

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19758

研究課題名(和文) うつ病患者の血清及び脳脊髄液中におけるリゾホスファチジン酸の定量解析

研究課題名(英文) Quantitative analysis of lysophosphatidic acid (LPA) in serum and cerebrospinal fluid of depressed patients

研究代表者

後藤 玲央 (GOTOH, LEO)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：70625194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リゾホスファチジン酸(LPA)は情動や抗うつ薬治療と深く関連している。本研究では、LPAの大うつ病バイオマーカーとしての臨床応用可能性検討のため、未治療患者を含む大うつ病患者群26例、統合失調症患者群27例、健常対照群27例の脳脊髄液と血漿サンプルのLPA濃度を調べた。その結果、脳脊髄液中のLPA濃度は未服薬のうつ病患者群で上昇し、抗うつ薬服薬量の増加とともに減少する傾向が示された。この結果は、動物実験から示唆されたうつ病の治療に伴いLPAシグナル伝達系が減弱するという事実に添うものであった。今後はLC-MSのような検出力と分解能のより高い測定手法による研究の進展が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) is a physiologically active substance closely related to emotion and antidepressant drug treatment. In this study, in order to examine the possibility of clinical application of LPA as a major depressive biomarker, the LPA concentrations of spinal fluid samples and plasma samples were examined with 26 cases of major depression patients and 27 cases of schizophrenia patients including untreated patients and 27 cases of healthy controls. As a result, the LPA concentration in cerebrospinal fluid increased in unmedicated depressed patients, and it tended to decrease with increasing antidepressant medication dosage. This result was consistent with the fact that the LPA signaling system attenuates with treatment of depression suggested from animal studies. In the future, it is thought that progress of research by a measuring method with higher detection power and resolution like LC-MS is necessary.

研究分野：精神薬理

キーワード：リゾホスファチジン酸 ELISA バイオマーカー うつ病

1. 研究開始当初の背景

近年、うつ病患者数は増加傾向にあり、社会的損失が大きいことから極めて重要な健康問題となっている。2000年代ごろより抗うつ薬として広く使用されている SSRI は服薬を始めてから薬効が現れるまでに 2 週間程度の時間が必要となる。この 2 週間に起こる脳内の変化を同定し、その機構を解明することは即効性の抗うつ薬の開発に重要な示唆を与えることが予想されるため、当研究部では代表的な抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の慢性投与を行ったマウスの脳内で発現変化する遺伝子を探索した。その結果、ROCK, LIMK2, cofilin, rhotekin などリゾホスファチジン酸 (LPA) シグナル伝達系の下流遺伝子や、LPA の機能を調節する *Prg1* の発現が変化していることが確認された (Yamada, 2002)。また、LPA1 受容体ノックアウトマウスでは、情動行動の異常等が報告されている (Harrison, 2003)。そこで、当研究部では、LPA シグナル伝達系と情動行動の関連について検討するため、マウス脳室内に LPA を投与し情動行動の変化を観察した (Yamada, 2014)。その結果、LPA による脳への直接刺激により不安を惹起することが示された。また、その行動変化は拮抗薬の併用で消失し、LPA による不安惹起は LPA 受容体を介することが示された。このように、LPA は情動や抗うつ薬治療と深く関連する生理活性物質であり、申請者はバイオマーカーとして応用できるのではないかと考えた。

これまでに、先端的なオミックス技術を用いたうつ病のバイオマーカー探索も複数実施されている。しかし、LPA は脂質メディエーターであるため、遺伝子やタンパク質を対象とする探索では対象とされてこなかった。一方、がん組織で LPA の発現が上昇する知見を基に、腹水中 LPA 濃度を卵巣癌の診断マーカーとして利用する研究などが行われている (Sedláková, 2011)。

そこで申請者は、LPA のバイオマーカーとしての臨床応用可能性を検証するため、国立精神・神経医療研究センターの NCNP バイオバンクで収集されたうつ病患者の血漿及び脳脊髄液中の LPA 量を測定し、比較・検討する本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、血漿及び脳脊髄液中の LPA に焦点を当て、うつ病のバイオマーカーとしての臨床応用可能性を検討する。実験動物を用いた先行研究より、血漿及び脳脊髄液中の LPA 量は抗うつ薬投与の影響を強く受ける可能性が高いと考えられる。本研究は段階的に進めることを予定していた。まず、1) ケースコントロール研究 (未治療重症うつ病患者と健常対照者の 2 群比較) を行い、効率よく必要な知見を集積する。次に、2) 幅の広い重症

度の未治療患者サンプルを用いた検討を行い、診断マーカー、重症度マーカーとしての応用可能性の検討を進める。3) 未治療うつ病患者の抗うつ薬治療開始後の時系列サンプルを用いた検討を実施し、同一患者内での重症度マーカーとしての応用可能性の検討を進めるとともに、抗うつ薬投与の影響を明らかにする。さらに、4) 他の精神疾患患者のサンプルを用いた検討を行うことで疾患特異性の検討に資する知見を得る。これらの知見は、LPA のバイオマーカーとしての妥当性を検討するための更なる臨床試験の立案を可能とするものである。

3. 研究の方法

本研究では、血漿及び脳脊髄液中の LPA に焦点を当て、うつ病のバイオマーカーとしての応用可能性を検討した。前述のとおり、第 1 ステップとして、1) ケースコントロール研究 (未治療重症うつ病患者と健常対照者の 2 群比較) を行う。次に、2) 幅の広い重症度の未治療患者サンプルを用いた検討を行った。

【研究デザインとサイズ設定の根拠】

本研究の計画立案時は、ケースコントロール研究として、年齢と性別をマッチさせた未治療うつ病患者と健常対照者の 2 群、各 13 名の血漿及び脳脊髄液中の LPA 濃度を定量解析することを目的としていた。しかし、NCNP バイオバンクから幅広い重症度の患者が含まれている大うつ病患者群 26 例 (うち 4 例が未治療)、統合失調症患者群 27 例 (うち 3 例が未治療)、健常対照群 27 例からなるプレ解析用サンプル群の CSF および血漿サンプルの提供を受けることができたため、予定より多くのサンプルを対象とする解析が可能となった。

【うつ病患者の選択基準】

大うつ病エピソードの基準 (DSM-IV) を満たす者で、重症身体疾患 (重篤な検査値異常等) や物質関連障害、統合失調症等を合併する者は除外した。

【健常対照者の選択基準】

NCNP バイオバンクの基準に従った

【LPA 量を比較する生体サンプルの種類】

血漿及び脳脊髄液 (NCNP バイオバンクが収集し提供するサンプルのみを用いた)

【LPA 量の測定方法】

LPA 量の測定には、Echelon 社製の ELISA Kit (LPA Assay Kit II) を使用した。申請者らは、予備的研究としてラット脳脊髄液中の LPA 濃度の測定を既に行っており、ヒトサンプルでの実験にも十分に利用可能であることを確認している (図 2)。

【発生した問題とその対応】

ELISA 法による LPA 量の測定は、確立していたが、ヒトサンプル中の LPA 濃度は非常に低かった。そのため測定の正確性を高めるために検量線作成のための標準サンプルの分布を低濃度域に集中した。

本研究は、国立精神・神経医療研究センタ

一 (NCNP) 倫理委員会で承認された研究計画に従い、全ての ELISA 実験は NCNP 精神保健研究所精神薬理研究部で実施された。

4. 研究成果

平成 28 年度は平成 27 年度に引き続き、ELISA 法によるヒト脳脊髄液および血漿サンプル中の LPA 濃度の測定手法を用いて、NCNP バイオバンクから提供を受けた幅広い重症度の患者が含まれている大うつ病患者群 26 例 (うち 4 例が未治療)、統合失調症患者群 27 例 (うち 3 例が未治療)、健常対照群 27 例からなるプレ解析用サンプル群の脳脊髄液および血漿サンプルの定量解析を行った。平成 27 年度および平成 28 年度に行った実験の結果、単純な診断毎の比較では血漿および CSF 中の LPA 濃度に差は見られなかった (図 1)。つぎに大うつ病の重症度を示す 17item HAM-D スコアと LPA 濃度の相関について調べたが相関は見られなかった (図 2)。

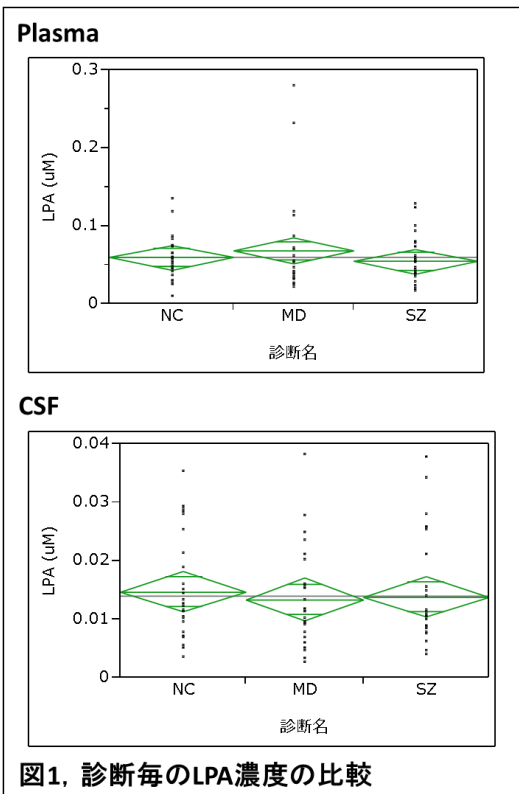


図1. 診断毎のLPA濃度の比較

先行研究の結果から、生体サンプル中の LPA の濃度は投薬の影響を受けることが予想される。このことから、今回の診断毎の LPA 濃度の比較は投薬の影響により真の結果がマスクされている可能性が予想された。そこで、大うつ病患者群を抗うつ薬による投薬治療を受けている群と未治療群に分け比較を行った。その結果、脳脊髄液中の LPA 濃度の平均値は未服薬のうつ病患者群において服薬中のうつ病患者および健常対照群に比べ有意に高く、血漿中においても、有意差こそ得られなかったが同様の傾向が見られた (図 3)。

更に、うつ病患者群の抗うつ薬服薬量を薬剤の力価を元にしたイミプラミン換算を行い、

LPA 濃度との相関を調べたところ、服薬量の増加に合わせ LPA 濃度が低下する傾向が示された (図 4)。

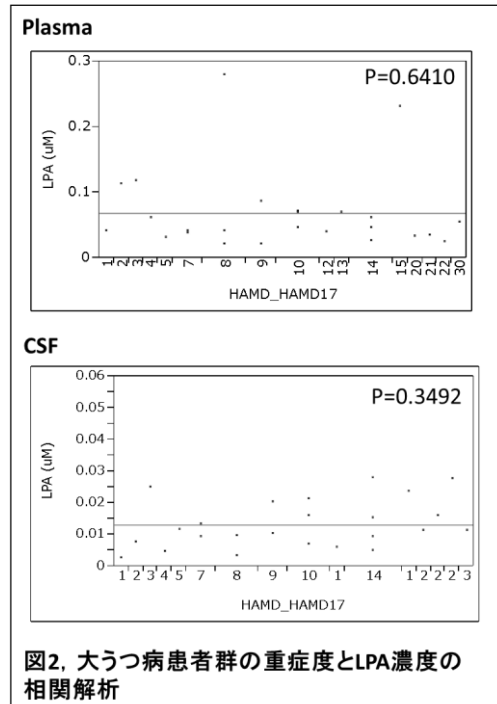


図2. 大うつ病患者群の重症度とLPA濃度の相関解析

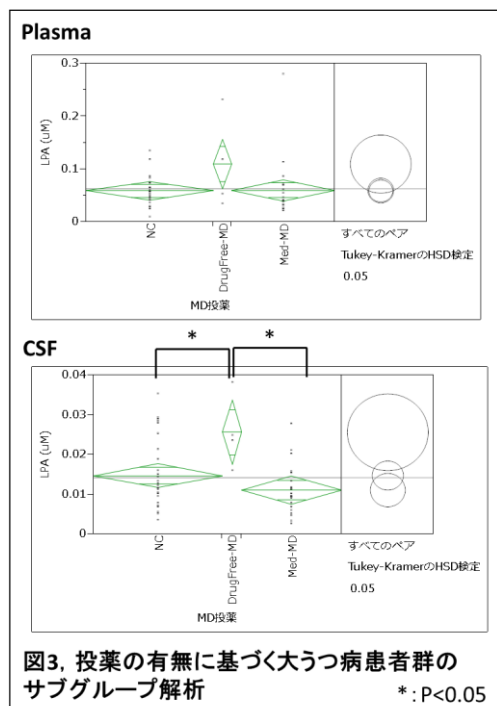


図3. 投薬の有無に基づく大うつ病患者群のサブグループ解析 * : $P < 0.05$

投薬治療の進行とともに脳脊髄液中の LPA 濃度が減少することを示すこの結果は、NCNP 精神保健研究所精神薬理研究部において行われた過去の動物実験により示唆されたうつ病の治療に伴い LPA シグナル伝達系が減弱するという事実と一致するものであると考えられる。

また、本研究では広く一般的に実施可能な手法による測定を行うため ELISA 法を使用しているが、ヒトサンプル中の LPA 濃度は非常に低く検出に工夫を必要としたことや、この手法で測定できるのは LPA のサブタイプの一

部であることを考え合わせると、現在の研究段階では LC-MS のような低濃度からの検出とサブタイプの分離が可能な測定手法による調査も必要かもしれない。

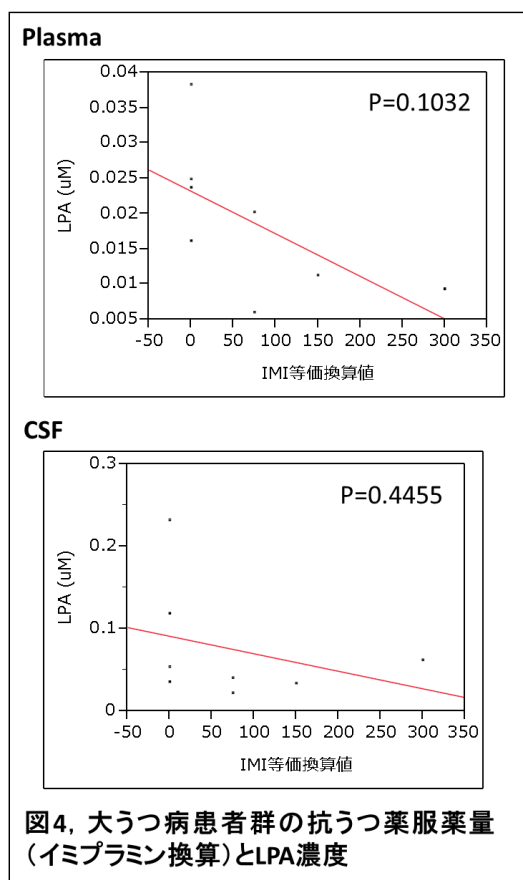


図4. 大うつ病患者群の抗うつ薬服薬量 (イミプラミン換算)とLPA濃度

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 0 件)

現在、投稿作業中

[学会発表] (計 2 件)

1. うつ病バイオマーカーとしてのリゾホスファチジン酸の可能性, 後藤玲央, 山田美佐, 斎藤顕宜, 服部功太郎, 功刀 浩, 樋口輝彦, 川寄弘詔, 山田光彦, 第 13 回日本うつ病学会総会, 2016. 8. 6, 名古屋市
2. うつ病バイオマーカーとしてのリゾホスファチジン酸の可能性, 後藤玲央, 山田美佐, 斎藤顕宜, 服部功太郎, 功刀 浩, 樋口輝彦, 川寄弘詔, 山田光彦, 第 35 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 2016. 11. 5, 山口市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://lgotoh.web.fc2.com/>

後藤玲央の研究者個人ホームページ内の「Thema」に「バイオマーカーの探索」として項目を設け、本研究内容について簡単にまとめた。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 玲央 (GOTOH, Leo)

福岡大学医学部精神医学教室ニューロサイエンス・精神医学研究講座・助教

研究者番号：70625194

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者

- 山田光彦 (YAMADA, Mitsuhiro)
- 斎藤顕宜 (SAITO, Akiyoshi)
- 山田美佐 (YAMADA, Misa)
- 服部功太郎 (HATTORI, Kotaro)
- 功刀 浩 (KUNUGI, Hiroshi)