

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791344

研究課題名(和文)統合失調症死後脳における異常タンパクの半網羅的定量的プロファイル解析

研究課題名(英文)Global and target-oriented proteomic analysis in the postmortem brains from patients with schizophrenia

研究代表者

國井 泰人(Kunii, Yasuto)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00511651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、統合失調症及び健常対照各10例の凍結脳サンプルの前頭前野皮質について、質量分析に基づく新規の網羅的及び標的指向的タンパク質解析法を用いてタンパク質発現比較を行った。網羅的解析では8768分子のタンパク質が同定され、そのうち300分子で統合失調症と対照で有意な差が認められた。標的指向的解析では統合失調症病態関連する候補分子108分子についてタンパク質発現量解析を行い、数種のタンパク質で有意な差を得た。これらの分子には既報の因子及び本研究で新規に明らかになった因子が存在した。これらのタンパク質については凍結脳を蛍光免疫組織化学染色し、細胞組織内局在及び発現強度の比較も行った。

研究成果の概要(英文)：We investigated the comparative analyses of protein expressions in the dorsolateral prefrontal cortex from patients with schizophrenia and healthy control subjects using novel methodology of proteomics based on the mass spectrometry, which consisted in two methods, global and target-oriented analysis. Global proteomic analysis resulted in the identification of 8,768 proteins, 300 of which showed statistically significant differential expression among two groups. Target-oriented analysis determined the quantities of the expression of 108 proteins which are believed to be associated with the pathogenesis of schizophrenia, and as a result several proteins showed significant differences among two groups. These proteins include both of the previously reported ones and newly founded ones in this study. Additionally, we examined the distributions, and compared the expressive intensities of these proteins in DLPFC among two groups using immunofluorescence staining.

研究分野：生物学的精神医学

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 死後脳研究 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の生物学的研究は、画像研究や動物実験などの間接的検討が中心であり、得られた知見を確定するには、死後脳サンプルを直接検討することが不可欠である。欧米では1960年代から死後脳バンクの取り組みが行われ多くのサンプルを集積してきたが、本邦では大幅に立ち遅れ、優れた研究もサンプルを欧米に依存するという状況が続いてきた。研究代表者はこれまで統合失調症の病態理解には死後脳組織の解析が不可欠と考え、日本初の系統的な精神疾患死後脳バンクの運営に従事し、統合失調症の有力な病因仮説に基づき、ドパミン系・グルタミン酸系・GABA系分子について、当バンクの死後脳組織を用いて検証しようと試みてきた。しかし、免疫組織化学法やin situ hybridizationなど組織形態を保ちながら解析する手法は、抗体やプローブを介した間接的な検出法であり、一サンプルから多くの物質について解析することが困難であるため、結果として限りある貴重なサンプルを多く消費するという欠点があった。我々は、東北大学大学院薬学研究科大槻純男准教授らの開発した、タンパク質の半網羅的な定量的プロファイル解析を初めて可能とするMultiplexed MRM法を用いることにより、前述の問題点を解決できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、統合失調症病態におけるドパミン系・グルタミン酸・GABA系の異常を、動物実験や画像研究などの間接的アプローチではなく、死後脳組織を用いて病態の現場を直接的に鑑することである。これまで代表者らが統合失調症死後脳組織を用いて分析を進めてきたドパミン系・グルタミン酸・GABA系の分子を中心に、Multiplexed Multiple Reaction Monitoring (MRM)法という本邦発の革新的な手法を用いて包括的に検討するものである。

3. 研究の方法

年齢、性別、死後時間をマッチさせた統合失調症死後脳10例(福島における精神疾患の原因・病態研究ブレインバンク)、健常対照死後脳10例(医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所でご遺族が研究利用に同意の検体)の凍結脳サンプルの前頭前野皮質について質量分析法を用いて解析した。2DICAL法による網羅的解析では8768分子の発現レベルを統合失調症群と対照群間で比較した。これと並行して行った標的指向的な絶対定量解析では、ドパミン、グルタミン酸、GABAの各神経伝達物質システムを中心として、これまでの報告で統合失調症病態に関連すると考えられている分子をピックアップし、LC-MS/MSにて検出可能と確認できるペプチドプローブを合成した108分子についてタンパク質発現量解析を行った。以上2通りの発現解析の結果、統合失調症群と対照群間で発現量の差がみられたタンパク質についてはさらに蛍光免疫組織化学染色により細胞組織内での局在及び発現強度を観察、測定し両群間の比較を行った。

4. 研究成果

2DICAL法による前頭前皮質の網羅的解析では8768分子のタンパク質が同定され、そのうち300分子で統合失調症と対照で有意な差が認められた(図1)。標的指向的な絶対定量解析による解析からも数種の候補タンパク質を得た(図2)。

	Cytosol
Number of detected peaks	80690
Number of identified peaks	8768
t<0.05	300

図1 網羅的解析の結果

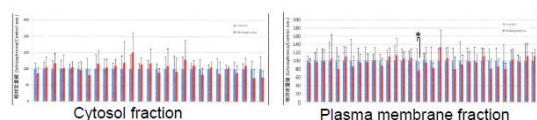


図2 標的指向的解析の結果

これらの分子には先行の研究において報告のあった因子及び本研究で新規に明らかに

なった因子が存在した。一例として Dynamin-1 は既報において統合失調症死後脳で増加することが報告されているが、本研究においては統合失調症で平均 0.24 倍 (p 値 = 0.0208) の有意な低下が見られた。これらのタンパク質については凍結脳を蛍光免疫組織化学染色し、細胞組織内局在及び発現強度を比較したところ、タンパク質量の比を反映しているもの (図 3) から、タンパク質量の比から想定される以上に染色像に差異があるもの (図 4) があった。

Dynamin-1

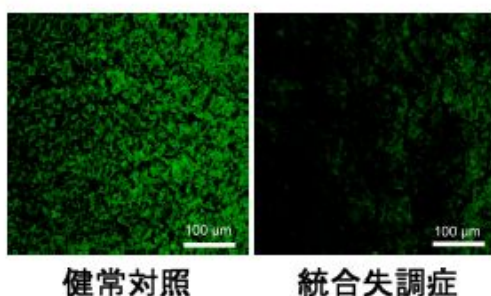


図 3

タンパク質 X

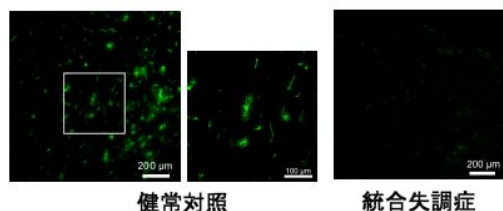


図 4

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)

Kunii Y, Miura I, Matsumoto J, Hino M, Wada A, Niwa SI, Nawa H, Sakai M, Someya T, Takahashi H, Kakita A, Yabe H. Elevated postmortem striatal t-DARPP expression in schizophrenia and associations with DRD2/ANKK1 polymorphism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014 Apr 3. pii: S0278-5846(14)00075-X.

doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.03.014.

[Epub ahead of print]

[学会発表](計 5 件)

國井泰人; 生前登録制度 ~ 当事者と研究者が作るインタラクティブな研究体制 ~. 第 8 回日本統合失調症学会, 浦河, 2013/4/20

國井泰人; 生物学的精神医学会合同ミニシンポジウム ジェネティック神経病理学: 精神疾患死後脳研究の新規アプローチ. 第 54 回日本神経病理学会総会学術総会, 東京, 2013/4/25

Yasuto Kunii, Itaru Miura, Junya Matsumoto, Mizuki Hino, Akira Wada, Hirooki Yabe, Akiyoshi Kakita, Hitoshi Takahashi, Miwako Sakai, Toshiyuki Someya, Hiroyuki Nawa, Shin-ichi Niwa; Effects of the Taq1A Polymorphism in the Dopamine D2 Receptor Gene on the DARPP-32 Expression of Postmortem Striatum. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 2013/6/26

Yasuto Kunii, Thomas M. Hyde, Tlanzhang Ye, Chao Li, Ran Tao, Whitney McFadden, Daniel R. Weinberger, Joel E. Kleinman, and Barbara K. Lipska; Expression levels of CHRNA7 and CHRFA7A are altered in postmortem dorsolateral prefrontal cortex in major psychiatric disorder. Neuroscience 2013, San Diego, CA, USA, 2013/11/11

國井泰人; 統合失調症死後脳内タンパク質発現解析および発現量変動したタンパク質の局在解析; 質量分析法による網羅的及び標的指向的な二種の定量解析を用いて. 第 9 回日本統合失調症学会, 京都, 2014/3/14

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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

<http://www.fmu-bb.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

國井泰人（KUNII, Yasuto）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00511651

(2)連携研究者

大槻純男（Ohtsuki, Sumio）

熊本大学・薬学部・教授

研究者番号：60323036

赤津裕康（Akatsu, Hiroyasu）

医療法人さわらび会福祉村病院・長寿医

学研究所・副所長

研究者番号：00399734