

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02751

研究課題名(和文) オミックス解析を駆使したうつ病の診断マーカー開発と病態研究

研究課題名(英文) Establishment of biological marker and pathophysiological study of depression using omics analysis

研究代表者

大森 哲郎(OHMORI, Tetsuro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：00221135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：オミックス解析技術を導入してうつ病の診断マーカーの作成を試み、カスタム化した簡便な測定方法の検討も行った。マーカー候補のグルタミン酸の実用的測定方法として酵素法による測定を確立した。グルタミン酸は単独では特異性が低く、また治療反応性との有意な関連は認めなかった。メチル化修飾変化によるマーカー候補サイトのLoop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP)法による測定を試みたが、健常者との小さい差異の検出は難しいことが判明した。双極性障害では、特定の遺伝子群では気分安定薬の影響を受けることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先端的オミックス解析を使用して複数の指標を抽出し、それをうつ病の診断補助マーカーとする国際的にみても先駆的な試みであり、学術的意義は高い。これまでの生物学的指標はひとつの測定値に依拠していたため、感度と特異性に限界があり、実用レベルには至っていない。本研究は、先端的測定技術を用いて、複数の指標を検討して、それらを組み合わせることによって、うつ病の診断評価を高い精度で可能とする道を開いた。技術的進歩によって解析は安価で迅速となり、しかも被験者負担が数mlの採血のみなので患者の同意を得やすく、どの診察室でも施行可能な検査となる可能性を持っている。

研究成果の概要(英文)：We attempted to make diagnostic markers for depression by introducing omics analysis technology, and also investigated a customized and simple measurement method. We established an enzymatic method for the practical measurement of glutamate, a candidate marker. The specificity of glutamate alone was low, and no significant association with therapeutic response was observed. We attempted to develop a method to measure candidate marker sites by methylation modification changes using Loop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP), but it proved difficult to detect small differences between depressed and healthy subjects. In bipolar disorder, it was found that the methylation differences compared with the normal group were small, the differences were not similar to those of depression, and certain gene groups were affected by mood stabilizers.

研究分野：精神医学

キーワード：臨床精神分子遺伝学 オミックス解析 うつ病 診断マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病の診断は面接に基づくが、診断一致率は必ずしも高くない。簡便な診断補助マーカーの確立が切実に望まれる。うつ病は全身性の疾患という側面があり、神経内分泌系、神経免疫系、自律神経系などの変化を伴う。視床下部・下垂体・副腎皮質系の機能亢進、サイトカインなどの免疫系機能異常、脳由来神経栄養因子(**BDNF**)などの栄養因子の変化の報告も数多い。しかし、いずれもマーカーとしては感度と特異性を確保するには至らない。うつ病のように複雑で、異種性が想定され、しかも末梢にその本質を顕現しているとはいえない疾患では、単一因子の測定値を診断指標とするのは原理的に困難であると思われる。本研究は、この困難を打開するために、オミックス解析技術を導入して少量のサンプルから多数の因子を測定し、複数の測定値を組み合わせることによってうつ病の診断マーカーを作成する試みである。オミックス解析で得られるうつ病特有の所見は病態を反映した所見でもあり、そこを起点とした臨床的および基礎的な病態研究を並行して行う。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、複数の測定値を組み合わせてうつ病の診断マーカーを作成することであり、我々が他に先駆けて独自に着手し、継続してきたものである。すでに遺伝子発現解析に関しては、5つの遺伝子発現を組み合わせて、うつ病患者と健常者を、感度、特異度とも80%以上で識別できるPCRアレイ法による診断マーカーを作成し、(**J Psychiat Res. 2015**) 続報では双極性障害との区別可能性を示した(**Neuropsychiatr Dis Treat. 2017**)。遺伝子メチル化修飾変化解析に関しては、メチル化修飾変化に有意差を認めた18サイトの測定値を組み合わせて、感度、特異度とも80%以上で、うつ病患者と健常者を識別できることを発表した(**Epigenetics. 2015**)。また、メタボローム解析では、キヌレニン、グルタミン酸、グルタミンなどの値が未治療うつ病患者で変化し、これらは治療後には正常化することを見出した(**Sci Rep. 2017**)。今後、オミックス解析で抽出した候補遺伝子ないし候補物質について、それらのみを選択的かつ効率的に測定する方法に切り替えを検討し、実用的なマーカーの作成を試みる。また得られた所見を発端とした病態検討も行う。

## 3. 研究の方法

【対象】DSM-5の基準に合致するうつ病患者、および、性、年齢の一致した健常対照を対象とする。疾患特異性の解析のために双極性障害と統合失調症をも対象とする。徳島大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会です承されたプロトコールに基づき、文書によるインフォームドコンセントを得る。

【症状評価と採血】DSM-5で診断し、うつ病はハミルトンうつ病評価尺度、双極性障害はヤング躁病評価尺度、統合失調症は簡易精神病評価尺度を用いて症状を評価する。静脈血採血を行い、既報の方法で、血漿、白血球 mRNA および DNA を採取する。

### 【研究項目】

#### (1) 疾患特異性および治療経過との関連

遺伝子発現解析、メチル化修飾変化、メタボロームを用いた指標について、いずれもうつ病と双極性障害あるいは統合失調症との区別については予備的な検討では有望な結果を得ているが、さらに解析数を増やして疾患特異性について検討する。また治療前後のセットのサンプルを解析し、所見が状態依存性で治療経過を反映するかを検討する。

## (2) 実用的測定方法の確立と検証

網羅的解析によって得られた候補遺伝子や候補物質の組み合わせを、それに絞った解析方法に変更する必要がある。遺伝子発現に関しては、すでにこの過程を進めてきた。網羅的測定から絞り込んだ候補遺伝子をリアルタイム PCR によって定量的に確認し、確認できた遺伝子を PCR アレイに搭載した。メチル化修飾マーカーに関しては、PyroMark Q24 システムや、栄研化学が開発した Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を応用した検討を行う。メタボローム解析によってうつ病で差異を認められた代謝産物の測定に関しても、企業とも共同して簡便な測定法の検討を行う。

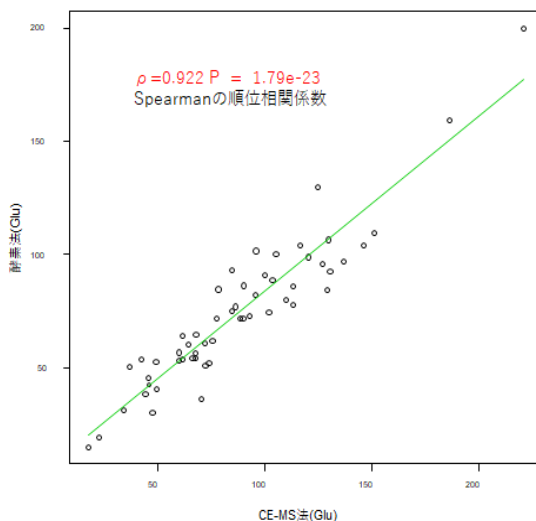
## (3) 病態学的検討

神経伝達物質関連遺伝子のメチル化変化や神経伝達物質関連の代謝産物とうつ病診断や重症度との関連を検討する。

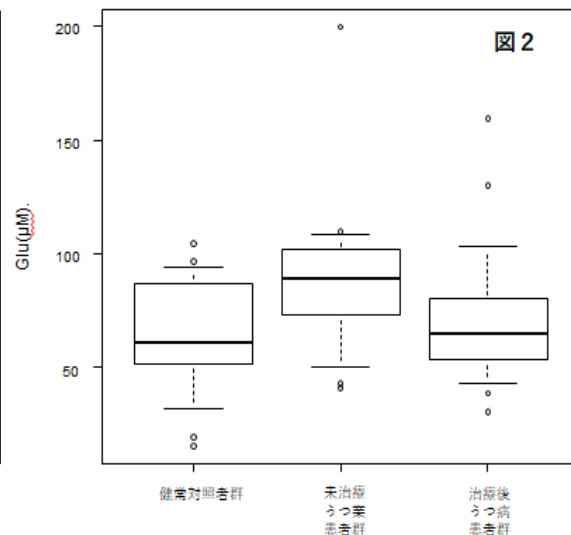
## 4. 研究成果

メタボローム解析研究では、うつ病で高値を示すことがメタ解析でも示されている。グルタミン酸の実用的測定方法としてヤマサ醤油株式会社と共同研究にて酵素法を確立し、それによる測定値は **capillary electro phoresis-mass spectrometry (CE-MS)** で測定した測定値と強い相関を認めた (図 1)。この方法は簡便かつ実用的であるが、採血後の常温保存でグルタミン酸値が上昇する点が汎用化への留意点である。独立したうつ病サンプル 17 名と健常者 21 名を対象に酵素法にてグルタミン酸濃度を測定したところ、健常者群と比較してうつ病患者群で高値を認めたが、両群に重なりが多く単独では診断マーカーとして不十分であることが分かった (図 2)。薬物応答性との関連についても検討したが、グルタミン酸濃度と有意な関連は認めなかった。

(図 1) グルタミン酸の酵素法と CE-MS 法との相関



(図 2) うつ病治療前後におけるグルタミン酸測定値



メチル化修飾測定に関しては、栄研化学株式会社と共同研究を行い、同社の **Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)** 法によって、うつ病のマーカー候補メチル化サイトの測定は可能であるが、うつ病と健常者の小さい差異を安定して検出するのは難しいことが判明した。続いて、すでに同定しているうつ病のメチル化マーカーに疾患特異性があるかどうかを検討するため、24 名の双極性感情障害患者と 24 名の健常対照者の白血球から抽出したゲノミック DNA を **Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina)** を用いてメチル化レベルの測定を行った。結果、解析対象とした 372,783 CpG サイトのうち、765 CpG サイトにおいて双極性障害患者群と健常者群でメチル化レベルに有意な違いを認めた (FDR  $q < 0.05$ )。うつ病と同様に双

極性感情障害群と健常者群のメチル化の差異は小さく、うつ病で異常を示した遺伝子との共通性は乏しく、特定の遺伝子群において気分安定薬の影響を受けることが分かった（図3）。

図3 メチル化と向精神薬

	有意であった CpG サイト数	Positive correlation	Negative correlation
Li	9 (1.2%)	3	6
VPA	5 (0.7%)	1	4
CBZ	90 (11.8%)	32	58
LTG	<u>223 (29.2%)</u>	76	147
抗精神病薬	23 (3.0%)	13	10
BZ	8 (1.0%)	3	5

遺伝子発現測定に関しては、うつ病サンプル 16 名と健常者 17 名を対象にイルミナ HiSeq2000 にて RNA の配列を解読した。データ解析は、GRCh38.p7 のゲノム配列に対して、Tophat でマッピングし、Cufflinks で集計した。診断間の遺伝子発現の差異は、R Bioconductor パッケージ EdgeR を用いたフィッシャーの正確確率検定で行った。結果、2 群間で遺伝子発現に違いを認めた 62 遺伝子を同定し、診断マーカー候補遺伝子の予備的データを得た。Gene-ontology 解析では、ATP 合成や免疫反応に関連する遺伝子群が同定された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Balan S, Ohnishi T, Watanabe A, Ohba H, Iwayama Y, Toyoshima M, Hara T, Hisano Y, Miyasaka Y, Toyota T, Shimamoto-Mitsuyama C, Maekawa M, Numata S, Ohmori T, Shimogori T, Kikkawa Y, Hayashi T, Yoshikawa T	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of an Atypical Cadherin Gene, Cdh23 in Prepulse Inhibition and Implication of CDH23 in Schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Schizophr Bull	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/schbul/sbab007.	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 Tomioka Y, Kinoshita M, Umehara H, Nakayama T, Watanabe SY, Nakataki M, Numata S, Ohmori T.	4. 巻 74
2. 論文標題 Association between serum folate levels and schizophrenia based on sex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychiatry Clin Neurosci.	6. 最初と最後の頁 466-471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pcn.13074.	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 Okazaki S, Numata S, Otsuka I, Horai T, Kinoshita M, Sora I, Ohmori T, Hishimoto A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Decelerated epigenetic aging associated with mood stabilizers in the blood of patients with bipolar disorder.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transl Psychiatry.	6. 最初と最後の頁 129-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-020-0813-y.	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 Yamazaki K, Yoshino Y, Kawabe K, Ibuki T, Ochi S, Mori Y, Ozaki Y, Numata S, Iga JI, Ohmori T, Ueno SI.	4. 巻 16
2. 論文標題 ABCA7 Gene Expression and Genetic Association Study in Schizophrenia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychiatr Dis Treat.	6. 最初と最後の頁 441-446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/NDT.S238471. eCollection 2020.	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 Suga Y, Yoshimoto K, Numata S, Shimodera S, Takamura S, Kamimura N, Sawada K, Kazui H, Ohmori T, Morinobu S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Structural variation in the glycogen synthase kinase 3 and brain-derived neurotrophic factor genes in Japanese patients with bipolar disorders.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacol Rep.	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12083.	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 Okazaki S, Otsuka I, Numata S, Horai T, Mouri K, Boku S, Ohmori T, Sora I, Hishimoto A.	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 Schizophr.	6. 最初と最後の頁 4
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 Inoshita M, Umehara H, Watanabe SY, Nakataki M, Kinoshita M, Tomioka Y, Tajima A, Numata S, Ohmori T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Elevated peripheral blood glutamate levels in major depressive disorder.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropsychiatr Dis Treat.	6. 最初と最後の頁 945-953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/NDT.S159855. eCollection 2018.	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 Tominaga T, Tomotake M, Takeda T, Ueoka Y, Tanaka T, Watanabe SY, Kameoka N, Nakataki M, Numata S, Izaki Y, Sumitani S, Kubo H, Kaneda Y, Ohmori T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Relationship between social and cognitive functions in people with schizophrenia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropsychiatr Dis Treat.	6. 最初と最後の頁 2215-2224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/NDT.S171207. eCollection 2018	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 Numata S, Umehara H, Ohmori T, Hashimoto R.	4. 巻 9
2. 論文標題 Clozapine Pharmacogenetic Studies in Schizophrenia: Efficacy and Agranulocytosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1049-1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2018.01049. eCollection 2018.	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 Takeda T, Nakataki M, Ohta M, Hamatani S, Matsuura K, Yoshida R, Kameoka N, Tominaga T, Umehara H, Kinoshita M, Watanabe S, Numata S, Sumitani S, Ohmori T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Negative and positive self-thoughts predict subjective quality of life in people with schizophrenia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychiatr Dis Treat.	6. 最初と最後の頁 293-301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/NDT.S190381. eCollection 2019.	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 Kane C, Tomotake M, Hamatani S, Chiba S, Kameoka N, Watanabe S, Nakataki M, Numata S, Ohmori T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Clinical factors influencing resilience in patients with anorexia nervosa.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychiatr Dis Treat.	6. 最初と最後の頁 391-395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/NDT.S190725. eCollection 2019.	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10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 大森哲郎
2. 発表標題 うつ病診断の現状と今後
3. 学会等名 第16回日本うつ病学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe S, Umehara H, Tomioka Y, Kinoshita M, Nakataki M, Numata S, Ohmori T.
2. 発表標題 Effects of processing conditions on plasma L-glutamate levels in non-psychiatric healthy subjects.
3. 学会等名 6th Congress of AsCNP (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Ohta, Masahito Nakataki, Tomoya Takeda, Shusuke Numata, Takeo Tominaga, Naomi Kameoka, Hiroko Kubo, Makoto Kinoshita, Kanae Matsuura, Maki Ohtomo, Naoya Takeichi, Masafumi Harada, Tetsuro Ohmori.
2. 発表標題 Causal relationship between salience network dysfunction, depressed mood, and subjective quality of life in schizophrenia.
3. 学会等名 6th Congress of AsCNP (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅原英裕、渡部真也、中瀧理仁、沼田周助、大森哲郎
2. 発表標題 うつ病の末梢白血球におけるSGK1遺伝子発現
3. 学会等名 第15回日本うつ病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井下真利、梅原英裕、渡部真也、中瀧理仁、木下誠、富岡有紀子、田嶋敦、沼田周助、大森哲郎
2. 発表標題 うつ病患者の末梢血グルタミン酸濃度のメタ解析
3. 学会等名 第15回日本うつ病学会総会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 中瀧理仁、久保弘子、住谷さつき、沼田周助、亀岡尚美、渡部真也、梅原英裕、大田将史、原田雅史、大森哲郎
2. 発表標題 双極性障害患者におけるアミノ酸系神経伝達物質の異常
3. 学会等名 第15回日本うつ病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沼田周助
2. 発表標題 Plasma metabolomics of major depressive disorder.
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shusuke Numata
2. 発表標題 Elevated glutamate levels in blood in mood disorders.
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shusuke Numata
2. 発表標題 The future prospect on postmortem brain research; from the point of view of similarity and dissimilarity between blood and brain.
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukiko Tomioka, Hidehiro Umehara, Shin-ya Watanabe, Masahito Nakataki, Rumiko Masuda, Kazuaki Mawatari, Takeshi Nikawa, Akira Takahashi, Shusuke Numata, Tetsuro Ohmori.
2. 発表標題 Altered plasma metabolites related to one-carbon metabolism in schizophrenia.
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	沼田 周助  (NUMATA Shusuke)  (10403726)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授   (16101)	
研究分担者	渡部 真也  (WATANABE Shinya)  (90563825)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教   (16101)	

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
---------	---------