

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860946

研究課題名(和文) 気分障害におけるサイトカイン上昇の分子機構及びその精神症候学的検討

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism for and psychiatric symptoms due to elevation of inflammatory cytokines in mood disorders.

研究代表者

小林 伸行 (KOBAYASHI, Nobuyuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20385321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、うつ病で炎症性サイトカインが上昇する機序やそれによる臨床症状の特徴を明らかにすることを目的に、うつ病患者による臨床的検討及び動物モデルによる検討を行った。

しかし、本研究の結果、うつ病患者では健常人と比較し、血液中炎症性サイトカインに有意な差を認めなかった。一方、酸化ストレスマーカーの上昇を認めた。

ほぼ全てのヒトに潜伏感染しているヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6)の潜伏感染であるSITH-1を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。このTgマウスは野生型マウスと比較し、うつ様行動を示した。しかし、SITH-1と炎症性サイトカイン上昇との関連は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to clarify the mechanism for the elevation of inflammatory cytokines, and the psychiatric symptoms produced by it, in major depressive disorder (MDD) through clinical investigation and the use of an animal model.

However, in this study there were no significant differences in inflammatory cytokines between MDD patients and normal controls (NC). On the other hand, the oxidative stress marker was more elevated in MDD patients than NC.

Transgenic (Tg) mice with regulated expression of SITH-1 (the latent protein of human herpesvirus 6) were prepared. Although the Tg mice showed depressive-like behavior compared to wild-type mice, there was no significant association between SITH-1 and the inflammatory cytokine.

研究分野：精神神経科学

キーワード：うつ病 気分障害 サイトカイン 酸化ストレス 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

気分障害において炎症性サイトカインの上昇が報告されているが、その上昇の原因や脳への影響は明らかではない。本研究ではサイトカイン上昇を来す要因として脳での持続・潜伏感染に関連するヒトヘルペスウイルス(HHV)に着目した。

我々はアルツハイマー病で単純ヘルペスウイルス(HSV)1型に対して、気分障害ではHHV-6に対して、異常な免疫反応が生じていることを見出した。とくに、うつ病患者では高率にHHV-6の潜伏感染タンパクであるSmall protein encoded by the intermediate stage transcript of HHV-6 1 (SITH-1)に対する抗体を持つことを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、気分障害とくにうつ病患者でヘルペスウイルスとサイトカイン誘導との関連、サイトカインと気分障害の精神症候学的特徴との関連を検討し、気分障害の発症機構の糸口を得ることを目的とした。

具体的には、うつ病患者による臨床的検討とSITH-1を発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを用いた検討を行った。

3. 研究の方法

【倫理的配慮】

本研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会並びに動物実験委員会の承認を得て行った。対象となる被験者に本研究内容を説明し、署名による同意を得た。

【対象】

東京慈恵会医科大学附属病院及び同柏病院精神神経科に通院または入院中の年齢が65歳未満のうつ病患者(MDD)36名を対象とした。なお、知的能力障害がある者は除外した。対照として、東京慈恵会医科大学附属柏病院及びあいらの森ホスピタル(旧栗野病院)に勤務する職員(NC)30名を対象とした。

うつ症状は自記式であるベック抑うつ質問票(Beck Depression Inventory, BDI)及びMontgomery Åsberg Depression Rating Scale (MADRS)によって評価した。MADRS合計点7点以上をうつ症状有り群(MDD-C)、7点未満を寛解群(MDD-R)とした。また、NC群でBDI合計点が17点以上の者は除外した。

【唾液中HHV-6量】

採取した唾液400µLから、BioRobot EZ1 workstation (QIAGEN)及びEZ1 virus mini kit v2.0 (QIAGEN)を利用して、ウイルスDNAを抽出した。7300 real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を利用して、唾液中HHV-6 DNA量をリアルタイムPCR法にて定量した。

【ヒトの遺伝子発現】

PAXgene Blood RNA 採血管を用いて、採血し、PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN)を使用して、RNAを抽出した。さらに、PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio)でcDNAを合成

し、QuantStudio 12K Flex real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を利用して、リアルタイムPCR法にてmRNA量を定量した。

【Tgマウス】

Cre-loxPシステムを用いた、SITH-1発現を制御可能なTg C57BL/6Jマウスを作製した。オスのヘテロマウスとメスの野生型マウス(C57BL/6NcrSlc)を交配させ、生まれた仔マウス脳に、出生後24時間以内でアデノウイルスベクターを用いて、Glial fibrillary acidic protein (GFAP)プロモーター制御のCreを発現させた。成長後、5週齢のオスについて、微懸垂テストを10分間行った。その映像を記録し、TailSuspScan(Clever Sys)により、無動時間を解析した。尾懸垂テスト後にマウスを安楽死させ、脳を採取した。

【マウスの遺伝子型判定】

脳からAllPrep DNA/RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて、DNA及びRNAを抽出した。DNAを鋳型にTgマウスのもつloxP配列の外側にプライマーを設計し、PCRを行った。PCR増幅産物を電気泳動し、増幅の有無により遺伝子型を判定した。

【マウスの遺伝子発現】

精製したRNAを用いて、PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio)でcDNAを合成し、7300 real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を利用して、リアルタイムPCR法にてmRNA量を定量した。

4. 研究成果

【被験者背景】

被験者の臨床的背景を表1に示した。

表1. 被験者背景

	健常人 (n = 30)	うつ病 (n = 36)	P
年齢	44.9 ± 2.1	46.2 ± 1.8	0.646
女性: 男性 (%)	53.3 : 46.7	30.6 : 69.4	0.061
BMI	23.6 ± 0.7	24.3 ± 0.7	0.481
罹病期間 (年)	-	6.8 ± 0.9	-
BDI 合計点	3.9 ± 0.6	14.9 ± 1.9	0.000
MADRS 合計点	-	13.8 ± 1.9	-

性差はカイ二乗検定、その他はWelchのt検定によって解析した。値は平均 ± 標準誤差。

【唾液中HHV-6 DNA量】

MDDではNCと比較し、有意に唾液中HHV-6 DNA量が高かった(図1A)。さらに、NCと比較し、うつ症状が寛解した群(MDD-R)では有意な差はなく、うつ症状を認める群(MDD-C)で唾液中HHV-6 DNA量が高かった(図1B)。

これらの解析は我々が以前報告した内容¹⁾と異なるが、解析数が増えたこと、NC群の集団としての特性の差異が結果に影響することが要因として考えられた。

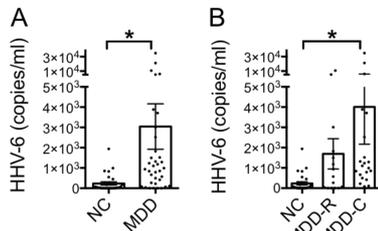


図1. うつ病患者における唾液中HHV-6量
* $P < 0.05$, 2群の比較はWelchのt検定、3群の比較は一元配置分散分析、Dunnettの検定によって解析した。値は平均±標準誤差。

【うつ病における炎症性サイトカイン、酸化ストレス関連因子のmRNA発現量】

MDDではNCと比較し、炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL-)1及びIL-6 mRNAに差はなかったが、有意に酸化ストレスマーカーであるHMOX1 mRNAが高かった。また、HMOX1 mRNAはうつ症状寛解群(MDD-R)でNCと比較し、有意に高かった(図2A-F)。

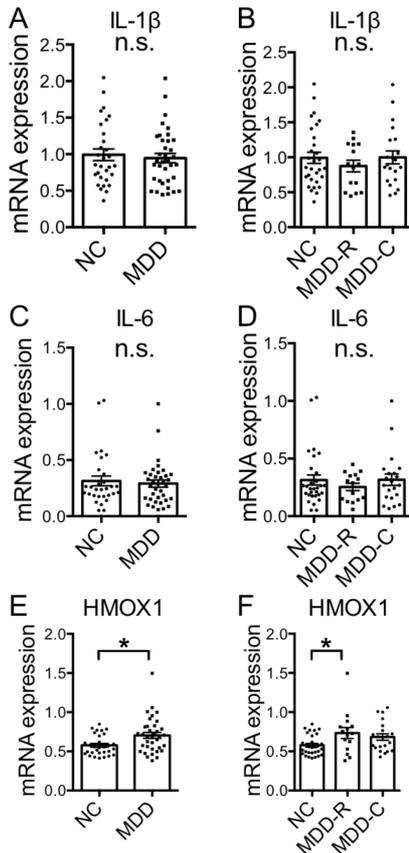


図2. うつ病患者における炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカーの変化
* $P < 0.05$, 2群の比較はWelchのt検定、3群の比較は一元配置分散分析、Dunnettの検定によって解析した。値は平均±標準誤差。

【SITH-1発現Tgマウスのうつ様行動変化】

SITH-1をアストロサイト特異的に発現させたTgマウスでは野生型(Wt)と比較し、尾懸垂テストにおける無動時間が有意に延長した(図3A)。また、脳のIL-1 mRNAはTg

マウスと野生型(Wt)で有意な差を認めなかった(図3B)。ただし、未だ全ての解析を終えていない結果である。

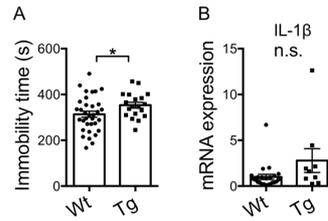


図3 SITH-1発現Tgマウスにおけるうつ様行動変化とIL-1 mRNA発現

* $P < 0.05$, 2群の比較はWelchのt検定によって解析した。Wt: $n = 34$, Tg: $n = 19$ (A)。Wt: $n = 23$, Tg: $n = 9$ (B)。値は平均±標準誤差。

【考察】

本研究の結果、大うつ病患者では酸化ストレスが亢進していた。また、酸化ストレスの亢進はうつ症状が寛解した群でも認めていた。そのため、酸化ストレスの亢進はうつ症状の有無によらない、うつ病のtraitマーカーとなることが示唆された。

一方、今までの大うつ病患者における検討で炎症性サイトカインが上昇する報告があるが、本研究では再現できなかった。この理由として、血液中の炎症性サイトカインは血液由来ではない可能性があること、大うつ病がヘテロな集団であること、重症度による違い、炎症性サイトカインが運動等そのほかの要因によって変化することが考えられた。

以上のことから、酸化ストレスマーカーは炎症性サイトカインの測定よりもうつ病に対して、鋭敏なバイオマーカーとなることが示唆された。

また、HHV-6の潜伏感染タンパクであるSITH-1はマウスにうつ様行動を引き起こした。SITH-1発現と炎症性サイトカイン産生の関連の検討は今後の課題である。

<引用文献>

1) . Aoki R, Kobayashi N, Suzuki G, et al. Human herpesvirus 6 and 7 are biomarkers for fatigue, which distinguish between physiological fatigue and pathological fatigue. Biochemical and biophysical research communications 2016;478(1): 424-30.

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計11件)

Tamai M, Kobayashi N, Shimada K, Oka N, Takahashi M, Tanuma A, Tanemoto T, Namba H, Saito Y, Wada Y, Okamoto A, Ida H, Kondo K. Increased interleukin-1beta and basic fibroblast growth factor levels in

the cerebrospinal fluid during human herpesvirus-6B (HHV-6B) encephalitis. *Biochemical and biophysical research communications* 2017;486(3): 706-11. 査読有, doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.102
Kobayashi N, Shinagawa S, Nagata T, Shimada K, Shibata N, Ohnuma T, Kasanuki K, Arai H, Yamada H, Nakayama K, Kondo K. Usefulness of DNA Methylation Levels in COASY and SPINT1 Gene Promoter Regions as Biomarkers in Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PLoS One* 2016;11(12): e0168816. 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0168816
Takeshita Y, Shibata N, Kasanuki K, Nagata T, Shinagawa S, Kobayashi N, Ohnuma T, Suzuki A, Kawai E, Takayama T, Nishioka K, Motoi Y, Hattori N, Nakayama K, Yamada H, Arai H. Genetic association between RAGE polymorphisms and Alzheimer's disease and Lewy body dementias in a Japanese cohort: a case-control study. *Int J Geriatr Psychiatry* 2016. 査読有, doi:10.1002/gps.4600
Aoki R, Kobayashi N, Suzuki G, Kuratsune H, Shimada K, Oka N, Takahashi M, Yamadera W, Iwashita M, Tokuno S, Nibuya M, Tanichi M, Mukai Y, Mitani K, Kondo K, Ito H, Nakayama K. Human herpesvirus 6 and 7 are biomarkers for fatigue, which distinguish between physiological fatigue and pathological fatigue. *Biochemical and biophysical research communications* 2016;478(1): 424-30. 査読有, doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.010
Shinagawa S, Kobayashi N, Nagata T, Kusaka A, Yamada H, Kondo K, Nakayama K. DNA methylation in the NCAPH2/LMF2 promoter region is associated with hippocampal atrophy in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment patients. *Neurosci Lett* 2016;629: 33-37. 査読有, doi:10.1016/j.neulet.2016.06.055
Osaki T, Morikawa T, Kajita H, Kobayashi N, Kondo K, Maeda K. Caregiver burden and fatigue in caregivers of people with dementia: Measuring human herpesvirus (HHV)-6 and -7 DNA levels in saliva. *Arch Gerontol Geriatr* 2016;66: 42-48. 査読有, doi:10.1016/j.archger.2016.04.015
Suzuki A, Shibata N, Kasanuki K,

Nagata T, Shinagawa S, Kobayashi N, Ohnuma T, Takeshita Y, Kawai E, Takayama T, Nishioka K, Motoi Y, Hattori N, Nakayama K, Yamada H, Arai H. Genetic Association between Presenilin 2 Polymorphisms and Alzheimer's Disease and Dementia of Lewy Body Type in a Japanese Population. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra* 2016;6(1): 90-7. 査読有, doi:10.1159/000444080
Kobayashi N, Shinagawa S, Nagata T, Shimada K, Shibata N, Ohnuma T, Kasanuki K, Arai H, Yamada H, Nakayama K, Kondo K. Development of Biomarkers Based on DNA Methylation in the NCAPH2/LMF2 Promoter Region for Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PLoS One* 2016;11(1): e0146449. 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0146449
小林伸行, 近藤一博. 【透析患者の疲労感】疲労研究の最前線 疲労の尺度と疾病(解説/特集). *臨床透析* 2015;31 巻(12号): 1447-52. 査読無
永田智行, 品川俊一郎, 小林伸行, 中山和彦. 【精神神経疾患のゲノム研究: 失われた遺伝率の謎を求めて】アルツハイマー病におけるゲノミクスでわかったこと. *臨床精神医学* 2015;44 巻(10号): 1385-92. 査読無
Nagata T, Kobayashi N, Ishii J, Shinagawa S, Nakayama R, Shibata N, Kuerban B, Ohnuma T, Kondo K, Arai H, Yamada H, Nakayama K. Association between DNA Methylation of the BDNF Promoter Region and Clinical Presentation in Alzheimer's Disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra* 2015;5(1): 64-73. 査読有, doi:10.1159/000375367

〔学会発表〕(計 11 件)

小林伸行, 品川俊一郎, 永田智行, 嶋田和也, 柴田展人, 大沼徹, 笠貫浩史, 新井平伊, 繁田雅弘, 近藤一博. さまざまな変性性認知症疾患における DNA メチル化変化とその臨床的意義の検討. 第 36 回日本認知症学会. 金沢. 2017 年 11 月 25 日
小林伸行, 岡直美, 高橋麻弓, 嶋田和也, 近藤一博. 疲労を引き起こす分子メカニズムの解明. 第 134 回成医会. 東京. 2017 年 10 月 12 日
小林伸行, 岡直美, 高橋麻弓, 玉井将人, 嶋田和也, 近藤一博. 分子機構から明らかにする疲労とストレスとの相違に関する検討. 第 13 回日本疲労学会. 名古屋. 2017 年 5 月 27 日

Kobayashi N, Aoki R, Kuratsune H, Oka N, Takahashi M, Shimada K, Yamadera W, Iwashita M, Ito H, Nakayama K, Kondo K. Human herpesvirus 6 (HHV-6) and HHV-7 reactivation in fatigue, which distinguishes between physiological fatigue and pathological fatigue. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Sapporo. 2016年10月24日.

小林伸行, 品川俊一郎, 永田智行, 嶋田和也, 柴田展人, 大沼徹, 笠貫浩史, 新井平伊, 山田尚, 中山和彦, 近藤一博. 血液中DNAメチル化変化を利用したアルツハイマー病と軽度認知機能障害の新規診断法に関する検討. 第31回日本老年精神医学会. 金沢. 2016年6月23日

小林伸行, 青木亮, 岡直美, 高橋麻弓, 嶋田和也, 玉井将人, 山寺亘, 岩下正幸, 倉恒弘彦, 伊藤洋, 中山和彦, 近藤一博. 唾液中ヒトヘルペスウイルス(HHV-6)及びHHV-7量による病的疲労と生理的疲労との鑑別に関する検討. 第12回日本疲労学会. 横浜. 2016年5月20日

小林伸行, 青木亮, 嶋田和也, 玉井将人, 山寺亘, 岩下正幸, 伊藤洋, 中山和彦, 近藤一博. 睡眠時無呼吸症候群を対象とした, HHV-6, HHV-7の再活性化メカニズムの検討. 第63回日本ウイルス学会. 福岡. 2015年11月23日

小林伸行, 嶋田和也, 岡直美, 玉井将人, 近藤一博. 疲労・ストレスによるヒトヘルペスウイルス6の再活性化機構の検討. 第62回日本ウイルス学会. 横浜. 2014年11月10日

Kobayashi N, Oka N, Shimada K, Kondo K. Novel human herpesvirus 6 stress-related latent protein induces depression and suicide. The 39th Annual International Herpesvirus Workshop 2014. Kobe. 2014年07月20日

Oka N, Kobayashi N, Shimada K, Kondo K. Molecular mechanism of depressive disorder caused by HHV-6 latent infection. The 39th Annual International Herpesvirus Workshop 2014. Kobe. 2014年07月19日-2014年07月20日

小林伸行, 岡直美, 嶋田和也, 鈴木豪, 徳野慎一, 丹生谷正史, 三谷圭司, 小原健幸, 山本哲生, 向井保雄, 清水邦夫, 丸山徹, 立花正一, 妻鳥元太郎, 倉恒弘彦, 杉野友啓, 梶本修身, 渡辺恭良, 近藤一博. 唾液中ヒトヘルペスウイルス量変化を利用した客観的疲労評価法による, 生理的疲労と慢性疲労

症候群との鑑別. 第10回日本疲労学会. 大阪. 2014年05月31日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 伸行 (KOBAYASHI, Nobuyuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20385321