

令和元年6月11日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08383

研究課題名(和文)統合失調症の診断と適切な薬物治療への橋渡しとなるバイオマーカーに関する研究

研究課題名(英文) Study of biomarker as a mediator for appropriate diagnosis and medication for schizophrenia

研究代表者

小笠原 裕樹 (OGASAWARA, YUKI)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20231219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究から、患者血漿中のカルボニル化タンパク質量が有意に高く、若年ほどその傾向が顕著であり、特にIgG軽鎖及びアルブミンのAGEs化が亢進していることを明らかにした。原因物質の1つと考えられたメチルグリオキサール(MGO)に対する高感度な定量法を開発した。複数の患者赤血球中でアルグピリミジン化したタンパク質の蓄積を発見し、そのタンパク質を同定した。カルボニルストレス性統合失調症モデルマウスを用いた予備検討において、低分子カルボニル化合物として、予想していた脳内MGOレベルの有意な上昇を見出した。以上の成果は、カルボニルストレス性統合失調症の診断、治療の橋渡しに繋がるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療抵抗性統合失調症患者の血液を用いて、バイオマーカーの探索を行った。本研究から得られた知見として、患者血漿中においてカルボニルタンパク質の有意な上昇と、患者赤血球中に、メチルグリオキサール(MGO)を前駆体として生成するアルグピリミジン構造を有する糖化タンパク質の蓄積を見出した。従って、カルボニルストレス性統合失調症と考えられる患者の割合は予想以上に多いことが示唆された。MGOが本疾患の原因物質である可能性が推定されたことから、今後、脳内タンパク質が糖化を受けることで生じるタンパク質機能や神経細胞構造の変化を詳細化することにより、本統合失調症の発症機序解明の糸口が見つかることが期待される。

研究成果の概要(英文)：1.We determined the formation of protein carbonyl in the plasma of schizophrenic patients. Protein carbonyl levels in the plasma from schizophrenic patients were significantly higher than that from healthy subjects. Western blots analysis clearly showed that albumin and IgG were markedly carbonylated in the plasma of patients.2.We established practical method based on HPLC with fluorescence detection to measure low methylglyoxal(MGO) levels. MGO concentrations were measured in human plasma using the original method in order to demonstrate its utility.3.We observed marked accumulation of an approximately 56 kD protein, reactive to anti-argpyrimidine antibodies, in the red blood cells of some patients with refractory schizophrenia. This ARP-modified protein was purified from the blood of schizophrenic patients and identified as selenium binding protein 1 (SBP1) by LC-MS/MS.4.In the preliminary study, we found the accumulation of MGO levels and MGO-induced AGEs in the model mouse brain.

研究分野：分析化学

キーワード：統合失調症 カルボニルストレス メチルグリオキサール バイオマーカー 治療抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)統合失調症の診断は、医師の問診や患者の訴えを基に行われており、生化学的な検査による診断法が確立していない現状にある。診断において一般化された検査法がないために治療的介入が遅れ、結果として難治化している症例も多いことから、その早期診断に有用な検査法の開発が切望されている。従って、患者血液で特異的に変化している低分子代謝物を見出すことは、新たな検査法開発の糸口となると共に、発症メカニズムの一端を解明する上で重要な知見となる。

(2)本研究では、統合失調症の一つのタイプとして最近報告された「カルボニルストレス性統合失調症」に注目した。カルボニルストレスとは、糖や脂質から酸化的に生じるカルボニル化合物がタンパク質に結合し、複雑で多様な構造体が生成する状態で、腎不全や動脈硬化症などの発症に関わる酸化的な翻訳後修飾として認識されてきた。ところが、近年、糸川ら(東京都医学総合研究所)のグループにより、腎機能が正常であるにも係らず、血液中においてカルボニル化タンパク質の形成を経て生じる AGEs の一つであるペントシジン量が増加し、カルボニル化合物との反応により減少するビタミン B₆濃度が低下している統合失調症患者が多く存在することが報告された。更に、糸川らはカルボニル化合物の消去剤であるピリドキサミンの投与で、その症状が改善する症例を報告した。しかし、血中や尿中のペントシジンは腎疾患のマーカーとして既に実用化されており、統合失調症に特異的なものではない。また、国内外で、精神疾患に対するマーカーとしてカルボニル化タンパク質の生成に着目した研究報告は殆どなく、統合失調症に特異的なカルボニルストレス状態を詳細化し、その発症や病態との関わりを明らかにすることが望まれている。

2. 研究の目的

(1)カルボニル化タンパク質の網羅的な微細構造の解析により、発症早期に生成している特異的なカルボニル構造を決定し、「始めに何がタンパク質に結合して、終末糖化産物(AGEs)生成に至るのか」を明らかにする。

(2)患者血液中で、タンパク質に結合してカルボニル化を起こす低分子と、生成する特異的なカルボニル化タンパク質をマーカーとする生化学的な検査法を確立し、患者試料に応用することで、統合失調症の診断と治療に貢献する橋渡しとなる基礎的データを提示する。

3. 研究の方法

(1)原因となる代謝物及びバイオマーカーを見出すために、患者と健常人の血液あるいはヒト由来神経細胞株などを試料として、カルボニル化に関する高分子及び低分子の比較解析を行う。具体的には、カルボニル化タンパク質の MALDI-TOF-MS, nano-LC-MS/MS 及び NMR による解析により、統合失調症患者に特異的なカルボニル化タンパク質を同定する。次いで、タンパク質に結合する低分子代謝物を解析、特定する。

(2)原因となる低分子代謝物が明らかとなった場合、逆相系 HPLC を用いた高感度な定量法を開発する。その方法により、原因低分子代謝物の患者血漿中での濃度を求め、腎機能障害患者、他の精神症患者及び健常人と比較することで、その特異性を評価してバイオマーカーを選定する。

4. 研究成果

(1)28年度の研究において、統合失調症患者血漿中のトータルカルボニルタンパク質量が、比較的若い患者において高い傾向にあることが明らかとなった。一方で、赤血球中のカルボニルタンパク質量には、統合失調症患者と健常人において、有意な差は見られなかった。しかし、各種の AGEs 抗体を用いたウエスタンブロット法による検討の結果、赤血球中の 56kD のタンパク質が、アルグピリミジン化しており、そのシグナルが、健常人に比べ明らかに強い統合失調症患者検体が見出された。

神経細胞を用いた検討においては、メチルグリオキサールが誘導するカルボニルストレスに対し、ポリスルフィド (H₂Sn)などの結合型イオウ種が、防御的に働くことが明らかとなった。更に、転写因子 Nrf2 の活性化剤であるカルノシン酸および CDDO-Im を、ヒト由来神経細胞株 SH-SY5Y に前処理するとき、メチルグリオキサール処理による細胞毒性が軽減されることを明確にした。また、Nrf2 活性化効果を有する結合型イオウ種であるポリスルフィドを用いて同様の検討を行った。その結果、メチルグリオキサールが誘導する細胞毒性に対する結合型イオウの効果には、Nrf2 系の活性化のみならず、直接的な消去作用が関与していることが示唆された。加えて、Nrf2 活性化によるカルボニルストレスの軽減、抑制効果においては、グルタチオン合成の律速酵素である GCL と、シスチンのトランスポーターである xCT の発現増大による細胞内グルタチオン濃度の上昇が、最も重要な要因であることを初めて明らかにした。

(2)29年度の研究においては、カルボニルストレス性統合失調症の原因成分である可能性が推定されている、メチルグリオキサールの測定法を開発し、その実用化のための検討を行なった。

メチルグリオキサルはグルコースから解糖系あるいはメイラード反応の過程で、非酵素的に生じる α -ジカルボニル化合物である。本研究では、血中や脳内のメチルグリオキサル濃度の変化及び蓄積について調べるため、簡便かつ高感度な蛍光ラベル化 HPLC 法を考案した。本法は、従来の方法に比べ簡便で、精度、再現性も良好であった。健常人血漿に本法を応用したところ、健常人におけるメチルグリオキサル濃度は $0.024 \sim 0.258 \mu\text{M}$ ($\text{mean} \pm \text{SD} = 0.098 \pm 0.066$) の範囲で、これまで報告された値に近似するものであった。本法は、今後の研究において、統合失調症患者血漿及びモデルマウス脳の各部位などにおいて、遊離型メチルグリオキサールの測定に用いることのできる有用な方法である。

一方、28 年度の研究で、一部の難治性統合失調症患者の赤血球中において、抗アルグピリミジン (ARP) 抗体で検出される 56kD のタンパク質が見出された。アルグピリミジンは α -ジカルボニル化合物であるメチルグリオキサルとタンパク質のアルギニン残基との反応で生成する AGEs 構造の 1 つである。そこで、29 年度はその 56kD の ARP 化タンパク質の精製、同定を試みた。患者血球より本タンパク質を精製し、詳細に解析した結果、LC-MS/MS 法により ARP 化タンパク質が selenium binding protein 1 (SBP1) であることが解かった。統合失調症の患者においては、測定した 22 人中 7 人において ARP 化 SBP1 の蓄積が認められたが、腎不全の患者赤血球においても有意な ARP 化 SBP1 の蓄積が見られたことから、赤血球中 ARP 化 SBP1 の蓄積は、統合失調症特異的ではないものの、新たなカルボニルストレス性疾患の指標となる事が示された。

(3) 28-29 年度までの検討において、複数の患者赤血球中で、メチルグリオキサルを前駆体として生成するアルグピリミジン構造を有する糖化タンパク質の蓄積を見出したことから、メチルグリオキサルが糖化ストレスの原因物質である可能性が強く示唆された。

最終年度は、血液中診断マーカーとして、統合失調症患者血漿を試料としてメチルグリオキサルを測定すると共に、メチルグリオキサールの代謝に焦点を絞り、構築されたカルボニルストレス性統合失調症モデルマウス (食餌制限を受けた GL01 ノックアウト) を用いて予備検討を行った。その結果、血漿中のメチルグリオキサル濃度については、健常人の検体数が不十分であることから、その変化の有無を示すには至らなかったが、カルボニルストレス性統合失調症モデルマウス脳中においてメチルグリオキサルレベルの有意な上昇を見出した。それを前駆体とする糖化タンパク質が前頭前皮質、海馬、脳幹及び線条体で局所的に蓄積していることが判った。この結果から、今後、メチルグリオキサルにより糖化を受ける脳内のタンパク質を同定し、その影響を明らかにすることが、カルボニルストレス性統合失調症の発症機序解明の上で重要な位置を占めることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Ogasawara Y, Tanaka R, Koike S, Horiuchi Y, Miyashita M, Arai M. 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*. 査読あり、1029, 2016, 102-105

DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.07.019

Ishida YI, Kayama T, Kibune Y, Nishimoto S, Koike S, Suzuki T, Horiuchi Y, Miyashita M, Itokawa M, Arai M, 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*. 査読あり、493, 2017, 573-577

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.150

Koike S, Ando C, Usui Y, Kibune Y, Nishimoto S, Suzuki T, Ogasawara Y. Age-related alteration in the distribution of methylglyoxal and its metabolic enzymes in the mouse brain. *Brain Research Bulletin*. 査読あり、144, 2019, 164-170

DOI: 10.1016/j.brainresbull.2018.11.025

[学会発表] (計 5 件)

小池 伸、小峰 大典、山元 繁秀、小笠原 裕樹、神経細胞における結合型イオウの抗カルボニルストレス作用の検討、第 38 回日本生物学的精神医学会、2016

小池 伸、西本翔一、川村久美子、鳥海和也、新井 誠、小笠原裕樹、グリオキサラーゼ 1 欠損マウス脳内のメチルグリオキサールの測定、第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会、2017

木船 陽介、鹿山 将、小池 伸、鈴木 俊宏、石田 洋一、堀内 泰江、宮下 光弘、新井 誠、小笠原 裕樹、統合失調症患者赤血球中のアルグピリミジン化タンパク質の同定、日本薬学会第 138 年会、2018

小池 伸、安藤千尋、臼井遥祐、小笠原裕樹、老齢マウス脳内におけるメチルグリオキサル濃度の測定、第 28 回日本臨床精神神経薬理学会、2018

木船 陽介、小池 伸、鈴木 俊宏、石田 洋一、鳥海 和也、新井 誠、小笠原 裕樹、疾患モ

デルマウスを用いたカルボニルストレス性統合失調症に関する研究、日本薬学会第 139 年会、2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：糸川 昌成

ローマ字氏名：ITOKAWA MASANARI

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。