

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790541

研究課題名(和文) DNAメチル化をマーカーとした抗うつ薬個別化適正医療の基盤構築

研究課題名(英文) Prediction of the responsiveness to antidepressants by DNA methylation in patients with major depression

研究代表者

南畝 晋平 (Nonen, Shinpei)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：40467527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：抗うつ薬反応性の個人差を予測しうるDNAメチル化部位を特定することを目的とした。パロキセチンを服用している患者を対象に、まず少数例でのスクリーニング解析を行い、脳由来神経栄養因子(BDNF)、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、セロトニントランスポーター(5-HTT)、セロトニン1A受容体(5-HT1A)遺伝子上流領域から、抗うつ薬反応性に関連するCpG領域の候補を特定した。次に、パロキセチン服用患者60名を対象に特定したDNAメチル化部位についてさらに解析を行った。その結果、BDNFのメチル化とパロキセチン反応性との間に相関が認められた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the DNA methylation marker associated with inter-individual difference in therapeutic efficacy observed in the clinical use of antidepressants, we performed DNA methylation analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), serotonin transporter (5HTT) and Serotonin receptor 1A (5HT1A) in the patients with major depressive disorder. We first performed screening analysis of DNA methylation levels of 104 CpG sites in these 4 genes in patient with response and non-response to paroxetine. Next, in 60 patients treated with paroxetine, we investigated the association between DNA methylation level of CpG sites detected by screening analysis and efficacy of paroxetine. We detected one CpG site in BDNF gene related to response to paroxetine.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ファーマコゲノミクス メチル化 うつ病 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

現代社会のストレス、社会の価値観の多様化により、うつ病は年々増加の一途を辿っている。うつ病は自殺の主な原因となる疾患であり、適切な治療・管理が欠かせない。うつ病に対する第一選択薬として、セロトニン選択的再取り込み阻害薬 (SSRI) やセロトニン/ノルエピネフリン再取り込み阻害薬 (SNRI) が汎用され、成果を上げているが、SSRI/SNRI の効果・副作用発現には著しい個人差が存在することが問題となっている。SSRI/SNRI の効果発現には 4~6 週間の期間が必要なことから、非反応群 (ノンレスポnder) への投与は早期治療の機会を逃すことになる。また服薬中に副作用が発現すると、患者が服薬を自己中断しうつ症状を悪化させ、その後の治療に苦慮することとなる。以上の観点から、投与前に各患者に適切な薬剤選択・投与量決定の為のエビデンス構築が求められている。

これまで、薬物の効果・副作用発現の個人差を予測する試みとして、遺伝子多型情報を基にしたファーマコゲノミクス (PGx) 研究が行われてきた。しかしながら、PGx 研究の成果が臨床応用されるには至っていない。その理由として、薬物の効果・副作用発現の予測精度が低いことが挙げられる。この予測精度を上げるためには、従来の PGx 研究とは異なるアプローチを取ることが必要となる。

近年、精神疾患とエピゲノム (DNA メチル化、ヒストンアセチル化) との関連に注目が集まっている。死後脳研究により、アルツハイマー患者や統合失調症患者では、健康成人と比べて脳の特定遺伝子領域の DNA メチル化状態が異なっていることが明らかにされている。しかしうつ病については、死後脳バンクの整備が著しく遅れており、エピゲノム研究が進んでいないのが現状である。また、神経細胞の DNA メチル化の程度に個人差が存在することが明らかにされている。

このような状況の中、末梢血における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の遺伝子上流領域の DNA メチル化の程度が、うつ病患者と健康成人との間で大きく異なり、うつ病を予測するマーカーとして利用可能であることが報告された (PLoS One. 2011;6(8):e23881.)。本来、DNA メチル化の状態は組織により異なると考えられるため、脳での DNA メチル化が検討されるべきであるが、臨床応用を考えた場合、脳組織を扱うのは不可能である。この報告は、末梢血の DNA メチル化状態から抗うつ薬の反応性・副作用発現を予測可能であること、その臨床応用が可能であることを期待させる。

2. 研究の目的

SSRI/SNRI の効果発現に関連する候補遺伝

子を選出し、効果発現の個人差に影響を与える DNA メチル化領域を特定する。特定した DNA メチル化領域及びこれまでに明らかにしてきた、SSRI/SNRI の効果発現の個人差が予測可能な遺伝子多型を組み合わせて、より精度の高い効果発現個人差の予測法を確立する。

3. 研究の方法

SSRI であるパロキセチンを服用しているうつ病患者 60 名を対象にした。投与前と投与 6 週後のハミルトンうつ病評価尺度 (HAM-D) を測定することにより、パロキセチン有効性を評価した。具体的には、

$$\text{改善率} = \frac{\text{投与前の HAM-D スコア} - \text{投与 6 週後の HAM-D スコア}}{\text{投与前の HAM-D スコア}}$$

で改善率を定義した。

パロキセチン効果発現の個人差に影響を与える DNA メチル化領域の特定については、第一段階として、反応性が高い患者 (レスポnder群; R 群) と低い患者 (ノンレスポnder群; NR 群) を対象に、候補遺伝子の DNA メチル化状態を解析した。候補遺伝子として、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、セロトニントランスポーター (5-HTT)、セロトニン受容体 (5-HT1A) を挙げた。この 4 遺伝子に存在する計 104 ケ所のメチル化部位を解析した。R 群、NR 群各 5 例を解析対象にする予定であったが、改善率が 100% の被験者が 8 例存在したので、R 群 8 例、NR 群 5 例を対象とした。第一段階の DNA メチル化比率測定は、被験者の末梢血ゲノム DNA をバイサルファイト処理、PCR、*in vitro* transcription の後、質量分析器を用いて行った。R 群と NR 群で DNA メチル化比率に違いが認められた部位に関して、第二段階として、メチル化感受性制限酵素処理、リアルタイム PCR 法を用いて、60 名の DNA メチル化比率を解析し、パロキセチン効果発現の個人差と相関が認められるか検討した。

4. 研究成果

第一段階の解析について、対象被験者の背景を表 1 に示す。

表 1 R、NR 群の被験者背景

	R 群 (n=8)	NR 群 (n=5)	P 値
年齢 (歳)	50.6 ± 12.5	52.6 ± 9.1	0.77
性別 (男/女)	5/3	1/4	0.18
投与前の HAM-D	18.4 ± 4.63	23 ± 3.54	0.83
改善率 (%)	100 ± 0.00	7.0 ± 14.8	<0.001

R 群、NR 群間で、年齢、性別、投与前の HAM-D スコアに有意な差は認められなかった。この解析の結果、104 ヶ所中 9 ヶ所の DNA メチル化部位がパロキセチン効果発現に関与している可能性が示唆された (BDNF; 6 ヶ所、GDNF; 1 ヶ所、5-HTT; 2 ヶ所)。このうち、BDNF について図 1 に示す。

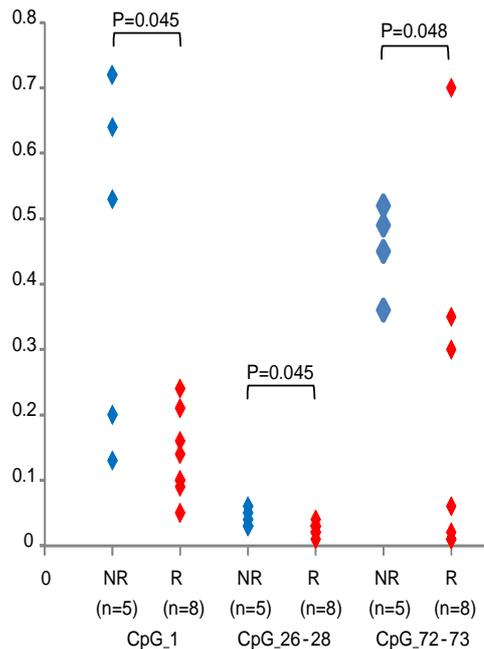


図 1 メチル化比率の比較 (縦軸はメチル化比率)

哺乳類では、塩基配列「...NNNCGNN...」の「C」がメチル化される。CpG_1 (p はリン酸を示している)の位置を図 2 に示す。

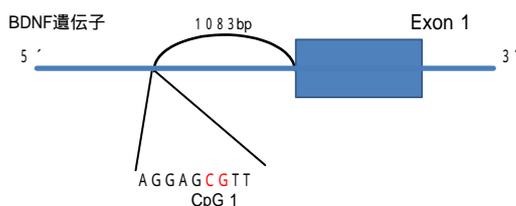


図 2 BDNF CpG_1 の位置

この位置から、下流に向かって「CG」のある場所に番号を付けている。

次に、BDNF CpG_1 について、第二段階の検討を行った。被験者 60 名の BDNF CpG_1 メチル化比率を測定し、低い順から均等に 3 群に分類した。3 群間での被験者背景を表 2 に示す。各群間での年齢・性別・投与前の HAM-D について有意差は認められなかった。この 3 群間でパロキセチン投与による HAM-D 改善率を比較したが、有意な HAM-D 改善率の差は認められなかった (図 3)。

我々は、これまでにセロトニントランスポーター遺伝子のプロモーター領域に存在する 43 塩基の挿入 (L 型) / 欠失 (S 型) 多型 (5HTTLPR) が、SSRI 効果発現の個人差に影響を及ぼすことを明らかにしている。具体的には、S/S 型の患者ではそれ以外の患者に比

表 2 BDNF CpG_1 メチル化比率により分類した被験者の背景因子

	1 群 (n=20)	2 群 (n=20)	3 群 (n=20)	P 値
年齢 (歳)	41.6 ± 16.2	47.3 ± 13.6	44.7 ± 15.5	0.50
性別 (男/女)	13/7	8/12	9/11	0.28
投与前の HAM-D	20.5 ± 5.2	21.7 ± 4.7	23.2 ± 5.5	0.27
メチル化比率	0.075 ± 0.015	0.11 ± 0.079	0.19 ± 0.16	<0.001

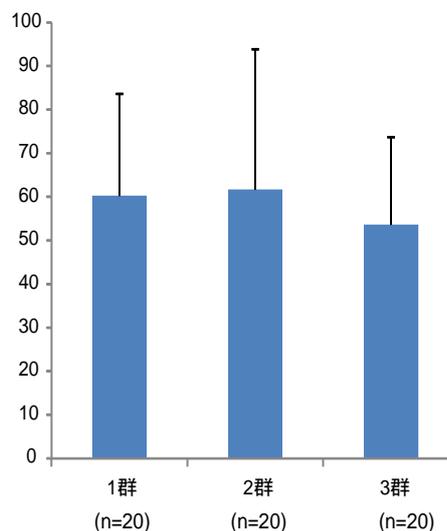


図 3 BDNF CpG_1 メチル化比率と HAM-D 改善率 (縦軸は HAM-D 改善率)

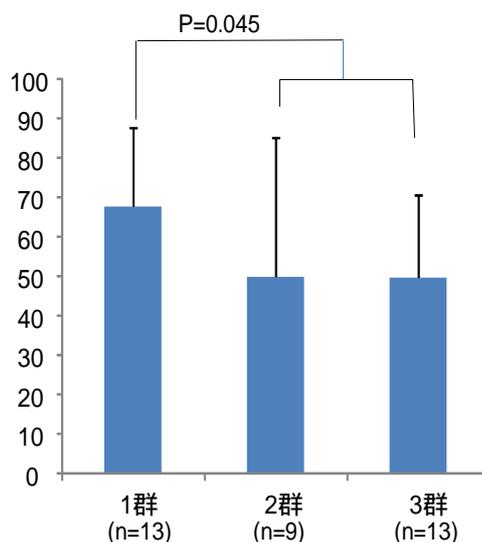


図 4 BDNF CpG_1 メチル化比率と HAM-D 改善率 (5HTTLPR S/S 型を対象、縦軸は HAM-D 改善率)

べて SSRI が効きにくいことが示唆されている。そこで全被験者 (60 名) の 5HTTLPR の判定を行い、S/S 型の被験者のみを対象に再度

BDNF CpG_1 メチル化と HAM-D 改善率との関連を検討した。その結果、メチル化比率の低い群の方が HAM-D 改善率が高いということが示唆された(図4)。

パロキセチンの有効性がみられた群 (HAM-D 改善率が 50%以上) では、投与後に血中 BDNF 濃度が上昇するという報告があり (吉村玲児 他 精神経誌 2007) パロキセチンが BDNF の発現を誘導している可能性が考えられる。一方、パロキセチン投与前の血中 BDNF 濃度では有効性を予測することはできなかったとも報告されている (Yoshimura R et al., Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2011)。本検討では、パロキセチン投与前の末梢血由来ゲノム DNA を用いてメチル化解析を行っている。このことから、BDNF CpG_1 のメチル化比率が低い群では、パロキセチン投与による BDNF 発現の誘導がかかりやすく、効果も得やすいのではないかと考えられる。

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1件)

Kato M, Nonen S, Serretti A, Tetsuo S, Takekita Y, Azuma J, Kinoshita T. 5-HTTLPR rs25531A > G differentially influence paroxetine and fluvoxamine antidepressant efficacy: a randomized, controlled trial. J Clin Psychopharmacol. 査読有 2013;33(1): 131-132. doi:10.1097/01.jcp.0000426182.66701.76.

[学会発表](計2件)

竹内唯希、南畝晋平 他、BDNF 遺伝子のメチル化とパロキセチン治療反応性との関連、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 30 日、熊本市総合体育館 (熊本市)

南畝晋平、加藤正樹 他、抗うつ薬反応性個人差におけるセロトニントランスポーター (5-HTT) プロモーター領域上の遺伝子多型の影響、第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2013 年 10 月 24 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南畝 晋平 (NONEN Shinpei)
兵庫医療大学・薬学部・講師
研究者番号: 40467527

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし