

DNAメチル化を用いた精神疾患の診断法の開発

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

准教授 森 信 繁

研究の背景

うつ病と統合失調症の実態

- WHOの時点有病者数(2004)にて、うつ病は世界で、1億5,100万人、統合失調症は2,600万人存在する
- 日常生活上の中等度～重症の障害をもたらす疾患群では、うつ病が世界3位、統合失調症は14位といずれも高い順位である

精神疾患の診断上の問題点

- 様々な立場があるが、公的な統計学的診断基準は、APA(アメリカ精神医学会)によるthe fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)に依る
- その基準は、主観的な症状の陳述や観察、罹病期間や症状変化の時間経過、臨床医の印象など、客観性に欠ける要素が多い
 - そのため、疾患の中でも多様性にとみ、正確な疫学調査や治療法の標準化、新薬の開発などが進みにくい

精神疾患の生物学的指標

- 前述の観点から、生物学的指標の必要性が提唱されて久しいが、未だ決定的な指標は存在しない

死後脳研究
脳画像研究
遺伝子研究

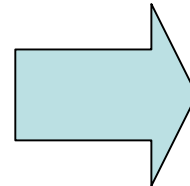
いずれの研究も、研究手法や対象の制限、
元来の遺伝子多様性などの問題を有する



生きているヒトを対象とした、苦痛を伴わない研究の観点から、
血液を用いた指標が着目されている

末梢血を用いた研究(大半は遺伝子研究で一部はタンパク)

連鎖解析
連鎖不平衡解析
集団遺伝学的解析
1塩基多型解析
全ゲノム関連研究



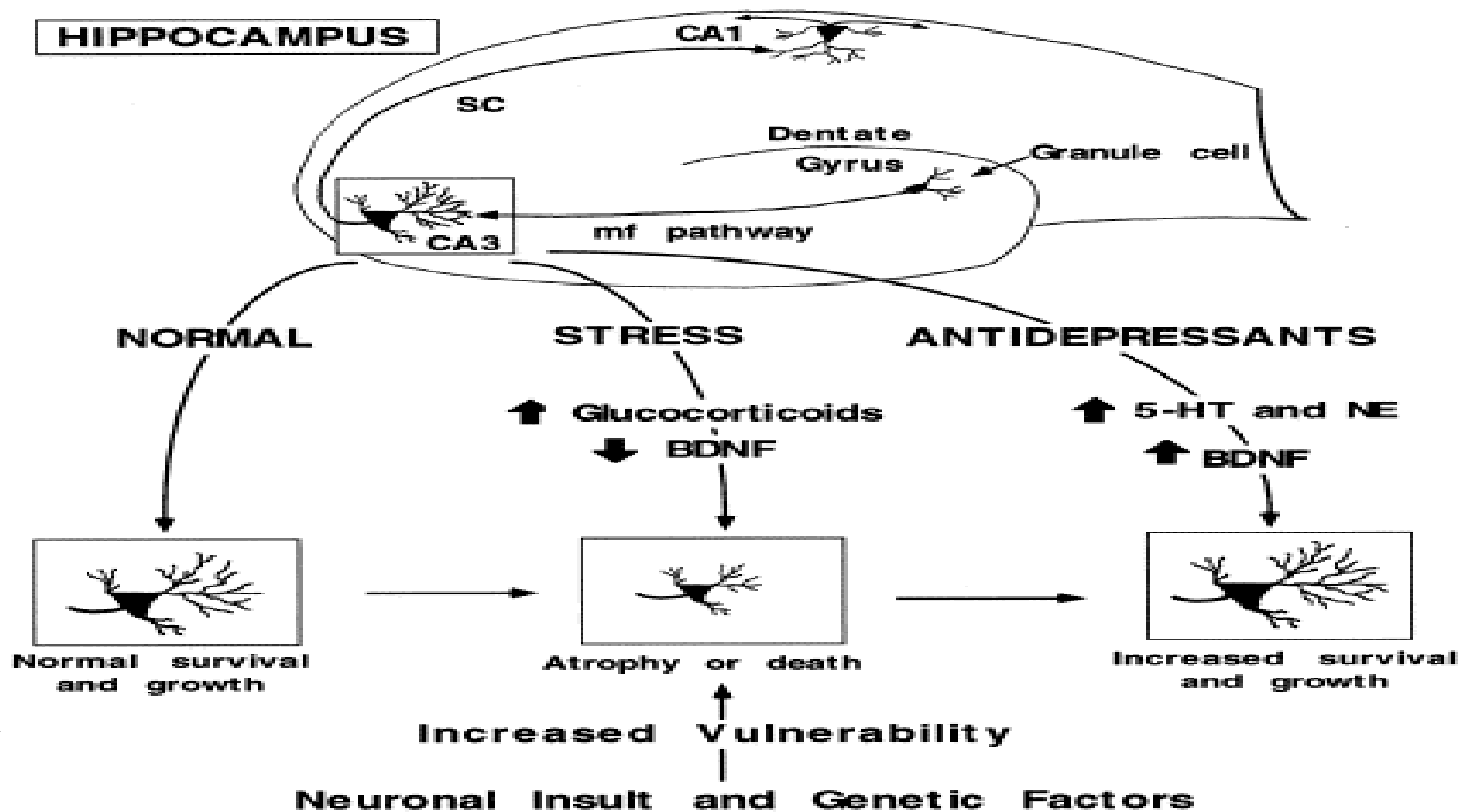
いずれも、元来の遺伝子の多様性、環境要因の影響などから、決定的な結論に達する研究はない

脳由来神経栄養因子

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

- BDNFは神経栄養因子群の一つで、主に中枢神経で発現している
- BDNFは、記憶・学習、神経発達、神経新生などの脳機能に深く関与している
(Broadbent et al.,2004: Kim and Diamond.,2002)
- BDNFはストレスによる海馬の神経可塑性、うつ病の病因に深く関与している
(Monteggia et al.,2004: Duman et al., 2006)

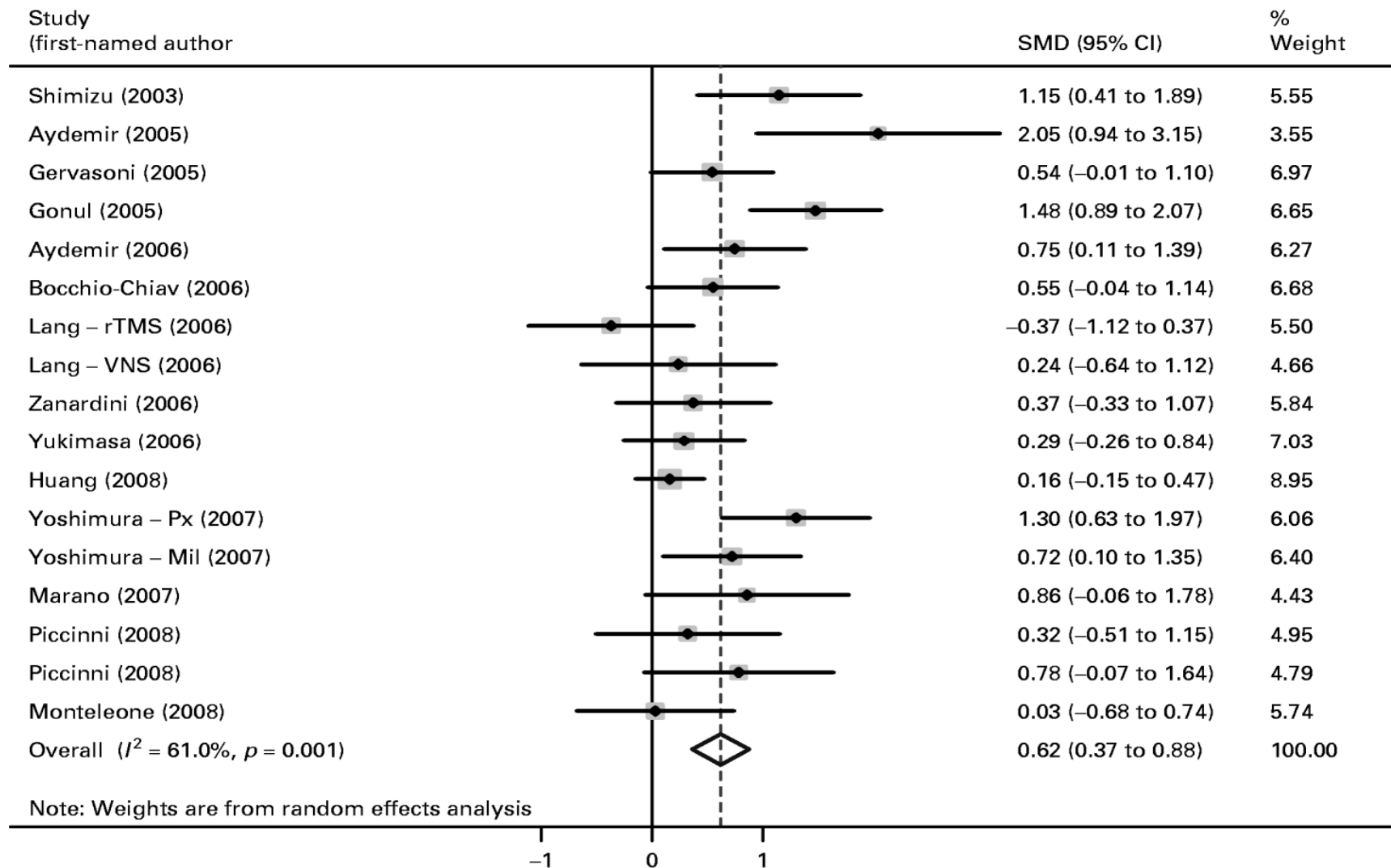
反復性うつ病の病態形成や治癒過程に関する BDNFの役割



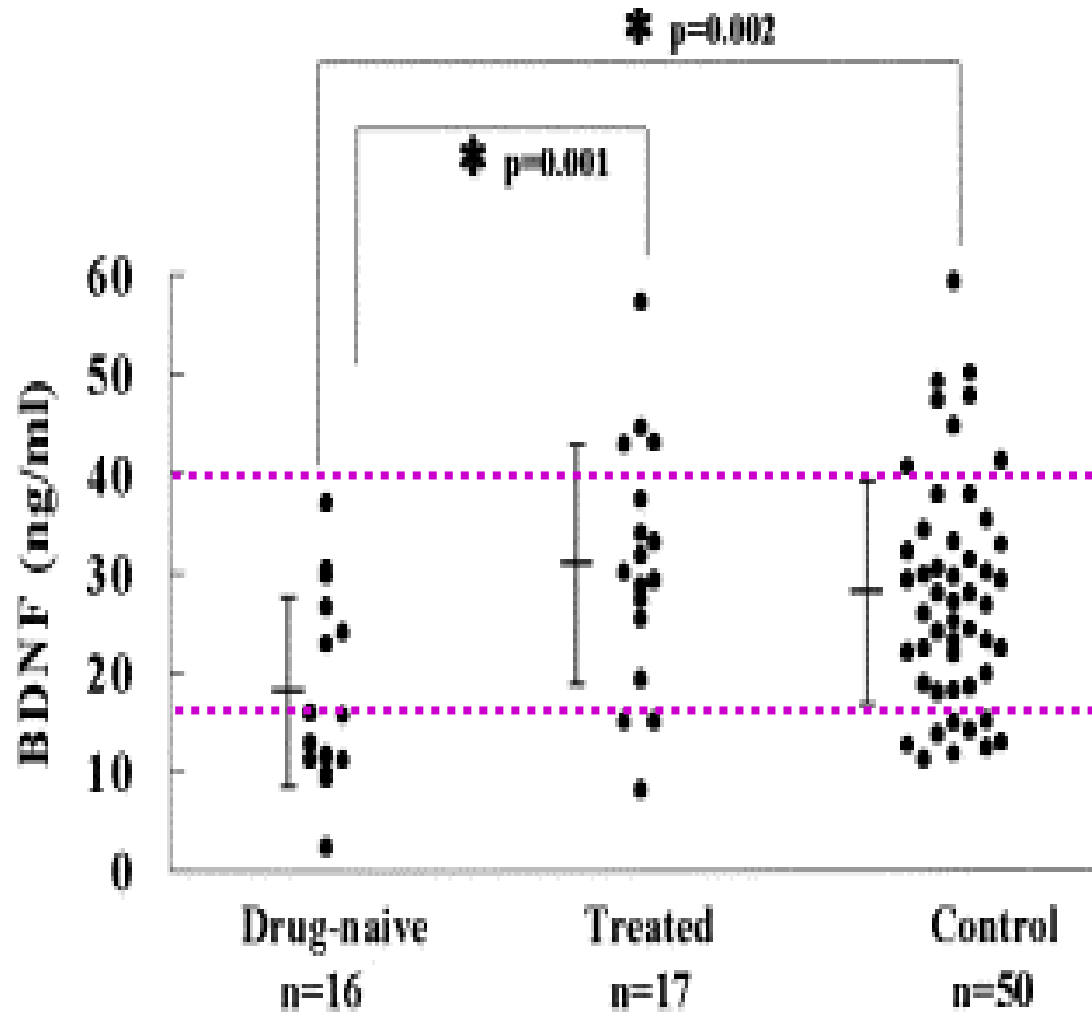
(Duman RS, 1998)

A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression

(Brunoni et al., Int J Neuropsychopharmacol 11: 1169-1180, 2008)



Decrease in serum levels of BDNF in major depression before treatment

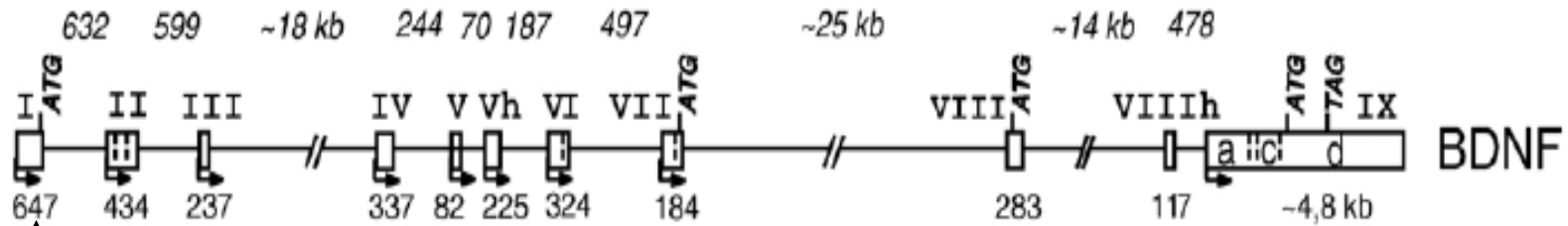


(Shimizu E et al., *Biol Psychiatry* 54: 70-75, 2003)

Epigenetic biomarker

- RNAやタンパクを用いたバイオマーカー研究は、物質の不安定さや標準化の煩雑化で再現性に乏しい(Simon, 2005)
 - DNAを用いた研究は、その安定性からより簡便ではあるが、DNAの変異は多様性に富み、不可逆的であるため、一部の遺伝性疾患に限られる(Yoo and Jones, 2006)
 - DNAのメチル化は、生物学的にも科学的にもかなり、安定性が高いが、環境変化や薬物処置にて可逆的である
- 癌や生活習慣病、多要因が関与して発症する疾患群において、疾患の発病マーカーや治療効果の判定における利用が注目されている (Tost 2010, Ushijima 2005)

Human BDNF



転写上のプロモーター活性や
preinitiationの観点から重要 (Delgado, Leon ,2006)

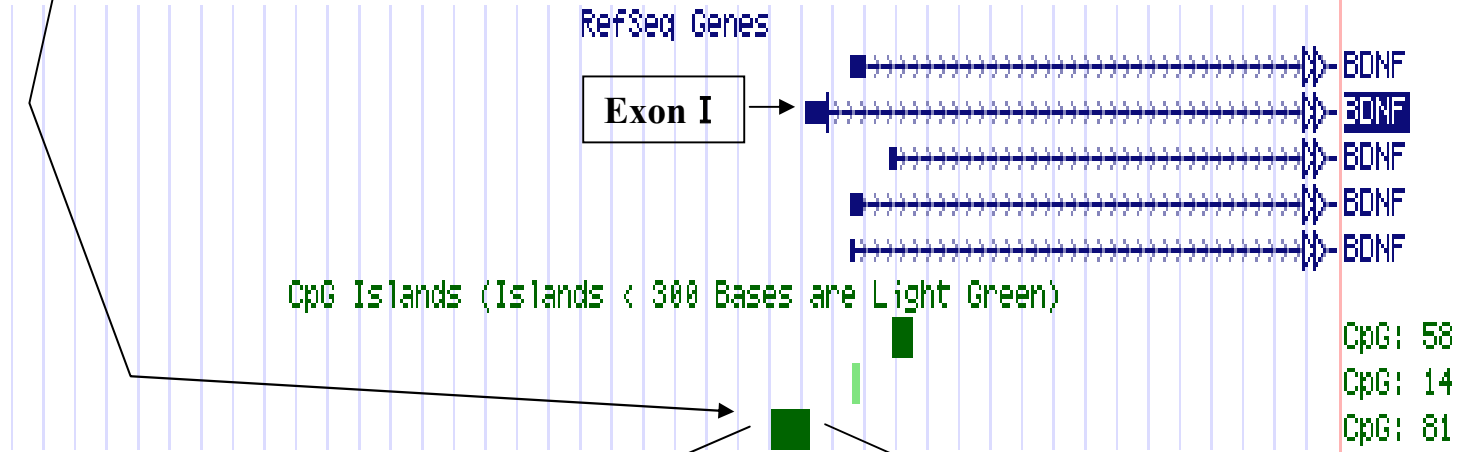
神経活動依存的な転写活性に重要
(Martinowich et al.,2003, Chen et al.,2003)

Exon I ExonIV の上流のCpG island
のDNAメチル化を解析した

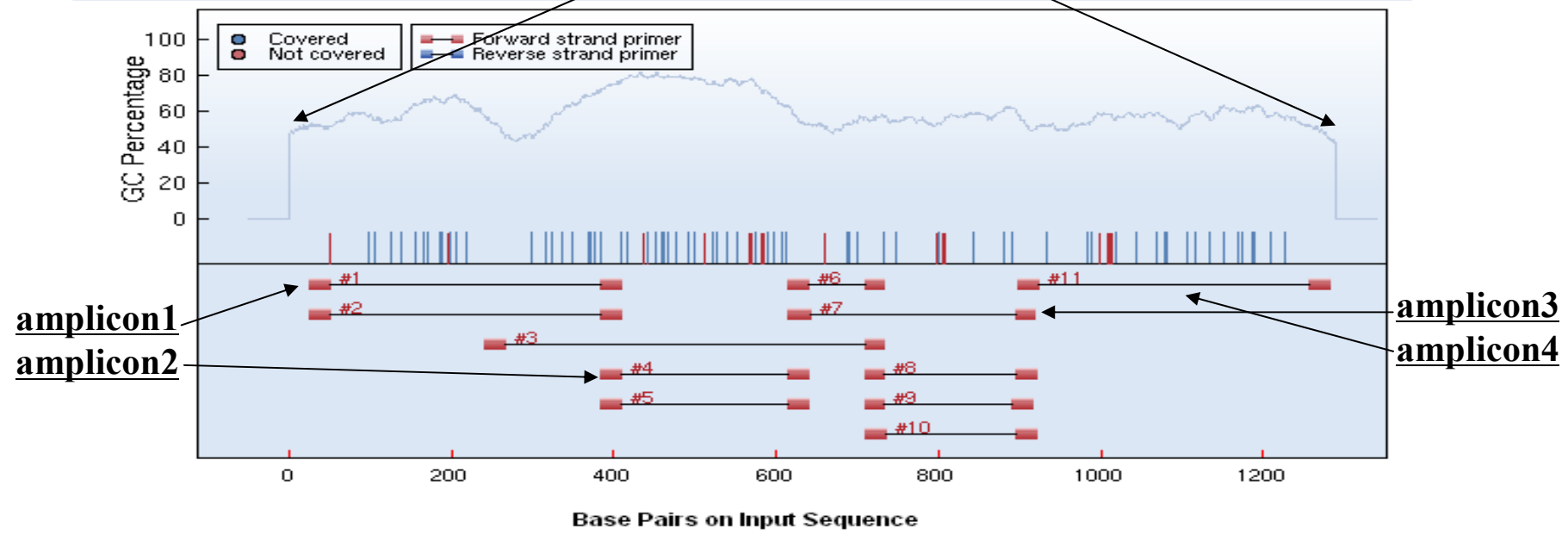
CpG Island Info

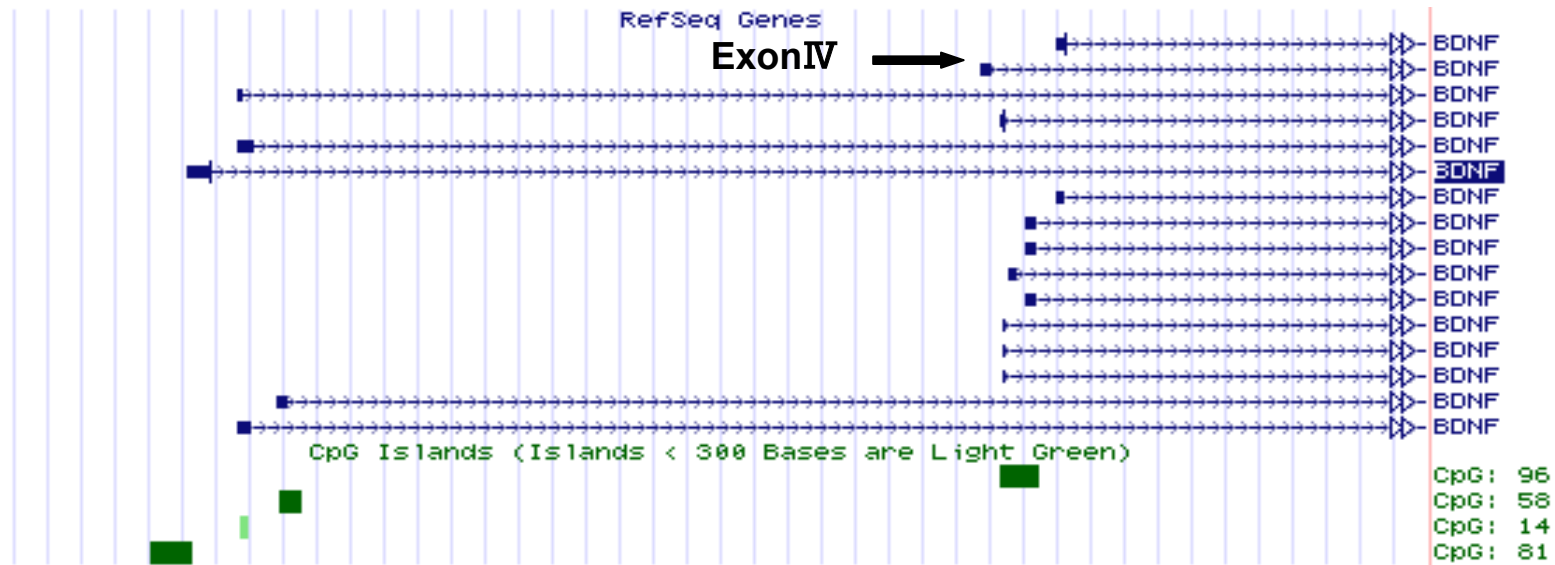
Position: chr11:27700049-27701140

Band: 11p14.1 Size: 1092 CpG count: 81 Percentage C or G: 60.5%

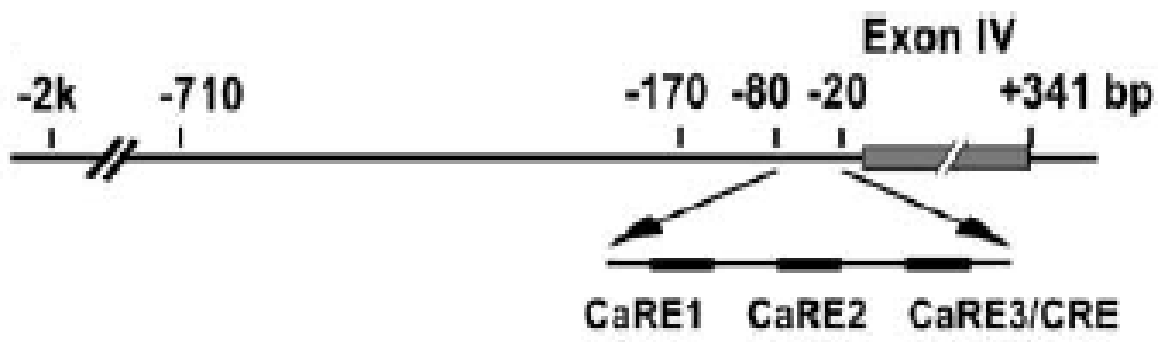


Results for seq00001





UCSC genome browser の基準ではExonIVの直上にCpG islandが存在せず



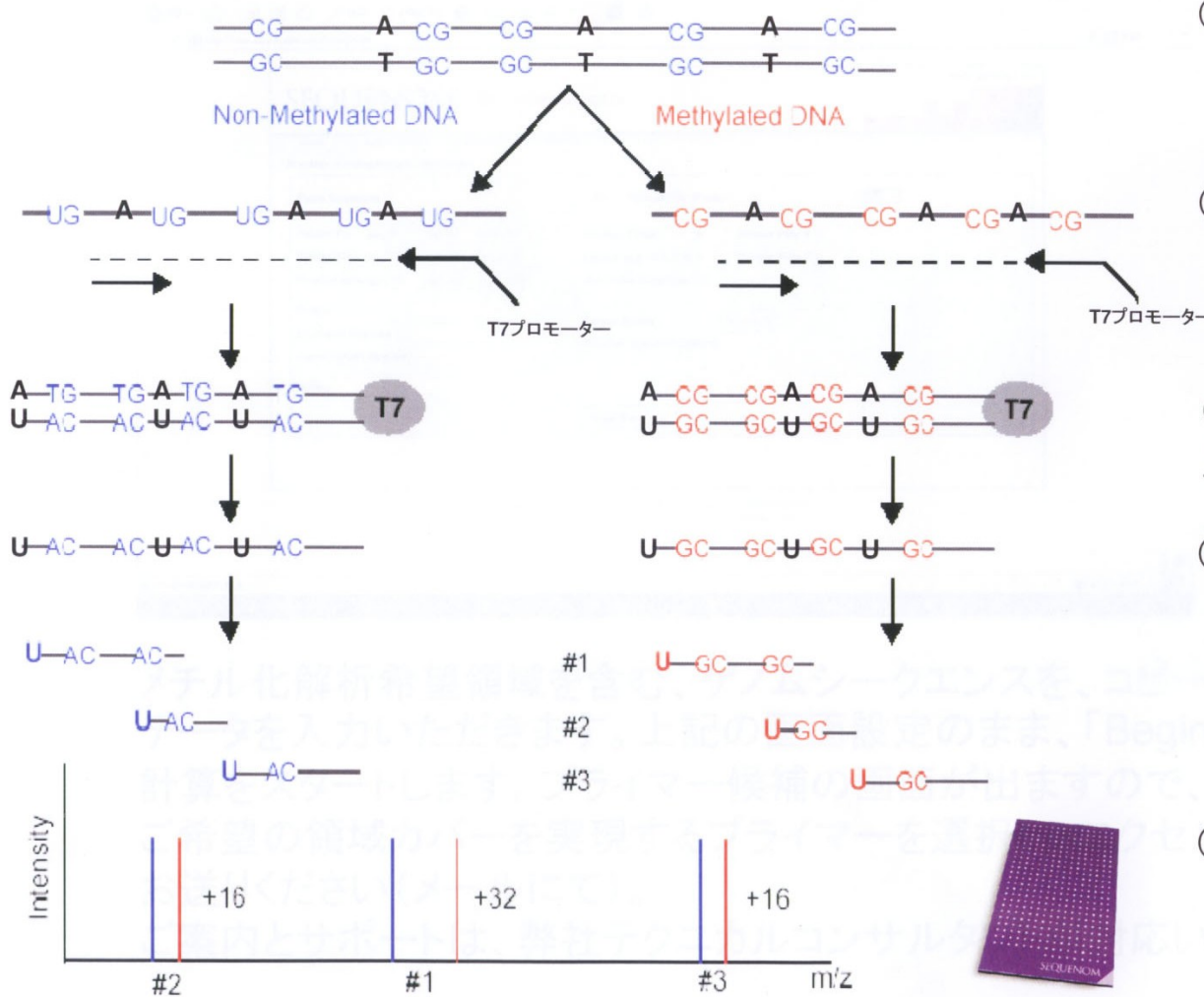
Proximal promoter activityは-710bp~-20bp上流に存在 (Keri Martinowich et al., 2003, S Yasuda et al., 2009)
 →-800bp~+341bpのsequenceに対しEpi designerでprimer設計

従来技術とその問題点

DNAメチル化解析

- **Methylation specific PCR**
- **Bisulfate sequencing**
- **Pyrosequencing**
- **Methylight (Methylation specific real-time PCR)**
- **COBRA(Combined Bisulfite Restriction Analysis)**
- **MassArray system**

MassARRAY (SEQUENOM)を用いたDNAメチル化の解析概要

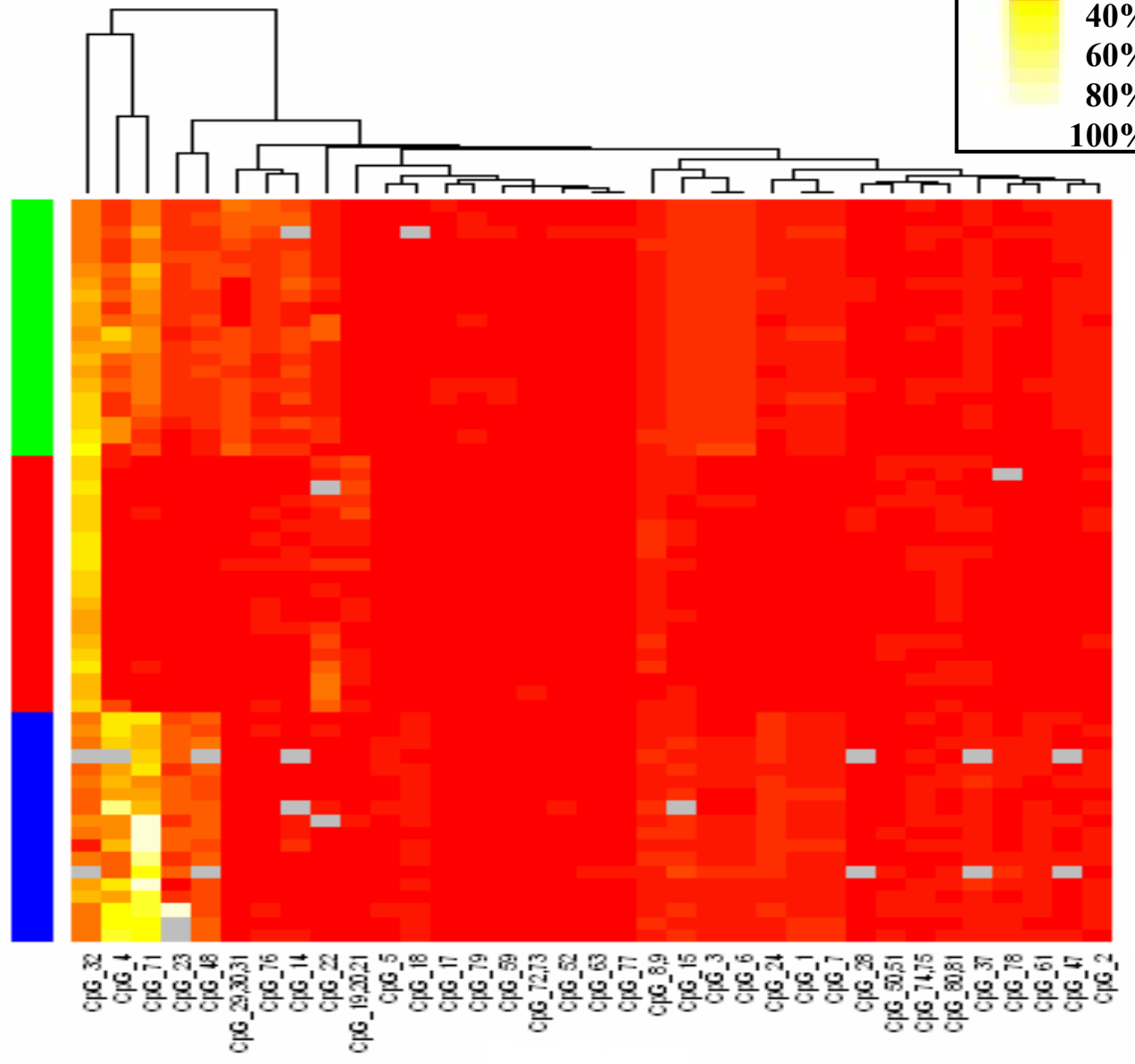
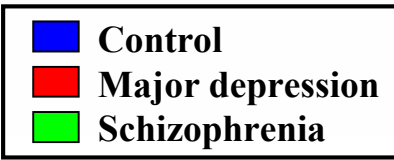
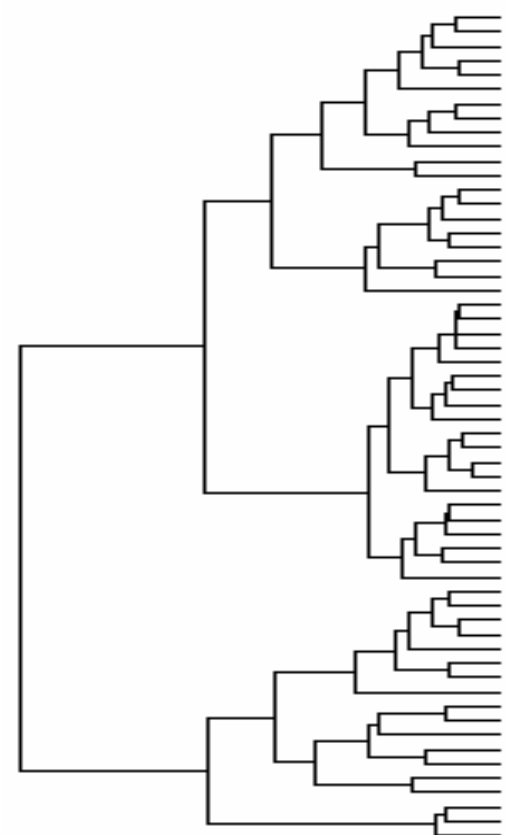
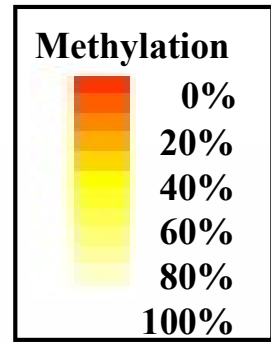


Demographic characteristics of subjects

Group	Gender (M/F)	Age (years: Mean \pm S.D.)
Control (N= 18)	10M/8F	42.3 \pm 9.6 (30 ~ 59)
Major depression (N= 20,投薬なし)	8M/12F	45.6 \pm 12.5 (21 ~ 61)
Schizophrenia (N= 20,投薬あり)	8M/12F	45.6 \pm 12.5 (21~ 62)

診断: DSM-IVおよび精神疾患簡易構造化面接法(M.I.N.I.)を用いた

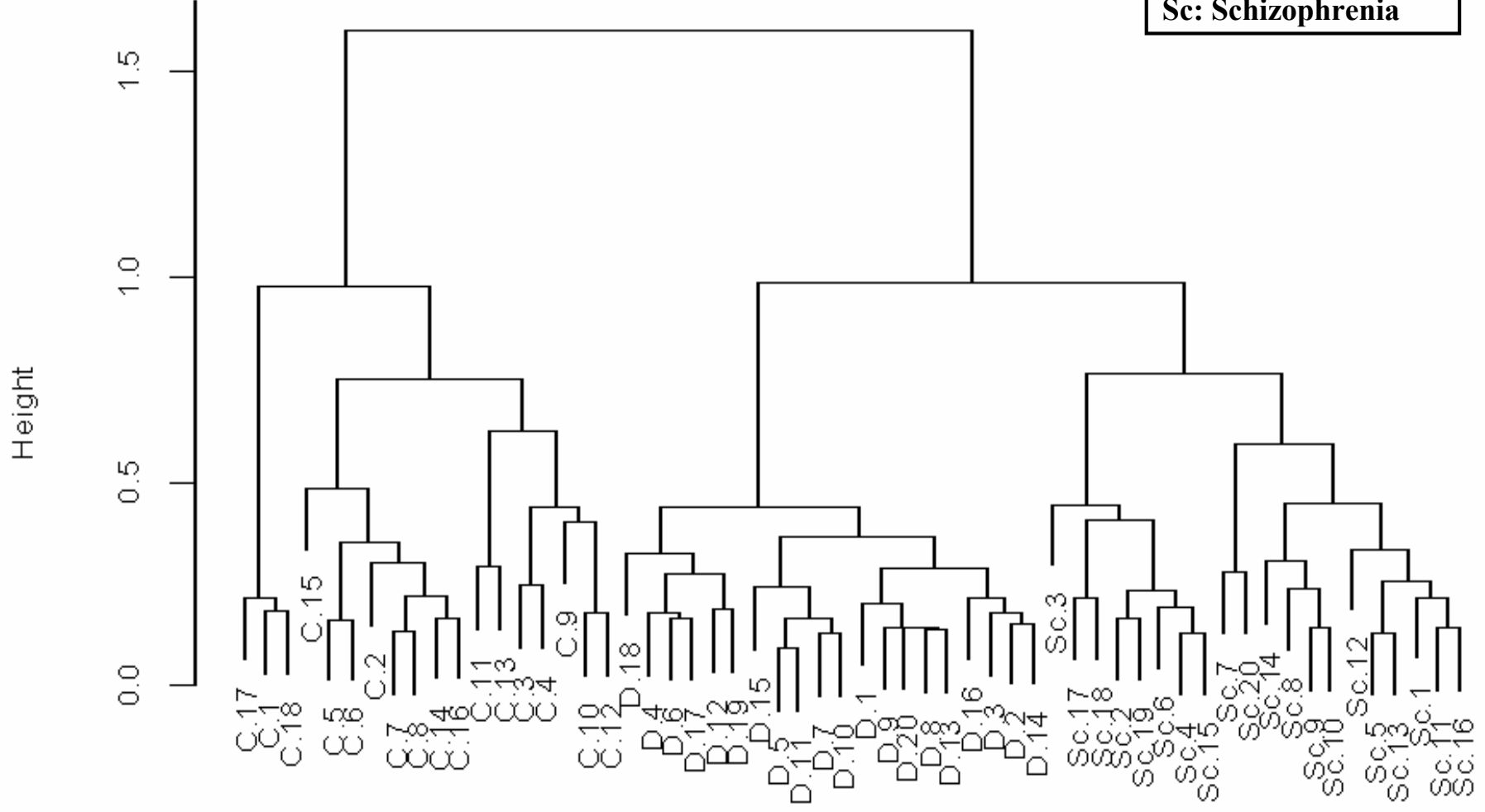
CpG I

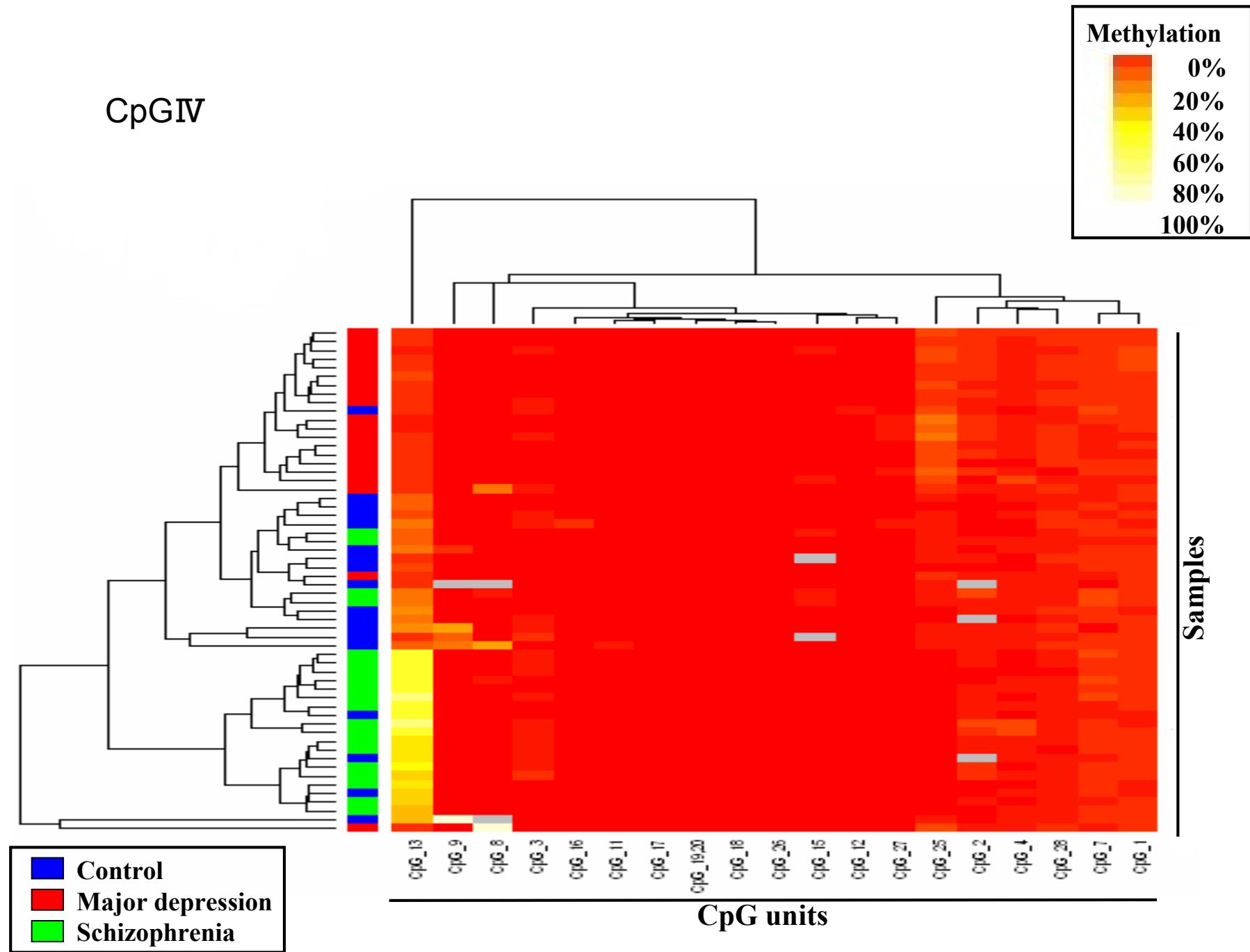


Samples

CpG units

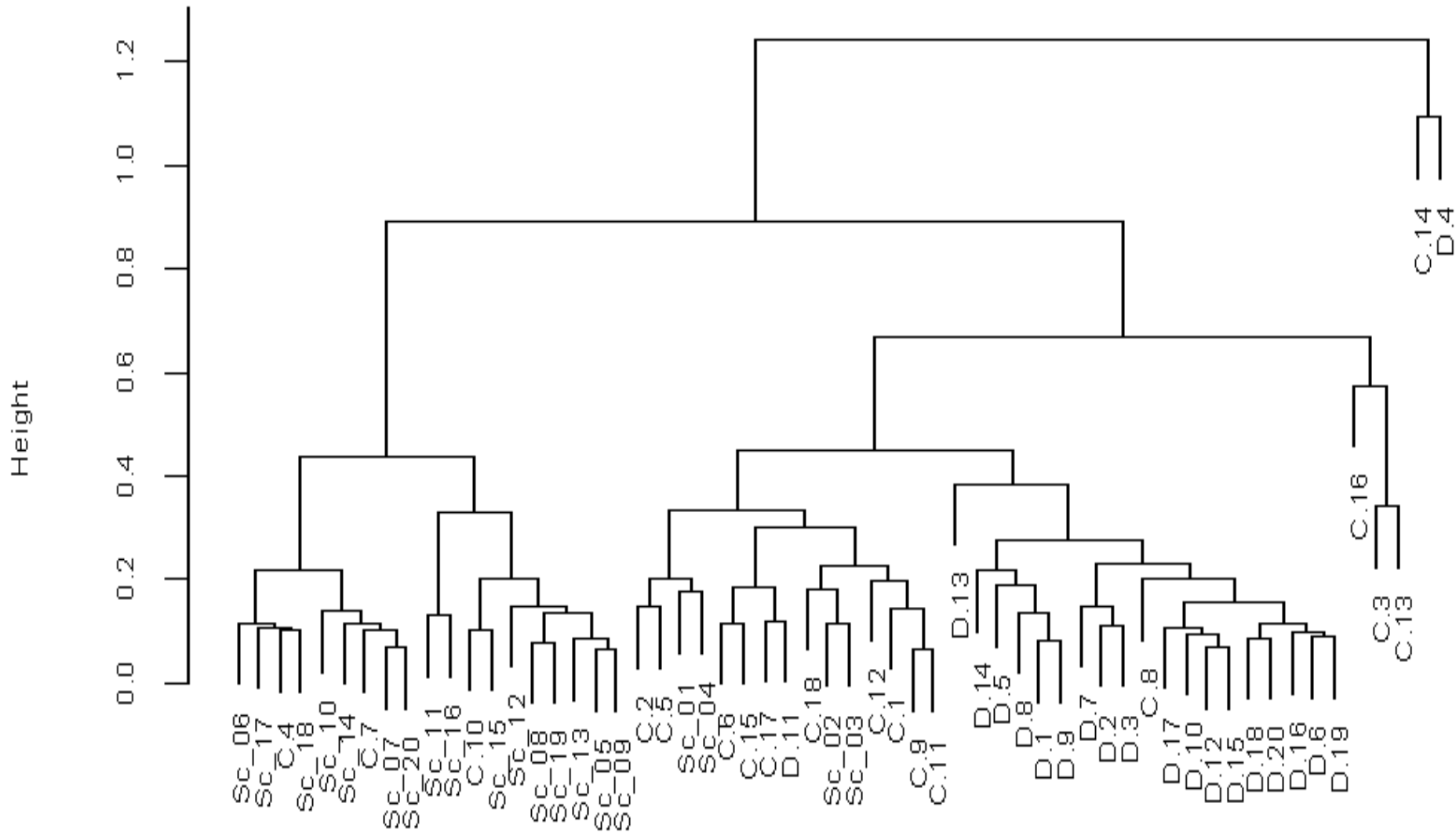
CpG I





CpGIV

C: Control
D: Major depression
Sc: Schizophrenia



Result of data filtering and analysis of variance

CpG unit	Mean of CpG ratio			Mean difference between group			Absolute value of mean difference			P value of one way test
	Control	DEP	SCZ	C-D	C-S	D-S	C-D	C-S	D-S	
CpG_1	0.124	0.023	0.121	0.101	0.003	0.020	0.101	0.003	0.020	3.67E-24
CpG_14	0.051	0.041	0.205	0.010	-0.154	0.195	0.010	0.154	0.195	1.29E-11
CpG_19,20,21	0.025	0.116	0.020	-0.091	0.005	0.111	0.091	0.005	0.111	2.29E-06
CpG_22	0.038	0.172	0.124	-0.134	-0.086	0.258	0.134	0.086	0.258	1.17E-09
CpG_23	0.283	0.034	0.162	0.248	0.121	-0.086	0.248	0.121	0.086	1.14E-12
CpG_24	0.144	0.018	0.084	0.125	0.060	-0.041	0.125	0.060	0.041	9.13E-20
CpG_29,30,31	0.019	0.033	0.211	-0.013	-0.192	0.224	0.013	0.192	0.224	1.76E-11
CpG_3	0.083	0.033	0.176	0.050	-0.094	0.126	0.050	0.094	0.126	3.89E-25
CpG_32	0.368	0.623	0.505	-0.255	-0.137	0.760	0.255	0.137	0.760	1.36E-11
CpG_36	0.004	0.095	0.082	-0.091	-0.078	0.173	0.091	0.078	0.173	1.46E-20
CpG_4	0.589	0.019	0.274	0.569	0.315	-0.296	0.569	0.315	0.296	7.95E-14
CpG_48	0.277	0.018	0.186	0.259	0.091	-0.073	0.259	0.091	0.073	8.51E-24
CpG_6	0.083	0.033	0.176	0.050	-0.094	0.126	0.050	0.094	0.126	3.89E-25
CpG_7	0.124	0.023	0.121	0.101	0.003	0.020	0.101	0.003	0.020	3.67E-24
CpG_71	0.743	0.036	0.389	0.707	0.354	-0.318	0.707	0.354	0.318	2.51E-17
CpG_76	0.036	0.061	0.164	-0.025	-0.129	0.189	0.025	0.129	0.189	4.56E-12
CpG_8,9	0.129	0.106	0.126	0.022	0.003	0.103	0.022	0.003	0.103	0.001241486

- Data filtering condition: 1. Calculate mean of methylation ratio in each CpG unit by group (Control, DEP, SCZ).
 2. Subtract mean methylation value between group. 3 Transpose from subtract mean value to absolute value.
 4. Extract absolute value has upper 0.1 at least one group.

One way test: Analysis of variance between group. P value is not adjustment for multiple test.

新技術の特徴・従来技術との比較

血清BDNFタンパク量の計測では、健康者とうつ病者の分類は重なる部分も多く診断技術として臨床応用が困難であった。同時に統合失調症とうつ病の鑑別も、血清BDNFタンパク量の計測では困難であった。

血清BDNFタンパク量計測キット

Emax® ImmunoAssay System (Promega)

BDNF Human ELISA Kit (abcam®)

BDNF遺伝子Exon Iのプロモーター上のCpGアイランドのメチル化を解析することで、健康者・うつ病患者・統合失調症者をほぼ100%の精度で診断することが可能になった。

MassARRAY法を用いることで、多数のCpGのメチル化率を計測できるようになり、従来用いられていたBisulfate Sequencing法と比べて、時間的な短縮や技術的な煩雑さが改良された。

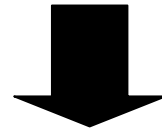
予想される用途

うつ病および統合失調症の診断をはじめ、精神疾患の客観的診断法に適用されることで、治療者間で診断が異なるような事態が防がれる。

うつ病治療に対する抗うつ薬の選択や予後の推測、統合失調症治療に対する抗精神病薬の選択や予後の推測、などに適用することで、これまで指針のなかった上記のような問題を解決していく上でのメリットが大きいと考えられる。

実用化に向けた課題

- 薬物投与の影響
- 疾患の限定(うつ病、統合失調症のみ)
- 人種差の影響
- サンプルサイズの問題



対象疾患や解析数を増やし、
生物学的指標を確立していく

本技術に関する知的財産権

発明の名称：精神疾患の検査法、精神疾患用の
検査キット、ならびに精神疾患治療剤
および/または予防剤の評価方法

出願番号 : 特願2010-175748

出願人 : 広島大学

発明者 : 森信 繁、淵上 学

お問い合わせ先

広島大学

産学官連携コーディネーター 山田一徳

TEL 082-257-5427

FAX 082-257-1567

e-mail kazuyama@hiroshima-u.ac.jp