

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金 障害者対策総合研究事業（精神障害分野）

総括研究報告書

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成

- 双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して -

主任研究者 大森哲郎 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授

研究要旨

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

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

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

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

分担研究者

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

A. 研究目的

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

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

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

の研究を踏まえ、複数指標によるうつ病マーカーを作成する。

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

B. 研究方法

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

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

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

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

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

などのうつ病病態と関連性が推定されるものを含んでいた。

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

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

D. 考察

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

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

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

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(主任研究者分のみ)

1. 論文発表

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

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

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

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

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

2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

沼田周助, 木下誠, 大森哲郎. ゲノム・ワイドメチル化解析からみた統合失調症の病態. 第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会, 沖縄, 2013.10.25

沼田周助, 木下誠, 田嶋敦, 下寺信次, 橋本亮太, 井本逸勢, 武田雅俊, 大森哲郎. 治療抵抗性統合失調症のバイオマーカー. 第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会, 沖縄, 2013.10.25

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特願 2014-035813 平成 26 年 2 月

26 日出願

精神疾患マーカーおよびその用途

発明者 大森哲郎ほか

出願人 徳島大学

2) メチル化を指標としたうつ病と統合

失調症の指標

出願準備中

発明者 大森哲郎ほか

出願人 徳島大学ほか

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし