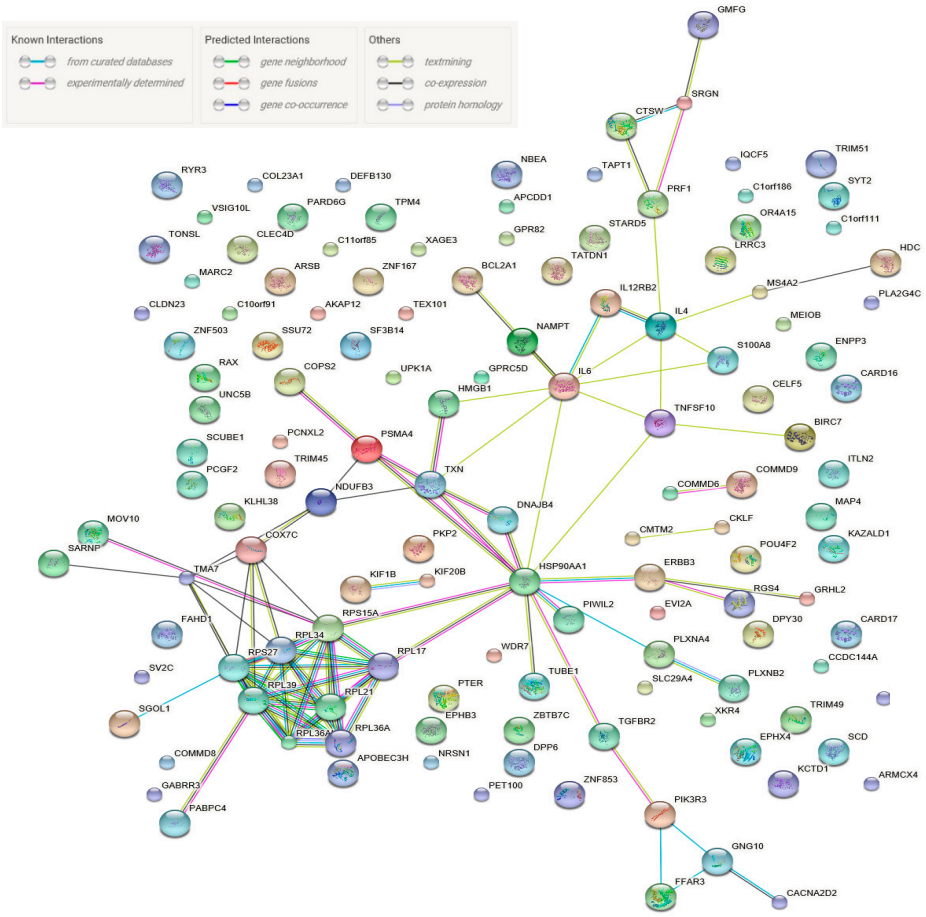
| 156　遺伝子発現プロファイルによる精神疾患発症予測法開発 | 堀　弘明 |
|---|---|

**【目的】**うつ病の病因は未解明であり、その主要リスク因子とされるストレス脆弱性の本態も不明である。本研究は、ストレス脆弱性の表現型と分子基盤を統合的に解析し、さらにストレス脆弱性とうつ病の連続性を検討することにより、精神疾患発症予測に資するエビデンスを創出することを目的とした。

**【方法】**初めに、一般人口から募集した健常者を対象に、潜在プロフィール分析を用いて各個人の心理特性プロフィールに基づいて行ったストレス脆弱性分類と、末梢血 RNA を用いてマイクロアレイにより測定したトランスクリプトームの関連を検討した。ストレス脆弱性に密接に関与する少数の遺伝子を選定し、これらの遺伝子について、独立のマイクロアレイデータおよび qPCR により、健常対照者と比較したうつ病患者における発現変動を調べた。

**【結果】**分散分析および fold change の基準を用い、ストレス脆弱性に関連して発現が変動する遺伝子群を同定した。それらの遺伝子群に対してパスウェイ・ネットワーク解析、共発現解析を適用することにより、リボソーム遺伝子群の有意な濃縮が見出された。中でも重要性が示唆された *RPL17* と *RPL34* については、うつ病患者においても、健常者のストレス脆弱性に関連した発現変動と同様の変動が認められた。

Stress vulnerable 群と Stress resistant 群の間での発現変動遺伝子によるタンパク質間相互作用解析



# 156. 遺伝子発現プロファイルによる精神疾患発症予測法開発

堀　弘明

*国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 成人精神保健研究部

Key words：ストレス脆弱性，うつ病，表現型，トランスクリプトーム，リボソーム遺伝子

## 緒　言

ストレス脆弱性は、うつ病をはじめとする多くのストレス関連精神疾患の主要なリスク因子であるが、その実態は明らかにされていない。また、うつ病の病因も未解明であり、病態研究やバイオマーカー研究が精力的に行われているものの、発症予測や客観的診断に資する生物学的指標は存在しない。

ストレス脆弱性は心理学的な視点と生物学的な視点から捉えることができる。心理的なレベルでのストレス脆弱性は、パーソナリティ特性やストレス対処方略によって規定されると考えられるが、単一の特性によって決定されるというより、複数の心理特性によって形成される各個人のプロフィールが重要である可能性がある。一方、生物学的なレベルでは、一つひとつは効果の小さな多数の感受性遺伝子が環境要因と複雑な様式で相互作用することによってストレス脆弱性が形成されるものと想定され、そういったゲノムと環境の相互作用の全体像は遺伝子発現プロファイルにスナップショットとして現れうる。また、こういった特性を有するストレス脆弱性は、健常者からうつ病患者へと連続的に分布していると推定される。

そこで本研究では、ストレス脆弱性の表現型と分子基盤を統合的に解析し、さらにストレス脆弱性とうつ病の連続性を検討することにより、精神疾患発症予測に資するエビデンスを創出することを目的とした。

## 方　法

本研究は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を受けて実施され、研究への参加に際しては、各被験者に対して文書を用いて説明し、書面で同意を得た。

研究全体の流れを図 1 に示す。本研究は以下の 2 つの主要パートから構成される。

前半部分である第 1 パートでは、健常者を対象に、各個人の心理特性プロフィールに基づいて行ったストレス脆弱性分類と、末梢血 RNA を用いて測定したトランスクリプトームの関連を検討した。われわれは既報論文において、個人志向型の統計的分類手法である潜在プロフィール分析を用い、一般人口から募集した 455 名の健常成人が 2 つの適応的グループ（ストレスからの回復力を持つ「Resilient」群、ストレスの影響を受けにくい「Resistant」群）と 1 つの非適応的グループ（ストレス脆弱性を有する「Vulnerable」群）に分類されることを見出した［1］。研究プロジェクトの一部として、同意の得られた同一被験者において採血を行い、末梢血 RNA サンプルを保存していたため、本研究ではこの保存検体を利用した。すなわち、上述の 455 名のうち Resilient、Vulnerable、Resistant 各群 20 名ずつ合計 60 名を、年齢・性別を 3 群間で揃えて抽出し、RNA 検体をマイクロアレイ解析に供した。本パートにおけるマイクロアレイは、Agilent 社の SurePrint G3 v3 human GE 8 × 60K microarray を用いた。群間で発現が変動する遺伝子群を同定し、この遺伝子群に対してバイオインフォマティクス解析を適用することにより、ストレス脆弱性に関連する分子システムを探索した。

後半部分の第 2 パートでは、第 1 パートの結果に基づいてストレス脆弱性との関連における最重要遺伝子を少数選定し、われわれの先行研究で取得したマイクロアレイデータセット［2，3］および逆転写定量 PCR（qPCR）を用いて、うつ病患者における発現変動を検討した。まず、既取得マイクロアレイデータ（第 1 パートとは独立のサンプルセット）を用い、うつ病患者 54 名（平均年齢 40.4 歳、女性の割合 50.0%）、うつ病が寛解状態にある患者 14 名（平均年齢 41.3

*現在の所属：国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所行動医学研究部

歳、女性の割合 50.0%)、健常対照者 54 名（平均年齢 39.7 歳、女性の割合 50.0%）の間で選定遺伝子の発現レベルを比較した。次に qPCR により、上述のいずれのマイクロアレイデータセットとも独立のサンプルセットであるうつ病患者 106 名（平均年齢 37.1 歳、女性の割合 50.0%）と健常対照者 60 名（平均年齢 37.8 歳、女性の割合 55.0%）の間で、選定遺伝子の発現レベルを比較した。また向精神薬服用の影響を調べるために、服薬中のうつ病患者 116 名、服薬していないうつ病患者 24 名、健常対照者 91 名の 3 群で選定遺伝子の発現量を比較した。さらに、疾患特異性を検討するために、同じ選定遺伝子について qPCR を行い、年齢・性別を揃えた大うつ病性障害患者 59 名、双極性障害患者 47 名、統合失調症患者 43 名、健常対照者 60 名の 4 群で発現量を比較した。

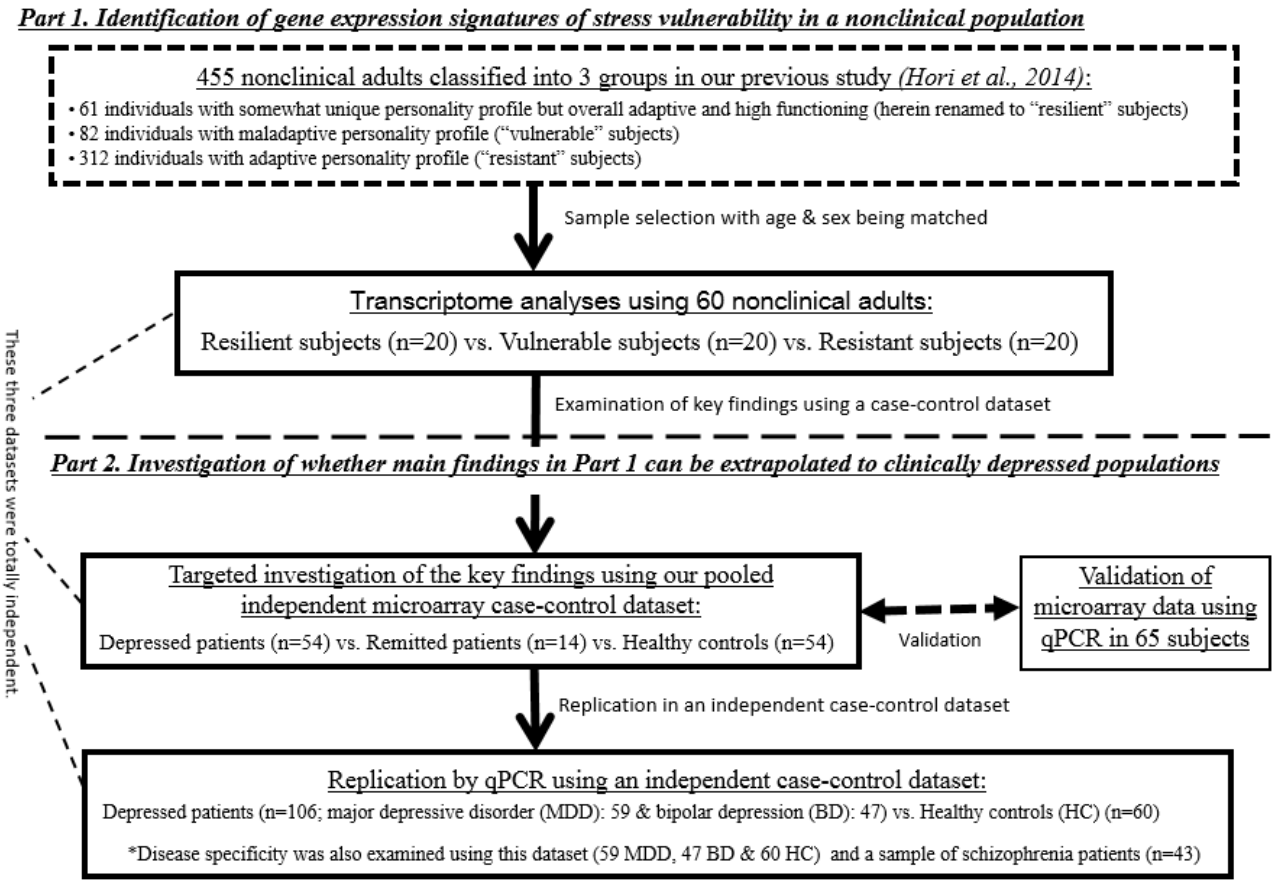



図 1. 研究手順とデータ解析の流れ

本研究は 2 つのパートから構成される。第 1 パートは、ストレス脆弱性に関連する遺伝子発現変化についての部分であり、3 群（「Resilient」群、「Vulnerable」群、「Resistant」群）に分類された 60 名の健常成人においてトランスクリプトーム解析を実施した。第 2 パートでは、第 1 パートにおける主要な結果について、うつ病患者を対象に検討した。

## 結　果

第 1 パートにおいて、分散分析と fold change の基準により、他の 2 群に比べて Vulnerable 群で有意に発現が変動する遺伝子群を同定した。この遺伝子群に対してパスウェイ解析やネットワーク解析を適用することにより、ストレス脆弱性に関与する分子系としてリボソーム遺伝子群が重要であることを見出した（表 1、図 2, 3）。

表 1. 発現変動遺伝子セットの有意な濃縮が認められたパスウェイ

| | Pathway database | Pathway term | p | Input genes appearing in the pathway database |
|---|---|---|---|---|
| Resilient vs. Vulnerable groups | | | | |
| | KEGG | hsa05100: Bacterial invasion of epithelial cells | 0.016 | *MAD2L2, SHC3, PIK3R3, ELMO2, SEPT8* |
| | KEGG | hsa04360: Axon guidance | 0.022 | *PAK6, ABLIM2, PLXNB2, ROBO2, L1CAM, EPHB3* |
| | KEGG | hsa04014: Ras signaling pathway | 0.023 | *PAK6, PDGFB, PLCG1, ANGPT1, SYNGAP1, SHC3, PIK3R3, PLA2G2F* |
| | KEGG | hsa04510: Focal adhesion | 0.045 | *PAK6, PDGFB, TNN, COL1A1, SHC3, PIK3R3, FLNA* |
| | KEGG | hsa05214: Glioma | 0.048 | *PDGFB, PLCG1, SHC3, PIK3R3* |
| Resilient vs. Resistant groups | | | | |
| | KEGG | hsa00760: Nicotinate and nicotinamide metabolism | 0.013 | *NT5C3B, ENPP3, AOX1* |
| | Reactome | R-HSA-1296072: Voltage gated Potassium channels | 0.023 | *KCNA6, KCNV2, KCNG2* |
| | KEGG | hsa01100: Metabolic pathways | 0.048 | *ETNPPL, ACSM2B, ACSM3, A4GALT, NT5C3B, CYP2C18, SPTLC3, ENPP3, AOX1, DGKI, AK7, HPD, PLA2G2F* |
| Vulnerable vs. Resistant groups | | | | |
| | Reactome | R-HSA-156902: Peptide chain elongation[a] | 1.80E-06 | *RPL17, RPL21, RPL34, RPL36A, RPL36AL, RPL39, RPS15A, RPS27* |
| | KEGG | hsa03010: Ribosome | 4.20E-05 | *RPL17, RPL21, RPL34, RPL36A, RPL36AL, RPL39, RPS15A, RPS27* |
| | KEGG | hsa04664: Fc epsilon RI signaling pathway | 0.012 | *IL4, MS4A2, PLA2G4C, PIK3R3* |

注：パスウェイ解析は、ペアごとに異なる発現変動遺伝子リストを用いて行った。 [a]同一データベースにおいて類似のパスウェイが複数同定されたため、最もp値の小さなパスウェイのみを残し、他は本リストから除外した。

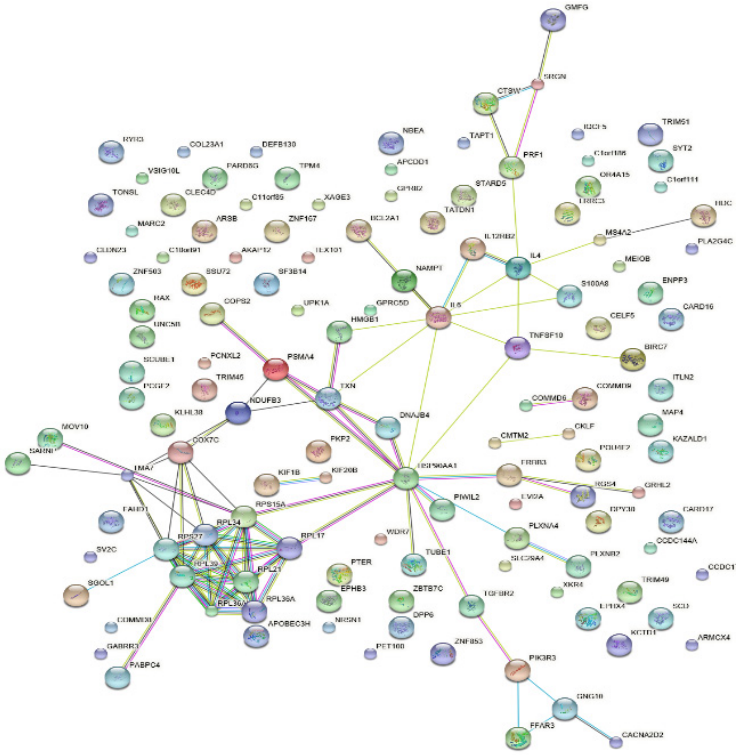



図 2. Vulnerable 群と Resistant 群の間での発現変動遺伝子によるタンパク質間相互作用解析
Vulnerable 群と Resistant 群の間での発現変動遺伝子を用い、Search Tool for the Retrieval of Interacting。Genes/Proteins（STRING）により作成したタンパク質間相互作用ネットワーク。

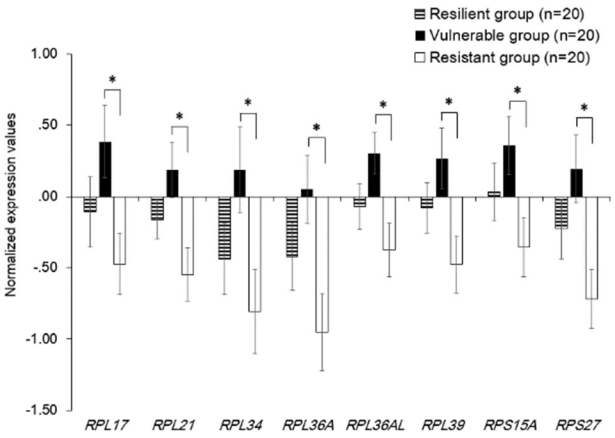



図 3. マイクロアレイで測定したリボソーム遺伝子発現についての Resilient、Vulnerable、Resistant 群の比較
8 個のリボソーム遺伝子、すなわち *RPL17*、*RPL21*、*RPL34*、*RPL36A*、*RPL36AL*、*RPL39*、*RPS15A*、*RPS27* の発現量を 3 群間で比較した。群間比較には分散分析を用い、事後検定におけるペアごとの比較は Tukey の HSD 法を用いて行った。*p < 0.05。エラーバーは標準誤差を示す。

第 2 パートでは、その中でも発現変動が大きく重要性が示唆されたリボソーム遺伝子として *RPL17* と *RPL34* を選定し、うつ病患者における発現変動を検討した。既取得マイクロアレイデータと qPCR データの両方において、健常対照者と比較してうつ病患者では、上述のストレス脆弱性に関連した発現亢進と同様の *RPL17* と *RPL34* の発現亢進が認められた（図 4）。この結果は服薬していないうつ病患者でも確認された。双極性障害、統合失調症に比べ、とりわけ大うつ病性障害において *RPL17* と *RPL34* の発現亢進が顕著であった（図 5）。

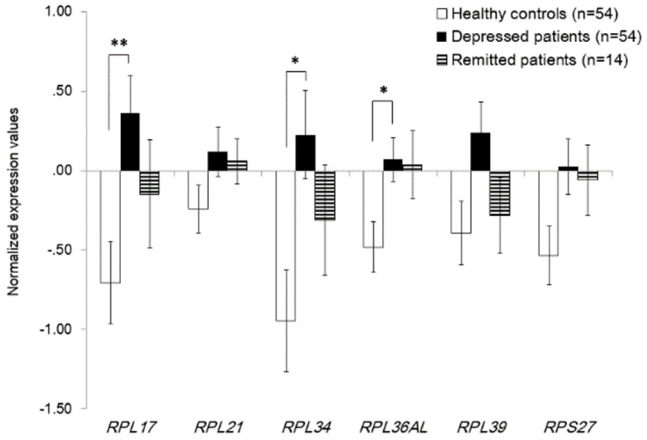



図 4. 既存マイクロアレイデータでのリボソーム遺伝子発現のうつ病患者, 寛解うつ病患者, 健常対照者の比較
6 個のリボソーム遺伝子、すなわち *RPL17*、*RPL21*、*RPL34*、*RPL36AL*、*RPL39*、*RPS27* の発現量を 3 群間で比較した。群間比較には分散分析を用い、事後検定におけるペアごとの比較は Tukey の HSD 法を用いて行った。
*p < 0.05, **p < 0.01。エラーバーは標準誤差を示す。

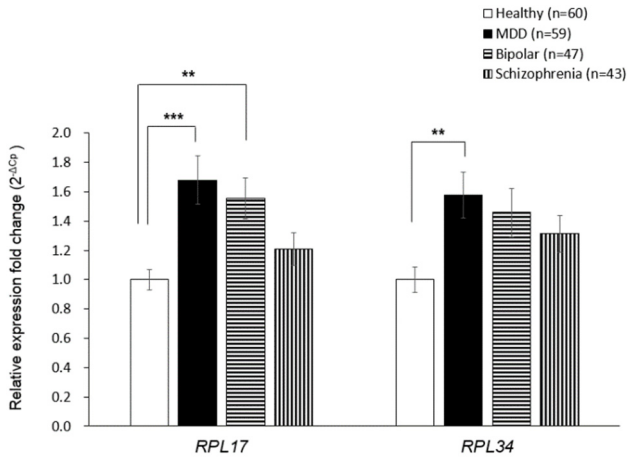



図 5. qPCR で測定した *RPL17* と *RPL34* の遺伝子発現についての群間比較

視認性を考慮し、qPCR で測定した相対発現量（-ΔCp）を $2^{-\Delta Cp}$ に変換した上で、健常者の平均値が「1」になるよう変換することにより、データが fold change を表すようにした。群間比較には分散分析を用い、ペアごとの事後検定は Tukey の HSD 法を用いて行った。$^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$。エラーバーは標準誤差を示す。

## 考　察

以上の結果より、リボソーム遺伝子、とりわけ*RPL17*と*RPL34*が、ストレス脆弱性およびうつ病に共通に関与する可能性が示唆される。なお本研究ではトランスクリプトーム解析に末梢血を用いたが、脳でも同様の遺伝子発現変化がみられることが報告されている。たとえば、大うつ病性障害患者の死後脳を用いたRNA-seqによって、健常対照者に比べ患者の眼窩前頭皮質でのリボソーム遺伝子発現亢進、および「Ribosome」や「Peptide chain elongation」を含むパスウェイの有意な濃縮が報告されている［4］。また、社会的敗北ストレスによるうつ病モデルマウスの視床下部において、コントロールマウスの同部位に比較し、*RPL34*を含む多数のリボソーム遺伝子の発現亢進が見出されている［5］。これらの知見から、ストレス脆弱性やうつ病に関連した脳・末梢共通でのリボソーム遺伝子発現変動が示唆される。

本研究の特色は、ストレス脆弱性を構成する表現型の相互作用プロフィールを考慮してその分子基盤を探索するとともに、健康な状態からうつ病へと至るプロセスを連続的に捉えている点にある。リボソーム遺伝子がストレス脆弱性およびうつ病に関与する可能性を示した本研究の結果に基づき、うつ病の発症予測法や個別化予防法の創出へとつながることが期待される。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、DNA チップ研究所の中村誠二、国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第三部の吉田冬子、寺石俊也、篠山大明、太田深秀、服部功太郎、功刀浩、同センター精神保健研究所行動医学研究部の金吉晴、同センターの樋口輝彦である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

## 文　献

1）　Hori H, Teraishi T, Sasayama D, Matsuo J, Kinoshita Y, Ota M, Hattori K, Kunugi H. A latent profile analysis of schizotypy, temperament and character in a nonclinical population: association with neurocognition. J Psychiatr Res. 2014 Jan;48(1):56-64. PMID: 24183242 DOI: 10.1016/j.jpsychires.2013.10.006

2) Hori H, Sasayama D, Teraishi T, Yamamoto N, Nakamura S, Ota M, Hattori K, Kim Y, Higuchi T, Kunugi H. Blood-based gene expression signatures of medication-free outpatients with major depressive disorder: integrative genome-wide and candidate gene analyses. Sci Rep. 2016 Jan 5;6:18776. PMID: 26728011 DOI: 10.1038/srep18776

3) Sasayama D, Hori H, Nakamura S, Miyata R, Teraishi T, Hattori K, Ota M, Yamamoto N, Higuchi T, Amano N, Kunugi H. Identification of single nucleotide polymorphisms regulating peripheral blood mRNA expression with genome-wide significance: an eQTL study in the Japanese population. PLoS One. 2013;8(1):e54967. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23359819 DOI: 10.1371/journal.pone.0054967

4) Darby MM, Yolken RH, Sabunciyan S. Consistently altered expression of gene sets in postmortem brains of individuals with major psychiatric disorders. Transl Psychiatry. 2016 Sep 13;6(9):e890. PMID: 27622934 DOI: 10.1038/tp.2016.173

5) Smagin DA, Kovalenko IL, Galyamina AG, Bragin AO, Orlov YL, Kudryavtseva NN. Dysfunction in Ribosomal Gene Expression in the Hypothalamus and Hippocampus following Chronic Social Defeat Stress in Male Mice as Revealed by RNA-Seq. Neural Plast. 2016;2016:3289187. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26839715 DOI: 10.1155/2016/3289187