

DNAメチル化を用いたうつ病診断バイオマーカーの開発

森信 繁

1. はじめに

精神障害の発症は古くから、遺伝的および環境的要因によるという仮説が提唱されてきたが、環境因の脳内遺伝子発現に及ぼす作用機序は長らく未解明のままであった。この精神疾患発症仮説は、遺伝的要因による発症への脆弱性は制御されているが、幼少期の不遇な養育環境などに曝露されることによって発症脆弱性が表面化するという考えである。ただ精神障害のタイプにより遺伝因と環境因の発症への寄与度は異なり、筆者らの研究対象としているうつ病は環境因が大きく関与する障害である。図1のように一卵性双生児の成長後の発症一致率は精神障害のタイプにより大きく異なり、遺伝要因と環境要因との発症過程に関与する程度には違いのみられることがわかる。自閉性スペクトラム障害での発症一致率に比べ、統合失調症やうつ病の発症一致率は小さくなっている。その上に統合失調症の有病率を1.5%とうつ病の有病率を8%と考えると、うつ病の一致率は遺伝的要因の関与のみではなく有病率の多さによる偶然の一致も推測され、上記障害の中ではうつ病は環境因が発症過程に重要な役割を果たす障害と考えられる。同時に疫学的研究からも、幼少期の不遇な養育環境はうつ病発症の重要なリスクファクターであることも報告されている。本稿ではうつ病の発症に関与する環境因をストレスによるDNAメチル化の変動と考え、筆者らがこれまで行ってきたうつ病の病態解明や診断バイオマーカーの開発についてのエピジェネティクス研究を紹介する。

2. 脳由来神経栄養因子遺伝子のメチル化とうつ病診断バイオマーカーの開発

筆者らはかつて、異なった作用機序を持つ三環系抗うつ

薬（TCA）・選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）・モノアミンオキシダーゼ（MAO）阻害薬がそれぞれ抗うつ作用を発揮することから、受容体以後の細胞内情報系の制御に抗うつ作用の基盤があるのではないかと考えた。その上で筆者らは、抗うつ薬や電気けいれん処置に共通な現象として、脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor：BDNF）の発現増大のみられることを報告した^{1,2)}。その後BDNFと抗うつ薬あるいはうつ病動物モデルの関連を解析する研究が多数行われ、うつ病BDNF低下仮説が提唱されている。

このため筆者ら³⁾はうつ病患者を対象に、BDNF遺伝子の転写に重要なエクソンI、IVの転写活性を決めるプロモーター上で起こるCpGのメチル化のプロフィールが、うつ病の診断バイオマーカーにならないかと考えこれら部位でのメチル化率の解析を行った。実際にはBDNF遺伝子のエクソンIのプロモーター上にあるCpGアイランド内の81個（Chr 11：27743473-27744564）のCpGのメチル化率と、エクソンIVのプロモーター上にある28個（Chr11：27722840-27723980）のCpGのメチル化率を、末梢血由来DNAを対象にMassARRAY®（Agena Bioscience）を用いて計測した。未治療うつ病患者20名と健康対照者18名を対象とした初期の研究では、図2に示すようにエクソンI、IVのプロモーター領域のCpGのメチル化プロフィールが、うつ病の診断マーカーとなる可能性を筆者らは報告した。しかしながらその後の未治療うつ病患者80名と健康対照者72名を対象とした研究では、図3に示すようにエク

自閉症の一卵性双生児の発症一致率：>90%（有病率1~2%）
 統合失調症の一卵性双生児の発症一致率：~50%（有病率1~2%）
 大うつ病の一卵性双生児の発症一致率：~40%（有病率8~15%）
 大規模GWASによる遺伝的要因の否定
 (Sullivan et al. (2013) Nat. Rev., 13, 537-551)

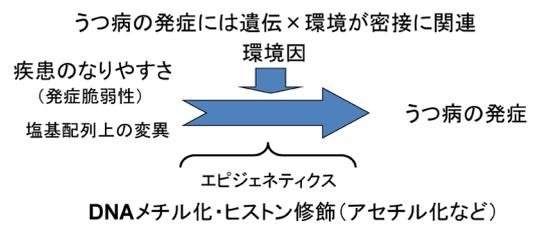


図1 うつ病の発症に関与するエピジェネティクスの重要性について

高知大学医学部神経精神科学（〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮）

Diagnostic biomarker of major depression based on DNA methylation

Shigeru Morinobu (Department of Neuropsychiatry, Kochi Medical School, Kochi University, Kohasu, Oko-cho, Nankoko, Kochi 783-8505, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890094

© 2017 公益社団法人日本生化学会

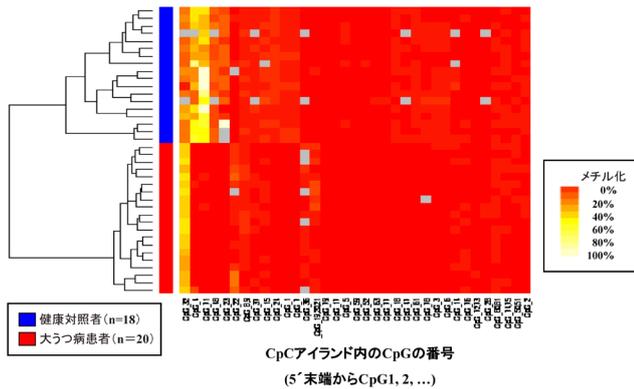


図2 BDNF 遺伝子エクソンIプロモーター上のCpGアイランドのCpGメチル化解析(I)
(文献3から一部改訂)

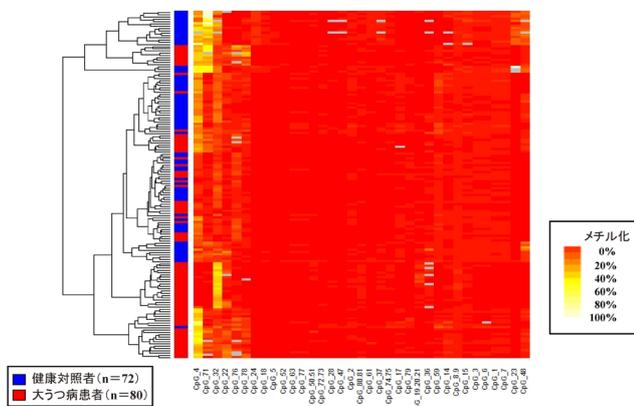


図3 BDNF 遺伝子エクソンIプロモーター上のCpGアイランドのCpGメチル化解析(II)

ソンIのプロモーター上のCpGメチル化プロフィールはうつ病の診断バイオマーカーにはならないことが報告された。このように計測できたすべてのCpGのメチル化率を用いた階層型クラスター解析ではうつ病群と対照群とを分類することはできなかったが、計測できた各CpGのメチル化率を2群間で比較した場合には35か所中22か所のCpGで有意な差がみられた。ただうつ病の重症度とCpGメチル化率との間には有意な関係はみられず、抗うつ薬との治療反応性と治療前のCpGメチル化率との間にも有意な関係はみられなかった。今後はこの22か所のCpGのうちの何か所かのCpGのメチル化率の計測によって、うつ病の診断バイオマーカーが開発されることが期待される。

筆者らの報告以外に、うつ病を対象にBDNF 遺伝子のメチル化を解析したいくつかの報告がある。Kangら⁴⁾は108名のうつ病患者を対象に7か所のCpGのメチル化率と臨床症状や社会的背景などの関連を解析しており、筆者らの結果とは異なりメチル化率の亢進は過去の自殺企図、治療中の自殺念慮、12週間の治療後の自殺念慮や高いBeck Scale for Suicide Ideation 値および自殺念慮への低い治療効果と、

有意な相関があったことを示している。うつ病を対象とした研究ではないがSongら⁵⁾の報告では、BDNF 遺伝子エクソンIプロモーター領域のCpGアイランド上の10か所のCpGのメチル化率を774名の日本人勤労者で計測し、Kessler's K6 questionnaireによるうつ状態の高い群では低い群に比べて、有意にメチル化率に低下のみられることを報告している。Naら⁶⁾の研究では65例のうつ病患者と健康対照者でBDNF 遺伝子のメチル化率を解析しており、うつ病群で計測した4か所のCpGのうち2か所で有意なメチル化率の増大を報告している。老年期うつ病251名を対象としたJanuarら⁷⁾の研究では、BDNF 遺伝子エクソンIのプロモーター領域11か所とエクソンIVのプロモーター領域7か所のCpGのメチル化率を解析しており、平均メチル化率で有意差はないものの各プロモーター上の1か所のCpGメチル化率が、うつ病群で有意に亢進している結果を報告している。

筆者らの研究に比べて上記の他施設での研究では、比較的少ない数のCpGのメチル化率を計測しており、BDNF 遺伝子のメチル化率によるうつ病診断バイオマーカーの開発を行うためには、多数のCpGのメチル化率を計測して、健康対照者群との間にオーバーラップのない(あるいはきわめて少ない)CpGを、複数箇所抽出することが必要と思われる。しかしながら上記のBDNF 遺伝子メチル化とうつ病の研究では、方法論や計測部位に違いはあるものの、結果的にはBDNF 遺伝子のCpGメチル化率が、うつ病群と健康対照者群との間で異なっており、このような結果はBDNF 遺伝子のメチル化率が、うつ病の診断バイオマーカーとなる可能性を支持していると考えられる。

3. セロトニン・トランスポーター遺伝子のメチル化とうつ病診断バイオマーカーの開発

SSRIやセロトニン/ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)および古くからうつ病治療に用いられていたTCAの多くは、セロトニン・トランスポーター(5-HTT)を阻害してシナプス間隙のセロトニン濃度を亢進させることが報告されている。このような多くの抗うつ薬に共通の薬理作用が5-HTTの阻害であることから、筆者ら⁸⁾はセロトニン・トランスポーター(SLC6A4)遺伝子のエクソンIのプロモーター領域からエクソンIを囲む85か所のCpGを持つCpGアイランド中(Chr 17:28562388-28563186)の29個のCpGのメチル化率を解析した。本研究ではMassARRAY[®]を用いて、未治療うつ病患者50名と健康対照者50名の末梢血由来DNAを対象に、SLC6A4遺伝子のメチル化率を解析している。BDNF 遺伝子と同様に階層型クラスター解析を行った結果、SLC6A4遺伝子のメチル化プロフィールではうつ病群と健康者群を

分類することはできなかった。しかしながらBDNF遺伝子とは異なり、うつ病者群と健康者群との間で有意なメチル化率に差のあるCpGは検出されなかった。うつ病の臨床症状と各CpGのメチル化率との関係では、うつ病の重症度と有意な関係を示すCpGはなかったが、うつ病群では2か所のCpG (CpG 3, CpG 76) のメチル化率が幼少期の外傷体験の数と有意な相関を示していた。

うつ病を対象としたSLC6A4遺伝子のメチル化研究もBDNF遺伝子と同じく、方法論や計測部位は異なるが筆者らの報告以外にいくつかみられる。Wonら⁹⁾のうつ病患者35名と健康対照者49名を対象に、プロモーター領域の5か所のCpGのメチル化率を比較した研究では、うつ病群で1か所のCpGメチル化率の亢進が報告されている。Frodlら^{10,11)}のうつ病患者25名と健康対照者35名およびうつ病患者33名と健康対照者35名を対象に、プロモーター領域の11か所のCpGのメチル化率を比較した二つの研究では、うつ病群と健康者群で有意な差を示すCpGはみられていない。このようなSLC6A4遺伝子プロモーター領域のメチル化率は、BDNF遺伝子とは異なりうつ病の診断バイオマーカーとしては妥当でないと考えられる。

その一方でSLC6A4遺伝子のメチル化研究で興味深いのが、幼少期の不遇な体験とメチル化率の関係である。養育不足によってラット海馬のグルココルチコイド受容体(GR)のプロモーター領域のメチル化が亢進して、成熟後のストレス発現時のGR発現の増大が得られないこと¹²⁾が報告されて以来、幼少期の不遇な環境とDNAメチル化との関連が盛んに研究されている。筆者ら⁸⁾の研究結果でもうつ病患者では2か所のCpGのメチル化率が幼少期の外傷体験の数と相関を示していたが、他にも幼少期の外傷体験がうつ病患者のSLC6A4遺伝子のメチル化を変動させることが報告されている。うつ病患者108名を対象に行ったKangら¹³⁾の研究では、プロモーター領域の7か所のCpGのメチル化率を計測して、幼少期の外傷体験と平均メチル化率との間に有意な相関が報告されている。上記のFrodlら^{10,11)}の二つの研究でも、幼少期の不遇な体験とSLC6A4遺伝子のメチル化率との間に有意な相関が報告されている。このようなSLC6A4遺伝子メチル化率と幼少期の不遇な体験との関連はうつ病研究のみならず、一卵性双生児28組を対象としたOullet-Morinら¹⁴⁾の研究や、一般人を対象としたBeachら¹⁵⁾の疫学的研究からも同様の結果が報告されている。

しかしながら幼少期の不遇な養育環境とうつ病発症の関連ではSLC6A4遺伝子メチル化率のみならず、セロトニン・トランスポーター(5-HTT)遺伝子の多型の関与も報告されている¹⁶⁾。このような報告はうつ病発症脆弱性についての遺伝的要因の関与を示唆しており、今後はSLC6A4遺伝子メチル化率と5-HTTのlength polymorphism

とうつ病発症の関係を大規模集団で調べる必要があると思われる。

4. ゲノムワイドなメチル化解析によるうつ病診断バイオマーカーについて

イルミナ社によって開発されたHuman Methylation 450K array (HM450)は、ヒトゲノム内の45万か所以上のメチル化サイトのメチル化率を同時に計測するBeadChipである。これまでメチル化率を計測する場合に用いていたPyrosequencing法やMassARRAY[®]法では、数個から数十個のCpGのメチル化率を同時計測する程度であり、ゲノムワイドなメチル化の解析はできない状況であった。これに対してHM450はゲノムワイドなメチル化解析に適した方法であるが、イルミナ社のウェブサイトによると遺伝子領域あたり、わずかに17か所程度のCpGのメチル化率が計測できるようセットされているだけである。したがってHM450に搭載されていないCpGのメチル化率が、バイオマーカーとして重要になってくる場合も念頭に置いて実験する必要がある。

実際に筆者ら¹⁷⁾もHM450を用いて、未治療うつ病患者20名と健康対照者19名との間でのメチル化率の比較を行い、続いてその検証という形で未治療うつ病患者12名と健康対照者12名での比較を行った。その結果、うつ病群で有意にメチル化率の低下しているCpGが363か所検出され、その85.7%はCpGアイランド内にあった。双極性障害の治療に用いられるリチウムやバルプロ酸の標的分子であり、うつ病の病態機序との関連も報告されているglycogen synthase kinase (GSK) 3 β 遺伝子のプロモーター上のCpGアイランド内のCpGのメチル化率が、うつ病群で有意に低下していた。このため末梢血中のGSK3 β mRNAとGSK3 β のメチル化率との関連を解析したところ、有意な負の相関がみられた。うつ病の病態機序に関与すると考えられている遺伝子のプロモーター上の複数のCpGのメチル化を用いて診断マーカーを開発する試みに対して、このようなゲノムワイドなCpGのメチル化解析を用いることの長所として、複数の遺伝子のCpGメチル化を基盤とした診断マーカーの開発のできる点が考えられる。

5. おわりに

精神疾患領域でのエピジェネティクス研究はまだ始まったばかりであり、特に病態解明という目標に対しては、方法論的な問題もありあまり進展はみられていない。そのような研究状況の中でのWeaverら¹²⁾の不遇な養育環境による海馬GR遺伝子のメチル化の亢進の報告は、環境の変化が脳内の遺伝子発現を変化させることを実証した特筆す

べき研究であり、すでに同様の研究がヒトを対象にも行われ動物実験と臨床研究との結果の比較が始まっている¹⁸⁾。不遇な養育環境によるヒトと動物の脳由来および末梢血由来DNAのメチル化の変化が共通であれば、うつ病は不遇な養育環境を危険因子とする疾患であるため、うつ病動物モデルを用いたメチル化研究が診断バイオマーカー開発に大きく貢献することが推測される。

ただし、メチル化率の解析という研究はCpGの5-メチルシトシン (5-mC) の割合をみているだけであり、脱メチル化過程でTen-eleven translocation (Tet) 1によって5-mCから産生される5-ヒドロキシメチルシトシン (5-hmC)^{19,20)} の割合などは未解明のままである。5-hmCの転写過程への作用も報告されており、今後のバイオマーカーの開発では複雑な脱メチル化の過程で産生されるシトシン関連分子の中でも、特に転写に関与する分子の比率をみていく必要があると思われる。

文 献

- 1) Nibuya, M., Morinobu, S., & Duman, R.S. (1995) *J. Neurosci.*, **15**, 7539–7547.
- 2) Fuchikami, M., Morinobu, S., Kurata, A., Yamamoto, S., & Yamawaki, S. (2009) *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **12**, 73–82.
- 3) Fuchikami, M., Morinobu, S., Segawa, M., Okamoto, Y., Yamawaki, S., Ozaki, N., Inoue, T., Kusumi, I., Koyama, T., Tsuchiyama, K., & Terao, T. (2011) *PLoS One*, **6**, e23881.
- 4) Kang, H.J., Kim, J.M., Lee, J.Y., Kim, S.Y., Bae, K.Y., Kim, S.W., Shin, I.S., Kim, H.R., Shin, M.G., & Yoon, J.S. (2013) *J. Affect. Disord.*, **151**, 679–685.
- 5) Song, Y., Miyaki, K., Suzuki, T., Sasaki, Y., Tsutsumi, A., Kawakami, N., Shimazu, A., Takahashi, M., Inoue, A., Kan, C., Kurioka, S., & Shimbo, T. (2014) *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, **165B**, 357–364.
- 6) Na, K.S., Won, E., Kang, J., Chang, H.S., Yoon, H.K., Tae, W.S., Kim, Y.K., Lee, M.S., Joe, S.H., Kim, H., & Ham, B.J. (2016) *Sci. Rep.*, **6**, 21089.
- 7) Januar, V., Ancelin, M.L., Ritchie, K., Saffery, R., & Ryan, J. (2015) *Transl. Psychiatry*, **5**, e619.
- 8) Okada, S., Morinobu, S., Fuchikami, M., Segawa, M., Yokomaku, K., Kataoka, T., Okamoto, Y., Yamawaki, S., Inoue, T., Kusumi, I., Koyama, T., Tsuchiyama, K., Terao, T., Kokubo, Y., & Mimura, M. (2014) *J. Psychiatr. Res.*, **53**, 47–53.
- 9) Won, E., Choi, S., Kang, J., Han, K.-M., Chang, H.S., Tae, W.S., Son, K.R., Joe, S.-H., Lee, M.S., & Ham, B.-J. (2016) *Transl. Psychiatry*, **6**, e866.
- 10) Frodl, T., Szyf, M., Carballedo, A., Ly, V., Dymov, S., Vaisheva, F., Morris, D., Fahey, C., Meany, J., & Gill, M. (2015) *J. Psychiatry Neurosci.*, **40**, 296–306.
- 11) Booij, L., Szyf, M., Carballedo, A., Frey, E.-M., Morris, D., Dymov, S., Vaisheva, F., Ly, V., Fahey, C., Meany, J., Gill, M., & Frodl, T. (2015) *PLoS One*, **10**, e0119061.
- 12) Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., & Meaney, M.J. (2004) *Nat. Neurosci.*, **7**, 847–854.
- 13) Kang, H.J., Kim, J.M., Stewart, R., Kim, S.Y., Bae, K.Y., Kim, S.W., Shin, M.G., & Yoon, J.S. (2013) *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **44**, 23–28.
- 14) Oullet-Morin, I., Wong, C.C., Danese, A., Pariante, C.M., Papadopoulos, A.S., Mill, J., & Arseneault, L. (2013) *Psychol. Med.*, **43**, 1813–1823.
- 15) Beach, S.R., Brody, G.H., Todorov, A.A., Gunter, T.D., & Philibert, R.A. (2010) *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, **153B**, 710–713.
- 16) Kaufman, J., Yang, B.Z., Douglas-Palumberi, H., Grasso, D., Lipschitz, D., Houshyar, S., Kryatal, J.H., & Gelemtzer, J. (2006) *Biol. Psychiatry*, **59**, 673–680.
- 17) Numata, S., Ishii, K., Tajima, A., Iga, J., Kinoshita, M., Watanabe, S., Umehara, H., Fuchikami, M., Okada, S., Boku, S., Hishimoto, A., Shimodera, S., Imoto, I., Morinobu, S., & Ohmori, T. (2015) *Epigenetics*, **10**, 135–141.
- 18) McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., Turecki, G., & Meaney, M.J. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**, 342–348.
- 19) Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Lyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., & Rao, A. (2009) *Science*, **324**, 930–935.
- 20) Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.L., & Song, H. (2011) *Cell*, **145**, 423–434.

著者寸描

●森信 繁 (もりのぶ しげる)

高知大学医学部神経精神科学教室教授。医学博士。