

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08944

研究課題名(和文) ARMS患者血清中低分子濃度解析ならびに新規ARMS診断分析法の開発

研究課題名(英文) Analyses of metabolites in serum of individuals with ARMS and the development of the novel analytical method for diagnosis of ARMS.

研究代表者

福島 健 (FUKUSHIMA, Takeshi)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：00272485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症(SCZ)発症前の精神病発症危険状態(ARMS)患者の血清中低分子濃度を健常者と比較する研究を行った。グルコース濃度は高く、一方、L-乳酸濃度は低かったが、精神疾患の臨床症状の陰性症状スコアとL-乳酸濃度は負の相関があり、血清中L-乳酸低下と引きこもりなどの症状の関連性が示唆された。SCZ発症患者(FEP)では、ホモシステイン(Hcy)濃度が高く、メチオニン(Met)濃度が低かった。ARMSでは、FEPと同様にHcy濃度は高かったが、Met濃度の低下はなかったため、ARMSとFEPで違いが見出された。他にARMSでは、血清中D-セリン、グルタチオン、不飽和脂肪酸の濃度低下を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症(SCZ)患者の治療において、発症後の早期に治療に取り組むことが良好な予後、つまり社会復帰に繋がることが精神科医療で認識されつつある。SCZを発症する前段階の患者を対象とした生体内物質の研究はほとんどなかったが、本研究で発症前患者(ARMS)の血清中の物質に着目し、その濃度を健常者と比較解析した。その結果、ARMSの段階で、既にSCZ発症患者と同様な変動を示す物質が複数発見された。この結果より、精神状態がひどくなる前から生体内物質が変化していると考えられた。また、ARMSとSCZ患者では濃度が異なる物質も発見されたので、この物質の生成経路の異常がSCZ発症に関係することも推測された。

研究成果の概要(英文)：Individuals with at-risk mental state (ARMS) had higher serum glucose levels, while ARMS had significantly lower serum L-lactate levels than did controls. A negative correlation was revealed between serum L-lactate levels and Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) negative symptoms scores in ARMS, suggesting an involvement of reduced serum L-lactate levels in the negative symptoms. Serum Met levels were decreased, while Hcy levels were increased in first-episode psychosis (FEP) group. A significant decrease in the Met to Hcy ratio (Met/Hcy) was observed in the FEP group compared to both control and ARMS groups, and was correlated with PANSS positive scores. Taken together, the serum Met/Hcy ratio may be a risk factor for developing psychosis during the transition from ARMS to FEP. Other than these, reduction of D-Ser, glutathione, and unsaturated fatty acids levels were found in ARMS.

研究分野：医療薬学

キーワード：精神病発症危険状態 ARMS 統合失調症 L-乳酸 ホモシステイン メチオニン D-セリン グルタチオン

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、幻覚、幻聴などの陽性症状、引きこもり、感情鈍麻などの陰性症状、認知機能障害を伴う重篤な精神疾患で人口の約1%が発症する。精神科の診療現場では、精神病発症危険状態 (At Risk Mental State; ARMS) の患者、すなわち、診察時には統合失調症を完全に発症していないが、将来的に統合失調症を発症する可能性の高い患者の診断・治療は難しい。ARMS の約3割が約1年以内に発症するため、その3割の患者 (統合失調症移行群) に対する早期介入・薬物治療は有効であるが、発症しない患者 (非移行群) への抗精神病薬の投与は不必要であり、その患者への副作用が懸念され、好ましくない。ARMS の診断が難しいのは、現在も専門医の問診により、限られた診療時間内で診察がなされ、血圧や血糖値のような数値で示される客観的・科学的な診断指標が見出されていないためである。統合失調症を発症した患者については、脳画像や血液試料、また、死後脳を使った生化学、生理学的な基礎研究が行われているが、ARMS を対象とした研究はほとんどされていないため、ARMS に関する基礎研究データの情報はほとんどない。

2. 研究の目的

本申請課題では、本学医療センター精神科医師と共同研究を企画し、研究代表者が開発してきた HPLC 法により、ARMS として診断された患者の血清中低分子濃度を定量する。定量する分子には、研究代表者の研究 (*PLoS One* 2014; 9: e101652) で定量した低分子化合物の他、文献上で統合失調症との関連が報告されている分子を新たに加える (計40種)。ARMS 患者血清中低分子濃度を解析することで、1) 統合失調症に移行 (発症) する前段階の患者では、健常者の血清中低分子濃度とは異なるのかどうか、ARMS の診断に有効な客観的・科学的な臨床診断マーカーを見出すこと、次に、2) ヒト血清中のこれらの診断マーカー候補分子群を同時に定量可能な、臨床現場で役立つ新規分析法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) 本研究は、本学薬学部生命倫理委員会・医学部倫理委員会にて承認を得た。本学医療センター・精神科医師 (研究分担者) により精神病発症危険状態 (ARMS) と診断された患者の血清中低分子 (40種) 濃度を HPLC 蛍光法および LC-MS/MS 法により定量する。研究同意が得られる ARMS 患者を集める期間を3年間とした。同期間で健常人群ボランティアも募集し、同様に血清中低分子を定量する。最終年度は定量、解析の他、研究成果の公表を行った。さらに、精神疾患 (統合失調症) を発症した患者 (First episode psychosis; FEP) 群についても検討し、FEP 群+ARMS 群の各内因性物質濃度と PANSS との相関性を調べた。

(2) LC-MS/MS 用の新たな誘導体化試薬として、CBZ-L-Asp を出発原料として、3工程で新規誘導体化試薬 COXA-OSu を合成した。各アミノ酸溶液に塩基触媒として 4-N, N-ジメチルアミノピリジン、次いで S-COXA-OSu を加え誘導体化反応を行い、HPLC-UV、-TOF-MS、-MS/MS により、最適な移動相の組成とカラム温度について検討した。HILIC 型固定相には、COSMOSIL Packed Column 2.5HILIC (2.0 ID×150 mm)、移動相の流速は 0.4 mL/min で行った。

4. 研究成果

(1) ARMS 群と健常対照群の血清中低分子 (約40種) の濃度について、HPLC 蛍光法および LC-MS/MS 法により定量し、比較研究を行った。その結果、ARMS 群の血清中グルコース、ピルビン酸、L-グルタミン酸 (Glu) 濃度の有意な増加が見られたが、一方、D-セリン (Ser)、不飽和必須脂肪酸、 γ -グルタミルシステイン (GluCys)、グルタチオン (GSH) 濃度の有意な低下が認められた。D-Ser、不飽和必須脂肪酸の濃度低下は統合失調症患者においても報告されており、これらの分子変動と統合失調症患者発症機序との関連が示唆された。

一方、ARMS 群の血清中グルコース濃度及び D-Ser/total Ser 比は陰性症状スコアと負の相関を示した。これらの結果から、低血糖及び D-Ser/total Ser 比の低下が陰性症状に寄与していることが示唆された。

ARMS 群において血清中グルコース濃度の有意な増加、L-乳酸濃度及び L-乳酸/ピルビン酸比の有意な低下などが認められた。一方、D-乳酸濃度の有意な変動は認められなかった。更に ARMS 群では、L-乳酸濃度と陰性症状スコアとの間に有意な負の相関が認められた ($r = -0.6097$, $p = 7.357 \times 10^{-4}$)。これらの結果より、ARMS 群では解糖系に異常が生じている可能性が示された。

FEP 群では、血清中 Met 濃度が Control 群よりも有意に低下し ($p = 0.0381$)、Hcy 濃度は Control 群 ($p = 0.0170$)、ARMS 群よりも有意に増加した ($p = 0.0158$)。FEP 群の Met/Hcy 比は、Control 群や ARMS 群よりも有意に低下した。更に、FEP 群+ARMS 群における Met/Hcy 比と陽性症状スコアとの間に有意な負の相関が認められた。これらの結果より、Met/Hcy 比の低下は、ARMS から FEP の期間における ARMS と FEP の判別マーカーとなり得ることが示唆された。

(2) 我々は、これまでに光学活性ジアステレオマー誘導体化試薬 *R*- or *S*-DBDPyNCS を用いて、HILIC モードであるトリアゾール固定相を装着した LC-MS/MS によるアミノ酸の分離定量を報告してきたが、今回、新規ジアステレオマー誘導体化試薬 (4*R*/4*S*-*N*-Cbz-5-oxo-oxazolidine acetic acid *N*-hydroxysuccinimide ester; *R*/*S*-COXA-OSu) をデザイン・合成し、そのアミノ酸光学分割能ならびに LC-MS/MS 用誘導体化試薬としての有用性について検討した。

合成した COXA-OSu の光学純度を HPLC-キラル固定相法 [CHIRALCEL OZ-RH (4.6 ID×150 mm, 5 μm)]により確認した結果、99%以上であり、光学純度の高い試薬を得ることができた。

COXA-OSu を用いたアミノ酸の誘導体化反応は *N,N*-ジメチルアミノピリジンの存在下、室温 ~ 60 の条件で検討を行った。LC-MS/MS 装置として Shimadzu LCMS-8040 を使用し、MRM モードで測定を行った。カラムにはトリアゾール型固定相 COSMOSIL® 2.5HILIC (2.0 x 150 mm, 2.5 μm) を用い、有機溶媒に富んだ移動相 (HILIC モード) を使用した。

COXA-OSu によるアミノ酸のジアステレオマー誘導体化反応は温和な条件で短時間に進行した。COXA-アミノ酸誘導体は MS/MS において、COXA 構造に由来する特徴的な開裂パターンを示した。DL-Ser、-Phe、-Ala、-Lys などの誘導体は COSMOSIL® HILIC を用いて十分な分離が可能であり、その分離度は 1.7 ~ 2.8 であった。また、システインやグルタチオンに対してはチオール基、アミノ基ともに反応していることを MS で確認した。また、Trp およびキヌレニンについては DBD-PyNCS 使用時よりも分離度、分離係数の上昇が見られた。移動相として有機溶媒がリッチな条件 (95% CH₃CN) により、溶出時間 40 分以内で 17 種のアミノ酸の光学分割が達成された。同条件下では、酸性アミノ酸の溶出が困難であったが、移動相の塩濃度を上昇させることで溶出・光学分割が可能になった。また、移動相の H₂O 含量が高くなると光学分割できないことが分かった。

移動相組成ならびに至適なカラム温度設定などの改良を重ね、より最適化した測定条件を探索し、ヒト血清のほか、軟体動物 (アメフラシ) の神経組織試料中アミノ酸の検出・定量に成功した。

本研究で開発された LC-MS/MS 法により、ARMS 患者ならびに健常者の血清中低分子化合物の迅速な一斉定量を現在、進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Onozato Mayu, Umino Maho, Shoji Ayako, Ichiba Hideaki, Tsujino Naohisa, Funatogawa Tomoyuki, Tagata Hiromi, Nemoto Takahiro, Mizuno Masafumi, Fukushima Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Serum D and L lactate, pyruvate and glucose levels in individuals with at risk mental state and correlations with clinical symptoms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Early Intervention in Psychiatry	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） 10.1111/eip.12866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Onozato Mayu, Uta Arisa, Magarida Ayaka, Fukuoka Naomi, Ichiba Hideaki, Tsujino Naohisa, Funatogawa Tomoyuki, Tagata Hiromi, Nemoto Takahiro, Mizuno Masafumi, Fukushima Takeshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Alterations in methionine to homocysteine ratio in individuals with first-episode psychosis and those with at-risk mental state	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 48 ~ 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clinbiochem.2019.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiromi Tagata, Naohisa Tsujino, Mayu Onozato, Takahiro Nemoto, Takeshi Fukushima, Masafumi Mizuno	4. 巻 -
2. 論文標題 Analyses of N-methyl-D-aspartate receptor-related metabolites in the serum of antipsychotic-naive individuals with at-risk mental state	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toho Journal of Medicine	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） 10.14994/tohojmed.2019.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakamoto Tatsuya, Furukawa Shoko, Nishizawa Takuro, Fukuda Mizuho, Sasaki Miyu, Onozato Mayu, Uekusa Shusuke, Ichiba Hideaki, Fukushima Takeshi	4. 巻 1585
2. 論文標題 Succinimidyl (3-[(benzyloxy)carbonyl]-5-oxo-1,3-oxazolidin-4-yl)acetate on a triazole-bonded phase for the separation of dl-amino-acid enantiomers and the mass-spectrometric determination of chiral amino acids in rat plasma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 131 ~ 137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chroma.2018.11.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Tatsuya, Onuma Riho, Furukawa Shoko, Hayasaka Akane, Onozato Mayu, Nakazawa Hiromi, Iizuka Hideaki, Ichiba Hideaki, Fukushima Takeshi	4. 巻 409
2. 論文標題 Liquid chromatography-mass spectrometry with triazole-bonded stationary phase for N-methyl-D-aspartate receptor-related amino acids: development and application in microdialysis studies	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 7201 ~ 7210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-017-0682-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 小野里 磨優、雅樂 晏里沙、曲田 彩夏、福岡 尚実、一場 秀章、辻野 尚久、田形 弘実、船渡川 智之、根本 隆洋、水野 雅文、福島 健
2. 発表標題 初回エピソード精神病及び精神病発症危険状態におけるHcy-Met代謝の変動
3. 学会等名 第140回 日本薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田形 弘実、辻野 尚久、小野里 磨優、船渡川 智之、山口 大樹、片桐 直之、根本 隆洋、福島 健、水野 雅文
2. 発表標題 抗精神病薬未服薬の早期精神病における血清中グルタミン酸代謝物の解析
3. 学会等名 第29回日本臨床精神神経薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Onozato M, Umino M, Shoji A, Ichiba H, Tsujino N, Funatogawa T, Tagata H, Nemoto T, Mizuno M, Fukushima T
2. 発表標題 Serum D- and L-lactate, pyruvate, and glucose levels in individuals with at-risk mental state and correlations with clinical symptoms.
3. 学会等名 The 11th Joint Seminar on Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海野 真帆, 小野里 磨優, 辻野 尚久, 田形 弘実, 一場 秀章, 船渡川 智之, 根本 隆洋, 福島 健, 水野 雅文
2. 発表標題 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中グルコース代謝物濃度の比較解析
3. 学会等名 第139回 日本薬学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野里 磨優, 辻野 尚久, 田形 弘実, 海野 真帆, 一場 秀章, 船渡川 智之, 根本 隆洋, 福島 健, 水野 雅文
2. 発表標題 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中グルコース代謝物濃度の比較解析
3. 学会等名 第15回 東邦大学5学部合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野里 磨優, 海野 真帆, 一場 秀章, 福島 健, 辻野 尚久, 船渡川 智之, 田形 弘実, 根本 隆洋, 水野 雅文
2. 発表標題 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中グルコース代謝物濃度の比較解析
3. 学会等名 第48回 日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiromi Tagata, Naohisa Tsujino, Mayu Onozato, Naoyuki Katagiri, Taiju Yamaguchi, Takahiro Nemoto, Takeshi Fukushima, Masafumi Mizuno
2. 発表標題 Analyses of NMDA-receptor Co-agonists in Serum among Individuals with At-risk Mental State for Psychosis.
3. 学会等名 11th International Conference on Early Intervention in Mental Health (IEPA11) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野里 磨優, 小山田 紘子, 一場 秀章, 福島 健, 辻野 尚久, 船渡川 智之, 田形 弘実, 根本 隆洋, 水野 雅文
2. 発表標題 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中代謝物濃度の比較解析
3. 学会等名 第47回 日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田形 弘実, 辻野 尚久, 小野里 磨優, 船渡川 智之, 山口 大樹, 片桐 直之, 根本 隆洋, 福島 健, 水野 雅文
2. 発表標題 精神病発症危険状態 (ARMS) における末梢血グルタミン酸代謝物の解析
3. 学会等名 第21回 日本精神保健・予防学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ayako Shoji, Mayu Onozato, Hiroko Oyamada, Hideaki Ichiba, Takeshi Fukushima, Naohisa Tsujino, Tomoyuki Funatogawa, Hiromi Tagata, Takahiro Nemoto, Masafumi Mizuno
2. 発表標題 Analyses of endogenous metabolites in serum from at-risk mental state subjects
3. 学会等名 10th Joint Seminar on Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小野里磨優, 辻野尚久, 雅樂晏里沙, 岡西佑紀奈, 奥村郁実, 小沼利穂, 小畑香菜, 庄司礼子, 田形弘実, 船渡川智之, 山口大樹, 片桐直之, 坂本達弥, 一場秀章, 根本隆洋, 水野雅文, 福島 健
2. 発表標題 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中代謝物濃度の比較解析
3. 学会等名 第14回東邦大学5学部合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野里 磨優, 辻野 尚久, 雅樂 晏里沙, 岡西 佑紀奈, 奥村 郁実, 小沼 利穂, 小畑 香菜, 庄司 礼子, 田形 弘実, 船渡川 智之, 山口 大樹, 片桐 直之, 坂本 達弥, 一場 秀章, 根本 隆洋, 水野 雅文, 福島 健
2. 発表標題 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中代謝物濃度の比較解析
3. 学会等名 第138回日本薬学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsujino N, Fukushima T, Katagiri N, Yamaguchi T, Iizuka H, Onozato M, Ichiba H, Nemoto T, Mizuno M
2. 発表標題 Biomarkers during the schizophrenia onset using quantitative analyses of serum metabolites at risk mental state.
3. 学会等名 The 10th International Conference on Early Intervention in Mental Health (IEPA 10) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 辻野 尚久, 福島 健, 片桐 直之, 山口 大樹, 飯塚 英昭, 小野里磨優, 一場 秀章, 根本 隆洋, 水野雅文
2. 発表標題 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中低分子濃度解析
3. 学会等名 第13回 東邦大学4学部合同学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小山田 紘子, 内藤 瑛子, 高橋 周平, 鈴木 祥, 福本 実理, 小野里 磨優, 一場秀章, 福島 健, 辻野 尚久, 船渡川 智之, 田形 弘実, 根本 隆洋, 水野 雅文
2. 発表標題 ARMS 患者, 健常人血清中 L-Trp 及びその代謝物の濃度比較解析
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Fukushima, Takuro Nishizawa, Mizuho Fukuda, Shoko Furukawa Miyu Sasaki, Tatsuya Sakamoto, Mayu Onozato, Hideaki Ichiba, Tatsumi Nagahama
2. 発表標題 Development of a chiral derivatization reagent, COXA-OSu, by LC-MS/MS and its application to determine amino acids in biological samples.
3. 学会等名 The 4th International Conference of D-amino acid research (IDAR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayu Onozato, Maho Umino, Ayako Shoji, Hideaki Ichiba, Naohisa Tsujino, Tomoyuki Funatogawa, Hiromi Tagata, Takahiro Nemoto, Masafumi Mizuno, Takeshi Fukushima
2. 発表標題 Serum D- and L-lactate, pyruvate, and glucose levels in individuals with at-risk mental state and correlations with clinical symptoms.
3. 学会等名 The 4th International Conference of D-amino acid research (IDAR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島 健, 小野里 磨優, 坂本 達弥, 辻野 尚久, 田形 弘実, 船渡川 智之, 片桐 直之, 根本 隆洋, 水野 雅文
2. 発表標題 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中低分子濃度の解析
3. 学会等名 東邦大学 5 学部合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野里 磨優, 曲田 彩夏, 福岡 尚実, 一場 秀章, 辻野 尚久, 田形 弘実, 船渡川 智之, 根本 隆洋, 水野 雅文, 福島 健
2. 発表標題 初回エピソード精神病及び精神病発症危険状態におけるHcy-Met代謝の変動
3. 学会等名 東邦大学 5 学部合同学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	辻野 尚久 (TSUJINO Naohisa) (00459778)	東邦大学・医学部・講師 (32661)	
研究 協力者	小野里 磨優 (ONOZATO Mayu)		