

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461731

研究課題名(和文) 脳脊髄液中のマイクロRNAを用いた精神疾患バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of cerebrospinal fluid miRNA marker for psychiatric disorders

研究代表者

服部 功太郎 (Hattori, Kotaro)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長

研究者番号：50415569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、うつ病など精神疾患の脳脊髄液中マイクロRNAバイオマーカーの開発を目指した。収集済みの精神疾患脳脊髄液と、うつ病、統合失調症、双極性障害、健常対照合計106例のマイクロアレイ測定結果から候補分子を選択し定量PCRによる検証を試みた。アレイの結果から延べ193分子を選択したが、定量PCRによる解析により定量性の確保できる分子は限られることが明らかとなり、実用性の観点等から40分子に絞り込んだ。その中には、うつ病の一部で顕著に亢進しているmiR-3620-5pや重症度と相関するmiR-1908などが含まれていた。今後、亜型分類マーカーを中心とした実用化を目指したい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop microRNA biomarkers in cerebrospinal fluid for psychiatric disorders including schizophrenia and depression. Using cerebrospinal fluid microarray analyses data of total 116 cases including schizophrenia, depression, bipolar disorder and healthy controls, we selected 193 candidate molecules. We then performed quantitative PCR analyses on a part of candidate molecules, and found that only a part of those molecules with high expression levels could be measured with certain precision. Thus, from the viewpoint of practicality, we narrowed the candidate marker to 40 molecules. Among those molecules, miR-3620-5p, was markedly increased in a subpopulation of depression, whereas miR-1908 was significantly correlated with depressive symptoms. Future studies are warranted to verify those candidate markers, especially to develop new classification and treatment for psychiatric disorders.

研究分野：分子精神医学

キーワード：バイオマーカー 精神疾患 脳脊髄液 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 統合失調症、うつ病をはじめとする精神疾患の臨床分子マーカーの探索には血液が主に用いられてきた。うつ病のサイトカインや神経栄養因子など、いくつかの候補は提案されているものの現在までのところ実用的な分子マーカーはみつかっていない。

この大きな要因として、血液は多くの臓器を循環し、それらの影響を受けること、脳との間には血液脳関門が存在し分子の交流が阻害されることが挙げられる。すなわち、血液は”雑音”が大きく、脳の状態を反映しにくい。そこで、我々は脳脊髄液(CSF)に着目した。近年 CSF は大半が脈絡叢ではなく脳の実質より産生されること、脳の細胞と脳脊髄液の間には障壁が事実上存在しないことが判明し、最も脳に近い臨床検体として再注目されている。アルツハイマー病については感度・特異度とも 9 割近い CSF マーカーが開発され 2012 年からは健康保険で認められている。

(2) 我々は 2010 年よりナショナルセンター・バイオバンク事業の支援を受けつつ研究目的の精神疾患脳脊髄液を収集し申請時までに、統合失調症 188、うつ病 107、双極性障害 70、健常対照 110 を含む約 500 検体の脳脊髄液が集まっていた(現在は合計約 950)。検体は採取後、直ちに氷冷し 30 分以内に分注・保存されている。また専属の臨床心理士が簡易構造化診断面接 (MINI)、症状評価 (PANSS, HDRS など)を行い、データベース化もなされている。これらの検体を用いて個々のタンパク質の解析や網羅的な解析を行っていた。

(3) マイクロ RNA(miRNA)は長さ 18~25 塩基の小さな RNA で、他の遺伝子の発現を調節し、脳では神経発生やシナプス機能 (Kolshus ら 2013) に関与すると考えられている。近年、特にがんの領域では miRNA は病態の解析にとどまらず、バイオマーカー

にも応用されており、その高い正確性から、海外では血液でがんを鑑別するサービス (Rosetta Genomics 社)や、生検組織より膵ガンと膵炎を鑑別するキット (Asuragen 社) など、実用化されているものもある。

そこで、我々は申請時までに施設の運営費を利用し、上記 CSF 検体の中から統合失調症 30、うつ病 30、双極性障害 16、健常対照 30 を含む合計 110 検体の CSF を東レ株式会社 (3D Gene, 2019 分子) で委託解析した。

2. 研究の目的

精神疾患の CSF miRNA バイオマーカーを開発することが本研究の目的である。そのために研究開始時までに得られていた統合失調症やうつ病、双極性障害、健常対照合計 110 検体の miRNA 解析結果や臨床データを用いてバイオマーカー候補を選出するとともに、精神疾患 CSF バイオリソースに対してリアルタイム PCR 法などで検証を行いバイオマーカーの実用化を目指した。

3. 研究の方法

(1) miRNA バイオマーカーの選択

研究開始当初に予備的に行っていた候補分子の選択 (健常・疾患群の有意差) だけでなく、詳細な臨床情報を用いた症状評価との関連、健常群データより求めた正常値を逸脱する症例の数、過去の研究報告をもとにした機能的な意義などにより候補分子の再選択を行った。

(2) 定量 PCR 法による検証

得られた候補分子について TaqMan プローブによる定量 PCR 法を用いて検証することを試みた。RNA 抽出はマイクロアレイ解析と同様 Qiagen 社のカラムを用いて行った。定量 PCR は Applied Biosystems 社 7900HT によるリアルタイム PCR 法で行ったが、一部 Thermo Fisher 社の QuantStudio 3D によるデジタル

PCR でも実施した。

4. 研究成果

(1) miRNA バイオマーカーの選択

疾患群・健常対照群の平均値の有意差だけでなく、健常対照群より正常域を算出し、正常範囲からの逸脱症例数、HAM-D, PANSS などそれぞれの疾患の重症度との相関、分子の機能的意義などから選択を行い、最終的に統合失調症マーカー 45 分子、うつ病マーカー 97 分子を含む合計 193 分子を選択し、特許を申請した。

その中には図 1 のように、うつ病の一部症例で異常高値を示した分子や、図 2 のように、うつ病の重症度 (HAM-D スコア) と相関していた分子、図 3 のように統合失調症、うつ病、双極性障害、3 つの疾患において一部症例で異常低値を示した分子などが含まれていた。

図 1 うつ病の一部症例で異常高値を示した分子。

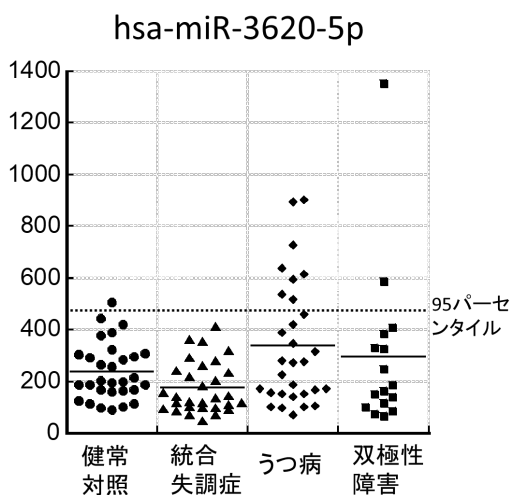


図 2 うつ病の重症度と相関していた分子

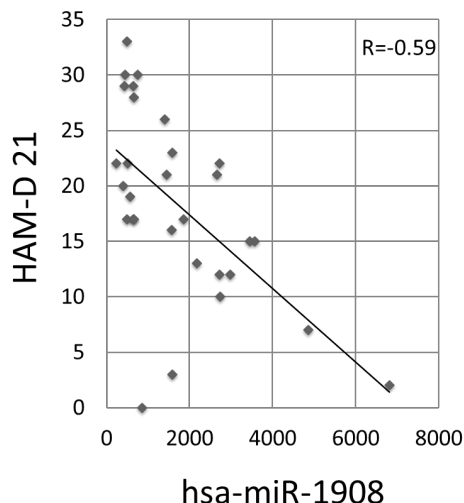
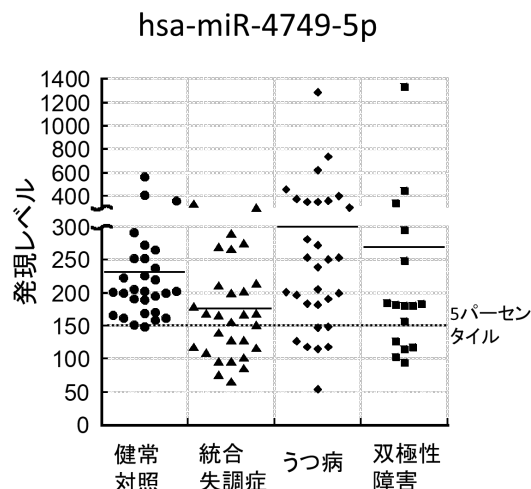


図 3 統合失調症、うつ病、双極性障害各々の一部で異常低値を示した分子



うつ病や統合失調症などは症候群類似の疾患分類であり、複数の病態が含まれていると想定される。図 1 や図 3 のようなマーカーは、それぞれの垂型を反映している可能性がある。また、図 2 のようなマーカーは重症度を反映するマーカーや治療標的として用いることができる可能性があると考えられた。

(2) 定量 PCR による検証

まず、リアルタイム PCR 法による検証を試みた。内在性コントロール (RNU44, 28) や比較的高発現が見込まれる候補分子 (mir-24)、低発現が見込まれる候補 (mir-4513) を中心に TaqMan microRNA

assay にて解析を行った。通常のプロトコールでは比較的高発現と見込まれる RNAU44 や mir-24 であっても CT 値 35 以上であった。CT 値 25-30 以下でないと必要な定量性(変動係数概ね 20%以下)は確保できないことが分かったため、RNA 抽出、逆転写反応や PCR 反応系の改良を試みたが、高発現分子でも CT 値 32 を割ることはできなかった。そこで、より感度と低発現領域での定量性に優れるデジタル PCR を用いた検討を大なった。7つのプローブ(RNU44, 48, miR-24, 659, 4484, 4515, 4749)について条件検討を行い、少なくとも4つのプローブについて測定自体は可能となった。しかし、デジタルPCRにおいても1000 copy 以下では、十分な定量性が確保困難であることが判明した。測定数を増やすことで改善できるがコストや使用試料量の増加などのデメリットがあった。また、10種のプローブで解析により、リアルタイム PCR の CT 値と、マイクロアレイの蛍光強度との間には関連が認められ、デジタル PCR の 1000copy はマイクロアレイの蛍光強度約 400RFU に相当することが判明した。そこで、マイクロアレイの解析結果より健常群の平均蛍光強度が400RFU 以上の分子 40 個を、再現確認可能性の高いマーカーとして選択しなおした。

(3) 血液検査

当初、血液検査でも代用できるか検討するため、血漿を用いた解析も行う予定であった。血液検査であれば、より侵襲が小さく実用性が増すとともに、当センターバイオバンクの保有する精神疾患バイオリソースで検証を行うことができる。しかし、Fibrinogen (Hattori et al., 2015)や G72 (Ishiwata et al., 2017)などを含む複数の分子で CSF と血液での発現レベルに相関が全くみられず、相関が得られる可能性は極めて低いことが予想されたため実施しなかった。

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5件)

Ishiwata S, Hattori K, Sasayama D, Teraishi T, Miyakawa T, Yokota Y, Matsumura R, Yoshida F, Nishikawa T, Kunugi H, Plasma and cerebrospinal fluid G72 protein levels in schizophrenia and major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 査読有、254、2017, pp.244-250. doi: 10.1016/j.psychres.2017.04.060.

Hidese S, Hattori K, Sasayama D, Miyakawa T, Matsumura R, Yokota Y, Ishida I, Matsuo J, Noda T, Yoshida S, Teraishi T, Hori H, Ota M, Kunugi H, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 査読有、76, 2017, pp.12-18. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.02.016.

Fujii T, Hattori K, Miyakawa T, Ohashi Y, Sato H, Kunugi H, Metabolic profile alterations in the postmortem brains of patients with schizophrenia using capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Schizophr Res.* 査読有、183, 2017, pp.70-74, doi: 10.1016/j.schres.2016.11.011.

Sasayama D, Hattori K, Ogawa S, Yokota Y, Matsumura R, Teraishi T, Hori H, Ota M, Yoshida S, Kunugi H. Genome-wide quantitative trait loci mapping of the human cerebrospinal fluid proteome. *Hum Mol Genet.* 査読有、26, 2016, pp.44-51, doi: 10.1093/hmg/ddw366.

Hattori K, Ota M, Sasayama D, Yoshida S, Matsumura R, Miyakawa T, Yokota Y, Yamaguchi S, Noda T, Teraishi T, Hori H, Higuchi T, Kohsaka S, Goto Y, Kunugi H. Increased cerebrospinal fluid fibrinogen in major depressive disorder. Sci Rep. 査読有、2015, 11412. doi: 10.1038/srep11412.

[学会発表](計6件)

Hattori K, Ota M, Kunugi H, Altered protein patterns in cerebrospinal fluid of psychiatric disorders, The International College of Neuropsychopharmacology, ソウル(韓国) 2016/7/3

服部功太郎、篠山大明、太田深秀、宮川友子、横田悠季、松村亮、秀瀬真輔、朽木友紀恵、吉田寿美、功刀浩、うつ病の脳脊髄液バイオマーカーの開発、第13回日本うつ病学会総会、ウインクあいち(名古屋) 2016/8/5

Hattori K, Sasayama D, Hidese S, Miyakawa T, Ota M, Hori H, Yoshida S, Goto Y, Kunugi H, Increased cerebrospinal fluid fibrinogen in major depressive disorder; reconfirmed in larger sample size, 29th European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress, ウィーン(オーストリア) 2016/9/19

服部功太郎、篠山大明、太田深秀、宮川友子、横田悠季、松村亮、吉田寿美子、功刀浩、うつ病における脳脊髄液 fibrinogen 亢進：精神疾患 384 症例を用いた検証、第 38 回生物精神・第 59 神経化学合同大会、福岡国際会議場(福岡) 2016/9/9

服部功太郎、篠山大明、吉田寿美子、功刀浩。精神疾患脳脊髄液バイオマーカーの

構築とバイオマーカーの探索。第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会, 2015/9/25, 東京

Hattori K, Yoshida S, Goto Y, Kunugi H. Collection of cerebrospinal fluid bioresource and multiple omics approaches to psychiatric disorders. 第 38 回 日本神経科学大会, 2015/7/28-31, 神戸

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：miRNA を用いた精神疾患判定マーカー
発明者：服部功太郎、功刀浩、後藤雄一、高坂新一

権利者：国立精神・神経医療研究センター
種類：特許

番号：PCT/JP2016/51504

出願年月日：2016年1月27日

国内外の別：国内、国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 功太郎 (HATTORI, Kotaro)

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長

研究者番号：50415569

(4) 研究協力者

朽木 友紀恵 (KUCHIKI, Yukie)