

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591284

研究課題名（和文） 脳神経精神疾患患者脳脊髄液の分子レベル解析による疾患関連物質探索研究

研究課題名（英文） Mass spectrometry analysis of human cerebrospinal fluid with psychiatric disease patients.

研究代表者

大河内 正康 (OKOCHI MASAYASU)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：90335357

研究成果の概要（和文）：「脳神経精神疾患患者 CSF の分子レベル解析を最新質量分析法を用いて実施し疾患関連物質を見つける」ことを目的とし CSF 中のペプチド群の無作為的同定研究を実施した。脳内に測定できる一次構造の決定されたペプチド群について精神神経疾患との関連性を検討した（大阪大学医学部医学倫理委員会承認）。 「疾患特異的に出現する物質」を発見することを主眼点とした。

精神疾患患者 CSF および健常者 CSF について、その中に含まれる微量ペプチドを数千種類同定した。そして、それらについて疾患に関連して大きな差異のあると考えられるものを抽出することを試みた。約 1000 種類のペプチド断片について統合失調症などの精神疾患との関連について検討したが、現時点では有意に疾患に関連すると考えられるペプチドは同定できなかった。質量分析法で測定できるペプチドや脂質代謝産物はまだまだよく調べられていない。我々は本資金終了期間までの期間には関連ペプチドが見つけられなかったが、今後も研究を継続していく予定である。

研究成果の概要（英文）：By using LC/MS/MS analysis, we tried to detect brain peptides which are associated with psychiatric disorders. We used CSF of patients with or without psychiatric disorders. We detected and compared the levels of more than a thousand of peptides of which amino-acid sequences were determined by us. However, we could not successfully detect any specific peptides, so far. We will continue the study to find endogenous compounds which are associated with psychiatric conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：精神神経疾患・質量分析法・脳脊髄液

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病などの神経変性疾患と異なり、精神神経疾患の病因・病態研究は進

んでいるとはいえない。ケース・コントロール症例を用いた遺伝子の多変量解析などの疾患関連遺伝子解析が行われているが、病

像を説明しうる十分な成果は得られていない。一方で、過去に行われた精神疾患の生化学的解析が治療や診断につながるような成果を得られなかったことも事実である。我々はアルツハイマー病診断薬開発のため使用した質量分析法でヒト脳脊髄液の解析を行ったところ、高感度かつ多種類の低分子からペプチドまでの物質が一度に同定でき、その定量も可能であることを経験した (Yanagida et al., EMM 2009)。そこで今回、質量分析技術を精神神経疾患の病態解析に応用する計画を考えた。

## 2. 研究の目的

脳神経精神疾患患者 CSF の分子レベル解析を最新質量分析法を用いて実施し疾患関連物質を探索を始める。

我々はアルツハイマー病研究に関連して CSF 中のペプチド群の無作為的同定研究を実施した。驚くべきことに少量のヒト CSF 中の高分子量物質を簡単な手法で取り除く処理をした後、一度 LC/MS/MS システムで処理しただけで、脳内の五百種以上のペプチド群の一次配列が明らかになった。つまり、最新の科学技術を用いれば、多種多様の低分子量物質をヒト脳内に簡単に同定・定量できる可能性が出てきた。この戦略で脳内に測定できる一次構造の決定されたペプチド群について精神神経疾患との関連性を検討する。

この研究は「疾患特異的に出現する物質」や「疾患になるとその量が数十倍以上あるいは数十倍以下の著しい変化を示す物質」を発見することを主眼点としている。

## 3. 研究の方法

LC/MS/MS 型質量分析器および MALDI/TOF/MS 型質量分析器を駆使し CSF 中のペプチド群の無作為的同定研究を実施する。

(1) 精神疾患患者 CSF と神経学的に正常な患者 CSF のデータを比較定量する。同定ペプチド数を数千を目標とする。

(2) また、イオン交換カラムや疎水性カラムなどの吸着性カラムを用いてペプチド断片を分離し同定効率を上げるように技術的改善を試みる。

(3) 多種多様の一次構造の決定されたヒト脳内ペプチド群について疾患との関連性を検討する。

## 4. 研究成果

ヒト CSF 中からアルブミンおよびグロブリンを除去したサンプルを ABI 社製 Q-TRAP3200 型 LC/MS/MS で解析した。吸着性のカラムを用いて CSF から余剰成分を除き解析した。いくつのペプチドが同定され、その測定間の同定ペプチドの重複の程度から全体の同定

可能ペプチド数を推測した。最終的に測定すべき約 1000 のペプチド断片を同定した。

平成 22 年度に同定したペプチド群に関して、5 例の精神疾患患者 CSF と神経学的に正常な患者 CSF のデータを測定比較を開始した。

平成 23 年度は引き続きこれらの一次構造の決定されたヒト脳内ペプチド群について疾患との関連性を検討した。これには関連性のありそうなペプチドの選択と、それらについての半定量系の確立をまず行わなければならない。しかる後に、疾患と関連性のあるペプチドの有無を判定する必要がある。しかしながら、平成 23 年度終了時点で有意に差があると結論付けられる精神疾患関連ペプチドは同定できなかった。このような研究は手法的にも試行錯誤が必要であり今後も検討を続けていく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1) Okochi M, Tagami S, Yanagida K, Takami M, Kodama TS, Mori K, Nakayama T, Ihara Y, Takeda M.  $\gamma$ -secretase modulators and presenilin 1 mutants act differently on presenilin/ $\gamma$ -secretase function to cleave A $\beta$  42 and A $\beta$  43. Cell Rep. 3(1) 2013 42-51

2) Sakagami Y, Kudo T, Tanimukai H, Kanayama D, Omi T, Horiguchi K, Okochi M, Imaizumi K, Takeda M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in tauopathy. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jan 11;430(2):500-4.

3) Sato N, Okochi M, Shinohara M, Thinakaran G, Takeda S, Fukumori A, Shinohara-Noma M, Mori-Ueda M, Hamada H, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. Differential regulation of amyloid precursor protein/presenilin 1 interaction during A $\beta$  40/42 [corrected] production detected using fusion constructs. PLoS One. 2012;7(11)

4) Takeda M, Tanaka T, Okochi M, Kazui H. Non-pharmacological intervention for dementia patients. Psychiatry Clin Neurosci. 66(1) 2012 1-7.

5) Okochi M, Takeda M. [Behavioral and psychological symptoms of dementia].

Nihon Rinsho. 2011 Oct;69 Suppl 8:308-12.

6) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Nemoto K, Ohnishi T, Yamamori H, Takahashi H, Iike N, Kamino K, Yoshida T, Azechi M, Ikezawa K, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Iwase M, Kazui H, Takeda M. The AKT1 gene

is associated with attention and brain morphology in schizophrenia.

World J Biol Psychiatry. 2013 14(2):100-13.

7) Sigma-1Rs are upregulated via Mitsuda T, Omi T, Tanimukai H, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M.

PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. Biochem Biophys Res Commun. 2011 415(3):519-25.

8) Takeda M, Tanaka T, Okochi M. New drugs for Alzheimer's disease in Japan.

Psychiatry Clin Neurosci. 2011 65(5):399-404.

9) Kato K, Tanaka T, Sadik G, Baba M, Maruyama D, Yanagida K, Kodama T, Morihara T, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M. Protein kinase C stabilizes X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) through phosphorylation at Ser(87) to suppress apoptotic cell death.

Psychogeriatrics. 2011 11(2):90-7.

10) Takeda M, Martínez R, Kudo T, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Morihara T, Hashimoto R, Cacabelos R.

Apolipoprotein E and central nervous system disorders: reviews of clinical findings.

Psychiatry Clin Neurosci. 2010 64(6):592-607.

11) Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M, Iwase M, Iike N, Azechi M, Ikezawa K, Takaya M, Takahashi H, Yamamori H, Okochi T, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Kazui H, Iwata N, Takeda M. The impact of a genome-wide supported psychosis variant in the ZNF804A gene on memory function in schizophrenia. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 153B(8):1459-64.

12) Hayashi N, Kazui H, Kamino K, Tokunaga H, Takaya M, Yokokoji M, Kimura R, Kito Y, Wada T, Nomura K, Sugiyama H, Yamamoto D, Yoshida T, Currais A, Soriano S, Hamasaki T, Yamamoto M, Yasuda Y, Hashimoto R, Tanimukai H, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Morihara T, Takeda M.

KIBRA genetic polymorphism influences episodic memory in Alzheimer's disease, but does not show association with disease in a Japanese cohort.

Dement Geriatr Cogn Disord. 2010;30(4):302-8.

13) Mori K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Yanagida K, Kodama TS, Tatsumi S, Fujii

K, Tanimukai H, Hashimoto R, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Funamoto S, Ihara Y, Takeda M. The production ratios of AICD  $\epsilon$  51 and A $\beta$  42 by intramembrane proteolysis of  $\beta$  APP do not always change in parallel.

Psychogeriatrics. 2010 10(3):117-23.

14) Yasuda Y, Hashimoto R, Ohi K, Fukumoto M, Takamura H, Iike N, Yoshida T, Hayashi N, Takahashi H, Yamamori H, Morihara T, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Kamino K, Ishii R, Iwase M, Kazui H, Takeda M. Association study of KIBRA gene with memory performance in a Japanese population.

World J Biol Psychiatry. 2010 11(7):852-7.

15) Mitsuishi Y, Hasegawa H, Matsuo A, Araki W, Suzuki T, Tagami S, Okochi M, Takeda M, Roepman R, Nishimura M. Human CRB2 inhibits gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein by binding to the presenilin complex.

J Biol Chem. 2010 285(20):14920-31.

16) Okochi M, Tagami S, Takeda M. Analysis of APL1beta28, a surrogate marker for Alzheimer Abeta42, indicates altered precision of gamma-cleavage in the brains of Alzheimer disease patients.

Neurodegener Dis. 2010;7(1-3):42-5.

17) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Yoshida T, Takahashi H, Iike N, Iwase M, Kamino K, Ishii R, Kazui H, Fukumoto M, Takamura H, Yamamori H, Azechi M, Ikezawa K, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Yamada K, Numata S, Ikeda M, Tanaka T, Kudo T, Ueno S, Yoshikawa T, Ohmori T, Iwata N, Ozaki N, Takeda M.

The chitinase 3-like 1 gene and schizophrenia: evidence from a multi-center case-control study and meta-analysis.

Schizophr Res. 2010 116(2-3):126-32.

[学会発表] (計 10 件)

1) Okochi M, Potential Action Mechanism of  $\gamma$ -Secretase Modulators AD/PD2013, 3/6-10 Florence, Italy

2) 大河内 正康 田上 真次 柳田 寛太 児玉 高志 武田 雅俊  $\gamma$ セクレターゼ修飾薬のアルツハイマー病予防薬としての理論と実際 "第 31 回日本認知症学会 学術集会 トピックス徹底討論「抗 Ab 療法の最新現状と徹底討論」平成 24 年 10 月 28 日 (日) 9:00 ~12:00、つくば国際会議場、第 4 会場 2F 中ホール

3) 大河内正康 田上 真次 朝長毅 武田 雅俊 "アルツハイマー病発症前診断バイオマーカーの開発 脳プロ課題 F・アミロイド  $\beta$  42 産生の上流機構の解析 (武田班)"

”第 34 回日本生物学的精神医学会 発表形式：シンポジウム 26 セッション名：脳老化の初期と創薬 日時：2012 年 9 月 30 日（日）09:00-11:00 会場：E 会場（神戸国際会議場 502）

4) Masayasu Okochi, Kanta Yanagida, Shinji Tagami, Takashi Kodama, Shozo Sano, Takeshi Tomonaga, Takaomi C. Saido, Masatoshi Takeda. Characterization of brain APL2 $\beta$ , an A $\beta$ -like peptide produced from APLP2

Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver Convention & Exhibition Centre, Vancouver Canada 2012. 7. 18

5) Masayasu Okochi, The 28-amino Acid Form of an APLP1-derived Ab-like Peptide is a Surrogate Marker for Ab42  
AAICAD2011, July 16-21, 2011,  
Paris Porte de Versailles, Convention and Exhibition Center, France  
Wednesday, July 20, 2011.

6) Masayasu Okochi, Biochemistry of “Ab-like Peptide”, a novel type of peptide family 第 84 回日本生化学会, 2011 年 7 月 21 日（水）-24 日（土）、国立京都国際会館  
Session Number: 1S13p, 7 月 21 日（水）、14:45-17:15

7) 大河内正康, Session Title: A Return to the Basics- Molecular Decoding of the Alzheimer's Disease Pathogenesis”  
”アルツハイマー病治療薬 $\gamma$ セクレターゼ・モジュレーターの理論とその将来的優位性について 第 33 回生物学的精神医学会  
シンポジウム 2・アルツハイマー病治療薬の新たな展開 ホテルグランパシフィック LE DAIBA・パレロワイヤル B  
平成 23 年 5 月 21 日（土） 12 時 30 分から 14 時 30 分”

8) 大河内正康, S15-4 認知症バイオマーカーと次世代認知症治療戦略 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会, 第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会  
2011 年 10 月 27 日（木）-29 日（土）、京王プラザホテル 10 月 29 日（土）13 時 20 分から 15 時 20 分まで  
第 2 会場（コンコード B）  
シンポジウム 15 認知症の病態理解から診断・治療法へ

9) Masa Okochi, New aspects of pathophysiology and therapeutic/diagnostic strategy of dementia The ratio of CSF APL1 $\beta$ 28, a surrogate marker for Abeta42, increases before onset of sporadic Alzheimer disease ICAD2010, Hawaii Convention Center,

Honolulu, Hawaii. Oral session, 04-03. Hot Topics 2: Biomarkers/FTD, Wed, July 14 10) 大河内正康 A $\beta$  様ペプチドの分泌から見えること-A $\beta$  産生過程の発症への関与の可能性 第 29 回日本認知症学会・シンポジウム 7、名古屋ウイנק愛知・第 2 会場、平成 22 年 11 月 6 日

”

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

特になし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 大河内正康（OKOCHI MASAYASU）

研究者番号：90335357

(2) 研究分担者 田上真次（TAGAMI SHINJI）

研究者番号：40362735

(3) 研究分担者 武田雅俊（TAKEDA MASATOSHI）

研究者番号：00179649