康対照者 18 名を対象に MassARRAY システム (SEQENOM 社) を用いて、BDNF 遺伝子のエクソン I、IV のプロモーター上のメチル化プロフィールを階層的クラスタ分析で解析したところ、前者では全く重なりなく 2 群に分類できることを報告している (図 5)¹⁶⁾。ヒト型 BDNF 遺伝子を神経系由来の培養細胞に導入し、神経刺激の結果 BDNF mRNA は顕著に転写が増大するが、この実験条件下ではエクソン I mRNA の発現が顕著にみられていること⁴⁵⁾から、BDNF 遺伝子の転写にエクソン I の上流のメチル化やヒストン・アセチル化は重要な役割をもっていると推測される。このような意味からも、今後の大規模な未治療うつ病患者を対象

とした検証研究の成果が期待される場所である。本章のタイトルとは異なるが、筆者らと同様に小規模対象者での遺伝子メチル化を用いたバイオマーカーの探索研究では、口腔内の細胞を用いたセロトニン・トランスポーター遺伝子の研究があるが、筆者らの BDNF 研究とは異なりうつ病患者群と健康対照者群の 2 群間の分類はできていない⁴⁴⁾。

V. ゲノム・ワイドなメチル化の解析によるうつ病の病態の解明

これまで紹介してきたうつ病と GR、BDNF 遺伝子のメチル化障害の関係は、1 つの遺伝子のメチル化を標的として行った研究の結果である。これに対して方法論上の困難さはあるが、ゲノム・ワイドなメチル化解析 (メチローム解析) の報告も少数だがみられる。ごく最近の Sabunciyani⁴⁶⁾ のうつ病患者の死後脳を用いた彼ら独自開発の CHARM (Comprehensive High-throughput

Arrays for Relative Methylation) 法による解析では、対照群に比べて 10% メチル化率の異なる 224 個の遺伝子領域を抽出しており、これらの領域の機能は神経系の成長や発達に関連していることも報告されている。

このような研究者独自の方法によるアプローチに対して、昨今 Illumina 社が開発した Bead chip を用いたゲノム・ワイドなうつ病のバイオマーカー開発の研究結果も報告されている。Uddin ら⁵⁶⁾ は末梢血由来の DNA を用いて健康対照者に比べてうつ病患者 (lifetime depression) では、特異的に 107 の遺伝子が非メチル化で 21 の遺伝子がメチル化されていることを報告している。

ゲノム・ワイドなメチロームの解析は魅力的な方法であるが、多数のサンプルを解析するには時間とコストがかさむ上に、Illumina 社のアレイではゲノム上の 45 万個以上のメチル化サイトをカバーしているが、個々の遺伝子についてのメチル化数はわずか 2 個程度の CpG をカバーしているだけである。このためアレイで顕著なメチル化率に差の検出されたメチル化サイトを中心に近傍の CpG のメチル化も含め、多数例での局所的な検証が必要となる。実際に上記の CHARM 法を用いたゲノム・ワイドなメチル化の解析でも、PRIMA1 (proline rich membrane anchor 1) という遺伝子のメチル化の増大を発見しているが、その後の小規模検証研究では異なった結果が得られている⁴⁶⁾。またうつ病患者の死後脳を用いて PRIMA1 の免疫染色法による発現の解析も行われたが、メチル化率の増大とは異なり統計的に有意な発現減少はみられていない⁴⁶⁾。ゲノム・ワイドなメチローム解析に関しては、顕著なメチル化率に違いのみられた遺伝子領域に注目してその後の検証を行うことが必要であると同時に、発現に有意な変化のみられた遺伝子のうつ病の病態への役割について Pathway 解析などによる検証が必要である。

VI. HDAC 阻害薬による抗うつ効果について

HDAC 阻害薬はヒストン・アセチル化を保つ働きをもつため、クロマチン構造をユークロマチン

状態に保つことになり、転写因子のゲノム上の結合部位への結合を促進することになる (図 3)²⁵⁾。したがって HDAC 阻害薬の投与は、抗うつ薬投与によってリン酸化された転写因子 CREB の CRE サイトへの結合能亢進を導き、下流の BDNF など遺伝子の転写を増大させると考えられる。

HDAC 阻害薬である sodium butyrate (SB) の腹腔内慢性投与によって、抗うつ薬のスクリーニング検査である強制水泳試験で無動時間の短縮⁶¹⁾や、尾懸垂試験で無動時間の短縮⁴⁷⁾といった、抗うつ効果が報告されている。同じく HDAC 阻害薬である vorinostat の慢性投与によって、うつ病モデルである慢性予測不能ストレスを負荷されたマウスのうつ病様行動の改善も報告されている⁵⁵⁾。いずれの実験も、HDAC 阻害薬による抗うつ効果発現までの期間は、抗うつ薬による場合に比べて短縮されることが報告されている^{47,55,61)}。また抗うつ薬 fluoxetine と SB の併用投与によっても、抗うつ効果の早期発現のみられることも報告されている⁴⁷⁾。脳内に HDAC 阻害薬を投与して抗うつ作用を観察した研究もあり、この実験では社会的敗北ストレスによるうつ病モデルマウスに HDAC 阻害薬 MS-275 の側坐核内への投与を行い、抗うつ効果のみられることを行動学的に示している¹⁰⁾。

標準的な抗うつ薬投与に抵抗性の難治性うつ病の問題がクローズアップされている現状では、抗うつ薬と HDAC 阻害薬による併用治療は魅力的な選択肢と考えられる。ただし、vorinostat は本邦でも悪性皮膚リンパ腫の治療薬として承認はされているが、まだまだ臨床応用のできる HDAC 阻害薬は少なく、長期に服用した際の副作用などわからない点も多く、現時点では臨床応用は困難と考えられる。

おわりに

——今後の展望——

うつ病に関するエピジェネティックな研究はまだ端緒に終わったばかりであり、DNA メチル化の研究では大半の研究が、標的とした 1 つの遺伝子

のごく一部の領域の DNA メチル化を解析しているのみである。筆者ら¹⁶⁾の BDNF 遺伝子のメチル化の研究は、その中では広範な領域のメチル化(エクソン I のプロモーターでは 1092 bp 内にある 35 個の CpG あるいは CpG unit, エクソン IV のプロモーターでは 1141 bp 内にある 18 個の CpG あるいは CpG unit)を解析している。少なくとも今後は標的遺伝子の転写に密接に関与していると考えられる、プロモーター領域の CpG アイランドおよびショアのシトシンのメチル化の解析は必要と考えている。その一方でゲノム研究と同様に、ゲノム・ワイドなメチル化プロファイルの解析も方法論の進歩から可能となっており、エピゲノム解析も重要と思われる。特にマウス海馬を対象とした電気けいれん処置によるゲノム・ワイドなメチル化の研究では、電気けいれん処置前後での多様なメチル化プロファイルの変化が報告されている²²⁾。

ごく最近の発見であるがメチル基の付いたシトシンからメチル基の除かれる過程が解明されつつあり、当初の予想とは異なり単純にメチル基が酵素によって除去されるのではなく、5-methylcytosine から 5-hydroxymethylcytosine への転換を経て、メチル基が除去されることがわかってきた^{21,51)}。このような研究成果から考えると、ゲノム・ワイドに 5-methylcytosine や 5-hydroxymethylcytosine の抗体を用いて免疫沈降を行い、得られた DNA fragment を次世代シーケンサーで解析し、うつ病ではどのような遺伝子の 5-methylcytosine や 5-hydroxymethylcytosine に変動がみられるかを、ゲノム・ワイドに解析する方法も新たな情報を提供してくれると考えている。

本稿に記載したヒストン・アセチル化や DNA メチル化は酵素反応による可塑的な変化であり、遺伝子プロモーター上のヒストン・アセチル化は HAT と HDAC の作用によって、DNA メチル化は Dnmt と Tet 1 の作用によって調節されている。したがって、このようなエピジェネティックな変化を導く酵素群の活性の計測方法が樹立され、どのような要因によって各酵素の活性化や不

活化が引き起こされるのかの解明が待たれるところである。筆者らも拘束ストレスによる BDNF 遺伝子プロモーターのヒストン・アセチル化の変動に、血清コルチゾール濃度の変化の関与する可能性を報告している¹⁵⁾。現時点では細胞系を対象として、これらの酵素活性を計測できるキットがいくつかの会社から販売されているが、組織を対象とした実験には不向きなようである。今後の展望として、うつ病症状の変動に呼応したエピジェネティック機構の変動を解析して、うつ病の病態との関連を細かく解析していくことが必要と思われる。

本総説の執筆は、文部科学省科学研究費、同省脳科学研究推進プログラム(課題 F)、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業、先進医薬研究振興財団精神薬療分野一般研究助成金の補助を受けて行った。

なお、本論文に関連して開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Adzic, M., Djordjevic, J., Djordjevic, A., et al.: Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol.* 202 ; 87-97. 2009
- 2) Alboni, S., Tasciedda, F., Corsini, D., et al.: Stress induces altered CRE/CREB pathway activity and BDNF expression in the hippocampus of glucocorticoid receptor-impaired mice. *Neuropharmacology.* 60 ; 1337-1346. 2011
- 3) Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., et al.: Autism as a strongly genetic disorder : evidence from a British twin study. *Psychol Med.* 25 ; 63-77. 1995
- 4) Batten, S. V., Aslan, M., Maciejewski, P. K., et al.: Childhood maltreatment as a risk factor for adult cardiovascular disease and depression. *J Clin Psychiatry.* 65 ; 249-254. 2004
- 5) Berton, O., McClung, C. A., Dileone, R. J., et al.: Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science.* 311 ; 864-868. 2006
- 6) Bifulco, A., Brown, G. W., Adler, Z.: Early sexual abuse and clinical depression in adult life. *Br J Psychiatry.* 159 ; 115-122. 1991

- 7) Bosker, F. J., Hartman, C. A., Nolte, I. M., et al.: Poor replication of candidate genes for major depressive disorder using genome-wide association data. *Mol Psychiatry*, 16 ; 516-532, 2011
- 8) Brunoni, A., Lopes, M., Fregni, F.: A systematic review and meta-analysis of clinical studies on, major depression and BDNF levels : implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11 ; 1169-1180, 2008
- 9) Carroll, B. J., Curtis, G. C., Mendels, J.: Neuroendocrine regulation in depression. I. Limbic system-adrenocortical dysfunction. *Arch Gen Psychiatry*, 33 ; 1039-1044, 1976
- 10) Covington, H. E., 3rd, Maze, I., LaPlant, Q. C., et al.: Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci*, 29 ; 11451-11460, 2009
- 11) Duman, R. S., Monteggia, L. M.: A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 59 ; 1116-1127, 2006
- 12) Erabi, K., Morinobu, S., Kawano, K., et al.: Neonatal isolation changes the expression of IGF-IR and IGFBP-2 in the hippocampus in response to adulthood restraint stress. *Int J Neuropsychopharmacol*, 10 ; 369-381, 2007
- 13) Ernst, C., Deleva, V., Deng, X., et al.: Alternative splicing, methylation state, and expression profile of tropomyosin-related kinase B in the frontal cortex of suicide completers. *Arch Gen Psychiatry*, 66 ; 22-32, 2009
- 14) Espallergues, J., Teegarden, S. L., Veerakumar, A., et al.: HDAC6 regulates glucocorticoid receptor signaling in serotonin pathways with critical impact on stress resilience. *J Neurosci*, 32 (13) ; 4400-4416, 2012
- 15) Fuchikami, M., Morinobu, S., Kurata, A., et al.: Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12 ; 73-82, 2009
- 16) Fuchikami, M., Morinobu, S., Segawa, 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 ; e23881, 2011
- 17) Fukada, M., Hanai, A., Nakayama, A., et al.: Loss of deacetylation activity of Hdac6 affects emotional behavior in mice. *PLoS One*, 7 ; e30924, 2012
- 18) Grad, I., Picard, D.: The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol*, 275 ; 2-12, 2007
- 19) Gräff, J., Rei, D., Guan, J.-S., et al.: An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*, 483 ; 222-226, 2012
- 20) Gibbons, J. L., Mchugh, P. R.: Plasma cortisol in depressive illness. *J Psychiatr Res*, 1 ; 162-171, 1962
- 21) Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., et al.: Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145 ; 423-434, 2011
- 22) Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., et al.: Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci*, 14 ; 1345-1351, 2011
- 23) Heuser, I., Yassouridis, A., Holsboer, F.: The combined dexamethasone/CRH test : a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res*, 28 ; 341-356, 1994
- 24) Hobara, T., Uchida, S., Otsuki, K., et al.: Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. *J Psychiatr Res*, 44 ; 263-270, 2010
- 25) Jenuwein, T., Allis, C. D.: Translating the histone code. *Science*, 293 ; 1074-1080, 2001
- 26) Jones, P. A., Baylin, S. B.: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3 ; 415-428, 2002
- 27) Keller, S., Sarchiapone, M., Zarrilli, F., et al.: Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*, 67 ; 258-267, 2010
- 28) Keller, S., Sarchiapone, M., Zarrilli, F., et al.: TrkB gene expression and DNA methylation state in Wernicke area does not associate with suicidal behavior. *J Affect Disord*, 135 ; 400-404, 2011
- 29) 厚生労働省大臣官房統計情報部 : 患者調査, 厚生労働省, 2008
- 30) Kovacs, J. J., Murphy, P. J., Gaillard, S., et al.: HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell*, 18 (15) ; 601-607, 2005
- 31) Kurata, A., Morinobu, S., Fuchikami, M., et al.: Maternal postpartum learned helpless (LH) affects maternal care by dams and responses to the LH test in adoles-

cent offspring. *Horm Behav.* 56 ; 112-120, 2009

32) Lee, J. B., Wei, J., Cheng, J., et al.: Histone deacetylase 6 gates the synaptic action of acute stress in prefrontal cortex. *J Physiol*, 590 (Pt 7) ; 1535-1546, 2012

33) Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium, Ripke, S., Wray, N. R., et al.: A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry*, 18 ; 497-511, 2013

34) McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., et al.: Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associate with childhood abuse. *Nat Neurosci*, 12 ; 342-348, 2009

35) McGuffin, P., Katz, R., Watkins, S., et al.: A hospital-based twin register of the heritability of DSM-IV unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry*, 53 ; 129-136, 1996

36) Morinobu, S., Satoh, H., Endoh, M., et al.: Noradrenergic function and the dexamethasone suppression test in depression. *Jpn J Psychiatry Neurol*, 41 ; 669-676, 1987

37) Moser, D., Molitor, A., Kumsta, R., et al.: The glucocorticoid receptor gene exon 1-F promoter is not methylated at the NGFI-A binding site in human hippocampus. *World J Biol Psychiatry*, 8 ; 262-268, 2007

38) Murphy, P. J., Morishima, Y., Kovacs, J. J., et al.: Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem*, 280 ; 33792-33799, 2005

39) Murray, C. J., Lopez, A. D.: Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020 : Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349 ; 1498-1504, 1997

40) Naganuma, Y., Tachimori, H., Kawakami, N., et al.: Twelve-month use of mental health services in four areas in Japan : findings from the World Mental Health Japan Survey 2002-2003. *Psychiatry Clin Neurosci*, 60 ; 240-248, 2006

41) Narlikar, G. J., Fan, H. Y., Kingston, R. E.: Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 108 ; 475-487, 2002

42) Noguchi, T., Makino, S., Matsumoto, R., et al.: Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobi-

lization stress. *Endocrinology*, 151 ; 4344-4355, 2010

43) Nibuya, M., Morinobu, S., Duman, R. S.: Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, 15 ; 7539-7547, 1995

44) Olsson, C. A., Foley, D. L., Parkinson-Bates, M., et al.: Prospects for epigenetic research within cohort studies of psychological disorder : a pilot investigation of a peripheral cell marker of epigenetic risk for depression. *Biol Psychol*, 83 ; 159-165, 2010

45) Pruunsild, P., Sepp, M., Orav, E., et al.: Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J Neurosci*, 31 ; 3295-3308, 2011

46) Sabunciyan, S., Aryee, M. J., Irizarry, R. A., et al.: Genome-wide DNA methylation scan in major depressive disorder. *PLoS One*, 7 ; e34451, 2012

47) Schroeder, F. A., Lin, C. L., Crusio, W. E., et al.: Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol Psychiatry*, 62 ; 55-64, 2007

48) Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, K., et al.: Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*, 54 ; 70-75, 2003

49) Steffenburg, S., Gillberg, C., Hellgren, L., et al.: A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J Child Psychol Psychiatry*, 30 ; 405-416, 1989

50) Sullivan, P. F., Neale, M. C., Kendler, K. S.: Genetic epidemiology of major depression : review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 157 ; 1552-1562, 2000

51) Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., et al.: Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324 ; 930-935, 2009

52) Toki, S., Morinobu, S., Imanaka, A., et al.: Importance of early lightning conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring. *Eur J Neurosci*, 25 ; 815-829, 2007

53) Tsankova, N. M., Kumar, A., Nestler, E. J.: Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci*, 24 ; 5603-5610, 2004

- 54) Tsankova, N. M., Berton, O., Renthal, W., et al.: Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*, 9 ; 519-525, 2006
- 55) Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., et al.: Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. *Neuron*, 69 ; 359-372, 2011
- 56) Uddin, M., Koenen, K. C., Aiello, A. E., et al.: Epigenetic and inflammatory marker profiles associated with depression in a community-based epidemiologic sample. *Psychol Med*, 41 ; 997-1007, 2011
- 57) Waddington, C. H.: The epigenotype. *Endeavor*, 1 ; 18-20, 1942
- 58) Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., et al.: Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, 7 ; 847-854, 2004
- 59) Weinberg, M. S., Girotti, M., Spencer, R. L.: Restraint-induced fra-2 and c-fos expression in the rat forebrain : relationship to stress duration. *Neuroscience*, 150 ; 478-486, 2007
- 60) Widom, C. S., DuMont, K., Czaja, S. J.: A prospective investigation of major depressive disorder and comorbidity in abused and neglected children grown up. *Arch Gen Psychiatry*, 64 ; 49-56, 2007
- 61) Yamawaki, Y., Fuchikami, M., Morinobu, S., et al.: Antidepressant-like effect of sodium butyrate (HDAC inhibitor) and its molecular mechanism of action in the rat hippocampus. *World J Biol Psychiatry*, 13 ; 458-467, 2012

Epigenetic Mechanism of Major Depression

Shigeru MORINOBU

Department of Neuropsychiatry, Kochi Medical School, Kochi University

A recent genome-wide association mega analyses of major depression suggests that major depression is a polygenic and multifactorial disease and that a gene-environmental interaction plays a pivotal role in its pathophysiology. Recent advances in epigenetics, such as improved methods for the measurement of DNA methylation, and covalent histone modifications, have shed light on the molecular mechanisms by which environmental stimuli affect gene expression in the brain and subsequently alter the cognitive function. Herein, we summarize how recent progress in epigenetics has advanced our understanding of the pathophysiology of major depression, particularly the role of glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor, including the development of stress vulnerability and resilience, and we discuss the possibility of using epigenetic drugs, such as histone deacetylase inhibitors, for the treatment of major depression.

<Author's abstract>

<Keywords : DNA methylation, histone acetylation, histone deacetylase inhibitor, glucocorticoid receptor, brain-derived neurotrophic factor>