

令和元年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10189

研究課題名(和文) うつ病マーカーとなる糖タンパク質の同定とマウス脳内における機能解析

研究課題名(英文) Identification of glycoproteins as markers of depression

研究代表者

山形 弘隆 (YAMAGATA, Hiroataka)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10549934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病の診断は、症状の組み合わせから判断する診断法が主流であり、診断できる検査方法は未だ存在しない。本研究では、血漿タンパク質の糖鎖に着目した。糖鎖はタンパク質の機能を調節していることが知られており、癌などの他の疾患では既に診断マーカーとして利用されている。うつ病の新たな診断マーカーを見つけるために、うつ病モデルマウスとうつ病患者の血漿タンパク質の糖鎖を解析し、うつ病モデルマウスの血漿とうつ病患者の血漿で共通する糖鎖変化を見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病患者の血漿タンパク質の糖鎖について調べ、うつ病患者で変化する糖鎖変化を見つけていることが出来た。また、うつ病モデルマウスの血漿タンパク質でも、ストレス負荷を受けたマウスで変化している糖鎖変化を同定できた。今後、さらに詳しく血漿の糖鎖を調べることで、うつ病の診断につながるような検査方法が見つかる可能性がある。また、うつ病モデルマウスの脳内タンパク質の糖鎖を調べることで、うつ病の病態を引き起こす原因となるような糖鎖変化が見つかるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Glycosylation, the addition of a carbohydrate moiety to a protein during biosynthesis, is a common post-translational modification involved in several disease states. Specific protein-glycan structures have been reported to be useful as biomarkers for cancer and some neuropsychiatric disorders; however, the relationship between glycosylation of plasma proteins and major depressive disorder (MDD) has not been studied. This study aimed to determine whether the plasma protein-glycan structure would differ in MDD from typical values, using both a stress-based mouse model and samples from patients with MDD. The glycan structure profile of plasma proteins might represent candidate biomarkers for MDD.

研究分野：精神神経科学

キーワード：うつ病 糖鎖 バイオマーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

うつ病の診断は、ICD10 や DSM-V のような症状の組み合わせから判断する操作的診断法しかなく、客観的な臨床マーカーを用いる検査として臨床応用されているのは、近赤外線分光法 (NIRS: 光トポグラフィー) を用いる先進医療が唯一である。そのため、他の客観的で簡便なバイオマーカーの発見が切に望まれている。山口大学医学部精神科神経科を含む各グループが、構造的画像解析、機能的画像解析、mRNA の発現解析、ゲノムの GWAS 解析などから新規のバイオマーカー検索を行っているが、未だ実用には至っていない。

生体内のタンパク質の約 6 割が糖鎖修飾されており、細胞表面やタンパク質などに存在する糖鎖は、個々の細胞に特異的な情報伝達や細胞間コミュニケーションなどの役割を果たしている。例えば、糖鎖構造の一つであるポリシアル酸が神経細胞接着因子 (NCAM) を修飾することで、脳由来神経栄養因子 (BDNF) やドーパミンと結合することが報告されている (Kanato, Y et al. *Glycobiology* 2008; 18:1044-1053, Isomura, R et al. *J. Biol. Chem.*, 286: 21353-21545, 2011)。このように、糖鎖が付加することで、タンパク質の機能が調節されている。糖鎖は、癌、免疫、受精、血液型などにおいて、重要な役割を果たしていることが解っており、その様々な機能から、近年は各疾患のバイオマーカーとしての検索が盛んに行われている。例えば、臨床的に広く用いられている腫瘍マーカーの CA19-9 は、がん細胞株を用いて作製された抗体によって認識される糖鎖抗原である (Nakayama T et al. *Cancer* 1995;75:2051-6.)。しかし、糖鎖はグルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミンなどが何通りもの結合様式で連結する複雑な構造であり、近年まではその構造を解析する方法は限られていた。しかし、近年の糖鎖解析方法が発達したことで、上述のような客観的なバイオマーカーが存在しないうつ病を扱う精神科領域の臨床研究において研究が進みつつある。例えば、血漿の糖タンパク質と注意欠陥多動性障害や自閉症との関連が報告されており (Pivac, N. et al. *Mol Cell Proteomics* 2011;10: M110 004200)、統合失調症死後脳では、GABA 受容体の糖鎖変化が報告されている (Mueller, T et al. *Neuropsychopharmacology*, 2014 39:528-37)。本研究では、糖鎖変化がうつ病の病態に重要であると予想し、以下のような研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

血漿タンパク質の糖鎖を網羅的に解析し、簡便で低侵襲な新規バイオマーカーの発見をすることで、うつ病の確定診断や治療反応性予測が出来ることが期待される。血漿タンパク質の糖鎖をうつ病患者のうつ病期・寛解期、健常者の 3 群で比較し、うつ病の発病脆弱性素因マーカー、うつ病期特異的な治療反応性マーカーを同定する。うつ病モデルマウスとの比較から、基礎研究に繋がる糖鎖変化を同定することを目的とする。うつ病患者の白血球遺伝子発現解析で、糖鎖形成に関係する遺伝子の発現変化を調べる。また、慢性ストレス負荷うつ病モデルマウスの脳のマイクロアレイ遺伝子発現解析を行い、糖鎖形成関連の遺伝子を調べる。血漿内で見つかった糖タンパク質の脳内機能を調べるため、うつ病モデルマウス脳組織を使って、同定したタンパク質の脳内発現や局在について解析して、マーカー候補の糖タンパク質が神経可塑性やうつ様行動にどのように寄与しているかを明らかにする。

血漿の糖タンパク質からバイオマーカーが同定されれば、低用量の血漿から診断が可能となるため、低侵襲かつ簡便なマーカーとなり、かつ検診などでうつ病のスクリーニングを行うことができ、早期発見・早期治療が可能となる。各薬剤の治療反応予測などへの応用により、治療期間の短縮やうつ病のオーダーメイド治療の実現も期待できる。

3. 研究の方法

山口大学の臨床研究センターに臨床研究申請を行い、承認を得た。アメリカ精神医学会が作成した「精神障害の分類と診断の手引き Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-IV-TR)」に基づいて大うつ病性障害の診断基準を満たした患者を対象とした。診断は臨床診断面接および構造面接 The Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI) により診断した。うつ状態の重症度評価を構造化面接である Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale (SIGH-D) を用いて行い、躁状態は Young Mania Rating Scale (YMRS) で評価する。うつ状態は SIGH-D が 18 点以上と定義した。寛解期については、SIGH-D 8 点以下かつ DSM の「完全寛解」基準に基づき、「過去 2 か月間はつきりした兆候や症状が見られていない」者とした。脳器質性疾患(てんかん、脳性まひなど)がある者や、重篤な内科的疾患をもっている者などは除外した。うつ病患者(うつ病期および寛解期)、健常者から末梢血 40 ml を採取した。全血からの分離白血球より血漿、RNA、ゲノム DNA を精製した。集めたサンプルについては、連結可能匿名化した。レクチンアレイを用いて、血漿糖鎖タンパクに結合するレクチンを網羅的に解析した。精製された RNA サンプルから逆転写 PCR を用いて cDNA を作成し、リアルタイム PCR を用いて糖鎖転移酵素の RNA の発現解析を行った。

独自に研究したうつ病モデルマウス（慢性ストレス負荷 BALB マウス）（Uchida S, et al. *Neuron*. 2011;69(2):359-372.）を非ストレス群、ストレス負荷群、ストレス負荷+抗うつ薬群の3群に分け、各マウスの血液と同一個体の脳から海馬、前頭前野などを単離した。マウス血漿の網羅的な糖鎖解析を行い、うつ患者サンプルの結果と比較した。

4. 研究成果

自に研究したうつ病モデルマウス（慢性ストレス負荷 BALB/c マウス）の血液から、ストレス依存的な糖鎖マーカーを調べることとした。非ストレス群(NS) (n=6)、ストレス負荷群(CUMS) (n=7)、ストレス負荷+抗うつ薬群(CUMS+IMI) (n=7)の3群に分け、各マウスの血液と同一個体の脳から海馬、前頭前野を単離した。レクチンアレイを用いて、マウス血漿の網羅的な糖鎖解析を行ったところ、Agaricus bisporus agglutinin (ABA)、Trichosanthes japonica agglutinin I (TJA-I) に結合するタンパク質がストレス依存的に変化していた。さらに、Maackia amurensis lectin I (MAL_I) に結合するタンパク質が、ストレス+イミプラミン投与で有意に増加していた (Fig. 1)。

次に、うつ病患者 10 名、健常者 10 名の血漿について解析した。うつ病患者については、急性期・寛解期それぞれにおいて血漿サンプルを採取した。デモグラフィックデータを Table 1 に示す。年齢、性別については、健常者とうつ病患者で差はなかった。ハミルトンうつ病スケール (HDSR) と機能の全体的評価 (GAF) で、うつ病期うつ病患者は健常者や寛解期の患者と比べて有意な差が認められた。

レクチンアレイを用いて、血漿糖鎖タンパクに結合するレクチンを網羅的に解析した。急性期うつ病患者、寛解期うつ病患者、健常者の3群で一元配置分散分析を行ったところ、TJA-I、Sambucus nigra agglutinin (SNA)、Griffonia simplicifolia lectin I isolectin B4 (GSL_I_B4)、Helix pomatia agglutinin (HPA) など、10 個のレクチンと結合する血漿タンパク質に有意な差が認められた (Fig. 2)。

これらの結果から、Siac2-6Gal/GalNAc 構造に着目し、糖鎖転移酵素を推定したところ、8 つの糖鎖転移酵素が候補として挙げられた。定量的リアルタイム PCR を用いて、これらの糖鎖転移酵素 mRNA の発現解析を行ったところ、ST6GALNAC2 がうつ病相依的に変化していた (Fig. 3)。

Fig. 1

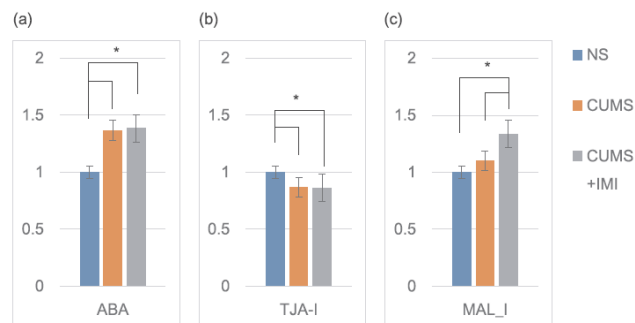


Table 1
Demographic data for participants.

	HC (n = 10)		MDD (n = 10)	
			Depressed	Remitted
Age	57.4 ± 1.7		55.7 ± 1.6	
Gender (male/female)	3/7		3/7	
HDSR	0.8 ± 0.8		22.5 ± 2.2*	3.2 ± 2.5
GAF	91.1 ± 2.1		52.6 ± 5.5*	86.1 ± 9.1
MMSE	29.0 ± 1.7		-	28.0 ± 2.3
Antidepressants (equivalent dose of imipramine) (mg)	-		156.4 ± 112.3	260.7 ± 180.1

Fig. 2

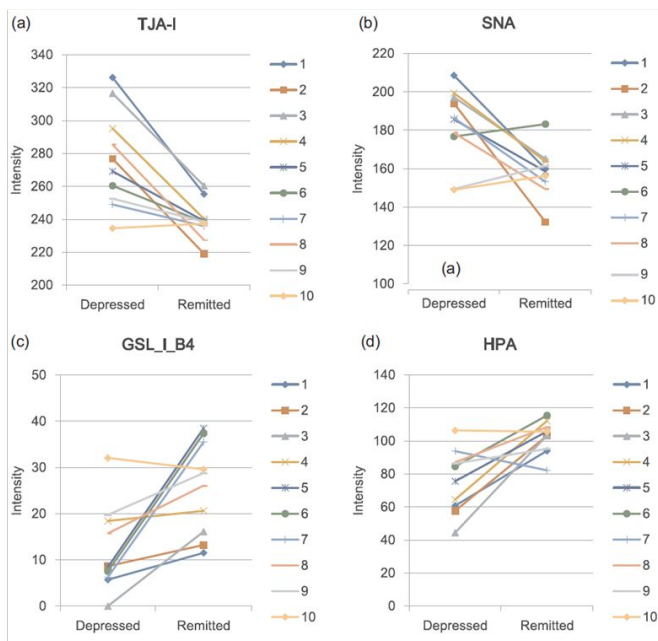
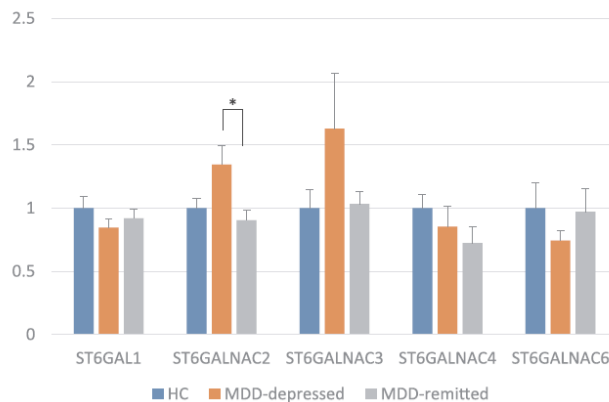


Fig. 3



これらの結果から、Siaα2-6Gal/GalNAc 構造などの血漿タンパクの糖鎖構造が、うつ病患者の診断や治療反応などのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Yamagata H, Uchida S, Matsuo K, Harada K, Kobayashi A, Nakashima M, Higuchi F, Watanuki T, Matsubara T, Watanabe Y. Altered plasma protein glycosylation in a mouse model of depression and in patients with major depression. *Journal of Affective Disorders*, 査読有, 233, 79-85, 2018 年, 10.1016/j.jad.2017.08.057

Uchida S, Yamagata H, Seki T, Watanabe Y. Epigenetic mechanisms of major depression: Targeting neuronal plasticity. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 査読有, 72(4), 212-227 2018 年, 10.1111/pcn.12621

Harada K, Ikuta T, Nakashima M, Watanuki T, Hirotsu M, Matsubara T, Yamagata H, Watanabe Y, Matsuo K. Altered Connectivity of the Anterior Cingulate and the Posterior Superior Temporal Gyrus in a Longitudinal Study of Later-life Depression. *Front Aging Neurosci*. 査読有, 2018, 10:31 10.3389/fnagi.2018.00031

Matsuo K, Harada K, Fujita Y, Okamoto Y, Ota M, Narita H, Mwangi B, Gutierrez CA, Okada G, Takamura M, Yamagata H, Kusumi I, Kunugi H, Inoue T, Soares JC, Yamawaki S, Watanabe Y. Distinctive Neuroanatomical Substrates for Depression in Bipolar Disorder versus Major Depressive Disorder. *Cereb Cortex*. 査読有, 2018, 202-214, 10.1093/cercor/bhx319

Ikuta T, Matsuo K, Harada K, Nakashima M, Hobara T, Higuchi N, Higuchi F, Otsuki K, Shibata T, Watanuki T, Matsubara T, Yamagata H, Watanabe Y. Disconnectivity between Dorsal Raphe Nucleus and Posterior Cingulate Cortex in Later Life Depression. *Front Aging Neurosci*. 査読有, 9, 236, 2017, 10.3389/fnagi.2017.00236.

Yamagata H, Uchida S, Matsuo K, Harada K, Kobayashi A, Nakashima M, Nakano M, Otsuki K, Abe-Higuchi N, Higuchi F, Watanuki T, Matsubara T, Miyata S, Fukuda M, Mikuni M, and Watanabe Y. Identification of commonly altered genes between in major depressive disorder and a mouse model of depression. *Scientific Rep*. 査読有, 7, 3044, 2017. 10.1038/s41598-017-03291-x

Uchida S, Teubner BJ, Hevi C, Hara K, Kobayashi A, Dave RM, Shintaku T, Jaikhan P, Yamagata H, Suzuki T, Watanabe Y, Zakharenko SS, Shumyatsky GP. CRT1 Nuclear Translocation Following Learning Modulates Memory Strength via Exchange of Chromatin Remodeling Complexes on the Fgf1 Gene. *Cell Rep*. 査読有, 18, 352-366, 2017, 10.1016/j.celrep.2016.12.052.

山形弘隆, うつ病と神経細胞死、日本生物学的精神医学会誌、査読無、169-174、2017

山形弘隆, 内田周作, 関友恵, 渡邊義文、白血球の遺伝子発現からみた気分障害の診断、精神医学、査読無、843-848 2017

Higuchi F, Uchida S, Yamagata H, Abe-Higuchi N, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Shintaku T, Itoh Y, Suzuki T, Watanabe Y. Hippocampal microRNA-124 enhances chronic stress resilience in mice. *Journal of Neuroscience*, 査読有, 36, 7253-7267, 2016. 10.1523/JNEUROSCI.0319-16.2016.

Harada K, Matsuo K, Nakashima M, Hobara T, Higuchi N, Higuchi F, Nakano M, Otsuki K, Shibata T, Watanuki T, Matsubara T, Fujita Y, Shimoji K, Yamagata H, Watanabe Y. Disrupted orbitomedial prefrontal limbic network in individuals with later-life depression. *J Affect Disord*, 査読有, 204, 112-9, 2016, 10.1016/j.jad.2016.06.031.

[学会発表] (計 16 件)

Seki T 他, The usefulness of long noncoding RNAs as biomarkers of major depressive disorder. Society for Neuroscience 2018

関友恵 他, 大うつ病性障害患者における長鎖非コード RNA の発現解析、第 39 回日本生物学的精神医学会 2017

山形弘隆 他, うつ病患者白血球とうつ病モデルマウス血液に共通した遺伝子発現変化、第 39 回日本生物学的精神医学会 2017

樋口文宏 他, ストレス適応機構におけるヒストン脱アセチル化酵素の役割の解析、第 39 回日本生物学的精神医学会 2017

内田周作 他, 精神疾患領域における標的分子の探索と創薬への可能性 うつ病・不安障害におけるサーチュインの役割と創薬への可能性、第 39 回日本生物学的精神医学会 2017

Uchida S 他, MicroRNA profiling of the ventral hippocampus in stress-resilient and stress-susceptible mice, Society for Neuroscience 2017

T Seki 他、Altered expression of long, noncoding RNAs in patients with major depression. Society for Neuroscience 2017

Yamagata H 他、Altered plasma protein glycosylation in depression. Society for Neuroscience 2017

Yamagata H 他、Identification of biomarkers in blood in geriatric patients with early-onset major depressive disorder. Society for Neuroscience 2016

山形弘隆 他、うつ病と神経細胞死、第 38 回日本生物学的精神医学会 2016

内田周作 他、ストレス適応破綻からみたうつ病態における神経可塑性異常とその分子基盤、第 38 回日本生物学的精神医学会 2016

渡邊義文 他、うつ病の発病脆弱性の分子機構を考える、第 38 回日本生物学的精神医学会 2016

山形弘隆 他、BubR1 を介した神経突起伸展の制御、第 38 回日本生物学的精神医学会 2016

樋口文宏 他、Hippocampal microRNA-124 enhances chronic stress resilience in mice、第 38 回日本生物学的精神医学会 2016

原田健一郎 他、高齢うつ病患者の脳構造学的・機能学的異常に関する縦断 MRI 研究、第 38 回日本生物学的精神医学会 2016

内田周作 他、Hippocampal SIRT1 signaling mediates stress resilience and susceptibility in mice、第 38 回日本生物学的精神医学会 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：50 歳未満発症うつ病の罹患の有無を予測する方法

発明者：山形弘隆、内田周作、渡邊義文、浜本義彦、荻原宏是

権利者：山口大学

種類：特許

番号：特願 2017- 91149

出願年：2017 年

国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松尾 幸治

ローマ字氏名：(MATSUO, Koji)

所属研究機関名：埼玉医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8 桁)：00292912

研究分担者氏名：内田 周作

ローマ字氏名：(UCHIDA, Shusaku)

所属研究機関名：山口大学(削除：2018 年 3 月 22 日)

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8 桁)：10403669

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。