

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253066

研究課題名(和文)MPSTから探る精神疾患の新しい病理パラダイム

研究課題名(英文)A role of MPST in the pathophysiology of psychiatric illnesses, in particular schizophrenia

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・脳科学総合研究センター・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) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：以下の取り組みから、統合失調症の少なくとも一群には硫化水素産生亢進がみられる可能性を得た。(1)毛髪を用いた硫化水素産生酵素遺伝子MPSTの発現解析。(2)疾患特異性の検討：統合失調症以外に双極性障害、自閉症を対象とした遺伝子解析。(3)MPST以外の硫化水素産生酵素遺伝子、CBS、CTHの解析。(4)ヒト遺伝学的解析(SNP解析、DNAメチル化解析)。(5)Mpst遺伝子改変マウスの作成による行動、硫化水素代謝への影響調査。

研究成果の概要(英文)：We previously identified elevated levels of Mpst, a hydrogen sulfide (H₂S)-producing enzyme, in an inbred mouse model for schizophrenia. In this study, biochemical analyses revealed increased contents of free H₂S and polysulfides (H₂S_n), and bound sulfane sulfur, an intracellular storage molecule of H₂S, in the model inbred. In keeping with mouse data, we observed up-regulation of corresponding genes in schizophrenia-derived postmortem brain samples, neurospheres differentiated from iPS cells, and scalp hair follicles, with the last issue further pursued as a potential biomarker. Dysregulated DNA methylation status of responsible genes was thought to underlie a mechanism. An animal study suggested an inflammatory insult in the brain development stage as a cause of epigenetics changes. These data suggest that elevated sulfide stress (H₂S production) could constitute a novel schizophrenia pathophysiology.

研究分野：精神医学、精神科遺伝学、分子細胞生物学

 キーワード：脳神経疾患 統合失調症 ゲノム 生理活性 ガスメディエーター マウス近交系 プレパルス抑制
ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

客観的診断指標のない精神疾患にとって、バイオマーカーは大きな意義を持つと期待されているが、次の2点は最小限おさえておかななくてはならないと考えられる：(1) 精神疾患の非常に異質性の大きい病理をある程度集約・分類できる手がかりになること、(2) それに基づいて、精神疾患の新規治療法の開発や予防法の確立に踏み出せること。我々はマウスの網羅的プロテオミクス解析からスタートして、H₂Sの産生酵素であるMPST (mercaptopyruvate sulfurtransferase)が統合失調症の死後脳、iPS細胞、脳と同じ外胚葉由来の毛根で、対照群に比較してmRNA発現が有意に上昇していることを見出した。具体的には、我々が以前報告した事実である、

C57BL/6N (B6)近交系マウスは、C3H/HeN (C3)マウスに比較してプレパルス抑制が良好(*PLoS Biology* 2007)、B6マウス前頭葉ではC3に比較して細胞外D-serine & glycine (両方ともNMDA受容体の内因性coagonist)の濃度が高い(*J Neurochem* 2010)、自発活動量はC3の方が高い、等に基づいてC3マウスはB6マウスに比較してヒトに置き換えた場合、より統合失調症関連の素因を多く持っていると考えた。そこで関連分子基盤を検出する目的と、ヒトでのバイオマーカー応用性を考えて、両系統のマウスの前頭葉および脾臓リンパ球(ヒトの末梢リンパ球適用可能性を見据えた)からタンパク質を抽出し、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム(2D-DIGE)で展開し、1,000個以上のスポットに分離した。2つの臓器からの抽出タンパクのうち、マウス系統間比較で両臓器で同じ方向に量的変異が認められるものに着目し、数個のスポットを見出した。それらをMALDI-TOFマスで分析し抗体を用意しウェスタン解析したところ、両臓器ともC3の方がB6に比較してタンパク発現量が高いのはMpstであることが判明した。これらの結果に基づいて、ヒト死後脳前頭葉を用いてMPST mRNAを測定したところ、統合失調症で有意な発現増加を認めた(NSWブレインバンク、疾患、対象群とも各約100サンプル)。ヒトリンパ球では発現増加傾向は認めたものの有意ではなかった。そこで脳と同じ外胚葉由来である頭髪毛根サンプルを用いてMPST mRNAを測定したところ、死後脳と同じく統合失調症群で有意に高い発現上昇を認めた。また、統合失調症由来iPS細胞でも高発現が確認された。毛髪でのMPST発現量というマーカーの長所は、年齢・性別・投薬量・罹病期間・喫煙といった交絡因子の影響を受けず、ROC曲線解析でAUC (Area Under the Curve) = 0.734、感受性 56.4%、特異性 79.2%という良好な値を示したことである。

このような準備状況から、統合失調症のバイオマーカーおよび疾患病理の観点から、硫化水素産生系の亢進を調べることにした。

2. 研究の目的

これまでの研究で、「統合失調症」の少なくとも一群にはMPST発現量が高い群があり、それは毛髪という非侵襲的かつqRT-PCRという簡便な方法で判別できることが明らかになったが、バイオマーカーとしての確度確立、MPST高発現という全く新規の病理機構の解明、創薬への展開に向けて、以下の点に取り組むことを目的とした。

(1) 再現性の検討：これまでの毛髪の研究は、患者群50名、対照群50名で行ったが、再現性を確認するために、異なる地域の異なる医療施設から初回以上のサンプル数を収集し、追加解析を行う。

(2) 疾患特異性の検討：硫化水素産生系は、酸化ストレスや炎症といった精神疾患の「病名」横断的な生理(慢性微弱炎症反応)に関係する。そこで、統合失調症以外に双極性障害、自閉症を対象に、死後脳と毛髪でMPST発現量を調べる。

(3) MPST以外の硫化水素産生酵素遺伝子の解析：成体の脳ではMpstはアストロサイトのミトコンドリアに存在し、H₂Sガスを産生する最終段階に関わる。病理機序としてMPST高値はH₂S産生亢進の一側面である可能性が高いため、H₂S産生に關する他の2つの酵素遺伝子、CBS (cystathionine-synthase)とCTH (cystathionine-lyase)の発現量をヒト材料、およびマウスサンプルで測定する。

(4) 統合失調症(精神疾患)の亜集団におけるMPST高値の病理的意義検討：疾患でMPSTが高値なのは一次的な原因なのか、あるいは酸化ストレス等の代償として二次的に上昇しているのかを動物で検討するために、C3マウスおよび統合失調症モデルマウス(poly I:C処置したもの)にNaHS (H₂S発生剤)を投与して、プレパルス抑制、その他の表現型がどのように変化するのか調べる。

(5) ヒト遺伝学的解析：硫化水素産生酵素遺伝子については、一次的原因が遺伝子多型にあるのかどうか遺伝学的アプローチを用いて解析する。

(6) 硫化水素産生酵素遺伝子の遺伝子改変動物の作成、および表現型解析：メカニズムの理解を深めるため、可能な限り遺伝子改変動物を作成して、*in vivo*, *in vitro*表現型解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 再現性の検討・疾患特異性の検討：これまでの統合失調症毛髪の研究は、我々が以前、脳で発現している多くの遺伝子が末梢では非侵襲的に採取できる毛根(外胚葉)でも発現していることに気づいて始めたもので、患者群50名、対照群50名で行ったが、再現性を確認するために、異なる地域の異なる医療施設から初回以上のサンプル数を収集し、追加解析を行う。初回サンプルでは罹病期間と

MPST 発現量の間には有意な相関はなかったが ($P = 0.20$)、 $\rho = -0.21$ とマイナス値であった。対照群では年齢に関して $\rho \approx 0$ であった。このことは、統合失調症発症後間もないほど MPST 発現量は対照群に比較して高い可能性、ひいては ARMS にある方の将来転帰予測マーカーになる可能性を秘めている。そこで、可能な限り初期精神変調外来を行っている施設に「前向き研究」についての共同研究を依頼する。最近、ARMS にある方への既存抗精神病薬の投与は有害である可能性が示唆されているため (Scott et al., *Neuron* 2013)、ARMS の将来転帰予測手段の開発は精神科臨床にとって重要な問題である。また、「DSM 診断名」横断的に MPST が病理に関与している可能性を追求するために、毛髪サンプルの収集は自閉症に拡大して行う。サンプル収集は、これまで当研究室との共同研究の実績があり、倫理的承認が得られている施設に当研究室の担当者が出向いて行う。なお、頭髪は一人あたり 10 本いただければ十分な解析が可能である。頭髪は採取後速やかに毛根部を RNAlater® (Ambion 社) に浸し、RNA 抽出後 TaqMan system を用いて real-time quantitative RT-PCR 法にて MPST RNA 量を測定する。内部標準は GAPDH を用いる。さらに、毛根幹細胞と MPST 発現量の関連を調べるために、免疫組織化学、*in situ hybridization* 解析を行う。

「DSM 診断名」横断性に関しては、死後脳においても検討する。

(2) MPST 以外の硫化水素産生酵素遺伝子の解析： H_2S 産生に關する MPST 以外の他の 2 つの酵素遺伝子、CBS と CTH (図 1) の発現量をヒト・マウスサンプル、および iPS 細胞で測定する。死後脳サンプルは、統合失調症 (前頭葉、海馬) 双極性障害 (前頭葉)、自閉症 (前頭葉) を用いる。交絡因子の影響も調べる。

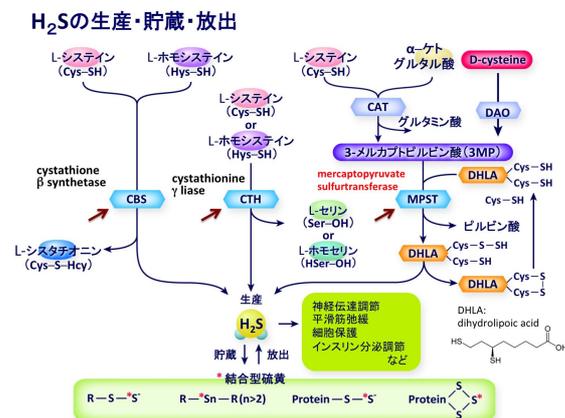


図 1：硫化水素産生系および3つの関連酵素 (MPST, CBS, CTH)

(3) 統合失調症 (精神疾患) の亜集団における MPST 高値の病理的意義検討：統合失調症を初めとした各種精神疾患の病態生理には、慢性微弱炎症反応・酸化ストレスが多かれ少なかれ関与している可能性が繰り返し指摘されている。MPST により産生された H₂S は system Xc- を活性化し、抗酸化物質である GSH 合成を促進する。よって、統合失調症 (精神疾患) で MPST の発現量が高値なのは酸化ストレス等の代償として二次的に上昇している可能性もあるし、あるいは「MPST 高値」自体が一次的な疾患の原因になっている可能性もある。この 2 つの可能性を区別するために、C3 (NIH 系統) マウス、ポリイノシンポリシチジン (polyinosinic-polycytidylic acid, poly I:C) [条件検討の結果、NIH 系統では poly I:C 40 mg/kg を E12.5 の段階で母マウス (妊娠 12 日目) に腹腔内投与するのが有効であることを確認] (統合失調症モデルマウス)、NaHS (H₂S 発生剤) を投与して、プレパルス抑制等の行動指標に対する効果を調べる。

また、硫化水素産生酵素遺伝子の発現上昇が生化学的変化として裏打ちされているか解析する。硫化水素産生上昇により、遊離の硫化水素代謝産物 (H₂S および H₂Sn) 貯蔵型イオウ [酸不安定型イオウ (ミトコンドリアの呼吸鎖酵素に結合) とタンパク結合型イオウ (システイン残基に -S-Sn として結合)] (図 2) が生化学的に生じることが予想される。

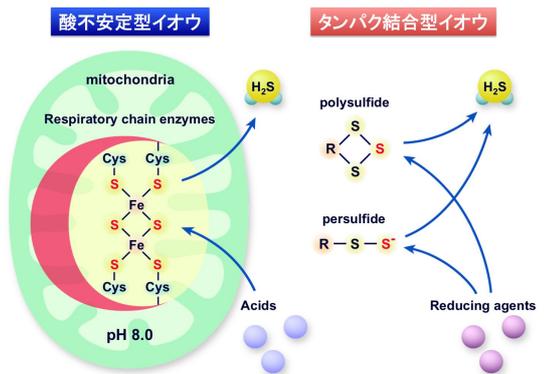


図 2：貯蔵型イオウ

(3) 遺伝学的解析：硫化水素産生酵素遺伝子について tag SNPs (近隣のゲノム多型を代表する一塩基置換) を選択する。この際、HapMap の日本人データベースを参照する。選択した tag SNPs につき、TaqMan システム (ABI7900 使用) を用いてタイプする。なお、tag SNP はマイナーアレル頻度が 0.05 以上、 r^2 0.8 のものを採用する。これらの他、報告されている非同義置換も含める。さらに、当該遺伝子のコピー数多型を高精度で調べるために QuantStudio™ 3D Digital PCR system (Applied Biosystems 社) を使用する。リソースは、現時点で統合失調症約 2,000 例、対照群サンプル約 2,000 例を所有している。

また、バイサルファイト法を用いて標的遺

伝子の CpG アイランドのメチル化解析も行う。

(4) 硫化水素産生酵素遺伝子の遺伝子改変動物の作成、および表現型解析：遺伝子ノックアウト動物の作成はゲノム編集を用いる。トランスジェニックマウスの作成は、常法に準じる。表現型解析としては、行動および硫化水素代謝の生化学的解析を行う。

4. 研究成果

(1) 再現性の検討・疾患特異性の検討：

統合失調症毛髪での MPST 発現量の増加は、当初患者群 50 名、対照群 50 名で行ったが、再現性を確認するためにその後サンプルサイズを患者群 149 名、対照群 166 名まで拡張した。この拡張したサンプルセットでも有意差が確認された ($P = 0.0060$)。検体採取時年齢、発症年齢、服薬量、罹病期間等の交絡因子の影響は認められなかった。ROC 解析では、感受性=73.6%、特異性=47.2%であった。なお、統合失調症死後脳（前頭葉）で発現増加が認められた CBS 遺伝子に関しては、毛髪では差が認められなかった（図 3）。

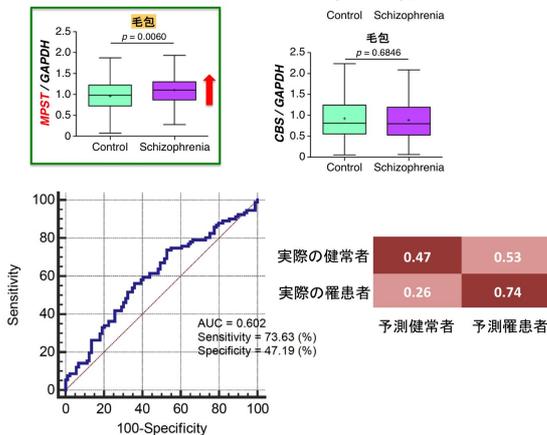


図 3：毛髪（毛根細胞）での MPST、CBS 遺伝子発現、および MPST 遺伝子発現の ROC 解析の結果

毛根幹細胞における MPST 発現は、免疫組織化学の結果、outer root sheath と inner root sheath に発現していることが判明した（図 4）。

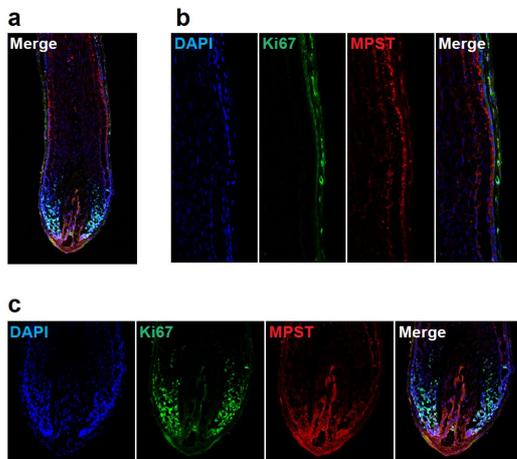


図 4：毛根細胞での MPST 染色

死後脳を用いた疾患特異性に関しては、双極性障害、自閉症の死後脳を用いて検討したが、MPST 発現量には対照群と有意差は見られなかった。ただ、統合失調症死後脳と比較してサンプル数が少ないので、検出力の問題は残った。

(2) MPST 以外の硫化水素産生酵素遺伝子の解析：

硫化水素産生酵素には、MPST、CBS、CTH の 3 種類あるが、それぞれの組織でどの酵素遺伝子が重要な役割を担っているのかを知る一助として、デジタル PCR 法によって遺伝子の絶対発現量を検討した。その結果、各組織における最も発現量の高い酵素遺伝子は以下のものであった：ヒト死後脳-CBS、ヒト iPS 細胞-CBS、ヒト neurosphere-CBS、ヒト毛包-MPST、ヒトリンパ球-MPST、マウス前頭葉 Mps1（図 5）。

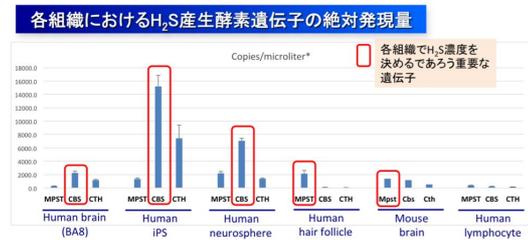


図 5：硫化水素産生酵素遺伝子の各組織における絶対発現量

これらの結果は、統合失調症由来組織で硫化水素産生系が亢進しているというこれまでの解釈と合致する。

(3) 硫化水素代謝の生化学的解析：

次に、硫化水素産生系の亢進が実際生化学的所見として検出できるか確認した。遊離の硫化水素は、 H_2S 、 H_2Sn として存在していることが知られている。硫化水素産生系が亢進していると思われる C3 系統マウス脳と、そうでない B6 系統マウス脳で遊離硫化水素をモノプロモビマン-HPLC（必要時さらに LC-MS/MS）測定したところ、 H_2Sn が C3 脳で有意に上昇していた（図 6）。また、貯蔵型イオウには、ミトコンドリアの呼吸鎖酵素に蓄えられた acid-labile sulfur と、タンパク質のシステイン残基に蓄えられた bound sulfane sulfur がある。C3 脳では bound sulfane sulfur が有意に上昇していた（図 6）。これらの結果から、C3 マウス脳では B6 マウス脳に比較して硫化水素産生系が亢進している事実が生化学的所見からも確かめられた。なお、上記の測定には大量の組織を必要とするため、ヒト由来サンプルでの測定は困難である。

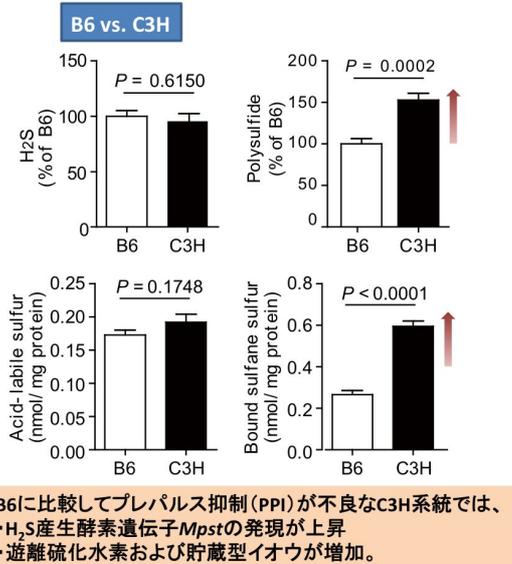


図 6 : B6、C3H 系統マウス脳における硫化水素代謝産物の生化学的解析

(4) 遺伝学的解析 :

硫化水素産生酵素遺伝子の発現量の違いの原因を探るため、*MPST*、*CBS*、*CTH* 遺伝子につき、tag SNP を拾って統合失調症 2,000 例、対照群 2,000 例を用いて関連解析を行った。しかし、補正をかけなくても有意な SNP はなかった。次に DNA メチル化解析を行った。マウス脳では C3 において *Mpst* gene body のメチル化亢進、ヒト neurosphere では統合失調症由来サンプルで *CBS* gene body のメチル化亢進が比較的明瞭な所見であった (図 7)。

Human CBS

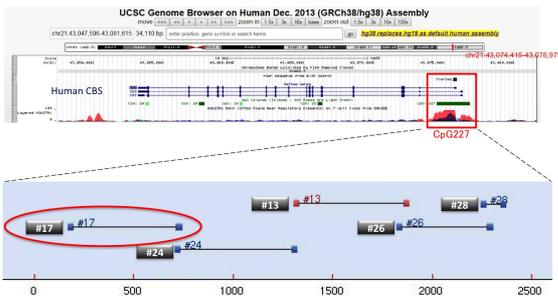


図 7 : ヒト neurosphere では、CpG227 アイランドの 3' 側が、統合失調症で有意に DNA メチル化が亢進していた。

(5) NaHS 投与の効果、硫化水素産生酵素遺伝子の遺伝子改変動物の作成、および表現型解析 :

C3H/HeN (C3H)系統は、C57BL/6N (B6)と比べてプレパルス抑制 (PPI) が不良 (PPI の不良は統合失調症を代表とする精神疾患のエンドフェノタイプの一つと見なされている) かつ *Mpst* の発現量が増加している。そこで硫化水素発生剤である NaHS を 2 週間腹腔内投与したところ、B6 では PPI は不変で、C3H

で PPI が悪化した。B6 は元々硫化水素の産生が C3H より低い、さらに外因性の硫化水素を緩衝する素因があると考えられた。

C3H の遺伝的背景において、CRISPR/Cas9n 系 (ダブルニッキング法) により *Mpst* を破壊したマウスを作成した。最初のコーディングエクソンに 4 bp の欠失があり、western 解析でタンパクの発現はみられなかったため、KO マウスとして扱える。行動試験では、各プレパルスレベルで PPI の改善傾向がみられ、78 dB で有意な改善が認められた (図 8)。

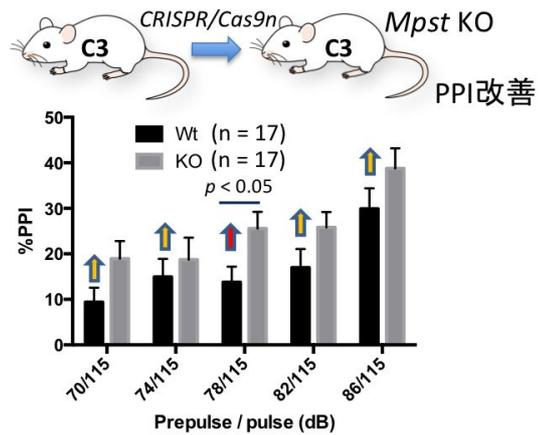


図 8 : C3H マウスで、*Mpst* 遺伝子をゲノム編集で破壊した際の PPI

硫化水素の生化学的解析では、acid-labile sulfur は B6 < (trend) C3 であったものが、C3 WT > C3 KO、bound sulfane sulfur は B6 < C3 であったものが、C3 WT > C3 KO となり、*Mpst* の発現量は硫化水素の生化学的基盤に反映されていることが確かめられた (図 9)。

Mpst WT vs. *Mpst* KO in C3H background

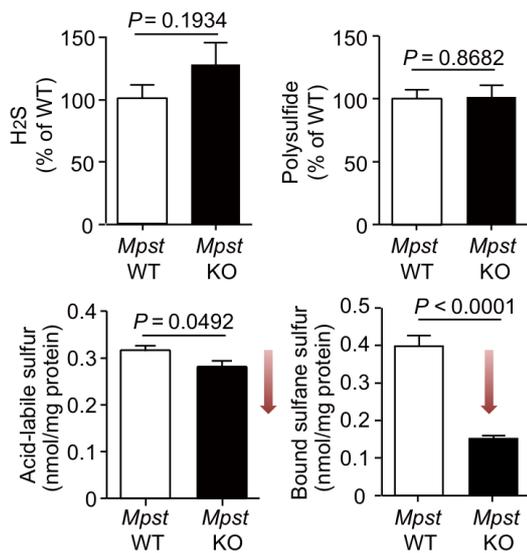


図 9 : C3H マウスの *Mpst* 遺伝子をゲノム編集で破壊した際の硫化水素代謝変動

以上の結果を元に、現在論文をまとめる作業をしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)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・脳科学総合
研究センター・チームリーダー
研究者番号:30249958

(2)研究分担者

山田 和男(YAMADA,Kazuo)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究
センター・副チームリーダー
研究者番号:10322695 (平成26年度)

豊田 倫子(TOYOTA,Tomoko)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・客員研究員
研究者番号:20392045

渡辺 明子(WATANABE,Akiko)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究
センター・研究員
研究者番号:40210992 (平成26年度)

前川 素子(MAEKAWA,Motoko)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・研究員
研究者番号:50435731

大西 哲生(OHNISHI,Tetsuo)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・副チームリーダー
研究者番号:80373281

豊島 学(TOYOSHIMA,Manabu)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・研究員
研究者番号:90582750