

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10281

研究課題名(和文) 構造方程式モデリングを用いて統合失調症末梢血の研究成果を統合し、病態解明に繋げる

研究課題名(英文) Investigation of amino acids contribution to schizophrenia etiology using structural equation modeling.

研究代表者

尾関 祐二 (Ozeki, Yuji)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90303768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症患者127名健常者64名を対象に末梢血中のアミノ酸18種類等を測定し、統合失調症患者でL-アラニンが有意に減少していた。統合失調症患者で臨床症状や認知機能とアミノ酸の血中濃度を比較すると、L-セリン濃度が陽性症状と正の相関を示し、注意と情報処理速度がグルタミン酸濃度と正の相関、D-セリン濃度と負の相関を示した。L-セリン濃度が変化している患者2名で各々にL-セリン合成酵素の遺伝子内に稀な遺伝子異常が見いだされ、培養細胞で遺伝子変異を評価したところ、一部患者でみられたのと同様のアミノ酸濃度変化が認められた。以上より本研究では生体内のアミノ酸が一部病状と関連する可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症は0.8%ほどの人がかかる疾患で、幻覚妄想などの症状とともに、考える力が下がるなど一種の後遺症があります。また、治療を受けていても症状を繰り返す場合も少なくなりません。投薬などの治療は改善されてきていますが、後遺症や再発の恐れは完全には解決されていません。そのため、どうして病気になるのかといった研究を通して、新たな治療法を見つける必要があります。今回の研究ではこれまでに提出されていたアミノ酸と統合失調症との関係をより詳しく調べました。その結果D-セリンなど一部のアミノ酸が症状と関係している可能性が認められました。こうした成果は今後の疾患克服に有用な情報を提供すると考えられます。

研究成果の概要(英文)：The serum concentration of 18 kinds of amino acids was measured in 127 patients with schizophrenia (SZ) and 64 healthy controls (HC). L-Alanine concentration was significantly decreased in SZ by logistic regression analysis. Furthermore, in SZ, the correlation between amino acid concentration and clinical symptoms by PANSS and cognitive function by BACS-J was investigated. L-serine concentration correlated with positive symptoms, glutamic acid and D-serine concentration correlate with attention, with a positive and negative manner respectively. The rare mutation was found in one of the L-serine synthesis enzymes. The function of the mutations was investigated in HEK293 cells. One mutation modified amino acid concentration which is similar to the patient who has the mutation. This project indicates the possibility that amino acid could affect symptoms of schizophrenia.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 アミノ酸 D-セリン L-セリン グルタミン酸 グルタミン アラニン BACS-J

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の病態研究では、いくつかの物質の血中濃度が変化していることが報告されており、我々の研究でも、血漿中の L-セリンの上昇(Ozeki et al Psychiatry Res 2016)やホモシステインの上昇(Takano, Ozeki et al Ann Gen Psychiatry 2016)を確認している。これら変化は診断に使用できるほどの感度や特異度を示している訳ではないが、健常人と比べて何らかの違いが存在していることは事実のようである。これら現象が疾患の原因なのか疾患に罹患した後に生じる何らかの結果かは明らかではないが、こうした変化の原因を俯瞰的かつ詳細に追求めることは疾患の病態をより明らかにすると共に、我々がこれまでに得てきた結果を含め、これまでの多くの独立した研究成果を統合し疾患の病態・原因を一元的に解明することになると考えられる。

こうした目的を達成するには報告されている全ての物質を同時に取り扱うことが望ましいが現実的には限界があり、本研究ではこれまで比較的良好に報告がされている L-セリン、D-セリン、グリシン、グルタミン-グルタミン酸サイクル及びこれらと関連するアミノ酸とした。我々はこれまでに統合失調症における L-セリンについての研究を行い、上述のようにこれまでの報告と同様に末梢血液中 L-セリン濃度軽度上昇を確認している。我々は D-セリン血中濃度の変化は確認できなかったが(Ozeki et al Psychiatry Res 2016)、低下の報告も少なくない(Kantrowitz et al Lancet Psychiatry 2015)、グリシンは血中濃度低下が報告されている(Hons et al Psychiatry Res 2010)。グルタミンやグルタミン酸に関しては、MRS を用いた中枢系での測定が中心であるが、多くはグルタミンの上昇を報告している(Thakkar et al Biol Psychiatry 2016)。これらグルタミン酸受容体や GABA 系につながる異常は神経発達の問題にもつながる(Jaeken et al Arch Dis child 1996, Aida et al PLoS One 2012)。

なお、one-carbon metabolism に関連する異常としてホモシステインの上昇が統合失調症で繰り返し報告され、上述のように我々もそうした現象を確認している。この現象の一部は MTHFR の遺伝子多型で説明できるが、唯一の決定因子ではないことを我々も確認している(Takano, Ozeki et al Ann Gen Psychiatry 2016)。なおこの現象は DNA メチル化の変化とつながって統合失調症発症と関連していると考えられている(Ikegame T et al Neuroscience Research 2013)。また、血液中でスフィンゴミエリンなどスフィンゴ脂質の異常が指摘されており (Smesny S et al. Schizophr Bull 2012)、脳白質の問題を指摘する画像研究(Laskaris et al Br J Pharmacol 2016)ともつながる。ここにあげた物質は互いに生化学経路上で関連がある。このように今回検討するアミノ酸はいろいろな生化学経路を通じて統合失調症のこれまで知られている変化と関連する。

物質間の相互関係を図 1 にまとめた。

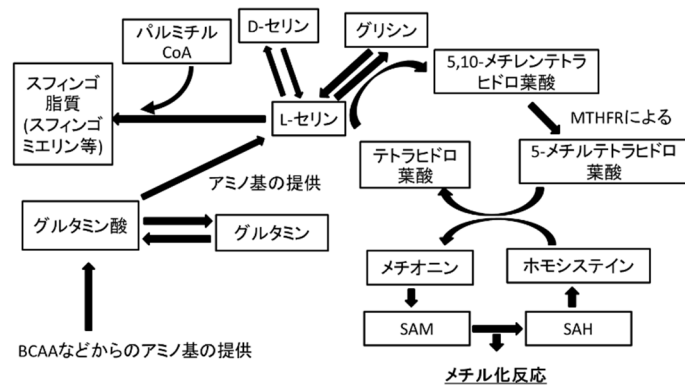


図1. 各種物質の相関図:
SAM: S-adenosyl methionine, SAH: S-Adenosyl-L-homocysteine, BCAA: Branched Chain Amino Acids, MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase

2. 研究の目的

本研究で測定する物質の相関図(図 2)を基に、構造方程式モデリング法(Structure Equation Model: SEM)によって各種測定値の相関を調べる。その際年齢や性別、罹病期間、喫煙の状態、治療薬の内容も因子として組み入れることで、統計学的な補正を行う。各種物質の測定は過去の報告に沿って行う。こうした手法で患者と健常人で比較するとともに各種物質と臨床症状との関連

の関係もSEMで解析予定とした。臨床症状としてはPositive and Negative Syndrome Scale: PANSSにて臨床症状を、Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia: BACSにて認知機能を測定する。こうした検討はこれまでに報告されている各種物質と臨床症状の関係を、各種物質間の相互関係を補正して評価することができる。こうした視点からも統合失調症で認められる現象のうち、どのようなものが本質的に疾患と関連しているのかを明らかにしてゆくことができると期待した。

本研究は、以上のような検討を通してこれまでに得られてきた統合失調症に関する知見を可能な限り統合し、観測される現象の本質を統計学的により詳しく探るとともに、疾患克服への足がかりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

I. 検体等情報の収集

研究参加の同意を得た被験者より採血を行って、血中の物質を測定する。患者の検体を収集する際には内服内容、臨床症状評価(Positive and Negative Syndrome Scale: PANSSにて臨床症状を、Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia: BACSにて認知機能を測定する)を行い、後の解析に使用した。

II. 物質の測定

図2内に示された物質を測定した。測定は High performance liquid chromatography (HPLC)を用いた。

III. 反応経路の比較

測定された物質間の関係性を図1,2に従って Amos ver.22.0 を用いて構造方程式モデリング法(SEM)にて解析した。SEMではモデル図の中の経路全ての関係性を同時に統計学的に評価でき、お互いの関係を補正した上での本質的(有意)な関係(反応経路)を見いだすことができる。

なお、実際の解析では図の経路以外に内服内容、年齢、性別、罹病期間、喫煙習慣を外生因子として加えることで補正した。パス図を考慮しない解析としては重回帰分析もしくはロジスティック回帰分析を行った。

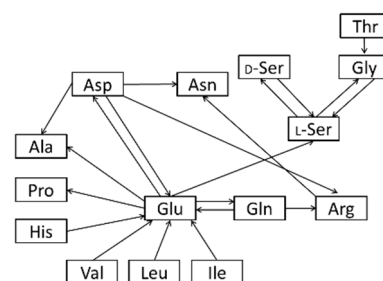


図2 各アミノ酸の関係図: Glu: グルタミン酸, Gln: グルタミン, L-ser: L-セリン, D-ser: D-セリン, Gly: グリシン, Thr: スレオニン, Val: バリン, Leu: ロイシン, Ile: イソロイシン, His: ヒスチジン, Pro: プロリン, Ala: アラニン, Asp: アスパラギン酸, Asn: アスパラギン, Arg: アルギニン

IV. 遺伝子情報の収集のための実験

- 遺伝子配列に関してはエクソン部分のリシークエンスを行う遺伝子配列を対象者ごとに決定する。リシークエンスには確実性や効率性を求めて、次世代シーケンサーであるサーモフィッシャーサイエンス社の Ion PGE を使用した。
- 対象者より PAXgene™ Blood RNA System にて RNA を採取、cDNA を作成した後 Stratagene Mx3000P を用いて定量的 PCR を行い、PHGDH, PSAT1, PSP の各 mRNA 発現量を求め、housekeeping gene である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) もしくは beta-actin の mRNA との比を求めた後、統合失調症患者と健常者の mRNA 発現量を Mann-Whitney の U 検定で比較した。mRNA 発現量は定量的 PCR 法を用い $\Delta\Delta C_t$ 法を用いる。プローブは Applied Biosystems 社の既製品を用いた。

なお検体の収集・測定に当たっては、獨協医科大学生命倫理委員会の承認を得て、被験者本人に文章にて説明を行い自筆署名にて同意の確認を行う。

4. 研究成果

I. 血中アミノ酸濃度とアミノ酸と統合失調症

a. 健常人との比較

統合失調症患者 127 名(男性 66 名、女性 61 名、平均年齢 48.1±12.6、喫煙 41 名、平均罹病期間 23.7±13.0 年 PANSS 得点 74.3±18.3 [陽性尺度 15.1±5.7 陰性尺度 22.9±6.6]、BACS-J composite score 175.4±52.7)を対象にグルタミン酸、グルタミン、L-セリン、D-セリン、グリシン、メチオニン、ホモシステイン及びこれら物質と代謝的に関連が深いアミノ酸である L-アラニン、D-アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、アルギニン、プロリン、ヒスチジンの測定を行った。アミノ酸の生合成に併せたパス図を作成して共分散構造分析を行ったが、数学的に適切なモデルの作成に至らなかった。そこで、各アミノ酸の測定値と健常人 64 名(男性 37 名、女性 27 名、平均年齢 48.8±11.8、喫煙 14 人)とロジスティック解析で比較したところ、L-Ala が統合失調症患者で有意に上昇していた(p=0.004、年齢性別喫煙で補正)

b. 統合失調症臨床症状と血漿アミノ酸濃度

統合失調症患者で血中アミノ酸濃度とパス解析を SPSS AMOS26 を用いて行ったが、数学的に良いモデルが得られなかった。重回帰分析では、注意と情報処理速度が、Glu ($\beta=0.36$, $p<0.001$), D-Ala($\beta=-0.36$, $p<0.001$), D-Ser ($\beta=-0.32$, $p<0.001$)と関連していた。PANSSP positive が L-Ser と関連していた($\beta=0.21$, $p=0.021$)。

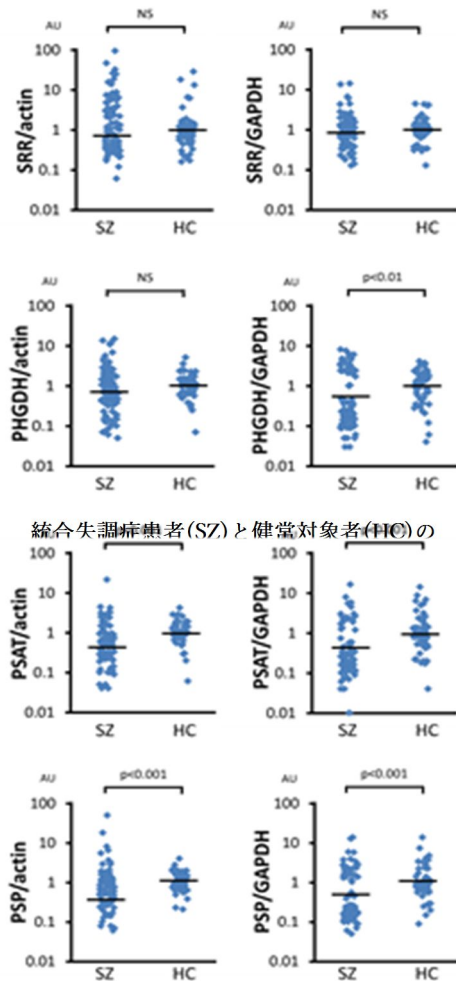
II. セリン合成酵素の遺伝子解析

85 名でセリン合成酵素(PHGDH, PSPH, PSAT1)の遺伝子配列をリシークエンスしたところ、PHGDH で希な変位を伴って L-セリン濃度が上昇もしくは低下している被験者各一名を見出した(表参照)。それぞれの遺伝子変異に missense1,2 と仮に命名し、各々の変異を PHGDH 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作成し、HEK293 細胞に導入したところ、L-セリン濃度が低下している患者で認められた変異の導入では、コントロールに比べ D-セリン濃度の低下、グリシン濃度の低下傾向が認められた。検体数が少なく統計的な検定を行えなかった。

	frequency	amino acids (average), μM		
		L-serine (86.0±20.4)	D-serine (1.46±0.58)	glycine (184.3±62.0)
missense 1	0.0008%	122.7	3.32	423.3
missense 2	0 - 0.2%(east Asia)	69.7	1.61	133.5

表. 統合失調症患者の PHGDH 遺伝子を対象としたリシークエンス n=85. 2 名で希な変異が見つかり、missenes1,2 と命名した。アミノ酸濃度は赤で示したものが健常人の値の 3SD を超えて上昇していた。青で示したものは健常人の値の 2SD を超えて低下していた。Missense1 では L-serine が増加、missense2 では L-セリンが減少していた。

III. セリン合成酵素の血中 mRNA 発現量



PSAT1 及び PSP の mRNA の発現量は GAPDH もしくは beta-actin の mRNA の発現量との比を用いた検討で共に統合失調症患者で有意に低下していた ($p<0.001$)。PHGDH に関しては GAPDH との比を用いた比較では統合失調症患者で低下していたが ($p<0.01$)、beta-actin との比を用いた検討では統合失調症患者で低下傾向にあったものの、有意な違いは見いだされなかった ($p=0.037$)。SR (serine racemase) の mRNA 発現量は患者群と健常者群で違いは見られなかった。

5. 考察

今回の結果を 1 つの視点から説明することは難しい。当初の検討課題の一つであった L-セリンと統合失調症との関連においては少なくとも陽性症状と血中濃度との間に関係が認められた。しかし、統合失調症患者で必ずしも L-セリンが上昇したり低下したりしている状況ではないことが今回の検討からは明らかになった。このことは L-セリンが統合失調症の修飾因子として作用している可能性が考えられた。すなわち何らかの統合失調症リスクがある人では L-セリン濃度が高い体質の人で病状が悪化しやすいもしくは発症しやすい可能性が考えられた。ただし L-セリン合成酵素の血液中 mRNA 発現量が一部統合失調症患者で変化していることは統合失調症発症にも L-セリンが何らかの関係を持っている可能性は考えられた。

統合失調症患者で健常者と比較して血漿中 L-アラニンが低下していることが認められたが、実際に統合失調症の病状とどのように関係しているかはを明らかにするには今後の検討が必要である。

今回の検討で、血漿中のアミノ酸濃度が統合失調症に何らかの関連がある可能性が認められ治療法の開発や発症メカニズムの解明の糸口となる可能性が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Maekawa, Jinnoh, Matsumoto, Narita, Mashima, Takahashi, Iwahori, Saigusa, Fujii, Abe, Higaki, Yamauchi, Ozeki, Shimoda, Tomioka, Okuyama, Eto, Ohno, Clayton, Yamaguchi, Mano	4. 巻 20
2. 論文標題 Structural Determination of Lysosphingomyelin-509 and Discovery of Novel Class Lipids from Patients with Niemann-Pick Disease Type C	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5018 ~ 5018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/ijms20205018	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 Shinozaki Masataka, Pierce Jason, Hayashi Yuki, Watanabe Takashi, Sasaki Taro, Komahashi-Sasaki Hazuki, Akiyama Kazufumi, Kato Kazuko, Inoue Yoshimasa, Tsuchimine Shoko, Yasui-Furukori Norio, Ozeki Yuji, Shimoda Kazutaka	4. 巻 52
2. 論文標題 8-Hydroxylation and Glucuronidation of Mirtazapine in Japanese Psychiatric Patients: Significance of the Glucuronidation Pathway of 8-Hydroxy-Mirtazapine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmacopsychiatry	6. 最初と最後の頁 237 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-0918-6408	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 Akiyama Kazufumi, Saito Atsushi, Saito Satoshi, Ozeki Yuji, Watanabe Takashi, Fujii Kumiko, Shimoda Kazutaka	4. 巻 17
2. 論文標題 Association of genetic variants at 22q11.2 chromosomal region with cognitive performance in Japanese patients with schizophrenia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Schizophrenia Research: Cognition	6. 最初と最後の頁 100134 ~ 100134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.scog.2019.100134	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 Fujii Kumiko, Okayasu Hiroaki, Shinozaki Takahiro, Shimoda Kazutaka, Ozeki Yuji	4. 巻 74
2. 論文標題 Slower titration of lamotrigine reduces the risk of rash	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 282 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12987	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuji Ozeki
2. 発表標題 The relationship between peripheral amino acids alteration and symptoms of schizophrenia including neurocognitive dysfunction.
3. 学会等名 WFBS 2018 KOBE (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾関祐二、関根正恵、藤井久彌子、高野有美子、岡安寛明、篠崎隆央、渡邊崇、青木顕子、青木秀明、森玄房、秋山一文、本間浩、下田和孝
2. 発表標題 統合失調症患者におけるL-セリン合成酵素の遺伝情報と臨床症状との関係の検索
3. 学会等名 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会 合同年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾関祐二、関根正恵、藤井久彌子、岡安寛明、秋山一文、本間浩、下田和孝
2. 発表標題 血漿中アミノ酸濃度と認知機能の関係：構造方程式モデリングを用いた評価
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾関祐二 藤井久彌子 Katja Koelkebeck 下田和孝
2. 発表標題 統合失調症患者における神経発達症合併の臨床経過への影響の評価
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Ozeki, Masae Sekine, Kumiko Fujii, Takashi Watanabe, Hiroaki Okayasu, Yumiko Takano, Takahiro Shinozaki, Akiko Aoki, Hideaki Aoki, Harunobu Mori, Kazufumi Akiyama, Hiroshi Homma, Kazutaka Shimoda
2. 発表標題 Relationship between peripheral amino acid concentration and diagnosis and severity of schizophrenia using structural equation modeling analysis
3. 学会等名 International Congress on Schizophrenia Research (国際学会)
4. 発表年 2017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	藤井 久彌子 (Fujii Kumiko) (70314151)	滋賀医科大学・医学部・准教授 (32203)	