

平成 28 年 9 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861022

研究課題名(和文)統合失調症における脳脂質代謝の視覚的網羅解析

研究課題名(英文)Visualization of brain lipidomics in Schizophrenia.

研究代表者

松本 純弥 (MATSUMOTO, Junya)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10635535

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)：統合失調症を罹患していた方の死後脳において、脂質代謝に関する解析を実施した。蛋白質同時解析では、脂質代謝に関わる酵素群など、重要なタンパク質について、先端技術を用いて死後脳組織を解析した。さらに病態の鍵となると予想される脂質分子については、精密解析の結果に基づいて、質量顕微鏡データを再検討し、詳細に解析した。

研究成果の概要(英文)：Brains from patient with schizophrenia were investigated about lipid metabolism. In the protein simultaneous analysis, important proteins, such as enzymes which are related to lipid metabolism, were studied. Furthermore the key lipid molecule was analyzed by using the imaging mass spectrometry based on the result of accurate analysis.

研究分野：神経精神医学

キーワード：統合失調症 脳 脂質

1. 研究開始当初の背景

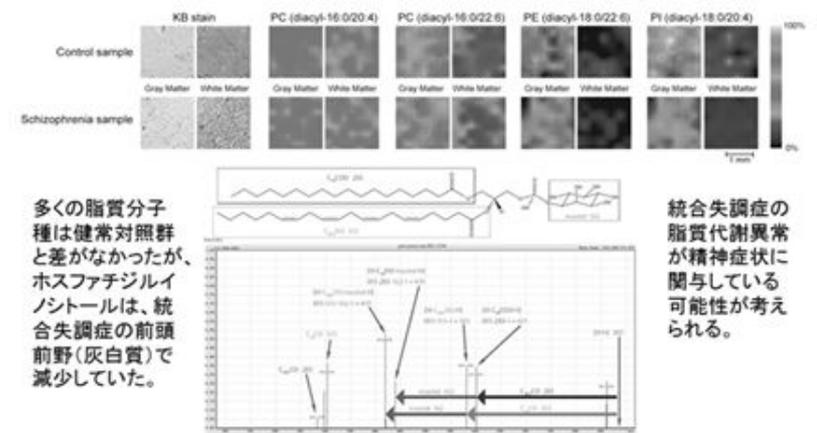
統合失調症の病因解明の努力は遺伝子関連研究や精神薬理学的研究でも困難な状況にある。各疾患集積家系で見出された候補遺伝子を大規模に再検討しても再現性が乏しく (Harrison et al., 2005)、大規模マイクロアレイ解析では報告ごとに異なるパターンの遺伝子増減を示している (Iwamoto et al., 2006)。精神薬理学的研究では、統合失調症の幻覚妄想に効果がある薬剤がドパミン受容体遮断薬であり、5-HT、GABA、nAchR、glutamate などの神経伝達物質も検討されているものの実用化の目は立っておらず、神経伝達以外の観点からの創薬は切望されているところである。そのため、従来主流となってきた統合失調症研究とは異なるアプローチも求められている。そこで、研究代表者は新たなアプローチとして統合失調症の脂質代謝に着目した。脂質は細胞膜の構成成分であり、軸索の伸長には細胞膜脂質の合成も不可欠であるなど、神経組織の構造維持に脂質代謝が重要であることは明白で、その上多くの重要な細胞内シグナル分子やケミカルメディエータの原料にもなるので、脂質代謝が脳内で重要な機能を担っている。従来の生物学的精神医学研究では DNA や RNA の遺伝子解析やタンパク質解析が主流であったため、脂質の解析については知見が十分ではない。統合失調症の末梢血液サンプルで不飽和脂肪酸が減少しているという報告 (Reddy et al., 2004) や統合失調症群への不飽和脂肪酸投与が統合失調症の精神症状を緩和するという報告 (Peet et al., 2002) などから統合失調症の脂質代謝異常は支持されておりその分子病態基盤を解明する必要性に迫られている。末梢血液サンプルなどではなく直接病気の現場である脳を調べるには死後脳を取り扱うしかないが、これまでの統合失調症の脂質異常に関する死後脳研究は方法論が限られていた。近年、脂質解析手法として質量分析法を応用した質量顕微鏡法が開発され、これまでに代表者は統合失調症死後脳組織の解析に応用し (Matsumoto et al., 2011)、さらに脂質異常を見出している。本研究ではこの結果を踏まえて、統合失調症の

脂質代謝病態の全体像を把握することを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的はこれまであまり注目されていなかった脳内における脂質の種類と分布と代謝の観点から統合失調症の分子病態を解明することである。脳の主要構成成分は脂質であるうえ軸索の伸長には細胞膜脂質の合成も不可欠であるなど神経組織の機能維持に脂質動態が重要であることは明白であり統合失調症の分子病態解明には脂質代謝の解析が急務である。ところが従来の病態解明アプローチは神経伝達物質や DNA 等の核酸の解析であって脂質解析は軽んじられてきた。本研究では近年利用可能になった質量顕微鏡装置や、最新技術のタンパク質多項目同時測定法研究手法で生前の臨床情報が整った日本の精神疾患死後脳を解析することで世界に先駆けて統合失調症の脂質動態解明を目指すこととした。これまでの解析から、多くの脂質分子種では統合失調症群と健常群で差が見られないものの、ホスファチジルイノシトールの一部については統合失調症群の前頭前野皮質において分布量が減っていることを見出した。ホスファチジルイノシトールはアクチン細胞骨格の調節に影響しており、神経組織の中ではスパイン形成及びシナプスの形成に大きく寄与している可能性が考えられる。この結果を手掛かりに、その周辺代謝経路を調べることにした。統合失調症に関しては、脳組織の mRNA 発現レベルでの網羅的解析は幾つかおこなわれているが、蛋白質レベルでの発現解析はわずかである。遺伝子の発現量は蛋白質の発現量と乖離があること、また翻訳後修飾を含めた蛋白質発現解析は遺伝子発現解析よりもより機能を反映していることから、プロテオーム的解析は重要であるが、その研究で使用された死後脳は日本人のものではない。病理解剖で診断がつかない統合失調症においては、生前の臨床診断の信頼性が重要であり、違法薬物による依存症の併存も多く、異常死を取り扱う監察院からの死後脳集積課程も含む欧米のブレインバンクではサンプルの信頼性に

疑問が残る。申請者らは1997年より本邦で初めてとなる精神疾患死後脳バンクを運営しており、現在40例以上の精神疾患死後脳組織が保存されている。諸外国のブレインバンクとの比較では、申請者らは生前登録に基づくサンプル集積を重視しており生前の臨床情報を完備している点で質の高い研究が可能である。また、



研究手法については、従来の蛋白質二次元電気泳動に基づく手法でプロテオーム的解析を行う上ではサンプル量を多く必要とし、実験には習熟を要し、さらに多検体間で蛋白質の発現量を比較するのに必須である蛋白質定量が難しいといった問題がある。本研究ではマルチプレックス法を用いることでこれらの問題を解決する。また質量顕微鏡法も用いることにより、組織学的情報を残したまま、組織切片上の物質を解析・同定することが可能となる。これは従来の手法では実現が不可能なものである。

3. 研究の方法

これまでに代表者は統合失調症死後脳組織の解析に応用し (Matsumoto et al., 2011) 脂質異常を見出してきた。本研究ではこの結果を踏まえて、統合失調症の脂質代謝病態の全体像を把握していく。これまでの解析で判明している脂質異常に基づいて、その周辺代謝経路を調べる。統合失調症死後脳の凍結脳サンプルを用いて、マルチプレックス法をはじめとした解析により脂質代謝酵素などの重要なセカンドメッセンジャー経路を測定する。それらの酵素、蛋白質の代謝関連脂質と、質量顕微鏡法、質量分析法の結果との関連を解析していく。これらを通して脂質代謝経路の性状を可視化していく。凍結保存組織を生理的緩衝液にホモジェナイズし、マルチプレックス法で蛋白質濃度を定量する。マルチプレックス法には Luminex 200 (メルクミリポア社) を用いる。測定対象の蛋白質は、現時点では予備的解析の結果から、ホスファチジルイノシトールの異常がおきている可能性が高いので、その代謝経路から、いくつかの代謝酵素を対象とする。標的蛋白質に特異的な抗体を結合した蛍光標識ビーズを液相でサンプルの懸濁液に反応させ更にサンドイッチ法にてビーズに結合した標的蛋白質を定量的に蛍光標識し、個々のビーズをフローメトリーを用いて検出する。マルチプレックス法では困難なタンパク質の場合には、

その他の手法も併用する。質量顕微鏡法については、凍結死後脳サンプルから 8µm の脳組織切片を作成し、質量顕微鏡法による解析を実施したデータで、脳組織内部での代謝経路を視覚化する。得られたデータは、統合失調症群に関しては、当バンク特有の詳細な臨床情報(罹病期間、抗精神病薬用量、生活歴・既往歴・手術歴・鎮痛薬を含む全服薬歴等)を駆使して関連を検討する。蛋白質発現解析から得られた情報を元に遺伝子発現解析やエピジェネティクス解析も視野に入れ、多型解析データとの関連も検討する。

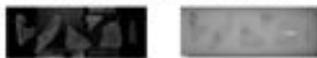
4. 研究成果

近年、脂質解析手法として質量分析法を応用した質量顕微鏡法が開発され、貴重な死後脳サンプルを少量でも解析できる蛋白質解析技術が発展してきたこともあり、これらを統合失調症の死後脳解析に応用する研究が必要とされていた。死後脳サンプルを研究に用いるには十分な倫理的配慮が必要であり、当講座における死後脳集積は、当事者家族代表と学外学識経験者からなる審議委員会により常時審査を受け、倫理面に十分に配慮した。精神疾患へのスティグマを乗り越えるためにも、このような生物学的脳研究が重要であると考えられた。マルチプレックス法はごく少量のサンプル量で 1 fmol の検出感度を誇るタンパク質の多項目同時測定法であり、これを用いて脂質分子から細胞内セカンドメッセンジャーに重要な役割を果たす経路にかかわる代謝酵素群を測定した。同時に、フォスファチジルイノシトール系に関わる酵素は一般的な ELISA 法での測定結果を得た。フォスファチジルイノシトール系については、微量な測定を研究協力者とも協力し、定量解析も実施し、さらに酸化ストレスにも関わる重要なデータが得られた。今後は、これまでのデータを一塩基多型の網羅的データと比較することで、脳内の脂質代謝とそれに関連する蛋白質発現を一塩基多型から予測すること(ジェネティックニューロパソロジー)

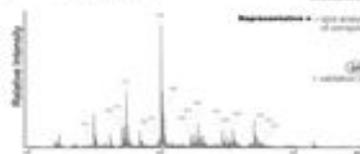
に展開していくことが求められるため、実際の臨床現場で採血検査などを通じて脳内の分子発現・代謝経路の状況を予測するテーラーメイド医療を

質量顕微鏡法 = 質量分析法の発展型

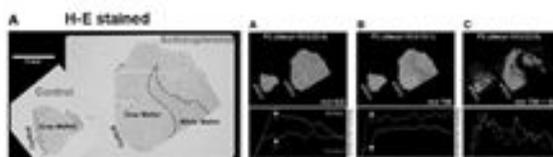
生体高分子のイオン化は田中耕一氏のノーベル賞技術



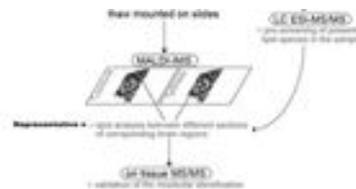
レーザーキャンによりイオン化した生体分子の重さを測定



各測定点からスペクトルを取得



任意のシグナルについて二次元分布を作成



目指す成果が引き続きこの研究の実績から生まれることが期待できる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

松本純弥, 國井泰人, 矢部博興, 【精神科領域の用語解説】ブレインバンク. 分子精神医学, 査読なし, 15 (4):298-300, 2015.

〔その他〕

精神疾患(統合失調症)の病因・病態研究 ブレインバンク

<http://www.fmu-bb.jp/npo/kenkyu.htm#ronbungouseki>

福島県立医科大学医学部 神経精神医学講座

<http://fmu-hpa.jp/neuropsych/research/pmb.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

松本 純弥 (MATASUMOTO JUNYA)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10635535