

令和元年6月21日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15525

研究課題名(和文) Nrf2活性化によるカルボニルストレスの抑制と、その治療抵抗性統合失調症への応用

研究課題名(英文) Inhibition of carbonyl stress via Nrf2 activation and its application for the treatment-resistant schizophrenia

研究代表者

小池 伸 (Koike, Shin)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70751014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Nrf2とそれにより制御されているグルタチオン(GSH)のメチルグリオキサル(MG)濃度への影響を検討した。MGは強力な神経毒性を有するが、ヒト神経芽腫細胞SH-SY5YにNrf2活性化剤を処理後、MGを処理するとその毒性が軽減された。また、この保護メカニズムはGSH濃度上昇によるものであることが分かった。さらに、脳内でGSH濃度が減少している老齢マウスでは若齢マウスと比べてMG濃度が減少していることが分かった。老齢マウスの脳内ではMGの解毒のためにGSHが消費されている可能性がある。以上から、MGの解毒には細胞内GSH濃度の上昇が重要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症患者の一部にカルボニルストレスを呈する一群が見つかった。カルボニルストレスはメチルグリオキサル(MG)の蓄積により促進される。我々は統合失調症モデルマウスの脳内でMG濃度が上昇することを発見したことなどから、MGの除去が統合失調症の治療に繋がる可能性を見出している。従って、神経系の細胞株においてNrf2活性化剤がMG毒性に対して保護機能を発揮したことは重要な知見である。さらに、老化に伴って過剰に脳内に蓄積したMGの解毒のためにGSHが消費されている可能性を見出した。以上の知見は、カルボニルストレス性疾患に対してGSH濃度の制御を基軸とした新たな治療戦略確立の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：Methylglyoxal (MG) is a highly reactive α -dicarbonyl compound that exerts a potent cytotoxic effect on neuronal cells. We found that treatment with Nrf2 activators protected SH-SY5Y cells against MG induced cytotoxicity via activation of GSH synthesis. Furthermore, we first revealed that the MG concentration decreased in various regions of the aged mouse brain which also decreased intracellular GSH levels compared with young mouse. In aged mouse brain, excess MG may be detoxified by GSH. We indicated that the promotion of GSH synthesis by activation of Nrf2 is a key response to MG detoxification.

研究分野：分析化学

キーワード：Nrf2 カルボニルストレス 統合失調症 メチルグリオキサル グルタチオン 老化

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

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は代表的な精神疾患であるにも関わらず、その発症メカニズムには不明な点が多い。クロロプロマジンの発見以降、様々な D₂ 受容体遮断薬が開発され、統合失調症の予後はそれ以前と比べると良好になった。一方で、治療抵抗性の統合失調症患者は長期間の入院を余儀なくされ、発症メカニズムの解明と治療法の確立が望まれている。

統合失調症には多くの病態仮説が存在するが、最近、カルボニルストレスが高値を示す一群が同定され、カルボニルストレス性統合失調症として定義付けられた。カルボニルストレスとは AGEs が生体内に蓄積した状態である。カルボニルストレス性統合失調症患者は終末糖化産物 (AGEs) の一種であるペントシジンが血漿中で高値を示し、血清中のビタミン B₆ が低値を示す。カルボニルストレス性統合失調症はもともと東京都総合医学研究所の新井誠博士らによって同定されたが、重篤な統合失調症患者にグリオキサラーゼ 1 (GLO1) 遺伝子の変異を見出したことが、この一群の同定に繋がった。GLO1 はグリオキサラーゼおよびメチルグリオキサール (MG) と還元型グルタチオン (GSH) が結合して生成するヘミチオアセタールを基質とし、MG を D-乳酸へと解毒する。MG は反応性が極めて高い α -ジカルボニル化合物であり、タンパク質のリジン残基やアルギニン残基と容易に結合し、AGEs 構造体を形成する。タンパク質は AGEs 化されることにより機能異常をきたす。我々は、東京都医学総合研究所の新井誠先生にご提供いただいたカルボニルストレス性統合失調症モデルマウスの脳内において MG が過剰に産生され、AGEs が高度に蓄積していることを明らかにしている。従って、カルボニルストレス性統合失調症患者の脳内で MG が過剰な状態になっていることが考えられ、これが何らかの症状の発現に関与している可能性がある。

一方で、カルボニルストレスは酸化ストレスによって亢進することが知られている。生体内では転写因子 Nrf2 が酸化ストレス遺伝子群の発現を制御している。例えば、GSH はその合成酵素が Nrf2 の活性化によって発現上昇し、生体内のレベルが維持されている。我々はこれまでの研究で、MG が神経細胞に対して顕著な毒性を示すことを認めており、Nrf2 の活性化剤が、その毒性を軽減することを明らかにしている (Neurotoxicology 55, 2016)。前述した通り、Nrf2 によって合成が制御されている GSH は GLO1 を介した MG の代謝に深く関与している。このような背景のもと、Nrf2 活性化剤および生体内 GSH レベルとカルボニルストレスの関係性を明らかにすべく研究を行った。

2. 研究の目的

これまでの研究で Nrf2 活性化剤が神経細胞において MG 由来のカルボニルストレスを軽減することは明らかになったが、その詳細なメカニズムや、他の Nrf2 活性化剤のカルボニルストレスへの効果は分かっていない。そこで、Nrf2 活性化剤のカルボニルストレス性統合失調症治療への応用を実現するために、以下の内容に取り組んだ。

(1) MG 由来 AGEs 群の解析: MG の過剰な産生は AGEs 群の蓄積を誘導するが、神経細胞においてどの様な AGEs の蓄積が MG によって誘導されるかは不明瞭である。ヒト神経芽腫細胞由来の SH-SY5Y 細胞に MG を添加することにより、神経細胞内に蓄積する AGEs 群を検出する。

(2) マウスへの MG 腹腔内及び脳内投与によって蓄積する AGEs 群の検出: MG を腹腔内に投与すると脳内に MG が蓄積するという報告がある (J. Clin. Invest. 122, 2012)。しかし、脳内で MG が過剰になった場合の AGEs 群の解析は行われておらず不明な点が多い。そこで、マウスの腹腔内及び脳内に MG を投与したときにどの様な AGEs が蓄積するかを検討する。

(3) Nrf2 活性化剤に対する GLO1 の発現解析: MG の代謝酵素である GLO1 が Nrf2 によってその発現量が制御されているという報告がある。本検討では、Nrf2 活性化剤を SH-SY5Y 細胞に処理したときの GLO1 の発現量を調べる。

(4) MG 毒性に対する GSH の役割: Nrf2 活性化剤が MG 毒性に対して保護的に働くことは、これまでの研究で明らかになっているが、そのメカニズムは明らかでない。本検討では GSH に焦点を当てて、そのメカニズムを明らかにする。

(5) マウス脳内における MG の分布: MG が脳内で産生され一定量存在することは明らかになっているが、部位毎の存在量は分かっていない。そこで、マウス脳を分画し、それぞれにおける MG レベルを解析する。

(6) 脳内で GSH レベルが低下した老齢マウス脳における MG レベルの解析: MG は生体内で GLO1 によって代謝されるが、GLO1 は MG と GSH が結合したヘミチオアセタールを基質にする。従って MG の解毒には細胞内 GSH レベルが影響する。また老齢マウス脳内では GSH レベルが低下していることが知られているので、本検討では GSH レベルが低下した状態における MG レベルの解析を行う。

3. 研究の方法

(1) MG 由来 AGEs 群の解析: AGEs に対する各種抗体を用いて検討を行う。MG を SH-SY5Y 細胞に添加し、一定時間後に細胞を回収し、タンパク質を抽出後、ウェスタンブロット法で AGEs の検出を行う。

(2) マウスへの MG 腹腔内及び脳内投与によって蓄積する AGEs 群の検出: マウスの腹腔または脳内に MG を投与し、MG レベルを定量し、ウェスタンブロット法にて AGEs 群の検出を

行う。

(3) Nrf2 活性化剤に対する GLO1 の発現解析: Nrf2 活性化剤であるカルノシン酸及び CDDO-Im を SH-SY5Y 細胞に添加した際の GLO1 mRNA とタンパク質の発現量をそれぞれリアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法で解析する。

(4) MG 毒性に対する GSH の役割: MG の解毒においては GLO1 が主要な酵素であるが、これは GSH 依存的に働くものと思われる。SH-SY5Y 細胞に MG を処理すると強力な毒性が発現するが、Buthionine Sulfoximine (BSO) を前処理した場合の毒性評価と、Nrf2 活性化剤の細胞保護効果が BSO によってどのような影響を受けるか検討する。

(5) マウス脳内における MG の分布: マウス脳を前頭皮質、海馬、線条体、側坐核、脳幹、小脳の 6 部位に分画し、独自に開発した蛍光検出による液体クロマトグラフィー (HPLC-FL) によって MG レベルを定量する。

(6) 脳内で GSH レベルが低下した老齢マウス脳における MG レベルの解析: 約 20 ヶ月齢の C57BL/6J マウスと 8 週齢の若齢マウスの脳内における GSH レベルを HPLC-FL 法で解析する。さらに、マウス脳を 6 部位に分画後、それぞれの部位における MG レベルを HPLC-FL 法で定量し、老齢マウスと若齢マウスの比較を行う。

4. 研究成果

(1) MG 由来 AGEs 群の解析: 生体内に AGEs が蓄積した状態はカルボニルストレスと呼ばれ、末梢、中枢問わず多様な疾患への関与が報告されている。MG 由来の AGEs は MG-H1 やアルグピリミジン、カルボキシエチルリジン (CEL) などが知られているが、神経細胞において明確にそれを示したデータは乏しい。そこで、ヒト神経芽腫細胞株である SH-SY5Y 細胞に MG を添加し、タンパク質を抽出後、抗 MG-H1、CEL、ペントシジン、カルボキシメチルリジン抗体を用いてウェスタンブロット法にて各種 AGEs 群を検出したところ、MG-H1 と CEL が MG の処理時間及び処理濃度依存的に蓄積することが分かった。さらに Nrf2 活性化剤であるカルノシン酸または CDDO-Im を前処理しておくこと、MG-H1 及び CEL の蓄積が軽減された。また、MG は神経細胞に対する強力な毒性を有するが、この毒性による細胞死も Nrf2 活性化剤の前処理によって軽減されることが分かった。

(2) マウスへの MG 腹腔内及び脳内投与によって蓄積する AGEs 群の検出: マウスの腹腔内に MG を投与すると僅かではあるが脳内の MG 濃度が上昇し、MG-H1 化タンパク質の蓄積が僅かに認められた。一方で、脳内に MG を投与すると、MG の顕著な蓄積と、MG-H1 化タンパク質及び CEL 化タンパク質の顕著な蓄積を認めた。(1) の結果と合わせると、脳内においては、過剰量の MG 由来で MG-H1 や CEL 化タンパク質が顕著に蓄積することが分かった。

(3) Nrf2 活性化剤に対する GLO1 の発現解析: Paul J. Thornalley らによって、GLO1 は Nrf2 によって発現が制御されていると報告された (Biochem. J. 443(1), 2012)。そこで、我々もカルノシン酸及び CDDO-Im を SH-SY5Y 細胞に添加し、リアルタイム PCR 法にて GLO1 mRNA の発現量を解析した。その結果、Nrf2 によって発現量が制御されていることが知られている、ヘムオキシゲナーゼ 1 やグルタチオン合成に深く関与している GCLm や GCLc mRNA の発現量はカルノシン酸と CDDO-Im の処理によって増大したが、GLO1 の発現量は Nrf2 活性化剤の有無によらず一定であった。

(4) MG 毒性に対する GSH の役割: GSH は細胞内に mM オーダーで存在することが知られており、細胞内における最大の抗酸化物質である。カルボニルストレスに対しても MG とヘミチオアセタール体を形成することから、重要な役割を担っていると予想される。SH-SY5Y 細胞においても BSO を処理しておくこと、Nrf2 活性化剤による GSH レベルの上昇が抑制されるとともに、Nrf2 活性化剤の MG 由来の細胞死からの保護効果も消去されることが分かった。このことから、Nrf2 活性化剤の MG 毒性に対する保護効果は、Nrf2 の活性化に伴う GSH 合成の促進によるものであることが明らかになった。

(5) マウス脳内における MG の分布: 神経細胞において MG は AGEs の形成を促進することが分かったが、MG の脳内における分布は明らかではない。本研究では 6 部位にマウス脳を分画し MG レベルを測定した。その結果、他の部位に比べて MG レベルは脳幹で顕著に高く、前頭皮質では低値を示した。また、MG の分布は、その代表的な代謝酵素である GLO1 の発現量と正の相関性を示した。

(6) 脳内で GSH レベルが低下した老齢マウス脳における MG レベルの解析: これまでの検討で、Nrf2 を介した MG の解毒には GSH が重要であることが分かった。老齢マウスの脳内の GSH レベルは若齢マウスと比べると 2 割程度減少していた。また、老齢マウスの脳を 6 部位に分画し、それぞれの MG レベルを測定すると、各部位で顕著な MG レベルの減少が認められた。一方で、この減少は肝臓では認められなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. 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 Res Bull. 144, 164-170, 2019. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2018.11.025.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 小池 伸 他 5 名、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
2. 木船陽介、鹿山 将、小池 伸、他 6 名、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
3. 小池 伸 他 3 名、老齢マウス脳内におけるメチルグリオキサール濃度の測定:第 28 回日本臨床精神神経薬理学会・第 48 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2018

〔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：

ローマ字氏名：

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。