

令和 元年 9 月 2 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05380

研究課題名(和文)糖化ストレス軸からの統合失調症の病態基盤の究明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of glycative stress exposure in patients with schizophrenia

研究代表者

新井 誠 (ARAI, Makoto)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：80356253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：カルボニルストレスが病態基盤として躁うつ病と統合失調症の一部の症例において、共通であることが示唆された。GL01ノックアウトマウスモデルの行動解析において、行動量の減少や強制水泳試験における無動時間の短縮などを明らかとした。また、カルボニルストレス性統合失調症に由来するiPS細胞を樹立した。さらに、アストロサイトへ分化、誘導する系を確立し、抗糖化ストレス薬のスクリーニングを可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患の多くの症例において糖尿病、心血管疾患、肥満など様々な合併症が問題視されている。身体疾患の増悪とも関連のあるカルボニルストレスを軸としてデータ資源を十分に有効活用することは、早期からの精神疾患・身体疾患の予防介入、健康増進に資する予防医学に貢献できるものと考えられ、その社会的意義は高い。統合失調症をはじめとする精神疾患の発症や病態の分子メカニズムを糖化ストレスの観点から理解する事は学術的に意義が高い。

研究成果の概要(英文)：Glycation is the abnormal accumulation of dicarbonyl metabolites leading to increased modification of protein. Glycative stress is a risk factor of various diseases in the life stages, such as diabetes, heart disease, dementia and psychiatric disorders. However, the developmental effects and health-related impacts of glycative stress in the life stages and the molecular basis of these effects are unknown. We found several schizophrenic patients with novel heterozygous frameshift and missense mutations in GL01 gene with 40-50% and 15-20% reduction of enzymatic activity, respectively. GL01 is one of enzymes to detoxify reactive carbonyl compounds such as methylglyoxal, preventing the eventual formation of AGEs. In order to evaluate effects of GL01 deficits on behavior, we generated Glo1 knockout mice and assessed their behavioral phenotypes.

研究分野：分子精神医学、分子神経科学、生物学的精神医学

キーワード：糖化 統合失調症 GL01 カルボニルストレス グリケーション ライフコース

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の発症における遺伝と環境相互の要因や発症後の病態基盤は未だ明らかではないものの、当事者の視点に立った診断、治療、予防法の創出が希求されている。我々は、統合失調症における「カルボニルストレス (carbonyl stress, CS)」という終末糖化産物 (advanced glycation end products, AGEs) のひとつであるペントシジン (pentosidine, PEN) 蓄積、ビタミン B6 (VB6) 低下を伴う代謝の病態を明らかにした (Arai et al., *Arch Gen Psychiatry*. 2010)。メチルグリオキサール (methylglyoxal, MGO) に代表される反応性カルボニル化合物 (reactive carbonyl compounds, RCOs) は、タンパク質、脂質、核酸などとメイラード反応を生じ、脱水、酸化、転位などの複数の反応過程を経て、不可逆的な AGEs を形成する。RCOs による糖化反応が亢進している状態は、糖化ストレスあるいは CS と提唱されている。また、drug-naive 症例での症状改善に伴う CS 低下 (Arai et al., *Psychiatry Clin Neurosci* 2011)、治療効果や重症度を判定するマーカーとしての有用性と代謝系バランスの障害 (Arai et al., *Psychiatry Clin Neurosci*. 2014) を報告した。症例数を拡大した検証の結果からも、一般症例のおよそ 2 割が同様の代謝障害を呈することを報告した (Miyashita et al., *Psychiatry Clin Neurosci* 2014)。さらに、CS 性統合失調症は治療抵抗性が多く、入院期間も長期であるという臨床特徴との関連を明らかにした (Miyashita et al., *Schizophr Bull* 2014)。本研究の成果は、2018 年に Phase IIb 試験を実施するにまで至り、「カルボニルストレス代謝制御」という新たな統合失調症の病態に基づく治療法と生物学的指標による診断法確立の可能性へ道を拓く成果となった (Itokawa et al., *Psychiatry Clin Neurosci* 2018)。

他の国内グループから急性期症例での AGEs 亢進 (Katsuta et al. *Schizophr Bull* 2014)、治療抵抗性症例での total fluorescent AGEs 蓄積が報告されており (Kouidrat et al., *J Psychiatr Res* 2013)、AGEs という代謝経路の障害が統合失調症の病態基盤のひとつとして存在することを示唆している。また、国内外の研究者とも連携を組み、代表者は、ゲノム・臨床研究の連携 (Abe et al., *Schizophr Res*. 2017; Kushima et al., *Mol Psychiatry*. 2017; Kushima et al., *Cell Rep*. 2018) に加え、カルボニル化合物修飾分子の同定 (Koike et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2015) や高感度糖化前駆物質の分析法開発 (Ogasawara et al., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2016) など他施設との連携研究成果を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究は、糖化マーカーを軸に、精神疾患の新たな心身統合的な早期診断・予防・治療法創成のため、病態基盤を解明することを目的とした。また、生化学的分析による糖化修飾化分子の同定に加え、マウスモデルでの行動試験、薬理学的分析、細胞モデルを活用した CS 回避に有用な天然物質探索とその作用機序の解明をめざした。

3. 研究の方法

ヒト生理検体について HPLC-MS 分析を行い、精神疾患罹患者と健常者の血中 CS 変動を比較し、血中 CS と臨床情報との関連について検討を行った。また、一般集団の被験者における CS 指標について、皮膚 AGEs 値を測定、栄養疫学調査を実施し、それらとの関連についての検討を試みた。同定した統合失調症患者と健常対照者との判別に有用な末梢血代謝プロファイルの感度・特異度についてもその妥当性を検証した。動物モデル研究においては、glyoxalase I (*GL01*) ノックアウトマウスを用いた行動試験、遺伝子発現解析を実施した。加えて、細胞株あるいは iPS 細胞モデルを活用した抗 CS 作用のある天然物由来 bioactives の探索等を試みた。

4. 研究成果

CS マーカーである PEN、VB6 が重篤な陰性症状の一つである思考の解体、思考障害と強い関連を示すことが明らかとなった。また、躁うつ病と統合失調症という 2 大内因性精神疾患において、その一部には CS 病態基盤の共通性が示唆された。さらに、統合失調症において、PEN 蓄積が再燃・再発リスクや予後予測の因子となる可能性も示唆された。AGEs マーカーを非侵襲的に皮膚から簡便に測定する体制を確立し、統合失調症では健常者と比較して皮膚 AGEs 値が有意に増大すること、早期発症、入院回数、入院期間、抗精神病薬服用と関連することを明らかにした。*GL01* KO マウスの行動解析においては、行動量の減少、強制水泳試験における無動時間の短縮、驚愕反応の減少を明らかとした。CS 性統合失調症、健常者の iPS 細胞を樹立し、アストロサイトへ分化、誘導する系を確立した。

4- 生理検体でのマーカープロファイル

CS 亢進の指標である血漿 PEN、血清 VB6 値について検体収集を実施した施設間での妥当性を検証したところ、PEN、VB6 には施設間バイアスは存在せず、マーカーとしての妥当性が示された。精神症状の評価指標である PANSS を用いて、CS 亢進の指標である PEN、VB6 値と精神症状との関連を検討した結果、PEN と思考の解体 ($P < 0.0001$)、思考の硬直 ($P = 0.0002$)、緊張病症状 ($P = 0.0001$) との有意な関連が示され、Marder の分類による PANSS 下位評価尺度 (陽性症状、陰性症状、思考解体、敵意 / 興奮) スコアにおいては、思考障害との強い相関 ($P < 0.0001$) を認めた。VB6 値は、Marder の下位項目分類で思考障害と有意な負の相関 ($P < 0.0001$) を認

めた。これまで、PEN 高値、VB6 低値の統合失調患者の臨床経過の特徴として長期入院中の治療抵抗性患者を指摘してきたが、本研究によって、PEN、VB6 が重篤な陰性症状の一つである思考の解体、思考障害と強い関連を示すことが明らかにされた。以上の結果は、PEN、VB6 は、経過の特徴のみならず、症状レベルでも治療抵抗性の特徴を明確に反映することが明らかとなった。また、他の内因性精神疾患における CS 亢進について疾患特異性の検討をした結果、PEN 高値を示す患者の割合は、統合失調症で 42.1%、躁うつ病で 50.0%、うつ病群で 28.6%、健常者では 11.6% にどまった。PEN 高値、VB6 低値の両者を満たす CS 性の割合は、統合失調症で 17.1%、躁うつ病群で 18.2% と比較的高かったが、うつ病群では 8.6%、健常者では 1.1% と少なかった。躁うつ病と統合失調症は、精神病症状の出現のみならず、近年では共通の感受性遺伝子変異が明らかにされるなど、その疾患類似性が指摘されつつあるが、本研究の結果、躁うつ病と統合失調症という 2 大内因性精神疾患の CS 病態基盤の共通性を示唆しているものと考えられた。さらに、入院患者を対象に退院をアウトカムとして、前向き追跡調査を実施し、PEN 蓄積と再燃・再発リスクや予後との関連について検討したところ、PEN 高値の入院患者では退院できない患者が有意に 1.7 倍増大し、外来患者を対象にした再入院をアウトカムとした調査では、再入院を要する患者数が PEN 高値症例で 1.5 倍に増大することを明らかにした (Miyashita & Arai, in preparation)。

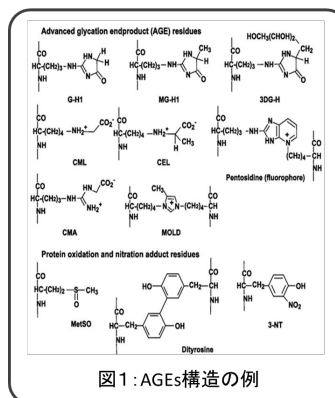


図 1: AGEs 構造の例

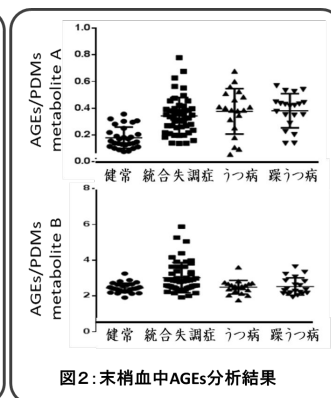


図 2: 末梢血中 AGEs 分析結果

続いて、ペントシジンに加え、患者血漿中の複数の AGEs を網羅的に測定し、AGEs の組み合わせからなる末梢血 AGEs プロファイルが、疾患群及び健常対照者を判別できること明らかにした。また、興味深いことに、マーカーは、疾患群と健常対照者群を分別するのみならず、躁状態あるいは抑うつ状態などの気分症状併存の有無により、疾患群を 2 群に層別化することも確認した。このことは、臨床現場において、当該 AGEs プロファイルが、診断のみならず、有効な薬物療法選択の際も、生物学的指標として有用である可能性を示唆された (Yoshikawa A & Arai M et al., in preparation)。

4- マウスモデル研究

GL01 欠損が行動に与える影響を評価するため、GL01 ノックアウト (KO) マウスを作製し、その行動表現型を評価した。open field test では、KO マウスは野生型 (WT) と比較して運動活性が低かった。KO マウスは forced swimming test において immobility time の短縮、また、acoustic startle response の低下により pre-pulse inhibition が増強された。Y-maze test、social interaction test においては変化を示さなかった。さらに、KO マウスのストレス脆弱性を評価するため、慢性的な社会的敗北ストレス後の social avoidance test を実施したが、WT と KO マウスとの間に有意差は認められなかった。以上の結果は、GL01 欠損により幾つかの行動変化を誘発することを示唆しているものの、KO マウスで観察された行動障害は、典型的な統合失調症のような行動ではなかった (Toriumi & Arai, in preparation)。今後は、遺伝的要因だけでなく環境要因も統合失調症発症に重要な役割を果たしていることが広く認識されているため、環境要因としての VB6 欠乏を付与した KO マウスを活用し、「遺伝 (GL01) × 環境 (VB6)」相互作用モデルにて、現在、検討を継続している。また、KO マウス単独での脳内遺伝子発現変化を前頭葉皮質、海馬、線条体で検討した結果、数個の遺伝子変動に留まったことから、今後、栄養条件や養育条件を含め、マウスモデルの時系列の代謝産物変動、網羅的遺伝子発現ネットワークの解析及び組織化学的分析を検討する予定である。

4- 細胞モデル研究の展望

また、細胞モデルでの解析においては、CS 性統合失調症家系 2 名、非 CS 性統合失調症患者 1 名、健常者 2 名より iPS 細胞を樹立し、iPS 細胞由来神経細胞・アストロサイトを高効率に誘導する系を確立した。CRISPR/Cas9 システムを用いた GL01 遺伝子改変 iPS 細胞の作成を継続中であり、今後、SY-SY5Y、1321N1 細胞株モデルで明らかとした bioactives を用いて、糖代謝、メチルグリオキサール代謝、ポリオール代謝等、代謝系の動態変化について評価を検討する予定である。また、抗 CS 薬の探索をめざすため、培養細胞株での siRNA silencing による細胞モデルに加え、iPS 細胞での天然物由来化合物の有効性を評価し、より安全で有用性の高い予防・治療薬の創出とその分子基盤の解明を図る計画である。

以上の成果は、AGEs の末梢血プロファイルを用いて診断・個別化医療の発展に貢献するものであり、予備的検討からは、横断面の末梢血プロファイルが患者ごとの薬物療法の違いとも対応していることを見出した。これらのプロファイルに基づき縦断経過を予測し、個別に治療を行うことが出来る点で画期的治療法の開発に資するものであり、将来、疾患の層別化と個別化

医療が実現可能となる展開が期待される。これまで精神疾患の発症リスクが高いとされる前駆期症例においては、確立された生物学的指標が無いため、常に過剰診断の危険が伴い、積極的な介入が困難であったが、本研究において末梢血代謝プロファイルの発症予測にかかわる生物学的指標としての妥当性が示されれば、発症予防につながる臨床的意義の高い成果も期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

R Mizutani, (18 名略), **M Arai** (20 番目). Three-dimensional alteration of neurites in schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2019 Feb 12;9(1):85. doi:10.1038/s41398-019-0427-4.

新井誠(1 番目)、(6 名略). ビタミン B6 と統合失調症. *臨床精神医学* 48(1): 63-73, 2019. Yamasaki S, (8 名略), **Arai M** (10 番目), (6 名略). Maternal diabetes in early pregnancy, and psychotic experiences and depressive symptoms in 10-year-old offspring: A population-based birth cohort study. *Schizophr Res*. 2018 Dec 26. pii: S0920-9964(18)30704-7. doi:10.1016/j.schres.2018.12.016.

Kushima I, (35 名略), **Arai M** (37 番目), (44 名略). Comparative Analyses of Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia Reveal Etiological Overlap and Biological Insights. *Cell Rep*. 2018 Sep 11;24(11):2838-2856. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.022.

R Mizutani, (16 名略), **M Arai** (18 番目). Three-dimensional alteration of neurons in schizophrenia. *Neurons and Cognition (q-bio.NC); Biological Physics (physics.bio-ph)*, 2018. arXiv:1804.00404 [q-bio.NC]

宮下光弘, (9 名略), **新井誠** (11 番目). カルボニルストレスが亢進する統合失調症患者に対するピリドキサミンの治療可能性. *精神神経学雑誌* 120(10): 861-867, 2018.

堀内泰江, 森暁, **新井誠**, 糸川昌成. iPS 細胞を用いた精神疾患病態モデルの可能性と課題. *精神科臨床 Legato*. 4(1): 21-24, 2018.

Itokawa M, Miyashita M, **Arai M** (3 番目), (14 名略). Pyridoxamine, A Novel Treatment For Schizophrenia With Enhanced Carbonyl Stress. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2018 Jan;72(1):35-44. doi: 10.1111/pcn.12613.

糸川昌成, **新井誠**, 針間博彦, 齋藤正彦. 生物学と統合失調症. 「統合失調症」再考(1). *精神医学* 59(11): 1037-1044, 2017.

Ishida YI, (8 名略), **Arai M** (10 番目), Ogasawara Y. Identification of an argpyrimidine-modified protein in human red blood cells from schizophrenic patients: A possible biomarker for diseases involving carbonyl stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Nov 4;493(1):573-577. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.150.

Abe D, **Arai M**, Itokawa M. Music-evoked emotions in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2017 Jul;185:144-147. doi: 10.1016/j.schres.2016.12.013.

Kushima I, (26 名略), **Arai M** (28 番目), (21 名略). High-resolution copy number variation analysis of schizophrenia in Japan. *Mol Psychiatry*. 2017 Mar;22(3):430-440. doi: 10.1038/mp.2016.88.

新井誠(1 番目)、(4 名略). II 統合失調症スペクトラム障害および他の最新病性障害群 カルボニルストレス 精神医学症候群(第2版)別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.37, 363-367, 2017.

Miyashita M, (23 名略), **Arai M** (25 番目). The regulation of soluble receptor for AGEs contributes to carbonyl stress in schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Oct 21;479(3):447-452. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.074.

Ogasawara Y, (4 名略), **Arai M** (6 番目). Determination of methylglyoxal in human blood plasma using fluorescence high performance liquid chromatography after derivatization with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016 Sep 1;1029-1030:102-105. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.07.019.

宮下光弘、堀内泰江、**新井誠**、糸川昌成. 統合失調症におけるカルボニルストレス. *生体の科学* 67(5): 484-485, 2016

堀内泰江, 宮下光弘, 糸川昌成, **新井誠**. カルボニルストレス性統合失調症患者由来 iPS 細胞を用いた統合失調症病態解明. *分子精神医学* 16(4): 15-21, 2016

新井誠(1 番目), (10 名略). 臨床医学分野における人材育成の強化. *日本生物学的精神医学会誌* 27(3):163-167, 2016

[学会発表](計 12 件)

M Arai. 19th TOKYO IGAKUKEN International Symposium: Preventive medical research in areas of psychiatry, health, and social welfare: Beneficial life course intervention in critical

and sensitive periods for glycation, oxidative stress, and nutritional epidemiology (2019)

M Arai, M. Miyashita, K. Toriumi, Y Horiuchi, A Kobori, M Itokawa. Pyridoxamine, a novel treatment for negative symptoms of schizophrenia. Society for Neuroscience 2018 Annual Meeting (2018)

M Arai, M Miyashita, T Dan, K Toriumi, Y Horiuchi, K Suzuki, T Miyata, M Itokawa. Pyridoxamine, a novel treatment for negative symptoms of schizophrenia. 13th International Symposium on The Maillard reaction (2018)

新井誠 .グリケーション研究の潮流:統合失調症におけるグリケーション Schizophrenia and Advanced glycation end products 第 91 回日本生化学会_シンポジウム(2018)

新井誠 .生活行動習慣と糖化・酸化ストレスの相互作用が主体価値の形成と改編に与える影響 .新学術領域研究「脳・生活・人生の統合的理解にもとづく思春期からの主体価値発展学」班会議 (2018)

新井誠 .カルボニルストレス .若手中堅シンポジウム 1: ここまで分かった統合失調症~分子生物学的研究~, 第 13 回日本統合失調症学会 (2018)

新井誠 ,(10名略) .生活行動習慣と糖化・酸化ストレスの相互作用が主体価値の形成と改編に与える影響 .新学術領域研究「脳・生活・人生の統合的理解にもとづく思春期からの主体価値発展学」班会議 (2018)

M Arai, K Toriumi, M Miyashita, Y Horiuchi, I Nohara, N Obata, G Konopka, M Itokawa, T Dan, T Miyata. Administration of high-dose pyridoxamine to adult mice. WPA XVII WORLD CONGRESS OF PSYCHIATRY (2017)

新井誠 .シンポジウム 2 「思春期の発達と健康を支えるもの:大規模思春期コホート研究から」思春期の心身の健康と生活習慣行動:コホートへの糖化・酸化ストレスマーカー導入 .第 21 回日本精神保健・予防学会 (2017)

新井誠 .糖化・酸化ストレスの生涯軌跡に着目した新たな心身統合的疾患概念・予防・治療戦略の創成~思春期に着目して~ 班会議 (2017)

新井誠 .生活行動習慣と糖化・酸化ストレスの相互作用が主体価値の形成と改編に与える影響 .新学術領域研究「脳・生活・人生の統合的理解にもとづく思春期からの主体価値発展学」班会議 (2017)

M Arai. Carbonyls stress and Schizophrenia. 14th IGAKUKEN International Symposium (2016)

〔図書〕(計1件)

新井誠 .統合失調症薬物治療ガイド:患者さん・ご家族・支援者のために .一般社団法人日本神経精神薬理学会 編集,じほう,作成メンバー .2018年8月30日発行 .

〔産業財産権〕

該当なし

出願状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

・公益財団法人 東京都医学総合研究所 統合失調症プロジェクト ホームページ
<http://www.igakuken.or.jp/schizo-dep/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:瀧澤 俊也

ローマ字氏名:TAKIZAWA, Shunya

所属研究機関名:東海大学

部局名:医学部 内科学系神経内科

職名:副学部長、内科学系長、神経内科学教授・診療科長

研究者番号(8桁):70197234

(2)研究協力者

研究協力者氏名:堀内 泰江

ローマ字氏名:HORIUCHI, Yasue

研究協力者氏名:宮下 和弘

ローマ字氏名:MIYASHITA, Kazuhiro

研究協力者氏名:鳥海 和也

ローマ字氏名:TORIUMI, Kazuya

研究協力者氏名:鈴木 一浩

ローマ字氏名:SUZUKI, Kazuhiro

研究協力者氏名:吉川 茜

ローマ字氏名:YOSHIKAWA, Akane