

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790053

研究課題名（和文） プロテオーム解析による統合失調症関連分子の同定

研究課題名（英文） Proteomics analysis in schizophrenia

研究代表者

永井 拓(NAGAI TAKU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：10377426

研究成果の概要：本研究では、統合失調症患者のリンパ芽球様細胞株を樹立し、タンパク質の発現変化について解析した。二次元電気泳動により約900個のスポットが検出され、15個のスポットに有意な発現変化が認められた。統合失調症患者群では酵素、トラフィック、シグナル伝達、細胞骨格、タンパク分解、酸化ストレスおよびプロテアソームに關与するタンパク質の発現が変化していた。以上の結果から、統合失調症患者のリンパ芽球様細胞株において発現が変化するタンパク群が存在し、統合失調症関連分子である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：統合失調症

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、罹患率が1%と高く、多くの症例は青年期に発症して以来、長期にわたって学業面でも就労面でも患者の社会的機能を低下させる結果を生み、加えて10%は自殺既遂に至る。また、現在可能な薬物、心理社会的治療を行ったとしても十分な治療効果を得られない症例が2/3に達することから、統合失調症の病態を解明し、病態に即した治療法・予防法を見いだすことは、社会的要請の高い研究課題である。

統合失調症の病態は明確化されていない

が、ドパミン受容体拮抗作用を有する抗精神病薬が陽性症状を軽減させること、逆にアンフェタミンやコカインなどのドパミン作動薬が症状を悪化させることが知られている。その他、フェンシクリジンやケタミンなどのグルタミン酸受容体拮抗薬は統合失調症の陽性症状と陰性症状の両者に類似した症状を引き起こすことが報告されている。したがって、統合失調症の病態には、ドパミン作動性神経の過活動およびグルタミン酸作動性神経の機能低下が関与していると考えられている。我々は、フェンシクリジンを連続投

与したマウスにおいて意欲低下や社会性行動障害および認知障害（潜在学習や連合学習）などの陰性症状様の異常行動が発現することを世界に先駆けて報告し、治療薬の評価系を既に確立してきた。しかし、既存の薬物の臨床的効果に限界があることを考えると、これまでとは異なる治療標的の探索が必須と考えられる。

養子研究や双生児研究により統合失調症発症に遺伝因子が関与していることが実証されているが、一卵性双生児であっても統合失調症不一致例が存在する。すなわち、統合失調症に遺伝因子以外の因子も関与していることを示唆しているが、その詳細は不明である。また、統合失調症の発症時期が心理社会的成長に最も重要な時期である思春期および青年期に多いことから、我々は症状が不完全な状態から診断可能な状態へ移行するのにタンパク質の発現や翻訳後修飾などが関与していると考えている。

一方、ポストゲノム時代の到来により、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析に代表される網羅的解析法が注目されているが、これらの研究手法を用いることにより、既存の仮説に囚われることなく病態を捕らえることが可能となった。また、2005年、遺伝子領域以外のゲノム領域が遺伝子発現に重要な役割を果たしていることが確認され、遺伝子・蛋白発現と病態の関連性を検討する重要性が高まっている。マイクロアレイにより得られた情報は網羅性が高く、mRNAの発現変化を示している。また、プロテオーム解析はタンパク質の発現変化だけではなく、様々な翻訳後修飾に関する情報を得ることが可能である。

2. 研究の目的

上記の観点を踏まえて、本研究の目的は、統合失調症新規関連分子の同定を試みるとともに創薬標的の可能性について検討することである。これまでの統合失調症患者に関するプロテオーム解析について、死後脳を用いた研究報告がされているが、問題点として死後変化および治療薬の影響を受けている可能性を否定できない。そこで、末梢血液からリンパ球を株化したリンパ芽球様細胞株をサンプルとした。統合失調症患者および健康人のサンプルからタンパク質を抽出し、異なる蛍光ラベルしたタンパク質を同一ゲル内で二次元電気泳動を行い、発現変化を直接比較検討した。さらに、質量分析法によりタンパク質の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 末梢血液の採取

構造化面接で診断を確定させ、抗精神病薬治療反応性、認知機能、MRI morphometry

を確認した統合失調症患者 10 名、SCID で精神障害を除外した正常対照者 10 名の末梢血液を採取した。なお、臨床データと末梢血液の採取に関しては、名古屋大学大学院医学系研究科精神医学分野（尾崎紀夫教授）の協力を得て行った。

(2) リンパ芽球様細胞株の作製

Ficoll-Conray 液により末梢血液からリンパ球を分離精製した。精製したリンパ球を Epstein-Barr virus (EBV) により不死化させ株化したリンパ芽球様細胞株を調製した。

(3) 二次元電気泳動

統合失調症患者および健康人のサンプルから抽出したタンパク質を、Cy3 または Cy5 で蛍光ラベルし同一ゲル内で等電点電気泳動および二次元電気泳動を行った。泳動後のタンパク質は蛍光イメージスキャナーにて可視化し、スポット発現解析ソフトを用いて発現量の変化を直接比較検討した。

(4) タンパク質の同定

二次元電気泳動により発現に変化が認められたスポットを質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いてペプチドを決定し、データベース (Mascot) 検索により分子の同定を行った。

4. 研究成果

リンパ芽球様細胞株の樹立に要した日数は正常対照者群で 29 ± 2 日、統合失調症患者群で 34 ± 5 日であり、得られた細胞数についても両群間に有意な差は認められなかった。

二次元電気泳動によってタンパク質を分離した結果、約 900 個のスポットが検出された。各群の検出されたスポット数の平均は正常対照者群が 905 ± 7 個、統合失調症患者群が 899 ± 10 個であった (図 1)。さらに、個々のスポットについて解析した結果、15 個のスポットに有意な発現変化が認められた (表 1)。統合失調症患者群において正常対照者群に比べて発現が増加したスポットが 8 個、逆に発現が減少したスポットが 7 個検出された。発現変化が認められたスポットのうち統合失調症患者で最も発現が増加したスポットは正常対照者群の約 1.9 倍であり、最も発現が減少したスポットは正常対照者群の約 0.6 倍であった (表 1)。統合失調症患者群では酵素、トラフィッキング、シグナル伝達、細胞骨格、タンパク分解、酸化ストレスおよびプロテアソームに関与するタンパク質の発現が変化していた (図 2)。

以上の結果から統合失調症患者のリンパ芽球様細胞株において発現が変化するタンパク質が存在することが明らかとなった。今後は統合失調症関連分子であるかどうかを

検討するため、症例数を増加させるとともに発現に差が認められたタンパク質について、機能解析を行う予定である。

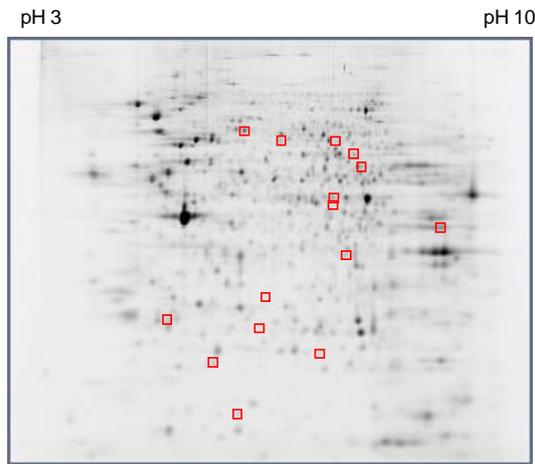


図 1. リンパ芽球様細胞株から抽出したタンパク質の二次元電気泳動図。
二次元電気泳動によって分離されたスポットについて発現解析を行った結果、15個のスポット(枠)に有意な発現変化が認められた。

表 1. 統合失調症患者由来リンパ芽球様細胞株において発現変化が認められたスポットの一覧。

スポット番号	発現比	分子量 (kDa)	等電点
1	0.769	26	5.1
2	0.798	21	5.5
3	0.763	26	5.7
4	0.728	29	5.8
5	0.632	71	5.9
6	0.861	23	6.1
7	0.794	65	6.6
8	1.089	18	5.5
9	1.270	76	5.7
10	1.434	47	6.2
11	1.425	71	6.3
12	1.194	35	6.4
13	2.033	46	6.2
14	1.238	59	6.7
15	1.878	39	8.1

発現比は正常対照者群に対する変化を示している。分子量および等電点はスポットの移動度より算出した。

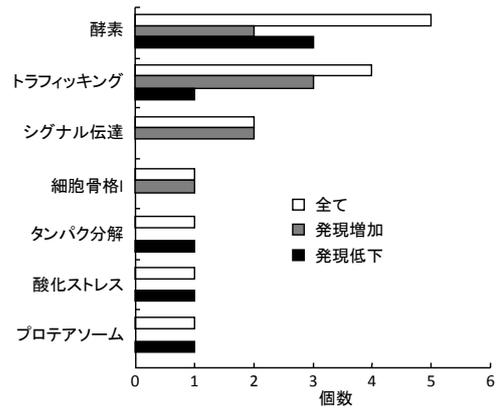


図 2. 同定されたタンパク質の機能的分類

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 5 件)

- ① Nagai, T., Murai, R., Matsui, K., Kamei, H., Noda, Y., Furukawa, H. and Nabeshima, T. Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D₁ and serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Psychopharmacology* 202, 315-328, 2009. 査読有
- ② Fukakusa, A., Nagai, T., Mizoguchi, H., Otsuka, N., Kimura, H., Kamei, H., Kim, H-C., Nabeshima, T., Takuma, K. and Yamada, K. Role of tissue plasminogen activator in the sensitization of methamphetamine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 105, 436-444, 2008. 査読有
- ③ Ito, M., Nagai, T., Mizoguchi, H., Fukakusa, A, Nakanishi, Y., Kamei, H., Nabeshima, T., Takuma, K. and Yamada, K. Possible involvement of protease-activated receptor-1 in the regulation of morphine-induced dopamine release and hyperlocomotion by the tissue plasminogen activator-plasmin system. *J. Neurochem.* 101, 1392-1399, 2007. 査読有
- ④ Nagai, T., Takuma, K., Dohniwa, M., Ibi, D., Mizoguchi, H., Kamei, H., Nabeshima, T. and Yamada, K. Repeated methamphetamine treatment impairs spatial working memory in rats: reversal by clozapine but not haloperidol. *Psychopharmacology* 194, 21-32, 2007. 査読有

- ⑤ Ito, M., Nagai, T., Mizoguchi, H., Sato, K., Hayase, M., Otsuka, N., Fukakusa, A., Kumagai, N., Kim, H-C., Nabeshima, T., Takuma, K. and Yamada, K. Activation of postsynaptic dopamine D1 receptors promotes the release of tissue plasminogen activator in the nucleus accumbens via PKA signaling. J. Neurochem. 103, 2589-2596, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

- ① 永井拓, 衣斐大祐, 溝口博之, 鍋島俊隆, 山田清文. 周産期における免疫異常は思春期マウスにおける情動および認知機能を障害する. 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(京都), 2008, 12, 20-21.
- ② 永井拓, 北原裕子, 衣斐大祐, 山田清文. 周産期 polyinosine:polycytidylic acid 投与による精神機能発達およびグルタミン酸作動性神経系の変化. 第119回マイクロダイアリシス研究会(東京), 2008, 12.6
- ③ 永井拓, 鍋島俊隆, 山田清文. モルヒネ誘発性精神障害における tPA-プラスミンシステムの役割(日本生物学的精神医学会合同シンポジウム). 第51回日本神経化学学会大会(富山), 2008, 9, 11-13.
- ④ 永井拓, 村井里菜, 松井香奈枝, 亀井浩行, 野田幸裕, 古川宏, 鍋島俊隆. フェンシクリジン誘発認知記憶障害に対するアリピプラゾールの効果. 第81回日本薬理学会年会(横浜), 2008, 3, 17-19.
- ⑤ 永井拓, 田熊一徹, 溝口博之, 鍋島俊隆, 山田清文. 組織プラスミノゲン活性化因子による依存性薬物の報酬効果の制御(シンポジウム). 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会合同年会(札幌), 2007, 7, 11-13.

6. 研究組織

(1)研究代表者

永井 拓 (NAGAI TAKU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：10377426