

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08024

研究課題名（和文）統合失調症における新規バイオマーカー研究

研究課題名（英文）Novel biomarker research for schizophrenia

研究代表者

野本 宗孝（NOMOTO, Munetaka）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：80457861

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトリンパ球中のCRMP2とリン酸化CRMP2のウェスタンブロットングによる検出について検討したところ、可能であることが判明した。対象の統合失調症患者群とコントロール群におけるそれぞれの発現量を測定した結果、統合失調症群ではコントロール群と比較して、若年者においてCRMP2のリン酸化率が低く、高齢者ではその反対にコントロール群よりもCRMP2リン酸化率が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症群とコントロール群において、ヒトリンパ球中でのCRMP2リン酸化率に違いがあることを見出した。CRMP2のリン酸化は脳神経の可塑性と関連していることが知られており、疾患群と健常者群の違いは脳可塑性の違いを反映している可能性がある。本研究における結果はヒト生体検体におけるタンパク質レベルでの翻訳後修飾の変化を捉えた点で貴重であり、タンパク質の翻訳後修飾が統合失調症の発症機構に関わっている可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：We investigated the detection of CRMP2 and phosphorylated CRMP2 in human lymphocytes by Western blotting and found that it is possible. The expression levels of CRMP2 and phosphorylated CRMP2 in schizophrenia patients and controls were measured, and the results showed that the phosphorylation rate of CRMP2 was lower in younger patients with schizophrenia than in controls, and conversely, the phosphorylation rate of CRMP2 was higher in elderly patients than in controls.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 CRMP2 リン酸化CRMP2 軸索ガイダンス分子 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は急性期には幻覚・妄想や解体した会話を特徴とし、慢性期には人格荒廃に至ることもある進行性の精神疾患である。19世紀末にクレペリンが“早発性痴呆”とした疾患を20世紀初頭にプロイラーが“統合失調症群”という概念にまでまとめあげた。今日においてもその疾患概念の骨子は維持されている。1980年にアメリカ精神医学会が精神医学研究の発展を目的にDSM-Ⅱを発刊した以後からは、症状を基にした操作的診断が主流をなすようになった。そのことは統合失調症の生物学的病態解明のための医学研究を大いに推し進めたが、いまだ統合失調症に共通した生物学的なエビデンスを見出すには至っていない。精神医学の世界において統合失調症に共通した生物学的要因を見出すことは大きな学術的「問い」となっている。

(1)本研究の着想に至った経緯と準備状況

応募者が所属した横浜市立大学分子薬理神経生物学教室では神経細胞の軸索ガイダンス分子であるCRMP(Collapsin response mediator protein)に着目し、その機能解明を進めてきた。その結果、CRMPの発現異常により神経走行が変化し、脳内の神経ネットワークに異常をきたすことがこれまでに分かっている。特にCRMPのノックアウトマウスでは統合失調症様の行動異常が認められることも報告した(Yamashita et.al. 2013)(Nakamura et.al. 2016)。また多くの基礎医学研究においてCRMPやそのリン酸化が統合失調症死後脳検体で有意な変動を示すことが明らかにされている(Davalieva et al.2016)(Hensley K et al.2011)(Martins de Souza D et al.2010)(Beasley CL et al.2006)(Johnston-Wilson NL et al.2000)。

統合失調症をはじめとした精神神経疾患では生体試料として脳組織を用いることができない。そのため血液や脳脊髄液、尿、唾液、便、毛髪(毛母細胞)、皮膚細胞などが生体試料として用いられる。CRMPは細胞内タンパク質であるため、その測定には細胞成分が必要であるが、比較的短期間でのターンオーバーが期待できる細胞試料が望ましい。その条件のもとでは血液が検体としてもっとも適していると考えられる。さらにその中でも細胞のポピュレーションをそろえやすい試料としてリンパ球を選択した。

以上からCRMPの発現異常をヒトリンパ球検体で測ることができれば、統合失調症のバイオマーカーとなり得るのではないかと着想するに至った。

(2)関連する国内外の研究動向と本研究の位置づけ

リンパ球中のCRMPと統合失調症の関係については既にBaderらが2012年に発表しており、患者群と健常者群でCRMPの発現に有意な違いが認められている。その論文の中ではCRMPのサブタイプのひとつであるCRMP1を対象としており、また検体として用いたリンパ球はEpstein-Barr virusによって不死化した株を用いている。

本研究では主にCRMP2を測定対象としており、さらにリン酸化変化も確認する。また使用するリンパ球は不死化過程を経ない検体である点で、先行研究と差別化される。

研究分担者である五嶋らは脳卒中後のリハビリテーション効果を大きく促進する新薬の候補化合物を特定し、その化合物の標的がCRMP2であることを同定した(Abe et al.2018)。このことはCRMP2が脳神経細胞の可塑性を規定している分子の一つであることを示唆している。

統合失調症のバイオマーカー研究は精力的におこなわれているにもかかわらず、未だ臨床応用に足る分子は見い出されていない。死後脳研究においてCRMPと統合失調症の関連が強く示唆されていることを考慮すれば、患者の脳神経細胞内ではダイナミックにCRMPが変動している可能性は高い。それを生体試料中で測定できるようになれば、統合失調症の診断につながったり、病勢を定量化できるかもしれない。

CRMP研究においては五嶋が主宰する横浜市立大学医学部分子薬理神経生物学教室は長年の実績があり、特異性の高い抗CRMP抗体を有しているため、大きなアドバンテージがある。本研究によって臨床的にも有用な統合失調症バイオマーカー発見へとつなげることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では統合失調症のバイオマーカーを開発し、臨床応用を目指すことを目的とする。我々横浜市立大学精神医学教室と分子薬理神経生物学教室はこれまで共同で統合失調症のバイオマーカーとして CRMP が有用であるかどうかを探索してきている。神経細胞の軸索ガイダンス分子が統合失調症の要因であるかどうかは未だ明らかでないが、CRMP ノックアウトマウスが統合失調症様の行動様式をもつことを、行動解析により明らかにしてきている。また我々の持つ抗 CRMP 抗体は特異性に優れており、さらにリン酸化 CRMP 抗体も作成済みである。これらの抗体を用いて CRMP の総量だけでなくリン酸化した CRMP も測定できるため、タンパク質の翻訳後修飾が果たす役割の解明に手掛かりを与えられる可能性がある。上記の点において独自性と創造性を持つ。

本研究で何をどのように、どこまで明らかにしようとするのか
我々はこれまでにヒト培養リンパ球検体からウェスタンブロットティングによって CRMP を測定することに成功している。本研究ではその内容を発展させ、培養を経ないリンパ球検体での CRMP 測定方法を確立する。
その上で臨床検体を用いて統合失調症患者と健常群で CRMP 発現量を測定し、開発した測定方法が統合失調症のバイオマーカーとして利用が可能であるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MACS テクノロジーを利用したヒトリンパ球精製と CRMP 測定

MACS テクノロジーは Miltenyi Biotec 社が開発した細胞分離法である。細胞の表面抗原を標的として磁気ビーズを抗原抗体反応により接着させ、磁気カラムに通すことで目的の細胞を分離する。このシステムを用いて、採血後に単核球まで分離した検体からリンパ球を特異的に選別することが可能になり、検体ごとの細胞型を一致させることができる。

我々はこれまでに培養リンパ球から CRMP とリン酸化 CRMP をウェスタンブロットティングにより検出する高感度検出系を開発している。この検出系を用いて MACS テクノロジーによって得られたリンパ球中の CRMP とリン酸化 CRMP を測定する。

(2) 血液の採取、臨床背景調査

研究倫理委員会において承認を受けたうえで、統合失調症患者と健常ボランティアから血液検体の提供をお願いし、同意を得たうえで採取を行う。この際、血液検体については単核球分離用採血管 (BD バキュテイナ CPT) を用いて採取する。

加えて臨床背景調査のため、面接や神経心理学的検査を施行する。また診療録からも情報を得る。必要であれば患者の家族や支援者からも情報を収集する。

有意差の解析を行うことを考慮して、目標症例数は患者群 150 例、健常群 150 例とする。

(3) リンパ球中の CRMP/リン酸化 CRMP 測定

採取した血液検体において CRMP とリン酸化 CRMP の測定を行う。血液検体については遠心分離・細胞選別してリンパ球成分のみを精製し、ウェスタンブロットティングを施行。CRMP 発現量を専用ソフトウェアにより定量する。

測定した結果を定量化し、背景情報と合わせて統計学的解析を行う。

(4) 測定結果の統計学的解析

CRMP 発現量の結果と患者の臨床背景とを照合し、CRMP とリン酸化 CRMP の値と統合失調症の病的進行度合いとの間に有意な差が認められるかどうか統計学的な解析を行う。

統合失調症の病態との関連を検証し、バイオマーカーとしての応用可能性を検討する。

4. 研究成果

MACS テクノロジーによるリンパ球の特異的選別を試みたものの、細胞のポピュレーションを揃えることが難しく、断念した。そのため細胞のポピュレーションを揃える方法として、2日間単核球を培養し、接着性の細胞と非接着性の細胞とに分離することで揃える方法をとった(図1)。

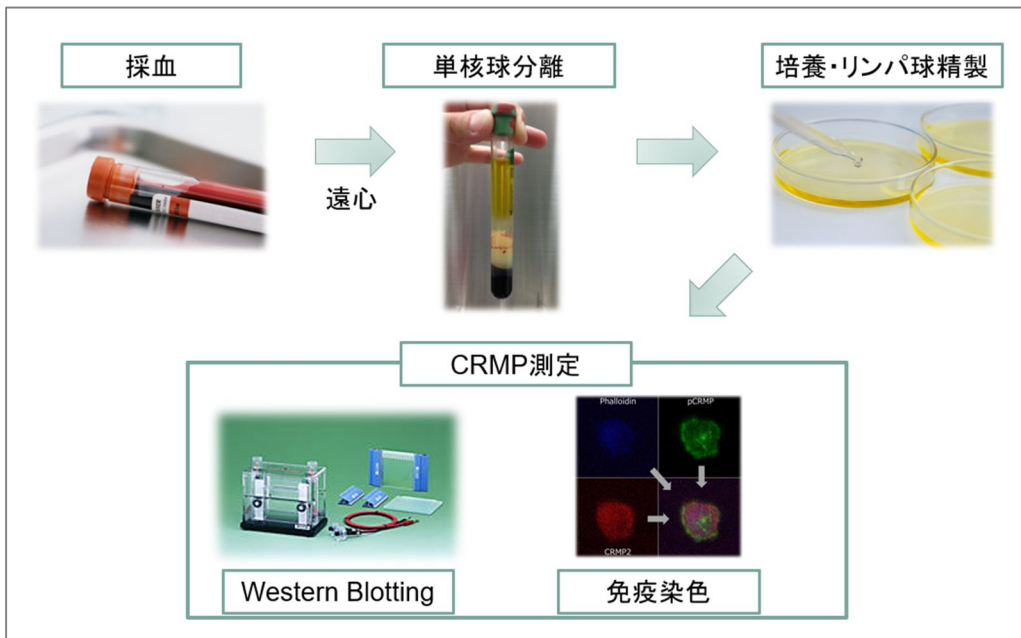


図1. ヒトリンパ球中のCRMP測定手順

リンパ球分離を容易にするため、専用の採血管を用いて採血する。遠心機にかけて末梢血単核球に分離したら、それを2日間培養する。リンパ球の含まれる浮遊細胞のみを回収して検体として用いた。ウェスタンブロットングにより、CRMP2とリン酸化CRMP2を測定した。

分子薬理神経生物学教室が作成した抗体について、抗CRMP2抗体はCRMP2を補足し、検出できることが明らかとなった。また抗リン酸化CRMP抗体はCRMP2の522番目のセリン残基のリン酸化を認識し、検出できることが明らかとなった。この抗体特異性により、CRMP2の522番目のセリン残基におけるリン酸化について、その発現量を測定することが可能となった(図2)。

抗体特異性の確認

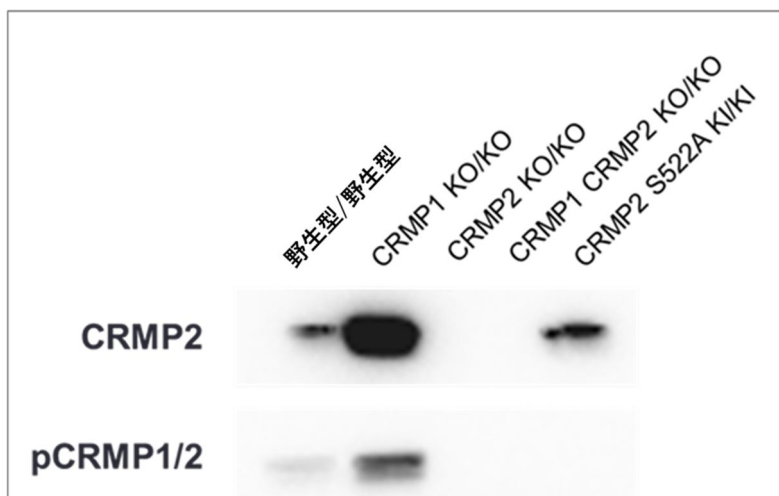
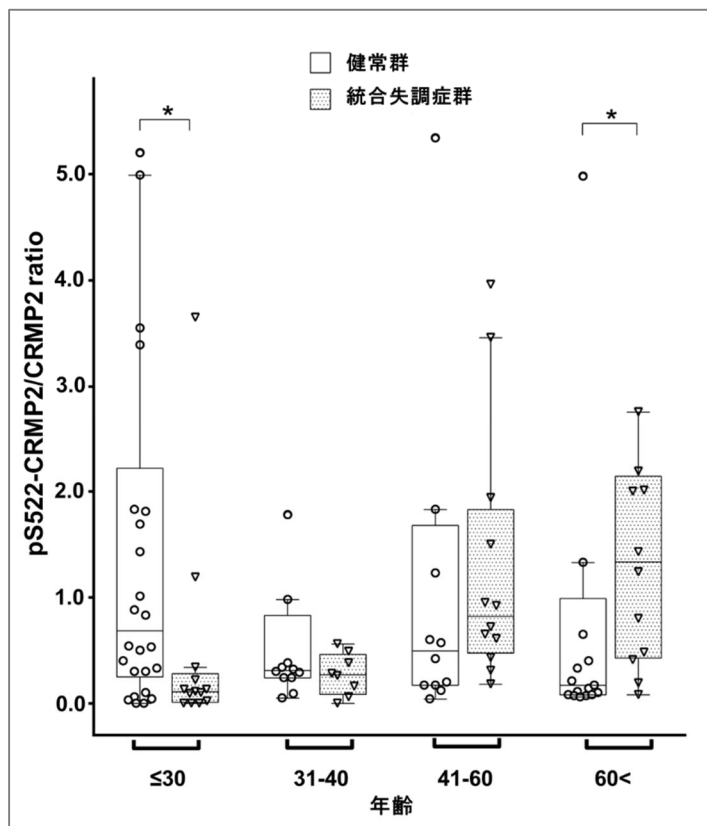


図2. 抗CRMP2抗体と抗リン酸化CRMP抗体の特異性確認試験の結果

(Nomoto et al., 2021 より引用)

ヒトリンパ球中の CRMP2 とリン酸化 CRMP2 のウェスタンブロッティングによる検出について検討したところ、可能であることが判明した。対象の統合失調症患者群とコントロール群におけるそれぞれの発現量を測定した結果、41 歳以下の統合失調症群ではコントロール群と比較して CRMP2 のリン酸化率が低かった(図 3)。共同研究者である Konopaske らは統合失調症患者の死後脳研究において、41 歳以下の疾患群で同様の傾向があることを確かめている。

A



B

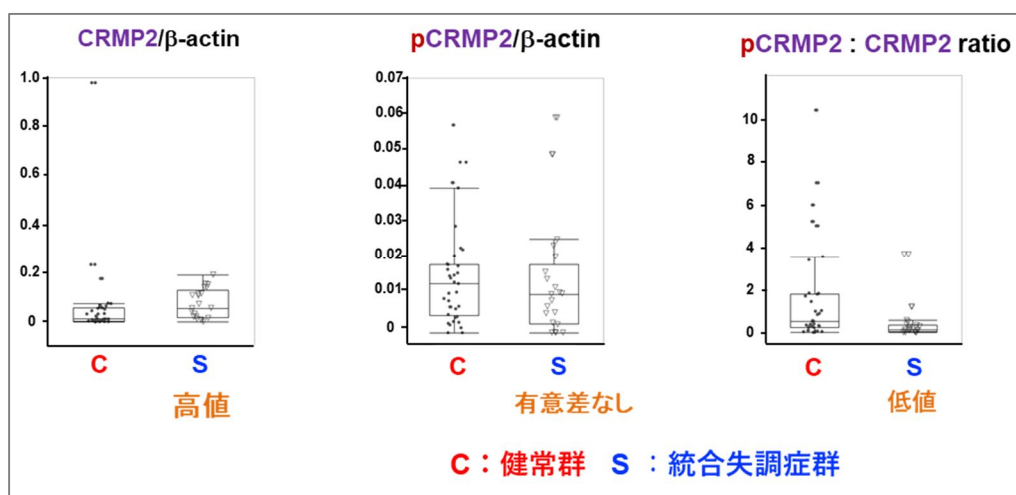


図 3 . 健常群と統合失調症群における CRMP2 リン酸化率の違い

(Nomoto et al.,2021 より引用)

考察

統合失調症群とコントロール群において、ヒトリンパ球中での CRMP2 リン酸化率に違いがあることを見出した。これは患者死後脳での結果と同様の傾向を示しており、若い統合失調症患者においてバイオマーカーとなり得る可能性がある。また本研究における結果はヒト生体検体におけるタンパク質レベルでの翻訳後修飾の変化を捉えた点で貴重であり、タンパク質の翻訳後修飾が統合失調症の発症機構に関わっている可能性を示唆している。

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 Nomoto Munetaka, Konopaske Glenn T., Yamashita Naoya, Hirayasu Yoshio, Snyder Evan Y., Goshima Yoshio et al.	4. 巻 118
2. 論文標題 Clinical evidence that a dysregulated master neural network modulator may aid in diagnosing schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2100032118	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五嶋 良郎, 野本 宗孝, 山下 直也, 實木 葵[高橋], 中村 治子, 槇原 弘子, 大庭 真梨, 中村 史雄, 平安 良雄
2. 発表標題 統合失調症患者由来血液検体におけるCRMP2およびそのリン酸化修飾レベルの変化
3. 学会等名 第 40 回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 統合失調症バイオマーカーCRMP2	発明者 五嶋良郎、野本宗孝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2836	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 統合失調症バイオマーカーCRMP2	発明者 五嶋良郎、野本宗孝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2836	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

統合失調症のバイオマーカーの発見 -発症初期の診断に有効-
https://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/news/202107_goshima_pnas.html

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	五嶋 良郎 (Goshima Yoshio) (00153750)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------