

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19734

研究課題名(和文) 強迫性障害の薬物反応と5-HTTLPR遺伝子多型・5-HTT遺伝子メチル化の関連

研究課題名(英文) Association study of the polymorphic region and methylation in the serotonin transporter gene promoter in the clinical response to drug treatment in obsessive-compulsive disorder

研究代表者

梅原 英裕 (UMEHARA, Hidehiro)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：90645798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：強迫性障害の発症リスクおよび薬物治療反応性とSerotonin transporter (5-HTT)遺伝子の遺伝子多型、遺伝子発現、DNAメチル化修飾との関連を調べた。強迫性障害の薬物反応性の違いと、5-HTTLPR、5-HTT遺伝子のm-RNA発現、DNAメチル化修飾レベル、それぞれとの間に有意な関連は示すことはできなかった。一方で、強迫性障害患者と健常者の間には5-HTTの遺伝子発現やDNAメチル化修飾に違いがあることを示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to investigate whether gene expression, methylation, and polymorphism of serotonin transporter (5-HTT) gene is associated with obsessive-compulsive disorder (OCD) and the therapeutic responses to a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) in OCD. Our results didn't demonstrate that 5HTT gene expression, the methylation, and the polymorphism is associated with therapeutic responses to a SSRI in OCD. On the other hands, our results showed the differences of 5HTT gene expression and the methylation between the patients with OCD and healthy controls.

研究分野：精神疾患

キーワード：強迫性障害 Serotonin transporter 治療反応性 遺伝子発現 DNAメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

強迫性障害の薬物治療として、三環系抗うつ薬やセロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)による治療が有効であることから、強迫性障害の病態にはセロトニン系の異常が関与していると考えられている。一方、SSRI や三環系抗うつ薬に対する薬物反応性は 40 - 60% と報告されており(Jenike et al. 2004)、この薬物反応性の違いは、強迫性障害者における生物学的な違いから生じていると推定される。セロトニントランスポーター(5-HTT)は、シナプス間隙における神経伝達物質であるセロトニンの再取り込みを行っているたんぱく質であり、SSRI の主要な作用部位である。Serotonin-transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR) は 5-HTT のプロモーター領域にある 20 ~ 23 塩基対の不完全な繰り返し配列であり、そのコピー数の長さにより L 型(16)と S 型(14)があり、S 型は L 型に比して活性が低下することが知られている(Heils et al. 1996)。この機能性多型と強迫性障害の発病リスクとの関連や強迫性障害患者における SSRI の治療効果との関連が複数報告されているが一致した見解が得られていない(Billett et al.1997,DiBella et al.2002,Denys et al.2007,Miguita et al.2011,Bloch et al.2008,Taylor et al.2012)。一方で、強迫性障害と同様に SSRI が主要な治療薬でありセロトニン系の異常が関連していると考えられているうつ病では、メタ解析研究で、この機能性多型とうつ病の SSRI の薬物反応性との関連が報告されている(Porcelli et al.2012)。

また、近年、塩基配列によらない遺伝情報の発現制御機構 1 つで、シトシン塩基とグアニン塩基が連続している配列の部分でシトシンがメチル化する DNA メチル化修飾が精神疾患で注目されている。生育環境、栄養、薬剤、感染などの環境因子が DNA メチル化修飾に作用し、遺伝子発現の変化や行動の変化を来すことが知られており、遺伝要因と境要因からなる complex disease の精神疾患の病態に関与すると考えられている。我々の教室でも、これまでに末梢血を用いた大うつ病における 5-HTT の遺伝子発現研究や統合失調症の DNA メチル化修飾解析研究に取り組んできた(Iga et al. 2005, Kinoshita et al. 2014)。これまでに 5-HTT 遺伝子の DNA メチル化修飾と強迫性障害との関連を調べた研究報告はないが、うつ病における抗うつ薬の薬物反応性とセロトニントランスポーター遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化修飾との関連が報告されており(Domschke et al.2014)、強迫性障害においても SSRI の薬物反応性にセロトニントランスポーター遺伝子が DNA メチル化修飾関連する可能性があると考えられた。

### 2. 研究の目的

5-HTT 遺伝子に注目して、これまで当教室で

蓄積してきた強迫性障害患者の臨床データやサンプルを用いて、生物学的手法による強迫性障害の治療反応性に違いが生じる生物学的背景の探索を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) サンプル収集

徳島大学病院精神科を受診した、DSM- の診断基準で強迫性障害と診断された患者 61 名と年齢、性別の一致した健常対照者 61 名を対象とした。全ての参加者は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たプロトコルに基づき、文書によるインフォームドコンセントを得た。治療反応性は Yale Brown Obsessive-Compulsive Scale (Y-BOCS) を用いて、2 地点で評価した。

#### (2) 遺伝子多型解析

末梢血白血球から抽出された genomic DNA を用い、PCR 法によって、全対象の 5-HTTLPR 多型を同定した。同定した 5-HTTLPR の機能性多型を用いて、強迫性障害群と健常対照群とのケースコントロール研究および、メタ解析を行った。続いて、強迫性障害の薬物治療反応性の有無と 5-HTTLPR の機能性多型の関連を調べた。

#### (3) 遺伝子発現解析

Qiagen PAXgene Blood RNA キットを用いて精製した total RNA を用いて、逆転写酵素で cDNA を作成し、ABI 7500 RealTime PCR を用いたリアルタイム RT-PCR 法により測定した。測定で得られた 5-HTT の m-RNA 発現量を用いて、強迫性障害群と健常対照群とのケースコントロール研究を行った。

#### (4) DNA メチル化修飾解析

抽出した DNA を Zymo Research 社の EZ DNA methylation kit でバイサルファイト処理を行い、QIAGEN 社の PyroMark Q24 を用いて 5-HTT 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化修飾レベルを調べた。先行論文(Sugawara et al. 2012)を参考に、5HTT 遺伝子の exon 1 の上流の転写調節領域にある 13 の CpG サイトを測定対象とした。測定で得られた 5-HTT の DNA メチル化率を用いて、強迫性障害群と健常対照群とのケースコントロール研究を行った。続いて、強迫性障害の薬物治療反応性の有無と 5-HTT の DNA メチル化率との関連を調べた。

#### (5) 統計解析

強迫性障害群と健常対照群の比較には、5-HTT の m-RNA 発現では Student t-test を、DNA メチル化修飾では Mann-Whitney's U test を用いた。メタ解析には R package の 'metafor' を用いて行った。Y-BOCS の改善率が 35% 以上のものを薬物反応性あり、35% 未満のものを薬物反応性なしのカテゴリーに従属変数とし、リスク多型の数(0、1、2)、

または、それぞれの CpG サイトのメチル化率を独立変数にしてロジスティック分析を行った。性別・年齢・発症年齢・治療前 Y-BOCS スコアを共変量に入れた。多重比較には FDR を用いた。5-HTTLPR の L 型の中には一塩基多型により遺伝子発現の異なる型があり (La, Lg)、Lg 型は S 型と同等に遺伝子発現が低下していると報告されていることから (Hu et al. 2006)、リスクアレルは Lg 型 + S 型の合わせたものとした。

#### 4. 研究成果

(1) 強迫性障害群と健常対照群の遺伝子多型のケースコントロール研究の結果、我々のサンプルにおいて 5-HTTLPR の機能性多型と強迫性障害の発症リスクとの関連を示すことはできず、先行研究を合わせたメタ解析の結果でも、5-HTTLPR の機能性多型と強迫性障害の発症リスクとの間には有意な関連を認めなかった。

(2) 強迫性障害群と健常対照群のサンプルを用いた遺伝子発現のケースコントロール研究の結果、強迫性障害群の 5-HTT の m-RNA 発現が、健常対照者群に比べて有意に発現亢進していることを認めた。

(3) 強迫性障害群と健常対照群のサンプルを用いた DNA メチル化修飾率のケースコントロール研究の結果、強迫性障害群の DNA のメチル化修飾率は、健常対照群に比べて、測定した 13CpG サイト中複数のサイトで有意な低メチル化率を示した。有意な低メチル化を示したサイトのうちいくつかのサイトは m-RNA 発現と負の相関を示した。

(4) 強迫性障害の薬物反応性の有無と、5HTTLPR、5HTT 遺伝子の m-RNA 発現および DNA メチル化修飾率との間に有意な関連は認めなかった。

(5) 本研究の結果、強迫性障害の薬物治療反応性の有無に 5-HTT の遺伝子多型や m-RNA 発現や DNA メチル化修飾が関与していることを示すことはできなかったが、強迫性障害患者と健常者の間には 5-HTT の m-RNA 発現や DNA メチル化修飾に違いがあることを示した。

#### <引用文献>

Billett, E. A. et al. Obsessive compulsive disorder, response to serotonin reuptake inhibitors and the serotonin transporter gene. *Mol. Psychiatry* 2, 403-406 (1997).

Bloch, M. H. et al. Association of the serotonin transporter polymorphism and obsessive-compulsive disorder: systematic review. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 147B, 850-858 (2008).

Denys, D., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D. & Westenberg, H. G. M. Prediction of response to paroxetine and venlafaxine by serotonin-related genes in obsessive-compulsive disorder in a randomized, double-blind trial. *J. Clin. Psychiatry* 68, 747-753 (2007).

Di Bella, D., Erzegovesi, S., Cavallini, M. C. & Bellodi, L. Obsessive-Compulsive Disorder, 5-HTTLPR polymorphism and treatment response. *Pharmacogenomics J.* 2, 176-181 (2002).

Domschke, K. et al. Serotonin transporter gene hypomethylation predicts impaired antidepressant treatment response. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 1167-1176 (2014).

Hu X, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Gen* 78:815- 826 (2006)

Iga, J. et al. Serotonin transporter mRNA expression in peripheral leukocytes of patients with major depression before and after treatment with paroxetine. *Neurosci. Lett.* 389, 12-16 (2005).

Jenike, M. A. Obsessive-Compulsive Disorder. *N. Engl. J. Med.* 350, 259-265 (2004).

Kinoshita, M. et al. Aberrant DNA Methylation of Blood in Schizophrenia by Adjusting for Estimated Cellular Proportions. *NeuroMolecular Med.* 16, 697-703 (2014).

Migueta, K., Cordeiro, Q., Shavitt, R. G., Miguel, E. C. & Vallada, H. Association study between genetic monoaminergic polymorphisms and OCD response to clomipramine treatment. *Arq. Neuropsiquiatr.* 69, 283-287 (2011).

Porcelli, S., Fabbri, C. & Serretti, A. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with antidepressant efficacy. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 22, 239-258 (2012).

Taylor, S. Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: a comprehensive meta-analysis of genetic association studies. *Mol. Psychiatry* (2012).

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔学会発表〕(計 3件)

Umehara H, Numata S, Watanabe S, Sumitani S, and Ohmori T, Altered Serotonin transporter mRNA expression in the peripheral leukocytes of obsessive-compulsive disorder, CINP (Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum) 2016, Jul. 5, 2016, COEX, Seoul, Republic of KOREA

Umehara H, Numata S, Tajima A, Nish A, Imoto I, Sumitani S, Ohmori T, A genome-wide association study of the long-term clinical response to SSRI or SSRI with antipsychotics in obsessive-compulsive disorder in the Japanese population, Society of Neuroscience 2015, Oct. 20, 2015, McCormick Place, Chicago, USA

梅原 英裕 沼田 周助 住谷 さつき  
大森 哲郎、強迫性障害の治療反応性とセロトニントランスポータ遺伝子多型との関連、第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会 合同年会、2015年9月25日、タワーホール船堀、東京都江戸川区

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅原 英裕(UMEHARA, Hidehiro)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：90645798