

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15484

研究課題名(和文)腸内細菌へ介入するうつ病の予防法開発のための研究

研究課題名(英文)Interventions of gut bacteria to develop preventive methods for depression.

研究代表者

蓬萊 政 (Horai, Tadasu)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90817826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究を開始し、当院外来通院中及び入院となったうつ病患者の同意取得を試みたが、同意を得ることができなかった。その多くはDEX-CRH負荷試験について、ステロイド内服やCRHの静脈内投与に対する恐怖感を訴えてのものであった。加えて新型コロナウイルス感染拡大のため、初診患者、入院患者共に大幅に減少し、対象となる患者自体が減ってしまった。患者、健常者共に現時点での組み入れは極めて困難であり、今後、新型コロナウイルスの感染が落ち着き次第、再度検体収集を試みる予定である。他には気分障害や統合失調症に関する生物学的な研究を複数行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸内細菌叢プロファイルと個人のストレス反応性との関連、うつ病の回復や重症化に関連する腸内細菌叢のタイプ・腸内細菌の種類同定、腸内細菌がうつ病の発症に影響を与える生物学的機序の解明を目的とする研究であった。現在の精神医学は依然としてその診断は臨床症状からの診断が中心で、画像所見や血液検査などの客観的な診断方法は確立されていない。それゆえに本研究で腸内細菌からうつ病の診断や各個人のストレス反応性が解明される可能性があり、学術的にも社会的にも非常に大きな意義をもつものであった。今後も患者の組み入れを継続し、新たな精神疾患の診断法・治療法の発展に寄与したい。

研究成果の概要(英文)：We started the study and tried to obtain informed consent from depressed patients who were outpatients or hospitalized at our hospital, but we could not obtain informed consent. Most of them were afraid of taking steroids or intravenous CRH. In addition, due to the spread of the coronavirus disease 2019 (COVID-19), the number of eligible patients has decreased significantly, both in terms of first visit patients and inpatients. It is extremely difficult to include both patients and healthy subjects in the study at this time, and we will attempt to recruit patients and healthy control again as soon as the COVID-19 settles down. We have also conducted several biological studies on mood disorders and schizophrenia.

研究分野：精神医学

キーワード：腸内細菌 ストレス反応性 DEX-CRH負荷試験

### 1. 研究開始当初の背景

日本は先進諸国の中でも自殺者の割合が高く、深刻な社会問題である。自殺者の多くに気分障害や統合失調症などの精神疾患の既往があり、自殺防止に精神医学が果たす役割は大きい。しかし、依然としてその診断は臨床症状からの診断が中心で、画像所見や血液検査などの客観的な診断方法は確立されていない。そのため、臨床家ごとに診断がばらつく、誤診を招く、さらには unnecessary な治療が行われるなど様々な弊害を招いており、精神疾患診断におけるバイオマーカーの開発は喫緊の課題であった。

うつ病の発症には個体の遺伝学的脆弱性に加え、ストレスが影響する。ストレスに対する回復力もまた幼少期ストレスや食事など生活環境因に強く影響を受けることが分かっている。

一方で、近年、腸内細菌叢の変化が、自律神経や液性因子を介して脳と相互作用し、ニューロテンシンや副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの分泌を促すことが明らかになってきている(脳腸相関研究: microbiota-gut-brain communication)。主には齧歯類を用いた研究において、気分障害やストレス反応との関連性が多数報告されている。こういった研究によって、ヒトにおいてもうつ病と腸内細菌との関連が示唆されたり、自閉症児における腸内細菌叢の変化が報告されている。しかし、ヒトを対象として気分障害や統合失調症といった精神疾患と腸内細菌の関係、ストレス反応性と腸内細菌との関係などをテーマとした研究はなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は(1)腸内細菌叢プロファイルと個人のストレス反応性との関連(2)うつ病の回復や重症化に関連する腸内細菌叢のタイプ・腸内細菌の種類の同定(3)腸内細菌がうつ病の発症に影響を与える生物学的機序の解明を目的とする。「腸内細菌へ介入するうつ病の診断と治療法開発のための研究基盤」を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

大うつ病性障害患者 60 人、健常対照者 60 人を対象者として、インフォームドコンセントを得た上で血液(血漿)を EDTA 入り採血管にて 10cc、同日の糞便を専用キットにて採取する。同日中に精神科診断(MINI)と各種病相(HAMD17 / BDI-II)・重症度スコア(CGI-S)、心理ストレス尺度(SRS18)を評価する。採取したサンプルは即座にその後の研究に備えるために処理をした上で -80℃ の冷凍庫にて保管する。

T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法と DNA シーケンス(16SrRNA 遺伝子解析)を用いたうつ病発症と難治化に関連する腸内細菌の詳細な解析を行う。腸内細菌叢の特徴を T-RFLP 解析[糞便中の細菌 DNA を PCR にて増幅し、制限酵素で切断したフラグメントサイズの組み合わせと定量解析にて菌群の種類と存在量を、主な腸内細菌について門や属レベルで解析する方法]によりケース・コントロール比較を行う。[1]うつ病の発症に関連する腸内細菌の門や属レベルが存在するか[2]重症度、難治化、リチウム反応性に関連するものはあるかを明らかにするために、患者の糞便(患者 60 人 健常者 60 人)を採取し、DNA 抽出を行い、T-RFLP 解析と 16S rDNA ランダムシーケンス法にて腸内細菌の網羅的解析を行う。T-RFLP 解析では 10 程度の細菌分類、16S 遺伝子解析では 200 種(属)程度に分類した細菌情報が得られ、患者の臨床的データとの関連を解析する。疾患脆弱性やうつ症重症度に関連するとされる視床下部-下垂体-副腎(HPA)系応答(ストレス反応性)の指標とされるデキサメタゾン-副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン

(DEX-CRH) 負荷試験により、HPA 系の過剰亢進している群では腸内細菌がどうなっているかを調べる。試験前日午後 11 時に低用量 DEX 1.5mg(デカドロン錠 0.5mg を 3 錠、日医工株式会社)を服用し、試験当日午後 2 時 30 分に静脈血管を確保した後、3 時に CRH 100 µg(ヒト CRH 静注用 100 µg「タナベ」、田辺三菱製薬株式会社)を静脈内投与する。CRH 静脈投与直前の 3 時と、静脈内投与後の 3 時 30 分、3 時 45 分、4 時、4 時 15 分に採血を行い HPA 系(コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモンなど)の数値を SRS 社で測定する。それによって抑制群、非抑制群を判定する(コルチゾール濃度 < 3 µg/dl で低下反応ありとする)。特徴的な菌種を多く有する難治性うつ病患者 30 名と薬剤反応良好なうつ病患者 30 名、健常対照者 30 名を対象に行う。

#### 4. 研究成果

研究を開始し、当院外来通院中及び入院となったうつ病患者の同意取得を試みたが、同意を得ることができなかった。その多くは DEX-CRH 負荷試験について、ステロイド内服や CRH の静脈内投与に対する恐怖感を訴えてのものであった。加えて新型コロナウイルス感染拡大のため、初診患者、入院患者共に大幅に減少し、対象となる患者自体が減ってしまった。患者、健常者共に現時点での組み入れは極めて困難であり、今後、新型コロナウイルスの感染が落ち着き次第、再度検体収集を試みる予定である。

本項では、平行して行った統合失調症<sup>1</sup>の研究について紹介する。

統合失調症の研究は、マイクロ RNA に着目したものであった。統合失調症患者 22 名、健常者 19 名の末梢血サンプルを用いて、マイクロ RNA-19a およびマイクロ RNA-19b の測定を行った。結果マイクロ RNA-19b が統合失調症群では優位に高かった。細胞レベルでの変化を調べるために、マウス神経前駆細胞を用いて、マイクロ RNA-19b の生存や増殖への影響について検討した。結果、マイクロ RNA-19b をノックダウンした細胞では、増殖が増加した一方、生存率に差はなかった。以上の結果より、統合失調症の発症に関して、マイクロ RNA-19b が細胞増殖に影響を与えることで、ストレス脆弱性に寄与している可能性が考えられた。

ストレスが細胞レベルで影響を与える可能性について見識を深めることができた。改めて、本研究を進め、ストレスが腸内細菌に与える影響を検討し、バイオマーカーとして利用できることの重要性を認識した。

1. miR-19b is elevated in peripheral blood of schizophrenic patients and attenuates proliferation of hippocampal neural progenitor cells. [Horai T, Boku S, Okazaki S, Otsuka I, Ratta-Apha W, Mouri K, Yamaki N, Hirata T, Hishimoto A.](#) J Psychiatr Res. 2020 Sep 11;131:102-107.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shinko Yutaka, Otsuka Ikuo, Okazaki Satoshi, Horai Tadasu, Boku Shuken, Takahashi Motonori, Ueno Yasuhiro, Sora Ichiro, Hishimoto Akitoyo	4. 巻 120
2. 論文標題 Chemokine alterations in the postmortem brains of suicide completers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Psychiatric Research	6. 最初と最後の頁 29 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpsychires.2019.10.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okazaki Satoshi, Otsuka Ikuo, Horai Tadasu, Hirata Takashi, Takahashi Motonori, Ueno Yasuhiro, Boku Shuken, Sora Ichiro, Hishimoto Akitoyo	4. 巻 98
2. 論文標題 Accelerated extrinsic epigenetic aging and increased natural killer cells in blood of suicide completers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 109805 ~ 109805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pnpbp.2019.109805	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirata Takashi, Otsuka Ikuo, Okazaki Satoshi, Mouri Kentaro, Horai Tadasu, Boku Shuken, Takahashi Motonori, Ueno Yasuhiro, Sora Ichiro, Shirakawa Osamu, Hishimoto Akitoyo	4. 巻 278
2. 論文標題 Major depressive disorder-associated SIRT1 locus affects the risk for suicide in women after middle age	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychiatry Research	6. 最初と最後の頁 141 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psychres.2019.06.002	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okazaki Satoshi, Otsuka Ikuo, Numata Shusuke, Horai Tadasu, Mouri Kentaro, Boku Shuken, Ohmori Tetsuro, Sora Ichiro, Hishimoto Akitoyo	4. 巻 5
2. 論文標題 Epigenetic clock analysis of blood samples from Japanese schizophrenia patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 npj Schizophrenia	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41537-019-0072-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Takashi, Hishimoto Akitoyo, Otsuka Ikuo, Okazaki Satoshi, Boku Shuken, Kimura Atsushi, Horai Tadasu, Sora Ichiro	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 Investigation of chromosome Y loss in men with schizophrenia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropsychiatric Disease and Treatment	6. 最初と最後の頁 2115 ~ 2122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/NDT.S172886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaki Naruhisa, Otsuka Ikuo, Numata Shusuke, Yanagi Masaya, Mouri Kentaro, Okazaki Satoshi, Boku Shuken, Horai Tadasu, Ohmori Tetsuro, Shirakawa Osamu, Sora Ichiro, Hishimoto Akitoyo	4. 巻 269
2. 論文標題 Mitochondrial DNA copy number of peripheral blood in bipolar disorder: The present study and a meta-analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Psychiatry Research	6. 最初と最後の頁 115 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psychres.2018.08.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Yuan, Hishimoto Akitoyo, Otsuka Ikuo, Watanabe Yuichiro, Numata Shusuke, Yamamori Hidenaga, Boku Shuken, Horai Tadasu, Someya Toshiyuki, Ohmori Tetsuro, Hashimoto Ryota, Sora Ichiro	4. 巻 103
2. 論文標題 Longer telomeres in elderly schizophrenia are associated with long-term hospitalization in the Japanese population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Psychiatric Research	6. 最初と最後の頁 161 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpsychires.2018.05.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------