

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461717

研究課題名(和文) 網羅的エピゲノム解析を用いた産後うつ病の病態に関わる生物学的因子の同定

研究課題名(英文) Identification of biological factors related to the pathological condition of postpartum depression using comprehensive epigenome analysis

研究代表者

中村 由嘉子 (Nakamura, Yukako)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：60614485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、妊産婦を対象とした網羅的メチル化解析の結果から産後うつ病の診断法開発を目指したものである。末梢血より抽出したDNAサンプルを用いて、産後抑うつ群18例、非抑うつ群18例のメチル化強度の差を確認したところ、ゲノムワイド有意水準($p < 1.3E-7$)に達したメチル化サイトは確認されなかった。関連解析でp値の低かった上位1,000のメチル化サイトに着目し機能的な偏りに着目した解析を行ったところ、軸索誘導などに関連する遺伝子セットが確認できた。本研究の結果から、産後うつ病の診断法開発のためには、単一のメチル化サイトだけでなく、それらの機能的な偏りに着目した解析が有用であることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted comprehensive methylation analysis using peripheral blood with the aim of developing a diagnostic method for postpartum depression (PPD). A total of 18 female cases and 18 female controls were enrolled. We performed a case-control study to examine the association of DNA methylation (DNAm) status ($p < 1.3E-7$). After that we conducted functional enrichment analysis of PPD. We observed no genome-wide significant association between the genome-wide measure of DNAm based on all CpG sites and PPD. From a result of comparing the case-control DNAm level, we selected 1,000 sites with low p-values and conducted functional enrichment analysis. As a result of enrichment analysis we found four GO Terms. From the results of this study, we confirmed that not only a single methylation site but also an analysis focusing on their functional relevance was useful for development of a diagnostic method for postpartum depression.

研究分野：精神医学

キーワード：網羅的メチル化解析 周産期 うつ病

1. 研究開始当初の背景

産後うつ病の発症には、心理社会的因子と共に、妊娠出産に伴う内分泌学的変化など、環境に応答した生物学的因子の変化が関与する事が想定されるが、生物学的な病態を反映した診断検査法がなく、現在、病因・病態に基づく治療戦略を立てることが困難な状態にある。一方で、産後うつ病を含むうつ病の発症には、遺伝環境相互作用が関与していることが想定されており、連携研究者尾崎は、DISC1 ノックアウトモデル動物に隔離飼育ストレスを加えることで、脳内ドパミン神経系に持続的なエピジェネティックな変化を来し、その結果、うつ病様の表現型をとることを示している(Niwa M, Ozaki N et al. Science, 339,6117 p335-9,2013)。遺伝環境相互作用の観点から産後うつ病に関わる生物学的因子を明らかにし、診断法および効果的な予防・治療法の開発に繋がる情報を得ることは喫緊の課題である。

近年、環境因子によって引き起こされるゲノム上のエピジェネティックな修飾が、うつ病を含む精神疾患の病因や病態と密接に関わる可能性が指摘されている。とりわけ、DNA メチル化は、遺伝子サイレンシング制御やクロマチン安定性に重要であり、メチル化状態の差異が遺伝子発現の状態を左右すると考えられている。そのため、DNA メチル化解析は、うつ病の発症機序を分子レベルで解明する糸口となることが期待されている。

2. 研究の目的

妊産婦を対象に網羅的なメチル化解析を行い、産後抑うつ群に特異的なメチル化制御をうける遺伝子領域を同定することにより、産後うつ病の診断法開発を目指す。

3. 研究の方法

対象は20歳以上の産婦で、妊娠中から産後にかけて抑うつ状態を呈さない群を「非抑うつ群」、妊娠中は抑うつ状態を呈さず出産1か月後に抑うつ状態を呈した群を「産後抑うつ群」とした。抑うつ状態の評価には、Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS)を用いた。非抑うつ群18例、産後抑うつ群18例の計36例に対し、産後に採血した末梢血より抽出したDNAサンプルを用いてメチル化解析を行った。網羅的なメチル化解析には、Human Methylation 450 BeadChipを用いた。本研究は名古屋大学医学部附属病院生命倫理審査委員会の承認を得ており、承認事項に従い、参加者全員から書面による同意を得て、個人情報保護に配慮して実施した。

得られたメチル化アレイのデータに関して、非抑うつ群と産後抑うつ群のメチル化強度の関連解析を行った。解析手法には、一般化線形モデルを使用した。DNAのメチル化強度の指標には、統計的妥当性をもつ指標である M-value を用いた(BMC Bioinformatics

11,p587,2010)。DNA メチル化アレイの測定間のバイアスを補正するため、経験的ベイズ法(Biostatistics8,1 p118-27,2007)を用いて、測定間のバイアスを除去した。

解析にあたり、以下1.2.3.4.のいずれかに該当するDNA メチル化サイトを除外した。1. Detection P value < 0.05を満たす測定値が全検体(n=36)の95%未満であったサイト、2. Chenらにより、Cross-hybridizationの可能性が報告されているサイト(Epigenetics8,2 p203-9,2013)、3. 1000 genomesのEast Asianサンプルで1%以上のminor allele frequency > 0.01のSNPを含むプローブにあるサイト、4.Y染色体上のサイト。上記のサイトを除外し、379,277サイトについて解析を行った。

(1)年齢を独立変数とした関連解析

年齢、Cell type composition(6種)を独立変数、DNA メチル化強度(M-value)を従属変数として、一般化線形モデルを用いた関連解析を実施した。有意水準は、Bonferroniの補正を行い決定した($\alpha = 0.05/379,277 = 1.32 \times 10^{-7}$)。p値はgenomic controlで補正した。

(2)抑うつ状態を独立変数とした関連解析

年齢、Cell type composition(6種)、産後の抑うつ状態の有無を独立変数、DNA メチル化強度(M-value)を従属変数として、一般化線形モデルを用いた関連解析を実施した。有意水準は、Bonferroniの補正を行い決定した($\alpha = 0.05/379,277 = 1.32 \times 10^{-7}$)。p値はgenomic controlで補正した。

(3)the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, (DAVID)を用いた解析

上記(2)の結果から、p値の低い上位1,000サイトに着目し、近隣の遺伝子名を用いてDAVID6.8による解析を実施した。有意水準はfalse discovery rate(FDR)<0.05とした。

4. 研究成果

(1)結果

解析対象の背景を表1に示す。

表1 対象者の背景

	非抑うつ群 N=18 平均値 ± SD	産後抑うつ群 N=18 平均値 ± SD
年齢	34.6 ± 4.6	33.3 ± 4.4
産後採血日	30.1 ± 7.6	26.4 ± 10.7
産後1カ月 EPDS得点	2.3 ± 2.4	13.6 ± 4.2

これら 36 名を対象に、年齢、Cell type composition(6 種)を独立変数とし、DNA メチル化強度の関連解析を実施した結果、メチル化サイト、cg16867657 において有意水準 1.32×10^{-7} で有意差が認められた。また、図 1 に示す Quantile-Quantile(QQ)plot においても、期待される p-value (破線) から逸脱したメチル化サイト、cg16867657 が確認された。

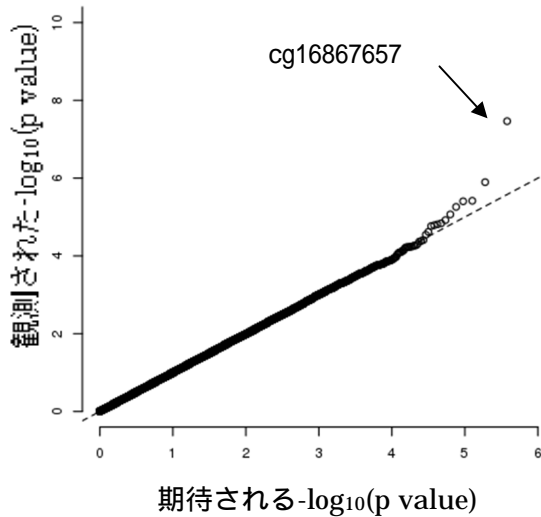


図 1 年齢の QQ-plot

次に、36 名を対象に、産後の抑うつ状態の有無、年齢、Cell type composition(6 種)を独立変数とし、DNA メチル化強度の関連解析を実施した結果、有意水準 1.32×10^{-7} で有意差のあるサイトは存在しなかった。また、図 2 に示す Quantile-Quantile(QQ)plot においても、期待される p-value (破線) から逸脱したメチル化サイトは確認されなかった。

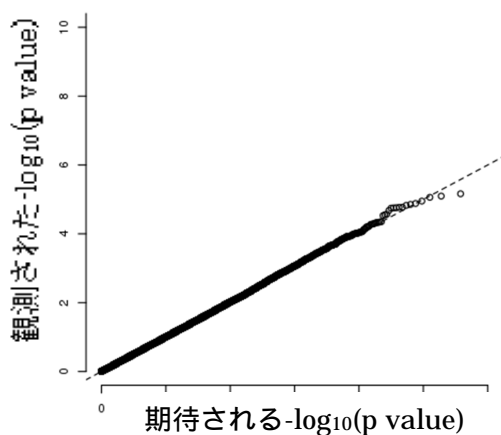


図 2 産後抑うつ状態の有無の QQ-plot

産後の抑うつ状態の有無、年齢、Cell type composition(6 種)を独立変数とし、DNA メチル化強度の関連解析を実施した結果から、p-value の低い 1000 サイトに着目し、DAVID6.8 による解析を行った。有意水準を false discovery rate (FDR) <0.05 を満た

す GO Term として、表 2 に示す 4 つが抽出された。解析の結果を表 2、表 3 に示す。

表 2 DAVID を用いた解析から抽出された Gene ontology terms

Category	Terms
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0005515 ~ protein binding
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005654 ~ nucleoplasm
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0003714 ~ transcription corepressor activity
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007411 ~ axon guidance

MF Molecular function
CC Cellular Component
BP Biological process

表 3 表 2 に示した Gene ontology terms の Count と FDR

Terms	Count	FDR
GO:0005515 ~ protein binding	390	2.5E-05
GO:0005654 ~ nucleoplasm	148	2.3E-04
GO:0003714 ~ transcription corepressor activity	24	0.002
GO:0007411 ~ axon guidance	20	0.011

表 3 に示した、protein binding、nucleoplasm、transcription corepressor activity、axon guidance の Fold Enrichment は、それぞれ、1.21、1.50、3.22、3.40 であった。

(2) 考察

年齢を独立変数とした解析では、有意水準を満たすサイトとして cg16867657 が確認された。cg16867657 は ELOVL2 (脂肪酸エロンガーゼ) のプロモーター領域に位置し、そのメチル化強度は年齢と比例することが報告されている(PLoS One8,6 pe67378,2013)。本研究で、年齢を独立変数とした関連解析で、cg16867657 が確認されたことから、本研究の

解析結果に問題がないと推察される。

産後の抑うつ状態の有無を独立変数とした解析では、非抑うつ群と産後抑うつ群の各サイトのメチル化頻度の差異は小さく、本研究では、ゲノムワイド有意水準で有意差のあるサイトは見出せなかった。

関連解析の結果から、p-value の低い1000サイトに着目した DAVID6.8 による解析の結果、protein binding、nucleoplasm、transcription corepressor activity、axon guidance の、4つの Gene ontology terms が抽出された。このうち、Fold Enrichment の値が最も大きかった axon guidance は、神経系の発生段階で神経回路形成を行う重要なプロセスであり、これまでも精神障害との関連が指摘されている。今後、さらなる検討が重要であると考えられる。

本研究の結果から、産後うつ病の診断法開発のためには、網羅的なメチル化解析の結果から単一のメチル化サイトや遺伝子に着目するだけでなく、複数の遺伝子群に着目し、その機能的特徴を明らかにすることが重要と考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 中村由嘉子、椎野智子、Branko Aleksic、遠山美穂、山内彩、大原聖子、久保田智香、岡田俊、尾崎紀夫、網羅的メチル化解析を用いた周産期うつ病に關与する生物学的因子の探索、日本うつ病学会、2016年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(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

中村 由嘉子 (Nakamura Yukako)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：60614485

(2)連携研究者

尾崎 紀夫 (Ozaki Norio)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40281480