

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01574

研究課題名(和文)統合失調症生起・転帰の縦断的メカニズムの解明

研究課題名(英文)Exploration of mechanism for schizophrenia origin and longitudinal consequence

研究代表者

吉川 武男 (Yoshikawa, Takeo)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：30249958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の新規メカニズムとして、硫化水素の産生系が亢進しているという発見に基づき、本研究では統合失調症の発症原因、縦断的経過、転帰のメカニズムを追究した。脳の発達期に炎症・酸化ストレスを受けると、それに対する防御反応として抗酸化系の亢進がエピジェネティックにプログラムされ、かつ硫化水素産生酵素遺伝子発現亢進は抗酸化系の一環として生じることが考えられた。硫化水素産生が亢進した結果(過酸化ストレス)、脳のエネルギー代謝の低下、PV陽性抑制性ニューロンの機能低下、スパインの減少が引き起こされることが判明した。過酸化ストレスは、創薬の新しい切り口になることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症のこれまで知られていなかった病理・病態として、硫化水素の産生系が亢進していることを発見した。硫化水素の産生系が亢進する原因は、脳の発達期に受けた炎症・酸化ストレスに起因し、硫化水素の産生系亢進は脳のエネルギー代謝を低下させることが判明した。過酸化ストレスという概念は、統合失調症の成因から転帰までを統一的に説明することができ、かつ創薬の新しい切り口になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously revealed that elevated levels of Mps1, a hydrogen sulfide (H₂S)/polysulfides-producing enzyme, led to impaired prepulse inhibition with increased sulfide deposition. Analysis of human samples demonstrated that the H₂S/polysulfides production system is indeed upregulated in schizophrenia. Mechanistically, Mps1 overexpression dampened energy metabolism, while maternal immune activation model mice showed upregulation of genes for H₂S/polysulfides production, via epigenetic modifications. These results suggest that inflammatory/oxidative insults in early brain development result in upregulated H₂S/polysulfides production as an antioxidative response, which in turn cause deficits in bioenergetic processes. This study revealed that an elevated H₂S/polysulfides-producing system(“sulfide stress”)underlies the pathophysiology of a subset of schizophrenia, explaining a novel aspect of the “neurodevelopmental hypothesis”, and could provide a novel paradigm for drug development.

研究分野：精神医学、分子遺伝学、神経科学

キーワード：統合失調症 硫化水素 エネルギー代謝 エピジェネティックス 炎症 酸化ストレス 還元ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、思春期以降に顕在発症の後、寛解、再発を繰り返し、徐々に社会機能の低下（認知科学的には認知・実行機能の低下）を来し、特に適切な治療を施さない場合は、陰性症状の重篤化をきたすなど、精神医学が進歩した現代でも早急に克服しなければならない難病である。既存の向精神薬が有効でない「治療抵抗性統合失調症」も 55%存在するとの試算もある(Holla & Thirthalli, *Asian J Psychiatr* 2015)。

統合失調症では病因の異質性が際立っており、ゲノム解析からはオッズ比が 1.5 以下程度の効果の弱いコモン SNP が 8,300 あるとシュミレーションもあり(Ripke et al, *Nat Genet* 2013)、個人によってそのレパトアが異なることが大きな要因であると考えられる。

Serendipitous に発見された現在の抗精神病薬が D2R 阻害作用を持つように、横断面でみると顕在発症後の活発な病相期（図 1 の縦線）ではドーパミン神経の過活動が想定されている。その他、NMDA 神経伝達の低下など神経伝達物質あるいはその受容体に関する theory が多い。

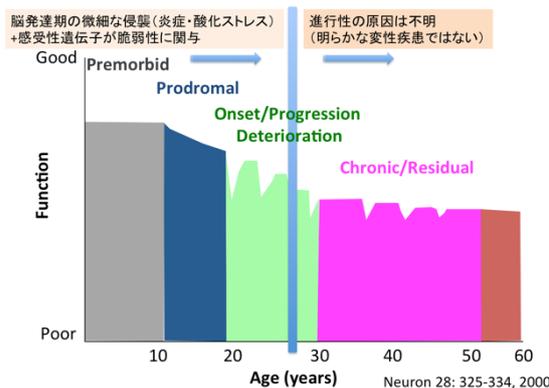


図 1：統合失調症の典型的な縦断的経過

我々は、H26-28 の基盤研究 A (代表：吉川) で、モデル動物のプロテオミクス解析等を駆使して調べた結果、疾患の横断面では全く新しいメカニズムとして硫化水素(H₂S)の産生系が亢進しているという事実を発見した。H₂S theory の主なエビデンスは以下の通りである：

- 統合失調症のモデルマウスのプロテオミクス解析で、H₂S 産生酵素の 1 つである Mpst (図 2) の発現上昇を transcript およびタンパクレベルで認め、生化学的解析の結果、モデルマウスの脳では遊離 H₂S の上昇、それによるタンパクの過酸化を検出した。
- 統合失調症毛髪で、MPST の発現レベルが上昇していた。
- もう 1 つの H₂S 産生酵素遺伝子の 1 つである CBS (図 2) の発現が、統合失調症死後脳、患者 iPS 細胞から分化させた神経幹細胞で上昇していた。
- 患者由来 iPS 細胞の生化学的解析でも H₂S 産生系が亢進している裏付けが取れた。
- H₂S 産生酵素には 3 種類あるが (図 2)、上記 upregulation が見られた酵素遺伝子は当該組織で最も発現レベルが高いものであり、生化学的変化に帰結していることは reasonable であると考えられた。
- モデルマウスに H₂S 発生剤を投与したところ、統合失調症様表現型が悪化した。

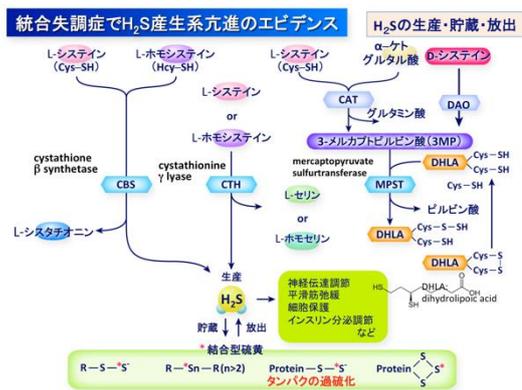


図 2：硫化水素産生系と関連酵素

モデルマウスの脳での Mpst の発現上昇、統合失調症死後脳での CBS 発現上昇の原因をゲノムレベルで調べるべくプロモーター領域のシーケンス解析、コピー数多型解析等を行ったが変化がなかった。しかし、遺伝子領域に遺伝子発現上昇を説明できる明らかな DNA メチル化の変化が認められた。H₂S 産生系はグルタチオン合成を促進し生体内では抗酸化の主要なシステムとして機能している。これらの結果は、脳の発生・発達期に炎症・酸化ストレスがあり、それらを緩和すべくエピジェネティック変化が生じたものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) Cause: 横断面での H₂S 産生系が亢進している原因に関して、脳発達期の酸化・炎症ストレス ⇒ H₂S 産生系遺伝子のエピジェネティック変化、という観点から迫る、(2) Consequence: 横断面での H₂S 産生系亢進の慢性的帰結に関して、マルチオミクス手法を用いて統合失調症につながるメカニズムの解明に迫る、ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳発達期の酸化・炎症ストレスモデル：

母マウスに polyI:C を投与して、胎児マウス脳に炎症・酸化ストレスを与える方法 (maternal immune activation) を採用した。基本的には我々が以前共著で報告したプロトコル(Bundo et al, Neuron 2014)を踏襲した。C57BL/6N マウスを用いて、胎生 9.5 日に polyI:C を 20 mg/kg i.p.母マウスに投与した。polyI:C はイノシンリボヌクレオチドの鎖とシチジンリボヌクレオチドの鎖の二重鎖で自然免疫における TLR (toll like receptor) のリガンドとなっており、RNA 二重鎖は哺乳類の生体内でインターフェロンを誘導し炎症反応を惹起する。本プロトコルで成体期に統合失調症様表現型が出現することは確認している (Murata et al., unpublished data)。

(2) ヒト死後脳：

統合失調症および対照群の死後脳は、遺伝子発現解析においては、Victorian Brain Bank Network (<http://www.mhri.edu.au/brain-bank>)から入手した Brodmann Area 8 (BA8)を用いた。Schizophrenia n=95, control n=93 である。生化学的解析においては、Postmortem Brain Bank of Fukushima for Psychiatric Research および Brain Research Institute, Niigata University, Japan の BA17 サンプルを用いた。これは、schizophrenia n=22, control n=14 である。

(3) その他の解析：

定量的 RT-PCR 解析、RNA-seq 解析、western blot 解析、ミトコンドリア complex I、ATP 解析、スパイン解析、統計解析については、Ide et al., *EMBO Mol Med* 11: e10695, 2019 を参照。

(4) 研究倫理

本研究のプロトコルは、理化学研究所の倫理委員会、および共同研究機関の倫理委員会で承認されている。

4. 研究成果

(1) Cause: 横断面での H₂S 産生系が亢進している原因について：

統合失調症の病理病態仮説として有力なものに「神経発達障害仮説」がある。これは、脳の発達期において受けた微細な侵襲が思春期以降の顕在発症の基盤になるという考え方である。侵襲は、通常、炎症・酸化ストレスを伴う。polyI:C 投与モデルマウスで、硫化水素産生酵素遺伝子、および代表的な抗酸化遺伝子の発現レベルを測定した結果を図 3 に示す。

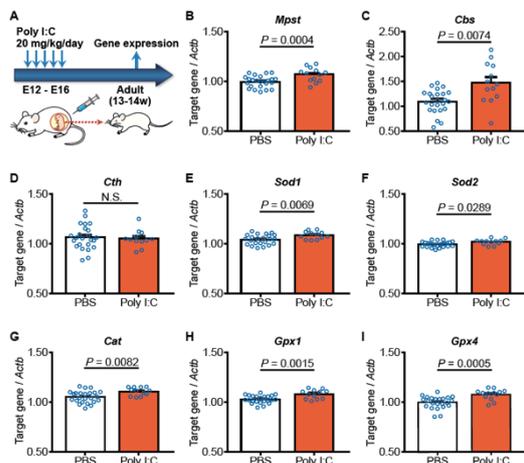


図 3 : polyI:C 投与モデルマウスにおける遺伝子発現レベル

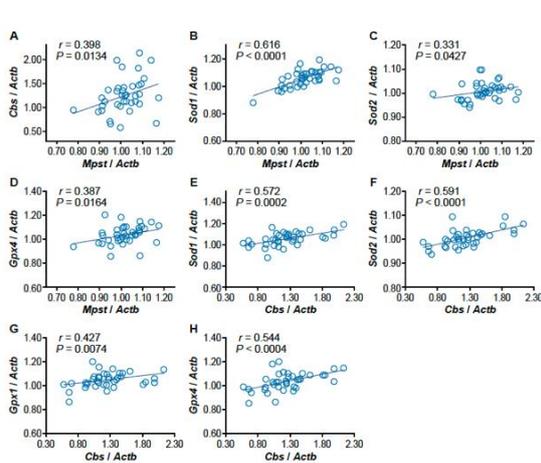


図 4 : 硫化水素産生酵素遺伝子と抗酸化遺伝子の発現レベルの相関

3 種類の硫化水素産生酵素遺伝子のうち、Mpst、Cbs の発現レベルは polyI:C 投与マウスで有意に上昇していた (図 3 B, C)。興味深いことに、代表的な抗酸化遺伝子、Sod1、Sod2、Cat、Gpx1、Gpx4 の発現レベルも上昇していた (図 3 E-I)。そして、図 4 に示すように、これら硫化水素産生酵素遺伝子の発現レベルと抗酸化遺伝子の発現レベルは有意に相関していた。

これらのことから、脳の発達期に炎症・酸化ストレスを受けると、反作用 (防御反応) としての抗酸化系の亢進がエピジェネティックにプログラムされ、かつ硫化水素産生酵素遺伝子発現亢進は抗酸化系の一環である、と考えられる。実際、H₂S が生体内で抗酸化分子として働いていることはこれまで繰り返し報告されている。なお、図 5 のように、polyI:C 投与モデルマウスでは、成体期に炎症系の亢進は生じていなかった。

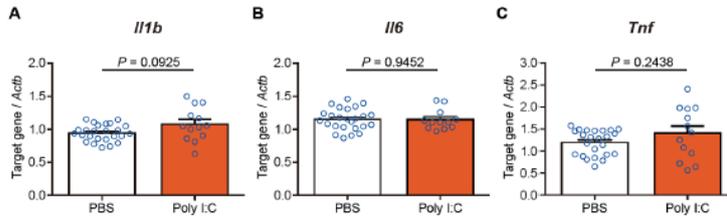


図5：Poly I:C 投与マウスにおける炎症系サイトカイン遺伝子の発現

今回の研究の出発点は、マウス近交系 C3H/HeN (C3H)が C57BL/6N (B6)に比較してプレパルス抑制 (PPI) が低下しており、C3H は B6 と比べてより統合失調症形質に近い形質を持っていると考えたことであるが、興味深いことに脳発達期の C3H マウス脳では B6 に比較して炎症性サイトカイン遺伝子の発現上昇がみられた (図6)。

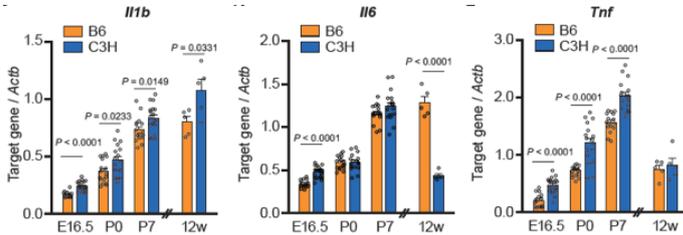


図6：脳発達期の B6、C3H マウス脳における炎症系サイトカイン遺伝子の発現

ヒト統合失調症死後脳でも、抗酸化遺伝子 *CAT*(catalase)の発現上昇が認められ、その発現レベルは硫化水素産生酵素遺伝子 *MPST*、*CBS*の発現レベルと相関していた (図7)。このことは、統合失調症でも poly I:C 投与マウスと同様、抗酸化系の亢進がエピジェネティックにプログラムされ、かつ硫化水素産生酵素遺伝子発現亢進は抗酸化系の一端を構成していると考えられる。

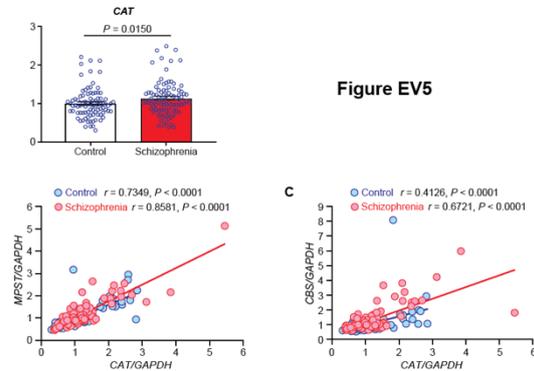


図7：統合失調症死後脳における抗酸化遺伝子 *CAT*の発現と *MPST*/*CBS*発現との相関

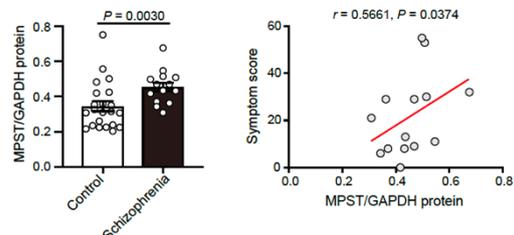
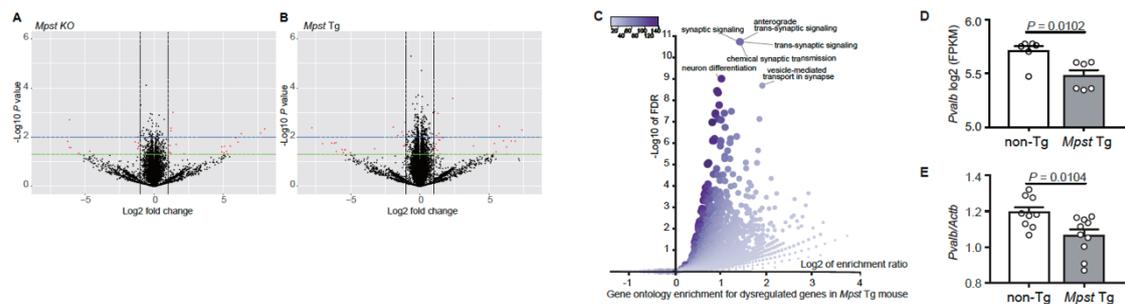


図8：統合失調症死後脳における *MPST* 発現レベル(左)と臨床重症度との相関(右)

さらに重要なことに、ヒト統合失調症死後脳では、タンパクレベルで *MPST* の発現レベルが上昇しており、*MPST* 発現レベルは生前の臨床症状重症度スコアと相関していた (図8)。

(2) Consequence: 横断面での H₂S 産生系亢進の機能的帰結に関して：

硫化水素産生が亢進した場合 (過酸化ストレス)、どのような機序で統合失調症の発症につながるのかを調べるために、*Mpst* KO マウスと *Mpst* Tg マウスの前頭葉サンプルを用いて RNA-seq 解析を行った (図9)。



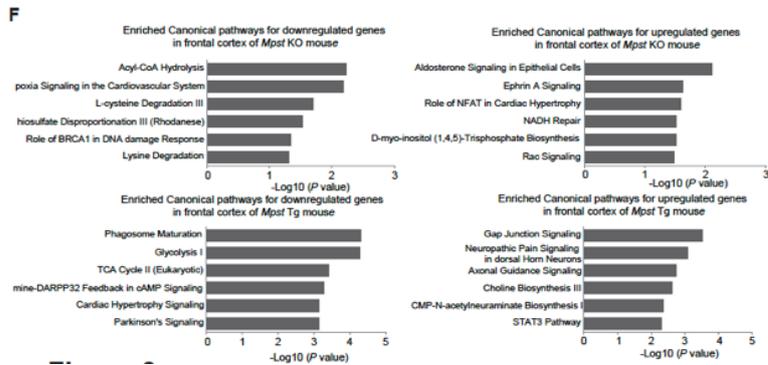


図 9 : *Mpst* KO マウスと *Mpst* Tg マウスの前頭葉の RNA-seq 解析

神経系に関するいろいろな遺伝子の発現量の差が KO と Tg 間で認められたが、特に注目されたのは、Tg マウスで解糖系および TCA サイクルというエネルギー産生に関係するパスウェイに属する複数の遺伝子の発現が減少していたことである (図 9 F)。これに呼応して、脳内で最もエネルギーを消費していると考えられている抑制性神経細胞のマーカーであるパルブアルブミン遺伝子 (*Palb*) の発現量も Tg マウスで減少していた (図 9 D, E) エネルギーに関連して、ATP の含量およびミトコンドリアの complex IV の活性を、*Mpst* non-Tg と *Mpst* Tg マウス脳と比較してみたところ、これらエネルギー産生の指標は Tg マウスで有意に減少していた (図 10)。

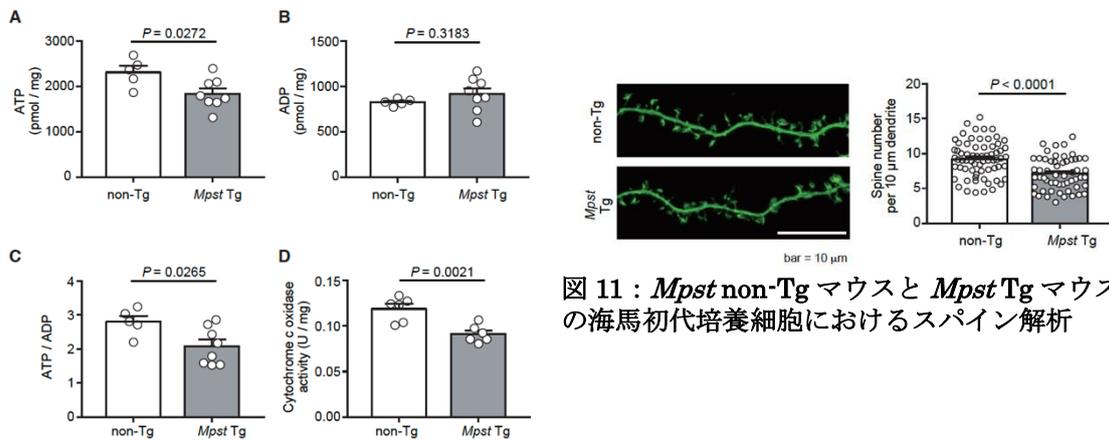


図 11 : *Mpst* non-Tg マウスと *Mpst* Tg マウスの海馬初代培養細胞におけるスパイン解析

図 10 : *Mpst* non-Tg マウスと *Mpst* Tg マウスの ATP 含量と complex IV 活性

さらに、海馬初代培養細胞を調整してスパインを調べたところ、*Mpst*Tg マウスは *Mpst* non-Tg に比較してスパイン密度の低下がみられた (図 11)。

以上をまとめると、今回の結果から以下のようなことが言える：

- 生体内での硫化水素濃度の測定は困難であったため、生理的な硫化水素産生亢進がどのような影響を及ぼすか、今まで不明であった。
今回の研究では、
 - C3H は B6 に比較して *Mpst* タンパクレベルが約 1.5 倍
 - B6 *Mpst* Tg は B6 *Mpst* non-Tg に比較して *Mpst* タンパクレベルが約 1.5 倍
- 精神疾患の病態はいろいろな階層レベルで考えられ、例えば
 - 神経と神経のつながり (神経回路)
 - 電気信号の伝達の問題 (シナプス、ミエリンによる軸索の絶縁状態)
 などがあるが、硫化水素は、より根底にあるエネルギーの問題に関係している。
- 硫化水素の問題は、これまでの研究に対する 2 つのアンチテーゼを含む：
 - (1) 精神疾患に関するこれまでの研究では、炎症反応に重点が置かれていたのに対し、その反対の生体反応である還元反応 (硫化水素産生の亢進を含む) も疾患にとって重要である可能性。
 - (2) これまでは硫化水素による必須かつ有用な生理作用に重点が置かれてきたのに対し、その産生が過剰になった場合の脳への影響。
- 今後：硫化水素産生酵素の阻害剤を開発すれば、一部の統合失調症の症状改善に有効となる可能性が考えられる。また、過硫化ストレス (サルファイドストレス) と命名した現象のより詳細なメカニズムを探求していくことって、さらなる創薬の切り口が見えてくる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ide M, Ohnishi T, Toyoshima M, Balan S, Maekawa M,..., &Yoshikawa T	4. 巻 11
2. 論文標題 Excess hydrogen sulfide and polysulfides production underlies a schizophrenia pathophysiology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 e10695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/emmm.201910695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川武男
2. 発表標題 マウスの系統差から探る統合失調症病理 - Genetics vs. Epigenetics -,
3. 学会等名 第255回つくばブレインサイエンス・セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木村 英雄 (Hideo Kimura) (30321889)	山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授 (25503)	
研究分担者	大西 哲生 (Tetsuo Ohnishi) (80373281)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・副チームリーダー (82401)	