

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19769

研究課題名(和文)末梢白血球中の遺伝子発現を用いた精神疾患の診断マーカーの開発

研究課題名(英文)Peripheral gene expression-based biological test for psychiatric diseases

研究代表者

渡部 真也(WATANABE, Shin-ya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：90563825

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): 17名の統合失調症患者と36名の双極性障害者患者について5つの遺伝子の末梢白血球中のmRNA発現を測定し、過去に報告した25名のうつ病患者、25名の健常対象者の測定データと組み合わせることで単一のマーカーを作成した。これを用いることでうつ病患者を他疾患群および健常対象群から感度:64%、特異:67.9%をもって弁別することができた。

研究成果の概要(英文): We measured messenger ribonucleic acid expression levels of the aforementioned five genes in peripheral leukocytes in 17 patients with schizophrenia and 36 patients with bipolar disorder using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR), and we combined these expression data with our previous expression data of 25 patients with MDD and 25 controls. Subsequently, a linear discriminant function was developed for use in discriminating between patients with MDD and without MDD. This expression panel was able to segregate patients with MDD from those without MDD with a sensitivity and specificity of 64% and 67.9%, respectively.

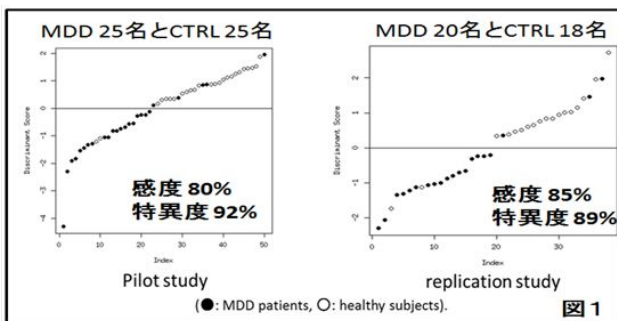
研究分野：分子精神医学

キーワード：診断マーカー うつ病 遺伝子発現 末梢白血球

1. 研究開始当初の背景

うつ病、双極性障害、統合失調症、などの主要な精神疾患の診断は現在も症候学に基づいた医療面接からの情報に依るところが多いが、病初期には相互に似通った症状を呈することがあることもあり、初診時に正確に診断することが難しい症例も多い。特に、初診時に大うつ病性障害と診断し、後に双極性障害であった症例を経験することは多く、同様のケースは双極性障害患者の3分の1にのぼると報告されている(Hirschfeld et al. 2003)。このような背景の中、精神疾患を区別できる簡便で侵襲の少ない生物学的診断補助マーカーが望まれている。

我々の教室では、末梢血を用いた quantitative real-time PCR による疾患候補遺伝子の発現研究を行っており、これまでに、うつ病におけるセロトントランスポータをコードする SLC6A4、ヒストンメチル化に関連する HDAC5、カルシウムシグナルに関わる PDLIM5 や CREB、cAMP に関わる PDE4B における遺伝子発現異常(Iga et al. 2005, 2006, 2007)や、統合失調症における TGFBR2、PDLIM5、PDE4B における遺伝子発現異常(Numata et al. 2007, 2008)を見出し論文報告してきた。しかしながら、疾患群と健常者群の遺伝子発現の重なりは多く、これらの遺伝子発現異常を診断マーカーへ応用することを検討した場合、単独で診断マーカーとして使用するのは困難であった。そこで、これまでの我々の研究結果ならびに既報うつ病関連論文で末梢血での遺伝子発現が報告されている計 40 遺伝子について、PCRarray の手法を用いて遺伝子発現を測定し、複数の遺伝子発現パターンの組み合わせによるうつ病患者と健常対照者の弁別を試みたところ、最終的には Wilks's lambda 法を用いた選定に基づいた 5 遺伝子の発現パターンを用いることにより、うつ病患者と健常対照者を 80%以上の感度・特異度をもって両者を弁別することに成功し、独立した別のコホートにおいても再現性を確認した(Watanabe et al. 2015)(図 1)。



しかしながら、我々の研究結果は、あくまでもうつ病と健常者との比較結果であり、うつ病と他の精神疾患を区別できるかどうかは不明である。

このため、双極性障害や統合失調症といったうつ病以外の精神疾患からも弁別を可能にするようなマーカーが必要とされる。我々がこれまで行ってきた複数の遺伝子発現を利用して一つの指標を構築するという手法を用いてこの課題を解決しうるマーカーが作成できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

うつ病群と健常者群を高い精度で区別できる遺伝子発現マーカーが、双極性障害患者群や統合失調症患者群を加えても診断マーカーとして有効であるかどうかを検討する。

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- の診断基準で統合失調症と診断された患者 17 名と徳島大学病院精神科を受診した、DSM- の診断基準で双極性障害患者と診断された患者 39 名を新たな対象としてリクルートした。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ールに基づき、文書によるインフォームドコンセントを得た。

(2) 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 を作成した。過去の我々の研究(Watanabe et al. 2015)でうつ病と健常対象者の弁別に用いた 5 つの遺伝子 (ARHGAP24, HDAC5, PDGFC, PRNP, SLC6A4) の発現を ABI 7500 RealTime PCR を用いた RT-PCR 法により測定した。

(3) 統計解析

今回測定した対象者の発現データと過去の我々の研究で測定したうつ病患者 25 名と健常対象者 25 名(Watanabe et al. 2015)の発現データを合わせて解析した。

うつ病患者群と他群(統合失調症患者群、双極性障害患者群、健常対象者群)を弁別するために線形判別関数を用いた。

	Major Depressive disorder	Schizophrenia	Bipolar disorder	control	p value
N	25	17	39	25	
male	7	8	15	9	
female	18	9	24	16	0.652
age	43.00±13.99	31.52±10.18	51.05.00±11.94	40.40±11.878	1.90E-06
HAM-D score	22.4±7.1				

(4) 判別スコアの算出

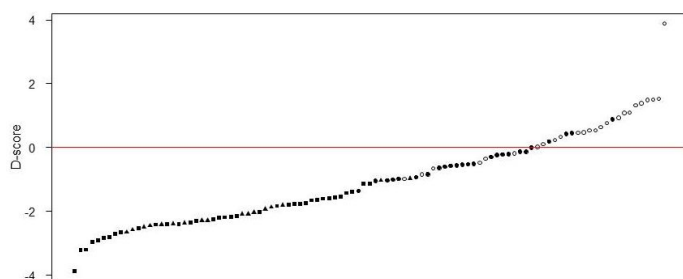
Z 変換して標準化した各遺伝子の発現量を係数とした線形判別関数(下記参照)から、各サンプルごとに判別スコア(D-score)を算出した。

$$D\text{-score} = -0.73980239 \times PDGFC + 0.84889084 \times PRNP - 0.42559503 \times ARHGAP24 - 0.07806493 \times SLC6A4 + 1.48110014 \times HDAC5 + 0.005$$

算出された D-score が 0 以上であればうつ病、0 未満であればそれ以外の対象者(健常対象者、統合失調症患者、双極性患者)として対象者の中からうつ病患者の弁別が可能であるかどうか検証した。

4. 研究成果

末梢血白血球中の 5 つ遺伝子(PDGFC, SLC6A4, ARHGAP24, PRNP, HDAC5)の発現量を用いて算出した D-score による判別で、25 名のうつ病患者のうち 16 名を「うつ病患者である」と、うつ病以外の 81 名の対象者のうち、56 名を「うつ病患者でない」と正しく判別できた。D-score を用いた判別における感度・特異度はそれぞれ 64%, 67.9%であった。



The distribution of D-scores (○:depressive disorder patient, ●:healthy subject, ▲:Schizophrenia patient ■:bipolar disorder patients).

うつ病患者群を健常対象者群のみと弁別した過去の我々の報告(前述)と比べると、感度と特異度ともに低い結果となった。

<引用文献>

Hirschfeld RM1, Calabrese JR, Weissman MM et al. Screening for bipolar disorder in the community. *J Clin Psychiatry*. 2003 Jan;64(1):53-9.

Iga J, Ueno S, Ohmori T. Molecular assessment of depression from mRNAs in the peripheral leukocytes. *Ann Med*. 2008;40(5):336-42.

Hepgul N, Cattaneo A, Zunszain PA, Pariante CM. Depression pathogenesis and treatment: what can we learn from blood mRNA expression? *BMC Med*. 2013 Feb ;5:11:28.

Uddin M. Blood-based biomarkers in depression: emerging themes in clinical research. *Mol Diagn Ther*. 2014 Oct;18(5):469-82.

Watanabe SY, Iga J, Ishii K et al. Biological tests for major depressive disorder that involve leukocyte gene expression assays. *J Psychiatr Res*

2015;66-67:1-6.

Bilello JA, Thurmond LM, Smith KM et al. MDDScore: confirmation of a blood test to aid in the diagnosis of major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*. 2015 Feb;76(2):e199-206.

Spijker S, Van Zanten JS, De Jong S et al. Stimulated gene expression profiles as a blood marker of major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2010 Jul 15;68(2):179-86.

Numata S, Ishii K, Tajima A et al. Blood diagnostic biomarkers for major depressive disorder using multiplex DNA methylation profiles: discovery and validation. *Epigenetics*. 2015;10(2):135-41.

Zheng P, Gao HC, Li Q et al. Plasma metabolomics as a novel diagnostic approach for major depressive disorder. *J Proteome Res*. 2012 Mar 2;11(3):1741-8.

Zheng P, Fang Z, Xu XJ et al. Metabolite signature for diagnosing major depressive disorder in peripheral blood mononuclear cells. *J Affect Disord*. 2016 May;195:75-81.

Liu X, Zheng P, Zhao X. Discovery and validation of plasma biomarkers for major depressive disorder classification based on liquid chromatography-mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2015 May 1;14(5):2322-30.

Papakostas GI, Shelton RC, Kinrys G et al. Assessment of a multi-assay, serum-based biological diagnostic test for major depressive disorder: a pilot and replication study. *Mol Psychiatry*. 2013 Mar;18(3):332-9.

Buoli M, Caldiroli A, Cumerlato Melter C, Serati M, de Nijs J, Altamura AC. Biological aspects and candidate biomarkers for psychotic bipolar disorder: A systematic review. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2016 Jun;70(6):227-44.

Ohmori T, Morita K, Saito T, Ohta M, Ueno S, Rokutan K. Assessment of human stress and depression by DNA microarray analysis. *J Med Invest*. 2005; 52 Suppl:266-271.

Ohmori T, Ueno S, Morita K, Rokutan K, Saito T. Microarray analysis of leukocyte mRNA in depression. *World J Biological Psychiatry* 6 2005;(Suppl 1): 116.

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Shin-ya Watanabe, Shusuke Numata, Jun-ichi Iga, Makoto Kinoshita, Hidehiro

Umehara, Kazuo Ishii, and Tetsuro Ohmori:
Gene expression-based biological test for
major depressive disorder: an advanced
study
Neuropsychiatr Dis Treat. 2017; 13:
535-541

〔学会発表〕(計 2 件)

Shin-ya Watanabe, Hidehiro Umehara,
Makoto Kinoshita, Kazuo Ishii, Shusuke
Numata, Tetsuro Ohmori
Gene expression-based diagnostic marker
for bipolar disorder
6th Congress of AsCNP, 2017.4.28, Bali (Re
public of Indonesia)

渡部真也, 沼田周助, 石井一夫, 大森哲
郎
遺伝子発現を用いたうつ病マーカーの疾患
特異性の検証
第 38 回日本生物学的精神医学会 ・ 第 59 回
日本神経化学会大会-合同年会, 2016.9.10
福岡国際会議場(福岡県福岡市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 真也 (WATANABE, Shin-ya)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号 : 90563825