

## 脳脊髄液 BDNF プロペプチド濃度を指標としたうつ病 BDNF 仮説の検討

切刀 浩

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

### 【研究の背景】

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は精神疾患、特にうつ病との関連が指摘されてきた。抗うつ薬の慢性投与によりラットの海馬において BDNF の発現が有意に増加すること (Nibuya et al. 1996)、死後脳においても同部位で BDNF 量が減少することが報告されている (Chen et al. 2001)。また、大うつ病患者の血液中 BDNF 量は減少しており、抗うつ薬投与患者では上昇することが報告され、バイオマーカーとなる可能性が指摘されてきた (Shimizu et al. 2003, Sen et al. 2008 ほか)。我々もラットの拘束ストレスによって BDNF の発現が低下することや、培養ニューロンにおいて BDNF とストレスホルモン受容体が相互作用すること (Chiba et al. 2012, Numakawa et al. 2009) を明らかにしてきた。こうしたエビデンスの集積により、精神疾患の BDNF 仮説は概ね定説となったと考えられる。しかし、血液中の BDNF は血小板に多く含まれており、食事や運動、日内変動の影響などを受け、脳内の状態を反映するかについては疑問である。そこで、脳内の細胞外液中濃度を反映する脳脊髄液 (CSF) 中 BDNF 濃度がバイオマーカー候補として注目される。Pillai らは精神疾患患者の BDNF 濃度は CSF と血漿中で有意に正の相関を示すと報告したが (Pillai et al. 2010)、この報告はその後再現されておらず、我々が複数の測定法を用いて行った検討では CSF 中の BDNF 量は定量限界を下回っており従来の ELISA での検出は困難であると結論した (Mizui et al. 2019)。

BDNF pro-peptide (BDNFpp) は BDNF の前駆物質である pro-BDNF からプロセッシングによって mature BDNF (mBDNF) が産生される際に生じるペプチドである。我々は、BDNFpp がヒト CSF 3  $\mu$  L からウエスタンブロッティング法により測定可能であり、大うつ病患者の CSF 中で有意に減少していることをはじめ報告した。ここでは、CSF 中の BDNFpp が脳内 BDNF の surrogate marker として有用なのではないかと推測した。

### 【目 的】

BDNF は精神疾患において重要な役割を果たすが、CSF 中に含まれる量を測定することは困難である。我々は、proBDNF から mBDNF にプロセッシングされる際に mBDNF と同量産生される BDNFpp に着目することで脳内の BDNF 量の変化を推測できると考えている。そこで、当研究所のバイオバンクが保有する精神疾患患者の CSF 検体を用いて BDNFpp 量を測定し、BDNFpp がうつ病を含む精神疾患のバイオマーカーとなり得るか否かを精査することを目的とする。

### 【方 法】

本研究では統合失調症患者 52 名、大うつ病患者 44 名および健常者 31 名の CSF 検体 (国立精神・神経医療研究センターバイオバンクより提供) (Table 1) 中の BDNFpp 量をウエスタンブロッティング法により測定した。

Table 1

	Control	Schizophrenia	MDD	Statistic
N	31 (Male: 14, Female: 17)	52 (Male: 25, Female: 27)	44 (Male: 25, Female: 19)	
Age (Years)	40.8±9.6	40.9±9.9	42.8±9.8	N.S. (p=0.58)
PANSS total		64.5±17.1		
PANSS positive		14.8±5.6		
PANSS negative		17.7±5.8		
PANSS general psychopathology		32.1±9.7		
CP		664.2±464.5		
CP typical		75.3±177.2		
CP atypical		586.7±448.2		
HAMD17			14.3±7.8	
IMI			13.2±34.2	

CSF検体6  $\mu$  Lにsample bufferを等量加え100°Cで3分加熱後、20mAで90分間泳動した。その後、0.45  $\mu$  m Immobilon P membrane (Millipore, USA)に4°Cで1時間かけて転写した。転写後すぐにメンブランを30分間常温で2.5%グルタルデヒドに浸した。PBSでwash後、PVDF Blocking reagent for canget signal (TOYOBO, Japan)で1時間ブロッキングし、canget signal solution 1で2000倍希釈したmAb287 antibody (Gene Copoeia, USA)にメンブランを浸し4°Cで一晩反応させた。翌日、0.1% tweenを含むTBS (TTBS)で洗浄後、canget signal solution 2で1000倍希釈したanti-mouse HRP conjugated 2次抗体 (GE healthcare, UK)を常温で1時間反応させた。TTBSで洗浄後、イムノスター試薬 (富士フィルム和光純薬, Japan)でバンドを検出し、バンドはImage Jにより定量した。CSF中BDNFpp量を定量するため、recombinant BDNFpp (Alomone Labs, Israel)を段階希釈し検量線を作成した。各ゲルには2サンプル以上のquality control (QC)検体を入れ、ゲル内およびゲル間のばらつきを評価した。

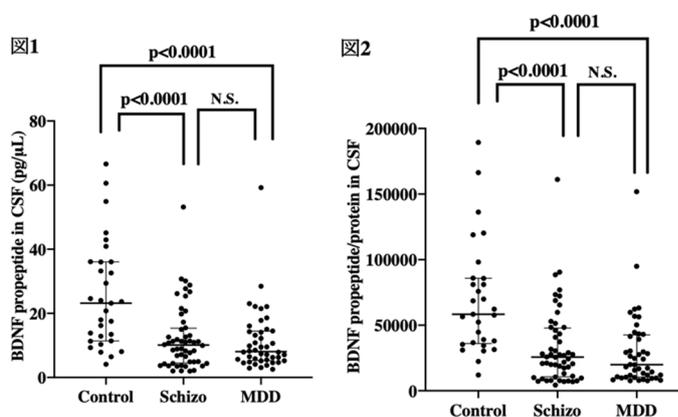
臨床情報としてハミルトンうつ病評価尺度 (HAMD)、陽性・陰性症状評価尺度 (PANSS)、服薬量 (イミプラミン換算値、クロルプロマジン換算値)を用いた。

統計解析は、SPSS 22.2 Japanese version (IBM Japan, Japan)を用いた。本研究では正規分布を満たしたため、群間比較は年齢と性別を共変量として共分散分析 (ANCOVA)、関連解析は偏相関により行った。

## 【結 果】

各ゲルに泳動した QC 検体濃度の、各ゲル内の変動係数の平均値は約 4%、ゲル間の変動係数は約 14% (n=14)であった。

健常者と統合失調症患者および大うつ病患者の CSF 中 BDNFpp を比較したところ、統合失調症患者および大うつ病患者で有意に減少していた (ANCOVA controlling for age and sex, cont vs schizo:  $p < 0.0001$ , cont vs MDD:  $p < 0.0001$ , 図 1)。BDNFpp 量をタンパク量で補正した値 (BDNFpp/protein) を各群で比較したところ、同様に統合失調症および大うつ病患者において有意な減少が認められた (ANCOVA controlling for age and sex, cont vs schizo:  $p < 0.0001$ , cont vs MDD:  $p < 0.0001$ , 図 2)。



健常者において男女間の BDNFpp 量および BDNFpp/protein を比較したところ、男性と比較して女性で有意に減少していた (unpaired t test with welch's correction, BDNFpp:  $p=0.0012$ , BDNFpp/protein:  $p=0.01$ )。そこで、男女別に健常群と疾患群の比較を行った。男性では BDNFpp 量および BDNFpp/protein が疾患群で有意に減少していることが明らかとなった (ANCOVA controlling for age and sex, cont vs schizo:  $p<0.0001$ , cont vs MDD:  $p<0.0001$ )。一方、女性では健常者群と各疾患群間に有意な差は認められなかった (ANCOVA controlling for age and sex, cont vs schizo:  $p>0.05$ , cont vs MDD:  $p>0.05$ )。

次に、BDNFpp と症状重症度との関連を検討した。統合失調症患者において BDNFpp 量と PANSS total, positive, negative, general psychopathology スコアとの関連を検討したが有意な関連は認められなかった。クロルプロマジン換算値と BDNF pp 量との間にも有意な関連は認められなかった。

また、大うつ病患者において HAMD17 スコアと BDNF pp 量との間に有意な関連は認められなかった。イミプラミン換算値との間には先行研究では関連が認められたが、検体数を増やした本研究では有意な関連は認められなかった。

## 【考 察】

本研究において先行研究と独立の約 2 倍の検体数を測定した結果、男性の大うつ病性障害患者において BDNFpp/protein が有意に減少するという結果が再現された。また、検体数を追加したことにより、減少傾向は認められていたものの有意差がつかなかった男性の統合失調症患者において有意な減少が確認された。また、タンパク量で補正しない BDNFpp 量自体も統合失調症および大うつ病患者で有意に減少していた。

男性の疾患患者でのみ BDNFpp 量が有意に減少したことから、男性の統合失調症および大うつ病の診断マーカーとして利用できる可能性がある。疾患重症度との関連は認められていないが、動物実験において BDNFpp は海馬での長期抑圧に関連することが報告されている (Mizui et al. 2015)。今後、記憶や認知機能を評価する心理指標との関連を調べることにより、これらの臨床症状と BDNFpp の関連が明らかになる可能性がある。

また、健常者の男女間で BDNFpp 量を比較すると、女性で有意に減少していた。このことが、女性の疾患患者で BDNFpp 量が疾患群において低下していないことに関連している可能性がある。海馬での BDNF 発現量はエストロゲンの影響を受ける (Kight et al. 2017) ことや血液中の BDNF 量は性周期の影響を受ける (Begliuomini et al. 2007) ことが報告されており、女性ホルモンが BDNFpp 量にも影響している可能性がある。

本研究では、ほとんど全ての疾患患者が服薬していたため、BDNFpp 量の減少が薬によるものなのか疾患によるものなのかを断定することは難しく、今後、非服薬患者での検討は必要である。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

血液中の BDNF はうつ病を始めとする精神疾患の診断マーカーとして注目されてきたが、中枢神経系の BDNF を反映するバイオマーカーとして信頼できるマーカーは存在しなかった。BDNF と同量であると推測される BDNFpp 量は、少量の CSF で簡易に測定することができ、かつ統合失調症と大うつ病患者で顕著に減少していることから、精神疾患のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。CSF 採取は比較的侵襲的であると考えられているが、アルツハイマー病において脳脊髄液中のアミロイド  $\beta$  がバイオマーカーになることが明らかになり、アミロイド PET が開発されるようになったのと同様に、BDNFpp がマーカーとなれば、今後、PET などを用いた BDNF の非侵襲的な定量化技術に発展していくと期待される。

## 【参考・引用文献】

Begliuomini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti M, Freschi L, Pieri M, Genazzani AD, Luisi S, Genazzani AR. Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. Hum Reprod. 22(4): 995-1002, 2007.

Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., Young, L.T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*. 50 (4): 260-265. 2001.

Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 39: 112-119, 2012.

Kight KE, McCarthy MM. Sex differences and estrogen regulation of BDNF gene expression, but not propeptide content, in the developing hippocampus. *J Neurosci Res*. 95(1-2):345-354, 2017.

Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Lume M, Matsumoto T, Hara T, Yamawaki S, Takahashi M, Shiosaka S, Itami C, Uegaki K, Saarma M, Kojima M. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(23): E3067-74, 2015.

Mizui T, Hattori K, Ishiwata S, Hidese S, Yoshida S, Kunugi H, Kojima M. Cerebrospinal fluid BDNF pro-peptide levels in major depressive disorder and schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 113: 190-198, 2019.

Nibuya, M., Nestler, E.J., Duman, R.S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci*. 16 (7): 2365-2372. 1996.

Numakawa T, Kumamaru E, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Kunugi H. Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC-gamma signaling for glutamate release via a glutamate transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 647-652, 2009.

Pillai, A., Kale, A., Joshi, S., Naphade, N., Raju, M.S., Nasrallah, H., Mahadik, S.P. Decreased BDNF levels in CSF of drug-naive first-episode psychotic subjects: correlation with plasma BDNF and psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol*. 13 (4): 535-539. 2010.

Sen, S., Duman, R., Sanacora, G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry*. 64 (6): 527-532. 2008.

Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*. 54 (1): 70-75. 2003.