

リエゾン領域で発生するうつ病のバイオマーカー探索
新規および既知の候補遺伝子の代謝・活性調節能の検討とバイオマーカーの開発
業務分担者 野田 幸裕 名城大学薬学部 教授

研究要旨

本研究では、精神疾患における診断あるいは治療反応性予測バイオマーカーの探索・同定を目的とし、1) 新規バイオマーカーの探索、2) 閾値下うつ（産科リエゾン領域の抑うつ状態、口腔外科リエゾン領域の抑うつ状態）のバイオマーカーの同定を目指した研究を行った。1) においては、新規薬物治療に関連するバイオマーカー探索するため、実験モデル動物での脳および血液サンプルでの遺伝子発現解析の条件検討を行い、サンプルを採取した。2) においては、閾値下うつのバイオマーカーの候補分子の一つであるセロトニントランスポーター（SERT）あるいはノルアドレナリントランスポーター（NAT）のユビキチン化のヒト末梢血での測定条件を確立し、産後うつ病患者において血小板中の SERT 量の増加傾向を確認し、口腔内疼痛性障害患者の血小板中のユビキチン化 SERT 量が少なく、抑うつ重症度が高い傾向を同定した。本結果は、ユビキチン化 SERT が抑うつ状態のバイオマーカーとして臨床応用可能な根拠となる重要な知見となり、臨床応用が期待できる。

A. 研究目的

精神疾患の多くはほぼ生涯にわたって内服を継続する必要があり、早期の診断・治療介入が予後を左右する。また、身体疾患はうつ病のリスクであり、精神科以外の患者においてうつ病頻度は高く、総合病院での自殺は大きな問題である。一方、現状の医療体制では、リエゾンが出来る総合病院は限られており、多くは院内外の精神科へコンサルテーションが為されている。しかし、非精神科の医師では、どの症例をコンサルトすべきか決定しがたいというジレンマがあり、閾値下の抑うつ状態群とうつ病群を峻別するマーカーが待望されている。

本研究では、1) 精神疾患の早期の診断・治療の新規バイオマーカーを探索し、2) リエゾン領域において、気分障害の発症率が約 10%と比較的高い産後うつ状態や、口腔外科領域で合併する抑うつ傾向を示す患者を対象に、抑うつ状態に関与するセロトニントランスポーター（SERT）あるいはノルアドレナリントランスポーター（NAT）のユビキチン化タンパク質の末梢血での発現量と閾値下の抑うつ状態との関連性を検討した。

B. 研究方法

1) 新規バイオマーカー探索に関する研究

- ・幼若期社会的敗北ストレス負荷マウスの作製：3 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスを攻撃性の高い ICR 系雄性マウスと 1 日 10 分間、10 日間連続して物理的に接触させ、慢性社会的敗北ストレス負荷マウスを

作製した。

- ・サンプル調整：最終ストレス負荷 2 時間後と 24 時間後に採血・抜脳し、市販キットを用いて RNA を抽出した。
- 2) リエゾン領域で発生するうつ病のバイオマーカー同定に関する研究
 - ・対象とサンプル：一般ボランティア（男性：追加 3 例、計 15 例、女性：追加 6 例、計 21 例）および、妊産婦（妊娠中期あるいは産後 1 ヶ月：17 例）あるいは口腔内疼痛性障害患者（初診あるいは治療 12 週間後：20 例）の前向きコホート研究から得られた末梢血をサンプルとして用いた。
 - ・ユビキチン化 SERT あるいは NAT の測定：各被験者から得られた末梢血は、遠心分離により血小板を得た。得られた血小板におけるユビキチン化タンパクは、市販キットを用いて回収し、抗 SERT あるいは NAT 抗体を用いてウェスタンブロッティング法によりユビキチン化 SERT あるいは NAT を検出した。
 - ・心理状態検査：一般ボランティア採血時には気質性格検査（TCI）とベック抑うつ評価尺度による心理状態検査を行った。

3) 統計解析

得られた結果は、一元配置分散分析を行い、各群間比較には Tukey-Kramer の多重比較検定を用いた。2 群間比較には、Student t 検定を、関連解析にはピアソンの相関係数を用いた。全ての統計解析において有意

水準を 5% と設定し、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

(倫理面への配慮)

本研究課題の一部は、精神疾患群、健常対照群を対象とした遺伝子解析研究の一環である。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に即して編成された名古屋大学倫理審査委員会において本研究課題に直結するゲノム研究に関する課題の研究計画書を提出し、承認を受け、これまでも研究を遂行してきた。また、口腔外科リエゾン領域での研究課題において愛知学院大学倫理委員会に計画書を提出し、承認を受け、研究を遂行してきた。平成 18 年度以降、試料提供者へのインフォームド・コンセント、個人情報情報の厳重な管理(匿名化)などを徹底し、倫理的配慮を持って研究を進めている。実験動物を用いた研究では、名城大学薬学部と名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、各機関の動物実験指針および The Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, revised 1996) に準じて行った。

C. 研究結果

1) 新規バイオマーカー探索に関する研究

幼若期社会的敗北ストレス負荷 2 時間後および 24 時間後の脳および血液サンプルを採取し、DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析用のサンプル調整は終了した。

2) リエゾン領域で発生するうつ病のバイオマーカー同定に関する研究

一般ボランティアでの測定条件の検討：男性あるいは女性サンプル(各 15 あるいは 21 例)のユビキチン化 SERT および NAT の発現解析の再現実験の結果、採血管の抗凝固剤の種類(EDTA およびクエン酸)に関わらず末梢血の血小板よりユビキチン化 SERT および NAT が検出された。ユビキチン化 SERT あるいは NAT の発現量は、日内(9:00~20:00)、日間(1~3 日間)や採血後の室温放置(0~24 時間)において変動しなかった。ユビキチン化 SERT あるいは NAT の発現量と気質性格検査との関連解析において、男性では自己超越性との間に正の相関、自己志向、報酬依存との間に負の相関が、女性では自己志向・協調性との間に正の相関、損害回避との間に負の相関が認められ

た。

産科リエゾン領域での検討：妊産婦(17 例)の血小板中のユビキチン化 SERT 量は周産期のエストロゲン変化との関連が認められた。産後うつ群では血小板中の SERT 量の増加傾向が認められた。

口腔外科リエゾン領域：口腔内疼痛性障害患者(20 例)の血小板中のユビキチン化 SERT が少ないほど、ハミルトンうつ病評価尺度(HAMD)のスコアが高い傾向が認められた。

D. 考察

一般ボランティアの血小板におけるユビキチン化 SERT および NAT の測定条件の追加検討において、いずれのユビキチン化タンパク質を安定して測定することが可能であった。また、ユビキチン化 SERT の発現量とうつに関連した気質・性格との相関も認められたことから、ユビキチン化 SERT は、バイオマーカーとして実用性が高いことが示唆された。実際に、口腔外科リエゾン領域においてうつ様症状の重症度との関連性が一部認められたことから、うつ様症状の初期診断や治療薬選択判断のバイオマーカーへの応用が期待できると思われる。現在もサンプリングを継続中であり、例数を増やしてさらにに解析を進めている。

E. 結論

一般ボランティアでのユビキチン化 SERT および NAT の測定条件の確立やリエゾン領域での発現量と状態関連解析から得られた結果は、ユビキチン化 SERT および NAT が抑うつ状態のバイオマーカーとして臨床応用可能な根拠となる重要な知見となり、臨床応用が期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) 毛利彰宏、野田幸裕、渡辺 研、岩田仲生、尾崎紀夫、鍋島俊隆：妥当性に基づく精神疾患モデルの開発とその臨床応用：うつ病モデル動物としての MAGE-D1 遺伝子欠損マウスの妥当性と診断薬開発の試み。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 21 日)

- 2) 毛利彰宏、横山美里、石原歩美、肥田裕丈、國本正子、渡辺 研、尾崎紀夫、鍋島俊隆、野田幸裕：幼若期社会的敗北ストレスによるセロトニントランスポーターのユビキチン化の低下とうつ様行動。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 21 日）
- 3) 横山美里、毛利彰宏、木村真理、椿井 朋、肥田裕丈、木村宏之、徳倉達也、吉見 陽、河野直子、國本正子、尾崎紀夫、鍋島俊隆、野田幸裕：血症板におけるユビキチン化セロトニントランスポーターの発現レベルとパーソナリティとの関連性。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 21 日）
- 4) 木村真理、毛利彰宏、横山美里、椿井 朋、肥田裕丈、木村宏之、徳倉達也、吉見 陽、河野直子、國本正子、尾崎紀夫、鍋島俊隆、野田幸裕：うつ様症状の診断や治療薬選択のバイオマーカーの開発：セロトニントランスポーターの代謝調節機構からのアプローチ。第 8 回精神科専門薬剤師セミナー（名古屋、2014 年 11 月 23 日）
- 5) 山本文哉、肥田裕丈、森健太郎、毛利彰宏、石原歩実、

尾崎紀夫、野田幸裕：ストレス負荷によって惹起されるうつ様行動におけるセロトニントランスポーターのリン酸化制御の関与 日本薬学会第 135 年会（神戸、2015 年 3 月 26 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