

薬物治療に関連するバイオマーカー探索に関する研究

代謝変容を基軸とした抑うつバイオマーカー検索

業務分担者 斉藤 邦明 京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

うつ病は自殺の主たる原因になっており、最近では労働者のメンタルヘルス対策によりストレスチェックが法定で義務化されるなど、社会問題化している。そういった深刻な問題であるにもかかわらず、うつ病の診断に有用な生体指標の開発は発展途上にある。本研究では、健常人データベース解析から解析対象を効率的に抽出できるデータベースの構築および対象となるバイオリソースを用いた抑うつのバイオマーカー探索、さらには新たなターゲット因子の機能解析を行った。1) サイトカイン高発現により誘導される、抑うつ疾患動物モデルの解析結果より、ターゲット遺伝子の候補としてセロトニン系に加えて、トリプトファン-キヌレニン代謝の変容が重要であることを明らかにした。また、2) 歴年的バイオリソースおよび健康情報をデータベース化し、より効率的に抑うつバイオマーカーを検索する足がかりとなるシステムが構築された。さらに、データベースより効率的に抽出した血液を解析し、トリプトファン-キヌレニン代謝の変容がセロトニン系に加えて新たな抑うつのリスクとなる可能性を示した。本結果は、新たな抑うつのリスクとなるターゲットの存在を示唆する重要な知見であり、臨床応用が充分期待できる。また、人間ドックの歴年的検診データなど抑うつ、ストレスなどの解析結果をデータベース化し、効率的に解析サンプルを抽出することで、新規バイオマーカー検索を可能としたことの行政的意義は大きい。

A. 研究目的

メンタルヘルス対策の充実を目的として職員のストレスをチェックする事を義務化する労働安全衛生法の一部を改正する法案（ストレスチェック義務化法案）が本年成立した。しかし、ストレスによる不健康を見つけ出すためのバイオマーカー、確定診断、その間の治療と社会復帰等、その社会医療システム構築は発展途上である。特にストレスに関連した抑うつ症状の発症は、遺伝的素因と環境要因の間で生じる相互作用 (gene-environment interaction) が深く関係している。本研究では、1) 抑うつ関連バイオマーカー検索として、サイトカインの高発現により誘導されたうつ様マウスモデルを作製し、ターゲット遺伝子の代謝変容を基軸とした機能解析を行う。2) ストレスならびに食習慣に関する調査データが付随した歴年的(経時的)に採取・保存された人間ドック、疾患バイオリソース(BR)を用いて、ビッグデータ解析を可能とするデータベースを作成する。さらに、効率的に選択したバイオリソースを用いて、新規バイオマーカー検索および抑うつの発症に伴い変動する疾患特異的代謝機能の変動を解析する。

B. 研究方法

1) 疾患動物モデル

サイトカインの高発現により誘導されたうつ様マ

ウスモデルを作製し、ターゲット遺伝子の1つとしてトリプトファン-キヌレニン代謝機能解析を行った。

1. サイトカイン遺伝子導入法:

野生型マウス (C57BL/6J, 8 週齢、) は清水実験材料株式会社より購入し、本学の動物舎 (室温 25 ± 1 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、明暗サイクル 7:00-19:00) で飼育した。1 週間の馴化期間後、IFN 高発現群は Liu らの方法に従い、IFNpDNA をマウス体重の約 9%量の生理食塩水に溶解し、尾静脈から 5 秒以内に全量注入した。コントロール群には、同様の方法で生理食塩水のみを尾静脈から注入した。ターゲット分子の1つとしてトリプトファン-キヌレニン代謝を変容させる ID01 遺伝子欠損マウス (C57BL/6J Background) を用いた。

2. 強制水泳試験法:

試験にはスキャンネット MV-40 AQ (メルクエスト社) を用いた。実験開始 1 時間前よりマウスを実験室 (室温 25 ± 1 、湿度 $55 \pm 10\%$) にて実験室に馴化させた。シリンダーにはあらかじめ 13.5 cm の高さまで水道水 (22 ± 1) を入れ、その中でマウスを 6 分間強制的に水泳させ、6 分間のうち後半 5 分間の無動時間を測定した。シリンダーは試験毎に水道水で洗浄した。

2) 対象としたサンプル

リエゾン領域で発症するうつ病を解析するための基

礎データとして、ターゲット分子をより効率的に解析するために抑うつを対象にしたバイオリソースと個々人の健康情報をデータベース化した。解析したサンプルは健康科学リソースセンターで歴年的に保存されている2085名のCES-D、GHQ28およびBSIDなど質問紙による調査データならびに人間ドック検診項目ほかを対象とし、解析が必要となる健常群を抽出、リエゾン領域で発症するうつ病の新規バイオマーカー検索を行うためのシステムを構築した。抽出したサンプルは、ターゲット分子の1つであるトリプトファン-キヌレニン代謝系代謝産物について多成分の測定を行った。抑うつの調査質問紙は下記に示したものを使用した。

1. CES-D

Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D) は一般人のうつ症状の評価を目的として1977年にRadloffが作製した国際的に妥当性が示されている質問紙である。20項目からなり、0,1,2,3点の4段階で0~60点で評価する。ガイドラインに従って16点以上を抑うつとした。

2. GHQ28

General Health Questionnaire (GHQ: 精神健康調査票) は神経症者の症状把握、評価、迅速な発見のために1978年にGoldbergが開発した質問紙で、国際的に妥当性が示されている。GHQ28はGHQ60の短縮版で、4区分28項目4段階(0,0,1,1点)の0~28点で評価する。日本語版GHQ28では健常者と神経症者との臨界点は5/6点、うつ状態を目的とした場合は7/8点が妥当であると報告されているため、8点以上を抑うつとした。

3. BSID

うつ病の簡便な構造化面接法 (Brief Structured Interview for Depression: BSID) を用いた。

3) サンプル抽出

2012年度の、解析した2085名中、抑うつ陽性であった60名(男性41名、女性19名)(測定55名(男性37名+女性18名)分)のうち、抗うつ薬を服用している6名を除いた49名を解析対象とし、健常群と年齢をマッチさせることができた42名(男性28名、女性14名)と健常群42名(男性25名、女性17名)を抽出して比較検討した。なお、この健常群は「対照となる健常人の抽出」で選別された健常群のうち、GHQ28<8点、CES-D<16点を共に満たす61名(男性29名、女性32名)から年齢に応じて抽出した。

4) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

血清の4分の1量の10%過塩素酸を用いて除蛋白した。14000rpm、4で10分間遠心後、上清を高速液体クロマトグラフィーLC-20AD(島津製作所)に50 μ l注入し、上清中のkynurenine (Kyn)、tryptophan (Trp)、3-hydroxyanthranilic acid (3HAA)、kynurenic acid (KA)、anthranilic acid (AA)を測定した。移動相として10mM酢酸ナトリウム、0.5~1.25%アセトニトリル(pH4.5)を調整し、流量を0.9ml/minに設定した。カラムはTSKgel ODS-100v 3 μ m 4.6mm(ID)×15cm(L)を用い、カラム温度40度で測定を行った。Trp、Kynの測定には紫外線可視分光検出器(SPD-20A、島津製作所)を用い、Kyn測定はUV波長365nm、Trp測定はUV波長280nmで行った。3HAA、KA、AAの測定には蛍光検出器(RF-10AXL、島津製作所)を用い、3HAA、AA測定は励起波長320nm、蛍光波長420nmで行い、KA測定は励起波長334nm、蛍光波長380nmで行った。3HK測定は、上記の方法とは別に血清の4倍量の10%過塩素酸を用いて除蛋白した。14000rpm、4で10分間遠心後、上清を高速液体クロマトグラフィー(エイコム)に20 μ l注入し、上清中の3HKを測定した。移動相として0.27mM EDTA、8.9mM 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム、0.59%リン酸、0.9%トリエチルアミン、1%アセトニトリルを調整し、流量を0.5ml/minに設定した。3HKの測定には電気化学検出器(Eicom ECD-300、エイコム)を用い、印加電圧は+500mVに設定した。カラムはEICOMPAK SC-50DS 3.0mm(ID)×150mm(L)を用い、カラム温度25度で測定を行った。

5) 統計解析

データはすべて平均 \pm 標準偏差(mean \pm SD)で表記した。2群間での有意差の判定にはt-testまたはMann-Whitney testを用い、3群以上での有意差の判定にはANOVAとBonferroni post hoc testを用いた。P<0.05を統計学的に有意差ありと判断した。

(倫理面への配慮)

健常人バイオリソースと健康情報の使用については、ヘルシンキ宣言の倫理規定および厚生労働省による臨床研究指針を遵守し、被験者の同意の自由、同意の取り下げの自由があり、プライバシーの保護(個人情報保護)に配慮し、人権保護を最優先した上で使用することを徹底している。実験計画は京都大学大学院医学研究科・医学部および医学部附属病院の医の倫理委員会に関係書類を提出し承認を得ている。実験動物

の使用に関しては、動物愛護法を遵守し、京都大学における動物実験の実施に関する規定に基づき、動物実験計画書を提出、動物実験委員会で承認、また遺伝子操作動物については組み替えDNA実験・研究用微生物安全委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) 薬物治療に関連するバイオマーカー探索に関する研究
サイトカインの高発現により誘導された、うつ様マウスモデルを解析し、行動薬理的解析を行った結果、ターゲット分子の1つである IDO1 分子を抑制する事により、抑うつが軽減、さらに、IDO1 遺伝子欠損マウスのフェノタイプ解析により IDO1 遺伝子の抑制により不安が軽減する事が明らかとなった。

2) リエゾン領域で発生するうつ病のバイオマーカー探索に関する研究

抑うつ、ストレス調査データ (CES-D、GHQ28 および BSID) ならびに人間ドック検診項目ほかを解析し、リエゾン領域で発症するうつ病の新規バイオマーカー探索を行うための基礎的解析を進めるためのデータベース化を行った。さらに、本データベースを利用し、健常人血清を用いたターゲット分子の探索を行うために、抗うつ薬を服用していない質問紙による抑うつ陽性群 42 名 (男性 28 名、女性 14 名) と平均年齢がほぼ同じ健常群 42 名 (男性 25 名、女性 17 名) を抽出し、ターゲット分子について解析を行った。その結果、データベースから抽出した血清トリプトファン-キヌレニン代謝産物は、抑うつ陽性群は健常人に比べ有意なトリプトファン-キヌレニン代謝系の上昇が認められた。さらに、マウスの行動薬理的解析より、トリプトファン-キヌレニン系代謝変動と抑うつ様症状の発症との関係が認められた。すなわち、キヌレニン代謝基軸を変動させる事で、不安あるいは抑うつ状態を動物で検証可能であり、抑うつ疾患モデルマウスとして有用であることを示唆している。

D. 考察

健常人バイオリソースの健康情報をデータベース化し、より効率的に抑うつバイオマーカーを検索する足がかりとなるシステムが構築された事の意義は大きい。データベースを用いる事で、今回トリプトファン-キヌレニン代謝の変容がセロトニン系に加えて新たな抑うつリスクとなる可能性を示し、ターゲット遺伝子候補をマウスで遺伝子改変することにより機能解析を可能とした。今後は、個々人の歴年的なバイオリソースを用いた検索な

らびに産科あるいは口腔外科リエゾン領域の患者サンプルについてトリプトファン-キヌレニン代謝産物を測定し、関連分子であるサイトカイン系の変動と比較検討することによりリスクファクターに関するプロファイル解析が期待できる。

E. 結論

トリプトファン-キヌレニン代謝の変容がセロトニン系に加えて新たな抑うつリスクとなる可能性を示唆する重要な知見となり、臨床応用が期待できる。また、人間ドックの歴年的検診データなど抑うつ、ストレスなどの解析結果をデータベース化し、効率的に解析サンプルを抽出することで、新規バイオマーカー探索を可能としたことの行政的意義は大きい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 松尾雄志, 桜井雅史, 齋藤邦明. 先制医療への挑戦 - バイオマーカー開発に求められる方向性 - : 先制医療に必要なバイオリソース/データバンク 臨床化学 43(4) 302-312. 2014.
- 2) 桜井雅史, 松尾雄志, 村上由希, 山本康子, 竹村正男, 松波英寿, 齋藤邦明. データヘルス計画とはなにか 健康管理のデータベース化と解析手法 機器・試薬 37(4) 2014.

2. 学会発表

- 1) 齋藤邦明: 免疫調節因子 IDO と抑うつとの関わり 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 年 11 月 22 日)
- 2) 竹田 真由, 加奈山憲代, 桜井 雅史, 村上 由希, 山本 康子, 竹村 正男, 林 慎, 松波 英寿, 松尾 雄志, 舩渡 忠男, 登 勉, 齋藤 邦明: 先制医療の実現に向けたバイオリソースバンクでのデータベース構築(第1報) 第61回 日本臨床検査医学会 (福岡, 2014 年 11 月 25 日)
- 3) 村上 由希, 齋藤邦明: 個別化医療の実現に向けたデータベース構築 第 24 回 日本臨床精神神経薬理学会 第 30 回 日本健康科学学会 (浜松, 2014 年 9 月 20 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし