

# 妊産婦を対象とした前向きゲノムコホート研究

名古屋大学大学院 医学系研究科 細胞情報医学専攻

脳神経病態制御学講座 精神医学分野

中村 由嘉子

## 1. 背景

疾病の影響には「死亡」と「障害を受けること」の二つがあり、この両者を合計したDisability Adjusted Life Years (DALY)が社会的損失の指標として用いられている。我が国で算出されたDALYのデータによると、うつ病は癌について第二位にランクされる重大な社会的損失をもたらす疾病であり、うつ病の病因・病態を明らかにして、予防・治療法を見出すことが求められている。

うつ病の病因・病態の解明には、環境因子を加味したゲノム解析、すなわちゲノムコホート研究のデザインが必須である。しかし、一般のうつ病では発症のきっかけとなるストレスの同定が困難であるなど多数の課題があり、それがコホート研究の実施を困難にしてきた。そこで我々は、妊娠・出産という共通したストレスを有するというコホート研究実効上の利点を有する妊産婦を対象とし、前向きコホート研究を実施し、その成果を報告している (Ishikawa N, Ozaki N, et al. J Psychosom Res, 2011)。

また、うつ病の発症には遺伝因子と環境因子の相互作用が影響すると考えられており、DNAのメチル化などゲノム上のエピジェネティックな変化が、病態と密接に関わっている可能性が指摘されている。動物実験では、母子分離によって生じたDNAメチル化が遺伝子発現に影響し、ストレス脆弱性に影響を与えることが実証されており、メチル化の差異が生涯を通じたストレス反応に影響すると考えられる。

そこで本研究では、我々が既に実施しているコホート研究に、DNAメチル化解析を加え、妊産婦を対象とした前向きゲノムコホート研究を実施し、DNAメチル化とうつ病の発症との関連を検討した。

## 2. 方法

産婦人科を受診した妊婦を対象として、妊娠初中期、妊娠後期、産後1か月の各時点で縦断的に追跡調査を行った。すなわち前向きゲノムコホート研究を行った。対象者は、対面で説明のうえ書面にて同意が得られた妊産婦250名である。

対象者より末梢血を採取しDNAを抽出した。抑うつ状態の評価には、自己記入式調査票であるEdinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS: エジンバラ産後うつ病自己評価)を用いた。人格傾向のうち、抑うつ状態との関連が指摘されている損害回避傾向の評価には、自己記入式調査票であるTemperament and Character Inventory (TCI)のうち、Harm Avoidance (HA: 損害回避)を用いた。

調査票は対象者に手渡し、記入後に郵送にて回収した。各時期の調査項目は下記のとおりである。以下の調査項目のうち、EPDSの評点によって妊産婦のうつ状態の有無を判定した。

- a. 妊娠初中期: EPDS, TCIのHAおよびDNA解析のための採血
- b. 妊娠後期: EPDS
- c. 産後1ヶ月: EPDS

メチル化状態の測定を行った部位は、うつ病との関連が示唆されているグルココルチコイド受容体遺伝子 (*NR3C1*) のプロモーター領域にあるCpG islandである。このうち、Pos. 1~Pos. 13の13カ所メチル化シトシンについて解析を行った。DNAのメチル化状態の測定にはPyro Mark Q96 MDを使用しpyrosequencing法を用いた。Pyrosequencing法は、プライマー伸長法を基盤にし、ルシフェラーゼ発光反応を厳密に制御することにより定量的な塩基配列の解析およびメチル化状態の測定を行うことができる技術である。具体的には、DNA中の非メチル化シトシンをSodium Bisulfite処理し、Bisulfite反応したDNAのクリーンアップを行った後、DNAメチル化の解析を行った。なお、本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。

### 3. 結果

妊娠初中期、妊娠後期、産後1か月の3回のEPDS得点によって、いずれの時期に抑うつ状態を呈さなかった“非抑うつ群”、妊娠期のいずれかの時期にのみ抑うつ状態を呈した“一過性抑うつ群”、妊娠期のいずれかもしくは、妊娠期に一貫して抑うつを呈し、且つ産後1か月後も抑うつ状態であった“持続性抑うつ群”、産後1ヶ月後にのみ抑うつを呈した“産後抑うつ群”に分類した。各群の人数および%は、非抑うつ群182名(72.8%)、一過性抑うつ群32名(12.8%)、持続性抑うつ群15名(6.0%)、産後抑うつ群21名(8.4%)であった(表1)。この4群においてメチル化解析を行ったPos. 1~Pos. 13のMethylation (%)を比較し、平均値の差の検定を行った。しかし、いずれの部位においても、Methylation (%)に群間の差はなかった(表2)。

次に、産後抑うつ群において、抑うつ状態との関連が指摘されている損害回避傾向と、Methylation (%)の関連を検討した。その結果、Pos. 11とPos. 12において、損害回避傾向とMethylation (%)との間に有意な相関が認められた。

また、損害回避傾向には、「予期懸念/悲観」「不確実性に対する恐れ」「人みしり」「易疲労性/無力性」という4つの下位項目が存在する。そこで、産後抑うつ群におけるPos. 11とPos. 12のMethylation (%)と関連する下位項目について検討したところ、「予期懸念/悲観」がMethylation (%)と有意に相関していることが確認された(表3、表4)。

表1 EPDSによる気分状態の経過推移による群分け

	EPDS			経過 パターン	N (%)
	妊娠 初中期	妊娠 後期	産後 1ヶ月		
非抑うつ群	—	—	—	—→—	182 (72.8)
一過性抑うつ群	+	+	—	+→—	32 (12.8)
	+	—	—		
持続性抑うつ群	—	+	—	+→+	15 (6.0)
	+	+	+		
	+	—	+		
産後抑うつ群	—	—	+	—→+	21 (8.4)

表2 Methylation (%)の4群比較

	非抑うつ群	一過性抑うつ群	持続性抑うつ群	産後抑うつ群	有意確率
Pos. 1	3.3 (±4.6)	2.9 (±4.5)	3.1 (±6.3)	3.1 (±4.1)	0.95
Pos. 2	0.2 (±1.2)	0.6 (±2.1)	0.5 (±1.8)	0.3 (±1.2)	0.53
Pos. 3	3.4 (±4.2)	2.1 (±4.0)	3.8 (±4.6)	3.5 (±4.1)	0.46
Pos. 4	1.0 (±2.8)	1.0 (±2.6)	0.0 (±0.0)	1.3 (±2.8)	0.50
Pos. 5	2.8 (±4.3)	4.1 (±5.1)	3.4 (±4.7)	3.1 (±4.1)	0.52
Pos. 6	4.7 (±4.0)	4.2 (±3.9)	5.0 (±4.0)	4.3 (±4.4)	0.85
Pos. 7	13.7 (±3.5)	14.1 (±3.8)	12.9 (±2.4)	13.8 (±4.2)	0.78
Pos. 8	11.7 (±3.7)	12.2 (±2.5)	10.8 (±3.8)	12.4 (±3.4)	0.51
Pos. 9	22.1 (±4.9)	23.4 (±4.2)	21.6 (±4.1)	24.3 (±5.2)	0.23
Pos. 10	17.8 (±3.3)	18.1 (±2.8)	17.5 (±2.6)	17.6 (±3.9)	0.95
Pos. 11	19.9 (±3.8)	20.5 (±3.7)	19.8 (±2.9)	20.3 (±3.9)	0.91
Pos. 12	19.1 (±4.1)	20.5 (±3.9)	18.0 (±6.2)	21.6 (±5.2)	0.08
Pos. 13	18.0 (±3.9)	18.1 (±3.6)	17.1 (±4.0)	17.8 (±3.4)	0.86

表3 Pos. 11のMethylation(%)と損害回避傾向との相関(産後抑うつ群のみ)

	予期懸念/ 悲観	不確実性に 対する恐れ	人みしり	易疲労性/ 無力性	損害回避
相関係数	0.56	0.1	0.484	0.351	0.502
有意確率	0.01	0.674	0.036	0.129	0.029
N	20	20	19	20	20

表4 Pos. 12のMethylation(%)と損害回避傾向との相関(産後抑うつ群のみ)

	予期懸念/ 悲観	不確実性に 対する恐れ	人みしり	易疲労性/ 無力性	損害回避
相関係数	0.667	0.166	0.426	0.355	0.502
有意確率	0.001	0.485	0.069	0.124	0.029
N	20	20	20	20	20

#### 4. 考察 まとめ

妊産婦を対象とした前向きゲノムコホート研究を実施し、抑うつ状態の経過により、対象者を非抑うつ群、一過性抑うつ群、持続性抑うつ群、産後抑うつ群の4群に群分けした。今回メチル化解析を行った*NR3C1*のCpG islandにあるPos. 1からPos. 13において、4群間でメチル化の程度に差は認められず、今回我々が解析を行った部位に関しては、抑うつ状態とメチル化との間に直接的な関連を見出すことは出来なかった。

一方で、産後抑うつ群において、人格傾向のひとつであり抑うつ状態との関連が指摘されている損害回避傾向(心配性で緊張しやすく、失敗を恐れるという特徴をもつ傾向)と、Pos. 1からPos. 13のメチル化の程度との関連を確認したところ、Pos. 11とPos. 12において、メチル化の程度と損害回避傾向に有意な相関がみられ、メチル化の程度が高いほど、損害回避傾向が強くなることが確認された。さらに、損害回避傾向の下位項目についても検討したところ、特に予期懸念/悲観(将来のことを心配する)とメチル化の程度に関連があることが明らかとなった。よって、妊産婦においては、*NR3C1*のプロモーター領域のメチル化と、母親になることへの不安の高さや育児に対する心配と関連するのではないかと推察される。

本研究の結果、産後抑うつ群において、*NR3C1*のプロモーター領域にあるPos. 11とPos. 12メチル化と予期懸念や悲観とが関連することが明らかになった。今後は、本研究では解析を行っていない*NR3C1*の他のプロモーター領域に関してもメチル化解析を行い、*NR3C1*と抑うつ状態との関連を明らかにすると共に、*BDNF*など他の有力な候補遺伝子についてもメチル化解析を行い、あわせて検討を行うことが重要である。

#### 5. 参考文献

Naoko Ishikawa, Setsuko Goto, Satomi Murase, Atsuko Kanai, Tomoko Masuda, Branko Aleksic, Hinako Usui and Norio Ozaki "Prospective study of maternal depressive symptomatology among Japanese women." *Journal of Psychosomatic Research* 71(4): pp264-9. 2011