

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月18日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011年度～2012年度

課題番号：23791337

研究課題名（和文）末梢白血球遺伝子発現を利用したうつ病診断キットの作成

研究課題名（英文）Biological diagnostic test for major depressive disorder based on the leukocytes gene expression

研究代表者 伊賀 淳一（IGA JUN-ICHI）

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号 70363140

研究成果の概要（和文）：

【目的】末梢血白血球中の複数の遺伝子発現パターンを利用したうつ病の診断バイオマーカーの検討を行った。

【対象・方法】25名の未治療のうつ病患者と性・年齢をマッチさせた25名の健常対照者を対象とし、40の候補遺伝子の遺伝子発現パターンに基づいて、うつ病と健常対象者を弁別することを試みた。

【結果】うつ病で有意に発現量の変化が認められた13の遺伝子の発現量を用いてMDD-scoreを算出し、うつ病と健常対象者との弁別を試みたところ、感度:72%、特異度:84%で両者を弁別することが可能であった。

【考察】うつ病診断におけるバイオマーカーとして末梢血白血球の遺伝子発現パターンが利用できる可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：

[Introduction] The goal of present work was to test the performance of a composite, multi-assay diagnostic test for MDD based on the leukocyte gene expression profiles.

[Methods] 25 patients, who met criteria for MDD were eligible for enrollment in this study. 25 non-depressed healthy individuals to serve as a control group were recruited from Tokushima University Hospital. We examined the levels of 40 gene expressions simultaneously using custom-made PCR plate.

[Results] 13 gene expressions were significantly changed in MDD. MDD score demonstrated a sensitivity and specificity of 72% and 84%, respectively, in differentiating between MDD patients and healthy subjects.

[Discussion] Further research is needed to confirm the performance of the test in other independent samples of patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：うつ病、白血球、遺伝子発現、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

うつ病をうつ病と正しく判定する診断率はプライマリーケア医師の場合では 50%程度に留まり、残る 50%は見落とされる。またうつ病でないものをうつ病でないと正しく除外する確率は 80%程度であり、20%程度は過剰診断されると言われている (Mitchell AJ et al. Lancet 2009)。専門医の診断精度はこれをはるかに上回るにしても、気分障害の診療にプライマリーケア医師の関与が必要な現状を考えれば、相当数の過少診断と過剰診断が横行していると想定せざるをえない。診断補助のための生物学的診断マーカーの確立と臨床導入は、気分障害の診療レベルの向上に大きく寄与することに疑いはない。

気分障害の基盤には脳内機能変調が存在するが、その影響は神経内分泌系、神経免疫系、自律神経系を通して全身に及んでいる。その影響を的確に把握して、生物学的マーカーとして役立てようとする研究はこれまでも数多い。中でも視床下部・下垂体・副腎皮質系 (HPA 系) の機能亢進は詳細に研究が続けてられており、末梢組織 (末梢血など) を利用した気分障害の分子マーカーも研究手法の発展に伴い新しい知見が蓄積されてきている。

現在まで、大うつ病に関する診断的バイオマーカーは確立されておらず、客観的指標に乏しいことがその適切な診断・治療を困難にしている。患者はまずプライマリーケア医を受診することが多く、精神科医でなくても早期診断に応用できる簡便かつ客観的な指標は、大うつ病の発見率と治療率を向上させようと考えられる。

2. 研究の目的

近年、大うつ病患者の白血球において、発現が変化している遺伝子が複数報告されてきている (Iga J et al. Ann Med 2008)。しかし、いずれの遺伝子発現の変化も、単一で疾患の診断に結びつくような大きな検出力は有していない。そこで今回我々は末梢血白血球における複数の遺伝子発現パターンを利用した大うつ病の診断的バイオマーカーの作成について検討を行った。

3. 研究の方法

DSM-IVの診断基準に基づいて大うつ病と診断された未服薬の患者 25 名と性・年齢をマッチさせた健常対象者 25 名で検討した。末梢血白血球から、QIAGEN 社の PAX gene 採血管を用いて total RNA を抽出し、NanoDrop を用いて質と濃度を確認した後、逆転写反応から cDNA を作成した。大うつ病への関連が示唆される遺伝子を約 40 種搭載した PCR array を作成し、これら遺伝子群の発現を real-time PCR 法で同時測定した。候補遺伝子の選定基準としては、①大うつ病患者においてその発現が変化していることが既に報告されている遺伝子、②健常人に炭酸リチウムを投与した際にマイクロアレイで発現の変化が確認できた遺伝子、③予備実験において末梢血白血球で定量に十分な発現が確認できたうつ病の候補遺伝子とした。内在性コントロールとして 6 つの遺伝子発現の測定を行い、解析には最も発現が安定していた GAPDH 遺伝子をコントロールとして用いた。

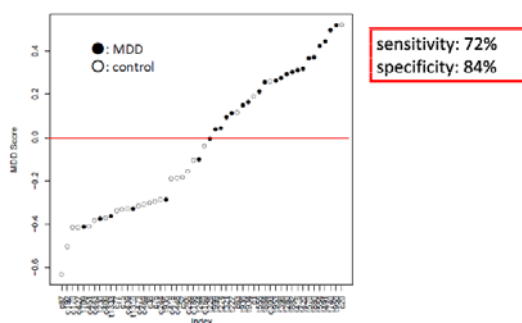
測定の結果、大うつ病群で発現の変化が見られた遺伝子を抽出し、これらの発現量を用いて大うつ病群と健常対象群の弁別を試みた。

定量的 real time PCR 解析は ABI 社の 7500

Fast Real Time PCR System を用いて実施した。大うつ病群と健常対象群とのそれぞれの遺伝子発現量の違いについて t 検定 (two-tailed, $\alpha=0.05$) を行い比較した。両群で発現の異なる ($p<0.05$) 遺伝子を抽出し、これらから MDD-Score を算出した (Scherzer CR et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 2007)。MDD-score が正であれば大うつ病、負であれば健常対象とし、うつ病と健常対象者の判別を行った。

4. 研究成果

PCR array を用いた発現解析の結果、40 の候補遺伝子のうち、大うつ病群と健常対象群間で 13 の遺伝子発現に有意差が見られた。これら 13 の遺伝子発現を用いて、それぞれの sample の MDD-score を算出し、大うつ病群と健常対象群の弁別を試みたところ、感度:72%、特異度:84%で両者を弁別することが可能であった(下図)。



大うつ病に対する生物学的バイオマーカーとして広く注目を集めたデキサメサゾン抑制試験の感度は約 40~50%、特異度は約 70~90% (Arana et al. Arch Gen Psychiatry. 1985)、DEX/CRH test は感度 61%、特異度 71%であったことが報告されている。(Watson S et al. Psychoneuroendocrinology 2006)。これらのテストの服薬と継時的採血の負担は、臨床応用のネックとなる。一方、末梢血白血

球の mRNA の発現をバイオマーカーは、試料は数 ml の末梢血で十分であり、通常診療で行われる血液検査と同様の手間と負担しか要さず、臨床応用における大きな強みとなる。今後は異なるコホートでの再試験を実施し、結果の再現性について検証する必要があると思われる。

末梢血白血球の遺伝子発現の測定にはいくつかの利点がある。タンパク質と異なり mRNA が物質的に比較的安定で保存がきくこと、どの遺伝子も同じ方法で短時間に解析できること、DNAチップやPCRアレイを使用すれば多数の遺伝子発現を同時に測定できること、試料は数ミリリットル以下の通常採血で十分であること、したがって患者の治療前後での遺伝子発現の変化など複数回にわたって検討することができることなどである。われわれのグループはこのような利点に注目して、DNAチップを利用したうつ病マーカーの可能性を検討している。一方、問題点として、白血球をまとめて解析すれば採血量が少量ですむが白血球分画の変化の影響を被ること、これを避けるために分画を分けると採血量が著増し手順が煩雑化すること、薬物や食事などの影響を考えなければならないこと、炎症反応などうつ病以外の影響を考慮する必要があることなどがあげられる。また発現量に変化のある遺伝子の白血球での役割が不明である場合、うつ病の病態との関連性を検討する必要がある。さらにはDNAチップのような網羅的方法では万単位の遺伝子が一括測定できる利点と裏腹に、測定系と解析法の確立と維持に労力とコストを要することなどの問題が残っている。診察室で使用できる診断マーカーとするにはまだ検討が必要である。

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 Morigaki R, Nakataki M, Kawarai T, Lee LV, Teleg RA, Tabuena MD, Mure H, Sako W, Pasco PM, Nagahiro S, Iga J, Ohmori T, Goto S, Kaji R: Depression in X-linked dystonia-parkinsonism: A case-control study. Parkinsonism Relat Disord ;2013
- ② Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Ono S, Imamura A, Iga J, Watanabe S, Kikuchi K, Kubo H, Nakataki M, Sumitani S, Imoto I, Okazaki Y, Ohmori T: DNA methylation signatures of peripheral leukocytes in schizophrenia. Neuromolecular Med 15:95-101,2013
- ③ 伊賀淳一、大森哲郎：双極性うつ病の鑑別診断、精神科、22、50-54、2013
- ④ Watanabe SY, Iga J, Numata S, Nakataki M, Tanahashi T, Itakura M, Ohmori T: Association Study of Fat-mass and Obesity-associated Gene and Body Mass Index in Japanese Patients with Schizophrenia and Healthy Subjects. Clin Psychopharmacol Neurosci 10:185-189,2012
- ⑤ 伊賀淳一、大森哲郎：Lithium の作用メカニズムはどこまで分かったのか？臨床精神薬理、15、1451-1459、2012
- ⑥ 伊賀淳一、大森哲郎：生物学的マーカーの臨床的応用と限界、精神科治療学、27、59-65、2012

[学会発表] (計3件)

- ① Junichi Iga: Biomarkers and drug response makers for mood disorders from human leukocytes gene expression, WFSBP Congress Kyoto 2013 (2013年06月23日～2013年06月27日)国立京都国際会館 (京都府)
- ② 伊賀淳一：リチウム投与による末梢白血球遺伝子発現の変化—マイクロアレイを用いた解析、Neuro2013 (2013年06月20日～2013年06月23日)国立京都国際会館 (京都府)
- ③ 伊賀淳一：白血球遺伝子発現を指標としたリチウムの精神薬理学的研究、第22回日本臨床精神神経薬理学会(2012年10月18日～2012年10月20日)栃木県総合文化センター(栃木県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊賀 淳一 (IGA JUN-ICHI)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部
・講師
研究者番号：70363140

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：