

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791210

研究課題名(和文) 遺伝環境相互作用の観点からうつ病の生物学的因子を同定する妊産婦ゲノムコホート研究

研究課題名(英文) Genome cohort study of gene-environment interactions aim to identify biomarkers for peripartum depression

研究代表者

國本 正子 (KUNIMOTO, Shohko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：30350135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：妊産婦コホート末梢血を用い、内分泌学的な変化や遺伝子のメチル化状態と気分変動との関連を検証し、遺伝環境相互作用の観点から、うつ病の病因・病態に關与する分子候補を同定することを目的とした。数種の血中物質濃度が出産前後で有意に変動していたが、気分変動との相関は見られなかった。メチル化の解析では、LINE-1の解析から、ゲノム全体の不安定化が妊産婦の気分変動と關連する可能性は低いことが示唆された。BeadChipによる網羅的解析では、産後抑うつと關連すると考えられるパスウェイが予試験的に抽出された。今後は妊婦のゲノムについて合わせて解析を行うとともに、例数を増やし、さらなる検証を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：Identification of biomarkers to understand for pathogenesis and pathophysiology of postpartum depression is urgent issue to develop therapeutic and preventive application. To address this issue, we analyzed blood samples from peripartum women using endocrinologic or epigenetic approaches with respect to gene-environment interaction.

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：臨床精神分子遺伝学 産後うつ病 DNAメチル化 遺伝環境相互作用

1. 研究開始当初の背景

我が国の、うつ病を含む気分障害患者数は100万人以上を数え、自殺ならびに長期休務等の主要因となっている。うつ病の発症には遺伝因子と環境因子の双方が関与していることが予測されているが、うつ病の遺伝環境相互作用を分子レベルから説明できる答えは未だ提示されていない。その結果、生物学的な病態を反映した診断検査法がなく、病因・病態に基づく治療戦略を立てることが困難である。したがって、遺伝環境相互作用の観点から、うつ病に関わる生物学的因子を明らかにし、有効な治療および予防の具体的戦略に繋がる情報を得ることは喫緊の課題である。この背景を踏まえ、報告者は、妊娠出産という共通した環境因の負荷下で発症群とともに非発症群を確認することが可能な、妊産婦コホートを出発点とし、末梢血を用いたゲノムコホート研究を行うことで、上記の課題に取り組んだ。

産後(産褥期)うつ病は頻度が高く、その発症には心理社会的環境と同時に、妊娠出産に伴う内分泌学的な変化などの生物学的な因子が関与する事が想定されるが、詳細は不明である。また、うつ病の遺伝因子に関する研究は散見されるが、産後うつ病のように、共通の環境因をもつ、特定の亜型に特化した研究もやはり乏しい。

近年、環境因子によって引き起こされるゲノム上のエピジェネティックな修飾が、うつ病を含む精神疾患の病因や病態と密接に関わる可能性が指摘されている。とりわけ、DNAメチル化は、遺伝子サイレンシング制御やクロマチン安定性に重要であり、メチル化状態の差異が遺伝子発現状態を左右すると考えられている。そのため、DNAメチル化解析はうつ病の発症機序を分子レベルで解明する糸口となることが期待されている。実際、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 遺伝子 Exon I 上流 CpG island のメチル化が、うつ病診断の有力なバイオマーカー候補であることを、申請者の所属グループは共同研究で報告した(Fuchikami M, Ozaki N, et al. PLoS One. 2011)。

また、うつ病と認知症の関連が疫学的観点から報告されるとともに、両疾患の病態生理に、コルチゾールの上昇や海馬容積の減少などの、環境に応答した共通の機構が関与することが示唆されている(Nat Rev Neurol, 2011)。報告者は、この背景に加え、これまで認知症の遺伝環境相互作用に関してモデル動物を用いた立証を実施してきた経緯[平成18、19年度および21、22年度若手(B)採択課題、研究業績欄4-10]から、認知症の病因・病態に関与するとされている分子の中には、うつ病に関連して変化し、脳構造の変化に寄与しうる因子が含まれると考えた。例えば認知症では、コルチゾールレベルの上昇に加え、炎症性的変化や神経栄養因子の欠乏が、海馬の萎縮と関連があることが示唆されて

いる。反復性うつ病でも、コルチゾールの変化に関連し、海馬の容積が低下することが示されているが、その機構は不明である。慢性炎症関連では、Interleukin(IL)-6 や tumor necrosis factor (TNF) レベルの上昇が、抗炎症作用や免疫抑制の調節を低下させ、中枢神経系における炎症誘発性変化を上昇させることで、認知障害を引き起こすこと、セロトニン代謝の阻害を介して、シナプス可塑性や海馬神経新生を低下させることが示唆されている。

また、神経成長因子の一種である BDNF の減少が認知症とうつ病の患者で見いだされていることから、海馬の統合や認知機能の維持において重要な役割を持つ他の神経成長因子も、うつ病に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本課題は、遺伝環境相互作用の観点から、妊産婦コホートの末梢血を出発点としたゲノムコホート研究を行い、産後うつ病の病因・病態に関与する生物学的因子を特定することを目的とした。産後うつ病に関連する、内分泌学的な変化、ゲノム全体のメチル化レベルの変動の有無、脳構造の変化に寄与する可能性のある遺伝子のメチル化状態を明らかにし、その結果から、うつ病の診断および有効な治療・予防の具体的戦略に繋がる情報を提示することを企図した。

3. 研究の方法

(1) 妊産婦コホート

所属グループは、名古屋大学倫理委員会の承認事項に則り、20歳以上の妊産婦を対象とした前向きコホート研究を実施し、これまでに、エントリー数900名以上、うち産後1カ月までのすべての質問紙に回答済みの数750名程度、ゲノム解析可能対象者数580名程度を得ている。妊産婦から、産後うつ病の評価、人格傾向、養育体験などを含む心理検査とともに、血液を採取し、データを集積し続けている。また、このコホートを利用し、産後一ヶ月のうつ病が約10%に生じること、産後1週以内にマタニティブルー(MB)が生じる群は産後うつ病のハイリスク群であることを明らかにしている(Ishikawa N, Ozaki N et al., J Psychosom Res, 2011)。本課題では、この前向きコホート研究において収集中の、妊産婦血液試料および、うつ病の評価を利用した。

抑うつ状態の評価として Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) を用いた継続的質問紙調査を、妊娠中と産後の各時点で行った。また、Stein Maternity Blues Scale (Stein's Scale) を用いて、産後うつ病のリスクになることが示唆されているマタニティブルーの評価を行った。

(2) 内分泌学的変化の解析

対象は妊産婦 62 名(平均年齢 31.3 歳、range: 24-43、SD=4.1)。妊娠 36 週、産後 2 日、産後 1 か月に採取した血液について、サイトカイン、ホルモンなど、血中物質の濃度変化を ELISA 法により測定し、継続的質問紙調査によって評価された抑うつ・非抑うつ群間および MB・非 MB 群間で比較した。

(3)LINE-1 によるゲノム全体のメチル化頻度の検証

LINE-1(long interspersed nuclear element)はレトロトランスポゾン的一种で、そのプロモーター領域はメチル化により通常発現抑制されているが、低メチル化により発現することがゲノム不安定化の原因となるといわれており、近年がん研究分野において注目されている。本課題では、妊産婦血液由来のゲノムを用い、LINE-1 プロモーター領域のメチル化頻度を調べ、出産前後および気分状態の違いによるメチル化頻度の変化を検証した。

(4)特定の遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度の解析

血液から抽出したゲノムに関して、特定の遺伝子を対象としたゲノムのメチル化状態の解析を行い、出産前後、および抑うつ群と非抑うつ群間で比較した。メチル化の解析は Bisulfite pyrosequencing 法により行った。解析に際し、QIAGEN の PyroMark CpG Assays を利用し、各遺伝子に最適なアッセイデザインを入手した。また、必要に応じて、QIAGEN PyroMark Assay Design ソフトを使用し、カスタムプライマーを設計し、解析に用いた。

(5)CpG island shore を含むゲノム全体のメチル化解析

イルミナ社の Infinium HumanMethylation450 BeadChip を用いて、網羅的メチル化解析により、産後抑うつ群 5 例と非抑うつ群間 5 例で、メチル化頻度に差のある部位の同定を試みた。

4. 研究成果

(1)妊産婦コホート

これまでに、エントリー数 900 名以上のうち、産後 1 か月までのすべての質問紙に回答済みの数 746 名、ゲノム解析可能対象者数 613 名を得た。

(2)内分泌学的変化の解析

出産前後で比較を行ったところ、cortisol, progesterone, TNF- α , Biopterin(active) は出産後に低下し、IL-6, TSH, PRL, Biopterin(inactive)は、出産後に増加していた。一方、EPDS や Stein's Scale の得点を用いて、測定したすべての血中物質に関して気分変動との関連を検証した結果、Cortisol に関してのみ、妊娠期に非抑うつであった妊産婦群を対象にした場合に、妊娠

末期の濃度と MB との関連がみられた。産後の気分変動については妊娠中の精神状態も含めて検討し、産後の MB やうつ病と妊娠からの継続したうつ状態との混在を防ぐ必要があることが判明した。

(3)LINE-1 によるゲノム全体のメチル化頻度の解析

妊娠中 101 名、産後 202 名分のゲノムを対象に、LINE-1 によるゲノム全体のメチル化頻度の解析を行ったところ、出産前後でゲノム全体のメチル化レベルに有意な差が認められた。この結果から、同一被験者における出産前後の経時的なメチル化解析の必要性が判明したため、次に、同一被験者妊産婦 7 名を対象に、妊娠中と産後のゲノム全体のメチル化レベルの比較を行った。その結果、対象者数が少ないこともあるが、同一被験者における出産前後の LINE-1 プロモーター領域のメチル化頻度に有意な差は認められなかった。また、気分状態の違いによる、LINE-1 メチル化頻度の差も認められなかった。

(4)特定の遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度の解析

ストレス応答関連遺伝子のグルココルチコイド受容体 NR3C1 および、神経栄養因子 BDNF のプロモーター領域について、メチル化頻度の解析を行った。

Nr3c1 については、母親のケアが少ないラットの海馬で、そのプロモーター領域、NGF1-A binding site の高頻度メチル化が生じることで Exon1 γ の発現が低下し、HPA 系(視床下部-下垂体-副腎系)のネガティブフィードバックが阻害されることが報告されている(Nat Neurosci 2004)。この報告を参考に、対応するヒト NR3C 遺伝子の NGF1-A binding site を含む、exon 1F 近傍 CpGp1-13 のメチル化解析を行った。妊娠中 95 名、産後 173 名分のゲノムを対象に解析を行ったところ、産後のゲノムでは、妊娠中と比較して、NR3C1 exon1F の転写調節に関わる NGF1-A binding site のメチル化頻度が有意に高いことが示された。しかしながら、今回解析を行った部位に関しては、抑うつ状態とメチル化頻度との間に直接的な関連を見いだすことはできなかった。

ついで、大うつ病性障害のバイオマーカー候補として報告されている(PLoS One 2011)BDNF 遺伝子 CpG 1 のメチル化頻度についても同様の解析を行った。その結果、産後のゲノムでは BDNF CpG 1 の一部のメチル化サイトについて、妊娠中のゲノムと比較してメチル化頻度が低いことが判明した。一方で、NR3C1 と同様に、抑うつ状態と BDNF の今回解析を行った部位に関しては、メチル化頻度との間に直接的な関連を見いだすことはできなかった。

(5)CpG island shore を含むゲノム全体のメ

メチル化解析

(4)の特定の遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度の解析において、NR3C1とBDNFのプロモーター領域 CpG island メチル化部位に関しては、抑うつ状態とメチル化頻度との関連が認められなかったため、CpG island shore を含むより広いメチル化領域を広く検証するため、BeadChipを用いて予試験的にゲノムワイドなDNAメチル化解析を行った。

まず、抑うつ・非抑うつ群間で産後のゲノムについて、メチル化の異なる領域を比較、解析した。2群間で有意差のあったCpGサイトは全プローブ数の0.14%を占め、非抑うつ群との比較から、抑うつ群で低メチル化なCpGサイトは、上記のうち80%、高メチル化のCpGサイトは20%であった。また、領域別の内訳では、転写不活性化と密接に関連する領域といわれているShoreサイトが多くを占めることが示された。予試験的ではあるが、Cytoscapeを用いたパスウェイ解析から、転写活性化、細胞周期、DNA修復に関連するパスウェイについて、2群間のメチル化状態に違いが見られる事が示された。

考察

内分泌学的変化については、出産前後の気分変動と一貫して相関のある血中物質は同定されなかったが、これはMB群や抑うつ群の検体数が少ないことに由来すると考えられるため、今後対象者数を増やして引き続き解析を行う必要がある。メチル化の解析では、LINE-1の解析から、ゲノム全体の不安定化が妊産婦の気分変動と関連する可能性は低いことが示唆された。

一方、pyrosequencing法を用いた特定の遺伝子プロモーター領域の解析では、今回対象とした遺伝子に関しては、抑うつとメチル化の頻度に関連が認められなかったことから、BeadChipによる網羅的解析を行った。その結果、予試験的に産後抑うつと関連すると考えられるパスウェイが抽出されたが、今後は出産による変化と抑うつによる変化を区別するためにも、妊婦のゲノムについて合わせて解析を行うとともに、例数を増やし、さらなる検証を行う必要がある。

今後、転写因子結合サイトデータベースTRNSFACにより、群間でメチル化変動が大きいCpGサイトに結合する可能性のある転写因子をリスト化し、産後抑うつ群で特異的に発現が変化する遺伝子セット・pathwayの同定を行うことで、産後うつ病の生物学的因子を明らかにできると予想される。また、利用中の妊産婦コホートに関しては、心理社会的因子も検証しており、上記の生物学的因子の解析と合わせて多面的検討が可能である。産後うつ病をモデルに生物学的因子を同定し分子病態解明に有用な知見が得られれば、包括的な解析から、うつ病一般の診断および有効な治療・予防の具体的戦略に繋がる情報を提供し、本疾患がもたらす自殺、休務などの

大きな社会的損失解消に対する解決の糸口を提案できると予想される。

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3件)

Shiino T, Koide T, Kushima I, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Aleksic B, Banno M, Kikuchi T, Kohmura K, Adachi Y, Kawano N, Okada T, Inada T, Jike H, Iidaka T, Suzuki M, Iwata N, Ozaki N. Common variants in bcl9 gene and schizophrenia in a Japanese population: association study, meta-analysis and cognitive function analysis. *Journal of Medical Biochemistry* 32:351-357. 2013. 査読有 DOI: 10.2478/jomb-2013-0049

Aleksic B, Kushima I, Ohye T, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Iritani S, Kurahashi H, Iwata N, Ozaki N. Definition and refinement of the 7q36.3 duplication region associated with schizophrenia. *Scientific Reports* 3:2587:ePub.2013. 査読有 DOI: 10.1038/srep02587

Tamaji A, Iwamoto K, Kawamura Y, Takahashi M, Ebe K, Kawano N, Kunimoto S, Aleksic B, Noda Y, Ozaki N. Differential effects of diazepam, tandospirone, and paroxetine on plasma brain-derived neurotrophic factor level under mental stress. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 27:329-333.2012. 査読有 DOI: 10.1002/hup.2220

〔学会発表〕(計3件)

野田幸裕, 長谷川章, 谷口将之, 肥田裕文, 毛利彰宏, 國本正子, 山田清文, 尾崎紀夫, 田中光一, 鍋島俊隆. 認知機能におけるグリア型グルタミン酸トランスポーター (GLAST) の役割

The role of glial glutamate transporter (GLAST) in cognitive functions in mice. 第87回日本薬理学会年会、東北大学百周年記念会館川内萩ホール、仙台国際センター(仙台市) 2014.3.19-3.21

渡邊淳, 國本正子, 高橋慶吉. 変異型 Notch3 ノックインマウスの生化学的解析. 第31回日本認知症学会学術集会、つくば国際会議場(つくば市)2012.10.26-28

玉地亜衣, 國本正子, 久保田智香, 水野妙子, 後藤節子, 村瀬聡美, 金井篤子, 尾崎紀夫. 妊産婦の気分変動と血

中ストレス関連物質との関連についての検討

The examination of the relationships between postpartum blues and serum cortisol and cytokine levels. 第 34 回日本生物学的精神医学会、神戸国際会議場（神戸市）2012.9.28-30

〔図書〕(計 2 件)

松本友里恵, 國本正子, 尾崎紀夫, うつ病発症と遺伝子/環境相互作用. 精神保健研究 第 26 号 (通巻 59 号) :5-13. 2013.

中村由嘉子, 國本正子, 尾崎紀夫, 妊産婦に生じるうつ病を対象としたゲノムコホート研究. 日本生物学的精神医学会誌 23:205-210. 2012.

〔その他〕

ホームページ等

國本正子, 中村由嘉子, 久保田智香, 尾崎紀夫. 産褥期精神障害. 脳科学辞典 2012.
<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/産褥期精神障害>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國本 正子 (KUNIMOTO SHOHKO)
名古屋大学・医学系研究科・特任助教
研究者番号: 30350135

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし