

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253075

研究課題名(和文) 多層的オミックス解析を用いた機能性精神疾患のバイオマーカー開発

研究課題名(英文) Development of biomarkers for functional psychoses based on multiple omics analyses

研究代表者

功刀 浩 (Kunugi, Hiroshi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第三部・部長

研究者番号：40234471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：気分障害、統合失調症、健常者の脳脊髄液等生体試料を収集し、オミックス技術(タンパク質、遺伝子などの網羅的解析法)を用いて、診断や経過判定の指標となるバイオマーカーを探索した。その結果、脳脊髄液のプロテオミクスによりfibrinogenが一部のうつ病の病態を示すバイオマーカーとなることを見出した。また、脳脊髄液中のタンパク濃度を規定する遺伝子多型のカタログを構築した。マイクロRNAについても網羅的解析を行い、精神疾患のマーカーとして有力な分子を特定した。血液のトランスクリプトーム解析から、うつ病患者ではVAMP2, FKBP4, CRHR2などの発現変化がバイオマーカーとなる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We collected bioresource including blood and cerebrospinal fluid (CSF) and performed omics analyses in patients with major depressive disorder (MDD), bipolar disorder, schizophrenia, and controls to find biomarkers for diagnosis and severity for the disorders. Based on proteomics approach, we found that CSF fibrinogen levels are increased in a portion of patients with MDD. We also examined the association between CSF protein levels and genetic variations (genome-wide polymorphisms) and constructed a database showing the relationship between CSF protein levels and single nucleotide polymorphisms (SNPs). We also found promising molecules from more than 2000 microRNA molecules as a biomarker for psychiatric diseases. Based on transcriptome approach on peripheral blood samples, we found that expression of some genes (VAMP2, FKBP4, and CRHR2) are altered in drug naive patients with MDD, suggesting that these genes could be biomarkers for MDD.

研究分野：精神医学

キーワード：プロテオミクス ゲノム マイクロRNA バイオマーカー うつ病 統合失調症 双極性障害 脳脊髄液

1. 研究開始当初の背景

統合失調症や気分障害などのバイオマーカーの研究は盛んに行われているが、入手し易いという点から末梢血を用いて行われているのが殆どである。申請者が知る限り、いまだに実用化されているものはない。遺伝子解析では、統合失調症や双極性障害のリスク遺伝子となる可能性が示唆されているものが多数挙げられているものの、いまだに確定したものはなく、リスクを与えとしても効果量を示すオッズ比は 1.1 程度と著しく低い。従って、これらの知見は病態解明に役立つ可能性があるが、診断マーカーにはなる見込みは乏しい。そこでタンパクや代謝産物などに着目した研究成果に期待がかかるが、今のところ確定した知見といえるものはない。

一方、アルツハイマー病では、脳脊髄液中の総タウやリン酸化タウが診断マーカーとなることが明らかになり、2012 年から保険収載されて実用化された。これはリン酸化タウが凝集して形成された神経原線維変化によって神経細胞死を引き起こされ、細胞外液中に遊離したタウ凝集体の一部が脳脊髄液中に拡散することによる。しかし、タウは血液中には出てこないため、血液は役に立たない。アミロイド (A β) もマーカーとして確立しているが、やはり血液に出現するのは脳脊髄液中の 1/10 ほどであり、精度が劣る。

このように、脳脊髄液は血液と比べて脳内病態をより強く反映するため、精神疾患においても脳脊髄液を研究することが重要と考えられる。そこで申請者らは、倫理委員会の承認を経て 2010 年 10 月から、統合失調症、気分障害、健常者の脳脊髄液サンプルの収集を開始し、これまでにおよそ 400 検体の収集に成功した。その試料を用いて候補分子に関する検討を行い、脳脊髄液中のオキシトシン濃度が統合失調症の陰性症状と負の相関をすること (Sasayama et al: Schizophr Res, 2012)、統合失調症やうつ病患者では脳脊髄液中 IL-6 濃度が上昇していることなどを見出した (Sasayama et al: J Psychiatr Res, 2013)。さらに、このサンプルを用いてプロテオーム解析の予備的検討を行い、統合失調症やうつ病で変化している分子の候補を見出している。

また、申請者らは統合失調症や気分障害の鍵分子として脳由来神経栄養因子 (BDNF) に着目した研究を行ってきたが、BDNF のシナプス可塑性に miRNA が重要な役割を果たすことを見出した (Kawashima et al: Neuroscience, 2010; Numakawa et al: Neurochem Int, 2011 ほか)。また、統合失調症の最も有力なリスク遺伝子として miRNA137 が報告されている (Nat Genet, 2011)。

以上のような内外の研究動向、当研究室の成果から、脳脊髄液のプロテオーム、miRNA の網羅的解析を行い、統合失調症、気分障害のバイオマーカー開発を行うことを計画し

た。

なお、申請者が知る限り、国内において日本人の精神疾患患者の脳脊髄液を研究している施設はない。海外では若干の施設がプロテオーム解析を行っており、VGF、apolipoprotein, SNAP25 などがマーカー候補として挙げられている (Vasic et al, 2012 の総説)。しかし、プロテオーム解析は日進月歩であり、一度に解析できるタンパク数、精度、方法などは急速に進んでいるため、最先端の方法で行うことにより新たな分子が見出される可能性が高い。なお、精神疾患の miRNA の網羅的解析に関する報告は内外にも殆どない。

2. 研究の目的

統合失調症や気分障害などの精神疾患の診断はいまだにもっぱら主観的症狀や問診に基づいており、診断に役立つバイオマーカーは殆どない。また、治療効果の判定なども面接による症状評価に基づいて行われている。そのため、治療効果を的確に判定する指標となっていない可能性が指摘されている。これは治療法の開発にも大きな妨げとなる。そこで、本研究は、脳脊髄液を用いて、診断や治療効果判定において客観的指標となるような感度の高いバイオマーカーを見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、脳脊髄液を用いたプロテオーム解析、microRNA 解析を中心に行ったが、多層的オミックス解析として、これ以外にゲノム解析 (遺伝子多型の網羅的解析) や血液のトランスクリプトーム解析 (遺伝子発現の網羅的解析) も行った。

(1) プロテオーム解析

年齢と性をマッチさせた検体 (統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害、健常者の 4 群) を対象として、脳脊髄液の 1129 種のタンパク質についてアプタマー技術 (核酸の立体構造と定量 PCR を用いてタンパク量を特定する方法: ソマロジック社の soma-scan) を用いてプロテオーム解析を行った。診断マーカー (疾患群と健常者との間に有意差がなる分子) や亜型分類マーカー (患者の一部で異常値、健常者の 95 パーセントイル外ないし 99 パーセントイル外を示すもの) 状態評価マーカー (重症度スコアと相関を示す分子、治療前後で変化する分子) として使用できる可能性のある分子を探索した。

(2) 脳脊髄液中のタンパクレベルを規定する遺伝子多型カタログの作成

脳内のタンパクレベルを反映する脳脊髄液中のタンパクレベルを規定する遺伝子多型については、いまだによくわかっていない。そこでわれわれは、上記の SOMA scan で

1129 分子のタンパクレベルの測定を行ったサンプルのうち、133 人について Illumina HumanOmni1-Quad BeadChip を用いてゲノムワイド遺伝子多型タイピングを行った。スピアマンの相関係数を用いて脳脊髄液中のタンパクレベルと一塩基多型との関連について解析した。

(3) 脳脊髄液中の microRNA 解析
年齢と性をマッチさせた検体（統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害、健常者の 4 群）を対象として、CSF 中の microRNA について東レ 3DGene を用いて約 2000 分子の網羅的解析を行った。

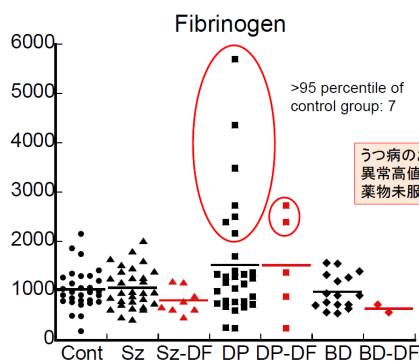
(4) 血液細胞のトランスクリプトーム解析
末梢血中の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて網羅的に測定し、疾患のマーカーを探る検討は、うつ病においていくつか行われているが、結果は一致していない。今回、われわれは、非服薬患者を対象にして検討した。すなわち、14 人の服薬していない大うつ病患者と年齢と性がマッチした 14 人の健常者について、Agilent human whole-genome arrays を用いて末梢血の遺伝子発現を網羅的に解析した。発現が異なっている遺伝子のパスウェイ解析やネットワーク解析も行った。さらに先行研究によって指摘されていた遺伝子についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) プロテオーム解析

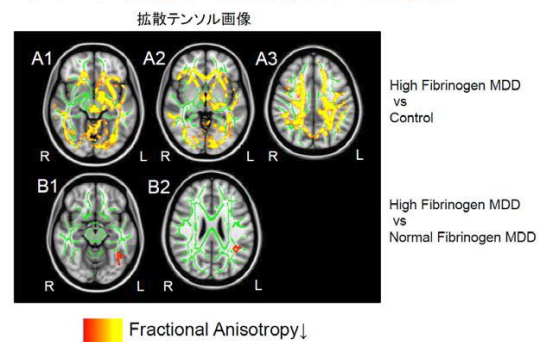
140 個のマーカー候補分子を見出し特許出願した（特願 2014-102090）。

その中でも特に有望なマーカー候補の一つとして fibrinogen が検出された。うつ病群では fibrinogen が異常高値（健常対照群の 99 パーセントイル以上）を示す症例が大うつ病患者のおよそ 4 分の 1 に存在し、薬剤非投与群にもみられた。アプタマーによる測定は ELISA による測定とも強い相関を示し、独立したサンプルで ELISA を用いて測定したところ、やはり、同様にうつ病の一部で異常高値を示した。



Fibrinogen 高値例は、年齢が高く、症状（HAM-D）も重い傾向があった。また、MRI の diffusion tensor imaging により、白質繊維を評価したところ、fibrinogen 高値例は健常対照例や fibrinogen 正常うつ病例と比べ側頭葉などで FA 値が低下しており、白質繊維の障害があることが示唆された (Hattori et al, Sci Rep, 2015)。

フィブリノーゲン高値型うつ病は神経ネットワーク障害が強い



以上から、脳脊髄液中のフィブリノーゲン値はうつ病のサブタイプを反映するマーカーとなる可能性が示唆された。

また、統合失調症や双極性障害のバイオマーカー候補として有望な分子を多数見出した。

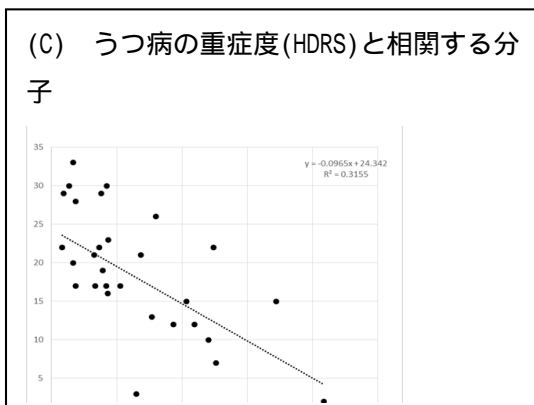
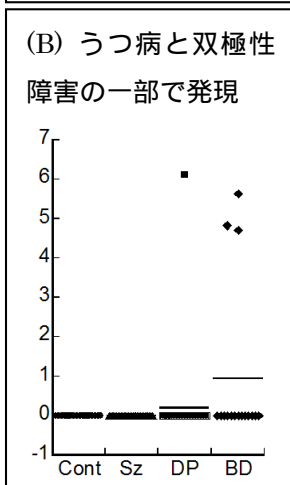
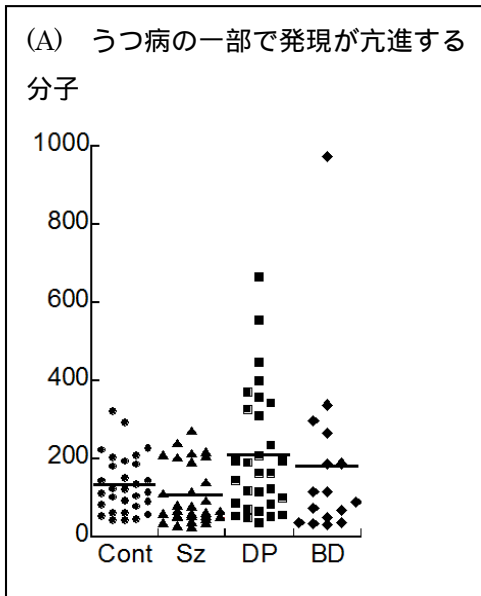
(2) 脳脊髄液中のタンパクレベルを規定する遺伝子多型カタログの作成 (protein quantitative trait loci: pQTL 研究)

統計解析において多重比較による補正を行ったところ、タンパクレベルと一塩基多型 (SNP) との間に有意 ($nominal P < 7.66 \times 10^{-9}$) な関連があったものは 446 対あり、大部分は、タンパクをコードする染色体の近傍にある遺伝子多型によって制御されていることがわかった。このような関連ペアに絞って解析して多重比較による補正を緩めると ($nominal P < 2.13 \times 10^{-5}$)、580 対のタンパク-SNP の組み合わせが見出された。このような SNP は、疾患感受性と関連しているものが多かった。本結果については、論文執筆中であり、論文が出版されれば、データベースを公開する予定である。このデータベースは脳内のタンパクレベルを規定する遺伝的基盤を明らかにする非常に貴重な情報となる。

(3) microRNA 解析

脳脊髄液中の miRNA 2019 分子をマイクロアレイで定量したところ、健常群と各々の疾患との間に有意差のある分子、重症度と有意に相関する分子など延べ 300 個以上検出された。その中で、疾患群で発現が顕著に亢進していた分子（図

A) 疾患群の一部のみ発現を示した分子 (図B) 重症度と強い相関が認められた分子 (図C) など、バイオマーカーとして有望と考えられる候補分子を 39 分子選択し、特許出願した (2015-008710)。



(4) 血液細胞のトランスクリプトーム解析
うつ病患者と健常者との間で発現が異なる分子についてパスウェイ解析を行ったところ、「シナプス伝達」に関わる分子のパスウェイの関与が示唆された。
機能との関連を考慮した場合、特に有望な

遺伝子として VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2), FKBP4 (FK506 binding protein 4), CRHR2 (Corticotropin releasing hormone receptor 2) などの分子が見いだされた。これらの分子は、うつ病の末梢血バイオマーカーとして有望である。

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 6 件)

1) Hattori K, Ota M, Sasayama D, Yoshida S, Matsumura R, Miyakawa T, Yokota Y, Yamaguchi S, Noda T, Teraishi T, Hori H, Higuchi T, Kohsaka S, Goto Y, Kunugi H. Increased cerebrospinal fluid fibrinogen in major depressive disorder. *Sci Rep.* 2015 Jun 17;5:11412. doi: 10.1038/srep11412. (査読あり)

2) Kunugi H, Hori H1, Ogawa S. Biochemical markers subtyping major depressive disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2015 Oct;69(10):597-608. doi: 10.1111/pcn.12299. (査読あり)

3) Hori H, Sasayama D, Teraishi T, Yamamoto N, Nakamura S, Ota M, Hattori K, Kim Y, Higuchi T, Kunugi H. Blood-based gene expression signatures of medication-free outpatients with major depressive disorder: integrative genome-wide and candidate gene analyses. *Sci Rep.* 2016 Jan 5;6:18776. doi: 10.1038/srep18776. (査読あり)

4) 功刀浩: うつ病の病態仮説と分子マーカー. *精神科診断学* 8 (1): 16-20, 2015. (査読なし)

5) 功刀浩: うつ病を生物学的に理解する. *医学と薬学* 72 (11) 1841-1849, 2015. (査読なし)

6) 功刀浩: うつ病の治療メカニズム. *臨床精神薬理* 18 (10): 1239-1247, 2015. (査読なし)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) Hattori K, Ota M, Sasayama D, Yoshida S, Noda T, Teraishi T, Hori H, Kunugi H: Increased cerebrospinal fluid fibrinogen delineates a subgroup of major depressive disorder. WPA Regional Congress, Osaka, Japan 2015, Osaka, 6

2) 功刀浩: うつ病を類型化する生化学的マーカー (教育講演). 第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会, 東京, 9.26, 2015

.4, 2015

3) 堀 弘明, 篠山大明, 寺石俊也, 山本宜子, 中村誠二, 太田深秀, 服部功太郎, 金吉晴, 樋口輝彦, 功刀 浩: 服薬していない外来うつ病患者における末梢血遺伝子発現プロファイル: 網羅的遺伝子発現と候補遺伝子発現の統合的解析. 第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会, 東京, 9.25, 2015

4) 服部功太郎, 篠山大明, 吉田寿美子, 功刀浩: 精神疾患脳脊髄液バイオマーカーの構築とバイオマーカーの探索. 第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会, 東京, 9.25, 2015

5) Hattori K, Yoshida S, Goto Y, Kunugi H: Collection of cerebrospinal fluid bioresource and multiple omics approaches to psychiatric disorders. Symposium "Progress in cerebral fluid markers in neuropsychiatric diseases" (Chair Kunugi H). 第 38 回日本神経科学大会, 神戸, 2015 年 7 月 30 日

6) 功刀浩: うつ病の病態仮説と分子マーカー(シンポジウム 1 うつ病のバイオマーカーをめぐって) 第 34 回日本精神科・診断学会, 松山, 2014 年 11 月 13 日

〔図書〕(計 1 件)

功刀浩: 気分障害(うつ病、双極性障害). 「分子脳科学: 分子から脳機能と心に迫る」(三品昌美編) 化学同人 Dojin Bioscience 20, pp. 195-207, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 精神疾患判定マーカー
発明者: 服部功太郎、功刀浩、後藤雄一、高坂新一
権利者: 国立精神・神経医療研究センター
種類: PCT
番号: PCT/JP2015/064233
出願年月日: 2015 年 5 月 18 日
国内外の別: 国内・国外(PCT)

名称: miRNA を用いた精神疾患判定マーカー
発明者: 服部功太郎、功刀浩、後藤雄一、高坂新一
権利者: 国立精神・神経医療研究センター
種類: 特願
番号: 2015-008710
出願年月日: 2015 年 1 月 20 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ 等
<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r3/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

功刀 浩 (KUNUGI Hiroshi)

国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第三部・部長

研究者番号: 40234471

(2) 研究分担者

服部功太郎 (HATTORI Kotaro)

国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第三部・室長

研究者番号: 50415569

(3) 研究協力者

篠山大明 (SASAYAMA Daimei)

信州大学医学部精神医学教室・助教

国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第三部・客員研究員

研究者番号: 90447764