

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390315

研究課題名（和文）

質量顕微鏡による統合失調症のドーパミン・グルタミン酸・ギャバ系の解析

研究課題名（英文）

The schizophrenia study about systems of dopamine, glutamate, and GABA by imaging mass spectrometry

研究代表者

丹羽 真一 (NIWA SHIN-ICHI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30110703

研究成果の概要（和文）：

精神疾患の脳研究は、動物を用いた脳研究では限界がある。本研究では精神疾患死後脳シグマのヒト脳サンプルを用いて、質量顕微鏡という最先端技術により統合失調症死後脳の解析を実施した。ドーパミン・グルタミン酸・ギャバ系が統合失調症の病因に重要で、神経伝達の基盤となるのは神経細胞（ニューロン）同士のネットワークであると言われているが、本研究の結果、統合失調症患者死後脳におけるニューロンネットワーク解明に重要な神経細胞膜成分の二次元分布を可視化することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

There are limits to brain research on psychiatric disorders using animals. In the present study, we analyzed postmortem brain samples of schizophrenia patients obtained from the Postmortem Brain Bank of Fukushima using a cutting-edge technology called mass microscopy. While dopamine, glutamic acid, and GABA are thought to play key roles in the etiology of schizophrenia, and neural networks are considered to form the basis of neurotransmission, in the present study, we succeeded in visualizing the 2-dimensional distribution of neuronal membrane components that are important for elucidating neural networks in the postmortem brains of schizophrenia patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	9,000,000	2,700,000	11,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・内科系臨床医学 細目：精神神経科学

キーワード：(1)統合失調症 (2)死後脳 (3)質量顕微鏡 (4)ドパミン (5)グルタミン酸 (6)GABA (7)プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の生物学的研究の殆んどが、画像研究や動物実験などの間接的検討であり、得られた知見を確定的なものにするためには、死後脳サンプルを直接検討することが不可欠である。欧米では1960年代から死後脳バンクの取り組みが行われ多くのサンプルを集積してきたが、本邦では大幅に立ち遅れ、優れた研究もサンプルを欧米に依存するという状況が続いてきた。研究代表者はこれまで一貫して統合失調症の生物学的研究に従事し、統合失調症病態理解には死後脳組織の解析が不可欠と考え、日本初の系統的疾患死後脳バンクを確立した。本研究は、欧米を中心とするバンクのサンプルに依存してきた我が国の疾患死後脳研究の現状を打開し、質量顕微鏡という本邦発の革新的新手法を用いて包括的に検討するものである。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで統合失調症の生物学的研究に従事する中で、その病態理解には死後脳組織の解析が不可欠と考え、日本初の系統的疾患死後脳バンクを確立した(國井ら 分子精神医学 2006、松本ら 精神医学 2005、丹羽ら 精神神経学雑誌 2004、丹羽ら、精神神経学雑誌 2002)。これまで他施設から供与を受けた死後脳サンプルを用いて幾つかの研究(Iwazaki, Niwaら Neurosci Lett 2004; Matsumotoら Neurosci Lett 2005; Ito, Niwaら Neurosci Lett 2005)を行い死後脳研究の方法論を習得してきた。

更にその経験を踏まえて、これまで多くの研究で明らかになってきた統合失調症の有力な病因仮説に基づき、ドパミン系・グルタミン酸系・GABA系に関わる標的分子について、当バンクの死後脳組織を用いて免疫組織化学的手法を用いて検証しようと試みてきた。DARPP-32とカルシニューリン(CN)を中心とするサーキットは、ドパミン系とグルタミン酸系の両方を調節する主要分子として注目されている。我々はDARPP-32とCNについての免疫組織化学的検討の結果、統合失調症前頭前皮質でDARPP-32の皮質の広い領域にわたる陽性ニューロン密度の低下とアストロサイトにおけるDARPP-32の発現、CNの第VI層における陽性錐体ニューロン密度の低下を明らかにした(2006、2007年日本生物学的精神医学会にて発表)。GABA系については、多くの死後脳研究で、統合失調症におけ

るGABA作動神経細胞の減少やGABA受容体の障害などが報告されている。GABA伝達系のうち、我々はGABAA受容体 $\alpha 3$ サブユニットを検索する予定であり、免疫組織化学的条件検討は終了している。また、萌芽研究「統合失調症脳における神経興奮のドパミン・グルタミン酸による拮抗的調節機構の異常」(平成19年度～平成20年度 研究代表：丹羽真一)の助成を受けており、現在までDARPP-32抗体とCN抗体の蛍光二重染色によるDARPP-32とCNの共存率測定の実験設定を完了している。しかし、免疫組織化学法やin situ hybridizationなど組織形態を保ちながら解析する手法は、抗体やプローブを介した間接的な検出法であり、一サンプルから多くの物質についての解析することが困難であるため、結果として限りある貴重なサンプルを多く消費するという欠点があった。

我々は、2006年10月22日に福島市において科学研究費(研究代表者：池本桂子)による「第1回ブレインバンクシンポジウム」を開催し(Ikemotoら Japan Psychiatry and Clinical Neurosciences, 2007)、その中で新たな手法として紹介された、岡崎生理学研究所の瀬藤光利らの質量顕微鏡法(Setouら, ProcICALC 2006; Shimma and Setou JMSSJ 2007,)を用いることにより、前述の問題点を解決できると考えた。このような経緯のもとで、本研究では統合失調症死後脳における異常を解明するために質量顕微鏡を用いて、特にドパミン系・グルタミン酸系・GABA系に関連する分子について検討することである。

3. 研究の方法

本研究では、これまで免疫組織化学的手法で検索してきた統合失調症におけるDARPP32-CNサーキットの異常仮説を、有力な統合失調症病因仮説であるドパミン仮説・グルタミン酸仮説・GABA仮説と融合して、関連分子で構成されるサーキットの異常仮説として拡張し、質量顕微鏡という強力なツールを用いてその詳細を明らかにするものである。

統合失調症群と健常対照群の死後脳パラフィン切片を質量顕微鏡を用いて比較検討する。同定できた有機分子のうちから、DARPP32、CN、GABAAを中心にドパミン関連分子(各ドパミン受容体、TH・AADCなどの合成酵素、COMT・MAOなどの代謝酵素、トランスポーターなど)、グルタミン酸関連分子

(NMDA・AMPA・KA・代謝型など各種グルタミン酸受容体、GAT、GADなど)、GABA関連分子(GABA_A・GABA_B受容体各サブユニット、GADなど)を抽出する。それぞれの平均定量値を比較して、統合失調症における脳領域ごとに関連分子の増減を含めた経路図を想定する。更に得られた統合失調症脳については、病型・罹病期間・抗精神病薬の服薬量・死後時間などの臨床プロフィールとの相関関係を求め、各分子と臨床データとの関係を同定する。

4. 研究成果

DARPP32-CN サークットの異常仮説を、ドパミン仮説・グルタミン酸仮説・GABA 仮説と融合して、関連分子で構成されるサーキットの異常仮説を質量顕微鏡という強力なツールを用いてその詳細を明らかにするために、統合失調症患者死後脳におけるニューロンネットワーク解明に重要な神経細胞膜成分の二次元分布を可視化することに成功した。質量顕微鏡で検出したスペクトルの有機分子を同定していくためには、まず最初にイオン化されやすいフォスファチジルコリンの同定を済ませていく必要がある。このリン脂質は、神経細胞膜の中心的な構成成分であるため、DARPP32-CN サークットから、各ドパミン関連分子を同定していく作業の前提として重要な部分である。各脳領域別に検出されてくる候補分子を確認した結果、各脂肪酸鎖別の各種リン脂質の分布を統合失調症群と健常対照群とに分けて二次元可視化の上で同定できた。各同定分子は Medline 収載の Analytical and Bioanalytical Chemistry 誌上で報告した (Matsumoto ら, Anal Bioanal Chem 2011)。この方法論については、第 32 回日本生物学的精神医学会で報告した (Matsumoto ら 2010)。また、臨床プロフィールとの関係では福島県精神医学会で報告した (Matsumoto ら 2011)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

松本純弥、杉浦悠毅、由木大、早坂孝弘、井上菜穂子、財満信弘、國井泰人、和田明、楊巧会、西浦継介、赤津裕康、堀映、橋詰良夫、山本孝之、池本桂子、瀬藤光利、丹羽真二、Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry、査読有、2011 Jun;400(7):1933-43. Epub 2011 Apr 2.

〔学会発表〕(計 2 件)

①松本純弥、國井泰人、和田明、楊巧会、西浦継介、池本桂子、杉浦悠毅、井上菜穂子、早坂孝弘、財満信弘、瀬藤光利、丹羽真一、質量顕微鏡法による統合失調症死後脳解析、第 32 回日本生物学的精神医学会、平成 22 年 10 月 9 日、福岡県北九州市小倉

②松本純弥、國井泰人、和田明、楊巧会、西浦継介、池本桂子、杉浦悠毅、井上菜穂子、早坂孝弘、財満信弘、瀬藤光利、丹羽真一、死後脳を用いて脂質プロフィール解析を実施した統合失調症の一例、第22回福島県精神医学会、2011年2月20日、福島県福島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 真一 (NIWA SHIN-ICHI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：30110703