

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：	基盤研究 (C)
研究期間：	2007～2008
課題番号：	19591359
研究課題名 (和文)	統合失調症の認知機能障害とコンプレキシンの変化—末梢血での検討
研究課題名 (英文)	Alteration of concentration of complexin and cognitive function in schizophrenic patient : investigation using peripheral blood lymphocytes
研究代表者	
	加藤 邦夫 (KATO KUNIO)
	高知大学・教育研究部医療学系・教授
	研究者番号 : 70346708

研究成果の概要:

統合失調症患者とコントロールの末梢血を顆粒球、リンパ球に分けて、コンプレキシン2、D3RとD4Rの発現量をリアルタイムRT-PCR法を用いて定量した。コンプレキシン2は末梢血での発現量は少ないにもかかわらず、死後脳研究と同様に末梢血でも変化があることが確認された。同様にD4Rは、以前の報告されているように作業記憶と関与しており、末梢血での変化は認知機能障害を反映する可能性があった。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症、末梢血、リンパ球、コンプレキシン、D3R、D4R、リアルタイムRT-PCR法

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の診断には、有用な客観的検査所見が無く、面接による特定の精神病理的現象を観察した精神科医の判断に基づいている。客観的で簡便な検査法の開発が求められている。

2. 研究の目的

いくつかの研究で、統合失調症のリンパ球や血小板などの末梢血での神経成長因子の減

少やドーパミンレセプターの変化があることが報告されている。統合失調の末梢血と前頭野での遺伝子発現量の関係は約半数が関連しているという報告もある。統合失調症死後脳で明らかな変化が確認された分子で、末梢血と死後脳の相関があることが明らかとなれば、末梢血でのその分子の定量を行えば、臨床診断が可能となる。このため、この研究を計画した。

3. 研究の方法

(1)対象

DSM-IVで統合失調症と診断された患者のうち、同意が得られた12名(56±12歳、男性8名)と健常コントロールの11名(44±12歳、男性3名)が研究に参加した。患者群は、陽性・陰性症状評価尺(Positive and Negative Syndrome Scale;PANSS)と統合失調症認知機能簡易評価尺度(The Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia;BACS)を評価された。この研究は、高知大学医学部倫理委員会において承認された。

(2)サンプル

末梢血は、午前10時から12時の昼食前に採血し、得られた末梢血は、1時間以内にモノホリ分離溶液(DSファーマバイオメディカル)に重層、遠心して、リンパ球と顆粒球を分離した。

(3)定量的RT-PCR法

リンパ球と顆粒球のtotal RNAはTRIzol(invitrogen)を用いて単離した。Total RNA(0.5μg)はランダム6mersとoligo dT primer(TaKaRa)の存在下にprimerscript reverse transcriptase(TaKaRa)を用いて逆転写した。そのcDNAはFastStart Universal Probe Master(ROX)(Roche)で増幅した。反応はABI PRISM 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems)にて行った。反応条件は50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 42 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 minで行った。プライマーとプローブはUniversal ProbeLibrary Assay(<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>) programsでデザインした。standard sampleの希釈系列を用いて目的遺伝子とリファレンス遺伝子(b-actin)のそれぞれの検量線を作成し、それに基づいて相対発現量を算出した。b-actin遺伝子の相対発現量の値を用いて目的遺伝子の発現量を標

準化することで、比較解析を行った。リンパ球、顆粒球のコンプレキシン1と顆粒球のD3Rは、発現が少なく、定量が出来ず、以降の検討を行わなかった。

(4)統計学的解析

統計学的解析は全てSPSS ver. 15によって行なわれた。サンプル間の差異を見るために、性別はカイ2乗解析、年齢のデータのテストはマンホイットニーテストで行なわれた。性別と年齢が目的遺伝子産物の発現量に影響を与えていないか評価するために、General linear model, multivariate analysisを行なった。目的遺伝子 mRNA の発現量の交絡因子の影響を除くために、Spearman 相関を用いて、年齢、薬物量、罹病期間をコンプレキシン2、D3RとD4Rとの相関を調べた。また、同様にSpearman相関を用いて、PANSSのサブスケールやBACSのサブスケールとコンプレキシン2、D3RとD4Rの発現量との相関を評価した。

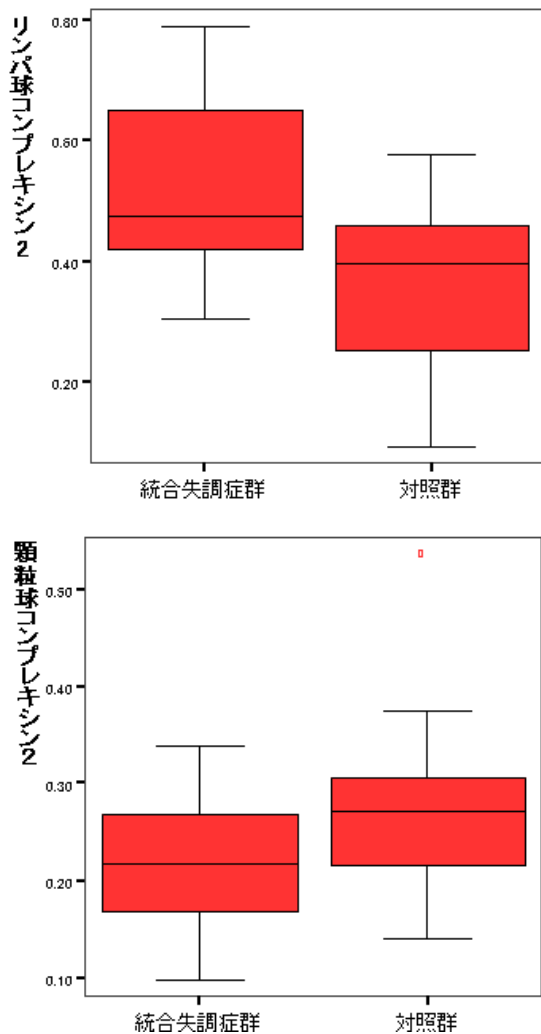
4. 研究成果

(1)コンプレキシン2の発現

① 結果

統合失調症群と対照群の年齢と性別が異なっているため、検討をしたが、コンプレキシン2に対する年齢と性別の影響は認められなかった。コンプレキシン2は統合失調症群(0.516±0.158)と対照群(0.358±0.143)を比べると、統合失調症リンパ球での統計学的に有意に発現が減少していた(p=0.023)(図1)。顆粒球は統合失調症群が(0.217±0.810)、対照群が(0.281±0.100)であり、統計学的に有意な変化は認められなかった。

図1



② 議論

我々の検討ではコンプレキシン2の発現量に対する年齢、性別、抗精神病薬の影響は統計学的に有意ではなかった。大脳皮質のコンプレキシン2は、興奮性ニューロンで主に発現し、当初の統合失調症の死後脳研究では、コンプレキシン1より多くの減少を認め、統合失調症の興奮神経障害仮説を示唆するものと報告された。パーキンソン病やアルツハイマー病、ハンチントン病、ウェルニッケ脳症などの神経精神疾患での変化も報告されており中枢神経系での変化があることが分かっているが、その機構は明らかでない。

われわれの研究では、リンパ球コンプレキシン2の増加が示されており、脳神経の変化がどのように末梢に反映されているか、分からない。脳神経系の減少を代償するために増加する

可能性もある。マスト細胞におけるコンプレキシンのノックダウン研究で Ca^{2+} の流入による脱顆粒が抑制されることが示されており、コンプレキシン2の上昇がリンパ球での細胞からの放出過程を促進している可能性がある。この脳神経系との矛盾した結果に関して、SNAREタンパクの発現を同様に確認すれば興味深い結果が得られると思われる。一般に中枢神経系と末梢ではSNAREタンパクの発現するサブタイプが異なる。またコンプレキシンもコンプレキシン3,4の発現が有ることが示されており、これを調べることも重要であろう。

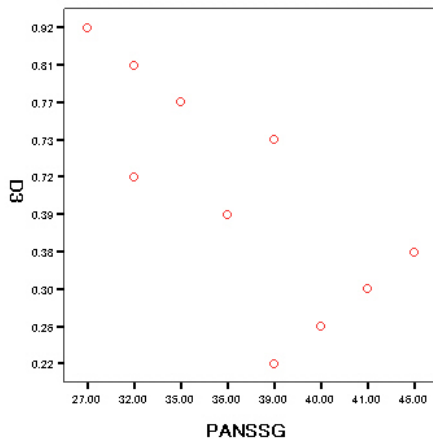
(2) 末梢血でのD3RとD4Rの発現

① 結果

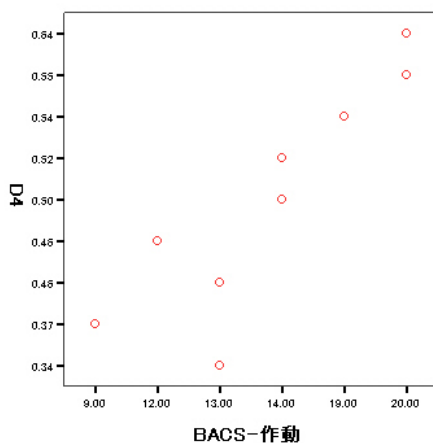
リンパ球のD3RとD4Rの相対発現量はD3Rが(統合失調症患者の平均: 0.551 ± 0.264 , コントロールの平均: 0.629 ± 0.270)。D4Rが(統合失調症患者の平均: 0.484 ± 0.089 , コントロールの平均: 0.513 ± 0.113)。顆粒球D4Rの発現量は(統合失調症患者の平均: 0.440 ± 0.167 , コントロールの平均: 0.439 ± 0.125)であった。いずれも統計学的に有意ではなかった。

次に統合失調症の中でのD3RとD4R発現量と臨床測定値との相関を調べた。罹病期間、薬のクロムゾリド換算量、BACS、PANSSのサブスケールとD3R、D4Rの相関を計測した。罹病期間とD3RとD4Rの発現量との相関は統計学的解析に有意差は無く、薬物量との相関も有意差は無かった。多くのサブスケールの中で、リンパ球D4R発現量とBACSの作業記憶サブスケールと強い正の相関を示していた($r=0.895$ $P=0.001$)。リンパ球D3Rは総合精神病理尺度と逆相関を示した($r=-0.768$ $p=0.009$) (図2)。

図 2 D3 相対発現量と PANSS 総合精神病理スコアの相関



D4 相対発現量と BACS 作業記憶スコアの相関



②考察

我々は、リンパ球での D3R の発現量が上昇し、D4R の発現量が低下するという以前の報告を追試できなかった。末梢血におけるドーパミンレセプターは、薬に影響を受ける可能性が強いと考えられるが、服薬量との相関は無かった。また罹病期間や精神病理の重症度との関与も無かった。この研究で発現量の差異が無かったのは患者群の臨床症状などの違いがあったのかもしれない。

統合失調症患者の中で、リンパ球 D3R が PANSS

の総合精神病理尺度と負の相関を示したが、その他の PANSS、認知機能などとの関連は無かった。D3R は、辺縁系に多く存在しており、死後脳研究では、辺縁系のドーパミン受容体 D3R が抗精神病薬非服薬患者で増加していた。リンパ球、T 細胞で統合失調症での増加が報告されている。この研究での D3R での総合精神病理との逆相関は、統合失調症で D3R が増加するという以前の結果の一部を示唆するものかもしれない。すなわち非定型の症状、不安やうつ状態などを示す、統合失調症の多い集団であれば以前の報告のように統合失調症において D3R の増加を示すかもしれない。

リンパ球 D4R は、BACS の作業記憶の点数と強い正の相関があることが明らかとなったが、その他の精神病理尺度や認知機能とは相関が無かった。今回の結果は、統合失調症の作業記憶とリンパ球の D4R の発現量が正の相関を示し、中枢の D4R の発現の変化を反映している可能性がある。D4R は新規抗精神病薬と認知機能との関係が研究されている。機能的 MRI を用いた作業記憶の研究では、D4R の遺伝子多型と作業記憶が相関するという報告が有る。最近、電気生理実験で D4R は NMDA 機能低下に関与し、また GABAA の機能低下させることから前頭葉の錐体神経の機能不全を来とし、作業記憶の障害を来しているという報告が有った。このようなデータを総合すると、D4R の脳内(前頭葉)での低下が作業記憶を減少させるとともに、その中枢での発現量の低下がリンパ球の D4R の低下させている可能性がある。この結果が、統合失調症のみで起こるのかははっきりとしないため、今後、正常コントロールでの認知機能評価を行い、変化を見る必要がある。

リンパ球と顆粒球における D3R と D4R の発現量を調べたが、顆粒球での変化は、臨床指標との相関を示すことは無かった。リンパ球がよ

り脳組織との変化と関与している可能性がある。多発性硬化症などの神経変性疾患などでは、脳血液関門を通りリンパ球は脳との交流をするという報告があり、統合失調症でも同様に中枢の病態を反映している可能性がある。今回の我々の研究では T 細胞を分離することは無かったが、T 細胞は脳との交流を行う候補として重要な細胞としてあげられており、研究する上で重要である。今後 T、Bリンパ球を分けることによってより臨床に有用なデータが蓄積できると思われる。

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 1 件)

① 加藤邦夫、西原真理、澤田健
「統合失調症と complexin」 Schizophrenia
Frontier, in press

[学会発表] (計 3 件)

① 澤田健、都留英美、加藤邦夫、統合失調症患者の末梢血におけるドーパミンレベルと mRNA 発現量の予備的解析、第4回統合失調症学会、2009年1月31日、大阪

② 河野充彦、澤田健、加藤邦夫、高坂要一郎、須藤浩一郎、初発統合失調症患者の大脳基底核への精神病抗精神病薬の影響—構造的 MRI を用いた解析、第4回統合失調症学会、2009年1月31日、大阪

③ F. MITSUYAMA, Y. KATO, K. KATO, K. MIKOSHIBA, K. KARAGIOZOV, T. Redistribution of microtubules in dendrites of hippocampal CA1 neurons after tetanic stimulation during Long-Term Potentiation, 38th Society for Neuroscience Meeting, Washington DC,

Nov. 17, 2008

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 邦夫 (KATO KUNIO)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：70346708

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

都留 英美 (TSURU EMI)
高知大学・総合研究センター
生命機能物質部門・助教
研究者番号：70380318

(4) 研究協力者

澤田 健 (SAWADA KEN)
高知県立芸陽病院・副院長