

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670542

研究課題名(和文) 第三の生命鎖である糖鎖を用いた簡便・低侵襲なうつ病バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Biological markers of plasma protein glycosylation in major depressive disorder

## 研究代表者

山形 弘隆 (YAMAGATA, Hirotaka)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10549934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖は、細胞識別やタンパク質の品質管理などの生体情報伝達を担う高分子である。しかし、糖鎖がうつ病の病態にどのように関与しているかはほとんど分かっていない。急性期うつ病患者、寛解期うつ病患者、健常者の3群で、血漿タンパク質の糖鎖解析をレクチンアレイを用いて行ったところ、うつ病寛解期で健常者と比べて有意に結合性が異なるレクチンが同定された。うつ病モデルマウス血漿タンパク質の網羅的な糖鎖解析を行い、うつ病患者サンプルの結果と比較し、ストレス依存的に結合性が変化するレクチンを同定した。

研究成果の概要(英文)：Glycosylation is one of the most common posttranslational modifications that occur during protein biosynthesis, and protein glycosylation is a major contributor to many diseases. However, the mechanisms of protein glycosylation in the pathophysiology of major depressive disorder have not been elucidated. We analyzed plasma protein glycosylation using a lectin microarray, and also examined protein plasma glycosylation in a mouse model of depression. Our results describe lectins that are associated with depression and stress.

研究分野：精神医学

キーワード：うつ病 バイオマーカー 糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病の診断は、未だ症状の組み合わせから判断する操作的診断法しかなく、客観的な臨床マーカーを用いる検査として臨床応用されているのは、近赤外線分光法 (NIRS: 光トポグラフィー) を用いる先進医療が唯一である。しかし、NIRS の結果は確定診断ではなく、あくまで臨床症状に基づく鑑別診断の補助として用いられている。そのため、他の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。当科を含む各グループが、構造的画像解析、機能的画像解析、mRNA の発現解析、ゲノムの GWAS 解析などから新規のバイオマーカー検索を行っているが、未だ実用には至っていない。

生体内のタンパクの約 6 割が糖鎖修飾されており、糖鎖は、癌、免疫、受精、血液型などにおいて、重要な役割を果たしていることが解ってきた。細胞表面やタンパク質などに存在し、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。

その様々な機能から、近年は各疾患のバイオマーカーとしての検索が盛んに行われている。例えば、臨床的に広く用いられている腫瘍マーカーの CA19-9 や CA125 は、がん細胞株を用いて作製された抗体によって認識される糖鎖抗原である。しかし、糖鎖はグルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミンなどが何通りもの結合様式で連結する複雑な構造であり、近年まではその構造を解析する方法は限られていた。そのため、糖鎖とうつ病の関係はほとんど明らかでない。

## 2. 研究の目的

うつ病のバイオマーカー検索は、脳画像、遺伝子、タンパク質の発現など多岐に渡るが、唯一臨床応用されている光トポグラフィーも鑑別診断の補助として用いられているにすぎない。本研究は、未開拓のうつ病新規マーカーを探すべく、血漿タンパク質の糖鎖に着目した。

糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第 3 の生命鎖と言われ、細胞識別やタンパク質の品質管理などの生体情報伝達を担う高分子である。糖鎖はすでに腫瘍マーカーとしては臨床利用されており、精神科領域では発達障害のマーカーとしての報告はあるが、うつ病患者のマーカーは知られていない。血漿タンパク質の糖鎖を網羅的に解析し、簡便で低侵襲な新規バイオマーカーの発見をすることで、うつ病の確定診断や治療反応性予測が出来ることが期待される。血漿タンパク質の糖鎖をうつ病患者のうつ病期・寛解期、健常者の 3 群で比較し、うつ病の発病脆弱性素因マーカー、うつ病期特異的な治療反応性マーカーを同定する。うつ病モデルマウスとの比較から、基礎研究に繋がる糖鎖変化を同定すること

を目的とする。

血漿タンパク糖鎖の網羅的な検索により、バイオマーカーが同定されることで、うつ病の早期発見・早期治療につながり、患者や社会にとっても非常に有益であると考えられる。

## 3. 研究の方法

当大学の臨床研究センターに臨床研究申請を行い、承認を得た。

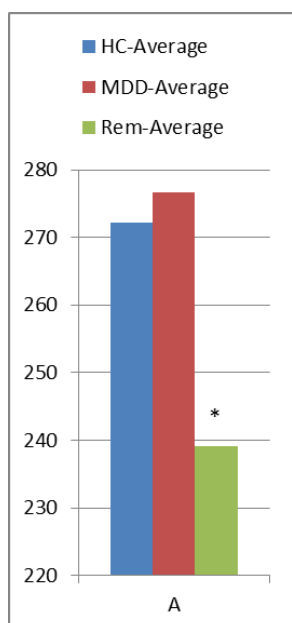
アメリカ精神医学会が作成した「精神障害の分類と診断の手引き Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-IV-TR)」に基づいてうつ病性障害の診断基準を満たした患者を対象とした。診断は臨床診断面接および構造面接 The Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI) により診断した。うつ状態の重症度評価を構造化面接である Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale (SIGH-D) を用いて行い、躁状態は Young Mania Rating Scale (YMRS) で評価する。うつ状態は SIGH-D が 18 点以上と定義した。寛解期については、SIGH-D8 点以下かつ DSM の「完全寛解」基準に基づき、「過去 2 か月間ははっきりした兆候や症状が見られていない」者とした。脳器質性疾患(てんかん、脳性まひなど)がある者や、重篤な内科的疾患をもっている者などは除外した。うつ病患者 10 名(うつ病期および寛解期)、健常者 10 名から末梢血 40 ml を採取した。全血からの分離白血球より血漿、RNA、ゲノム DNA を調整した。集めたサンプルについては、連結可能匿名化した。レクチンアレイを用いて、血漿糖鎖タンパクに結合するレクチンを網羅的に解析した。精製された RNA サンプルから逆転写 PCR を用いて cDNA を作成し、リアルタイム PCR を用いて糖鎖転移酵素の RNA の発現解析を行った。

申請者らが独自に研究したうつ病モデルマウス(慢性ストレス負荷 BALB マウス)(Uchida S, et al. Neuron. 2011;69(2):359-372.) を非ストレス群、ストレス負荷群、ストレス負荷+抗うつ薬群の 3 群に分け、各マウスの血液と同一個体の脳から海馬、前頭前野などを単離した。マウス血漿の網羅的な糖鎖解析を行い、うつ患者サンプルの結果と比較した。

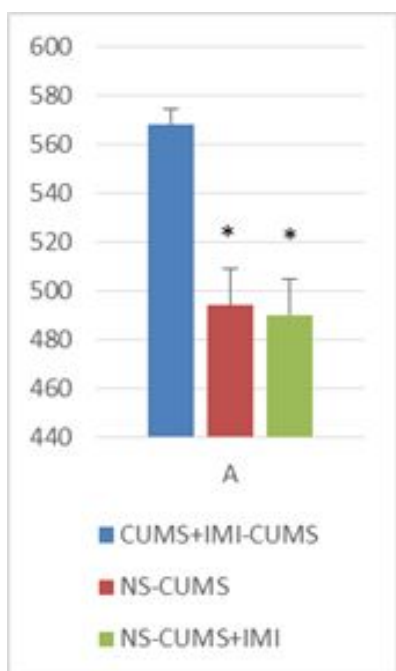
## 4. 研究成果

うつ病患者 10 名健常者 10 名の血漿について解析した。うつ病患者については、急性期・寛解期それぞれにおいて血漿サンプルを採取した。レクチンアレイを用いて、血漿糖鎖タンパクに結合するレクチンを網羅的に解析した。急性期うつ病患者、寛解期うつ病患者、健常者の 3 群で一元配置分散分析を行ったところ、うつ病寛解期で健常者と比べて有意に結合性が異なるレクチン A が同定さ

れた。



次に、申請者らが独自に研究したうつ病モデルマウス（慢性ストレス負荷 BALB/c マウス）の血液から、ストレス依存的な糖鎖マーカーを調べることにした。非ストレス群(NS) (n=6、ストレス負荷群(CUMS) (n=7)、ストレス負荷 + 抗うつ薬群(CUMS+IMI) (n=7)の3群に分け、各マウスの血液と同一個体の脳から海馬、前頭前野を単離した。レクチンアレイを用いて、マウス血漿の網羅的な糖鎖解析を行い、うつ患者サンプルの結果と比較したところ、ストレス依存的に結合性が変化するレクチン A が同定できた。このレクチン A は、うつ病患者寛解期に変化しているレクチンと同じものであった。



このレクチン A を基に糖鎖転移酵素を推定したところ、8つの糖鎖転移酵素が候補として挙げられた。定量的リアルタイム PCR を用いて、これらの糖鎖転移酵素 mRNA の発

現解析を行ったところ、1つの糖鎖転移酵素 B がうつ病相依的に変化していた。マウスの血液から抽出した RNA でも同様の糖鎖転移酵素の発現解析を行ったが、マウス血液における糖鎖転移酵素の発現は、全体的にヒト白血球の発現レベルよりも少なく、うつ病相依的に変化していた糖鎖転移酵素 B については発現が確認できなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Miyata S, Kurachi M, Okano Y, Sakurai N, Kobayashi A, Harada K, Yamagata H, Matsuo K, Takahashi K, Narita K, Fukuda M, Ishizaki Y, Mikuni M. Blood Transcriptomic Markers in Patients with Late-Onset Major Depressive Disorder. PLoS One. 査読有 2016 Feb 29;11(2):e0150262. doi:

10.1371/journal.pone.0150262.

eCollection 2016.

Abe-Higuchi N, Uchida S, Yamagata H, Higuchi F, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Watanabe Y. Hippocampal Sirtuin 1 Signaling Mediates Depression-like Behavior. Biol Psychiatry. 査読有 2016 Jan 30. pii: S0006-3223(16)00080-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.01.009.

Martel G, Uchida S, Hevi C, Chévere-Torres I, Fuentes I, Park YJ, Hafeez H, Yamagata H, Watanabe Y, Shumyatsky GP. Genetic Demonstration of a Role for Stathmin in Adult Hippocampal Neurogenesis, Spinogenesis, and NMDA Receptor-Dependent Memory. J Neurosci. 査読有 2016 Jan 27;36(4):1185-202. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4541-14.2016.

Yasuda S, Yoshida M, Yamagata H, Iwanaga Y, Suenaga H, Ishikawa K, Nakano M, Okuyama S, Furukawa Y, Furukawa S, Ishikawa T. Imipramine Ameliorates Pain-related Negative Emotion via Induction of Brain-derived Neurotrophic Factor. Cell Mol Neurobiol. 査読有 2014 Nov;34(8):1199-208. doi: 10.1007/s10571-014-0097-y.

eCollection 2016.

Ishizuka Y, Shimizu H, Takagi E, Kato M, Yamagata H, Mikuni M, Shirao T. Histone deacetylase mediates the decrease in drebrin cluster density induced by amyloid beta oligomers. Neurochem Int. 査読有 2014 Oct;76:114-21. doi:

〔学会発表〕(計 16 件)

Yamagata H, Uchida S, Higuchi F, Hobara T, Watanabe Y, The analysis of murine plasma proteins after chronic stress by lectin microarray. Neuroscience2015, SfN's 45<sup>th</sup> annual meeting, 2015 Oct 19, Chicago, USA.

Matsuo K, Harada K, Okamoto Y, Ohta M, Narita H, Fujita Y, Okada G, Takamura M, Yamagata H, Kusumi I, Inoue T, Kunugi H, Yamawaki S, Watanabe Y. Distinction of brain morphometric abnormalities in bipolar and unipolar depression: A voxel-based multi-center study. Neuroscience2015, SfN's 45<sup>th</sup> annual meeting, 2015 Oct 19, Chicago, USA.

山形弘隆, 内田周作, 樋口尚子, 樋口文宏, 芳原輝之, 渡邊義文, ストレス耐性や抗うつ効果に対する SIRT1 の役割, 第 37 回日本生物学的精神医学会, 2015/9/25, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

内田周作, 芳原輝之, 樋口文宏, 樋口尚子, 山形弘隆, 渡邊義文: エピジェネティクスによりうつ病の分子・細胞基盤第 37 回日本生物学的精神医学会, 2015/9/25, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

内田周作, 樋口尚子, 山形弘隆, 芳原輝之, 樋口文宏, 渡邊義文: レジリエンスの視点からうつ病の発症・回復の分子メカニズムを理解する. 第 37 回日本生物学的精神医学会, 2015/9/24, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

原田健一郎, 松尾幸治, 中島麻美, 樋口文宏, 樋口尚子, 柴田朋彦, 芳原輝之, 中野雅之, 大拙孝治, 綿貫俊夫, 松原敏郎, 古川又一, 藤田悠介, 下地啓五, 松永尚文, 山形弘隆, 渡邊義文: 高齢うつ病患者における内側前頭・辺縁系の構造異常第 37 回日本生物学的精神医学会, 2015/9/24, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Harada K, Matsuo K, Yamagata H, Nakashima M, Nakano M, Higuchi N, Higuchi F, Hobara T, Otsuki K, Shibata T, Watanuki T, Ueda K, Furukawa M, Fukunaga M, Fujita Y, Shimoji K, Matsubara T, Matsunaga N, Watanabe Y. Reduced gray-matter volume of fronto-temporal cortex in patients with late-life depression. Society of Biological Psychiatry 70th Annual Meeting. 2015 May 16, Toronto Canada.

Matsubara T, Matsuo K, Harada K, Nakashima M, Nakano M, Hirotsu M,

Higuchi N, Watanuki T, Higuchi F, Otsuki K, Shibata T, Hobara T, Yamagata H, Watanabe Y. Society of Biological Psychiatry 70th Annual Meeting. 2015 May 16, Toronto Canada.

Yamagata H, Hobara T, Uchida S, Higuchi F, Abe-Higuchi N, Watanabe Y. Gene expression change in the hippocampus of BALB/c mice after chronic ultra-mild stress. Neuroscience2014, SfN's 44<sup>th</sup> annual meeting, 2014 Nov 19, Washington DC, USA.

Uchida S, Abe-Higuchi N, Yamagata H, Hobara T, Higuchi F, Hara K, Kobayashi A, Watanabe Y, Essential role of hippocampal SIRT1 in behavioral response to stress in mice. Neuroscience2014, SfN's 44<sup>th</sup> annual meeting, 2014 Nov 19, Washington DC, USA.

Hobara T, Uchida S, Higuchi F, Abe-Higuchi N, Yamagata H, Watanabe Y. Upregulation of CaMKII $\beta$  by HDAC inhibitors might be involved in structural plasticity and behavioral responses in model mouse of depression. Neuroscience2014, SfN's 44<sup>th</sup> annual meeting, 2014 Nov 19, Washington DC, USA.

Miyata S, Kurachi M, Sakurai N, Takashi K, Yamagata H, Matsuo K, Narita K, Fukuda M, Ishizaki Y, Mikuni M. Neuroscience2014, SfN's 44<sup>th</sup> annual meeting, 2014 Nov 18, Washington DC, USA.

Okuyama S, Yasuda S, Yamagata H, Fukuhara K, Inagawa Y, Nakano M, Ishikawa K, Furukawa Y, Watanabe Y, Ishikawa T. Low dose imipramine ameliorates pain-related negative emotion via induction of brain-derived neurotrophic factor. Neuroscience2014, SfN's 44<sup>th</sup> annual meeting, 2014 Nov 16, Washington DC, USA.

山形弘隆, 内田周作, 芳原輝之, 樋口文宏, 渡邊義文: 慢性ストレス負荷 BALB/c マウスの海馬における遺伝子発現マイクロアレイ解析. 第 36 回日本生物学的精神医学会, 2014/9/30, 奈良市文化会館(奈良県奈良市)

芳原輝之, 内田周作, 山形弘隆, 樋口文宏, 渡邊義文: 海馬未成熟神経細胞の形態変化によるうつ様行動の変化. 第 36 回日本生物学的精神医学会, 2014/9/30, 奈良市文化会館(奈良県奈良市)

樋口文宏, 内田周作, 山形弘隆, 大拙孝治, 芳原輝之, 樋口尚子, 柴田朋彦, 渡邊義文: うつ様行動と神経可塑性におけ

る microRNA-124 と HDA7 の役割の解析. 第 36 回日本生物学的精神医学会, 2014/9/29, 奈良市文化会館( 奈良県奈良市)

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山形 弘隆 (YAMAGATA, Hirotaka)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10549934

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし