

リキッドバイオブシーとミトコンドリア機能障害に基づく双極性障害バイオマーカー探索

影山祐紀

大阪公立大学大学院 医学研究科 神経精神医学

【研究の背景】

双極性障害は気分の異常な高揚が続く状態とうつ状態を示す精神疾患である。同疾患の自殺企図率は精神疾患の中で最も高いが¹⁾、その危険性を客観的に評価できる指標は未だ存在しない。また、双極性障害の診断は主に診察による病状聴取によって行われるため、初発のうつ状態ではうつ病と診断されることが多く、双極性障害の診断および適切な治療には8-10年を要する²⁾。このため、希死念慮や診断を客観的に評価できるバイオマーカーの開発が望まれている。

双極性障害の病態として脳のミトコンドリア機能障害及び変異ミトコンドリア DNA の蓄積が知られている³⁾。ミトコンドリア機能障害には、エクソソームと呼ばれる、細胞から分泌される50-100 nmの小さな細胞外小胞の関与が指摘されている⁴⁾。このため、脳エクソソームの情報を反映したバイオマーカー研究が望ましいが、生体脳を用いた研究は侵襲的で困難であるという限界が存在した。

近年この限界を突破する方法として、エクソソームを介して血液から脳の情報を得る手法(リキッドバイオブシー)が着目されている。エクソソームは、DNA、RNA、タンパク質、脂質などの生理活性物質を内包している。脳神経細胞は神経伝達物質以外にも、エクソソームを介してこれらの物質をやりとりすることで細胞間情報伝達を行なっている。脳由来エクソソームは血液脳関門を通過するため、末梢の血液中に存在するが、エクソソームが細胞から放出される際に元の細胞由来の細胞膜タンパク質を保持することから、脳特異的な膜タンパク質を持つエクソソームを血液から分離することで、間接的に脳の情報を得ることができる。応募者はこれまでに血液を超遠心分離し、エクソソームを抽出した後に脳特異的な膜タンパク質であるNCAM1 と L1CAM に特異的な抗体を用いることで脳由来エクソソームを取り出す系を立ち上げた。また、変異ミトコンドリア DNA コピー数の測定プロトコルを今回の実験系に最適化し、血中脳由来エクソソーム内の変異ミトコンドリア DNA コピー数の測定に成功した。この手法を用いて以下の研究を立案した。

【目 的】

本研究の目的は、双極性障害のミトコンドリア機能障害に基づき、双極性障害患者のうつ状態と寛解状態および健常者の血中に含まれる脳由来エクソソーム内の変異ミトコンドリア DNA コピー数の測定を行い、①双極性障害の希死念慮を反映するか、②診断バイオマーカーの候補となるか、を探索することである。

【方 法】

同一双極性障害患者のうつ状態と寛解状態、健常者の試料を30試料ずつ収集する。うつ状態、寛解状態の精神症状は21項目版のハミルトンうつ病評価尺度とヤング躁病評価尺度を用いて評価し、希死念慮の重症度を点数化する。Spearmanの順位相関係数を用いて希死念慮と変異ミトコンドリア DNA コピー数の相関を調べる。また、ANOVA with *post hoc* Tukey's test を用いて3群間での変異ミトコンドリア DNA コピー数の有意差の有無と効果量を調べる。

【結 果】

双極性障害のうつ状態、寛解状態の血液採取をすすめ、27対の試料収集が終了した。30対の試料が収集できたところで本題の実験を行う。その間に NCAM1 抗原を持つ血中エクソソームが脳由来の情報を含んでいるかについて新たな検証を行った。血中 NCAM1 陽性エクソソーム中の RNA-seq を行い、得られた結果を Enrichr に含まれる包括的遺伝子セットを用いてエンリッチメント解析を行った。結果 fetal brain cortex ($p = 6.4e^{-35}$)、neural epithelium ($p = 7.5e^{-21}$)、midbrain ($p = 1.6e^{-17}$)、prefrontal cortex ($p = 8.7e^{-7}$)の領域に有意な相関を認めた(**Table 1**)。この4領域は多重検定の補正後も有意差を認めた。

次にこの技術が精神疾患のバイオマーカーとして利用可能か検証するためにうつ病 39 名と双極性障害 13 名の血中 NCAM1 陽性エクソソーム中の RNA-seq を行った。多重検定補正後に有意差を示した 159 遺伝子の発現データを用いて、Orthogonal PLS-DA 解析を行ったところ、2群を区別できることが示された(**Figure 1**)。また機械学習を用いた判別を行ったところ、159 遺伝子中29遺伝子を用いて、73.4%の確率で2群を区別できることが示された(**Figure 2**)。

また、同一人物ではないが、現在寛解期の双極性障害患者 7 名と現在うつ状態の双極性障害患者 5 名において血液 NCAM1 陽性エクソソーム中ミトコンドリア DNA コピー数の比較を行ったところ有意差を認めなかった($p = 0.30$)。

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	<u>FETAL BRAIN CORTEX</u>	6.442e-35	6.958e-33	1.98	155.97
2	PANCREATIC ISLET	1.930e-33	1.042e-31	1.95	147.13
3	<u>NEURONAL EPITHELIUM</u>	7.512e-21	2.704e-19	1.70	78.66
4	<u>MIDBRAIN</u>	1.617e-17	4.365e-16	1.62	62.72
5	MYOBLAST	1.940e-7	0.000004191	1.35	20.86
6	<u>PREFRONTAL CORTEX</u>	8.755e-7	0.00001576	1.33	18.52
7	BONE MARROW (BULK TISSUE)	0.9131	1.000	0.92	0.08
8	BLOOD DENDRITIC CELLS	0.9976	1.000	0.84	0.00
9	DENDRITIC CELL	0.9976	1.000	0.84	0.00
10	NEURONAL PROGENITOR CELLS	0.9984	1.000	0.83	0.00

Table 1 Enrichr analysis showed the plasma NCAM1+ EVs RNA-seq data enriched to parts of brain tissue.

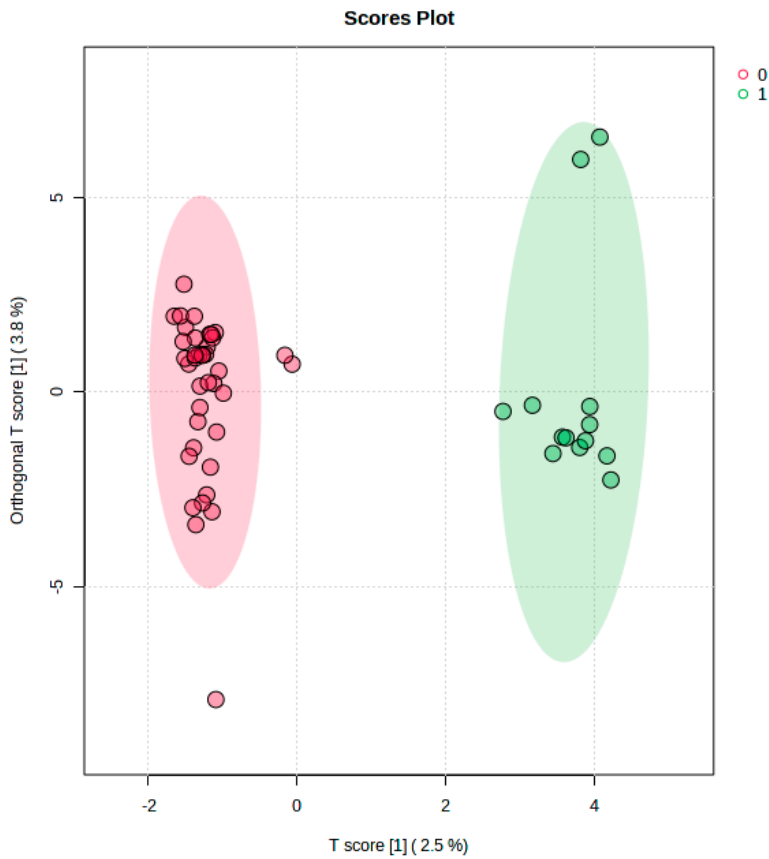


Figure1 Orthogonal PLS-DA analysis revealed that the 195 gene expression data can separate major depressive disorder and bipolar disorder groups. Each oval area displayed 95% confidence region.

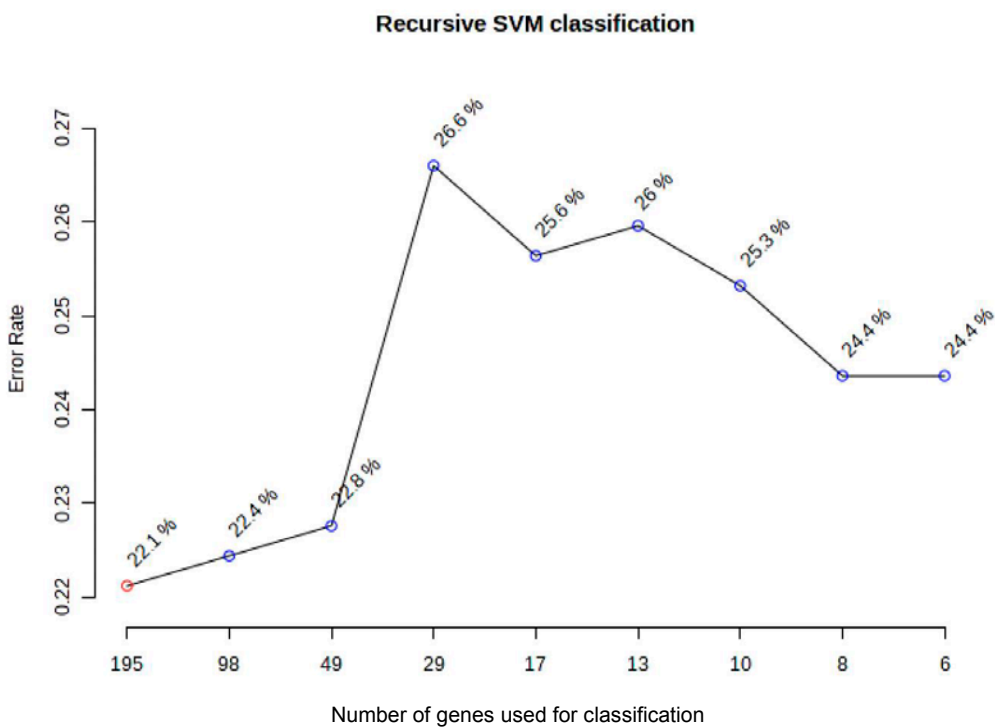


Figure2 Support Vector Machine classification revealed the 195 gene expression data could separate major depressive disorder and bipolar disorder groups.

【考 察】

うつ病と双極性障害で発現量に有意差のあった 159 遺伝子のパスウェイ解析の結果、Sumoylation by RanBP2 regulates transcriptional repression が最も高い odds ratio を示した (odds ratio; 22.47, adjusted p-value; 0.03)。このパスウェイに含まれている HDAC1 (Histone acetylation and deacetylation) は、神経細胞の損傷に伴うミトコンドリア輸送障害の際に、HDAC1 が核外へ輸送されることが知られている⁵⁾。これらのことから双極性障害におけるミトコンドリア機能障害を血中 NCAM1 陽性エクソソームが反映している可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

NCAM1 陽性エクソソーム中の RNA-seq 解析から、血液中から、脳に関連する情報を得られることが示唆された。多重検定補正後に有意差を示した 159 遺伝子に着目した Orthogonal PLS-DA 解析と機械学習結果からうつ病と双極性障害を区別するバイオマーカーとして臨床へ貢献できる可能性が示唆された。

【参考・引用文献】

1. Gonda X, Pompili M, Serafini G, Montebovi F, Campi S, Dome P, et al. Suicidal behavior in bipolar disorder: Epidemiology, characteristics and major risk factors. *J Affect Disord.* 2012;143:16-26.
2. Drancourt N, Etain B, Lajnef M, Henry C, Raust A, Cochet B, et al. Duration of untreated bipolar disorder: Missed opportunities on the long road to optimal treatment. *Acta Psychiatr Scand.* 2013;127:136-44.
3. Kato T. Mitochondrial dysfunction as the molecular basis of bipolar disorder: therapeutic implications. *CNS Drugs.* 2007;21:1-11.
4. Gambardella S, Limanaqi F, Ferese R, Biagioni F, Campopiano R, Centonze D, et al. ccf-mtDNA as a Potential Link Between the Brain and Immune System in Neuro-Immunological Disorders. *Front Immunol.* 2019;10:1064.
5. Kim JY, Shen S, Dietz K, He Y, Howell O, Reynolds R, et al. HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nat Neurosci.* 2010;13:180-9.