

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791368

研究課題名（和文） AGERの機能解析とカルボニルストレス性統合失調症の病態解明

研究課題名（英文） Functional analysis of AGER and research for schizophrenia with enhanced carbonyl stress

研究代表者 宮下 光弘 (MIYASHITA MITSUHIRO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員

研究者番号：60532132

研究成果の概要（和文）：カルボニルストレスを生じている統合失調症に焦点を当てて研究を実施した。カルボニルストレスを促進する危険因子として AGER 遺伝子の変異を同定した。この変異を有すると、カルボニルストレス抑制因子である esRAGE の血中濃度が低下することを突き止めた。また臨床面では、カルボニルストレスを呈する統合失調症は治療抵抗性統合失調症に類似していることを明らかにした。そして、ビタミン B6 の医師主導治験を実施し成果をまとめた。

研究成果の概要（英文）：We focused on schizophrenia with enhanced carbonyl stress. In this study, we identified genetic variants in AGER which is important gene regulating carbonyl stress. Subjects carrying minor allele in identified variants showed significant decreased esRAGE levels leading to impairment of reducing carbonyl stress. As for clinical investigation, we found that clinical features of schizophrenia with the stress were similar to those of treatment-resistant schizophrenia by Kane et al. We have done the clinical trial for patients with enhanced carbonyl stress by adding high dose vitamin B6.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

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：カルボニルストレス、統合失調症、ペントシジン、ビタミン B6、esRAGE、AGER

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに双生児研究や養子研究により統合失調症の遺伝率は 0.8 と発症への遺伝的要因の関与が大きい疾患と考えられている。しかし、大規模なゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) を含む近年のゲノム研究では、common disease-common variant 仮説に基づいて複数の候補遺伝子が見出されたものの、個々の遺伝子効果は弱いものばかりであり、病態との関連は期待されたほど明らかになっていない。そこで、申請者は common

disease-multiple rare variant 仮説に基づいて、稀ではあるが遺伝子効果の大きい変異を探索することが統合失調症の病態解明には不可避であるとの着想に至った。

本研究室では、RCOs (Reactive Oxygen Species) を解毒する主要代謝経路の律速酵素である glyoxalase I 遺伝子 (GLO1) に、活性を 50% 低下させる大きな効果の稀な変異を同定した。この稀な変異によって、終末糖化産物 (advanced glycation end products, AGEs) が蓄積し、AGEs スカベンジャーである vitamin B6 が枯渇する統合失調症の一群を

初めて同定し (Arai M et al., Arch Gen Psychiatry, 2010)、「カルボニルストレス性統合失調症」と定義して独自に研究を進めている。

統合失調症におけるカルボニルストレスの機序として、生成系の亢進と消去系の障害が推定される。申請者は、複雑なカルボニルストレス除去系の一つである、AGE 受容体 (receptor for AGEs, RAGE) のスプライスヴァリエント (分泌型 AGE 受容体、endogenous secretory RAGE, esRAGE) に着目し遺伝子解析を進めてきた。RAGE はリガンドである AGEs の結合により細胞内シグナルを介して炎症反応、動脈硬化などを惹起する。現在までに、AGEs-RAGE シグナルは糖尿病や腎障害など内科領域の様々な疾患への関与が明らかにされ、中枢神経領域ではアルツハイマー病との関連が報告されている (Deane R, et al. Nature Medicine. 2003)。RAGE と異なり細胞膜結合領域を欠く esRAGE は血中に存在し、AGEs が結合しても細胞内シグナルを誘発することなく、AGEs と複合体を形成したまま体外に排出されるため、カルボニルストレス除去系として機能する。

カルボニルストレス発見のきっかけとなった GL01 の rare variant は、酵素活性を 16-50%低下させるが (Arch Gen Psychiatry 2010)、カルボニルストレス性統合失調症の約 8 割の症例は GL01 に変異がなく、こうした症例では他のカルボニルストレス消去系の障害が示唆された。そこで、申請者は RAGE 遺伝子 (Advanced Glycosylation End product-specific Receptor, AGER) に着目し、GL01 が正常活性である患者のカルボニルストレスに、esRAGE の血中濃度低下が寄与し、さらにその一部に AGER の効果の大きい rare variant が関連する可能性があるものと考えた。

以上から、RAGE や esRAGE はカルボニルストレス消去系に深く関与しており、AGER の全塩基配列を詳細に解析することは、カルボニルストレス性統合失調症の全体像を明らかにするための必須のステップであると考えた。

## 2. 研究の目的

申請者の所属研究室では、統合失調症の約 4 割の症例にカルボニルストレスが関連することを独自に明らかにした (Arch Gen Psychiatry 2010)。本疾患のカルボニルストレスにおいて異種性が示唆されたことから (未発表)、AGE 受容体遺伝子 (AGER) を解析した結果、複雑なカルボニル消去系の一つである分泌型 AGE 受容体 (esRAGE) の発現を強く抑制する多型を同定した (未発表)。本研究では比較的大きな効果の rare variant を同定し、稀な症例における大きな生化学変化

をプロトタイプとして比較的均一な集団を解明する。個別病態の解明から共通病態への手掛かりを掴むことで異種性の障壁を乗り越え、統合失調症の病態を明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) AGER の resequence と変異/多型を同定する。

AGER の全領域 (転写調節領域、5' UTR、全エクソン、全イントロン、3' UTR 領域) について PCR-direct sequence 法によって塩基配列を決定し、得られたゲノム配列を基準配列と比較して変異や多型を同定する。同定した変異や多型の新規性、既知性についてデータベースを参照に検討する。direct sequence 法を用いることで、ミスセンス変異、フレームシフト、insertion/deletion など遺伝子機能に大きな影響を与える稀な新規変異を発見する可能性がある。

(2) 同定した変異/多型と統合失調症との関連を解析する

同定した変異や多型において、患者対照解析を実施する。具体的には、統合失調症群と健常者群から成る大規模サンプルで、変異や多型部位における遺伝子型とアレル頻度を確定し、Fisher's exact test によって統合失調症との関連を明らかにする。遺伝子機能に影響を及ぼす稀な新規変異が発見された場合には、対象者の家系を調査して疾患との関連を検討する。

(3) 得られた変異/多型やハプロタイプと、AGEs や esRAGE など生物学的マーカーになり得る分子 (中間表現型) との関連性を明らかにする。

既に申請者らは、ELISA 法などを用いて AGEs (具体的には pentosidine)、vitamin B6、esRAGE などの血中濃度を測定済みである。以上のようにして得られた各種生化学データと AGER の変異や多型を多変量解析し、バイオマーカーとして期待される分子との関連を明らかにすることで、将来的には重症度や治療反応性、経過予測などの臨床応用を目指す。

(4) 詳細な臨床データの整備と遺伝子変異/多型の解析

申請者が所属する研究所は都立松沢病院の敷地内にあるという立地条件を生かし、家族歴、発症年齢、罹病期間、重症度、経過、臨床型、投薬量、副作用情報など詳細な臨床情報を活用する。得られた臨床データと AGEs、ビタミン B6 などのカルボニルストレスマーカーとの関連を検討し、カルボニルストレス性統合失調症の臨床特徴を明らかにする。

(5) AGER の機能解析を実施する。得られた変異を有する株化リンパ球を用いて、esRAGE の発現解析を実施する。

#### 4. 研究成果

AGER の resequence による変異・多型の同定については、期間内に全てのサンプルで解析を終了した。その結果、AGER に全部で 28 ヶ所の変異・多型を同定した。そのうち 8 ヶ所の新規変異も新たに同定することができた。これらの変異・多型のうち、プロモーター領域の 63bp の欠失変異は esRAGE の血中濃度を強く抑制する他領域の二つの SNP と完全連鎖不平衡の関係にあることも明らかにした。また、統合失調症との関連解析においては intron8 にある 1 つの SNP が統合失調症でマイナーアレルの保有頻度が有意に高く、リスク因子であることを同定した (in preparation)。その他、フレームシフトなど強い効果を有する変異は発見されなかった。

次に血中 esRAGE 濃度を規定する遺伝要因の同定を試みた。AGER 内に同定した 28 か所の変異部位において、それぞれ遺伝子型毎に esRAGE 血中濃度に変化があるか確認したところ、上述したプロモーター領域の欠失と多領域の 2 ヶ所の SNP で形成されるハプロタイプにおいて、マイナーアレルを有した場合に顕著に esRAGE 血中濃度が低下することを突き止めた。また、エクソン 3 にある SNP においても変異型で有意に esRAGE 血中濃度低下と関連した。終末糖化産物の一種であるペントシジンの血中濃度が高値である患者群と正常である患者群においては、esRAGE の血中濃度に有意な差は認められなかった。

次に、統合失調症と健常者で esRAGE 血中濃度を比較すると、年齢を考慮に入れた場合有意な差は認めなかった。

最後に、血中 esRAGE 濃度を強く規定する因子を同定するため、多変量解析を実施した。年齢、性別、診断、腎機能障害指標 (eGFR)、血漿 AGEs (ペントシジン)、血清ビタミン B6、GLO1 酵素活性、GLO1 遺伝子多型、さらに上述した AGER 内の変異を候補独立因子として検討した。単回帰分析では年齢、診断、AGER 内のハプロタイプ、エクソン 3 の SNP が有意な相関を認めた。これら 4 つの因子を独立因子として、多重回帰分析を実施したところ、AGER 内のハプロタイプ、エクソン 3 の SNP が有意であった。したがって、この二つの変異が esRAGE 血中濃度の低下を規定する因子であることを見出した。

カルボニルストレスを呈する統合失調症の臨床症状と経過の特徴について、カルテ調査および患者面談による評価を実施した。その結果、臨床経過の特徴として Kane らが定義する治療抵抗性統合失調症に類似していることが明らかとなった。また、臨床症状の特徴を Positive And Negative syndrome Scal (PANSS) を用いて評価した。抗精神病薬量、入院期間や年齢などの交絡因子を独立因

子に含めて、各症状とカルボニルストレスを代表するマーカー (ペントシジン、ビタミン B6) との関連を多変量解析で検証した結果、多くの症状がビタミン B6 と有意な負の相関を示した。さらに PANSS 合計症状においてもビタミン B6 と負の相関を示した。一方ペントシジンは緊張の項目で正の相関を示した。以上をまとめると、カルボニルストレスを呈する統合失調症は治療抵抗性統合失調症に類似した特徴を有しており、ビタミン B6 が多くの症状と負の相関を示すことを考慮に入れると、カルボニルストレスバイオマーカーで規定される統合失調症の一群は、クロザピンと同程度にビタミン B6 が有効である可能性が示唆された。すでに我々は、医師主導型治験を実施し、ビタミン B6 のカルボニルストレスを呈する統合失調症における有効性を検討しているところである。

#### 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 3 件)

- ① 新井誠、宮下光弘、市川智恵、糸川昌成、カルボニルストレス性統合失調症-新たな病態仮説と将来の治療法の展望、精神神経学雑誌、査読無、114 (3) 巻、2012、199-208
- ② 新井誠、宮下光弘、市川智恵、糸川昌成、統合失調症とカルボニルストレス、精神神経学雑誌、査読無、114 (2) 巻、2012、101-107
- ③ 糸川昌成、新井誠、宮下光弘、市川智恵、AGEs と統合失調症、日本抗加齢医学雑誌、査読無、8 (1) 巻、2012、49-54

[学会発表] (計 8 件)

- ① Mitsuhiro Miyashita, Association between genetic variation of AGER and esRAGE in patients with schizophrenia, 11<sup>th</sup> International Symposium on the Maillard Reaction, 16 september 2012, Nancy, France.
- ② 宮下光弘、統合失調症における AGER 遺伝子多型と esRAGE 血中濃度との関連、第 7 回日本統合失調症学会、平成 24 年 3 月 16 日、愛知県産業労働センター、名古屋、愛知
- ③ 宮下光弘、統合失調症の病態生理に関連するカルボニルストレス、第 31 回日本精神科診断学会、平成 23 年 11 月 28 日、信州大学医学部付属病院、松本市、長野
- ④ 宮下光弘、統合失調症における AGER 遺伝子多型と esRAGE 血中濃度との関連、第 84 回日本生化学大会、平成 23 年 9 月 23 日、国立京都国際会館、京都

- ⑤ 宮下光弘、統合失調症における AGER 遺伝子多型とカルボニルストレスとの関連、第 6 回日本統合失調症学会、平成 23 年 7 月 18 日、札幌コンベンションセンター、札幌、北海道
- ⑥ 宮下光弘、統合失調症における AGER 遺伝子多型とカルボニルストレスとの関連、第 33 回生物学的精神医学会、平成 23 年 5 月 21 日、ホテル Le DAIBA、お台場、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮下光弘 (MIYASHITA MITSUHIRO)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員  
研究者番号：60532132

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし