慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	メタボローム解析による変性性認知症の代謝異常の特定
Sub Title	Comparing metabolic pathway of dementia patients with active persons by means of metabolomic profiling
Author	池垣, 雅子
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012
Jtitle	生命と情報 No.19 (2012.) ,p.133- 141
JaLC DOI	
Abstract	認知症を大別すると, 脳梗塞の多発などによって引き起こされる脳血管性認知症と脳の変性によって引き起こされる変性性認知症に大別できる。また変性性認知症には, 認知症全体の疾患の約50%を占めるアルツハイマー型認知症と, 約10%を占めるレビー小体型認知症が含まれ, その他の変性性認知症としては前頭側頭型認知症もある。各認知症は, アルツハイマー型認知症は, 認知機能低下や人格障害を特徴とし, レビー小体型認知症は, 認知障害だけでなくパーキンソン病様の運動障害も併発するのが特徴であり, 前頭側頭型認知症は, 人格障害が顕著な認知症である。これらの変性性認知症の診断法は現在, 知能検査や画像診断が主であるが, 発症初期などは診断が難しく, 誤診が多いことが問題となっており, 生化学検査などからの客観的な指標が求められている。メタボローム技術は代謝変動を網羅的に調べられ, 様々な疾患のバイオマーカーの発見や, 病理研究への応用がなされている。本研究はメタボローム解析を用いてこれらの変性性認知症, アルツハイマー型認知症, レビー小体型認知症, 前頭側頭型認知症についての診断方法を確立することを目的としている。本研究では, The Shankle Clinicとの共同研究で得られた認知症患者(アルツハイマー型認知症 : AD, 前頭側頭型認知症 : FTLD, レビー小体型認知症 : LBD)の血清, 尿, 唾液を解析した。統計解析からは, 各認知症の傾向を把握することに成功し, 特に同定物質に特徴があることが分かった。また, マンホイットニーの検定で健常者と認知症患者の間に差が見られていた複数の代謝物で, 各認知症の共通性と相違点を考察した。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0133

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

メタボローム解析による変性性認知症の代謝異常の特定

Comparing metabolic pathway of dementia patients with active persons by means of metabolomic profiling

環境情報学部４年

池垣 雅子

要旨

認知症を大別すると，脳梗塞の多発などによって引き起こされる脳血管性認知症と脳の変性によって引き起こされる変性性認知症に大別できる．また変性性認知症には，認知症全体の疾患の約50％を占めるアルツハイマー型認知症と，約10％を占めるレビー小体型認知症が含まれ，その他の変性性認知症としては前頭側頭型認知症もある．各認知症は，アルツハイマー型認知症は，認知機能低下や人格障害を特徴とし，レビー小体型認知症は，認知障害だけでなくパーキンソン病様の運動障害も併発するのが特徴であり，前頭側頭型認知症は，人格障害が顕著な認知症である．これらの変性性認知症の診断法は現在，知能検査や画像診断が主であるが，発症初期などは診断が難しく，誤診が多いことが問題となっており，生化学検査などからの客観的な指標が求められている．メタボローム技術は代謝変動を網羅的に調べられ，様々な疾患のバイオマーカーの発見や，病理研究への応用がなされている．本研究はメタボローム解析を用いてこれらの変性性認知症，アルツハイマー型認知症，レビー小体型認知症，前頭側頭型認知症についての診断方法を確立することを目的としている．

本研究では，The Shankle Clinicとの共同研究で得られた認知症患者（アルツハイマー型認知症：AD，前頭側頭型認知症：FTLD，レビー小体型認知症：LBD)の血清，尿，唾液を解析した．統計解析からは，各認知症の傾向を把握することに成功し，特に同定物質に特徴があることが分かった．また，マンホイットニーの検定で健常者と認知症患者の間に差が見られていた複数の代謝物で，各認知症の共通性と相違点を考察した．

Keywords:アルツハイマー型認知症（AD），前頭側頭型認知症（FTLD），レビー小体型認知症（LBD），メタボローム，CE-MS

1. 序論

1.1 現在の認知症診断

認知症の診断は現在，知能検査を始めとした神経心理学的検査と，画像診断によるものが主流である．

神経心理学的検査は，日本で最も広く使用されているのは長谷川式認知症スケールとMini-Mental State Examination(MMSE)である．どちらも，健常者は簡単に答えられるが，認知症にとってはそれが困難になる設問で構成されている．これにより，認知症と判断された場合，本人とその家族への問診を行った上で画像診断を行い，両者の診断に矛盾がなければ病名が下されることが多いが，それでもなお誤診率は50%に上るという結果が出ている．

画像診断においては，剖検調査の結果，アルツハイマー病と診断されていた約半数は診断を満たすべき脳病変が認められなかった．それに対して，レビー小体型認知症や，脳血管性痴呆では，病変は明らかであった．レビー小体型認知症の脳に現れるレビー小体という封入体は健常者の脳にも加齢とともに出現するものである．脳血管性痴呆の原因は脳梗塞や脳出血などであるが，軽微な脳梗塞は，これも，高齢者には出現しやすい．よって，対象者が高齢者であればあるほど病変混在比率が増え，画像病変の曖昧さは高まると報告されている．[1]

認知症の治療法は薬などによる対処療法となり，早期発見によって進行を遅らせることが望まれるが，以上の理由により誤診率が高く，不適切な治療を行なってしまうことが多々ある．よって，今後より多角的な病理研究や，客観的な評価指標が求められており，メタボローム解析を用いた生化学検査はそのうちのひとつである．

1.2 メタボローム解析の概要と臨床への期待

これまでの認知症の研究は脳生理学的な観点から行われるものが中心であったが，メタボローム解析技術は代謝変動を網羅的に調べることができ，様々な疾患のバイオマーカーの発見や，病理研究への応用が期待されており，メタボローム解析による認知症研究への有用性も期待されている[2].

メタボローム解析による研究はADについて盛んに行われ，バイオマーカー探索や病理研究に貢献している[3，4]. 先行研究によると，AD患者の脳内は健常者に比べ酸化ストレスが強く，一酸化窒素合成酵素（NOS）が顕著に現れ，尿素回路酵素に異常を引き起こすことが報告されている[6]. 別の研究においては，AD患者の血漿においてステロールの一種と推定される未知物質がバイオマーカー候補として挙げられた．しかしながら，数々の異性体から完全に特定することは出来ず，物質の特定は出来ていない[5]. また，FTLDやLBDなどその他の変性性認知症を含めた研究はなく，メタボローム解析でこれらの認知症を正確に診断するバイオマーカーは発見されていない．

1.3 本研究の意義

診断が難しいAD，FTLD，LBDについて，様々な視点・手法から特徴付けを行い，それらを複合的に組み合わせて考察する．主に統計解析を用い，各認知症の特徴を把握した上で，どのような評価，尺度からが最も各認知症を区別できるかということについて検討し，診断の精度を上げることを目的としている．

2. 対象と手法

2.1 血清，唾液，尿の処理法

CE-MS[7]で検出されたピークを，先端生命科学研究所の杉本氏によって開発されたソフトウェアMasterHands ver.2.10.0.17[7]を用いて解析した．血清，尿，唾液，コントロールそれぞれのデータ各19サンプルをそれぞれ全積分し，ピーク情報として質量電荷比 (m/z)，泳動時間 (Migrationtime: MT)とピーク面積値を得た．解析の手順は図1のとおりである．

1. m/z:40ppm MT:0.5minで積分を行った.
2. 代謝物質の標品を測定したピークファイル（標準物質）を用いてアノテーションを行った.

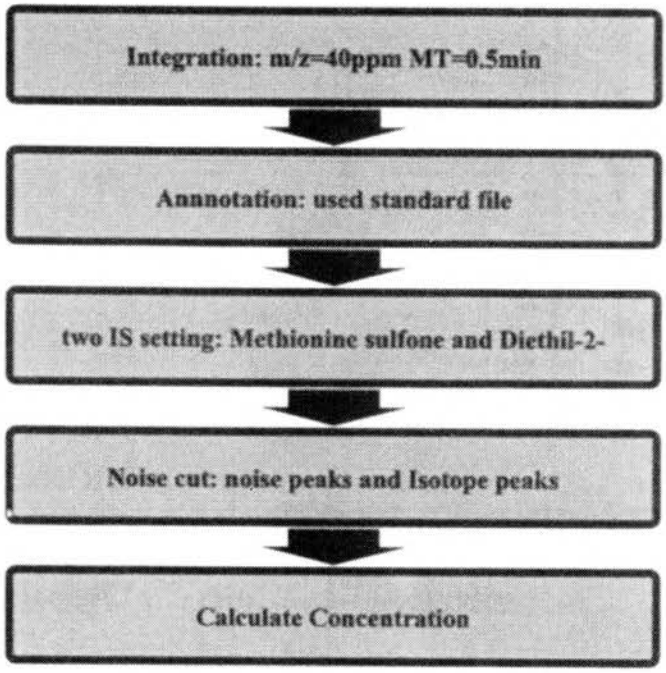


Fig. 1　MasterHandsによる解析の流れ

3. 内部標準物質（IS）にMethionine　sulfoneとDiethil-2-Acetateの2つを設定しピークの補正を行った.
4. アノテーションタグにNoiseと付いた物や，ノイズと思われるデータを目視で取り除く．AD（n=3），FTLD(n=4)，LBD（n=3），NL（コントロール，n=9）計19サンプルのうち，発現しているサンプル数が3未満の物質についても取り除いた.
5. 4.で出されたRelArea, Concからz-scoreに変換し，統計解析に用いた.

3.2.　統計解析

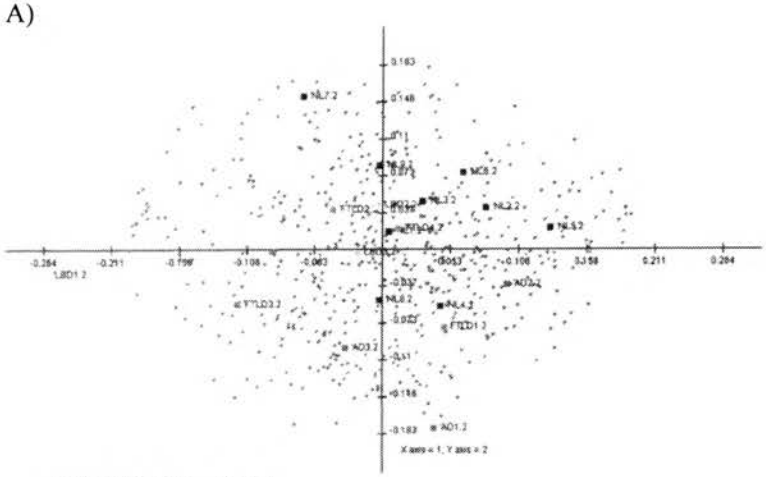
MasterHandsにより計算されたRelAreaを用いて主成分分析，対応分析を行った．これらの解析はTM4 Multi Experiment Viewer(Dana-Farber Cancer Institute, Boston)を用いて行った．主成分分析と対応分析は，多変量のデータを扱う解析手法の一分野である．主成分分析は，データに含まれる個々の項目を総合して評価し，少数の指標によって表す手法である．[16]扱う多次元データから，直交回転を用いて相関のない主成分を算出し，低次元に要約することができる．対応分析は，データの行と列の相関が最大になるように，関係性の強い要素を相対的に近くプロットする手法である．[17]

3．結果

3.1　統計解析

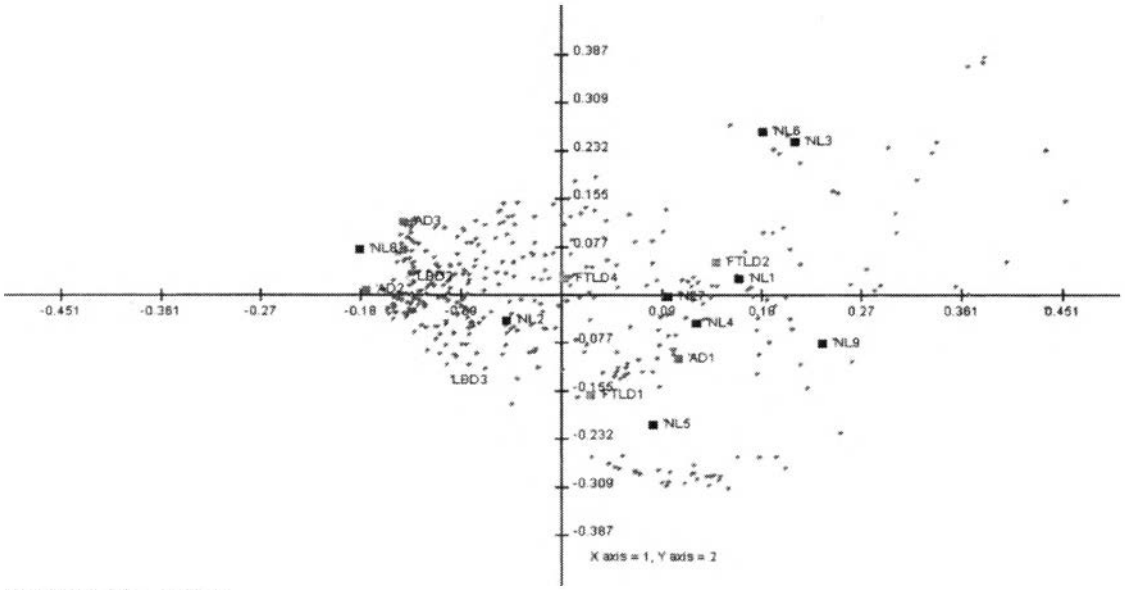
TM4 Multi Experiment Viewer(Dana-Farber Cancer Institute, Boston)を用いて主成分分析と対応分析を行った（Fig.1-2）．血清の寄与率は対応分析が29.80%であるのに対し，主成分分析が27.573%，唾液では対応分析20.37%で主成分分析31.914%，尿では対応分析が28.17で主成分分析　27.830%であった．血清と唾液の対応分析の結果では疾患群と健常者群で分離することができ，さらに各疾患に注目すると，血清においてはFTLDやAD間で，唾液においてはFTLDとLBD間でも明確に分離されていた．尿の対応分析では血清，唾液に比べ疾患群と健常者群で分離することができなかったが，主成分分析に比べ対応分析では全ての体液において疾患群対健常者群でよく分かれ，特に血清は累積寄与率も高かった.

A)



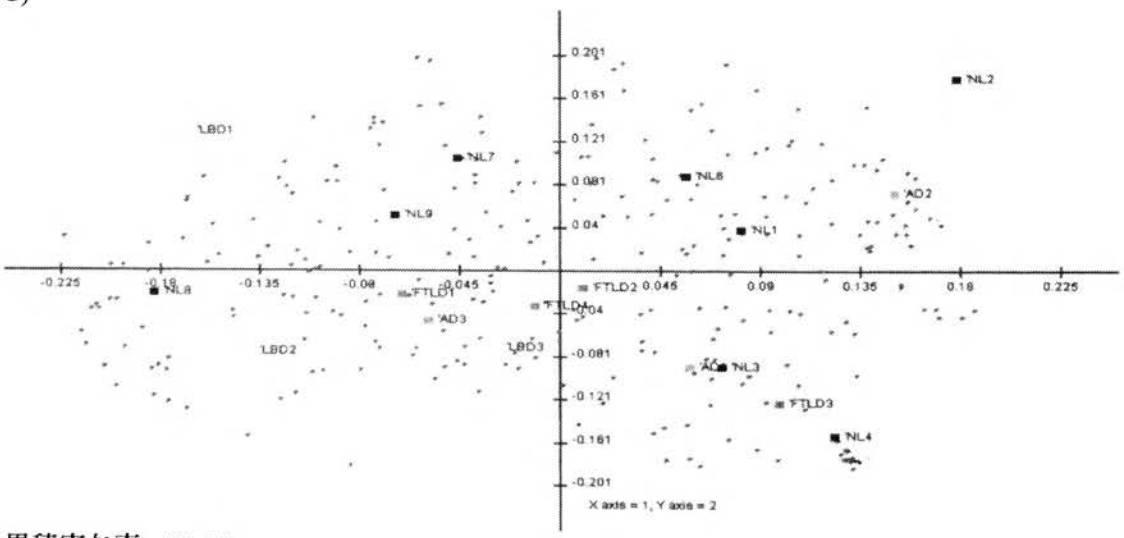
累積寄与率　29.80

B)



累積寄与率　20.37

C)



累積寄与率　28.17

Fig.1 各体液における対応分析

A)血清　B)唾液　C)尿を示す．グラフ下の数字は主成分分析の累積寄与率を示し，A)-C)それぞれ

29.80%，20.37%，28.17%．また，赤枠が疾患群，黒枠が健常者群を表す．■：NL（健常者）　■：AD（アルツハイマー型認知症）　■：FTLD（前頭側頭型認知症）　　：LBD（レビー小体型認知症）

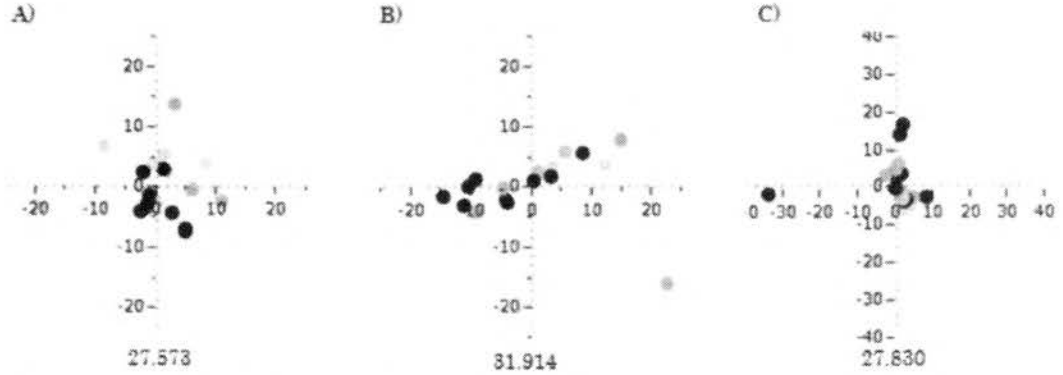


Fig.2 各体液における主成分分析
A)血清　B)唾液　C)尿を示す．グラフ下の数字は主成分分析の累積寄与率を示し，A)-C)の左からそれぞれ27.573%，31.914%，27.830%．●：NL（健常者）　●：AD（アルツハイマー型認知症）　●：FTLD（前頭側頭型認知症）　　：LBD（レビー小体型認知症）

3.2. マンホイットニーのU検定

TM4 Multi Experiment Viewerを使用し，マンホイットニーのU検定を行った．第二章で，疾患群対健常者群でU検定を行ったところ，血清と尿においてGlutamine(Gln)に，唾液と尿においてGABAに有意差が見られた（Table.1）．これらの物質はともに尿素回路周辺に位置する代謝物である．ADでは尿素回路周辺の代謝物に有意差(p値＜0.05)は見られなかったが，LBDではArginine(Arg)とGABA，FTLDではGABAに有意差があらわれた．LBDのArginineは血清，唾液で共に健常者より減少している（Fig.1）．また，GABAの濃度はLBD，FTLD共に上昇している．（Fig.2）

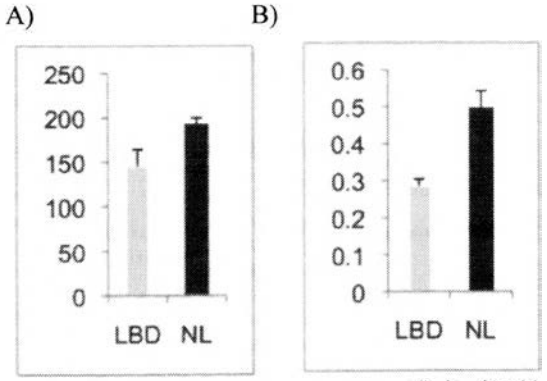


Fig.1　血清中と唾液中のArginine濃度（縦軸：Conc）

A) 血清　B)唾液
グラフ黄：LBD　黒：健常者

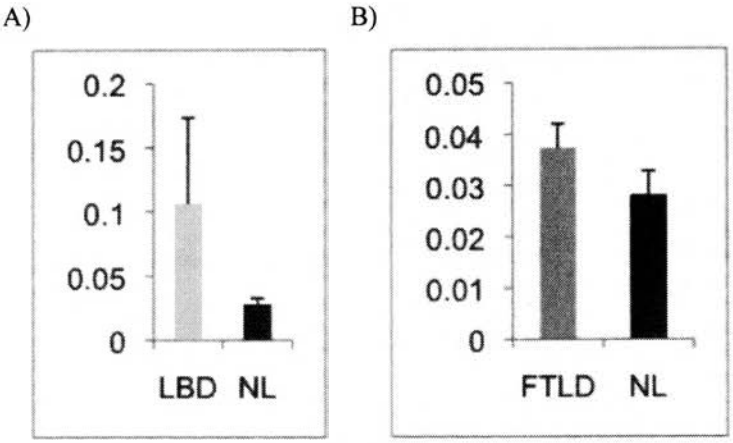


Fig.2 唾液中のGABA濃度（縦軸：Conc）
グラフ黄：LBD　青：FTLD　黒：健常者

第二章の考察で述べたように，GABAは神経伝達物質であるドーパミンを放出するドーパミン作動性の活動を抑制する[8,9]．マンホイットニーのU検定では血清，尿，唾液のどれにも有意差は出なかったが，血清データのRelAreaで算出して平均値を取ったグラフを以下に載せる．（Fig.3）また，Dopamineは唾液と尿では欠損値が多かったため載せない．血清中のDopamine量は，健常者に比べてすべての認知症で平均し少なかった．

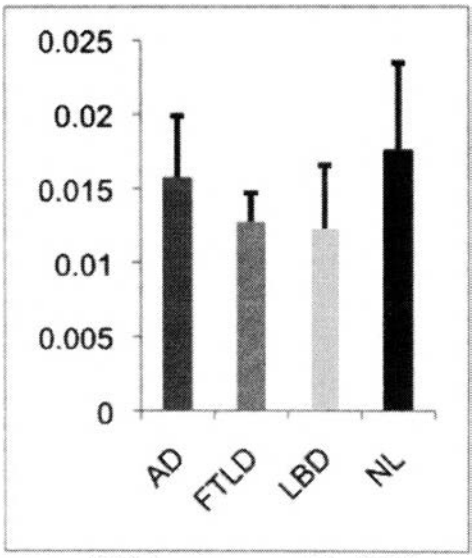


Fig.3　血清中のDopamine量（縦軸；Rel Area）
グラフ赤：AD　グラフ黄：LBD　青：FTLD　黒：健常者

3.3. 神経伝達物質量

認知症に関わりの深い物質として，神経伝達物質が挙げられる．その中でも，認知症の精神症状に深く関わりがあるとされるSerotoninと，特にADにおいて顕著な減少が見られるとされるAcetylcholineについて，以下にRelArea量で算出したグラフを載せる．（Fig.4）Dopamine同様，尿と唾液では欠損値が多くあったため，血清のデータを載せる．結果を見ると，3物質のどれからも傾向が見られず，また誤差範囲が多く出た．Glutamineと相互変換されるGlutamateについても同様であった．

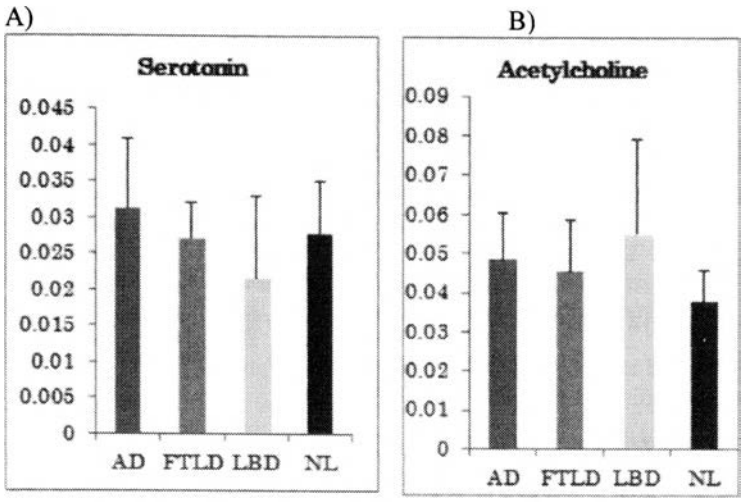


Fig.4　血清中の神経伝達物質量（縦軸；Rel Area）
A)Serotonin,　B)Acetylcholine
グラフ赤：AD　グラフ黄：LBD　青：FTLD　黒：健常者

3.4.　各認知症の尿素回路周辺の代謝マップ

尿素回路周辺の物質について，代謝マップを描き，疾患ごとの共通性と相違点を比較した．代謝マップについては付録1に掲載する．結果，ADの血清ではこの代謝経路においてすべての代謝物濃度が健常者群よりも高かった．

4. 議論

4.1　データ全体の傾向

対応分析では，疾患群対健常者群ですべての体液で分けることができた．特に血清は主成分分析に比べ，累積寄与率が高く，信頼性が高いと言える．尿，唾液では逆に累積寄与率が低くなったが，主成分分析ではほとんど分かれなかったのに対し，対応分析では分かれている．これは，対応分析が独立したデータの解析に適していることが関係していると考えられる[10]．また，行と列の関係性を最大化出来る性質により，疾患群と健常者群を各代謝物濃度によって特徴付けることに成功した．対応分析により，疾患群と健常者群は代謝物濃度において明確な差があることが分かった．

4.2 尿素回路周辺の代謝系

血清のサンプルでは，ADの尿素回路の代謝物濃度が全て健常者に比べ上昇している．これは他のサンプルには見られない特徴である．先行研究によると，AD患者の脳内は健常者に比べ酸化ストレスが強く，一酸化窒素合成酵素（NOS）が顕著に現れ，尿素回路酵素に異常を引き起こすことが報告されている[8]．またADの脳内において，尿素回路における重要な酵素の一つ，Ornithine transcarbamylase（OTC）が 機能していることが確認されている[15]．OTCはカルバモイルリン酸とOrnithineからCitrullineとリン酸を生成する際に働く酵素である．健常者の脳内ではこの酵素は不活性であり，尿素回路が活発になることがADの脳に何らかの影響を与えていると推察されている．血清サンプルのLBDにおける代謝マップを見ると，Ornithine濃度は健常者に比べて平均的に高く，Citrullineは平均的に低いことが確認できる．これらのデータから，OCTが機能して尿素回路に異常を引き起こすのはADのみであることが示唆される．

4.3. GABAの濃度上昇

代謝マップを見ると，全てのデータにおいて認知症患者のGABAの濃度が高くなっている．これらのうち，LBDとFTLDはともに唾液で有意差（$p<0.05$）が出ている．前期の研究結果でもGABAは健常者に比べ疾患群では高く出ていた．GABAは抑制性の神経伝達物質であり，抗不安，鎮静な

どの作用があるが，一定以上の増加はしばしば健忘を引き起こし，また興奮性神経伝達物質であるノルアドレナリンの前駆物質であるドーパミンを放出するドーパミン作動系の活動を低下させる[9, 10]．ドーパミンの不足は意欲の低下やパーキンソン病様の症状を引き起こす[11]．意欲の低下はAD,FTLD,LBDすべての疾患に共通する症状である．GABAは老年認知症，特にアルツハイマー型認知症の脳内での蓄積が報告されているが[12]，本研究ではレビー小体型認知症における蓄積が顕著である．

欠損値がなかった血清でDopamine量を調べたところ，健常者に比べ，各認知症ではDopamineが少なく出ていた．平均値として最も低かったのはLBDで，先行研究を裏付ける結果となった．先行研究ではタンパク質発現量で調査しているが，今回，CE-MSによるメタボローム解析でも同様の結果が出ている．

LBDと関わりのある疾患としてパーキンソン病が挙げられる．ともに脳内にレビー小体が発生することが原因となるが，発生箇所が異なる．レビー小体は神経細胞に出現するα-シヌクレインの封入体であり，ドーパミン，ノルアドレナリン，セロトニン，アセチルコリンを分泌する神経細胞に多く現れるとされているが，詳細な機構は明らかになっていない．LBDの神経伝達では，ドーパミン，ノルアドレナリン，セロトニン，アセチルコリン作動系で欠陥が起き，脳内で不足する．パーキンソン病ではDopamine作動系の働きが低下することが知られており[18]，パーキンソン病，LBDともに現れる身体症状はDopamine濃度の低下が原因と考えられる．また，ノルアドレナリンはADとFTLD，アセチルコリンはADでも低下することが分かっている．[19]セロトニンの低下はうつ病をはじめとする精神病で起こるとされ，抑うつ状態を引き起こすとされる．[20]今回，Dopamineは認知症に低く出る傾向が見られたが，AcetylcholineやSerotoninでは個体差が大きく，先行研究に沿った結果は得られなかった．

4.4. 血液脳関門の性質と代謝物

.血液脳関門（Blood-Brain Barrier, BBB）とは，脳の血管から神経細胞に流入する血液中の物質を選択的に阻害する機構である．この機構により，毒性のある物質などは神経細胞に届かない．通過できる物質としては帯電性があり，また，分子量の小さい物質が多いが，全貌は解明されていない．代謝物から神経伝達物質の結果を導こうとすると，問題となるのがこのBBBである．

本研究の結果を見ると，尿素回路周辺の物質やDopamineなど，発現量や脳解剖学による先行研究と類似するか，または同様の結果が出ている物質も多い．しかしながら，SerotoninやAcetylcholineなど，先行研究に沿わない結果が出た物質もある．尚，Dopamine, Serotonin, Acetylcholineはすべて BBBを通過することができず，前駆物質を利用して脳内で生成されている．

今回，これら3つの神経伝達物質の生成について調べた．すると，すべての物質について脳内（BBB以降）の神経細胞で産生されるが，SerotoninとAcetylcholineについてはBBB以前）でも産生されていた．ゆえに，SerotoninとAcetylcholineが脳内と体液で結果が得られなかったのは，脳以外の場所で産生された同物質との総量を測っていたからだと考えられる．この結果より，脳内の代謝量変化について見る場合，体液からは難しいが，脳内でのみ産生される物質では体液にも反映されるということが導かれた．

謝辞

本研究の共同研究先であるThe Shankle Clinicの方々，データの測定を行ってくださったヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社(HMT)の石川貴正氏，研究にあたりご指導いただいたアドバイザーの杉本昌弘氏，そしてこのような研究の場を提供してくださった冨田勝教授に心より感謝いたします．

参考文献

[1]Laura J. Martin, MD(2011)Study Shows Some Patients Diagnosed With Alzheimer's May Have Other

Forms of Dementia
[2]Catherine F. Hatfield, Robert B. Dudas and Tom Dening (2009) Diagnostic tools for dementia.
[3] Shimizu S, Hanyu H, Kanetaka H, Iwamoto T, Koizumi K, Abe K.(2005) Differentiation of dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease using brain SPECT.
[4] Ignasi Barba,Rafael Fernandez-Montesinos,David Garcia-Dorado1, David Pozo,(2008)Alzheimer's disease beyond the genomic era: nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy-based metabolomics
[5] Sato Y, Suzuki I, Nakamura T, Bernier F, Aoshima K, Oda Y.(2011)Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer Disease using metabolomics technology.
[6]HENEKA, MICHAEL T. MD; WIESINGER, HEINRICH PHD; DUMITRESCU-OZIMEK, LUCIA PHD; RIEDERER, PETER MD; FEINSTEIN, DOUGLAS L. PHD; KLOCKGETHER, THOMAS MD (2001) Neuronal and Glial Coexpression of Argininosuccinate Synthetase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Alzheimer Disease
[7] Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M.(2010) Capillary
electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles.
[8] Rossor MN, Garrett NJ, Johnson AL, Mountjoy CQ, Roth M, Iversen LL(1982) A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia.
[9] Sang Hee Leea, Inseong Kimc , Bong Chul Chung(2007) Increased urinary level of oxidized nucleosides in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease
[10] MO Hill (1974) Correspondence analysis: a neglected multivariate method
[11]HENEKA, MICHAEL T. MD; WIESINGER, HEINRICH PHD; DUMITRESCU-OZIMEK, LUCIA PHD; RIEDERER, PETER MD; FEINSTEIN, DOUGLAS L. PHD; KLOCKGETHER, THOMAS MD (2001) Neuronal and Glial Coexpression of Argininosuccinate Synthetase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Alzheimer Disease
[12] Rossor MN, Garrett NJ, Johnson AL, Mountjoy CQ, Roth M, Iversen LL(1982) A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia.
[9] Rossor MN, Garrett NJ, Johnson AL, Mountjoy CQ, Roth M, Iversen LL(1982) A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia.
[10] Sang Hee Leea, Inseong Kimc , Bong Chul Chung(2007) Increased urinary level of oxidized nucleosides in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease
[11] Ilíuchenok RIu, Dubrovina NI, Podgornaia OV, Galkina OV. (1994)Forgetfulness and amnesia: receptor mechanisms and brain mapping
[12] C. Q. MOUNTJOY, M. N. ROSSOR[1],L. L. IVERSEN[2] andM. ROTH(1983)CORRELATION OF CORTICAL CHOLINERGIC AND GABA DEFICITS WITH QUANTITATIVE NEUROPATHOLOGICAL FINDINGS IN SENILE DEMENTIA
[14] Franck Hansmannel1, David Mann2, Corinne Lendon3, Jean Jacques Hauw4, Geoffroy Laumet1, Anne Marie Ayral1, Julien Chapuis1, Didier Hannequin5,Steven DeKosky6,Florence Pasquier7, Claudine Berr8,Daniela Galimberti9, Elio Scarpini9, Ilyas Kamboh6, Dominique Campion5, Philippe Amouyel1, Jean Charles Lambert1(2009) Urea cycle and Alzheimer's disease
[15] Franck Hansmannel1, David Mann2, Corinne Lendon3, Jean Jacques Hauw4, Geoffroy Laumet1, Anne Marie Ayral1, Julien Chapuis1, Didier Hannequin5,Steven DeKosky6,Florence Pasquier7, Claudine Berr8,Daniela Galimberti9, Elio Scarpini9, Ilyas Kamboh6, Dominique Campion5, Philippe Amouyel1, Jean Charles Lambert1(2009) Urea cycle and Alzheimer's disease
[16] Greenacre, Michael (1983). Theory and Applications of Correspondence Analysis. London: Academic Press.
[17] Abdi. H., & Williams, L.J. (2010)Principal component analysis.
[18] Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C.(1993) Pathology and biology of the Lewy body.
[19] Kalinin S, Gavrilyuk V, Polak PE, Vasser R, Zhao J, Heneka MT, Feinstein DL.(2006)Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease.
[20] Lacasse J, Leo J. (2005)Serotonin and depression: A disconnect between the advertisements and the scientific literature