

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19752

研究課題名(和文)統合失調症脳における微小循環・慢性炎症関連分子のジェネティックニューロパソロジー

研究課題名(英文) Genetic neuropathological investigation of the molecules in chronic inflammation in the postmortem brains from patients with schizophrenia.

研究代表者

和田 明 (WADA, AKIRA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20510340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、統合失調症発症のメカニズムの一端を解明することを目的として、ルミネックス法を用いて慢性炎症に関連する分子について統合失調症死後脳での発現量を測定し、得られた結果から炎症物質と統合失調症との関連を検討した。その結果、統合失調症群では健常対象群に比較して、総タンパク質1mgあたりのIP-10、IL-17Aタンパクの質量が低下していた。これらの分子は炎症に深く関わる分子である。今回の結果から、統合失調症の発症に炎症が関わっている可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to elucidate part of the mechanism of schizophrenia onset using the postmortem brains. Using the Luminex assay, the expression levels of molecules involved in immunity and chronic inflammation were measured in postmortem brains from patients with schizophrenia. The data obtained from the postmortem brains from patients with schizophrenia were also analyzed regarding the relationship between each molecular level and clinical profile. The following results were obtained. 1) The schizophrenia group had lower interferon-inducible protein (IP)-10 mass/mg total protein (pg/mg) compared to healthy controls ($p=0.012$). 2) The schizophrenia group had lower IL-17A protein mass/mg total protein (pg/mg) compared to healthy controls ($p=0.003$). 3) Spearman's rank correlation analysis of the relationships of IP-10 and IL-17A protein mass/mg total protein with mean antipsychotic dose over the 3 months antemortem found a positive correlation for IP-10 ($p=0.032$).

研究分野：統合失調症

キーワード：統合失調症 慢性炎症 微小循環 IL-17A IP-10

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の約 1%が罹患するありふれた疾患であるが、その病因は解明されていない。それでも実臨床ではドパミン仮説をもとにして使用されているドパミン・アンタゴニストである抗精神病薬が幻覚・妄想などの精神病症状に対しては一定の効果があり、殆どの統合失調症患者に使用されている。しかしながら、統合失調症の長期予後は治癒や軽度の障害を残すのみなど良好な予後の場合が 50~60%で、重度の障害を残す場合は 10~20%となっている(厚生労働省 http://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/detail_into.html)。即ち、現在行われているドパミン仮説に基づく薬物療法に様々な心理社会的治療を組み合わせただけでは人口の約 0.5%、60 万人の統合失調症患者が十分な効果の得られる治療法を享受できない。そのため、統合失調症治療薬開発の新たなブレイクスルーとなりえるような、新たな統合失調症治療薬の標的分子を探索する必要がある。統合失調症の生物学的研究は、画像研究や動物実験などの間接的検討が中心であり、得られた知見を確定するには、死後脳サンプルを直接検討することが不可欠であり、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。しかし、本邦では大幅に立ち遅れ、サンプルを欧米に依存する状況が続いてきた。これに対し研究代表者らは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、日本初の系統的な精神疾患死後脳バンクを確立・運営し、集積されたサンプルを用いて統合失調症の病因の解明を目的として検討を行ってきた。

申請者は平成 16 年 4 月より福島県立医科大学神経精神医学講座内精神疾患死後脳バンクの運営に従事し、統合失調症の病因仮説に基づき、ドパミン・グルタミン酸・GABA 系に関わる標的分子について検証しようと試みてきた(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~20 年度、研究代表:丹羽真一) 基盤研究 B「質量顕微鏡を用いた統合失調症死後脳のドパミン・グルタミン酸・ギャバ系の解析」(平成 20 年度~平成 22 年度、研究代表:丹羽真一)など)。その結果、統合失調症群で尾状核においてカルシニューリン免疫陽性ニューロン率の有意な増加を見出した(Wada et al, 2012)。その後も死後脳を用いた統合失調症研究に従事し、最近では統合失調症の病因に関連する標的分子の遺伝子発現と各分子の遺伝子多型との関連を検討する研究協力者として参画してきた(若手研究 B「ジェネティックニューロパソロジーによる統合失調症脳内分子表現型解析」平成 27 年~平成 29 年度、研究代表者:國井泰人)。

一方、ドパミン仮説に基づいた統合失調症研究だけでは統合失調症治療薬開発の新た

なブレイクスルーとはなり得ないと考えてきた。我々は多くの統合失調症病因仮説の中で、神経炎症仮説、微小循環仮説に注目している。神経の慢性炎症が精神疾患に影響していることは、気分障害において以前より指摘されている。例えば、インターフェロンがうつ状態をもたらすことは広く知られており、炎症性サイトカインが気分障害に影響していることが疫学的に指摘されている。また、Anisman らはうつ病とサイトカインとの関連を指摘しており(Anisman, 2009)、Dowlati らは TNF- α や IL-6 がうつ病患者で増加していることをメタアナリシスで示している(Dowlati et al, 2010)。近年、統合失調症でもサイトカインの上昇や炎症との関連が統合失調症でも指摘されている(Miller et al, 2011; Fillman et al, 2013)。例えば、Zhang らは統合失調症において健常者と比較して、IL-2, IL-4, IL-8 が低下していることを報告している(Zhang et al, 2015)。統合失調症と免疫・炎症がどのように関連しているかは解明されていないが、心理的なストレスがミクログリアを活性化すること(Hinwood et al; 2012)、ミクログリアが活性化すると炎症性サイトカインを生成することなどから、ミクログリアを介した神経免疫系の異常活性が統合失調症の病因に関わっている可能性があると考えられる。

一方、免疫反応・炎症反応は主に全身の毛細血管であるが、毛細血管の機能不全が統合失調症の病態に関与しているという微小循環異常仮説を支持する報告がある。Meier らは統合失調症群は健常対照に比べて網膜の静脈内径が有意に太く網膜静脈内径が拡大しており、このことは炎症、内皮障害、虚血、低酸素などと関連していると考えられると報告している(Meier et al, 2015)。また、Uranova らは死後脳を電子顕微鏡で解析し、毛細血管の密度は前頭葉において統合失調症で低下しており、特に陰性症状が顕著な症例で強く低下していたこと、形態学的特徴として統合失調症群では基底膜の肥厚、毛細血管を囲むグリア細胞の足の膨潤が観察されたことを報告している(Uranova, 2011)。

これらのことより、統合失調症において慢性の免疫・炎症システムが何らかの形で変化し、結果として毛細血管が主な構成要素である微小循環が変化していることが示唆される。Takao らは、schurri-2(schi-2)欠損マウスにおいて統合失調症と似た行動特性を有しており、その脳に軽度の慢性炎症が起こっていること、parvalbumin や GAD67 といった抑制系ニューロンのマーカーが減少していることを報告している(Takao et al, 2013)。Takao らが報告した sch-2 欠損マウスでの変化がヒトにおいても起こっている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、統合失調症発症のメカニズム

の一端を解明することを目的として、ルミネックス法を用いて免疫、慢性炎症に関連する分子、微小循環に関連する分子、抑制系ニューロンに関連した分子について、統合失調症死後脳での発現量を測定し、得られた結果についてその遺伝子多型(SNPs)との関連を解析する。また、得られた統合失調症死後脳からのデータについては、臨床プロフィール(年齢、性別、病型、罹病期間、抗精神病薬服薬量、抗コリン薬服薬量、死後時間など)と各分子との関連を解析する。また、ルミネックス法により顕著な差異があった分子については免疫組織化学的手法を用いて組織内分布を確認する。

研究代表者らは本邦で初めてとなる系統的精神疾患死後脳バンクを運営してきており、現在約 50 例の脳組織を利用できる状態にある。同バンクの脳サンプルは脳サンプルを集積しているだけではなく、様々な生前の臨床プロフィールが利用可能であり、更に既に多くの脳サンプルについて全遺伝子についての SNPs の解析を終了しており、研究に利用可能となっている。本研究は現在これまでに蓄積してきた研究成果を基に、統合失調症の病因仮説(微小循環異常仮説、慢性炎症仮説)に関連した分子の遺伝子多型と、死後脳における分子表現型との関連を検討する、ジェネティックニューロパソロジーを適用する点で独創的である。ジェネティックニューロパソロジーという新しい精神疾患死後脳研究のアプローチは、NIMH-BTC の Kleinman らが提唱した手法で、精神疾患のメカニズムと新しい治療標的の同定は遺伝子のバリエーションと死後脳における分子表現型との関連から得られるという仮説(Kleinman et al, Biol. Psychiatry, 2011)であり、本研究の研究協力者である福島医大神経精神医学講座國井講師が現時点でそのアプローチを適用した世界最大規模の死後脳研究を報告している(Kuii et al, Mol Psychiatry, 2013)。

本研究により遺伝子多型を利用して脳内タンパクの異常が推測できるようになれば、現在はほぼドパミン仮説に則した治療しかない各患者への治療法が、患者の遺伝子多型により行える、オーダーメイド治療に繋がる一助になるのではないかと期待している。

3. 研究の方法

使用した死後脳サンプルは統合失調症群 24 例、健常対象群 31 例、双極性障害群 7 例である。3 群間において、年齢、性別、死後時間について有意差はなく、各サンプルについては病理学的検索により、軽度の加齢性変化以外、大きな神経学的異常はなかった。また、各症例について、神経疾患やタバコを除く物質依存、物質乱用はなかった。全ての統合失調症および双極性障害の患者は、DSM-の診断基準を満たしていた。各症例の上側頭回皮質から得られた死後脳サンプル凍結脳

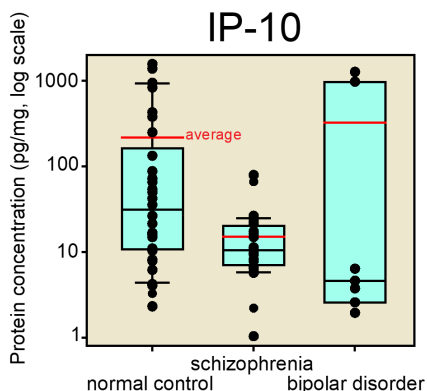
組織約 100mg に 6 倍量の N-PER™ Neuronal Protein Extraction Reagent を加え、ホモジエナイズおよび超音波破碎した。遠心法により上清を回収し PBS で希釈して 4mg/ml のタンパク質抽出液を作成し、ルミネックス法に用いた。ルミネックス法を用いたタンパク分析では、IL-1, GM-CSF, IFN-, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p40), IL-13, MCP-1, TNF-, Eotaxin, G-CSF, IFN-2, IL-1, IL-3, IL-12(p70), IL-15, IL-17, IP-10, MIP-1, MIP-1, TNF-, EGF, IL-1ra, MDC(CCL22), VEGF の各分子について、総タンパク質 1mg あたりの含有タンパク質量を測定した。なお、ルミネックス法による分析は、Filgen 社に外部委託し測定した。得られた総タンパク質 1mg あたりのタンパク質量について、統合失調症群、健常対象群、双極性障害群の 3 群間で Kruskal-Wallis 検定を用いて比較検討し、有意差のあった分子について群間での比較検討を行った。尚、統合失調症群について、他の群と有意差のあった分子については、死亡前 3 か月間の平均抗精神病薬投与量(CP 換算値)との関連を Spearman の順位相関検定で検討した。

4. 研究成果

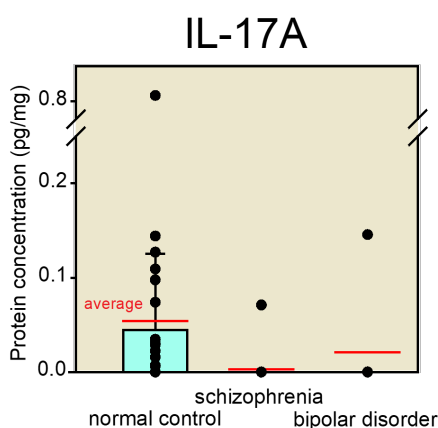
- (1) 統合失調症群では健常対象群に比較して、総タンパク質 1 mg あたりの IP-10 タンパクの質量 (pg/mg) が低下していた ($p=0.012$)。
- (2) 統合失調症群では健常対象群に比較して、総タンパク質 1 mg あたりの IL-17A タンパクの質量 (pg/mg) が低下していた ($p=0.003$)。
- (3) 統合失調症群 24 例のうち、抗精神病薬投与量が判明している 22 例について、総タンパク質 1mg あたりの IP-10, IL-17A タンパクの質量と死亡前 3 か月間の平均抗精神病薬投与量 (CP 換算値) との関連を spearman の順位相関検定で調べた。IL-17A については相関はなかったが、IP-10 について正の相関を認めた ($p=0.032$)。

分子名	有意確率(p)	分子名	有意確率(p)
IL-4	0.867	G-CSF	0.974
IL-5	0.094	GM-CSF	0.363
IL-6	0.556	IFN-alpha2	0.53
IL-7	0.064	IFN-gamma	0.069
IL-8	0.145	IL-10	0.642
IP-10	0.012*	IL-12(P40)	0.184
MCP-1	0.341	IL-12(P70)	0.583
MIP-1 alpha	0.942	IL-13	0.624
MIP-1 beta	0.322	IL-15	0.453
TNF-alpha	0.749	IL-17A	0.003*
TNF-beta	0.759	IL-1RA	0.17
VEGF	0.347	IL-1 alpha	0.051
EGF	0.78	IL-1 beta	0.767
Eotaxin	0.272	IL-2	0.419

【総タンパク質 1mg あたりのタンパク質量】



【総タンパク質 1mg あたりのタンパク質量】



本研究では、CXC ケモカインファミリーに属する IP-10(CXCL とも呼ばれる)タンパク質量が統合失調症群で低下していた。IP-10 は炎症の慢性化に関与すると言われている分子であり、慢性炎症仮説とは逆の結果となった。しかしながら、Asevedo らも統合失調症群での IP-10 の低下を報告しており、統合失調症において慢性化している炎症を IP-10 を低下させることにより抑制しようとしている可能性がある。また、IP-10 タンパク質量と死亡前 3 か月間の平均抗精神病薬投与量との関係に正の相関を認めた。Chen らは抗精神病薬の risperidone が IP-10 の生成を減少させることを報告しており、抗精神病薬の種類により IP-10 タンパク質量が変化する可能性がある。本研究では、炎症性サイトカインである IL17A タンパク質量が統合失調症群で低下していた。既報でも統合失調症患者の再発時に血漿中 IL-17 が低下しているとされている。IL-17A は炎症を促進する場合もあるが抑制することもあり、統合失調症においては神経系の慢性炎症を抑制する調節因子として働いている可能性がある。統合失調症と炎症がどのように関連しているかは解明されていないが、心理的なストレスがマイクログリアを活性化すること、マイクログリアが活性化すると炎症性サイトカインを生成すること

などから、マイクログリアを介した神経免疫系の異常活性が統合失調症の病因に関わっている可能性があると考えられており、このことを確認するためには、PET でマイクログリアの活性化を測定することで病期に応じた変化が確認できるかもしれない。今後、統合失調症の慢性炎症仮説の検証には、死後脳研究とともに画像研究の進展も必要である。

なお、ルミネックス法を用いたタンパク質量の測定結果と SNPs との関連については、データはあるものの十分結果がまとまっていないため、本研究の成果として今後まとめる予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

和田明、國井泰人、日野瑞城、松本純弥、長岡敦子、丹羽真一、竹島明、高橋均、那波宏之、柿田明美、笠井清登、矢部博興；統合失調症脳における慢性炎症関連分子のゲネティックニューロパソロジー. 第 13 回日本統合失調症学会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田明 (Wada Akira)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20510340

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

矢部博興 (Yabe Hirooki)

國井泰人 (Kunii Yasuto)

日野瑞城 (Hino Mizuki)

松本純弥 (Matsumoto Jyunya)

長岡敦子 (Nagaoka Atsuko)

丹羽真一 (Niwa Shin-ichi)

竹島明 (Takeshima Akari)

高橋均 (Takahashi Hitoshi)

那波宏之 (Nawa Hiroyuki)

柿田明美 (Kakita Akiyoshi)

垣内千尋 (Kakiuchi Chihiro)

笠井清登 (Kasai Kiyoto)