

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16425

研究課題名(和文) 神経伝達物質と反応するメチルグリオキサールの治療抵抗性統合失調症への関与

研究課題名(英文) Analysis of the reactivity of methylglyoxal and neurotransmitters and its involvement in treatment-resistant schizophrenia

研究代表者

小池 伸 (Koike, Shin)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70751014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生体内カルボニル化反応を惹起する代表的なジカルボニル化合物であるメチルグリオキサール(MGO)と神経伝達物質の反応性を検討した。その結果、ドパミンをはじめとする複数の神経伝達物質がMGOと極めて高い反応性を示すことが明らかとなった。また、マウス脳内にメチルグリオキサールを投与したところ、海馬におけるノルアドレナリンレベルの低下が認められた。さらにこのマウスでは不安様症状も認められた。また、統合失調症モデルマウスを用いた検討では海馬内にMGOが高度に蓄積していることを明らかにした。以上より、脳内におけるMGOレベルの上昇は神経伝達物質の低下を招き、精神症状を惹起することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、代表的な精神疾患である統合失調症患者にカルボニルストレスを伴う一群が見つかった。統合失調症は脳内の神経伝達異常が古くから報告されているが、神経伝達物質とカルボニルストレスとの関係を検討した研究は少ない。本検討における、*in vitro*、*in vivo*の実験によって、カルボニルストレスの前駆体であるMGOが神経伝達物質に及ぼす影響が明らかとなった。モデルマウスを用いた検討では海馬のエネルギー代謝に関わるタンパク質のMGOによる修飾がはじめて明らかとなった。これらは、治療抵抗性を示す患者の多いカルボニルストレス性統合失調症に対する、新たな治療法の確立の基盤となり得る結果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated that the reactivity of neurotransmitter and methylglyoxal (MGO) in physiological condition. As a result, dopamine, noradrenalin, adrenalin and serotonin highly react with MGO. In addition, when MGO was injected into the hippocampus of mice, noradrenaline levels in the hippocampus decreased and anxiety behavior was observed. Furthermore, we determined MGO and AGEs levels in schizophrenia mouse model brain. We found that MGO and AGEs levels are significantly increased in mouse model brain. And, we identified AGEs modified proteins in model mouse hippocampus using LC-MS/MS. These results suggest that elevated MGO levels in the brain lead to a decrease in neurotransmitters and induce psychiatric symptoms.

研究分野：分析化学

キーワード：メチルグリオキサール 統合失調症 神経伝達物質 カルボニルストレス モデルマウス LC-MS/MS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の約 1%が罹患するとされる代表的な精神疾患である。治療には D₂ 遮断薬が用いられており、統合失調症病態におけるドーパミンなど神経伝達物質の役割は重要であると考えられる。

一方、統合失調症患者の一部には治療抵抗性を示す患者が存在する。最近、この患者群の中にカルボニルストレスを呈する一群が東京都医学総合研究所の新井誠博士らによって発見された (Arai et al., *Arch. Gen. Psychiatry*, (2010))。カルボニルストレスとは終末糖化産物 (AGEs) が生体内に蓄積する状態である。AGEs は糖代謝の過程で産生されるメチルグリオキサール (MGO) などの反応性の高いジカルボニル化合物がタンパク質に結合し、いくつかの反応を経て形成される一連の構造体の総称である。AGEs の付加はタンパク質の機能的な異常を引き起こす。さらに、AGEs の前駆体である MGO は活性酸素種の発生などを伴い、それ自体が細胞毒性を示す。従って、MGO の消去剤 (スカベンジャー) は生体防御的に働くため、スカベンジャーを探索する研究は活発に行われており、アミノグアニジンやメトホルミンは MGO スカベンジャーとして良く知られている。ごく最近、カルボニルストレス性統合失調症患者に MGO のスカベンジャーとして知られているビタミン B₆ を投与すると、症状が回復することが報告された (Itokawa et al., *Psychiatry Clin. Neurosci.* (2018))。また、生体内において MGO はグルタチオンやシステインと反応する。MGO はグルタチオンと反応することでヘミチオアセタール体を形成し、これがグリオキサラーゼ (GLO1) の基質となることで解毒される。このように MGO はタンパク質だけでなく、生体内環境下において低分子化合物とも容易に反応するなど様々な挙動を示すことが知られている。神経伝達物質と MGO が直接反応すると仮定すると、MGO が脳内で高濃度に存在した場合、この反応によって神経伝達物質レベルが低下する可能性がある。

前述の通り、統合失調症における神経伝達異常は D₂ 遮断薬が著効を示すことから支持されているが、脳内におけるカルボニルストレスが神経伝達物質に与える影響は不明である。そこで本検討は、カルボニルストレスを誘導する MGO と神経伝達物質の反応性に着目し、カルボニルストレス性統合失調症の発症メカニズム解明の礎となるデータの獲得を目指した。

2. 研究の目的

本検討では、ドーパミンやセロトニンなど様々な神経伝達物質または脳内に存在する低分子化合物と MGO との反応性を生理的な条件下において検討し、それらの反応生成物の構造を推定する。また、マウス脳内におけるそれら反応生成物の検出や、マウス脳内に MGO を投与したときの神経伝達物質の定量を行う。さらに、MGO の神経伝達物質に対する影響と統合失調症との関係を検討するために、カルボニルストレス性統合失調症モデルマウスを用いて、脳内の MGO 濃度や AGEs 修飾タンパク質の同定を行う。以上の検討結果から、脳内の MGO の挙動が脳機能に与える影響を考察する。

3. 研究の方法

(1) PBS 中における MGO と神経伝達物質及び脳内低分子化合物の反応性の検討: PBS 中、37℃ で MGO と各種神経伝達物質及び低分子化合物を 24 時間反応させる。その後、その混合液に ケト酸に対する蛍光ラベル化剤を加え、我々が開発した HPLC を用いた蛍光検出法 (HPLC-FL) にて MGO を測定する。MGO の消失量を計算することで、両者が反応したか否かを確認する。また、LC-MS/MS による検討によって、反応生成物の構造を推定する。

(2) マウス脳内における MGO と神経伝達物質の反応性の検討: (1) で明らかとなった反応生成物がマウス脳内に内在するかを LC-MS/MS を用いて検討する。さらに、MGO をマウス海馬内に投与し、そのときに海馬内で反応生成物が生成されるかを検討する。また、電気化学検出による HPLC 法によって、マウス脳内の神経伝達物質を定量する。MGO を脳内投与したマウスは、オープンフィールドテストによって不安様行動の評価を行う。

(3) カルボニルストレス性統合失調症モデルマウス脳内における MGO 濃度の測定: カルボニルストレス性統合失調症モデルマウスは、MGO の代謝酵素である GLO1 ノックアウトマウスに、ビタミン B₆ 欠乏餌を与えたマウスである。一方で野生型マウスに通常餌を与えたマウスをコントロール群とし、両者を比較する。モデルマウス脳及びコントロールマウス脳を前頭皮質、線条体、側坐核、海馬、小脳及び脳幹に分画し、それぞれの MGO 濃度を HPLC-FL で測定し、比較する。

(4) カルボニルストレス性統合失調症モデルマウス脳内における AGEs 修飾タンパク質の検出: (3) の検討と同様に分画した各脳部位において、メチルグリオキサールハイドロイミダゾロン (MG-H1)、カルボキシエチルリジン、カルボキシメチルリジン、アルグピリミジン及びペントシジン修飾を受けたタンパク質を各抗体を用いてウエスタンブロット法で検出する。

(5) AGEs 修飾タンパク質の同定: (4) で明らかとなった AGEs 修飾タンパク質を LC-MS/MS を用いて同定する。また、同定されたタンパク質から神経伝達物質の産生や代謝などに関与するタンパク質や、(1) や (2) の検討で明らかとなった MGO と反応し得る低分子化合物の産生や代謝に関与するタンパク質について詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) PBS 中における MGO と神経伝達物質及び脳内低分子化合物の反応性の検討：PBS 中において、MGO はドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン及びセロトニンと高い反応性を示したが、GABA とは反応しなかった。さらに、LC-MS/MS による解析で、それらの新規の反応生成物の構造を推定することができた。一方で、神経伝達物質は PBS 中で自己酸化を起こしやすいため、溶液中の溶存酸素の十分な脱気が必要であった。

(2) マウス脳内における MGO と神経伝達物質の反応性の検討：マウス脳内において(1)で得られた MGO-神経伝達物質反応生成物の検出を LC-MS/MS によって試みた。その結果、各反応生成物は検出されず、マウス脳内にはこれらは内在しないことがわかった。また、マウス海馬内に MGO を投与しても、これら反応生成物の存在は認められなかった。一方で、MGO の投与によって、ノルアドレナリンレベルの顕著な減少が認められたが、ドパミン、セロトニン及びアドレナリンレベルに変化はなかった。次にノルアドレナリンレベルの変化がマウスの行動に及ぼす影響を検討するため、オープンフィールドテストを行った。その結果、海馬に MGO を投与したマウスに不安様行動が認められた。これらの結果は、MGO 濃度の一過性の上昇は、ノルアドレナリンの生成系や代謝系に影響を与え、不安様行動を誘発する可能性を示唆している。

(3) カルボニルストレス性統合失調症モデルマウス脳内における MGO 濃度の測定：モデルマウスの脳各部位の MGO 濃度を HPLC-FL によって測定したところ、前頭皮質、海馬、線条体においてコントロール群と比べて MGO 濃度は高値を示した。他の脳部位や、血漿では MGO 濃度に両群間の差は認められなかった。

(4) カルボニルストレス性統合失調症モデルマウス脳内における AGEs 修飾タンパク質の検出：MGO が高値を示す場合、タンパク質が修飾されて AGEs が形成されている可能性がある。そこで各種抗 AGEs 抗体を用いて AGEs 修飾タンパク質を検出したところ、特にモデルマウス海馬において顕著に MG-H1 修飾を受けたタンパク質が見つかった。この結果を受けて、二次元電気泳動後、同様の抗体で MG-H1 修飾タンパク質を検出したところ、コントロール群よりも MG-H1 修飾が亢進したスポットを複数個検出した。

(5) AGEs 修飾タンパク質の同定：(4) の検討で複数個検出された MG-H1 修飾タンパク質のスポットを切り出し、ゲル内消化後 LC-MS/MS に修飾を受けたタンパク質を同定した。その結果、T-complex protein 1、Creatine kinase U-type, mitochondrial などが同定された。また、Creatine kinase U-type, mitochondrial はモデルマウス海馬においてその活性が顕著に低下していた。

以上の結果から、MGO は様々な神経伝達物質と反応することがわかったが、マウス脳内ではそれら反応生成物は検出されなかった。一方で、MGO をマウス脳内に投与すると、ノルアドレナリンレベルが顕著に低下し、マウスは不安様行動を示した。脳内に過剰に存在する MGO は神経伝達物質と直接反応する可能性はあるが、一方で、ノルアドレナリンの生成や代謝に影響を及ぼしている可能性も考えられる。またモデルマウスを用いた検討では、特に海馬において MGO 濃度と MG-H1 修飾タンパク質が高値を示した。LC-MS/MS によるタンパク質の同定では、脳内の神経伝達物質レベルの制御に関与するタンパク質は同定されなかったが、予想外なことに海馬内のエネルギー代謝に関与し得る Creatine kinase U-type, mitochondrial の顕著な MG-H1 修飾と活性の低下が認められた。本研究によって、MGO と脳内における神経伝達機構及び海馬のエネルギー代謝機構の関係にフォーカスした、治療抵抗性統合失調症の発症メカニズム解明を目指す基礎研究の新たなアプローチを提案することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugiura Ko, Koike Shin, Suzuki Toshihiro, Ogasawara Yuki	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 Biological and Pharmaceutical Bulletin	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 Shin, Toriumi Kazuya, Kasahara Sakura, Kibune Yosuke, Ishida Yo-ichi, Dan Takashi, Miyata Toshio, Arai Makoto, Ogasawara Yuki	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 ~ 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 Sugiura Ko, Koike Shin, Suzuki Toshihiro, Ogasawara Yuki	4. 巻 562
2. 論文標題 Carbonylation of skin collagen induced by reaction with methylglyoxal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 100 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.044	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6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 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いて生成されるメチルグリオキサールの測定
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 鈴木一浩、鳥海和也、宮下光弘、堀内泰江、吉川 茜、小池 伸、小笠原裕樹、鷲塚伸介、糸川昌成、新井 誠
2. 発表標題 メチルグリオキサールに着目した統合失調症の AGEs上昇メカニズムの検討
3. 学会等名 第29回日本メイラード学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------