

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：35308

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09810

研究課題名(和文) 治療薬標的遺伝子のメチル化及びCNVによる気分障害の治療抵抗性マーカーの創出

研究課題名(英文) Development of the therapeutic biomarker in bipolar disorder using CNV and methylation of target genes of mood stabilizers

研究代表者

森信 繁 (Morinobu, Shigeru)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：30191042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：双極性障害(BP)の病態解明とリチウム(Li)治療反応性のマーカー開発のため、GSK3beta及びBDNF遺伝子のCNVとDNAメチル化の解析を行った。対象はBP患者・健康対照者、各々50名である。CNV計測はTaqMan Copy Number Assay法で、メチル化率の解析はMassARRAY法で行った。Li反応性はAlda Scaleで、評価した。BDNF遺伝子exon VI上のduplicationがBP群で有意に多く検出されたが、exon VIのpromoter上のメチル化率に有意な差はなかった。BDNF遺伝子のduplicationとLi反応性の間に、有意な関連はなかった。

研究成果の概要(英文)：Although it is known that lithium (Li) is effective in the treatment of bipolar disorders (BDs), a certain patient with BDs poorly responds to Li. It is hypothesized that structural genomic variations in the GSK 3 beta or BDNF gene may change the therapeutic efficacy of Li. One type of structural genomic variations is a copy number variation (CNV). So, we examined the rates of CNVs in GSK 3 beta and BDNF gene based on the Databases of Genomic Variations (DGV) in patients with BDs by quantitative real-time PCR. The therapeutic response to Li was evaluated by Alda Scale.

In the BDNF gene, while 5 BD patients were found to have 3 copies of exon IV region within nsv95132, there was no healthy subject having an amplified exon IV region. There was no significant difference in Alda Scale A between BD patients with 3 copies and 2 copies. These findings suggest that CNV within exon IV of the BDNF gene may not be involved in the therapeutic response to Li in patients with BD.

研究分野：分子精神医学

キーワード：Bipolar disorder GSK3beta BDNF Lithium CNV Biomarker

1. 研究開始当初の背景

双極性障害(BP)の治療に用いられるリチウム(Li)やバルプロ酸の作用機序に関する薬理学的研究から、BPの病態にはGlycogen synthase kinase (GSK) 3betaのリン酸化や脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現の変化が、密接に関与していることが報告されている。これまでに数多くのBP治療の反応性を予測するバイオマーカーを開発する目的で、治療前の血中GSK3beta mRNAやBDNF mRNA及びBDNF蛋白などの計測が行われてきたが、Li治療効果を予測するような結果は得られていない。このような治療反応性をめぐるバイオマーカー探索研究の中で、近年のゲノム研究の進歩からゲノムDNAの数の多型の一つであるCopy Number Variation (CNV)の存在が報告され、このCNVは疾患感受性や薬剤感受性とも密接に関与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では双極性障害の発症感受性やLi治療反応性におよぼすCNVの効果を解析する目的で、双極性障害患者及び健康対照者の末梢血由来DNAを用いてGSK3beta, BDNF遺伝子のCNVを計測した。

3. 研究の方法

対象：双極性障害患者50名{M/F 19/31、平均年齢 53.5 ± 15.0 歳(24歳から80歳)}と年齢・性別をマッチさせた健康対照者(HC)50名の参加を得た。双極性障害の診断は、DSM-IV-TRに準拠した簡易構造化面接法であるMini International Neuropsychiatric Interview (MINI)を用いて行った。Li反応性の評価は、Aldaスケールを用いて行い、A, B, A-Bの各点数を治療反応性として用いた。

方法：研究対象としたCNVについては、Databases of Genomic Variations (DGV)に登録されているCNVを基準にコピー数を計測した。

末梢血由来DNAを対象に、Applied Biosystems (AB)社のTaqMan[®] Copy Number

Assayを用いて、Sequence Detection System 7700 (ABI/PRISM)によるPCR解析を行った。GSK3beta遺伝子のCNVは、esv2516850 (chr3: 119601185 - 119602595)とesv2631534 (chr3: 119683848 - 119685428)の一部を計測した。GSK3beta遺伝子のCNVは、AB社のprimer setであるHs03484599_cn (Intron VII), Hs04732284_cn (Intron II), Hs04781092_cn (Intron II)を用いて行った。

BDNF遺伝子内に存在するCNVは、BDNF exon IV領域を含むnsv951324 (chr11: 27720301 - 27726000)と、BDNF exon XI及びAntisense-BDNF領域のnsv832095 (chr11:27538626 - 27715739)を対象とした。BDNF遺伝子のCNVは、AB社のHs00925412_cn (Exon IV), Hs00925594_cn (Exon IV - Intron IV), Hs01542529_cn (Exon XI, Antisense-BDNF)を、それぞれ用いた。

本研究は高知大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会、徳島大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会です承されている。

4. 研究成果

GSK3beta遺伝子上の今回解析を行った3ヶ所のCNVの解析結果は、BP群全例でCopy数は2個であった。

BDNF遺伝子上の今回解析を行った3ヶ所のCNVの解析結果では、nsv832095 (chr11: 27538626 - 27715739)のChr11: 27677894 - 27677988の領域のCopy数と、nsv832095 (chr11: 27538626 - 27715739)の一部であるChr11: 2723045 - 27723151領域のCopy数は、BP群全例で2個であった。

しかしながらnsv832095 (chr11: 27538626 - 27715739)の一部であるChr11: 27722845 - 27722944 (Exon IV)領域では、Copy数3個(重複)の症例が5例みられた。BP患者群でCopy数3個の症例がみられたためHC群を対象に、nsv832095 (chr11: 27538626 - 27715739)の一部であるChr11: 27722845 - 27722944領域のCopy数を計測したところ、全例でCopy数は2個であった。このためCopy数2個と3個の症例の頻度について

BP 群及び HC 群でカイ二乗検定を行ったところ、有意に BP 群で Copy 数 3 個の症例数の多い結果が得られた。

このような CNV の解析結果から、BDNF 遺伝子の nsv832095 (chr11: 27538626 - 27715739)の一部である Chr11: 27722845 - 27722944 領域の Copy 数 3 個群と 2 個群に BP 群を分類して、臨床データの比較を行った。

Li 治療反応性との関係を明らかにするため、Alda スケール A, B, A-B 得点をそれぞれ 2 群間で比較したが、特にいずれの得点についても有意な差はみられなかった。

次に BP 群での I 型・II 型の出現頻度について 2 群間で比較したが、特に有意な差はみられなかった。男女間での Copy 数の違いについて比較したが、特に有意な差はみられなかった。BP の発症年齢を 2 群間で比較したが、特に有意な差はみられなかった。

今回行った GSK3beta 遺伝子の CNV 解析の結果は Ronai ら¹⁾の報告(260 例の BP 患者を対象に intron II 領域を含む Copy 数重複を 2 例で、intron VII 領域を含む Copy 数の増幅を 9 例で検出)とは異なり、Intron II あるいは intron VII を含む領域の重複は 1 例もみられなかった。この異なった解析結果については、患者数の違いや人種差などが関与していると考えられる。今回の GSK3beta 遺伝子を対象とした CNV の解析結果からは Copy 数の重複例はみられなかったため、Li に対する治療反応性のバイオマーカーとして GSK3beta 遺伝子の CNV を解析することは有効ではないと考えられる。

今回の研究で発見された BDNF 遺伝子の Exon IV の領域の重複は、これまでに BP をはじめうつ病や統合失調症などの精神障害では報告のない CNV である。Alda スケールを用いた Li 治療反応性については Copy 数 2 個群と 3 個群との間で有意な差はみられなかったため、GSK3beta 遺伝子と同じく BDNF 遺伝子の CNV も Li 治療反応性予測のバイオマーカー

には適していないと考えられる。BDNF 遺伝子の mRNA の転写に Exon IV は重要な役割を果たしていることが報告されている²⁾ため、今回発見された同部位の Copy 数 3 個群は 2 個群と比較して一般的に mRNA の転写が亢進していると推測されるが、Alda スケールと BDNF 遺伝子 CNV との関係からみると BDNF 発現の高低が Li 治療反応性には関与していない可能性が考えられる。このような Li と BDNF 遺伝子との関連とは異なり、BDNF 遺伝子の転写は抗うつ薬の作用機序とも密接な関連があることが報告されている³⁾ため、今後は抗うつ薬の効果についても重複群に特異的な変化がないか解析が必要と考えられる。

<引用文献>

Ronai Z, Kovacs-Nagy R, Szantai E, Sasvari-Szekely M, Faludi G, Benkovits J, Rethelyi JM, Szekely A, Glycogen synthase kinase 3 beta gene structural variations as possible risk factors of bipolar depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 165:217-222, 2014.

Pruunsild P, Sepp M, Orav E, Koppel I, Timmusuk T, Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J Neurosci* 31:3295-3308, 2011.

Russo-Neustadt AA, Alejandre H, Garcia C, Ivy AS, Chen MJ, Hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression following treatment with reboxetine, citalopram, and physical exercise. *Neuropsychopharmacol* 29:2189-2199, 2004.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Ihara K, Fuchikami M, Hashizume M, Okada S, Kawai H, Obuchi S, Hirano H, Fujiwara Y, Hachisu M, Hogyong K, Morinobu S, The influence of aging on the methylation status of brain-derived neurotrophic factor gene in blood. *Int J Geriatr Psychiatry* (in press), 査読有. DOI:10.1002/gps4927

Fuchikami M, Yamamoto S, Morinobu S,

Okada S, Yamawaki Y, Yamawaki S, The potential use of histone deacetylase inhibitors in the treatment of depression. Prog Neuropsychopharmacol & Biol Psychiatry 64:320-324, 2016, 査読有.
DOI:10.1016/j.pnpbp.2015.03.010

〔学会発表〕(計3件)

Morinobu S, Efficacy of lithium and BDNF gene CNV in bipolar disorders. WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry, 2018年

森信 繁、須賀楓介、吉本啓一郎、沼田周助、高村祥吾、上村直人、下寺信次、大森哲郎、GSK3beta, BDNF 遺伝子の CNV による双極性障害のリチウム治療反応性の研究、第 29 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会、2017年

森信 繁、エピジェネティクスからみたうつ病の病態メカニズム、第 12 回日本うつ病学会総会、2015年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森信 繁 (MORINOBU Shigeru)
吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号：30191042

(2) 研究分担者

淵上 学 (FUCHIKAMI Manabu)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：40403571