



3) 構造方程式モデリングによる健常群とMDD群の区別

図のようなパス図を作成し、健常群とMDD群の区別に影響する因子同士の関係を構造方程式モデリングにより解析した。仮説は一般成人における構造方程式モデリングの結果 (Nakai et al. J Affect Disord 2014) をもとに作成した。その結果、図に示したモデルの適合度が最も高かった。すなわち、子供の時のネグレクト体験が循環、不安の気質を高め、間接的に健常群とMDD群の区別に影響していた。このパス図では健常群とMDD群の区別の決定係数は0.68と高く、68%がこのモデルで説明可能であった。

4) MDD群の寛解群と治療抵抗性群の比較

MDD群を寛解群(55例)と治療抵抗性群(22例)にわけて両群を比較した。寛解の定義は2ヶ月以上うつ病の症状・徴候がな

いこととし、治療抵抗性の定義は2種類以上の十分な抗うつ薬治療(有効用量で8週間治療)によっても中等症あるいは明らかな抑うつ症状が続いていることとした。

治療抵抗性群は寛解群に比べて子供の人数が少なく、PHQ-9点数(抑うつ症状)が高く、虐待的養育環境CATSの合計点、亜項目のネグレクト点数が高かった。さらに、TEMPS-Aで測定される5つの感情気質のうち、抑うつ、循環、不安、焦燥気質は治療抵抗性群で有意に高かったが、発揚気質は両群で有意な差はみられなかった。

最近1年間のライフイベントに対する肯定的(pLES)あるいは否定的評価(nLES)点数については、nLESは治療抵抗性群で有意に高かったが、pLESは両群で有意な差はみられなかった。

以上の治療抵抗性群と寛解群の違いは、治療抵抗性群と健常群の間でも同様に認められた。

なお、治療抵抗性群の患者数が22例と少なかったため、多項目に関する多変量ロジスティック回帰分析は実施できなかったが、抑うつ症状の関与を検討するためにPHQ-9を含めた2変量のロジスティック回帰分析を行った。その結果、CATSのネグレクト点数と合計点はPHQ-9とは独立に治療抵抗性と寛解を予測していた。しかし、TEMPS-Aの気質、nLESはPHQ-9を考慮した時は有意な予測因子とはならなかった。

D. 考察

本研究の結果から、子供のときの虐待のうち特にネグレクト（日本語では育児怠慢、育児放棄とも呼ばれる）が直接的にはではなく、2つの感情気質（不安、焦燥）を介して間接的に健常群とMDD群の区別を予測していることが構造方程式モデリングにより明らかになった。MDD発症に子供のときの虐待が影響していることはこれまでの多くの研究により明らかにされてきたが(Alloy et al., Clin Child Fam Psychol Rev, 2006)、日本人のMDD患者では特にネグレクトが発症に大きく関与していることが本研究より示唆された。さらに、感情気質は小児期虐待の媒介因子としてMDD発症に関与している可能性が示唆される。

MDD群では健常群と比べてうつ症状を示す被験者が多いため、両群の相違がうつ症状を介している可能性が否定出来ない。本研究では、抑うつ症状(PHQ-9)を独立変数に加えて多変量ロジスティック回帰分析を行ったが、PHQ-9総点以外の、感情気質、ネグレクト、合併身体疾患、無職などの5因子が有意なMDDの予測因

子として残った。したがって、抑うつ症状の程度とは独立にこれらの因子がMDD発症に関与している可能性が示唆される。またこれまでの多くの疫学的研究がこれらの因子をMDDの予測因子として示唆してきたことによっても本研究の結果の妥当性は支持される。しかし、結論をえるためには、MDD発症前にこれらの因子を同定して、前方視的にこれらの因子がMDDの予測因子であるかどうかを今後確認する必要がある。この点は横断的研究である本研究の限界の1つである。

これまで、遺伝要因と子供の時の虐待、成人期ライフイベントが相互作用してうつ病発症に関与すること(Caspi et al. Science 2003)、神経症的傾向と成人期ライフイベントが相互作用してうつ病発症に関与すること(Kendler et al. Am J Psychiatry 2004)、が前方視的コホート研究で報告されてきた。しかし、子供の時の虐待(ネグレクト)と感情気質がどのように関連してうつ病発症に影響するかについてはこれまで報告されたことはない。したがって、本研究は、子供のときの虐待が気質を介してうつ病発症に影響するという媒介効果を示唆した最初の報告である。

治療抵抗性MDDに関する疫学的研究はこれまでほとんどなされていなかった。欧州で行われた大規模多施設共同研究は、不安障害併存、自殺リスクが高いこと、メランコリー型特徴、最初の抗うつ薬への非反応が治療抵抗性MDDの特徴であることを報告した(Souery et al. J Clin Psychiatry 2006)。しかし、これまで小児期虐待や成人期ライフイベント、

感情気質が MDD の治療抵抗性に関連していることは報告されたことがない。

厳密には治療抵抗性 MDD の研究とはいえないが、1 種類の抗うつ薬、精神療法への非反応に小児期虐待が予測因子であることがメタ解析で明らかになった (Nanni et al. *Am J Psychiatry* 2012)。彼らの結果は、ネグレクトと CATS 合計点が治療抵抗性 MDD と関連しているという本研究の結果を支持している。今後、小児期虐待、特にネグレクトの既往が治療抵抗性の予測因子であるか否かは、大規模かつ前方視的な臨床精神薬理学的研究によって解明される必要がある。

E. 結論

MDD 発症には多因子が複雑に影響しているが、本年度の研究は子供の時の虐待が MDD 発症に影響する際の感情気質の媒介作用を初めて明らかにし、図のような仮説モデルを提案した。さらに、治療抵抗性 MDD に子供の時の虐待、特にネグレクトが関連していることをはじめて明らかにした。今後は、DNA メチル化に及ぼす子供の時の虐待の影響と他要因との相互作用が MDD 発症に関与しているか否かについて、検討していく予定である。健康危険情報 特になし

F. 研究発表 (分担研究者分のみ)

1. 論文発表

Toda H, Boku S, Nakagawa S, Inoue T, Kato A, Takamura N, Song N, Nibuya M, Koyama T, Kusumi I: Maternal separation enhances conditioned fear and decreases the mRNA levels of the

neurotensin receptor 1 gene with hypermethylation of this gene in the rat amygdala. *PLoS One* 9(5):e97421, 2014.

Boku S, Toda H, Nakagawa S, Kato A, Inoue T, Koyama T, Hiroi N, Kusumi I: Neonatal maternal separation alters the capacity of adult neural precursor cells to differentiate into neurons via methylation of retinoic acid receptor gene promoter. *Biol Psychiatry* 77:335-344, 2015.

Inoue T, Kohno K, Baba H, Takeshima M, Honma H, Yukiei Nakai, Toshihito Suzuki T, Hatano K, Arai H, Matsubara S, Kusumi I, Terao T: Does temperature or sunshine mediate the effect of latitude on affective temperaments? A study of 5 regions in Japan. *J Affect Disord* 172:141-145, 2015.

An Y, Inoue T, Kitaichi Y, Nakagawa S, Wang C, Chen C, Song N, Kusumi I: Subchronic lithium treatment increases the anxiolytic-like effect of mirtazapine on the expression of contextual conditioned fear. *Eur J Pharmacol* 747:13-17, 2015.

2. 学会発表

井上 猛: 不安障害と気分障害の併存. 第 110 回 日本精神神経学会学術総会、横浜、2014.5.27.

若槻百美, 井上 猛, 仲唐安哉, 林下善行,
中川 伸, 久住一郎:精神科外来通院患者
における月経前不快気分障害の合併なら
びに PMDD 評価尺度の妥当性に関する
検討. 第 11 回日本うつ病学会、広島、
2014.7.19.

三井 信幸、中井 幸衛、井上 猛、中川
伸、仲唐 安哉、北市 雄士、若槻 百美、
豊巻 敦人、久住 一郎：一般成人におけ
る抑うつ症状および、自傷または自殺念
慮と TEMPS-A による気質との関連に関
する研究. 第 11 回日本うつ病学会、広島、
2014.7.19.

中井幸衛、井上 猛、豊巻敦人、戸田裕
之、仲唐安哉、中川 伸、北市雄士、亀
山梨絵、若槻百美、北川 寛、久住一郎：
幼少期ストレス、ライフイベント、気質
の抑うつに対する交互作用の検討.第 30
回日本精神衛生学会、札幌、2014.11.1

井上 猛：難治性うつ病はなぜ難治なの
か？その解決法について. 第 24 回日本
臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経
精神薬理学会合同年会、名古屋、
2014.11.22.

G. 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 26 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 先端医療振興財団 先端医療センター研究所
チームリーダー

要旨

うつ病の適切な処遇と制圧は、社会全体の要請である。早期治療の観点からはうつ発症者の検出が、そして予防の観点からは誘因かつ増悪因子である精神的ストレスの的確な評価が重要と考えられる。うつ病の有病率の高さを考慮すると、どちらもハイスループットに行えることが望ましい。本研究は、うつ病態やストレス応答に沿って、血液中生理活性物質のタンパク濃度が変動するという発見をもとに、血液検査による発症者の検出と精神的ストレスの評価に応用、さらに発症者病型サブタイプ識別を目指すものである。平成26年度には、平成25年度に引き続き産業衛生フィールドを主に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、血液検査が示した高ストレス群が後の休職群とよく一致することを見いだした。平成26年度より実施されるストレススクリーニングに推奨される「新職業性ストレス調査票」の質問項目のなかから、同高ストレス群検出のための心理テスト質問項目群の抽出を試みた。

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、うつ病者の早期発見、ならびに未発症者のうつリスク評価と予防を狙ったテストバッテリーの構築を図る。うつ病態に深く関わるものが推測される DNA メチル化とそれらの所

見とを総合的に解析さらにサブタイプの変化とを観察することで、未病からうつ発症後のサブタイプに合わせた適切な処遇を科学的根拠に基づいて構築することを目指している。

B. 研究方法

本年度は、昨年度に構築したうつ病患者群に加え、企業内産業医面談に参加あるいは診療所受診または集団検診を受検した健康者、うつ病患者のうち、本研究参加への文書による同意が得られた 319 名を新規検討対象とした。診断は、DSM-IV、同TR、同Vに準拠した。精神病症状をともなう重症うつ病エピソードおよび双極性障害う

うつ病エピソードはリクルートしたが、本年度は以降の解析対象としなかった。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。

さらに同意を得た被検者に対して、新職業性ストレス簡易調査票(労働衛生研究所)を実施、同時に血液中サイトカイン濃度に基づくストレス・うつ病リスクの検査を行った。前者の各項目の返答を5段階にポイント化。後者は判別分析によって得られるマハラノビス距離をもとに、A、A-、B(無所見)、C、D、D-(有所見)の6段階に分け、後者における有所見と無所見者について前者の各項目でのポイント差を検討。有意差が得られた項目を抽出した。(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、継続承認を得ており、平成27年5月以降は、関山の異動に伴い、大阪大学倫理委員会の承認を得る見込みである。

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できることを示していた。うつ病時の同プロファイルからの相違をあらゆるパラメータは、HAM-D正常化に伴って増加し、健常者との相違は減少することも示していた。一方で、健常者の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、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た。

今回の検討では、メンタル問題(うつ病を含む)で休職、緩和勤務中の被検者を約15%含む319名を新たにリクルートした。そのうち、うつ病の診断のもと休職中かつHAM-Dにて中等症以上の者(5名)については、先述の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

離はできないことを確認した(データの再現)。

上記新被検者に対する新職業性ストレス調査票による調査結果では、仕事のストレスを訴える者が311名で、ストレスによると推定される心身の不調を訴える者が189名だった。一方で、うつ傾向を示すとされる質問項目については有所見者がわずか6名にとどまり、そのうちうつの診断のもと休職中の者は3名だったなど、休職者、緩和勤務中の者を含めて、質問紙によるうつ傾向と実際の障害発生者との一致率は今回のスタディフィールドでは高くなかった。質問紙のうつ傾向項目だけでは偽陰性・偽陽性が発生しやすいことが明確に示された。

新職業性ストレス調査票の質問項目の中から、血液検査による有所見者(ストレス、うつハイリスク群)と無所見者とで大きな差が生じる項目を抽出した。同テストは1-4の4段階評価であるが

2.5ポイント以上の差を認めた項目

2ポイント以上、2.5ポイント未満の差を認めた項目、2ポイント未満であるが差を認めた項目をそれぞれ見いだした。

一方で、血液検査有所見者と無所見者とで有意差を認めなかった項目、またはSD以上の差を認めなかった項目も見いだした。

D. 考察

平成26年度に重点的に取り組んだのは、うつ・ストレスバイオマーカーによる解析と新職業性ストレス調査票による解析との照合による、双方の相関の検討、ついで、今後うつ病発症者が得られるであろう前向き研究フィールドの形成維持だった。

バイオマーカーによる血液検査については、発症者データの再現の確認、平成25年度にハイリスクと推定された者の休職が複数例確認され、他のフィールドにおける過去の観察結果と一致する観察結果が得られた。一方で、新職業性ストレス調査票に関しては、バイオマーカーによる有所見者群において有所見となりやすい項目を特定できた。それらの項目は、総合判定スコアとは相関を認めず、被検者個人の努力や、ものごとの受け止め方の修正だけでは改善しづらいと考えられる項目だった。

バイオマーカーによる検査の判定基準構築の際は、健常群-うつ群の比較によるグレーディングを基本にしているため、健常者とうつ群の対比で差が出やすい、日常生活の習慣や慢性的な心理状態を反映したグレーディングになっている可能性がある。そのため、被検者個人の努力や、ものごとの受け止め方の修正だけでは改善しづらいと考えられる項目が目立って差が生じたのかもしれない。

昨年度の患者フィールド形成、本年度の、有病者を含む就労者フィールド形成、バイオマーカーによる解析と心理テストによる解析の照合により、うつ発症者、うつハイリスク群、高ストレス群に特徴的な返答の傾向があることが推測され、それら有所見者をバイオマーカーで選抜できる高い可能性が示された。今回のフィールドでは、質問紙によるうつ有所見者は6名(休職者は30名以上)であり、そのうちうつの診断のもと求職中の者は3名だった。このことから、レポーティングバイアスを回避して適切な支援、予防策を講じるためには自

記式質問紙以外の方法での被検者アセスメントも望ましいと考えられた。バイオマーカーによる評価によって有所見とされたものには質問紙での回答上で一定の傾向があり、バイオマーカーの判定基準構築の際の影響を受けていると考えられた。今後は、今回用いたサイトカイン濃度に基づく検査と、それ以外の検査法（DNAメチレーション分布解析、脳機能画像など）との照合をすすめ、かつ有所見者の群を増やしサブタイプを検討することで検出・評価可能な心理・精神状態を充実させることが急務と考えられた。

E. 結論

血中サイトカイン・ケモカインは、うつ病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ばかりでなく、うつ病発症のハイリスクとされる高ストレス状態を選抜できることが示された。被検者群（就労者など）によっては、自記式質問紙よりも検出成績がよい場合があることが推測された。今後は、当研究班で研究を推進している他のマーカーとの連携、組み合わせでの適用と解析を進め、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ならびにハイリスク群の客観的指標を確立、未病から発症後のサブタイプに合わせた適切な処遇を、科学的根拠に基づいて医療現場で構築することができると思える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Microstructural abnormality in white matter, regulatory T lymphocytes, and depressive symptoms after stroke. Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Kudo T, Kikuchi-Taura A, Sekiyama A, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K. *Psychogeriatrics*. 2014;14(4):213-21.
2. Delayed atrophy in posterior cingulate cortex and apathy after stroke. Matsuoka K, Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Kudo T, Sekiyama A, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2015; 30: 566-572.
3. Microstructural abnormalities in white matter and their effect on depressive symptoms after stroke. Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Sekiyama A, Matsuoka K, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K. *Psychiatry Res*. 2014 223(1):9-14.

2. 学会発表

1. Preemptive psychiatry based on serological detection of high-risk subjects after stress. A. Sekiyama, E. Kasahara, S. Tokuno 9th International Conference on Early Psychosis (IEPA2014) 17-19, November, Tokyo
2. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress is involved in the

stress-induced fatty liver. E. Kasahara, A. Sekiyama, M. Hori, E. F. Sato, M. Inoue, S. Kitagawa. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research international 23-26, March, 2014, Kyoto

3. ストレス負荷、うつ病、統合失調症患者における血液中サイトカイン、ケモカイン濃度プロファイルの検討 関山敦生

第110回精神神経学会年次学術総会
シンポジウム14 精神医学およびメンタルヘルスのためのバイオマーカー
活用のフロントライン (2014、6月、パシフィコ横浜)

H.知的所有権の出願・登録状況
特になし

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
森信 繁	気分障害のバイオマーカー(III) うつ病・双極性障害のエピジェネティック・バイオマーカーの開発—DNAメチル化およびマイクロRNAを用いた試み—.	中村 純	精神疾患のバイオマーカー	星和書店	東京	2015	143-157

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
Watanabe SY, Iga JI, Ishii K, Numata S, Shimodera S, Fujita H, Ohmori T.	Biological tests for major depressive disorder that involve leukocyte gene expression assays.	J Psychiatr Res.			in press
Numata S, Ishii K, Tajima A, Iga J, Kinoshita M, Watanabe S, Umehara H, Fuchikami M, Okada S, Boku S, Mishimoto A, Shomoderqa S, Imoto I, Morinobu S, Ohmori T	Blood diagnostic biomarkers for major depressive disorder using multiplex DNA methylation profiles: discovery and validation.	Epigenetics	10	135-141	2015
Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Ohi K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Takeda M, Ohmori T.	Aberrant DNA Methylation of Blood in Schizophrenia by Adjusting for Estimated Cellular Proportions.	Neuromolecul ar Med.	16(4)	697-703	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
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)	190-198	2014
Hayashi K, Yoshimura R, Kakeda S, Kishi T, Abe O, Umene-Nakano W, Katsuki A, Hori H, Ikenouchi-Sugita A, Watanabe K, Ide S, Ueda I, Moriya J, Iwata N, Korogi Y, Kubicki M, Nakamura J	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.	Neuropsychiatric Disease and Treatment,	25;10	1183-1190	2014
Yoshimura R, Kishi T, Hori H, Atake K, Katsuki A, Nakano-Umene W, Ikenouchi-Sugita A, Iwata N, Nakamura J	Serum proBDNF/BDNF and response to fluvoxamine in drug-naïve first-episode major depressive disorder patients.	Annals of General Psychiatry	9	13-19	2014
Yamanouchi Y, Sukegawa T, Inagaki A, Inada T, Yoshio T, Yoshimura R, Iwata N, and SCAP study co-operation group:	Clinical study evaluating individually safe correction of antipsychotic agent polypharmacy in Japanese patients with schizophrenia: Validation of the safety correction for antipsychotic polypharmacy and high-dose method.	International Journal of Neuropsychopharmacology			in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikeda M, Yoshimura R, Hashimoto R, Kondo K, Saito T, Shimasaki A, Ohi K, Kawamura Y, Nishida N, Miyagawa T, Sasaki M, Takeda M, Nakamura J, Ozaki N, Iwata N:	Genetic overlap between antipsychotic response and susceptibility for schizophrenia	Journal of Clinical Psychopharmacology			in press
Nishimura J, Kakeda S, Abe O, Yoshimura R, Watanabe K, Goto N, Hori H, Sato T, Takao H, Kabasawa H, Nakamura J, Korogi Y	Plasma levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylglycol are associated with microstructural changes within the cerebellum in the early stage of first-episode schizophrenia: a longitudinal VBM study	Neuropsychiatric Disease and Treatment	10	2315-2323	2014
Hori H, Yoshimura R, Katsuki A, Atake K, Nakamura J	Relationships between brain-derived neurotrophic factor, clinical symptoms, and decision-making in chronic schizophrenia: data from the Iowa Gambling Task.	Front Behav Neurosci.	8	417	2014
Hori H, Yamada K, Kamada D, Shibata Y, Katsuki A, Yoshimura R, Nakamura J	Effect of blonanserin on cognitive and social function in acute phase Japanese schizophrenia compared with risperidone.	Neuropsychiatric Disease and Treatment.	10	527-533	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
Atake K, Yoshimura R, Hori H, Katsuki A, Nakamura J	Catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype and the clinical responses to duloxetine treatment or plasma levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and homovanillic acid in Japanese patients with major depressive disorder	Neuropsychiatry Dis Treat.	11	967-974	2015
Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Katoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T, Kokubo Y, Mimura M	The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression.	Journal of Psychiatric Research	53	47-53	2014
Toda H, Boku S, Nakagawa S, Inoue T, Kato A, Takamura N, Song N, Nibuya M, Koyama T, Kusumi I	Maternal separation enhances conditioned fear and decreases the mRNA levels of the neurotensin receptor 1 gene with hypermethylation of this gene in the rat amygdala	PLoS One	9(5)	e97421	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
Boku S, Toda H, Nakagawa S, Kato A, Inoue T, Koyama T, Hiroi N, Kusumi I	Neonatal maternal separation alters the capacity of adult neural precursor cells to differentiate into neurons via methylation of retinoic acid receptor gene promoter	Biol Psychiatry	77	335-344	2014
Inoue T, Kohno K, Baba H, Takeshima M, Honma H, Yukiei Nakai, Toshihito Suzuki T, Hatano K, Arai H, Matsubara S, Kusumi I, Terao T	Does temperature or sunshine mediate the effect of latitude on affective temperaments? A study of 5 regions in Japan	J Affect Disord	172	141-145	2015
An Y, Inoue T, Kitaichi Y, Nakagawa S, Wang C, Chen C, Song N, Kusumi I	Subchronic lithium treatment increases the anxiolytic-like effect of mirtazapine on the expression of contextual conditioned fear	Eur J Pharmacol	747	13-17	2015
Matsuoka K, Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Kudo T, Sekiyama A, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K.	Delayed atrophy in posterior cingulate cortex and apathy after stroke.	Int J Geriatr Psychiatry.	30	566-572	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Kudo T, Kikuchi-Taura A, Sekiyama A, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K.	Microstructural abnormality in white matter, regulatory T lymphocytes, and depressive symptoms after stroke.	Psychogeriatr ics.	14(4)	213-221	2014
Yasuno F, Taguchi A, Yamamoto A, Kajimoto K, Kazui H, Sekiyama A, Matsuoka K, Kitamura S, Kiuchi K, Kosaka J, Kishimoto T, Iida H, Nagatsuka K.	Microstructural abnormalities in white matter and their effect on depressive symptoms after stroke.	Psychiatry Res.	223 (1)	9-14	2014

6-3 気分障害のバイオマーカー (Ⅲ) うつ病・双極性障害のエピジェネティック・バイオマーカーの開発 —DNA メチル化およびマイクロ RNA を用いた試み—

森信 繁

高知大学医学部神経精神科学

はじめに

厚生労働省の指針の改訂から、国民の健康に大きな影響をおよぼす五疾患のひとつとして精神疾患も取り上げられ、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の大きさは、うつ病が全世界での障害調整平均余命低下要因の第2位になることが2012年に報告される²⁴⁾など、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6.6%と報告されており¹³⁾、日本での気分障害患者数は、厚生労働省の調査で2001年が44万人であったものが2013年には96万人となっており¹²⁾、急増していることがわかる。

その一方で現在の精神疾患の診断は、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 5th edition (DSM-5) 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、準拠して行われている。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判断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稀ではない。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や適切な治療薬選択上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の創出とこれに基づく薬物治療アルゴリズムの開発が必要とされている。

このような精神科診断を巡るバイオマーカーの必要性は世界的にも共有されており、これまでもゲノムワイドな一塩基多型 (SNP) を用いた試みや、制限酵素多型を用いた挑戦が行われてきたが、その結果は満足できるものではなかった。これらの試みは生得的な遺伝子上の変異を対象としたバイオマーカーの開発であり、うつ病のように幼少期の養育環境をはじめ多様な環境因が複雑に発症に関与すると考えられている疾患では、ストレス要因によって変化する可変的な現象に焦点を当てたマーカー探索が妥当と思われる。このため本稿では、近年、特に遺伝子の転写や翻訳過程に作用して遺伝子発現を調節し、環境要因によって可塑的な変化も報告されている、DNAメチル化およびマイクロRNA (miRNA) を用いた、うつ病診断バイオマーカーの最近の研究成果を紹介する。

DNA メチル化とは

DNA メチル化はヒストン修飾 (アセチル化など) と並んで、エピジェネティクスという分野に属する現象である。エピジェネティクスとは、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導く現象の総称と要約される。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。

DNAメチル化はDNA methyltransferase (Dnmt) によって、DNAを構

成する塩基のひとつであるシトシンの5位にメチル基の付く反応である。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特異的なDNA上の結合部位への結合が抑制され、結果的に遺伝子の転写が抑制されることになる。逆に、脱メチル化はTet methylcytosine dioxygenase (Tet1)によるhydroxymethylation反応後にcytidine 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。脱メチル化反応の促進によって凝集していたクロマチン構造が緩やかになり、転写因子が特異的な結合部位に容易に結合できるようになり、結果として遺伝子の転写が亢進することになる。このようにDNAメチル化反応は、DnmtとTet1をはじめとするいくつかの酵素群との間で制御される、可塑的な現象である。

環境因が本当に脳内のDNAメチル化に影響を及ぼし、脳内の遺伝子発現を変化させるのかについては大きな疑問であった。これに対してMcGill大学のWeaverらのグループ²⁵⁾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、成長後のストレス暴露に対して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DNAメチル化の変化がさかんに研究されるようになってきた。

BDNF 遺伝子メチル化によるうつ病および双極性障害の バイオマーカー開発 (表 6-3-1)

DNAメチル化を用いたうつ病のバイオマーカーの開発は、ごく最近になってアレイ法であるHuman Methylation 450 BeadChip (Illumin)を用いたゲノムワイドな探索も行われているが、現状ではこれまでの精神薬理学的研究から報告されている、病態関連遺伝子や治療薬標的遺伝子を対象としたメチル化研究が一般的である¹¹⁾。うつ病を対象にBDNF遺伝子のメチル化を解析した報告は筆者らの研究をはじめ、これまでにいくつかの報告がみら

表 6-3-1 大うつ病を対象とした BDNF 遺伝子メチル化研究

研究者	文献	年	解析部位 (解析した CpG 数)	解析方法
Fuchikami	6)	2011	Chr11: 27743473 - 27744564 35 CpGs	MassARRAY
Kang	10)	2013	-714 ~ -604 (転写開始点から) 7 CpGs	Pyrosequencing
Carlberg	1)	2014	exon I promoter	MethyLight
Song	21)	2014	Chr11: 27743473 - 27744564 10 CpGs	HM450 *

* HM450 : Human Methylation 450 (Illumina)

れる。筆者ら⁶⁾は BDNF 遺伝子の exon I プロモーター領域の CpG アイランドおよび exon IV プロモーター領域の CpG のメチル化解析を、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。BDNF 遺伝子 exon I, IV のプロモーター領域の CpG のメチル化プロフィールを二次元階層的クラスター解析で解析し、ヒートマップで視覚化した。その結果、exon I 上流の DNA メチル化プロフィールによって、うつ病群と健康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 exon 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、わずかな重なりはあるものの exon I 同様にうつ病群と健康対照者群に分類できることがわかった。特に exon I プロモーター領域の 81 個のうち、方法論上の問題から 35 個の CpG のメチル化率のみが計測できたが、うつ病群と健康対照者群とでメチル化率に有意な差のあった CpG は 29 個と、うつ病の診断バイオマーカーとして有力であることがわかった。

筆者らの報告以外にうつ病を対象に BDNF 遺伝子のメチル化を解析した報告として、2つの報告がある。Kang ら¹⁰⁾の研究では 108 名のうつ病患者のみを対象にしており、健康者との間でのメチル化率の比較は行っていない。この研究ではメチル化率と臨床症状や社会的背景などの関連を解析しており、メチル化率の亢進は過去の自殺企図、治療中の自殺念慮、12 週間の治療後の自殺念慮や高い Beck Scale for Suicide Ideation 値および自殺念慮

への低い治療効果と、有意な相関があったことを示している。これに対して Song ら²¹⁾の報告は、BDNF 遺伝子 exon I プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化を 774 名の日本人勤労者を対象に計測している。この研究では DSM-IV-TR などの精神科診断基準は用いておらず、うつ状態を Kessler's K6 questionnaire で評価しているが、K6 で高得点群は低得点群に比べて有意にメチル化率に低下のみられることを報告している。この報告は筆者ら⁶⁾の報告と比べて方法論的な違いはあるものの、結果的には BDNF 遺伝子 exon I プロモーター領域のメチル化率が、うつ病の診断バイオマーカーとなる可能性を支持していると考えられる。この他にも個人的な情報であるが Emory 大学の Ressler や Smith らも、筆者らと全く同じ方法でうつ病患者と健康者で BDNF 遺伝子メチル化の解析を行ったが、筆者らの結果を支持する結果は得られていない。筆者らと Emory 大学との研究結果の差異の原因として、未治療であるか否かの問題や、幼少期の虐待体験の有無などの養育環境の違いなどがあると推測される。

未治療うつ病の診断バイオマーカーとしてだけではなく、BDNF 遺伝子の exon I プロモーターの CpG アイランドのメチル化解析は、難治性うつ病の診断マーカーとなる可能性もある。筆者らは電気けいれん療法が適応となった大うつ病 15 例の治療前・治療後で、BDNF 遺伝子のメチル化率を計測し、そのプロフィールを用いて健康者や未治療うつ病群との比較を試みた。その結果、電気けいれん療法群のメチル化プロフィールは、健康者群や未治療うつ病と比べて、異なった分布を示すことがわかった (図 6-3-1)。このような難治性うつ病に特徴的な BDNF 遺伝子のメチル化プロフィールは、病気による結果かこれまでの治療薬による結果であるのか、現時点ではわからない。ただこのような結果は、BDNF 遺伝子のうつ病の病態への密接な関連を示唆していると思われる。

BDNF 遺伝子のプロモーター領域のメチル化と双極性障害との関連を解析した研究も、うつ病同様にいくつかみられる。D'Addario ら²⁾は 94 名の双極性障害患者と 52 名の健康者を対象に解析を行っており、双極性障害 II