

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659566

研究課題名(和文) 遺伝子プロモーターのメチル化を用いた自殺予測のためのバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of the biomarker for suicide prediction using the methylation at the gene promoters

研究代表者

森信 繁 (MORINOBU, Shigeru)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：30191042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病の自殺企図を予防する目的で、うつ病患者50例を対象に脳由来神経栄養因子・TrkB受容体・セロトニントランスポーター(5HTT)・セロトニン2c受容体遺伝子のCpGのメチル化率を計測し、自殺予測に關与するバイオマーカーの開発を試みた。メチル化率の解析は、末梢血由来のDNAを対象にMassARRAY法にて行い、合計149ヶ所のCpGを計測した。ハミルトンうつ病評価尺度による希死念慮の程度と有意な相関を示すCpGは検出されなかったが、うつ病者の自殺企図と關連する、不遇な養育環境と5HTTのCpGメチル化率に相関が得られ、5HTT遺伝子メチル化率は自殺企図のマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To prevent the suicide in major depression, we measured the methylation levels at the promoter of exon 1 of the brain-derived neurotrophic factor, Trk B receptor, serotonin transporter (5HTT), and serotonin2c receptor gene in 50 patients with major depression and examined the possibility of the epigenetic biomarker for suicide prediction. We extracted DNA from peripheral blood and measured the methylation levels at the 149 CpGs in these 4 genes using MassARRAY system. No significant relationship between the methylation level of each CpG and the severity of suicidal idea evaluated by the Hamilton Rating Scale for Depression was found. However, there were significant correlations between the methylation levels of 5HTT CpGs and the severity of early adversities evaluated by the Early Trauma Inventory. Based on these findings, it is postulated that the methylation levels of CpGs in the 5HTT gene may be an appropriate biomarker for suicide prediction.

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：DNAメチル化 うつ病 自殺予測 バイオマーカー BDNF SLC6A4 不遇な養育環境

1. 研究開始当初の背景

わが国の年間自殺者数は3万人を超え、自殺企図にて病院に搬送される患者の数は自殺者の数倍にも達し、自殺や自殺企図の対策には自殺企図に対するバイオマーカーの発見に基づく、科学的予測法の開発が必須と考えられる。これまでのSNPを用いたバイオマーカーの探索では、ある遺伝子型がストレスなどの環境因子が加わった際に、自殺企図の相対的危険度が高くなることを示すだけで、あくまで危険因子としての意味しかない。このためバイオマーカーの探索には、希死念慮を含むうつ状態の重症度をモニターできる可塑的な因子の抽出というSNP以外の方法が求められている。また自殺者死後脳を用いた遺伝子メチル化研究もあるが、これらは自殺予測のバイオマーカーには応用出来ない。

研究代表者は文科省科研費特定領域研究(H18-H21)の補助を受け、大うつ病診断を目的にBDNF遺伝子プロモーター領域のメチル化の解析を行い、世界で初めて健康対照者や統合失調症との比較から大うつ病に特異的なBDNF exon 1上流のCpGアイランドのメチル化プロフィールを発見した(特願2010-175748)。DNAメチル化は遺伝子転写に重要でかつ、可塑的变化を示す反応であり、病態診断のみならずうつ状態の重症度によって変動する可能性が予想される。

2. 研究の目的

うつ病患者を対象に自殺企図を含む希死念慮などのPsychobiopsyを行うと同時に、末梢血DNAを用いてMassARRAYによるDNAメチル化の解析を行い、自殺予測のエピジェネティック・バイオマーカーの探索を行った。同時に健康対照者からも同様にDNAメチル化の解析を行い、うつ病に特異的なメチル化プロフィールの探求を試みた。

3. 研究の方法

研究対象：今回の研究では、うつ病患者50例(平均年齢：40.3 ± 10.3歳、男/女：27名/23名)と健康対照者50例(平均年齢：40.3 ± 10.5歳、男/女：27名/23名)を対象に行った。

採血時のPsychobiopsyは、以下のような方法で行った。

精神科診断：うつ病の診断は、米国精神医学会の作成した診断基準であるDSM-IV-TRに準拠した、簡易構造化面接法であるMini International Neuropsychiatric Interviewを用いて行った。

うつ状態の評価：Hamiltonうつ病評価尺度(HAM-D)の総得点をうつ病の重症度評価として、希死念慮の評価はHAM-Dの同項目の点数で行った。

幼少期の不遇な環境の評価：Early Trauma Inventory (ETI)による幼少期の不遇な環境の評価を行った。

実験方法：末梢血よりのgenomic DNAの抽

出は、DNeasy (Qiagen)を用いて行った。その後のDNAメチル化解析は、SEQUENOM社のMassARRAY® Systemを用いて行った。システム内のsodium bisulfite処理キットを用い、非メチル化シトシンのウラシルへの置換を行った。

今回解析の対象とした、脳由来神経栄養因子(BDNF)(図1)、BDNF受容体のTrkB、セロトニン・トランスポーター(5-HTT)(図2)、セロトニン(5-HT)2c受容体の各遺伝子の転写開始点近傍に存在するCpGアイランド領域の情報をUniversity of California, Santa Cruz (UCSC) genome browserとGenbankより取得し、各CpGアイランドをカバーする複数のPCR用プライマーをMassARRAY® System上のEpidesignerを用いて設計し、Methylation specific PCRの後、In vitro transcriptionを行った。U特異的切断の後、MassARRAY MALDI-TOF MSを用いてDNAメチル化を質量分析法にて定量した後、Epityperを用いてDNAメチル化のデータを得た。データ解析には、統計解析パッケージである“R”を用い、主に階層的クラスタリング法や主成分分析などの多変量解析を行った。

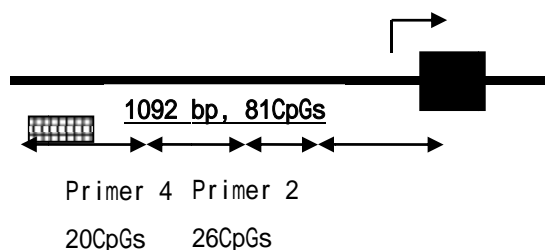


図1. メチル化率を計測したBDNF遺伝子のプロモーター領域

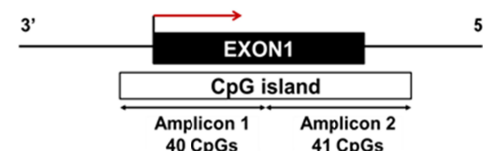


図2. メチル化率を計測した5-HTT遺伝子のプロモーター領域

4. 研究成果

今回のメチル化解析では、BDNF遺伝子は35ヶ所、TrkB遺伝子は31ヶ所、5-HTT遺伝子は29ヶ所、5-HT2c受容体遺伝子は54ヶ所の各CpGのメチル化率を解析できた。HAM-Dにて行った希死念慮の重症度と各遺伝子上のCpGメチル化率の間に、有意な関連はみられなかった。同時に行ったHAM-D総得点によるうつ病重症度と各遺伝子上のCpGメチル化率の解析では、5-HTT遺伝子CpG76にて有意な正の相関が得られた。幼少期の不遇な環境の程度を示すETI総得点と各遺伝子上のCpGメチル化率の解析では、5-HTT遺伝子CpG76にて有意な正の相関をCpG3にて有意な負の相関を得た。

また、今回の研究で対象とした各遺伝子のメチル化率を階層的クラスター法にて解析を行い、メチル化プロファイルによるうつ病群と健康対照群との分類を行ったが、有意な分類はできなかった(図3-5)。

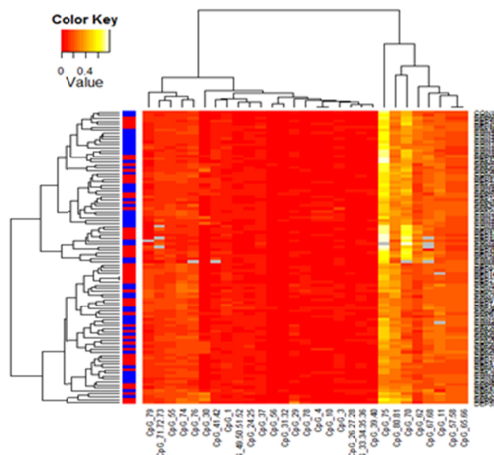


図3. 5-HTT 遺伝子のプロモーターのメチル化プロファイルによるうつ病患者と健康者の階層的クラスター解析結果
青：うつ病患者、赤：健康者。

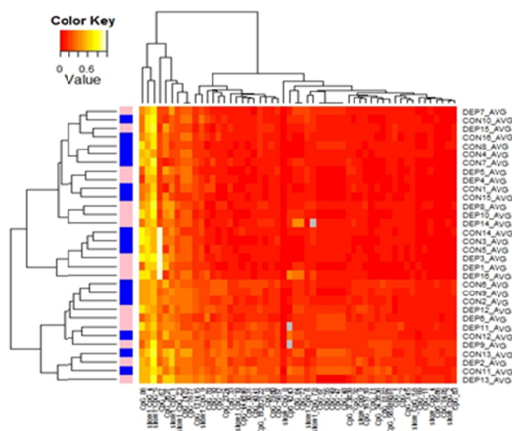


図4. 5-HT2c 受容体遺伝子のプロモーターのメチル化プロファイルによるうつ病患者と健康者の階層的クラスター解析結果
青：うつ病患者、赤：健康者。

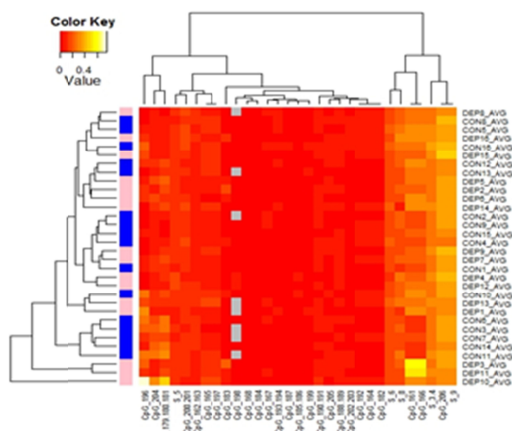


図5. TrkB 遺伝子のプロモーターのメチル化プロファイルによるうつ病患者と健康者の階層的クラスター解析結果
青：うつ病患者、赤：健康者。

さらに、今回の研究結果からは、メチル化解析の対象とした BDNF, TrkB, 5-HTT, 5-HT2c 受容体の各遺伝子の exon 1 上のプロモーター領域の CpG メチル化率は、自殺予測のバイオマーカーには適していないことがわかった。

なお、今回の対象とした遺伝子は、抗うつ薬との関連からうつ病の病態関連遺伝子として多くの報告のある遺伝子であるが、自殺という症状との関連には乏しい遺伝子であったために、今回のような結果になったと考えられる。

同様に今回対象とした遺伝子の中では、幼少期の不遇な環境を評価する ETI 総得点と 5-HTT の CpG3, 73 のメチル化率とが有意な相関を示している。なお、幼少期の不遇な環境はうつ病にみられる自殺企図の危険因子となることが報告されており、このような報告を前提に考えると 5-HTT 遺伝子のメチル化率が自殺予測のバイオマーカーとなる可能性が提唱されたと考えられる。

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2件)

Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Kataoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Trao T, Kokubo Y, Mimura M. The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. J Psychiatric Res, 53: 47-53, 2014. (査読有)

森信 繁. エピジェネティクスからみたうつ病の病態. 精神神経学雑誌 115: 1101-1112, 2013. (査読有)

[学会発表](計8件)

Morinobu S. Searching for epigenetic biomarkers in PTSD. VI Japanese Society of Anxiety Disorder Academic Conference. Tokyo Univ, Tokyo, 2014.2.1-2.

Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Okada S, Okamoto Y, Yamawaki S. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. XI World Congress of Psychiatric Genetics. Seaport World Trade Center and Seaport Hotel, Boston USA, 2013.10.17-21.

Segawa M, Morinobu S, Fuchikami M, Fujita Y, Okada S, Okamoto Y, Yamawaki S. Searching for epigenetic biomarkers in major depression: focusing on the sero

tonin signal transduction. XXI World Congress of Psychiatric Genetics. Seaport World Trade Center and Seaport Hotel, Boston USA, 2013.10.17-21.

森信 繁. Possibility of DNA methylation profiles as a potent diagnostic biomarker in PTSD. Kyoto International Conference Center, Kyoto Japan, 2013.6.23-27.

森信 繁. DNA メチル化解析を用いた精神疾患の客観的診断法の開発. 第 33 回日本臨床薬理学会. 沖縄コンベンションセンター, 沖縄, 2011.29-12.1.

Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Yamawaki S. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in psychiatric disorders. Neuroscience 2012, New Orleans Convention Center, New Orleans, USA. 2012, 11.13-17.

森信 繁. エピジェネティクスからみたうつ病の病態・診断・治療. 第 31 回日本認知症学会. つくば国際会議場, つくば, 2012.11.26-28.

森信 繁. DNA メチル化解析を用いた精神疾患の客観的診断法の開発. 第 34 回日本生物学的精神医学会. 神戸ポートピア国際会議場, 神戸, 2012.9.28-30.

[図書] (計 2 件)

森信 繁, 淵上 学, 瀬川昌弘, 岡田 怜. BDNF 遺伝子のメチル化を用いたうつ病バイオマーカーの開発. 別冊・医学のあゆみ 148-151, 2014. (査読無)

森信 繁, 淵上 学. 気分障害の BDNF 仮説とエピジェネティクス. 気分障害の薬理・生化学. 躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 編. 医薬ジャーナル社, 東京. p 141-150, 2012. (査読有)

[その他]

ホームページ等

高知大学医学部神経精神科学教室ホームページ
(http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_nrpsy/kenkyu.htm)

広島大学精神神経医科学ホームページ
(<http://home.hiroshima-u.ac.jp/seisin/laboratory.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森信 繁 (MORINOBU SHIGERU)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 30191042