

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07208

研究課題名(和文)糖化ストレスが関与する治療抵抗性統合失調症の原因物質と発症機序に関する研究

研究課題名(英文) Study of pathogenic mechanism in treatment-resistant schizophrenia involved in glycative stress

研究代表者

小笠原 裕樹 (Ogasawara, Yuki)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20231219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：カルボニルストレス性統合失調症(CS-SCZ)モデルマウスの構築に成功し、その脳の海馬や前頭前皮質及び側坐核におけるメチルグリオキサル(MGO)濃度の有意な上昇を明らかにした。次いで、MGOが増大しているモデルマウスの海馬において、7種のMGOを前駆体としてアルギニン残基の修飾によって生じる、メチルグリオキサルヒドロイミダゾロン(MG-H1)化タンパク質の蓄積を証明した。

従って、CS-SCZ患者の海馬におけるMG-H1化タンパク質の蓄積に伴う統合失調症様行動を解析し、それらの相関関係を明らかにすることで、本研究成果を基礎としたCS-SCZ発症機序解明に繋がる展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現段階においては、カルボニルストレス性統合失調症におけるAGEsの脳内蓄積と、その発症機序への関与は不明であるが、今後、in vivo ノックダウン等の手法により、本研究で見出された、マウス海馬において糖化の亢進が認められたCK-mitを含む7種タンパク質の統合失調症様行動への関与を検証することにより、発症機序解明の糸口を見出すことが望まれる。更に、本研究を起点とするリバーストランスレショナな展開として、より特異的にMGOを無毒化して糖化を抑制することを作用機序とする、カルボニルストレス性疾患の新しい治療薬が開発される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, glyoxalase 1(Glo1)-knockout and vitamin B6-deficient mice [KO/VB6 (-) mice], which is susceptible to methylglyoxal (MGO)-induced oxidative damages, were used as a carbonyl stress-related schizophrenia (CS-SCZ) model to analyze the carbonyl stress status in the brain. A comparison between Wild/VB6(+) mice and KO/VB6(-) mice for accumulated carbonylated proteins, with several advanced glycation end products in the brain, revealed that carbonyl protein levels with the MGO-hydroimidazolone 1 (MG-H1) moiety were significantly increased in the hippocampus and prefrontal cortex regions of the brain in KO/VB6(-) mice. Moreover, 2-dimensional electrophoresis and LC-MS/MS analysis showed MG-H1-modified arginine residues in seven proteins in the hippocampus region of KO/VB6(-) mice. These results suggest that further studies focusing on MG-H1 modified and accumulated proteins in the hippocampus may reveal the onset mechanism of CS-SCZ induced by MGO-induced oxidative damages.

研究分野：分析化学

キーワード：カルボニルストレス 統合失調症 モデルマウス メチルグリオキサル MG-H1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、糸川ら(東京都医学総合研究所)により、腎機能が正常であるにも係らず、血液中でタンパク質のカルボニル化を経て生じる AGEs の一つであるペントシジン量が増加し、カルボニル化合物との反応により減少するビタミン B₆ 濃度が低下している統合失調患者が多く存在することが報告された[1]。更に、糸川らはカルボニル化合物を消去する活性型ビタミン B₆ の投与で、その症状が改善する治験症例を報告した[2]。しかし、血漿中 AGEs 濃度が高い腎不全や糖尿病性腎障害患者では統合失調症病態が見られないことから、本統合失調症は、脳における糖の吸収、代謝、排出過程で生じる何らかの異常が原因で起こると考えられているが、その発症のメカニズムに関する知見は得られていない。

(2) これまでに、我々は、カルボニルストレス性統合失調症(CS-SCZ)の診断マーカーの探索に取り組んだ結果、患者血液中にメチルグリオキサール(MGO)を前駆体として生成する糖化蛋白質の蓄積を見出した。従って、MGO が CS-SCZ の原因物質である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、当該患者に近い状態を模倣した疾患モデル動物において、MGO の発症への関与を検証する。具体的には、MGO 代謝酵素を欠損させ、MGO 消去作用を持つビタミン B₆(VB₆)の摂取を制限したマウスを用い、MGO を前駆体とする脳内糖化タンパク質を同定すると共に、糖化による構造や機能の変化を解析することで、発症機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

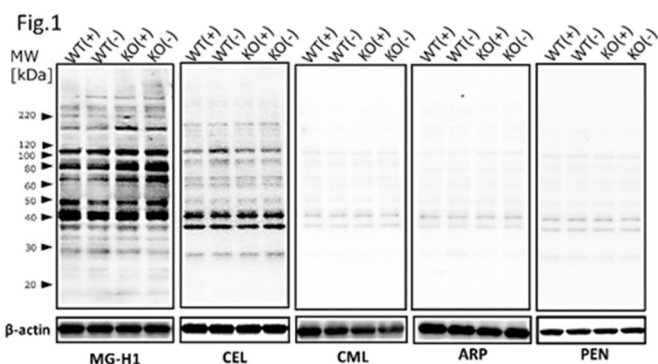
(1) 患者に近い状態を模倣した統合失調様行動を示すモデル動物[ビタミン B₆ 欠乏餌を与えたグリオキサラーゼ(GLO) 1 欠損マウス]を構築する。具体的には、KO(-)マウスは、GLO1 遺伝子をノックアウトした 8 週齢のマウスに VB₆ 欠損餌を 4 週間与えることにより作成した。また、8 週齢野生型(WT)マウスに通常餌を 4 週間与えたマウス[WT(+)]と、VB₆ 欠損餌を 4 週間与えた野生型マウス[WT(-)]及び 8 週齢の GLO1 ノックアウトマウスに通常餌を 4 週間与えたマウス[KO(+)]を同時に準備して、KO(-)マウスを含めた 4 群における比較において、行動実験を行うことで、統合失調症様行動を評価した。

(2) 疾患モデルマウスの脳内における MGO 濃度の変化を測定すると共に、MGO との反応により生じる糖化タンパク質の蓄積の有無を、カルボニルプロテオミクス解析法により明らかにすると同時に、その構造的、機能的な障害を解析する。

4. 研究成果

(1) VB₆ 欠乏餌を給餌した GLO1 KO マウス[KO(-)マウス]では、血漿中のホモシステインが増加し、前頭皮質(PFC) 海馬、線条体においてはメチルグリオキサールの蓄積が認められ、社会性行動障害や認知記憶障害、プレパルスインヒビション(PPI)抑制試験における感覚運動情報制御機能障害などの、統合失調症様の行動障害が示された。

(2) 4 群[GLO1-KO(±)、VB₆ 摂取(±)の組合せ]のマウス海馬ホモジネートを試料として、主に MGO との反応により生じることが知られている AGEs である、MG-H1、カルボキシエチルリジン(CEL)、アルグピリミジン(APR)に加え、ペントシジン(PEN)及びカルボキシメチルリジン(CML)の検出を行った。Fig.1 に示すように、KO(-)マウス海馬において、およそ 47kDa、64kDa 及び 78kDa に相当するタンパク質の有意な MG-H1 化の増大が認められた。



(3) Fig.1 より得られた結果から、更に解析を進めるため、二次元電気泳動によりタンパク質を更に分離して、LC-MS/MS による解析を行った。Fig.2 に示すように、KO(-)マウス海馬において見出された分子量 40 ~ 80kDa に相当する MG-H1 化されたタンパク質のスポットを CBB 染色と WB 法により決定し、そこに含まれる MG-H1 化タンパク質の同定を試みた。その結果、T-complex protein 1、Tubulin alpha-4A chain、Gamma enolase、Creatine kinase U-type, mitochondrial(CK-mit)、CRMP4、Beta-adrenergic receptor kinase 1、Synapsin-1 が同定され、

Table 1 に示すように、それぞれ MG-H1 化されたアルギニン残基が明らかになった。

Table 1

(4) 更に、CK-mit の MG-H1 修飾を受けている割合を、免疫沈降法によりコントロール [WT(+)] マウスと比較したところ、KO(-) マウスにおいて MG-H1 化が亢進

Spot	Accession No.	Protein Name	Coverage	Peptide Identification	Modified Residue
a	P80318	T-complex protein 1	55.23%	GASKEILSEVER*	R389
	P68368	Tubulin alpha-4A chain	32.14%	CDPR*HGKYMAC CLLYR*	R308,R320
b	P17183	Gamma enolase	30.41%	QR*YLGKGVLK	R56
c	P30275	Creatine kinase U-type, mitochondrial	39.23%	R*LER*GQDIR	R400,R403
d	O35098	CRMP4	32.69%	VVLEDGNLLVTPG AGR*	R467
e	Q99MK8	Beta-adrenergic receptor kinase 1	27.00%	YFYLFNRLEWR*	R591
f	O88935	Synapsin-1	69.69%	QR*QAGAPQATR*	R556,R565

していることが示された。そこで、CK-mit に注目し、その活性に関わるアルギニン残基を含む詳細な MG-H1 修飾部位の解析を行った結果、11ヶ所の MG-H1 化を受けたアルギニン残基を同定することができた。また、WT(+)及び KO(-)マウスの海馬における CK 活性を測定したところ、KO(-)マウスにおいて有意に活性が低下していることが解った。

今後、疾患モデルマウスを用いて CK-mit を含む 7 種のタンパク質のカルボニル化と統合失調症様行動の関連性を明らかにすることで、分子レベルにおける CS-SCZ 発症メカニズムの一端が解明されることが期待される。

<引用文献>

- [1] Arai M, et al., Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. Arch. Gen. Psychiatry, 67, 2010, 589-597.
- [2] Itokawa M, et al., Pyridoxamine: A novel treatment for schizophrenia with enhanced carbonyl stress. Psychiatry Clin. Neurosci., 72, 2018, 35-44.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koike Shin, Ando Chihiro, Usui Yosuke, Kibune Yosuke, Nishimoto Shoichi, Suzuki Toshihiro, Ogasawara Yuki	4. 巻 144
2. 論文標題 Age-related alteration in the distribution of methylglyoxal and its metabolic enzymes in the mouse brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research Bulletin	6. 最初と最後の頁 164 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainresbull.2018.11.025	査読の有無 無
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 Sugiura K, Koike S, Suzuki T, Ogasawara Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 Oxidative Formation of Methylglyoxal in Glycerol Preparations during Storage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 879-883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-01120	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 Koike S, Toriumi K, Kasahara S, Kibune Y, Ishida Y, Dan T, Miyata T, Arai M, Ogasawara Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Accumulation of Carbonyl Proteins in the Brain of Mouse Model for Methylglyoxal Detoxification Deficits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10040574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Toriumi Kazuya, Berto Stefano, Koike Shin, Usui Noriyoshi, Dan Takashi, Suzuki Kazuhiro, Miyashita Mitsuhiro, Horiuchi Yasue, Yoshikawa Akane, Asakura Mai, Nagahama Kenichiro, Lin Hsiao-Chun, Sugaya Yuki, Watanabe Takaki, Kano Masanobu, Ogasawara Yuki, Miyata Toshio, Itokawa Masanari, Konopka Genevieve, Arai Makoto	4. 巻 45
2. 論文標題 Combined glyoxalase 1 dysfunction and vitamin B6 deficiency in a schizophrenia model system causes mitochondrial dysfunction in the prefrontal cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 102057 ~ 102057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2021.102057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木船陽介、小池 伸、鈴木俊宏、石田洋一、鳥海和也、新井 誠、小笠原裕樹
2. 発表標題 疾患モデルマウスを用いたカルボニルストレス性統合失調症に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠原桜、小池伸、鳥海和也、新井誠、鈴木俊宏、小笠原裕樹
2. 発表標題 疾患モデルマウスの海馬に蓄積するAGEs含有タンパク質の解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内泰江、石川充、小幡菜々子、畠中真依、許絲茵、小池伸、鳥海和也、宮下光弘、宮岡祐一郎、小笠原裕樹、勝田奈那、永井竜児、岡野栄之、糸川昌成、新井誠
2. 発表標題 カルボニルストレス性統合失調症患者由来 iPS細胞の解析
3. 学会等名 第29回日本メイラード学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥海和也、鈴木一浩、小池 伸、宮下光弘、堀内泰江、吉川茜、小笠原裕樹、糸川昌成、新井誠
2. 発表標題 Glo1遺伝子欠損とビタミン B6欠乏がマウスの精神行動に与える影響
3. 学会等名 第29回日本メイラード学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦江、小池伸、鈴木俊宏、小笠原裕樹
2. 発表標題 グリセリン製剤中におけるメチルグリオキサールの生成に関する研究
3. 学会等名 第64回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小池伸、笠原桜、鳥海和也、段孝、宮田敏男、新井誠、小笠原裕樹
2. 発表標題 カルボニルストレス性統合失調症モデルマウスにおける 脳内カルボニル化タンパク質の解析
3. 学会等名 第31回日本メイラード学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小笠原裕樹
2. 発表標題 カルボニルストレス性統合失調症モデルマウスにおける、脳内カルボニル化タンパク質の解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会(シンポジウム)
4. 発表年 2021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
研究協力者	新井 誠 (Arai Makoto)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	糸川 昌成 (Itokawa Masanari)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関