

特集 1 精神疾患とオミックス研究最前線

1. 精神疾患におけるエピゲノム解析 —セロトニントランスポーターにおける解析例から

柳田悠太郎*, 仲地ゆたか*, 文東 美紀*, 岩本 和也*

抄録：DNA メチル化やヒストンタンパク質の修飾など，エピジェネティックな状態には遺伝環境相互作用が反映されており，精神疾患の病因・病態の理解のためにきわめて重要であると考えられている。セロトニントランスポーターは繰り返し配列の多型領域と DNA メチル化による転写制御を受けることから，遺伝環境相互作用研究のためのよいモデルであると考えられる。本稿では，高齢者コホート検体を利用し，正常加齢に伴う認知機能の低下や抑うつ傾向について検討した筆者らのセロトニントランスポーターでの研究例を紹介する。研究の背景と共に，臨床所見と MRI 画像による脳体積およびジェノタイプングデータや DNA メチル化状態を統合することで明らかになりつつある結果を紹介し，現状の課題と今後の展望を述べる。

日本生物学的精神医学会誌 34 (1) : 2-6, 2023

Key words : serotonin transporter, 5-HTTLPR, DNA methylation, older adults, cognitive function

1. セロトニントランスポーターと精神疾患

17 番染色体長腕の *SLC6A4* 遺伝子にコードされるセロトニントランスポーターは，セロトニン再取り込みを介してシナプス間隙におけるセロトニン濃度を調節している。三環系抗うつ薬や選択的セロトニン再取り込み阻害薬に代表される抗うつ薬の作用機序に関して，一般的なモノアミン仮説では再取り込みを阻害することでシナプス間隙の濃度を上昇させ，抗うつ効果を発揮すると考えられている。これらの背景から，本分子と精神疾患の発症リスクや治療反応性との関係が研究されてきた。

SLC6A4 遺伝子のプロモーター領域には，縦列反復配列（タンデムリピート）の機能的な多型領域（serotonin transporter linked promoter region : 5-HTTLPR）が存在する。繰り返し回数によって主に 14 回と 16 回の場合に大別されるが，短い前者（short : S 型）は後者（long : L 型）に比べ転写活性が低いことが知られており，個人の遺伝子型を SS/SL/LL と分類する根拠となっている。2003 年に Caspi らは，コーカソイド集団 847 名の前向き縦断

研究から，S 型アレルを有する集団は L 型アレルのみを有する集団と比較して，ストレスとなるライフイベントに関連して抑うつ症状やうつ病の診断および自殺率が上昇することを報告した²⁾。その後，多数の類似した関連研究が報告された一方で再現性に乏しい場合もあり，近年の大規模研究から，単純な遺伝学的関連は否定されている^{1, 3)}。

2. DNA メチル化と 5-HTTLPR の再検討

SLC6A4 遺伝子の転写調節研究に関して，5-HTTLPR に対する S/L 型の区別のほかに，新たに 2 つの視点から解析が有用であると考えられる。1 点目は，エピジェネティック制御による転写調節である。従来の研究では，5-HTTLPR 下流の第一エクソン周辺に存在する CpG アイランドにおいて，虐待などのネガティブなライフイベントによる高メチル化変化が報告されてきた。2011 年に筆者らは，一卵性双極性障害不一致例のリンパ芽球株を用いてプロモーターワイドなメチル化解析を行い，前述の CpG アイランド近傍の CpG アイランドショアに存

Epigenetic studies in psychiatry : lessons from serotonin transporter

*熊本大学大学院生命科学部 分子脳科学講座 (〒 860-8556 熊本県熊本市中央区本荘 1 丁目 1 番 1 号) Yutaro Yanagida, Yutaka Nakachi, Miki Bundo, Kazuya Iwamoto : Department of Molecular Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University. 1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan

【岩本 和也 E-mail : iwamotok@kumamoto-u.ac.jp】

在する 2 箇所の CpG (以下 CpG3, CpG4 とする) において、患者での高メチル化変化を同定した。また、死後脳サンプルからも同様のメチル化差異が観察された¹¹⁾。2 点目は、実際の転写活性の差異に基づいた解析手法である。具体的には、従来の S/L 型の区別が低/高活性の差異に対応しない場合があり、コーカソイド集団の代表的な L 型の L_A に比較して、L 型の L_G や L_{16c} は S 型と同程度に転写活性が低いことが報告されている⁵⁾。これらの多型のアレル頻度は、コーカソイド集団では低い (L_G)、または報告されていない (L_{16c})。一方で、日本人集団では L_A と L_G および L_{16c} の割合がほぼ同じであることから、日本人など東アジアでの集団を対象とする解析ではより重要性が増すと考えられる。

以上の点を踏まえ、筆者らは、日本人特有のアレルを考慮し転写活性の差異に基づく関連解析を行い、低活性アレルを有する男性の統合失調症・双極性障害患者において、CpG3 が高メチル化を示すこと、メチル化率と左扁桃体体積が負の相関を示すことを報告した。また、この過程で、人工的な CpG3 メチル化は、転写活性を完全に消失させることをルシフェラーゼレポーターアッセイにより示し、機能的な意義を持つメチル化であることを明らかにした⁶⁾。さらに、合計約 3,000 検体において 5-HTTLPR の詳細なジェノタイプピングを行い、転写活性がほとんど消失した多型を含む 11 件の新規アレルを同定した。このことから、研究報告に乏しい非コーカソイド集団を中心に 5-HTTLPR には未同定の多型が存在し、その特有の転写活性は正常な認知精神機能や精神疾患の病態に影響している可能性が考えられた⁷⁾。

3. 高齢者認知症コホートからのアプローチ

これまでのセロトニントランスポーターの関連研究は、性格傾向や青年期および壮年期発症の精神疾患が中心であり、高齢期における認知障害に加え、正常加齢に伴う認知機能低下や抑うつ傾向および脳構造変化との関連については報告に乏しい。2007 年に O'hara らはコーカソイド集団 154 名において、視床下部 - 下垂体 - 副腎系 (hypothalamic pituitary adrenal axis : HPA 系) および海馬体積と遅延再生 (delayed recall) の障害との関係を解析した。その結果、起床時コルチゾール濃度の上昇と海馬体積の縮小は、S 型アレル集団においてのみ、遅延再生の低下と関連していた¹⁰⁾。また、同グループは 2020 年に、高齢者の認知機能と 5-HTTLPR の関係に注

目し、109 名のベースライン時と 1, 2 年後の言語記憶 (verbal memory) を測定し、経時的変化と多型との関連に注目している。ベースライン時の言語記憶スコアは S 型アレル集団で低かった一方で、追跡調査では L 型アレル集団のスコア低下が大きく、2 年後にはスコアの差はみられなかった⁴⁾。本グループは、S 型アレルの存在は高齢者における記憶機能の障害における予測因子にはならないと結論している。ここで、コーカソイド集団の報告を解釈するうえで、人種間のアレル頻度と多型に基づく層別化の差異は重要である。すなわち、コーカソイド集団と東アジア人集団では 5-HTTLPR 多型のアレル頻度が大きく異なり、前者では L_A が大きな割合を占める一方で、後者では S 型や低活性の L 型が大半である。また、前述の O'hara らの研究は従来の S/L 型に基づいており、上述した実際の転写活性を反映したものではない。

わが国における健康長寿社会の実現をめざした大規模認知症コホート研究 (Japan Prospective Studies Collaboration for Aging and Dementia : JPSC-AD) では、8 地域の高齢者約 1 万人に対する追跡調査を通じて、認知症およびうつ病に関連した危険因子の同定を目的としている⁹⁾。本コホート研究では、生物学的性別・年齢・ゲノム情報などの後天的要因の影響を受けない変数に加えて、認知精神機能のスコア、疾患の診断、脳体積などの遺伝・環境要因の影響を受ける変数が測定されている。ここで、解析可能なデータを説明変数と目的変数に分け、適合のよい回帰モデルを作成することには主に 2 点の意義がある。1 点目に、回帰式による判定は、サブタイプを含めた診断やバイオマーカーの開発および治療反応性や副作用などの推測に有用である。2 点目に、アウトカムに強い関連を示す要因本体またはその周辺は生物学上重要な役割を有していると考えられ、病態解明に貢献する可能性がある。

筆者らは JPSC-AD 熊本サイトの約 1,500 名を対象とした高齢者認知症コホートデータから、認知機能や抑うつ傾向を反映する mini mental state examination (MMSE) および geriatric depression scale (GDS) スコアや脳体積データを使用した。収集された末梢血サンプルを用いて、CpG3 および CpG4 のメチル化率をパイロシークエンシング法により測定し、5-HTTLPR ジェノタイプピングを実施することで、転写活性に基づく回帰分析から新たに高齢者の認知精神機能とセロトニントランスポーターとの関係を明らかにした。具体的には、低活性アレル集団特異的な認知機能低下と抑うつ傾向の相関、加齢

に伴うメチル化変化, 高メチル化を介した認知機能の低下, 認知機能低下および抑うつ傾向に対する, 右海馬体積を介した高活性アレル関連の緩和的效果が観察された。その一方で, MMSE および GDS スコアのアレル集団間差異やカットオフ値による陽性判定の偏りは認められず, 低活性アレルが独立に認知症や老年期うつ病のリスクになるとは考えにくい。

4. 現在の課題と今後の展望

最後に, 認知精神機能に注目したコホート研究と *SLC6A4* 遺伝子の転写調節研究に関して, 研究の特性や課題を考察し今後の展望について述べる。

1 点目に, 地域在住者を対象としたコホート研究では, 主に血液サンプルが使用される一方で認知症や老年期うつ病の病態は中枢神経系にあると考えられるため, 脳組織と血液のメチル化差異を考慮する必要がある。これは, 本報告のように特定の CpG サイトのメチル化率に注目する研究に加えて, ゲノム全体に分布する CpG サイトのメチル化状態を測定し, 形質関連のメチル化変化を同定するメチル化ワイド関連解析 (methylome-wide association study: MWAS) においても重要な視点である。2021 年に Jia らのグループは欧州の 11 コホート 3,337 名のメタアナリシスにより, 海馬と視床および側坐核の体積を目的とした MWAS に加え, 血液と脳とのメチル化状態の差異を検討した⁸⁾。具体的には, 75 名の前頭前野, 嗅内皮質, 上側頭回, 小脳サンプルを用いて, MWAS で同定された形質関連の 2 件の CpG サイトと 3 件のメチル化可変領域 (differentially methylated region: DMR) におけるメチル化状態を測定し, 同一個人内または個人間で全血サンプルのメチル化状態との比較を行っている。その結果, 2 件の CpG サイトには血液・脳のメチル化率の相関はみられなかった一方で, 2 件の DMR における全血サンプルの個人間メチル化差異は, 海馬と視床および側坐核体積の個人間差異を予測していた。特に上側頭回において, 血液・脳サンプルでのメチル化率の共変動は, 血液のメチル化率と海馬体積との関連を説明している。以上の結果は, MWAS で検出される全血サンプルの CpG メチル化と形質の有意な関連は, 脳サンプルのメチル化状態に媒介されることを示唆しており, 末梢血サンプルのメチル化状態を解析することは, 脳でのメチル化状態や形質との関連を明らかにするうえで有用であると考えられる。2 点目に, 地域在住者を対象とし

たコホート研究の被験者集団は, 症例対照研究とは異なり非疾患群が主体であるため, 明らかな診断を伴わない状態で臨床所見やメチル化状態および脳体積などの縦断・横断的变化に注目し, 認知精神機能と関連する要因の解明にアプローチする必要がある。ここで, 2017 年に Swartz らは, 前向きコホートデータと実験から *SLC6A4* 遺伝子のメチル化変化と脳体積および臨床症状との関連を報告している。具体的には, コーカソイドおよび非ヒスパニック集団 132 名の社会経済状況 (socioeconomic status: SES), 血液サンプルから測定した転写開始部位の近位 20 CpG サイトのメチル化状態, 扁桃体反応性変化, うつ症状における媒介関係を検討した。その結果, 青年期の低い SES と 2 年後のメチル化変化量との相関, メチル化変化と恐怖に対する扁桃体反応性の正の相関, 扁桃体反応性の変化とうつ症状悪化の相関が観察された。以上の結果は, SES がメチル化および扁桃体反応性を介してうつ症状に影響していることを示しており, *SLC6A4* 遺伝子のメチル化と脳体積および臨床症状の関係を明らかにするうえで, 非疾患群の解析が有用であることを示唆している¹⁰⁾。また, 2022 年に Sun らは, 506 名または 823 名の欧州若年者集団において, ネガティブなライフイベントやメチル化状態および内在化・外在化行動と脳体積との関連に注目している。外在化行動関連の CpG サイトを同定しており, そのメチル化率は外在化行動のスコアや注意欠如・多動症の症状および衝動性と相関していた。さらに, ライフイベントに起因する問題行動が外在化行動関連のメチル化状態に影響を与えることを報告している¹²⁾。

以上のように, 媒介分析や共分散構造分析に代表される, 多変量間の関係に注目する新たな統計解析手法の開発を背景として, 大規模コホートデータから遺伝・環境要因とエピジェネティック制御および脳の器質的变化や臨床症状との関係を明らかにする研究が展開されている。

次に, *SLC6A4* 遺伝子の転写調節研究に関する現時点の課題を挙げる。1 点目に, 主に CpG3 のメチル化変化が 5-HTTLPR 多型と独立な現象であるか明確な結論は出ていない。筆者らの研究で観察された, 低活性アレル集団特異的な加齢に伴うメチル化変化や認知機能への影響は, メチル化変化が 5-HTTLPR 多型に影響を受ける可能性を示唆している。2 点目に, 5-HTTLPR 多型とメチル化状態による転写調節を細胞レベルで定量するアプローチに対して, 明確な提案はなされていない。人工的な 100% メチル化により転写活性が完全に消失するこ

とが示されたが、今回パイロシークエンシング法で測定した CpG3 メチル化率の 2 標準偏差 (standard deviation : SD) は 15.3% から 49.3% の範囲であり、生体内では大半が中間的なメチル化状態を示した。なお、サンプルには複数の細胞が含まれているが、細胞間で同程度のメチル化状態を有する場合と極端な細胞間メチル化差異を有する場合には生物学的意義が異なるため、細胞種間および同種細胞間のメチル化差異を考慮する必要がある。実際の細胞内では、2 本の染色体上の *SLC6A4* 遺伝子周辺の CpG アイランドショアおよび CpG アイランドのエピジェネティック制御に加え、5-HTTLPR 多型などのゲノム配列による転写調節がなされており、多型とメチル化制御および表現型との関連に迫るうえで、両者を統合した解析は重要であると考えられる。

本稿に記載した著者らの研究は、倫理委員会の承認を得て十分な倫理的配慮に基づき実施されたものである。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Border R, Johnson EC, Evans LM, et al (2019) No support for historical candidate gene or candidate gene-by-interaction hypotheses for major depression across multiple large samples. *Am J Psychiatry*, 176 : 376-387. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2018.18070881>
- 2) Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, et al (2003) Influence of life stress on depression : moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 301 : 386-389. <https://doi.org/10.1126/science.1083968>
- 3) Culverhouse RC, Saccone NL, Horton AC, et al (2018) Collaborative meta-analysis finds no evidence of a strong interaction between stress and 5-HTTLPR genotype contributing to the development of depression. *Mol Psychiatry*, 23 : 133-142. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.44>
- 4) Hirst RB, Jordan JT, Schüssler-Fiorenza Rose SM, et al (2020) The 5-HTTLPR long allele predicts two-year longitudinal increases in cortisol and declines in verbal memory in older adults. *Int J Geriatr Psychiatry*, 35 : 982-988. <https://doi.org/10.1002/gps.5319>
- 5) Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, et al (2006) Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet*, 78 : 815-826. <https://doi.org/10.1086/503850>
- 6) Ikegame T, Bundo M, Okada N, et al (2020) Promoter activity-based case-control association study on *SLC6A4* highlighting hypermethylation and altered amygdala volume in male patients with schizophrenia. *Schizophr Bull*, 46 : 1577-1586. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa075>
- 7) Ikegame T, Hidaka Y, Nakachi Y, et al (2021) Identification and functional characterization of the extremely long allele of the serotonin transporter-linked polymorphic region. *Transl Psychiatry*, 11 : 119. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01242-9>
- 8) Jia T, Chu C, Liu Y, et al (2021) Epigenome-wide meta-analysis of blood DNA methylation and its association with subcortical volumes : findings from the ENIGMA Epigenetics Working Group. *Mol Psychiatry*, 26 : 3884-3895. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0605-z>
- 9) Ninomiya T, Nakaji S, Maeda T, et al (2020) Study design and baseline characteristics of a population-based prospective cohort study of dementia in Japan : the Japan Prospective Studies Collaboration for Aging and Dementia (JPSC-AD) . *Environ Health Prev Med*, 25 : 64. <https://doi.org/10.1186/s12199-020-00903-3>
- 10) O'Hara R, Schröder CM, Mahadevan R, et al (2007) Serotonin transporter polymorphism, memory and hippocampal volume in the elderly : association and interaction with cortisol. *Mol Psychiatry*, 12 : 544-555. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001978>
- 11) Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, et al (2011) Hypermethylation of serotonin transporter gene in bipolar disorder detected by epigenome analysis of discordant monozygotic twins. *Transl Psychiatry*, 1 : e24. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.26>
- 12) Sun Y, Jia T, Barker ED, et al (2023) Associations of DNA methylation with behavioral problems, gray matter volumes, and negative life events across adolescence : Evidence from the longitudinal IMAGEN study. *Biol Psychiatry*, 93 : 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.06.012>
- 13) Swartz JR, Hariri AR and Williamson DE (2017) An epigenetic mechanism links socioeconomic status to changes in depression-related brain function in high-risk adolescents. *Mol Psychiatry*, 22 : 209-214. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.82>

■ ABSTRACT

Epigenetic studies in psychiatry : lessons from serotonin transporter

Yutaro Yanagida, Yutaka Nakachi, Miki Bundo, Kazuya Iwamoto

Department of Molecular Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

Epigenetic status, such as DNA methylation and histone modifications, reflect gene-environment interactions and are considered to be important for understanding the etiology and pathophysiology of psychiatric disorders. Because the serotonin transporter is subject to transcriptional regulation by polymorphic regions of repeated sequences and DNA methylation, it is considered to be a good model for gene-environment interaction studies. Here, we summarized our epigenetic research on the serotonin transporter, in which we examined the decline in cognitive function and depressive tendencies associated with normal aging using a cohort of elderly individuals. In addition to the background of the research, we described the current results as well as issues and future prospects.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 34 (1) : 2-6, 2023)
