

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791152

研究課題名（和文） 双極性障害のバイオマーカー探索

研究課題名（英文） Search for biomarkers of bipolar disorder

研究代表者

数野 安亜 (KAZUNO AN-A)

独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・リサーチアソシエイト

研究者番号：40360523

研究成果の概要（和文）：

双極性障害のバイオマーカーを探索するため、一卵性双生児双極性障害不一致例の双極性障害及び健常被験者由来の培養リンパ芽球からタンパク質を抽出し、蛍光標識2次元発現差異電気泳動法を行って、疾患の有無で差のあるタンパク質の検索を行った。一部の同定されたタンパク質に対する抗体についてウエスタンブロットを用いて、**case-control study**を行ったところ、解糖系に関連したタンパク質について疾患の有無でタンパク質の発現に差がみられることがわかり、このタンパク質が双極性障害のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To search for biomarker of bipolar disorder, we extracted proteins derived from lymphoblastoid cells of monozygotic twins discordant for bipolar disorder and compared protein levels between patients with bipolar disorder and co-twin using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. Using antibodies against a part of proteins identified, we performed the case-control study by using western blot analysis. We identified a glycolysis related protein that is different expression levels between patients and healthy controls. The protein may be a biomarker of bipolar disorder.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：脳神経疾患、双極性障害、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

双極性障害（躁うつ病）は躁状態とうつ状態が繰り返し起こる疾患で、再発率が高く、生涯にわたって投薬が必要な疾患である。双生児や家系の研究より双極性障害では多数の遺伝子と環境因子の両方が複雑に関与していると考えられている。双極性障害の病態として、モノアミンおよび細胞内情報伝達系から気分安定薬の神経保護作用が注目されつつある。しかし、神経保護作用の分子基盤については様々な報告があり、未だ統一した見解はない。上記の研究以外にも、これまで様々な研究が行われてきたが、未だバイオマーカーとなるものが見出されていない。このことは双極性障害の正確な診断を困難にしている。

双極性障害ではごくまれではあるが、一卵性双生児で不一致例が存在することが知られている。片方は双極性障害を発症するが、もう片方は発症しない。原因として周産期における障害や感染症など環境要因が関連している可能性のほかに、一卵性双生児はゲノムの塩基配列がほぼ同じと考えられているので、不一致例ではメチル化など DNA の修飾状態の相違による遺伝子の機能の違い、あるいはタンパク質の翻訳後修飾の差による機能の違いなどが関与する可能性も考えられる。

タンパク質は生育段階、組織器官、環境条件に応じて修飾を受けたり、特有の立体構造や複合体を形成したりする。プロテオーム解析では mRNA レベルでは検出できないタンパク質翻訳後修飾の違いを見ることが可能である。疾患により変化するタンパク質をとらえることができれば、それは病態形成や病勢に関与するものと考えられる。また、これらのタンパク質は疾患の有無や病態を診断するためのマーカーや治療におけるターゲット因子となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では一卵性双生児不一致例由来の試料を用いて、細胞からタンパク質を抽出し、蛍光標識二次元発現差異電気泳動法（two dimensional fluorescence difference gel electrophoresis: 2D-DIGE）を用いて、プロテオーム解析を行い、疾患の有無で変化しているタンパク質群を検索し、質量分析においてそれらのタンパク質を同定し、それらが双極性障害のバイオマーカーとなり得るか、多数の双極性障害患者由来試料において同定されたタンパク質の発現量を検討し、双極性障害におけるバイオマーカーを探索することを目的とする。

3. 研究の方法

以前に作製され凍結保存されていた一卵性双生児不一致例双極性障害患者および正常被験者由来のリンパ芽球（以下、リンパ芽球については理化学研究所・脳科学総合研究センターにおける倫理委員会承認のもと、被験者に口頭および書面にて研究の意義、方法を十分に説明し、同意を得た上で採取した末梢血からリンパ球を分離し、EBV を用いて芽球化した細胞）をそれぞれ 20% FBS、50 U/ml Penicilin、50 µg/ml Streptomycin、60 µg/ml Tylosin を添加した RPMI-164 培地で起こし、細胞数が約 1×10^8 個程度になるまで 10% FBS、50 U/ml Penicilin、50 µg/ml Streptomycin、60 µg/ml Tylosin を添加した RPMI-164 培地で培養を行った。培養したリンパ芽球は卓上遠心機で遠心（500×g、10 分間、4°C）して回収し、PBS で洗浄した後、遠心して回収し、Q-proteome mammalian protein preparation kit (QIAGEN) を用いてタンパク質を抽出した。タンパク質抽出の作業はすべて 4°C で行った。抽出したタンパク質を濃縮した後、可溶化バッファー（7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 10 mM Tris-HCl [pH 8.5]）に溶解し、Protein Assay kit を用いて各タンパク質の濃度を測定した。スタンダードに牛血清アルブミンを用いた。

可溶化したタンパク質は Cy2、Cy3、Cy5 の CyDye (GE Healthcare) を用いて蛍光標識を行った。疾患の有無で蛍光標識を Cy3、Cy5 と変えてそれぞれのタンパク質を標識し、同じゲル上で蛍光標識二次元発現差異電気泳動を行った。内部標準として発現変動解析を行うすべてのサンプルを等量ずつ混合し Cy2 で標識したものをを用いた。泳動後ゲルは蛍光イメージスキャナーにて可視化し、タンパク質スポット発現解析ソフトである DeCyder を用いてスポットの検出、差のあるタンパク質スポットの統計解析を行った。一連の作業は GE Healthcare 社の Ettan-DIGE system を用いた。発現差異が顕著に見られたタンパク質スポットを切り出し用のゲルから回収し、LC-MS/MS にてタンパク質の同定を行った。同定されたタンパク質群に対する抗体で市場に販売されているもの、なおかつこれまでの研究においてヒト由来サンプルを用いたウエスタンブロットで実績のある抗体を対象にウエスタンブロットの基礎的な検討を行った。

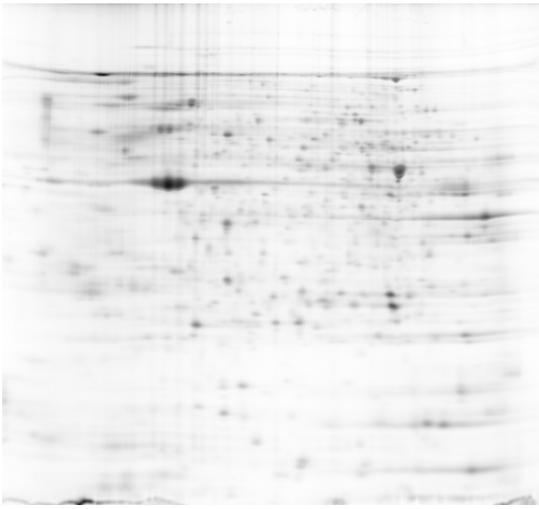
上記と同様に、双極性障害患者および双極性障害患者と年齢、性別をマッチさせた健常被験者由来のリンパ芽球（各 8 サンプルずつ）を培養し、それぞれタンパク質を抽出し、internal control を含む 8 種類のタンパク質についてウエスタンブロットを用いて case-control study を行った。

4. 研究成果

一卵性双生児不一致例双極性障害患者および正常被験者由来のリンパ芽球由来タンパク質を用いて two dimensional fluorescence difference gel electrophoresis を行い、疾患の有無で差のあるタンパク質を検索した。2次元電気泳動でタンパク質を分離した結果、各実験で平均約 3200 個のタンパク質スポットが検出された。

pH 3

pH 10



図：リンパ芽球細胞より抽出したタンパク質の2次元電気泳動におけるタンパク質スポット

各実験におけるタンパク質の発現パターンに偏りはなく、これは一卵性双生児由来サンプルを用いた解析であるため、多くのタンパク質の発現量が等しく、また実験間で安定していることがわかった。しかし、一部のタンパク質スポットについては両方で顕著に差異がある可能性が示唆された。そこで、両者の比較において fold change に 1.25 倍以上の差があり、統計的に有意 ($p < 0.05$) であるタンパク質スポットについて検索したところ、約 300 個程度のタンパク質スポットが疾患の有無により差がみられることがわかった。このうち、約 100 個程度のタンパク質を LC-MS/MS で解析し、そのうち 96 個のタンパク質を同定した。これらを双極性障害におけるバイオマーカー候補とした。これらのタンパク質群に対する抗体で市場に販売されているもの、なおかつこれまでの研究においてヒト由来サンプルを用いたウエスタンブロットで実績のある抗体を対象にウエスタンブロットの基礎的な検討を行った。健常被験者由来のリンパ芽球を培養して抽出したタンパク質を用いて、15 種類の抗

体について化学発光と蛍光法によるウエスタンブロットを行ったところ、8 種類の抗体においてこの実験系でワークすることがわかった。

双極性障害のバイオマーカー候補を探索するため、双極性障害患者および双極性障害患者と年齢、性別をマッチさせた健常被験者由来のリンパ芽球 (各 8 サンプルずつ) を培養し、それぞれタンパク質を抽出し、internal control を含む 8 種類のタンパク質についてウエスタンブロットを用いて case-control study を行ったところ、解糖系に関連したタンパク質において疾患の有無で差が見られることがわかった ($P < 0.05$, t-test)。対象にしたサンプル数が少ないのでさらなる検討が必要であるが、このタンパク質が双極性障害のバイオマーカーの 1 つとなる可能性が示唆された。

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)

① Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Miyauchi T, Komori A, Kazuno AA, Adati N, Kusumi I, Okazaki Y, Ishigooka J, Kojima T, Kato T. Hypermethylation of serotonin transporter gene in bipolar disorder detected by epigenome analysis of discordant monozygotic twins. *Translational Psychiatry* 2011; 1: e24, peer reviewed.

[学会発表] (計 4 件)

① Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Miyauchi T, Komori A, Kazuno A, Adati N, Kusum I, Okazaki Y, Ishigooka J, Kojima T, Kato T Hypermethylation of serotonin transporter gene in bipolar disorder detected by epigenome analysis of discordant monozygotic twins. 5th Biennial Conference of the International Society for Bipolar Disorders, Turkey, Istanbul, Mar. 15, 2012

② 数野安亜、岡崎祐士、加藤忠史 一卵性双生児双極性障害不一致例におけるリンパ芽球由来ミトコンドリアのプロテオミクス解析 第 33 回日本生物学的精神医学会 2011 年 5 月 22 日 東京

③ 菅原裕子、岩本和也、文東美紀、上田順子、宮内妙子、小森敦子、数野安亜、足立直樹、久住一郎、岡崎祐士、石郷岡純、小島俊男、加藤忠史 一卵性双生児双極性障害不

致例におけるゲノム差異およびエピゲノム
差異の探索 第33回日本生物学的精神医学会
2011年5月22日 東京

④ Kazuno A, Okazaki Y, Kato T
Mitochondrial proteomic analysis of
lymphoblastoid cells derived from
patients with bipolar disorder. XVIII
World Congress on Psychiatric Genetics,
Greece, Athens, Oct. 5, 2010

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.riken.jp/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

数野 安亜 (KAZUNO AN-A)

独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研
究チーム・リサーチアソシエイト

研究者番号：40360523