

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）

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、白血球をサンプルとして DNA メチル化修飾変化を網羅的に解析し、変化を見出した複数のメチル化サイトを組み合わせ、うつ病の診断マーカーを作成することを目的とする。メチル化修飾解析に加え、特定遺伝子 mRNA 発現などを第 2 の指標軸として設定する。これらの工夫により生物学的マーカーの弱点となりがちな患者群と対照群のオーバーラップの回避を狙うとともに、双極、単極、難治性の区別を視野に入れている。平成 26 年度までの研究により、17 種のメチル化サイトの組み合わせで、うつ病と健常者の識別が可能であることを明らかにし、特許を出願し（特願 2014 161176）論文発表した。また、5 種の遺伝子 mRNA 発現の組み合わせによっても高い精度でうつ病と健常者の識別が可能であることを示し、特許を出願し（特願 2014 035813、PCT/JP2015/051107）論文が受理されている。患者負担は少量の採血のみなので、臨床現場で使用しやすいマーカーとなりうる。網羅的解析を起点とするが、最終的には少数の測定指標に絞り込める見通しであり、安価かつ安定した実用可能なマーカーを目指している。

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	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

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可能とする。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のが望ましい。本研究は、

治療反応の異なつた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。研究代表者らは白血球をサンプルとして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）、うつ病ではこれと異なる所見を得た。また、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る（Fuchikami 他. 2011）。本研究は、これらの所見を発展させ、DNA メチル化修飾変化を組み合わせたうつ病の診断マーカーを作成することを目的としている。並行して、mRNA 発現解析などを利用した判別も検討する。患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。

B. 研究方法

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。血漿を BDNF とサイトカインの測定に供する。

網羅的および選択的 DNA メチル化解析に関しては、抽出したゲノミック DNA を、Infinium HumanMethylation450 Beadchip (Illumina 社)を用いて、広範囲

の遺伝子 CpG サイトのメチル化修飾状態を調べた。解析は外部に委託した。網羅的解析によって差異の見出されたメチル化サイトの一部に関しては PyroMark を用いて検証した。

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してプライバシーを保護する。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および平成 27 年度から施行される「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守する。研究計画は各施設の倫理委員会において承認を受けている。

C. 研究結果

平成 25 年度および 26 年度における DNA メチル化修飾変化を指標とする研究では、

うつ病 20 名と対照 19 名の第一集団 (39 名) において、メチル化アレイを用いて診断間にメチル化レベルに差異のある遺伝子サイトを同定した。それらのサイトの内、17 種類のサイトを用いた判別分析法を行ったところ、うつ病群と対照群の 2 群にサンプルを区別することができた。同じ 17 種類のサイトを用いてうつ病 12 名と対照 12 名の第 2 集団 (24 名) で検証を行ったところ再現性のある結果を得られた。これらの成果は Epigenetics (Numata et al. 2015) に掲載され、国内特許を出願し (特願 2014 161176) 国際特許を出願準備中である。服薬の影響について予備的に検討したところ、うつ病急性期例服薬例においても判別が可能であった。双極性障害についても、まず治療中の患者サンプルを解析したところ、単極性うつ病とは別の変化を見出している。

網羅的解析によって変化の見られた遺伝子メチル化サイトのいくつかについて PyroMark を用いて検討したところ、GSK3-

のひとつサイトにおいてうつ病患者のメチル化が低下し、これと対応して GSK3- の mRNA 発現は増加し、両変化の程度は逆相関していた。

また、mRNA 発現解析を指標とする研究では、うつ病 25 名と対照 25 名の第一集団において PCR アレイを用いて診断間に mRNA レベルに差異のある遺伝子を同定し

た。判別に必要な最少限の遺伝子を検討したところ、それらの内、5 種類で十分であることが判明し、感度 80%特異度 92% でサンプルをうつ病群と対照群に区別することができた。同じ 5 種類の遺伝子を用いてうつ病 20 名と対照 18 名の第 2 集団で検証を行ったところ感度 85%特異度 89%となり、再現性のある結果を得られた。これらの成果について、25 年度に十数種類の遺伝子 mRNA を使用する方法で国内特許を申請していたが (特願 2014 035813) 26 年度には特許内容を修正するとともに国際特許も出願し (PCT/JP2015/051107) 論文が J Psychiatr Res (Watanabe et al. 2015) に印刷中となっている。カスタム化アレイに搭載する遺伝子を再検討し、双極性障害における検討を準備している。

D. 考察

平成 26 年度の研究では、平成 25 年度に引き続き、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。論文発表し (Numata et al. Epigenetics 2015) 国内特許を出願し (特願 2014 161176)

国際特許を出願準備中である。予備的検討から、うつ病急性期例服薬例においても判別が可能であることが判明し、服薬の影響は受けないことが示唆された。また双極性障害ではうつ病とは異なる変化が認められた。

最近、白血球をサンプルとするメチル化修飾変化の解析において、白血球成分の補正を行う手法が開発されているので、これを導入する必要性も検討を要する。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。研究結果は、新たな病態解明の糸口を拓いた点において学術的意義も高い。

また、PCR アレイによる mRNA 発現を指標とする診断マーカーでは、平成 25 年度において、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。平成 26 年度の検討によって 5 種で十分であることが判明し、特許内容を修正するとともに国際特許も出願し (PCT/JP2015/051107)、論文が J Psychiatr Res (Watanabe et al.2015) に印刷中となっている。

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。

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 26 年度までの研究成果において、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がこれまでにない高い精度で可能であることを示し、論文発表し、特許を取得した。

これらの結果は DNA メチル化修飾変化および mRNA 発現を利用した実用的な診断マーカーの作成が可能であることを示唆している。現時点では、うつ状態においてのみ見られる所見 (state-dependent) か、回復後にも持続する所見 (trait dependent) かはまだ不明である。うつ病の病態との関連も今後の検討課題である。

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（主任研究者分のみ）

1. 論文発表

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.* 2015 doi: 10.1016/j.jpsychires.2015.03.004. [Epub ahead of print]

Numata S, Ishii K, Tajima A, Iga JI, Kinoshita M, Watanabe S, Umehara H, Fuchikami M, Okada S, Boku S, Hishimoto A, Shimodera S, Imoto I, Morinobu S, Ohmori T. Blood Diagnostic Biomarkers for Major Depressive Disorder using Multiplex DNA Methylation Profiles: Discovery and Validation. *Epigenetics.* 10(2):135-41,2015 doi: 10.1080/15592294.2014.1003743.

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. *Neuromolecular Med.* Dec;16(4):697-703,2014 doi: 10.1007/s12017-014-8319-5.

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.

2. 学会発表

Numata S, Kazuo I, Tajima A, Iga JI, Kinoshita M, Watanabe S, Umehara H, Fuchikami M, Okada S, Shimodera S, Imoto I, Morinobu S, Ohmori T. Blood diagnostic biomarkers for major depressive disorder using DNA methylation profiles. *Neuroscience, Washington DC, 2014.11.18*

Inoshita M, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Imoto I, Ohmori T. Sex differences of blood in DNA methylation. *Neuroscience, Washington DC, 2014.11.18*

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Nishi A, Imoto I, Ohmori T. Blood homocysteine and schizophrenia evaluated by a Mendelian

randomization analysis. Neuroscience,
Washington DC, 2014.11.17

Watanabe S, Iga J, Numata S,
Shimodera S, Fujita H, Ishii K, Ohmori
T. Leukocyte gene expression-based
diagnostic test for major depressive
disorder: A pilot and replication study.
29th CINP World Congress of
Neuropsychopharmacolog, Canada,
2014.6.24

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願2014 161176 平成26年8月7日
気分障害マーカーおよびその用途、な
らびに統合失調症マーカーおよびそ
の用途
大森哲郎、沼田周助 他

2) 国際特許出願番号

- PCT/JP2015/051107 平成 27 年 1 月
16 日
精神疾患マーカーおよびその用途
大森哲郎、伊賀淳一 他

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし