

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861009

研究課題名(和文) うつ病における血中バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search of the diagnostic biomarkers for depression

研究代表者

瀬川 昌弘 (SEGAWA, MASAHIRO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：20457253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：健常人(n=20)とうつ病患者(n=5)との血中proBDNF(brain derived neurotrophic factor)濃度の比較では、有意差は得られなかった。白血球由来のBDNFアンチセンスRNAをreal-time PCRで測定した。健常人(n=5)でのみ測定可能であった。セロトニントランスポーター(5-HTT)の発現調節部位であるSLC6A4のCpGアイランドのメチル化率を健常人(n=50)とうつ病患者(n=50)で比較することによって、うつ病のバイオマーカーとはなり得ないが、薬剤反応性の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)：Comparison of the proBDNF (brain derived neurotrophic factor) density in the blood with the control (n=20) and the depression patient (n=5) didn't give us the significant difference. Leukocyte-derived BDNF antisense RNA was measured in real-time PCR. It was possible to measure with only the control (n=5). We had compared the methylation rate of CpG Island of SLC6A4 which is a manifested control part of a serotonin transporter (5-HTT) of the depression (n=50) with one of the control (n=50). We didn't have the result in line with expectations, but a possibility which can be the biomarker of the therapeutic responses to antidepressant.

研究分野：うつ病

キーワード：うつ病 proBDNF BDNFアンチセンス 5-HTT メチル化 SLC6A4

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の2008年の患者調査によると、わが国では1041千人のうつ病患者数が報告され、国際的にも2020年にはうつ病は障害調整平均余命低下要因の第2位になることが推測されている(Murray & Lopez et al, 1997)。同時に1998年以来、年間自殺者数3万人越という現象の重要な要因の一つが、うつ病にあると考えられている。うつ病は適切な診断・治療により回復が認められる疾患であり、早期受診および適切な治療が重要であることは言うまでもない。しかしながらうつ病の診断はDSM-等を利用した、医師による患者への問診をベースに、精神科医の経験に基づいて成されているのが現状である。このような主観的診断法ゆえに、精神科診療機関によって診断が異なることも稀ではない。同時にうつ病治療に用いられる抗うつ薬には、SSRIをはじめ複数の薬理作用の異なったタイプの薬物があり、どの薬物を投与するかも問診及び視診による情報を基にした精神科医の経験に委ねられている。このような主観的要素の多いうつ病の診断・治療体系が、誤診あるいは難治化の要因とも指摘されており、バイオマーカーを用いた客観的な診断法および治療法の創出が急務とされている。

2. 研究の目的

大うつ病有病率の増大や難治化は、我が国の医療行政上の大きな問題となっており、新たな発症機序の解明や診断バイオマーカーの開発が急務となっている。このため本研究の目的は、本障害の病態が単なるBDNF低下ではなく、BDNFの多面的機能障害に由来することを解明して、新たな治療法の基盤を構築することにある。具体的には、課題1) うつ病患者の血中 proBDNF の計測による、BDNFのプロセッシング障害とうつ病発症機序の解明。課題2) うつ病患者の血中 BDNF のアンチセンス RNA の計測による、新たな BDNF 低下の機序の解明、課題3) うつ病患者の末梢血 DNA を用いた DNA メチル化解析による診断バイオマーカーの開発、の3課題に取り組む。

課題1: 血中 proBDNF の計測による、BDNF プロセッシング障害とうつ病発症機序の解明

近年うつ病の病態との関連性が強く示唆されている脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)(Nestler et al., 2002)を標的としたバイオマーカー研究が試みられ、うつ病患者では血清 BDNF 濃度が健常者と比較して有意に低下しているという報告(Simizu et al., 2003)や、うつ病患者死後脳研究でも BDNF 濃度が低下していることが報告されている(Chen et al., 2001)。しかし BDNF 仮説だけではうつ病の病態を十分には説明できない。BDNF は神経保護作用という観点からみると、成熟体 BDNF(mBDNF)とその前駆体で

ある precursor BDNF(pro-BDNF)では、全く異なる作用を持つことが知られている。pro-BDNF は後シナプスに発現している p75 受容体に作用することでアポトーシスやスパイン退縮等を引き起こすことがわかっており(Lu et al., 2005)、近年ではうつ病発症の因子の一つとして注目されている。

うつ病患者と健常者の血清中の pro-BDNF 蛋白量をウエスタンブロット法を用いて解析し、バイオマーカーとしての適性を調べる。

pro-BDNF とうつ病との関係は極めて斬新的な課題であり、最近申請者は電気痙攣療法(薬物抵抗性うつ病の治療として临床上最も効果的な治療法)によって、pro-BDNF を mBDNF へとプロセッシングする機構がラット海馬内で亢進していることを突き止めた。本研究では pro-BDNF の増加とうつ病の関係性に注目し、これまで行われていなかったうつ病患者の血清中 pro-BDNF 蛋白濃度を計測することで、より精密な診断・治療反応予測バイオマーカーの開発につながると考えている。

課題2: 血中 BDNF アンチセンス RNA の計測による、うつ病の新たな BDNF 低下の機序の解明

課題1で述べたように、うつ病患者では血清 BDNF 濃度が健常者と比較して低下している。BDNF 発現低下の要因はの一つとして、BDNF アンチセンス RNA の存在が指摘されている(Modarresi et al., 2012)。申請者らは最近、健常者末梢血サンプルから BDNF アンチセンス RNA 濃度の real-time PC 法を用いた計測法を開発したが(未発表データ)、疾患群では未確認である。

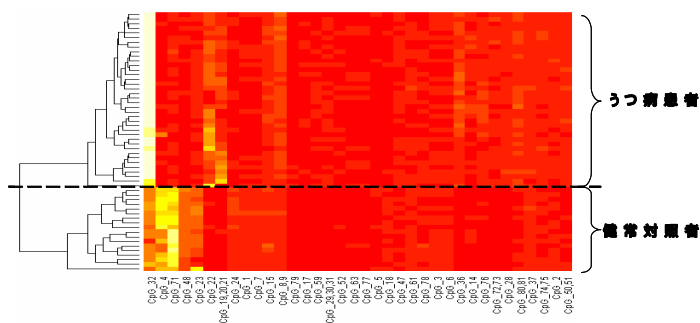
うつ病患者の血液中の BDNF アンチセンス RNA の存在を明らかにし、BDNF 低下の新機序解明と健常者との比較解析することでバイオマーカーとしての可能性を探る。

BDNF アンチセンス RNA の研究はまだ始まったばかりの研究分野であるが、うつ病患者で血清 BDNF 濃度が低下している原因の一つではないかと申請者は推測している。すでにヒト末梢血由来 RNA での BDNF アンチセンスの発現を、申請者は基礎検討を行い確認している。これは簡易な計測が可能のため、うつ病のバイオマーカーとして有力な候補になりうると期待している。

課題3: うつ病患者の末梢血 DNA を用いた DNA メチル化解析による診断バイオマーカーの開発

遺伝子発現において、遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランド領域(シトシンの次にグアニンが現れる2塩基配列で CpG サイトの出現頻度がゲノム中で高い領域)がメチル化されることで、遺伝子の転写の抑制が生じる。そこで健常者とうつ病患者の血液中の白血球由来 DNA のメチル化プロフィールに着目して、申請者らはうつ病患者と健常者の末梢血より DNA を採取し、

SEQUENOM 社の MassARRAY システムを用いて、BDNF のエクソン 1 の上流の CpG アイランド領域(約 1000bp)の 81 個の CpG のメチル化のプロフィールを計測した。その結果、階層的クラスタ解析法を用いることによって、健常者とうつ病患者を分類することが可能となることを見出した(下図)。これにより、他の遺伝子プロモータ領域でも分類可能な領域があることが予想される。



健常者とうつ病患者の白血球 DNA をもちいて、全ゲノムのメチル化パターンを比較し、うつ病患者において特定の染色体領域のメチル化が健常群と比較して有意に変化している遺伝子の抽出を行う。これによりうつ病疾患特異的に発現が異なる分子を複数抽出することで、一層精密なうつ病診断 DNA メチル化バイオマーカーの創出を行う。

BDNF 遺伝子のメチル化の解析から、双極性障害 及び 型を判別できるという報告もあるが、これはメチル化率の平均値が 2 群間で有意に異なるというだけで、臨床診断に使用できる精度ではない (D'Addario et al., 2012)。臨床症状からみてうつ病の病態は多様であることが推測され、BDNF のエクソン 1 の上流領域のみのメチル化プロフィールで全てのうつ病の診断が可能かは疑問である。このためゲノム・ワイドに DNA メチル化プロフィールを解析して、BDNF 遺伝子以外の部分でのうつ病特異的メチル化パターンを探索することは、本研究の主旨でもある精密な診断バイオマーカーの創出に必要な研究と考えている。申請者はすでに Human Methylation450 (HM450)Beads Chip (Illumina 社)を用いて、白血球由来 DNA のゲノム・ワイドなメチル化プロフィール解析に着手しており、University of California, Santa Cruz (UCSC) genome browser と Genbank を利用し、うつ病患者と健康者との間で有意なメチル化に差のある領域を抽出する予定である。このように DNA メチル化プロフィールを研究することは、高い確率で有益な結果をもたらすと期待している。本研究ではすでに広島大学の倫理委員会での承認を受けており、現在多数のうつ病患者と健常者の末梢血サンプルを収集している。従って、早期に研究に着手できると考えている。

3. 研究の方法

課題 1, 2, 3 で用いる血液サンプルは大うつ病患者を対象としており、本研究の内容と対象者への倫理的配慮を明記した研究説明書を提示し、研究参加の同意を文章にて取得する(本研究の実施に際して、すでに広島大学大学院医歯薬保健学研究院研究倫理委員会及び分担研究及び研究協力機関での倫理委員会の承諾を得ている)。

課題 1: 血中 proBDNF の計測による、BDNF プロセッシング障害とうつ病発症機序の解明
うつ病患者及び健常者からの末梢血サンプルを用いて血清成分を抽出し、pro-BDNF の解析には、抗 mature domain BDNF 抗体と抗 pro-domain BDNF 抗体を用いた共免疫沈降を行い、ウエスタンブロット法で定量する。

課題 2: 血中 BDNF アンチセンス RNA の計測による、うつ病の新たな BDNF 低下の機序の解明

末梢血からの total RNA 抽出は、QIAamp RNA Blood kit (Qiagen)と QIAcube (Qiagen)とを用いて行う。濃度計測後に Quantiscript Reverse Transcription kit (Qiagen)により cDNA の合成を行う。合成した cDNA を試料に、7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem)にて real-time PCR を行う。Real-time PCR 用の primer, Taqman probe は、Gene Expression Assay (Applied Biosystem)を用いる。

課題 3: うつ病患者の末梢血 DNA を用いた DNA メチル化解析による診断バイオマーカーの開発

うつ病患者及び健常者からの末梢血サンプルを用いて、申請者が属す広島大学精神科で行われている白血球由来 DNA の全ゲノムメチル化パターン解析結果でうつ病患者でより高度にメチル化されている染色体領域を抽出し、その領域に含まれる神経細胞と関わりあいの深い遺伝子を University of California, Santa Cruz (UCSC) genome browser と Genbank を利用して探索し、目的の遺伝子のプロモーター領域(転写開始点上流 800 ~ 1000bp)のシーケンスを同じく UCSC genome browser と Genbank から得る。末梢血からの genomic DNA の抽出は、DNeasy (Qiagen)と QIAcube (Qiagen)を用いて行う。その後の DNA メチル化解析は、SEQUENOM 社の MassARRAY System を用いて行う。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う。前述した方法で得た遺伝子のプロモーター領域に存在する各 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 を行い、in vitro transcription を施行する。U 特異的切断後、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取得する。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う。今回のターゲットはセロトニントランスポーター（5-HTT）の発現調節領域である SLC6A4 の CpG アイランドとした。

4. 研究成果

課題 1

ウエスタンブロット法で定量することを当初予定していたが、検出能に限界があることが判明した。そこで市販 ELISA は検出感度が悪く、サンプルの約 30%が測定不可であったが、北里大学高橋正身先生らが独自に開発した ELISA 法を用いたところ同割合を約 5%にまで向上させることに成功した。健常者血液を用いて、血清中 pro-BDNF 測定条件検討を進め、最適条件を決定した。健常者 20 名、うつ病患者 5 名について血清 pro-BDNF 濃度測定を行ったところ、健常者とうつ病患者に統計的に有意な差は見られなかった。

課題 2

白血球由来 BDNF アンチセンス RNA 濃度を real-time PCR で測定する最適条件を決定した。健常者 5 名について白血球由来 BDNF アンチセンス RNA 濃度を測定した。しかし、うつ病患者群の測定は研究期間内に行うことは時間的に困難であった。今後の研究課題となった。

課題 3

健常者群 50 名とうつ病患者群 50 名で SLC6A4 の CpG アイランド群のメチル化率を比較したところ、疾患でのみ比較しただけでは有意差は得られなかった。しかし、疾患群のうち抗うつ薬に治療反応が良好であった群を抽出すると、特定の CpG アイランド有意差が得られた。これは、疾患バイオマーカーとはなり得ないが、治療反応性のマーカーとして期待できる可能性がある結果であった。

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

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Masahiro Segawa, The potential of DNA methylation of the SLC6A4 gene and the HTR2C gene as the objective evaluation method for severity of symptoms of major depression. XXIst World Congress of Psychiatric Genetics 2013 Oct.17-21 in Boston, USA

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬川 昌弘 (SEGAWA MASAHIRO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院

特任助教

研究者番号：20457253