

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07946

研究課題名（和文）うつ病の鑑別診断を目指した糖タンパク質バイオマーカーの新たな展開

研究課題名（英文）Glycoprotein Biomarkers for Differential Diagnosis of Depression

研究代表者

山形 弘隆（Yamagata, Hiroataka）

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：10549934

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：レクチンを用いて、健常者およびうつ病患者の血漿タンパク質のプルダウンアッセイを行い、サンプルを電気泳動後に銀染色を行ったところ、4本のバンドが健常者と比較してうつ病患者で変化していることを発見した。これらのバンドを切り出し、質量分析を行ったところ、2つの糖タンパク質が有力な候補として同定された。このうち、1つのタンパク質については、ウェスタンブロットでもうつ病患者における変化が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病の診断は、ICD10やDSM-5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い。そのため、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。うつ病診断のための血漿バイオマーカーが同定されることで、プライマリーケア等でうつ病診断が容易かつ客観的に行えるようになる。血液検査でうつ病診断や他の精神疾患が鑑別できるようになれば、薬剤選択が容易となり、治療期間短縮が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：Using lectin, we performed a pull-down assay of plasma proteins from healthy and patients with depression. After electrophoresis of the samples and silver staining, we found that four bands were altered in patients with depression compared to healthy subjects. These bands were analyzed by mass spectrometry, and two glycoproteins were identified as strong candidates. One of the proteins was also found to be altered in patients with depression by Western blotting.

研究分野：精神科

キーワード：うつ病 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

うつ病の診断は、ICD10 や DSM-5 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い。そのため、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。

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、インターフェロンや IL-2 などのサイトカインは、糖鎖修飾によって生体内での活性が変わることが報告されている (Razaghi A et al. J Biotechnol. 2016., Ashina Y et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2015)。また、特定のタンパク質の糖鎖構造は、癌などのバイオマーカーとして有用であることも報告されている (Pinho SS et al. Nat Rev Cancer. 2015)。しかし、糖鎖構造はその複雑さゆえに(図1)近年まで解析する方法が限られていたため、うつ病患者における血漿糖鎖バイオマーカー探索はほとんど行われていなかった。

例えば、複数の研究室でうつ病バイオマーカーとして定量的な解析が行われているインターロイキン6 (IL-6) などのサイトカイン (Young JJ et al. J Affect Disord. 2014) や、脳由来神経栄養因子 (BDNF) (Kishi T et al. Front Psychiatry. 2018) においても、糖鎖修飾が行われることが知られている (Mowla SJ et al. J Biol Chem. 2001, Reif A et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2014)。しかし、このような主要なうつ病バイオマーカー候補のタンパク質でさえ、糖鎖を考慮した解析は当方が調べた限りでは行われていない。

以上のような知見から、タンパク質の単純な定量だけでなく、糖鎖修飾を含めた質的解析を組み合わせるバイオマーカー探索を行った方が、病態を反映する血漿タンパク質のバイオマーカーをより適切に同定できるのではないかという学術的な「問い」に至った。

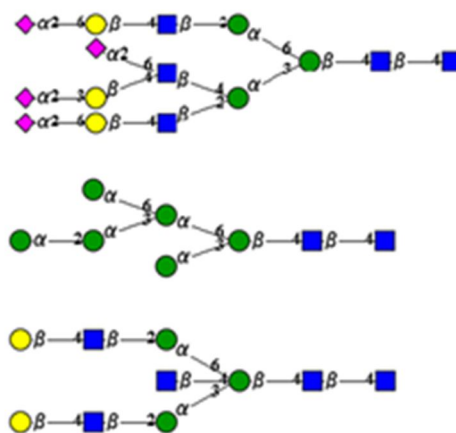


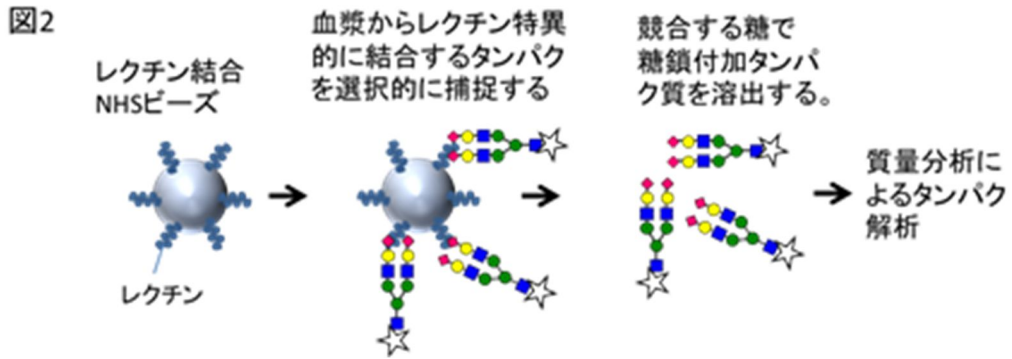
図1
糖鎖は、多様で複雑な構造をとりながら、個々の細胞に特異的な情報伝達や細胞間コミュニケーションなどの役割を果たしている。

2. 研究の目的

研究代表者は、糖鎖修飾された血漿タンパク質を定量することで、タンパク質の機能性に踏み込んだ解析が実現でき、うつ病の病態解明に繋がると考えて研究を行ってきた。その成果として、うつ病患者のうつ状態および寛解状態における血漿タンパク質の糖鎖構造を世界で初めて報告した (J Affect Disord. 233:79-85; 2018)。この報告で使用したレクチンアレイという手法は、様々な糖鎖構造に特異的に結合親和性を有する 45 種のレクチンを用いた解析である。複数ある糖鎖解析手法の中からレクチンアレイを用いた理由として、レクチンを用いたタンパク質のプルダウンアッセイを行うことにより、特定の糖鎖修飾が起こったタンパク質だけを精製できる点が挙げられる。夾雑物の多い未精製の血漿から、糖鎖変化を起こしているタンパク質を精製・同定することを見越して、これまでの研究を立案・遂行してきたことが本研究の土台となっている。また、うつ病患者の血漿解析結果を、うつ病モデルマウスを用いて検証している点も、臨床研究と基礎研究の融合を図ってきた研究代表者と当研究室の特色である。レクチンアレイの結果から、2-6 結合シアル酸構造 (Sia-alpha2-6Gal/GalNAc) が、うつ病モデルマウスおよびうつ病患者の両方において変化することが分かっているため、本研究では、まず 2-6 シアル酸修飾された血漿タンパク質の中から、うつ病バイオマーカーを同定することを目指す。同定された糖タンパク質をターゲットとした抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイ法を用いて、うつ病治療反応性や他の精神疾患との鑑別診断が可能なマーカーを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

2-6 シアル酸と親和性の高い *Salvia sclarea* agglutinin、*Sambucus nigra* agglutinin、*Trichosanthes japonica* agglutinin I などのレクチンを用いてプルダウンアッセイを行う (図2)。NHS ビーズは、任意のタンパク質を固定化させることが出来るため、特定のタンパク質に結合する物質を精製することが可能である。当大学の臨床研究センターで承認を得て既に集められた健常者、うつ状態のうつ病患者および寛解後のうつ病患者の血漿サンプルに、レクチンを固定化させたビーズを入れて糖タンパク質を結合させる。結合させたビーズを十分洗浄した後、特異的な糖鎖構造と競合的に溶出出来るラクトース溶液を用いて糖タンパク質のみを溶出させる。



溶出液中の糖タンパク質を電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した後、銀染色でうつ病患者に特異的な特定のバンドを同定する。同定したバンドをゲルから切り出し、高感度質量分析 (LC-MS/MS) により、精製した糖タンパク質を同定する。適切なマーカーが同定できない場合は、ショットガン解析などの網羅的な解析を用いる。うつ病患者で変化する糖鎖構造に結合するレクチンは既に 10 種類同定されており、それぞれのレクチンを用いたプルダウンアッセイも順次行う。

また、うつ病と双極性障害は治療法が異なるにも関わらず、うつ状態では鑑別することが非常に困難である。双極性障害患者の血漿サンプルを用いたレクチンアレイやレクチンプルダウンアッセイを行うことで、双極性障害患者特異的な糖タンパク質変化についても解析し、うつ病と双極性障害の鑑別診断が可能な糖タンパク質の同定を目指す。

同定された糖タンパク質について、ウェスタンブロット法で抗体反応性や定量性を確認し、使用できる抗体を同定する。レクチンアレイプレートに血漿タンパクを結合させた後、蛍光ラベルした抗体を用いて、マーカー候補として同定された糖タンパク質をサンドイッチし、蛍光を測定することで、簡便にレクチンに結合した特定の糖タンパク質を定量することが出来る。この方法を用いて、うつ病の診断マーカーとして再現性などを検証する。

4. 研究成果

Trichosanthes japonica agglutinin I を用いてプルダウンアッセイを行い、溶出液中の糖タンパク質を電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した後、銀染色でうつ病患者に特異的な特定のバンドを予備的実験で確認したところ、うつ病患者に特異的な複数のバンドが得られた (図3)。

高感度質量分析 (LC-MS/MS) により、精製した糖タンパク質を同定したため、Trichosanthes japonica agglutinin I でプルダウンしたサンプルを用いて、同定された特定タンパク質をウェスタンブロット解析で検出したところ、同定されたタンパク質の発現を確認できた。うつ病患者のうつ状態と寛解状態との比較において、4 名中 3 名は明らかな差が認められた (図4) が、健常者との比較については個体差が大きく、バイオマーカーとしての利用を検討するには、多くのサンプルを用いて感度、特異度を確認する必要がある。

図3
健常者 うつ病

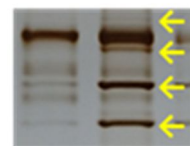
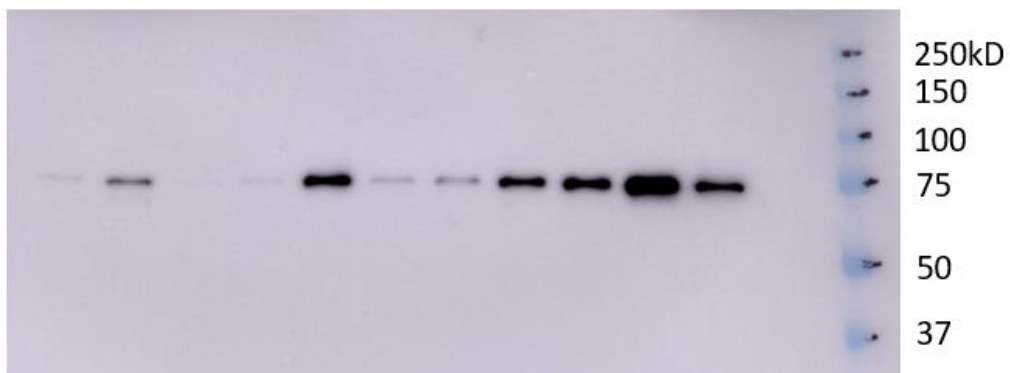


図4 HC:健常者 Dep:うつ状態うつ病患者 Rem:寛解状態うつ病患者

HC1 Dep1 Rem1 HC2 Dep2 Rem2 HC3 Dep3 Rem3 HC4 Dep4 Rem4



そこで、大量のサンプルを扱うための ELISA 実験系を構築するため、同定されたタンパク質についてタンパク定量 ELISA キットが構築できるか検討した。アフィニティープレートにレクチンを固着させ、段階希釈した健常者血漿を反応させた。目的タンパク質に対する一次抗体および

HRP 標識された二次抗体を負荷した。発色基質を入れてマイクロプレートリーダーを用いて定量性の検討を行ったが、段階希釈した健常者血漿では適切な検量線を引くことが出来なかった。ブロッキング剤やプレートなどの種類を変えて、条件検討を繰り返したが、ELISA による定量実験系の構築が困難であった。この結果から、糖タンパク質を用いたうつ病バイオマーカーの可能性は示せたものの、定量的な解析および実用に対する課題が浮き彫りとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Yamagata Hirotaka et.al	4. 巻 9
2. 論文標題 Interferon signaling and hypercytokinemia-related gene expression in the blood of antidepressant non-responders	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e13059 ~ e13059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e13059	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 Sakai Yusuke, Li Haiyan, Inaba Hiromichi, Funayama Yuki, Ishimori Erina, Kawatake-Kuno Ayako, Yamagata Hirotaka, Seki Tomoe, Hobara Teruyuki, Nakagawa Shin, Watanabe Yoshifumi, Tomita Susumu, Murai Toshiya, Uchida Shusaku	4. 巻 24
2. 論文標題 Gene-environment interactions mediate stress susceptibility and resilience through the CaMKII /TARP -8/AMPA pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102504 ~ 102504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102504	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 Ayumu Yamashita, Yuki Sakai, Takashi Yamada, Noriaki Yahata, Akira Kunimatsu, Naohiro Okada, Takashi Itahashi, Ryuichiro Hashimoto, Hiroto Mizuta, Naho Ichikawa, Masahiro Takamura, Go Okada, Hirotaka Yamagata	4. 巻 12
2. 論文標題 Common Brain Networks Between Major Depressive-Disorder Diagnosis and Symptoms of Depression That Are Validated for Independent Cohorts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychiatry	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) 10.3389/fpsy.2021.667881	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 Yamagata Hirotaka, Kobayashi Ayumi, Tsunedomi Ryouichi, Seki Tomoe, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Optimized protocol for the extraction of RNA and DNA from frozen whole blood sample stored in a single EDTA tube	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-96567-2	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 Seki Tomoe, Yamagata Hirotaka, Uchida Shusaku, Kobayashi Ayumi, Watanabe Yoshifumi, Nakagawa Shin	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel mouse model of postpartum depression using emotional stress as evaluated by nesting behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-02004-9	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 Ichihashi Kayo, Kyou Yoshitaka, Hasegawa Naomi, Yamagata Hirotaka, et al.	4. 巻 69
2. 論文標題 The characteristics of patients receiving psychotropic pro re nata medication at discharge for the treatment of schizophrenia and major depressive disorder: A nationwide survey from the EGUIDE project	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Psychiatry	6. 最初と最後の頁 103007 ~ 103007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajp.2022.103007	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 Funayama Yuki, Li Haiyan, Ishimori Erina, Kawatake-Kuno Ayako, Inaba Hiromichi, Yamagata Hirotaka, Seki Tomoe, Nakagawa Shin, Watanabe Yoshifumi, Murai Toshiya, Oishi Naoya, Uchida Shusaku	4. 巻 -
2. 論文標題 Antidepressant Response and Stress Resilience Are Promoted by CART Peptides in GABAergic Neurons of the Anterior Cingulate Cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological Psychiatry Global Open Science	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) 10.1016/j.bpsgos.2021.12.009	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 Yamagata Hirotaka, Ogihara Hiroyuki, Matsuo Koji, Uchida Shusaku, Kobayashi Ayumi, Seki Tomoe, Kobayashi Masaaki, Harada Kenichiro, Chen Chong, Miyata Shigeo, Fukuda Masato, Mikuni Masahiko, Hamamoto Yoshihiko, Watanabe Yoshifumi, Nakagawa Shin	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct epigenetic signatures between adult-onset and late-onset depression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81758-8	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 Yamashita Ayumu, Sakai Yuki, Yamada Takashi, Yahata Noriaki, Kunimatsu Akira, Okada Naohiro, Itahashi Takashi, Hashimoto Ryuichiro, Mizuta Hiroto, Ichikawa Naho, Takamura Masahiro, Okada Go, Yamagata Hirotaka et.al	4. 巻 18
2. 論文標題 Generalizable brain network markers of major depressive disorder across multiple imaging sites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000966	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 Iida Hitoshi, Iga Junichi, Yamagata Hirotaka et.al	4. 巻 74
2. 論文標題 Unmet needs of patients with major depressive disorder; Findings from the 'Effectiveness of Guidelines for Dissemination and Education in Psychiatric Treatment (EGUIDE)' project: A nationwide dissemination, education, and evaluation study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 667 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.13143	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 Yamagata Hirotaka, Nakagawa Shin	4. 巻 32
2. 論文標題 Glycosylation and Depression - A Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 J133 ~ J136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.2002.1J	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 Yamagata Hirotaka, Nakagawa Shin	4. 巻 32
2. 論文標題 Glycosylation and Depression - A Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E157 ~ E160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.2002.1e	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 Koan Ibuki, Nakagawa Takumi, Chen Chong, Matsubara Toshio, Lei Huijie, Hagiwara Kosuke, Hirotsu Masako, Yamagata Hirotaka, Nakagawa Shin	4. 巻 12
2. 論文標題 The Negative Association Between Positive Psychological Wellbeing and Loss Aversion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychology	6. 最初と最後の頁 641340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpsyg.2021.641340	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山形弘隆
2. 発表標題 抗うつ薬治療反応を予測する生物学的マーカーの探索
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井優子, 山形弘隆, 關友恵, 長谷川尚美, 橋本亮太, 中川伸
2. 発表標題 EGUIDEプロジェクトによる統合失調症患者・うつ病患者に対する外来処方の変化
3. 学会等名 第34回総合病院精神医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 正明, 山形 弘隆, 萩原 康輔, 兼行 浩史, 中川 伸
2. 発表標題 初発躁病エピソードで月経周期との関連から周期性精神病と診断した1例
3. 学会等名 第116回日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水本 智大, 小林 正明, 武井 光, 根本 壤, 山形 弘隆, 松尾 欣哉, 佐野 泰照, 中川 伸
2. 発表標題 抗NMDA受容体脳炎の攻撃性、食欲増進にトピラマートが有効だった1例
3. 学会等名 第116回日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2020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	關 友恵 (Sekii Tomoe) (50821865)	山口大学・医学部・特別医学研究員 (15501)	

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