

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (G)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591385

研究課題名（和文）血管型一酸化窒素合成酵素遺伝子多型のうつ病の病態への影響

研究課題名（英文） Relationship between polymorphisms of eNOS gene and depression

研究代表者

吉村 玲児 (YOSHIMURA REIJI)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90248568

研究成果の概要（和文）：うつ病患者で血中 NOx 濃度やそれらへの抗うつ薬治療さらに eNOS 遺伝子多型の影響に関して検討した。対象はうつ病患者 103 例であり（性別 M/F: 41/62, 年齢 44 ± 13 yr）、健常群は性別と年齢を一致させた 104 例(性別 M/F: 37/66, 年齢 39 ± 16 yr)である。(1)血中 NOx 濃度は健常群で $23.8 \pm 3.8 \mu\text{M}$ 、うつ病群で $15.4 \pm 2.1 \mu\text{M}$ であり、うつ病群で有意に低下していた。(2)HAMD 得点と血中 NOx 濃度との間には有意な負の相関が認められた。(3)milnacipran 群では投与 4 週間後で 1.5 倍、投与 8 週間後で 1.8 倍の増加が認められた。(4)eNOS 遺伝子多型(T-786C, G894T, intron 4VNTR)に関しては健常群、うつ病群で分布に有意差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：**Objective:** We hypothesized that polymorphisms of eNOS gene are associated with pathogenesis of depression. To confirm the hypothesis, we examined the association of the polymorphisms of eNOS gene between patients with MDD. In addition, we also investigated the associations among the polymorphisms of eNOS gene among scores of HAMD and Beck Depression Inventory (BDI), ankle brachial index (ABI) and plasma NOx levels in depressed patients.

Materials and Methods: This study included 103 in- or outpatients in our university hospital who met the DSM-IV-TR criteria for MDD (M/F: 41/ 62, age: 44 ± 13 years) and 104 age- and sex-matched healthy controls (M/F: 37/ 66, age: 39 ± 16 years). Based on three polymorphism of eNOS gene (SNP; rs2070744, rs1799983, VNTR in intron 4), we conducted a genetic association analysis of case- control samples in patients with MDD or healthy controls in Japanese population. The plasma NOx levels were analyzed by the Griess method, using ENO-20. We used TaqMan assay for two SNPs, and the VNTR polymorphisms in intron 4 were determined by PCR-RFLP.

Results: We did not find genotype distributions between patients with MDD and healthy volunteers. No associations were observed between any polymorphisms of eNOS gene and HAMD, BDI, or ABI in patients with MDD. **Conclusions:** These results suggest that the three polymorphisms of eNOS gene might play little roles for the pathogenesis of depression.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2008年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：一酸化窒素、遺伝子多型、うつ病

1. 研究開始当初の背景

うつ病では心血管障害の罹患率が一般人口と比較して有意に高く、心血管障害の患者でのうつ病の罹患率が高い。2008年の *Am J Psychiatry* 誌に掲載された Surtees らの EPIC-Norfolk コホート研究では、現在あるいは過去1年間でのうつ病の罹患が虚血性心臓疾患での死亡のリスクを2-3倍高めるとのことである。心血管障害とうつ病の病態の共に共通する因子として最近一酸化窒素(NO)が注目されている。NOはL-アルギニンからL-シトルリンに変換される過程でNO合成酵素(NOS)を触媒として合成される。NOはガス状のフリーラジカルであり、細胞膜上の受容体を介さずに、あるいは可溶性グアニレートシクラーゼ/cGMP 経路を介して多彩な作用を発現する。また、NOがモノアミンやサイトカインを制御していることも報告されている(Canossa et al., 2002)。NOは血管内では血管拡張因子として働いており、虚血性心臓疾患患者ではNOの代謝産物であるNOxやeNOS活性が有意に低下している。また、Chrapkoら(*Biol Psychiatry*, 2004)は、うつ病患者での血中NOx濃度や血小板のeNOS活性が有意に低下していると報告している。さらに、eNOS遺伝子には少なくとも3種類の機能的遺伝子多型も報告されている(Sandrim et al., *Atherosclerosis*, 2006)。今回の研究では、うつ病患者でのNO動態についての検討を行なった。具体的には(1)うつ病患者で血中NOx濃度が低下しているのか、(2)うつ病患者でeNOS活性の低下があるのか、(3)それらに対する抗うつ薬治療の影響は、(4)うつ病患者で動脈硬化(Ankle-Brachial Pressure Index; ABI)が有意か、NOxやeNOS活性との関連はあるのか、(5)eNOS遺伝子多型の影響はあるのか、などに関して調べた。

2. 研究の目的

- (1)マウスにおいて抗うつ薬の慢性投与の脳内NO動態におよぼす影響の検討。
- (2)うつ病患者での血中NOx濃度の健常者との比較検討。
- (3)抗うつ薬はうつ病患者の血中NOx濃度およびNOS活性に影響を及ぼすか？
- (4)eNOS遺伝子の遺伝子の機能的遺伝子多型はうつ病の病態や抗うつ薬の反応性と関連するか？

3. 研究の方法

(1)セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬ミルナシプランのNOとBDNFへの影響に関する研究

9週齢のオスのC57BL/6Jマウスを実験に用いた。ミルナシプラン投与群では3, 10mg/kgのミルナシプランを14日間腹腔内投与した。対照群では生理食塩水を用いた。投与終了後マウスの脳(大脳皮質, 中脳, 海馬)は直ちにホモジネートされアッセイまでの間-80℃で保存した。

NOx濃度測定: 脳組織および血中NOx濃度をENO-20(EICOM, Kyoto, Japan)を用いて Griess 法により測定した。

NOS活性測定: NOS活性はNOS活性測定kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)を用いてMishimaらの方法(2005)に従い、L-[3H]arginineからL-[3H]citrullineへの変換を測定することにより計測した。

BDNF mRNA測定: 大脳皮質よりtotal RNAをMidi Kit (Quagen, Hilden, Germany)を用いて抽出後、センスプローブ

(5'-GGTATCCAAAGGCCAACTGA-3')、アンチセンスプローブ

(5'-CTTATGAATCGCCAGCCAAT-3')を用いてRT-PCRを行った(BDNF; 94℃30s, 63℃60s, 72℃90s, 26cycles, GAPDH; 同20cycles)。

BDNF protein測定: Western Blotting 法に

より測定した。

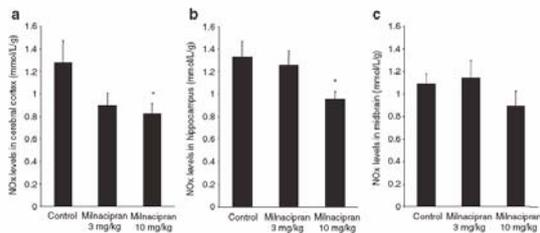
(2) うつ病患者での血中 NO_x 濃度動態に関する研究

対象は産業医科大学病院神経精神科の外来および入院患者 103 例であり (性別 M/F: 41/62, 年齢 44±13 yr)、DSM-IV の大うつ病性障害の診断基準を満たしていた。また健常群は性別と年齢を一致させた 104 例(性別 M/F: 37/66, 年齢 39±16 yr)である。抑うつの評価は Hamilton Rating Scale for Depression 17 項目 (HAMD)を用いて行った。うつ病群では全例薬物療法が行なわれていたが、少なくとも 1 週間以上の washout 期間後に採血を行なった。うつ病群のうち paroxetine 投与群 20 例と milnacipran 投与群 20 例は薬物投与 4 週間、8 週間後にも採血を行なった。血中 NO 濃度は高速液体クロマトグラフィー法により測定した。CV 値は intraassay, interassay 値ともに 1%以下であった。また、eNOS の 3 つの遺伝子多型を genotyping した。さらに、動脈硬化の指標として ABI も測定した。本研究は産業医科大学倫理委員会の承認を受けており、患者には書面による同意を得た。

4. 研究成果

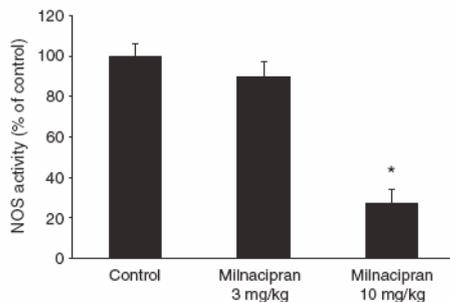
(1) ミルナシプラン慢性投与のマウス脳 NO_x 濃度への影響

ミルナシプラン 10mg/kg の 14 日投与で大脳皮質、海馬での NO_x 濃度が有意に低下したが、中脳の NO_x は変化がなかった。



(2) ミルナシプラン慢性投与のマウス大脳皮質 NOS 活性への影響

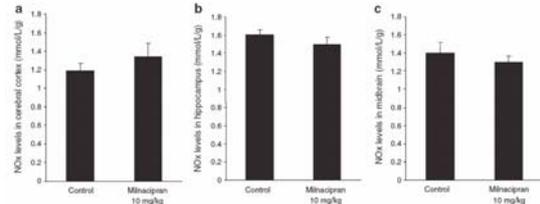
ミルナシプラン 10mg/kg の 14 日投与で大脳皮質の NOS 濃度が有意に低下した。



(3) ミルナシプラン急性投与のマウス脳 NO_x

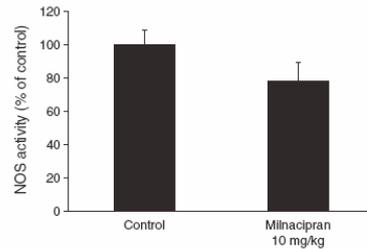
濃度への影響

ミルナシプラン 10mg/kg の 1 時間投与では大脳皮質、海馬、中脳いずれの部位においてもコントロール群と比較して NO_x 濃度に有意な変化は認められなかった。



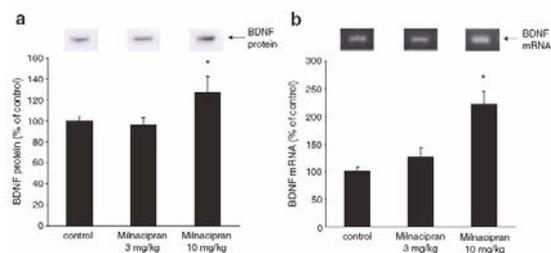
(4) ミルナシプラン急性投与のマウス大脳皮質 NOS 活性への影響

ミルナシプラン 10mg/kg の 1 時間投与では大脳皮質の NOS 活性はコントロール群と比較して有意な変化は認められなかった。

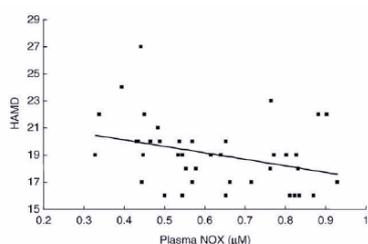


(5) ミルナシプラン慢性投与のマウス大脳皮質 BDNF 濃度への影響

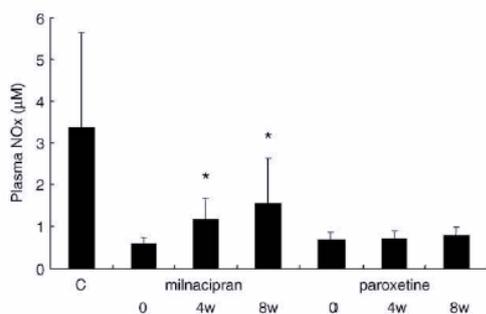
ミルナシプラン 10mg/kg の 1 時間投与では大脳皮質においてコントロール群と比較して BDNF mRNA および BDNF protein を有意に増加させた。



(6) うつ病患者の血中 NOx 濃度に関する検討
 血中 NOx 濃度は健常群で $23.8 \pm 3.8 \mu\text{M}$ 、うつ病群で $15.4 \pm 2.1 \mu\text{M}$ であり、うつ病群で有意に低下していた ($p < 0.01$)。さらに Hamilton Depression Rating Scale (HAMD) 得点と血中 NOx 濃度との間には有意な負の相関が認められた ($r = -0.556$, $p < 0.001$)。うつ病群のうち、自殺念慮有群 (HAMD の自殺の項目の得点が 2 点以上) の血中 NOx 濃度は $14.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$ 、自殺念慮無群 (HAMD の自殺の項目の得点が 1 点以下) では $16.7 \pm 2.9 \mu\text{M}$ であり、自殺念慮有群で有意に低値であった ($p = 0.034$)。



(7) 抗うつ薬の血中 NOx 濃度に対する影響
 うつ病患者において、paroxetine 投与群、milnacipran 投与群では薬物投与前血中 NOx 濃度に有意差は認められなかったが、milnacipran 投与群では投与 4 週間後でそれぞれ 1.5 倍、投与 8 週間後で 1.8 倍の増加が認められたのに対し paroxetine 投与群では有意な変化はなかった。



(8) eNOS 遺伝子多型のうつ病の病態に関する影響

うつ病群と健常群とで ABI の差はなかった。また、健常群でもうつ病群でも ABI と血中 NOx 濃度に関連は無かった。さらに eNOS 遺伝子多型 (T-786C, G894T, intron 4 VNTR) に関しては健常群、うつ病群でその分布に有意差は認められなかった。さらに HAMD 得点との関連もなかった。血中 NOx 濃度は SNP (rs207044) と関連しており、血中 NOx

濃度は TT 保有者で TC 保有者よりも高値であった。SNP (rs207044) と intron 4 の VNTR は連鎖不平衡にあり 2 つの SNP でハプロタイプ解析を行ったが関連はなかった。

G894T

| | cont | % | depression | % |
|----|------|------|------------|------|
| GG | 54 | 91.5 | 44 | 86.3 |
| GT | 5 | 8.5 | 7 | 13.7 |
| TT | 0 | 0 | 0 | 0 |

T-786C

| | cont | % | depression | % |
|----|------|-----|------------|------|
| TT | 43 | 74. | 36 | 70.6 |
| CT | 14 | 24. | 15 | 29.4 |
| CC | 1 | 1.7 | 0 | 0 |

VNTR

| | control | % | depression | % |
|-----|---------|------|------------|------|
| 5/5 | 43 | 74.1 | 35 | 68.6 |
| 4/5 | 13 | 22.4 | 16 | 31.4 |
| 4/4 | 2 | 3.4 | 0 | 0 |

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 15 件)

① Nakano Y, Yoshimura R, et al. Association between plasma nitric oxide metabolites levels and negative symptoms of schizophrenia: a pilot study. Hum Psychopharmacol 2010;25:139-144. (査読有)

② Fukuo Y, Kishi T, Yoshimura R, et al. Serotonin 6 receptor gene and mood disorders: case control study and meta-analysis. Neurosci Res 2010;Apr 13[Epub ahead of print]. (査読有)

③ Kishi T, Yoshimura R, et al. Association analysis of SIGMA 1 with major depressive disorder and SSRI response. Neuropharmacol 2010;58:1168-1173. (査読有)

④ Yoshimura R, et al. Nonadherence to paroxetine: a study based on monitoring

plasma paroxetine levels. J Clin Psychopharmacol 2010;30:82-83. (査読有)

⑤ Yoshimura R, Ikenouchi-Sugita A, et al. Adding a low dose atypical antipsychotic drug to an antidepressant induced a rapid increase of plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with treatment-resistant depression. P-N Biol Psychiatry 2010;34:308-312. (査読有)

⑥ Kishi T, Yoshimura R, et al. HTR2R is associated with SSRI response in major depressive disorder in a Japanese cohort. Neuromolecular Med 2009;Nov 24[Epub ahead of print]. (査読有)

⑦ Ikenouchi-Sugita A, Yumiko T, Yoshimura R, et al. Opposite effects of milnacipran, a serotonin norepinephrine reuptake inhibitor, on the levels of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in mouse brain cortex. N-S Arch Pharmacol. N-S Arch Pharmacol 2009;380:479-486. (査読有)

⑧ Umene-Nakano A, Yoshimura R, et al. Predictive factors for responding to sertraline treatment: views from plasma catecholamine metabolite and serotonin transporter polymorphism. J Psychopharmacol 2009;Oct 13[Epub ahead of print]. (査読有)

⑨ Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, et al. Effects of antidepressants on plasma metabolites of nitric oxide in major depressive disorder: comparison between milnacipran and paroxetine. P-N Biol Psychiatry 2009;33:1451-1453. (査読有)

⑩ Yoshimura R, et al. Rapid response to paroxetine is associated with plasma paroxetine levels at 4 but not 8 weeks of treatment, and is independent of serotonin promoter polymorphism in Japanese depressed patients. Hum Psychopharmacol 2009;24:489-494. (査読有)

⑪ Umene-Nakano W, Yoshimura R, et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in comorbidity of depression and alcohol dependence. Hum Psychopharmacol 2009;24:409-413. (査読有)

⑫ Yoshimura R, et al. Higher interleukin-6(IL-6) level is associated with SSRI- or SNRI-refractory depression. P-N Biol Psychiatry 2009;33:722-726. (査読有)

⑬ Furukawa TA, Yoshimura R, et al. How many well day vs. unwell days can you expect over 10 years, once you become depressed? Acta Psychiatr Scand 2009;119:290-297. (査

読有)

⑭ Yoshimura R, et al. Adding of risperidone to sertraline improves sertraline-resistant refractory depression without influencing plasma concentrations of sertraline and desmethylsertraline. Hum Psychopharmacol 2008;23:707-713. (査読有)

⑮ Okamoto T, Yoshimura R, et al. Efficacy of electroconvulsive therapy is associated with changing blood levels of homovanillic acid and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in refractory depressed patients: a pilot study. P-B Biol Psychiatry 2008;32:1185-1190. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

① 筒井正人 ほか. 心血管病およびうつ病成員における一酸化窒素システムの意義. 第 82 回日本薬理学会年会シンポジウム 横浜 2009. 3. 16

② 中野和歌子ほか. うつ病とアルコール依存症での抑うつ症状に対する抗うつ薬の効果. 臨床精神薬理学的予備的検討. 第 31 回日本生物学的精神医学会 京都 2009. 4. 25

③ Nakano W, Yoshimura R, et al. Alcohol dependence and depression: views from dynamics of brain-derived neurotrophic factor and catecholamines. Korean Society of Biol Psychiatry Seoul 2009. 7. 31

④ 吉村玲児ほか. うつ病寛解後の抗うつ薬の服薬コンプライアンス: 血中薬物濃度を指標とした検討. 第 6 回うつ病学会総会 東京 2009. 7. 31

⑤ 吉村玲児ほか. うつ病寛解後の抗うつ薬の服薬アドヒアランス: 血中薬物濃度を指標とした検討. 第 28 回躁うつ病の薬理・生化学研究懇話会 千歳 2009. 7. 10

⑥ 杉田篤子, 吉村玲児ほか. ミルナシプランが脳内の一酸化窒素動態および脳由来神経栄養因子の発現に与える影響. 第 28 回躁うつ病の薬理・生化学研究懇話会 千歳 2009.

⑦ 中野英樹ほか. Social Adaptation Self-evaluation Scale(SASS)日本語版のうつ病患者における臨床的有用性の検討. 第 105 回日本精神神経学会学術総会 神戸 2009. 8. 21

⑧ 吉村玲児ほか. アルコール依存と脳由来神経栄養因子. 第 21 回日本アルコール精神医学会 横浜 2009. 9. 7

⑨ 豊平由美子ほか. セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬ミルナシプランの脳内 NOS および BDNF に対する影響. 第 62 回日本薬理学会西南部会 松山 2009. 11. 20

⑩ Nakano W, Yoshimura R, et al. Varenicline did not increase serum BDNF levels in patients with nicotine

dependence:a preliminary study. 第 19 回
日本臨床精神神経薬理学会 京都
2009.11.13

①Nakano Y, Yoshimura R, et al. Treatment
with risperidone did not increase plasma
nitric oxide metabolites levels in
schizophrenic patients: a pilot study. 第
19 回日本臨床精神神経薬理学会 京都
2009.11.14

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 玲児 (YOSHIMURA REIJI)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 90248568

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

中村 純 (NAKAMURA JUN)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40148804

後藤 直樹 (GOTO NAOKI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60360278

中野 英樹 (NAKANO HIDEKI)

産業医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号: 20369060

杉田 篤子 (SUGITA ATSUKO)

産業医科大学・医学部・非常勤助教

研究者番号: 40421333