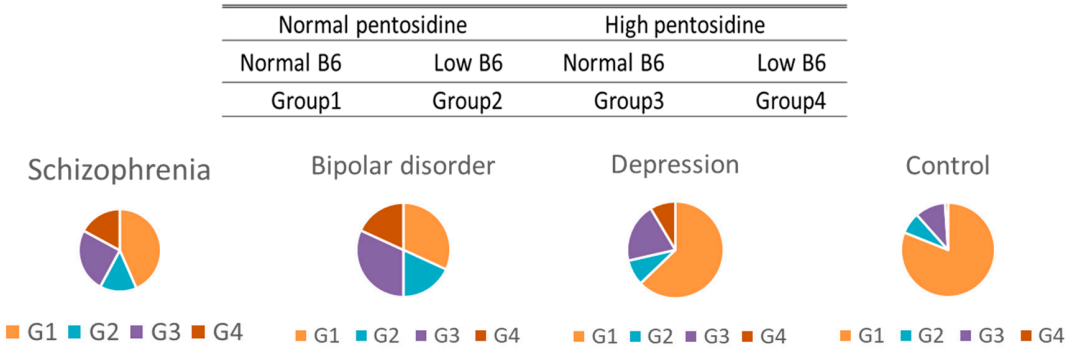
1　カルボニルストレスに着目した精神疾患発症機序の解明	新井　誠

【目的】精神疾患発症機序の解明において、異種性回避を念頭にしたバイオマーカー同定とその分子基盤に基づいた病因、病態の理解が早期診断、治療、予防法の創出のために必要不可欠である。本研究は、カルボニルストレス（carbonyl stress：CS）マーカーを軸に、精神疾患の新たな心身統合的な早期診断・予防・治療法創成のため、病態基盤を解明することを目的とした。

【方法】ヒト生理検体について HPLC-MS 分析を行い、精神疾患罹患者と健常者の血中 CS 変動を比較し、血中 CS と臨床情報との関連について検討を行った。また、一般集団の被験者における CS 指標について、皮膚 AGEs 値を測定、栄養疫学調査を実施し、それらとの関連についての検討を試みた。動物モデル研究においては、glyoxalase Ⅰ（*GLO1*）ノックアウトマウスを用いた行動試験、遺伝子発現解析を実施した。加えて、細胞株あるいは iPS 細胞モデルを活用した抗 CS 作用のある天然物由来 bioactives の探索等を試みた。

【結果】CS マーカーである PEN、VB6 が重篤な陰性症状の一つである思考の解体、思考障害と強い関連を示すことが明らかとなった。また、躁うつ病と統合失調症という 2 大内因性精神疾患において、その一部には CS 病態基盤の共通性が示唆された。さらに、統合失調症において、PEN 蓄積が再燃・再発リスクや予後予測の因子となる可能性も示唆された。AGEs マーカーを非侵襲的に皮膚から簡便に測定する体制を確立し、統合失調症では健常者と比較して皮膚 AGEs 値が有意に増大すること、早期発症、入院回数、入院期間、抗精神病薬服用と関連することを明らかにした。*GLO1* KO マウスの行動解析においては、行動量の減少、強制水泳試験における無動時間の短縮、驚愕反応の減少を明らかとした。CS 性統合失調症、健常者の iPS 細胞を樹立し、アストロサイトへ分化、誘導する系を確立した。精神疾患の多くの症例において糖尿病、心血管疾患、肥満など様々な合併症が問題視されているが、今後、身体疾患の増悪とも関連のある CS を軸として、CS データ資源を十分に有効活用することは、早期からの精神疾患、身体疾患の予防介入、心身健康の増進に資する予防医学にも貢献できるものと考えられる。

各精神疾患におけるカルボニルストレス性（グループ G4）の割合



1. カルボニルストレスに着目した精神疾患発症機序の解明

新井　誠

東京都医学総合研究所 精神行動医学研究分野 統合失調症プロジェクト

Key words：Schizophrenia，Advanced glycation end products，pentosidine，vitamin B6

緒　言

精神疾患で医療機関に受診する患者数は320万人を超え、統合失調症の8割の患者は15～25歳までに発症して慢性経過をたどるため、長期にかかる実質医療費のみならず、失われた労働生産量は大きな社会的損失である。早期予防が可能となれば医療費の抑制のみならず、将来の発症による労働力の損失を防ぐことも期待でき、心身健康のための革新的な予防医療に貢献できる。統合失調症の発症における遺伝と環境相互の要因や発症後の病態基盤は未だ明らかではないものの、当事者の視点に立った診断、治療、予防法の創出が希求されている。申請者らは、統合失調症おける「カルボニルストレス（carbonyl stress：CS）」という終末糖化産物（advanced glycation end products，AGEs）のひとつであるペントシジン（pentosidine：PEN）蓄積、ビタミンB6（VB6）低下を伴う代謝の病態を明らかにした［1］。メチルグリオキサール（methylglyoxal：MGO）に代表される反応性カルボニル化合物（reactive carbonyl compounds：RCOs）は、タンパク質、脂質、核酸などとメイラード反応を生じ、脱水、酸化、転位などの複数の反応過程を経て、不可逆的なAGEsを形成する。RCOsによる糖化反応が亢進している状態は、糖化ストレスあるいはCSと提唱されている。我々は、glyoxalase I（*GLO1*）遺伝子にフレームシフト変異をもつ稀な症例の同定から［1］、これまでに症状改善に伴うCS低下［2］、治療効果や重症度の判定マーカーとしての有用性［3］を報告し、症例数を拡大した検証の結果からも、一般症例のおよそ2割が同様の代謝障害を呈すること［4］、CSを呈する症例は治療抵抗性が多く、入院期間も長期であるという臨床特徴との関連を明らかにしてきた［5］。一方、他の国内外グループからも急性期症例でのCS同定［6, 7］、治療抵抗性症例での皮膚AGEs蓄積が報告されており［8］、AGEsという代謝経路の障害が統合失調症の病態基盤のひとつとして存在することを示唆している。現在、我々は、生化学的分析による糖化修飾化分子の同定に加え［9］、マウスモデルでの行動試験、薬理学的分析、細胞モデルを活用したCS回避に有用な天然物質探索とその作用機序の検討を継続している。本研究は、病態・疫学・分子レベルという側面から、新たな病態仮説としてのCSに着目し、精神疾患の発症機序の解明、心身統合的な新たな疾患概念・予防・治療戦略の創成を実現することを目的とした。

方　法

1. 病態レベル（生理検体の活用）

統合失調症、健常者を含む被験者の血漿、血清画分を用いて、CSマーカーであるPEN、VB6の測定を実施し、臨床特徴との関連を分析した。被権者は、DSM-IV診断基準を満たす統合失調症及び健常者を対象とした。血漿PENは、55.2 ng/mL以上（健常者のPEN平均値＋2SDをカットオフ値）を高値とし、基準値範囲内をPEN正常値とした。また、血清VB6は、基準値である男性6～40 ng/ml、女性4～19 ng/mlを正常値として、これ以下をVB6低値、基準値範囲内をVB6正常値と定義した。また、対象被験者のうち、協力の得られた被験者において皮膚AGEs値を非侵襲的測定機器（AGEsセンサ、シャープライフサイエンス社製）により計測を行い、入院回数、入院期間、服薬量、生活習慣等の臨床特徴との関連を検討した。

2. 疫学レベル（コホート検体の活用）

一般成人集団被験者における被験者の血漿 PEN、血清 VB6 及び皮膚 AGEs を測定するとともに、GHQ28（General Health Questionnaire）、CAPE（Community Assessment of Psychic Experiences）調査票を利用して精神的な健康度との関連を検討した。また、簡易型自記式食事歴法質問票（brief-type self-administered diet history questionnaire: BDHQ）を用いた栄養学調査を実施した。

3. 分子レベル（マウスモデル・細胞モデルの活用）

マウスモデルにおける神経発達・行動に及ぼす「遺伝×環境」相互要因を明らかにするため、CS 解毒を担う律速酵素 Glo1 の KO マウスを用いて、オープンフィールド試験、行動量定量試験、高架式十字迷路試験、社会性行動試験、新規物体探索試験、強制水泳試験、Y 字型迷路試験、プレパルス抑制試験など行動解析を実施した。また、CS 性統合失調症 2 名、非 CS 性統合失調症 1 名、健常者 2 名より iPS 細胞を樹立し、iPS 細胞由来神経細胞・アストロサイトへ分化、誘導する系を確立し、bioactives や薬剤処理などの評価系の基盤を構築した。

4. 統計解析等

PEN、VB6 における疾患群間のマンホイットニー検定、一元配置分散分析および精神症状評価スコアとの相関分析には GraphPad Prism 7 ソフトウェア（MDF Co., Ltd.）を使用して分析を行い、$P < 0.05$ を有意水準とした。尚、本研究は、東京都医学総合研究所および研究参加施設の倫理委員会の承認を得て被験者には十分な説明と文書による同意を得て実施した。

結果および考察

1. カルボニルストレスマーカープロファイル

CS 亢進の指標である血漿 PEN、血清 VB6 値について検体収集を実施した施設間での妥当性を検証したところ、PEN、VB6 には施設間バイアスは存在せず、マーカーとしての妥当性が示された。精神症状の評価指標である PANSS を用いて、CS 亢進の指標である PEN、VB6 値と精神症状との関連を検討した結果、PEN と思考の解体（$P < 0.0001$）、思考の硬直（$P = 0.0002$）、緊張病症状（$P = 0.0001$）との有意な関連が示され、Marder の分類による PANSS 下位評価尺度（陽性症状、陰性症状、思考解体、敵意／興奮）スコアにおいてでは、思考障害との強い相関（$P < 0.0001$）を認めた。VB6 値は、Marder の下位項目分類で思考障害と有意な負の相関（$P < 0.0001$）を認めた。これまで、PEN 高値、VB6 低値の統合失調患者の臨床経過の特徴として長期入院中の治療抵抗性患者を指摘してきたが、本研究によって、PEN、VB6 が重篤な陰性症状の一つである思考の解体、思考障害と強い関連を示すことが明らかにされた。以上の結果は、PEN、VB6 は、経過の特徴のみならず、症状レベルでも治療抵抗性の特徴を明確に反映することが明らかとなった。

また、他の内因性精神疾患における CS 亢進について疾患特異性の検討をした結果、PEN 高値を示す患者の割合は、統合失調症で 42.1%、躁うつ病で 50.0%、うつ病群で 28.6%、健常者では 11.6%にとどまった。PEN 高値、VB6 低値の両者を満たす CS 性の割合は、統合失調症で 17.1%、躁うつ病群で 18.2%と比較的高かったが、うつ病群では 8.6%、健常者では 1.1%と少なかった（表 1）。躁うつ病と統合失調症は、精神病症状の出現のみならず、近年では共通の感受性遺伝子変異が明らかにされるなど、その疾患類似性が指摘されつつあるが、本研究の結果、躁うつ病と統合失調症という 2 大内因性精神疾患の CS 病態基盤の共通性を示唆しているものと考えられた。さらに、入院患者を対象に退院をアウトカムとして、前向き追跡調査を実施し、PEN 蓄積と再燃・再発リスクや予後との関連について検討したところ、PEN 高値の入院患者では退院できない患者が有意に 1.7 倍増大し、外来患者を対象にした再入院をアウトカムとした調査では、再入院を要する患者数が PEN 高値症例で 1.5 倍に増大することを明らかにした。

さらに、皮膚 AGEs 測定する非侵襲的皮膚 AGEs センサを用いて、統合失調症、躁うつ病、うつ病、神経症圏と健常者で測定を実施した結果、血漿 PEN 値と同様に、統合失調症では皮膚 AGEs が健常群と比較して有意に高値を示した（$P < 0.05$）。一方、神経症圏では有意差を認めなかったことから、内因性精神疾患と神経症圏では CS に関連した病態メカニズムが異なることを示唆していると考えられた。皮膚 AGEs 値と臨床指標との相関解析を行った結果、統合失調症では、早期発症、頻回の入院歴、長期入院、抗精神病薬・睡眠薬の服薬量など臨床特徴・経過との相関傾向を認

めた。これらの結果は、血中 CS 亢進群の臨床特徴に類似する所見であった一方で、皮膚 AGEs 値と PEN 値および VB6 値の相関は認められなかったことから、皮膚 AGEs 値は血漿 PEN 蓄積の分子基盤とは異なるメカニズムであることが示唆された。現在、適応拡大・臨床活用の一環として、血中 AGEs、皮膚 AGEs の動態変化と食生活習慣及び精神症状変化の交互作用について縦断追跡により検証を継続している。General Health Questionnaire（GHQ28）、Community Assessment of Psychiatric Experiences（CAPE）と皮膚 AGEs の関連について予備的評価の結果、統合失調症における意欲低下・判断力低下、心気症状が AGEs 値と関連することも明らかになりつつある。

治療抵抗性統合失調症においては、クロザピンが唯一の有効な治療薬であるが、一方で無顆粒球症や糖代謝異常など致死的な副作用を生じることが稀ではない。我々は、治療抵抗性統合失調症と極めてよく似た臨床特徴を有する CS 性統合失調症において、VB6 による治療が、安全かつ有効な治療法となる可能性を検証している［10］。CS を含む糖化ストレスは、従来、身体疾患、特に糖尿病等の研究分野において精力的に行われてきた経緯があるが、近年、統合失調症の多くの症例でも糖尿病、心血管疾患、肥満など様々な合併症が問題視されている。また、重度精神疾患患者は平均余命が 20 年以上短いことを鑑みると、精神障害者の健康リスクに対する早期かつ効果的な介入の必要性が希求される。本研究における CS を軸に、データ資源を十分に有効活用することは、早期からの精神疾患、身体疾患の予防介入、心身健康の増進に資する予防医学にも貢献できるものと考えられる。

2. マウス・細胞モデル研究の展望

GLO1 欠損が行動に与える影響を評価するため、*Glo1* ノックアウト（KO）マウスを作製し、その行動表現型を評価した。open field test では、KO マウスは野生型（WT）と比較して運動活性が低かった。KO マウスは forced swimming test において immobility time の短縮、また、acoustic startle response の低下により pre-pulse inhibition が増強された。Y-maze test、social interaction test においては変化を示さなかった。さらに、KO マウスのストレス脆弱性を評価するため、慢性的な社会的敗北ストレス後の social avoidance test を実施したが、WT と KO マウスとの間に有意差は認められなかった。以上の結果は、GLO1 欠損により幾つかの行動変化を誘発することを示唆しているものの、KO マウスで観察された行動障害は、典型的な統合失調症のような行動ではなかった。今後は、遺伝的要因だけでなく環境要因も統合失調症発症に重要な役割を果たしていることが広く認識されているため、環境要因としての VB6 欠乏を負荷した KO マウスを活用し、「遺伝（GLO1）×環境（VB6）」相互作用モデルにて、現在、検討を継続している。また、KO マウス単独での脳内遺伝子発現変化を前頭葉皮質、海馬、線条体で検討した結果、数個の遺伝子変動に留まったことから、今後、栄養条件や養育条件を含め、マウスモデルの時系列の代謝産物変動、網羅的遺伝子発現ネットワークの解析及び組織化学的分析を検討する予定である。

また、細胞モデルでの解析においては、CS 性統合失調症家系 2 名、非 CS 性統合失調症患者 1 名、健常者 2 名より iPS 細胞を樹立し、iPS 細胞由来神経細胞・アストロサイトを高効率に誘導する系を確立した。CRISPR/Cas9 システムを用いた *GLO1* 遺伝子改変 iPS 細胞の作成を継続中であり、今後、SY-SY5Y、1321N1 細胞株モデルで明らかとした bioactives を用いて、糖代謝、メチルグリオキサール代謝、ポリオール代謝等、代謝系の動態変化について評価を検討する予定である。また、抗 CS 薬の探索をめざすため、培養細胞株での siRNA silencing による細胞モデルに加え、iPS 細胞での天然物由来化合物の有効性を評価し、より安全で有用性の高い予防・治療薬の創出とその分子基盤の解明を図る計画である。

表 1. カルボニルストレスマーカーによる分類（割合，%）

	ペントシジン正常		ペントシジン高値	
	ビタミンB6		ビタミンB6	
	正常	低下	正常	低下
%	グループ1	グループ2	グループ3	グループ4
統合失調症	43.4	14.5	25.0	17.1
躁うつ病	31.8	18.2	31.8	18.2
うつ病	62.9	8.6	20.0	8.6
健常者	81.1	7.4	10.5	1.1

血漿 PEN は、55.2 ng/mL 以上（健常者の PEN 平均値+2SD をカットオフ値）を高値とし、基準値範囲内を PEN 正常値とした。また、血清 VB6 は、基準値である男性 6～40 ng/ml、女性 4～19 ng/ml を正常値として、これ以下を VB6 低値、基準値範囲内を VB6 正常値と定義した。CS 性症例はグループ 4 に属する。

共同研究者・謝辞

本研究では、多くの共同研究者の皆様方からのご助言と多大なるご協力を頂き、また、何よりも本研究にご理解とご協力を頂いた当事者の方々とご家族の皆さまにこの場をお借りして心より感謝を申し上げます。本研究の成果は、東京都立松沢病院（齋藤正彦先生・岡崎祐士先生）、名古屋大学（尾崎紀夫先生・久島周先生）、東京大学（笠井清登先生・小池進介先生）、理化学研究所（吉川武男先生）、大阪大学（橋本亮太先生）、東北大学（宮田敏男先生・段孝先生）、東海大学（瀧澤俊也先生・湯澤公子先生・永井竜児先生）、金沢大学（山本靖彦先生）、明治薬科大学（小笠原裕樹先生）をはじめ多くの先生方のご協力により実施されました。

文　献

1） Arai M, Yuzawa H, Nohara I, Ohnishi T, Obata N, Iwayama Y, Haga S, Toyota T, Ujike H, Arai M, Ichikawa T, Nishida A, Tanaka Y, Furukawa A, Aikawa Y, Kuroda O, Niizato K, Izawa R, Nakamura K, Mori N, Matsuzawa D, Hashimoto K, Iyo M, Sora I, Matsushita M, Okazaki Y, Yoshikawa T, Miyata T, Itokawa M. Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 2010 Jun;67(6):589-97. PubMed PMID: 20530008. DOI:10.1001/archgenpsychiatry.2010.62.

2） Arai M, Koike S, Oshima N, Takizawa R, Araki T, Miyashita M, Nishida A, Miyata T, Kasai K, Itokawa M. Idiopathic carbonyl stress in a drug-naive case of at-risk mental state. Psychiatry Clin Neurosci. 2011 Oct;65(6):606-7. PubMed PMID: 22003997. DOI:10.1111/j.1440-1819.2011.02261.x.

3） Arai M, Miyashita M, Kobori A, Toriumi K, Horiuchi Y, Itokawa M. Carbonyl stress and schizophrenia. Psychiatry Clin Neurosci. 2014 Sep;68(9):655-65. Epub 2014 Aug 4. Review. PubMed PMID: 24995521. DOI:10.1111/pcn.12216.

4） Miyashita M, Arai M, Yuzawa H, Niizato K, Oshima K, Kushima I, Hashimoto R, Fukumoto M, Koike S, Toyota T, Ujike H, Arinami T, Kasai K, Takeda M, Ozaki N, Okazaki Y, Yoshikawa T, Amano N, Miyata T, Itokawa M. Replication of enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. Psychiatry Clin Neurosci. 2014 Jan;68(1):83-4. Epub 2013 Oct 28. PubMed PMID: 24393354. DOI: 10.1111/pcn.12081.

5） Miyashita M, Arai M, Kobori A, Ichikawa T, Toriumi K, Niizato K, Oshima K, Okazaki Y, Yoshikawa T, Amano N, Miyata T, Itokawa M. Clinical features of schizophrenia with enhanced carbonyl stress. Schizophr Bull. 2014 Sep;40(5):1040-6. Epub 2013 Sep 23. PubMed PMID: 24062594. DOI: 10.1093/schbul/sbt129.

6) Katsuta N, Ohnuma T, Maeshima H, Takebayashi Y, Higa M, Takeda M, Nakamura T, Nishimon S, Sannohe T, Hotta Y, Hanzawa R, Higashiyama R, Shibata N, Arai H. Significance of measurements of peripheral carbonyl stress markers in a cross-sectional and longitudinal study in patients with acute-stage schizophrenia. Schizophr Bull. 2014 Nov;40(6):1366-73. Epub 2014 Jan 21. PubMed PMID: 24448481. DOI: 10.1093/schbul/sbt234

7) Ohnuma T, Nishimon S, Takeda M, Sannohe T, Katsuta N, Arai H. Carbonyl Stress and Microinflammation-Related Molecules as Potential Biomarkers in Schizophrenia. Front Psychiatry. 2018 Mar 13;9:82. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 29593588. DOI: 10.3389/fpsyt.2018.00082.

8) Kouidrat Y, Amad A, Desailloud R, Diouf M, Fertout E, Scoury D, Lalau JD, Loas G. Increased advanced glycation end-products (AGEs) assessed by skin autofluorescence in schizophrenia. J Psychiatr Res. 2013 Aug;47(8):1044-8. Epub 2013 Apr 21. PubMed PMID: 23615188. DOI:10.1016/j.jpsychires.2013.03.016.

9) Koike S, Kayama T, Arai M, Horiuchi Y, Kobori A, Miyashita M, Itokawa M, Ogasawara Y. Characterization of modified proteins in plasma from a subtype of schizophrenia based on carbonyl stress: Protein carbonyl is a possible biomarker of psychiatric disorders. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 13;467(2):361-6. Epub 2015 Oct 9. PubMed PMID: 26431870. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.152.

10) Itokawa M, Miyashita M, Arai M, Dan T, Takahashi K, Tokunaga T, Ishimoto K, Toriumi K, Ichikawa T, Horiuchi Y, Kobori A, Usami S, Yoshikawa T, Amano N, Washizuka S, Okazaki Y, Miyata T. Pyridoxamine: A novel treatment for schizophrenia with enhanced carbonyl stress. Psychiatry Clin Neurosci. 2018 Jan;72(1):35-44. Epub 2017 Nov 30. PubMed PMID: 29064136. DOI: 10.1111/pcn.12613.