

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17090

研究課題名（和文）うつ病バイオマーカーとしての長鎖非コードRNA～トランスレーショナルな視点から～

研究課題名（英文）Long non-coding RNA as a biomarker for depression

研究代表者

關 友恵（SEKI, TOMOE）

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：50821865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、末梢血白血球におけるlncRNAの発現変化がうつ病のバイオマーカーになりうるかを検証した。定量的逆転写リアルタイムPCR（RT-qPCR）分析を用いて、うつ病（MDD）患者と健常者各29名のlncRNA発現解析を行った。健常者と比較してMDD患者ではRMRPの発現が減少しており、Y5、MER11C、PCAT1、PCAT29の発現が増加していた。RMRPの発現レベルは、うつ症状の重症度と負の相関を認めた。さらに、うつ病モデルマウスの末梢血白血球においてもRMRP発現は減少していた。RMRPの発現変化はMDDの診断バイオマーカーのみならず重症度のバイオマーカーになる可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大うつ病性障害（MDD）は多大な機能障害をきたす世界中で問題となっている疾患のひとつであるが、その病態生理は未だ解明されていない。診断においても、症状の組み合わせから判断する操作的診断法しかないことが最大の問題であり、うつ病の病態解明や客観的で簡便なバイオマーカーの確立が切に望まれている。本研究での5種のlncRNAの発現変化はMDDの診断バイオマーカーになる可能性があり、特にRMRPは重症度を反映するバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。本研究での新たな知見は、うつ病バイオマーカーの確立や、うつ病病態生理の解明に向けての前進に貢献した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we sought to evaluate the expression of lncRNAs in peripheral blood leukocytes as potential biomarkers for MDD. We measured the expression levels of 83 lncRNAs in the peripheral blood leukocytes of 29 MDD patients and 29 age- and gender-matched healthy controls using quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) analysis. We found that MDD patients exhibited distinct expression signatures. Specifically, the expression level of one lncRNA (RMRP) was lower while the levels of three (Y5, MER11C, and PCAT29) were higher in MDD patients compared to healthy controls. The expression level of RMRP was correlated with depression severity as measured by the Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D). Moreover, RMRP expression was lower in a mouse model of depression, corroborating the observation from MDD patients. Taken together, our data suggest that lower RMRP levels may serve as a potential biomarker for MDD.

研究分野：気分障害

キーワード：うつ病 lncRNA バイオマーカー RMRP 気分障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

うつ病の診断には、現在、the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems-10 (ICD-10) や the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5 (DSM-5) といった症状の組み合わせによる操作型の診断方法が用いられている。身体的な疾患とは異なり、症候学的方法に依存しており、その症候を裏付ける生物学的なマーカーとなるものが無いことが大きな問題である。客観的で予測的なバイオマーカーの開発は喫緊の課題で、これまでも長らく研究が続けられてきたが、直接診断ツールとなるようなバイオマーカーは未だに無い。これまでの研究から、エピジェネティクスとうつ病の関連が報告されており、エピジェネティックな遺伝子発現変化が、うつ病診断の新しいバイオマーカーとなる可能性が示唆されている (Abe et al., 2011; Hobara et al., 2010)。最近注目されているエピジェネティックプロセスに、非コード RNA (ncRNA) によって媒介されるプロセスがある。lncRNA は、クロマチンと遺伝子活性調節、エピジェネティックな変化の媒介、染色体の刷り込み、アポトーシスなど、さまざまな生物学的機能に関与していると言われている (Ma et al., 2013)。我々は、既に生理学的機能が知られている lncRNA に焦点をあててうつ病のバイオマーカーとしての可能性を検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

中枢神経系の疾患を含む他の疾患や病態で、その機能が既に報告されている 83 個の lncRNA を選択し、MDD 患者と健常者の末梢血白血球における発現を比較検討した。焦点を絞ったターゲットを分析することで、うつ病の病態生理に特有の lncRNA を検索し、以前の研究から得られた知見に基づいてその機能の洞察を深めることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験 1

参加者

参加者は 2012 年 2 月～2015 年 6 月に山口大学医学部附属病院に受診し、DSM-IV 改訂版の診断基準を用いて精神科医が大うつ病性障害と診断した患者である。うつ状態の重症度は、ハミルトンうつ病評価尺度 (HAM-D) の構造化インタビューガイドを用いて精神科医によって評価され、18 点以上の患者を参加の対象とした。患者は、熟練した精神科医による臨床面接、複数名の精神科医らによるケースカンファレンス、および the Mini-International Neuropsychiatric Interview によって鑑別診断が行われ、最終的な診断を決定された。本研究は、山口大学医学部附属病院の倫理委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言に従って実施された。尚、研究説明を行った後、すべての参加者から書面によるインフォームドコンセントを得ている。

定量的逆転写リアルタイム PCR (ヒトサンプル)

末梢血白血球からのトータル RNA 単離は、以前に報告された方法 (Yamagata et al., 2017) に従って実施した。The Disease Related Human LncRNA profiler Cat # RA920A-D-1 (System Biosciences) をプライマープレートとして使用し、83 個の lncRNA と 8 個のハウスキーピング遺伝子と 3 個の small RNA 転写物を含む 11 個の内蔵性コントロールについて定量した。

(2) 実験 2

実験動物

実験開始時に 8 週齢の BALB / c (BALB) 成獣雄マウスを用いた。コントロール群を 13 匹、ストレス群を 10 匹とし、コルチコステロン投与によるストレス負荷を行った。24 ± 2 °C に管理された部屋で、12 時間毎の明暗サイクル下で飼育した。すべての実験は、山口大学医学部動物実験指針 (the Guidelines for Animal Care and Use of Yamaguchi University Graduate School of Medicine) を遵守して行った。コルチコステロン [CORT (250 µg / mL)] または溶媒液 (0.45% 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン) を、飲料水として計 4 週間 free access により投与し、強制水泳試験を行った。化合物の劣化を防ぐため遮光ボトルを使用した。水槽 (高さ 20 cm、直径 14 cm) に深さ 13 cm まで水を満たした、水温は 23～24 °C) に 5 分間入れ、無動時間を計測した。

定量的逆転写リアルタイム PCR (マウスサンプル)

両群のマウス (コントロール群 13 匹、ストレス群 10 匹) から採血をおこなった。GeneJET 全血 RNA 精製ミニキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して、トータル RNA を抽出した。GAPDH、-actin、および U6 で、RMRP の相対発現レベルを標準化した。

(3) 統計解析

SPSS 16.0 を統計解析に使用した。²検定と独立サンプル t 検定を使用して、MDD 患者と健常者の人口統計学的 (デモグラフィック) 変数を比較した。各遺伝子の発現レベルの四分位範囲

(IQR) を使用してノンパラメトリックな外れ値検定を実行し、外れ値を除外した。データポイントが第一四分位より 1.5IQR を下回る場合、また第三四分位の 1.5IQR を上回る場合に外れ値と見なす、Tukey 法をもちいた。83 個の lncRNA と 11 個の内在性コントロールの発現については増幅曲線を確認し、増幅していないと判断したものは除外した。その後、全サンプルの平均 Ct 値が 35 以上であるものは、プライマープロトコルに従って除外した。11 個の内在性コントロール遺伝子の平均 Ct 値 (CtAVG Internal Control) を計算した。次に、各 lncRNA の Ct を、 $Ct = Ct_{lncRNA} - Ct_{AVG \text{ Internal Control}}$ で計算し、 ΔCt を、 $\Delta Ct = \Delta Ct (\text{MDD sample}) - \Delta Ct (\text{HC sample})$ で計算した。各遺伝子の発現レベルを Fold Change として $2^{-\Delta Ct}$ で求めた。Mann-Whitney U 検定で、MDD 患者と健常者の間の lncRNA の発現レベルを比較した。多重比較の有意水準の補正には、ボンフェローニ検定を用いた。スピアマン相関分析で、lncRNA 発現レベルと HAM-D スコアとの相関関係を検討した。実験 2 のデータについては、独立サンプル t 検定を行った。

4. 研究成果

(1) 実験 1

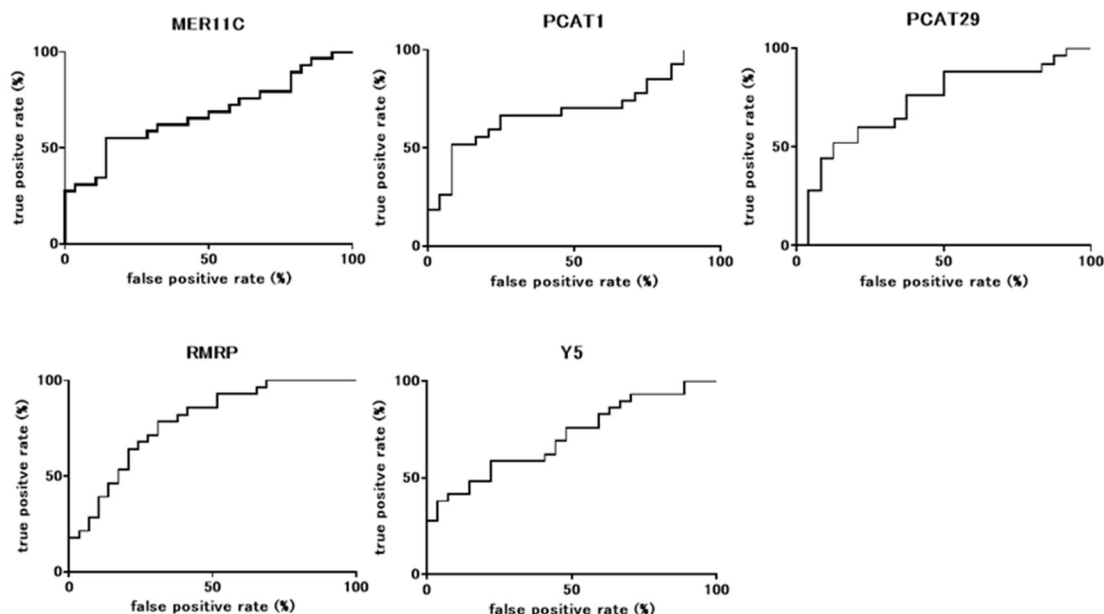
全参加者の背景・臨床データを表 1 に示した。HAM-D 得点 ($p = 1.8E-40$, $t = 36.1$) を除いて、MDD 群と健常者群での有意な差はなかった。

表 1

	健常者	うつ病患者
人数	29	29
性別 (男性/女性)	13/16	11/18
年齢 (歳)	47.0 ± 16.3	48.5 ± 12.9
HAM-D 得点 (点)	0.6 ± 0.9	21.5 ± 2.9*
STAI 得点 (点)	39.7 ± 4.7	37.5 ± 5.6
抗うつ薬総量 (mg) (イミプラミン換算)	—	212 ± 140

MDD 患者の RMRP 発現レベルは健常者よりも有意に低く ($p = 0.000227$, $U = 175$)、MER11C、PCAT1、PCAT29、および Y5 の発現レベルは健常者よりも有意に高かった (MER11C : $p = 0.0215$, $U = 262$; PCAT1 : $p = 0.0183$, $U = 199$; PCAT29 : $p = 0.00693$, $U = 165$; Y5 : $p = 0.00665$, $U = 226$)。各遺伝子の ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線下面積は、MER11C 0.6773; PCAT1 0.6929; PCAT29 0.725; RMRP 0.7845; Y5 0.7114 であった (図 1)。

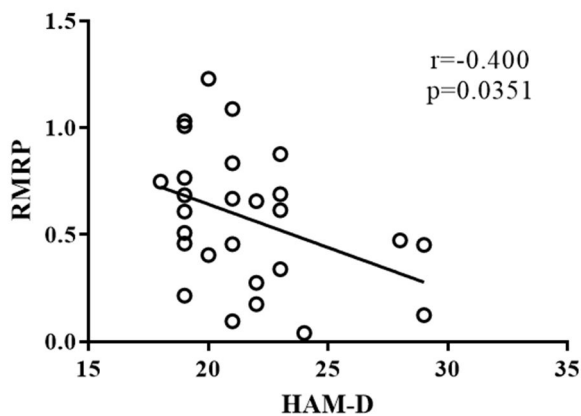
図 1



ボンフェローニ検定による修正後の p 値 (q 値) は、RMRP $q = 0.00972$; MER11C $q = 0.946$; PCAT1 $q = 0.787$; PCAT29 $q = 0.298$; Y5 $q = 0.286$ であった。また、RMRP の発現レベルのみ

が MDD 患者の HAM-D 得点と有意な相関が認められた (図 2)。

図 2



(2) 実験 2

1 か月間 CORT を服用したマウスでは、強制水泳試験で無動時間が有意に延長し ($p = 0.000357$ 、 $t = 4.25$)、うつ病様行動を示した (図 3)。次にこれらのマウスから得られた血中白血球サンプルを用いて RT-qPCR を行い GAPDH、 β -アクチン、及び U6 を内在性コントロールとして用いて RMRP の mRNA 発現を検討した。その結果、CORT 服用群では RMRP の mRNA 発現はそれぞれのコントロールに比して有意に減少していた (GAPDH: $p = 0.0131$ 、 $t = 2.71$ 、 β -アクチン: $p = 0.00975$ 、 $t = 2.84$ 、U6 : $p = 0.00315$ 、 $t = 3.33$) (図 4)。

図 3

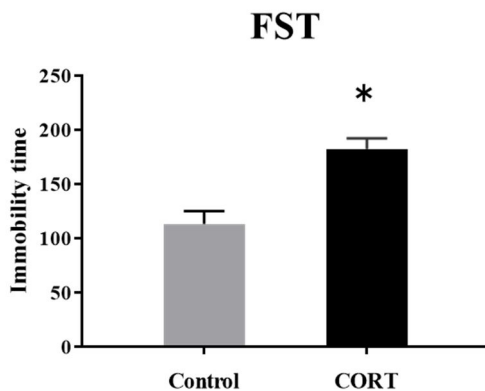
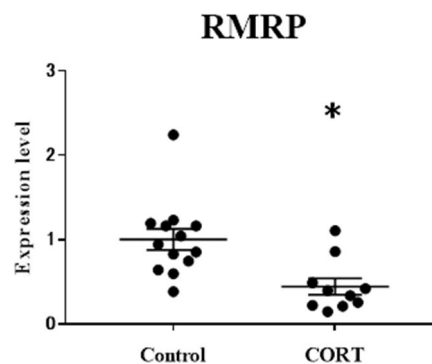


図 4



(3) 考察

実験 1 では、健常者と比較し MDD 患者の末梢白血球において 5 つの lncRNA の有意な発現変化を検出した。5 つのうち、MDD 患者で RMRP の発現は減少し、MER11C、PCAT1、PCAT29、Y5 の発現は増加していた。さらに、RMRP の発現レベルはうつ病の重症度と相関を認めた。実験 2 では、うつ病モデルマウスの血液で、RMRP 発現の減少を認めた。ヒトとモデル動物のデータに一貫性があることで、RMRP の発現変化がうつ状態に依存している可能性がより強固に示唆される。本研究は、MDD 患者とうつ病モデルマウスの両方で共通の発現変化を示す lncRNA を同定した最初の報告であるが、いくつかの限界がある。第一に、被験者の数が少ないことがあげられる。統計的検出力を高めるために、今後、より大きなサンプルサイズでの研究が必要である。第二に、過去に報告のある lncRNA を含むプライマープレートを使用して 83 種類の lncRNA に標的を絞ったため、他の lncRNA については検討していない。第三に、本研究では、末梢血サンプルを使用して発現レベルの解析を行っており、末梢血白血球での発現レベルが低いため、うつ病に關する中枢神経系の遺伝子が解析の対象とならなかった可能性は考えられる。第四に、喫煙・飲酒の習慣に関する詳細な情報を収集しなかったという点で、これらの影響を排除できなかった。第五に、実験 2 では雄マウスのみを使用し、雌マウスを用いた解析を行わなかった。最後に、これらの遺伝子の発現レベルに対する抗うつ薬の潜在的な影響を排除することはできなかった。しかしながら、RMRP に関しては、うつ病モデルマウスでもヒトと同様の発現変化が観察されたことから、うつ病の病態生理に RMRP が関与している可能性が強く示唆される。今後の展望として、これらの lncRNA が疾患特異的なものか、それともうつ状態に特異的なものなのか、また、どのようにうつ病の病態生理に關与しているのか、などを明らかにする必要がある。

<引用文献>

- Abe, N., Uchida, S., Otsuki, K., Hobara, T., Yamagata, H., Higuchi, F., Shibata, T., Watanabe, Y., 2011. Altered sirtuin deacetylase gene expression in patients with a mood disorder. *J Psychiatr Res* 45(8), 1106-1112.
- Hobara, T., Uchida, S., Otsuki, K., Matsubara, T., Funato, H., Matsuo, K., Suetsugi, M., Watanabe, Y., 2010. Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. *J Psychiatr Res* 44(5), 263-270.
- Ma, L., Bajic, V.B., Zhang, Z., 2013. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol* 10(6), 925-933.
- Yamagata, H., Uchida, S., Matsuo, K., Harada, K., Kobayashi, A., Nakashima, M., Nakano, M., Otsuki, K., Abe-Higuchi, N., Higuchi, F., Watanuki, T., Matsubara, T., Miyata, S., Fukuda, M., Mikuni, M., Watanabe, Y., 2017. Identification of commonly altered genes between in major depressive disorder and a mouse model of depression. *Sci Rep* 7(1), 3044.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamagata Hirota, Ogihara Hiroyuki, Matsuo Koji, Uchida Shusaku, Kobayashi Ayumi, Seki Tomoe, Kobayashi Masaaki, Harada Kenichiro, Chen Chong, Miyata Shigeo, Fukuda Masato, Mikuni Masahiko, Hamamoto Yoshihiko, Watanabe Yoshifumi, Nakagawa Shin	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct epigenetic signatures between adult-onset and late-onset depression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81758-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seki T, Yamagata H, Uchida S, Chen C, Kobayashi A, Kobayashi M, Harada K, Matsuo K, Watanabe Y, Nakagawa S.	4. 巻 117
2. 論文標題 Altered expression of long noncoding RNAs in patients with major depressive disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Psychiatric Research	6. 最初と最後の頁 92-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpsychires.2019.07.004. Epub 2019 Jul 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 關友恵, 山形弘隆, 内田周作, 古林亜由美, 小林正明, 陳冲, 原田健一郎, 松尾幸治, 渡辺義文, 中川伸
2. 発表標題 うつ病患者末梢白血球におけるバイオマーカーとしての長鎖非コードRNA発現解析
3. 学会等名 日本うつ病学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------