

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460650

研究課題名(和文) 抗うつ薬の炎症抑制作用に基づくうつ病の新しい治療戦略と個別化治療への応用

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for major depression based on anti-inflammatory action of antidepressants and application to personalized medicine

研究代表者

塚元 和弘 (TSUKAMOTO, Kazuhiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：30253305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：SSRI/SNRI単独治療を受けたうつ病患者を8週後の治療効果で2群に分け、34個の候補遺伝子内の161個の一塩基多型の出現頻度を比較する相関解析を行った結果、9個のSSRIの治療抵抗性遺伝子と2個のSNRIの治療抵抗性遺伝子を同定した。

多変量解析でも相関を認められた5個の一塩基多型を複数組み合わせさせた中で、「FRS3 + RET」の組み合わせが遺伝子診断のバイオマーカーとして最も有用であった。また、ルシフェラーゼアッセイ法でTNFRSF1Bのrs1061624の両対立遺伝子間で発現量に有意差を認め、治療薬の標的分子になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuroinflammation and neuroplasticity contribute to the pathogenesis of major depression (MD) as well as response to antidepressant(s). In this study, in order to identify responsibility genes to antidepressant, we examined an association between polymorphisms of 161 single nucleotide polymorphisms in the 34 candidate genes and the therapeutic effect of antidepressant (SSRI or SNRI) at the period of 8-week treatment using 105 Japanese MD patients. We identified 9 SSRI-resistant responsibility genes and 2 SNRI-resistant responsibility genes.

Genetic test revealed that the best combination of polymorphisms of FRS3 and RET is useful as a biomarker for identifying non-responders to SSRI after 8-weeks treatment. Moreover, since the dual-luciferase assay showed the difference in transcriptional activity between C allele and G allele of rs1061624 in TNFRSF1B in Jurkat cells, this receptor may become a target molecule for a novel drug against SSRI-resistant MD patients.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：うつ病 抗うつ薬 薬剤応答性遺伝子 うつ病の病因論 相関解析 遺伝子診断 ゲノム創薬

1. 研究開始当初の背景

うつ病は、持続的な抑うつ感と興味や喜びの喪失を主訴とし、多岐にわたる精神症状と身体症状を呈する精神疾患である。発症機序は明らかでないが、遺伝的因子と環境因子の両方が関与している。患者数は近年著しく増加し、生涯有病率は 6.2% と高い。うつ病は、患者の社会生活に大きな障害を来し、巨額の社会的な経済損失を招くだけでなく、自殺の主要な原因(約半数)として深刻な社会問題となっている。自殺リスクはうつ病の難治化や重症度に依存し、パニック障害や統合失調症などの他の精神疾患の併発によってうつ病の治療は難治化しやすくなる。

うつ病の治療は薬物療法・精神療法・休養を基本とする。認知行動療法や心理療法などの精神療法は薬物療法と併用して行われる。薬物療法では、第一選択薬として選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)の第2世代抗うつ薬が用いられる。しかし、いずれの抗うつ薬も治療効果発現までに数週間を要し、その効果には個人差がある。2ヶ月後で治療効果を認める患者は約 2/3 で、治療効果を認めた患者であっても、1年後になるとその約半数は再発し、増悪と寛解を繰り返して難治性となる。したがって、治療初期より長期予後を見据えて個々の患者に最適な抗うつ薬を選択するバイオマーカーの同定は、治療戦略上において重要かつ有用と思われる。

治療効果の個人差を規定している遺伝子(治療感受性あるいは治療抵抗性遺伝子)として、チトクローム P450 酵素、解毒酵素、神経伝達物質とその合成酵素、ABC トランスポーター、セロトニン受容体やアドレナリン受容体等が同定されている。近年、第2世代抗うつ薬の新しい薬理作用として抗炎症作用が示唆されたことから、神経炎症に関連する遺伝子(炎症性サイトカインとそのシグナル経路および炎症により誘導される活性酸素種の除去に関連する遺伝子)や神経可塑性に関連する遺伝子は、抗うつ薬の治療感受性あるいは治療抵抗性遺伝子の候補であるという作業仮説を立てた。神経炎症や神経可塑性に関連する遺伝子の機能解析から新しいうつ病の病態を解明し、解明した病態からゲノム創薬や個別化治療への応用を試みる。

2. 研究の目的

本研究では、候補遺伝子の一塩基多型(SNPs)と SSRI/SNRI の治療効果との相関解析を行い、治療感受性あるいは治療抵抗性遺伝子を同定する。さらに、抗うつ薬の治療感受性あるいは治療抵抗性を予測するバイオマーカーとしてこれらの多型の有用性を検証する。最後に、関連した SNPs の中から *in silico* 解析で機能している可能性の高い SNPs を絞り込み、ルシフェラーゼアッセイ法にて機能性 SNPs を同定する。

3. 研究の方法

(1) 西脇病院において大うつ病性障害(双極性障害を除く)と診断され、第2世代抗うつ薬(SSRI/SNRI)の単剤治療を4週間以上受けている105名の患者を対象とした。そのうち、SSRI 単剤治療患者は58名で、SNRI 単剤治療患者は24名であった。

本研究は長崎大学ヒト・ゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会より承認されている。文書によるインフォーム・ドコンセントを行い、本人より同意を得て採血を行った。患者の試料(血液)および臨床情報は情報管理者を介して連結可能で匿名化されている。匿名化された血液から、DNA エキストラクター-WB-ラビッドキットまたは NucleoSpin Blood を用いて DNA を抽出した。

(2) 各抗うつ薬による治療効果は治療経過から判断した。抗うつ薬投与開始から8週間後の時点で、症状が改善して寛解し、治療が継続されていた場合を「効果あり：治療感受性群」とし、一方、症状の悪化で投薬の変更があった場合を「効果なし：治療抵抗群」と判定した。投与日数が4週未満で効果が未発現である場合や副作用による投与中止の場合を対象から外した。

(3) International HapMap project のデータベースを参照し、候補遺伝子内とその上流 2 kb を加えた領域において、日本人で報告されている SNPs のうち、対立遺伝子の出現頻度が 0.20 以上の SNPs を抽出した。Haploview 4.3 ソフトウェアを用いて抽出した SNPsの中から解析対象 SNPs を選出した。また、遺伝子の発現や機能に影響を与えることが報告されている SNPs も解析対象 SNPs に加えた。

本研究では 34 個の候補遺伝子内の 161 個の SNPs を解析した。候補遺伝子として、炎症性サイトカインとそのシグナル経路に関連する 12 個の遺伝子 (*TNF*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *TRAF2*, *TRAF3*, *LTA*, *IL1R1*, *IL6R*, *NFKB1*, *NFKB2*, *RELA*, *RELB*)、神経可塑性に関連する 11 個の遺伝子 (*FGFR1*, *FRS2*, *FRS3*, *GRIN1*, *MAPK1*, *ARC*, *BDNF*, *ARTN*, *GFRA3*, *RET*, *GDNF*)、活性酸素種の除去に関連する 8 個の遺伝子 (*NOS2*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *GCLC*, *GCLM*, *GS*, *GR*) および抗酸化酵素の発現に関与する 3 個の遺伝子 (*NFE2L2*, *KEAP1*, *BACH1*) を解析した。

(4) 解析対象 SNPs の遺伝子型の決定には、PCR 産物の制限酵素切断の有無から多型を識別する PCR-制限酵素断片長多型(RFLP)法、PCR 産物の塩基配列を直接決定する PCR-DNA シークエンス法および PCR 産物の融解曲線の違いを識別する PCR-融解曲線分析(HRM)法を用いた。

(5) 治療感受性群と治療抵抗群間で解析対象 SNPs の出現頻度を 3 つの遺伝子モデルを用

いて有意差検定(カイ二乗検定または Fisher の正確確率検定)し、治療感受性あるいは治療抵抗性遺伝子を同定した。同定した複数の治療感受性あるいは治療抵抗性遺伝子の SNPs がお互いに独立して治療感受性や治療抵抗性に寄与しているかを多変量解析(多項ロジスティック回帰分析)で検証した。

次に、独立していた SNPs を複数組み合わせたものを遺伝子診断のバイオマーカーとして用いた。高感度、高特異度、高陽性的中率、高陰性的中率、高オッズ比および低い P 値を示す有用なバイオマーカー(SNPs の組み合わせ)を同定した。

(6) 西脇病院において新たに外来患者から同意を得て、上記の有用なバイオマーカーを用いた遺伝子診断を SSRI/SNRI 単独治療前に行うコホート研究を行った。

(7) SSRI/SNRI の治療効果と関連した治療感受性あるいは治療抵抗性遺伝子の SNPs に対して、RegulomeDB と HaploReg v4 と JASPAR database のデータベースを用いて *in silico* 解析を行い、機能している可能性の高い SNPs を同定した。同定した機能性の高い SNPs に対して、それぞれの対立遺伝子の多型を含む短い領域(30 bp 前後)を、ルシフェラーゼをリポーター遺伝子とする発現ベクターに組み込み、Jurkat 細胞株あるいは HEK 293T 細胞株にトランスフェクションした。ルシフェラーゼアッセイ法により、両対立遺伝子間で蛍光色素の発現量を比較した。インサートを含んでいない発現ベクターのみの蛍光色素の発現量をコントロールとした。

4. 研究成果

(1) 各抗うつ薬の治療感受性群と治療抵抗性群の臨床情報の比較

SSRI 治療感受性群(44 名)と治療抵抗性群(14 名)間の臨床情報を比較した。平均年齢、性別、アルコール依存症の併発率において両群間に有意差はなかった。しかし、統合失調症の併発率は SSRI 治療感受性群と比較して治療抵抗性群で有意に高かった($P = 0.004$)ため、その後の統計解析では、多項ロジスティック回帰分析を用いて統合失調症の併発の有無を補正した。

一方、SNRI 治療感受性群(17 名)と治療抵抗性群(7 名)間の臨床情報も比較した。平均年齢、性別、アルコール依存症の併発率および統合失調症の併発率において両群間に有意差はなかった。

(2) SSRI/SNRI の治療効果と関連した遺伝子《SSRI》

炎症性サイトカインのシグナル経路に関連する遺伝子

腫瘍壊死因子受容体 *TNFRSF1A* の rs4149577 で、T/T 遺伝子型の患者は約 4.8 倍治療抵抗性を示した($P = 0.029$)。同様に、*TNFRSF1B*

の rs1061624 で G/G 遺伝子型の患者は約 5.6 倍治療抵抗性を示した($P = 0.010$)。

炎症性サイトカイン IL1 の受容体 *IL1R1* の rs949963 で、A/A 遺伝子型の患者は約 7.7 倍治療抵抗性を示した($P = 0.039$)。

炎症性サイトカイン発現を調整している転写因子 *NFKB2* の rs7897947 で、T/G あるいは G/G 遺伝子型の患者は約 8.3 倍、G/G 遺伝子型の患者では約 5.9 倍治療抵抗性を示した(それぞれ $P = 0.022$ と $P = 0.044$)。

神経可塑性に関連する遺伝子

線維芽細胞増殖因子受容体 *FGFR1* の rs6474354 で、C/T あるいは T/T 遺伝子型の患者は約 6.6 倍治療感受性を示した($P = 0.044$)。逆に、C/C 遺伝子型の患者は約 6.6 倍治療抵抗性を示した。

FGFR1 の細胞内シグナル伝達分子である *FRS3* の rs3804281 で、T/T 遺伝子型の患者は 12.5 倍治療抵抗性を示した($P = 0.007$)。

神経栄養因子 GDNF の受容体 *RET* の rs2075912 で、T/C あるいは C/C 遺伝子型の患者は約 7.7 倍治療抵抗性を示した($P = 0.012$)。同遺伝子の rs2506022 で C/T あるいは T/T 遺伝子型の患者は約 5.3 倍、rs1800858 で A/G あるいは G/G 遺伝子型の患者は約 5.6 倍治療抵抗性を示した(それぞれ $P = 0.034$ と $P = 0.044$)。

活性酸素種に関連する遺伝子

活性酸素の分解酵素 *SOD1* の rs1041740 で、C/T あるいは T/T 遺伝子型の患者は約 6.1 倍治療感受性を示した($P = 0.019$)。逆に、C/C 遺伝子型の患者は約 6.1 倍治療抵抗性を示した。同遺伝子の rs2070424 で、A/G あるいは G/G 遺伝子型の患者は約 4.8 倍治療感受性を示した($P = 0.038$)。逆に、A/A 遺伝子型の患者は約 4.8 倍治療抵抗性を示した。

抗酸化酵素発現に関与する遺伝子

抗酸化酵素の発現を抑制している *BACH1* の rs1236481 で、A/G あるいは G/G 遺伝子型の患者は約 7.7 倍治療抵抗性を示した($P = 0.024$)。

SSRI の治療抵抗性を示す病態として、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)、IL1 受容体、炎症性サイトカイン発現を調整している転写因子(NF- κ B)、活性酸素の分解酵素(SOD1)および抗酸化酵素抑制因子(Bach1)の発現あるいは機能が亢進している。逆に、線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)自体あるいはその細胞内シグナル伝達経路(FRS3 を含む)の活性や神経栄養因子受容体(RET)の発現あるいは機能が低下していると推察される。このため、炎症が持続し、脳内セロトニンの枯渇や神経可塑性の異常が誘導され、神経新生や神経分化が抑制されて、SSRI に対して治療抵抗性を示したと考えられる。

《SNRI》

炎症性サイトカインのシグナル経路に関連する遺伝子

腫瘍壊死因子受容体の細胞内シグナル伝達分子である *TRAF2* の rs7852970 で、A/G あるいは G/G 遺伝子型を持つ患者は約 6.7 倍治療抵抗性を示した ($P = 0.046$)。

炎症性サイトカイン IL6 の受容体 *IL6R* の rs6427658 で、C/C 遺伝子型を持つ患者は約 10 倍治療抵抗性を示した ($P = 0.020$)。

SNRI の治療抵抗性示す病態として、TNFR の細胞内シグナル伝達経路 (*TRAF2* を含む) の活性化や IL6 受容体の発現あるいは機能の亢進により、炎症が持続し、神経可塑性の異常が誘導され、神経新生が抑制されて、SNRI に対して治療手抵抗性を示したと推察される。

(3) SSRI/SNRI の治療抵抗性に関与する一塩基多型の独立性の検証

SSRI の治療抵抗性に寄与していた 9 個の遺伝子型 (*TNFRSF1A* の rs4149577 の T/T 遺伝子型, *TNFRSF1B* の rs1061624 の G/G 遺伝子型, *IL1R1* の rs949963 の A/A 遺伝子型, *NFKB2* の rs7897947 の G/G 遺伝子型, *FGFR1* の rs6474354 の C/C 遺伝子型, *FRS3* の rs3804281 の T/T 遺伝子型, *RET* の rs2075912 の T/C あるいは C/C 遺伝子型, *SOD1* の rs1041740 の C/C 遺伝子型, および *BACH1* の rs1236481 の A/G あるいは G/G 遺伝子型) を多変量解析 (多項ロジスティック回帰分析) した結果, 5 個の遺伝子型 (*IL1R1* の rs949963 の A/A 遺伝子型, *NFKB2* の rs7897947 の G/G 遺伝子型, *FGFR1* の rs6474354 の C/C 遺伝子型, *FRS3* の rs3804281 の T/T 遺伝子型, および *RET* の rs2075912 の T/C あるいは C/C 遺伝子型) がお互いに独立して SSRI の治療抵抗性に寄与していたことから, これらをバイオマーカーとして遺伝子診断に応用した。

同様に, SNRI の治療抵抗性に寄与していた 2 個の遺伝子型 (*TRAF2* の rs7852970 の A/G あるいは G/G 遺伝子型と *IL6R* の rs6427658 の C/C 遺伝子型) がお互いに独立して SNRI の治療抵抗性に寄与していなかったため, これらをバイオマーカーとして遺伝子診断に応用できなかった。

(4) SSRI の治療抵抗性を予測する遺伝子診断の有用性の評価

多変量解析でお互いに独立して SSRI の治療抵抗性に寄与していた 5 つの遺伝子型を複数組み合わせで遺伝子診断を試みた。

オッズ比が高かった組み合わせは, 「*FRS3* + *RET* (オッズ比: 23.9)」, 「*FGFR1* + *FRS3* + *RET* (17.2)」, 「*NFKB2* + *RET* (11.7)」, 「*FRS3* (11.7)」の順であった。

P 値が低かった組み合わせは, 「*FGFR1* + *RET* (P 値: 0.0018)」, 「*FRS3* + *RET* (0.0023)」, 「*FRS3* (0.0067)」, 「*FGFR1* + *FRS3* + *RET* (0.010)」の順であった。

感度が高かった組み合わせは, 「*FGFR1* + *RET* (感度: 78.6%)」, 「*FRS3* + *RET* (35.7%)」, 「*FRS3* (35.7%)」, 「*FGFR1* + *FRS3* + *RET* (28.6%)」の順であった。

特異度が高かった組み合わせは, 「*FRS3* + *RET* (特異度: 97.7%)」, 「*FGFR1* + *FRS3* + *RET* (97.7%)」, 「*NFKB2* + *RET* (97.7%)」, 「*FRS3* (95.5%)」の順であった。

陽性的中率が高かった組み合わせは, 「*FRS3* + *RET* (陽性的中率: 83.3%)」, 「*FGFR1* + *FRS3* + *RET* (80.0%)」, 「*NFKB2* + *RET* (75.0%)」, 「*FRS3* (71.4%)」の順であった。

陰性的中率が高かった組み合わせは, 「*FGFR1* + *RET* (陰性的中率: 91.2%)」, 「*FRS3* + *RET* (82.7%)」, 「*FRS3* (82.4%)」, 「*FGFR1* + *FRS3* + *RET* (81.1%)」の順であった。

検査法として感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率, オッズ比および P 値のバランスが最も有用であった遺伝子型の組み合わせ (バイオマーカー) は 「*FRS3* + *RET*」であり, 感度は 35.7% とやや低かったが, 特異度は 97.7%, 陽性的中率は 83.3%, 陰性的中率は 82.7% およびオッズ比は 23.9 (23.9 倍治療が効きにくいことを意味する) と最も高く, そして P 値も 0.0023 と強い相関を認めた。次にバランス的に有用であった組み合わせは 「*FGFR1* + *FRS3* + *RET*」であった。

(5) コホート研究

「*FRS3* + *RET*」をバイオマーカーに用いて治療前に遺伝子診断を行い, その後に SSRI 治療を開始するコホート研究を開始した。しかし, 西脇病院にて新たに同意を得たうつ病患者数が 16 名と少なく, 現時点で統計解析を行わずに, 今後も症例を蓄積するために研究を継続することにした。

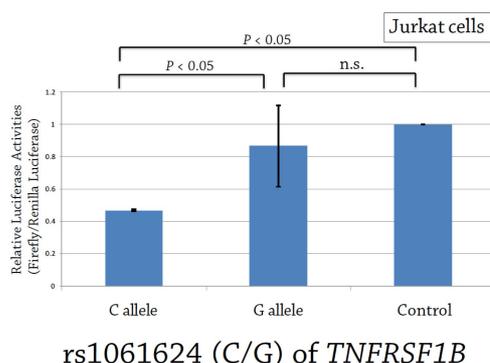
(6) *in silico* 解析

SSRI/SNRI の治療効果と相関した 11 個の遺伝子内の 14 個の SNPs (*TNFRSF1A* の rs4149577, *TNFRSF1B* の rs1061624, *IL1R1* の rs949963, *NFKB2* の rs7897947, *FGFR1* の rs6474354, *FRS3* の rs3804281, *RET* の rs2075912 と rs2506022 と rs1800858, *SOD1* の rs1041740 と rs2070424, *BACH1* の rs1236481, *TRAF2* の rs7852970 および *IL6R* の rs6427658) に対して *in silico* 解析を行った結果, 機能している可能性の高い 5 つの SNPs (*TNFRSF1A* の rs4149577, *TNFRSF1B* の rs1061624, *FRS3* の rs3804281, *SOD1* の rs2070424 および *IL6R* の rs6427658) を同定した。

(7) ルシフェラーゼアッセイ法

同定した機能性の高い 5 つの SNPs に対してルシフェラーゼアッセイ法を行い, 両対立遺伝子の転写活性能を比較した結果, *TNFRSF1B* の rs1061624 で両対立遺伝子間で蛍光色素の発現量に有意差を認めた (図 1)。つまり, 対立遺伝子の違いにより発現が変化する

ることから、G 対立遺伝子を持つうつ病患者では、腫瘍壊死因子受容体自体の発現量が増え、その下流のシグナル経路が活性化されて炎症が持続し、SSRI の抗炎症作用と拮抗して治療抵抗性を示したと推察される。したがって、腫瘍壊死因子受容体は治療抵抗性を克服する治療薬の標的分子になる可能性が示唆された。一方、*TNFRSF1A* の rs4149577 では両対立遺伝子間で蛍光色素の発現量に有意差はなかった。その他は現在も解析中であり、研究を継続する予定である。



今後、結果のすべてを英語論文にまとめ、英語雑誌や当研究室のホームページで公表する。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Kawafuchi Y, Kurokawa T, Arata Y, Keya K, Araki T, Ijichi S, Inamine T, Kondo S, Kurotaki N, Nishiwaki K, Tsukamoto K. Genetic polymorphisms in the neuroplasticity-related genes contribute to the therapeutic effect of antidepressants for major depression. 65th American Society of Human Genetics Annual Meeting 2015, 10/6-10 (Baltimore, USA)

毛屋幸司, 荒田有貴, 黒川拓也, 伊地知俊介, 稲嶺達夫, 近藤新二, 西脇健三郎, 塚元和弘. うつ病患者における抗うつ薬感受性および統合失調症併発を予測するバイオマーカーの同定. 第2回先導的薬剤師の未来像を考えるシンポジウム 2015, 2/14 「長崎大学(長崎県長崎市)」

荒田有貴, 黒川拓也, 毛屋幸司, 稲嶺達夫, 近藤新二, 西脇健三郎, 塚元和弘. *FRS3* の遺伝子多型はうつ病患者における SSRI/SNRI の治療効果に關与する. 日本薬学会第 134 年会 2014, 3/27-30 「熊本大学(熊本県熊本市)」

荒田有貴, 黒川拓也, 毛屋幸司, 稲嶺達夫, 近藤新二, 西脇健三郎, 塚元和弘. うつ病と

統合失調症の合併を予測するバイオマーカーの同定. 第 30 回日本薬学会九州支部大会 2013, 12/7-8 「長崎国際大学(長崎県佐世保市)」

〔その他〕

ホームページ等

研究成果を当研究室のホームページに公開している。

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/treat/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚元 和弘 (TSUKAMOTO, Kazuhiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号: 30253305

(2) 連携研究者

黒滝 直弘 (KUROTAKE, Naohiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号: 20423634

(3) 研究協力者

西脇 健三郎 (NISHIWAKI, Kenzaburo)

児島 諒子 (KOJIMA, Ryoko)

黒川 拓也 (KUROKAWA, Takuya)

荒木 千鶴 (ARAKI, Chizuru)

荒田 有貴 (ARATA, Yuki)

下宮園 彩 (SHIMOMIYAZONO, Aya)

毛屋 幸司 (KEYA, Koji)

小畑 京佑 (OBATA, Kyosuke)

川淵 有佳 (KAWAFUCHI, Yuka)

伊地知 俊介 (IJICHI, Shunsuke)

谷口 隼輔 (TANIGUCHI, Shunsuke)

西園 美紀 (NISHIZONO, Miki)