

201122002A

厚生労働科学研究研究費補助金
障害者対策総合研究事業（精神障害分野）

統合失調症の多次元生物学的診断法と
新たな治療薬の開発をめざした病態解明研究

平成 23 度 総括・分担研究報告書

研究代表者 功刀 浩

平成 24（2012）年 5 月

厚生労働科学研究研究費補助金
障害者対策総合研究事業（精神障害分野）

統合失調症の多次元生物学的診断法と
新たな治療薬の開発をめざした病態解明研究

平成 23 度 総括・分担研究報告書

研究代表者 功刀 浩

平成 24（2012）年 5 月

目 次

I.	総括研究報告	
	統合失調症の多次元生物学的診断法と新たな治療薬の開発をめざした病態解明研究	1
	功刀 浩	
II.	分担研究報告	
	1. 神経心理・神経生理・分子遺伝学を用いた統合失調症の病態解明	11
	功刀 浩	
	2. MRIによる統合失調症の画像診断	27
	佐藤 典子	
	3. MRSを用いたバイオマーカーの開発	29
	石川 正憲	
	4. 細胞生物学的遺伝子機能解析	31
	沼川 忠広	
	5. 統合失調症の候補遺伝子研究による治療標的分子の解明	33
	尾崎 紀夫	
	6. 全ゲノム情報を用いた統合失調症診断法の開発	40
	岩田 仲生	
	7. 神経発達障害関連分子に着目したバイオマーカー・治療薬の開発	44
	那波 宏之	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	52
IV.	研究成果の刊行物・別刷	57

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（精神障害分野））
総括研究報告書

統合失調症の多次元生物学的診断法と新たな治療薬の開発をめざした病態解明研究

研究代表者 功刀 浩

研究要旨

本研究の目的は、最先端の脳科学的手法・生物学的手法を用いて、統合失調症の多次元生物学的診断法の確立を行うとともに、遺伝子研究・機能解析によってバイオマーカーや治療法を開発を行うことを目的とする。今年度は、以下のような成果が得られた。

研究代表者／分担研究者の功刀は、統合失調症における多次元生物学的診断法の開発とそれに基づいた病態解明、鍵分子の探索を目的として、統合失調症、うつ病、健常者を対象に詳細な認知機能テストバッテリー（知能検査 WAIS-R、ウェックスラー記憶力検査、実行機能[WCST]など）、簡易認知機能テスト(BACS)、運動機能(pegboard、握力)、感覚情報処理の異常を検出するプレパルスインヒビション、ストレスホルモン系を調べるデキサメサゾン(DEX)／CRH 負荷テスト、安定同位体 ^{13}C を活用した呼気ガス検査、血液中や脳脊髄液中のタンパク質やモノアミン代謝産物、MRI 脳構造画像、プロトン MRS を同一被験者に施行した。特に、23 年度に得られた主要成果として、①知能検査として汎用されている WAIS-R の下位項目スコアを指標とし比較的高い感度、特異性で統合失調症とうつ病や健常者とを判別する方法を開発した。②統合失調症では血液や脳脊髄液中の IL-6 が増加していることを明らかにした。③統合失調症のリスク遺伝子として ABCA1、インターロイキン 1β の遺伝子多型を同定した。④安定同位体で標識した ^{13}C フェニルアラニンの呼気ガス検査によって統合失調症におけるフェニルアラニン代謝の低下を明らかにした。⑤ MRI 画像によって女性の統合失調症とうつ病とを判別する方法を開発した。以上のように、多次元生物学的診断法の確立のためのデータベースの構築が大きく進んだ。

分担研究者の佐藤は、グリアや神経上に存在する ABCA1 の遺伝子多型と統合失調症リスクとの関連、ABCA1 遺伝子多型と MRI 脳画像との関連を解析した。その結果、ABCA1 遺伝子多型が、男性において疾患リスクや大脳の脆弱性と関連していること示唆する結果を得

た。

分担研究者の石川は、急性期病棟の医長として患者リクルートを積極的に行い、入院患者全員に研究協力を依頼する体制を維持した。また、MRSによるGlx測定が統合失調症の再発のバイオマーカーとなる可能性を示唆する結果を得た。

分担研究者の沼川は、統合失調症の病態の鍵分子である脳由来神経栄養因子(BDNF)に注目し、統合失調症症状を惹起することで知られるフェンサイクリジン(PCP)の培養ニューロンシナプス減少作用におけるBDNFの役割について検討した。その結果、PCPはNMDA型グルタミン酸受容体を介したカルシウムの流入を阻害することによってBDNFの分泌を抑制し、その結果シナプスを減少させることを見いだした。

分担研究者の尾崎は、NMDAR複合体の構成分子であるneuropilin and tolloid-like 1と統合失調症との関連について詳細な検討を行い、リスクと関連を示唆する結果を得た。

分担研究者の岩田は、日本人統合失調症患者を対象とした全ゲノム解析を行い、そのデータを利用して遺伝子多型と末梢血での遺伝子発現を組み合わせるeQTLの手法を用い、発現を規定する可能性のある一塩基多型(SNP)が疾患感受性と重複するかを検討した。その結果、発現と有意に関連するSNP(P<0.01)は、疾患感受性のリスクに有意に多く存在することを同定した。

分担研究者の那波は、ニューレグリン1の新生児ラット投与モデルを統合失調症モデル動物として用い、その神経回路発達の変化、認知行動変化との対応、抗精神病薬の作用機序など、その病態機序の解明を行った。このモデルでは、前頭葉内側部への永続的なドーパミン神経支配を示すとともに、社会行動において顕著な認知行動異常を示した。昨年度までの上皮成長因子を用いたモデルと同様に、中脳ドーパミン神経の自発発火頻度、もしくはその頻度分布、反応性に異常が観察された。これらの事実は、統合失調症の関連認知行動変化にドーパミンが確かに関与していることを実証するもので、ドーパミン仮説の再検証と関連薬物の再評価を促すものである。

分担研究者	
佐藤典子	国立精神・神経医療研究センター 病棟放射線診療部・部長

石川正憲	国立精神・神経医療研究センター 病棟第一病棟部・医長
沼川忠広	国立精神・神経医療研究センター

	ター神経研究所疾病研究第 三部・室長
尾崎紀夫	名古屋大学大学院医学系研 究科・教授
岩田仲生	藤田保健衛生大学 医学部・教授
那波宏之	新潟大学脳研究所・教授

A. 研究目的

統合失調症の生涯罹患率はおよそ1%であり、わが国では約70万人が治療を受けており、入院患者数(18万人)はあらゆる病気の中で最も多い。医療費による国家の直接的経済損失や職業的機能障害などによる間接的経済損失も莫大である。このような現状であるのは、統合失調症の根本的治療法や発症予防法が無いためであり、病気の本態を解明し、新たな診断・治療・予防法を開発することは、厚生労働行政上極めて重要な課題である。

統合失調症の病態は、神経心理、神経生理、生化学、画像、遺伝子解析などによって研究されており、いずれの方法においても健常者と比較して差がみられるという所見はある一方、統合失調症だけに特異的に見られる単一の異常所見は存在しない。これは、統合失調症が明確に定義できる疾患単位というより、異種性を持ち、統合失調症型人格や気分障害などとの間に連続性がある病態であることによると考えられる。そこで本研究は、統合失調症の発病仮説

に関連する各種の生物学的検査(換言すればエンドフェノタイプ)を同一患者に施行し、多角的に病態を解明し、生物学的診断や類型化に役立つ診断システムを開発することを第一の目的とする。実際には、簡易認知機能テスト、感覚情報処理の異常を検出するプレパルスインヒビション、ストレスホルモン系を調べるデキサメサゾン(DEX)/CRH 負荷テスト、カテコールアミンの前駆物質であるフェニルアラニン代謝をモニターする呼気ガス検査、MRI 脳構造画像、プロトン MRS を同一被験者に施行する。さらに、血液や脳脊髄液を採取し末梢血の遺伝子発現プロファイルや神経発達障害に関与するタンパク質(サイトカインなど)やモノアミン代謝産物の測定を行う。特に呼気ガス検査は、申請者の知る限り精神疾患に応用されたことは無く、極めて独創的である。各検査について、統合失調症と健常者や気分障害を最も効率よく識別する基準値を明らかにし、複数の検査を活用することによって中核的な統合失調症を100%近く正確に診断でき、機能性精神疾患を多次元生物学的診断システムで評価する方法を開発することを目的とする。

次に、これらの生物学的所見をエンドフェノタイプとして網羅的遺伝子解析やプロテオームなどを用いた最先端の手法によって分子基盤について明らかにし、新しい治療薬を開発することを第二の目的とする。われわれは、既に統合失調症の全ゲノム遺伝子解析を終了して

おり、その基盤の上にさらにデータを収集し発展させる。注目される遺伝子については培養ニューロンを用いて細胞生物学的機能を明らかにする。また、鍵分子に作用する低分子化合物の抗精神病薬作用について、統合失調症動物モデルを用いた創薬研究を行う。

統合失調症の診断は今の所、発症後の症状を医師が面接に依って主観的に把握することによって行われており、脳科学的な客観的診断法が存在しない。本研究によって顕在発症前の早期発見（早期介入を可能にする）、生物学的所見に基づく類型化と科学的根拠に基づいた最適な治療法の選択なども可能になることが期待される。また、疾患の分子基盤を明らかにし、認知機能などを改善させる新しい治療薬を開発することを第二の目的とする。これに成功すれば、長期施設化からの脱却、就職率の向上につながることを期待される。統合失調症は1兆円規模の医療費（主に入院費）に加えて、生活保護や障害年金の受給者が非常に多いことから、国民の経済損失も多大である。社会復帰や就職率が向上すれば、患者だけでなく、国民全体の福祉に対する貢献は図り知れない。また、新たな診断・治療法の開発はわが国の知的財産の獲得や産業活性化にも寄与することが期待できる。

本研究全体図を図1に示す。

B. 研究方法

<多次元生物学的診断法の確立>

昨年度までの検討に引き続き、国立精神・神経医療研究センターにおいて、統合失調症患者、気分障害患者、健常者を対象にゲノムDNA、血液中のRNA、血漿サンプルを多数収集するとともに、詳細な認知機能テストバッテリー（知能検査WAIS-R、ウェックスラー記憶力検査、実行機能[WCST]など）、簡易認知機能テスト(BACS)、運動機能(pegboard、握力)、感覚情報処理の異常を検出するプレパルスインヒビション、ストレスホルモン系を調べるデキサメサゾン(DEX)/CRH負荷テストや低用量デキサメサゾン抑制テスト、カテコールアミンの前駆物質であるフェニルアラニンの代謝速度をみる呼気ガス検査、血液中のタンパク質（サイトカイン）、MRI脳構造画像、プロトンMRSを同一被験者に施行した。統合失調症患者は国立精神・神経センター急性期病棟において、気分障害患者は国立精神・神経センターうつ病外来において系統的に（原則として全患者に）研究への参加協力を要請した。また、今年度までに、統合失調症患者、気分障害患者、健常者およそ300名からの脳脊髄液を収集した。精神症状は陽性・陰性症状評価尺度(PANSS)やハミルトンうつ病評価尺度(GRID-HAMD-21)を用いた。健常者において、精神疾患の既往の有無については、精神疾患簡易構造化面接法(M.I.N.I.)を用いてスクリーニングした。

統合失調症認知機能簡易評価尺度日本語版(BACS-J：兼田ら、2008)と感覚情報処理をみ

るプレパルスインヒビション(PPI)は、臨床心理士が行い、PPIは申請者らによる既報に基づいて行った。遺伝子解析は、研究協力者の篠山大明がインターロイキン1βを候補遺伝子として、藤井崇がABCA1を候補遺伝子として解析した。サイトカインの役割に注目し、血中や脳脊髄液中のIL-6については、研究協力者の篠山や若林千里が中心に解析した。視床下部—下垂体—副腎系の機能検査であるDEX/CRHテストは申請者らが提唱した方法(Kunugi et al, 2006)により、研究協力者堀弘明(精神科医)が担当して行った。呼気ガス検査は安定同位体¹³Cで標識したフェニルアラニン100mgを投与し、その後2時間、15分間隔で呼気中に排出される¹³CO₂を採取することでカテコールアミン産生量を推定した(研究協力者寺石俊也、精神科医)。MRIは1.5テスラの装置で撮像し、SPMによる脳構造体積測定や拡散テンソル画像による神経ネットワーク異常に関する解析を行った。今年度は、統合失調症とうつ病とを判別する方法を開発した。MRIと同時にプロトンMRSの撮影を行い、N-acetylaspartate (NAA)、choline-containing compounds (Cho)、creatine、lactate、glutamine、GABAについて関心領域ごとに測定した。MRIは分担研究者の佐藤、石川と研究協力者太田深秀(精神科医)が行った。

<分子基盤の解明と創薬標的の探索>

研究代表者らは、これまでに統合失調症の鍵分子として、脳由来神経栄養因子(BDNF)が重要であることを明らかにしおり、22年度までの研究に引き続き、統合失調症症状を惹起することで知られるフェンサイクリジンの培養ニューロンシナプス減少作用におけるBDNFの役割について検討した(分担研究者沼川)。

さらに、グルタミン酸が重要であることが古くから指摘されており、グルタミン酸誘導体であり、緑茶の旨味成分であるテアニンが、新たな抗精神病薬として有望である前臨床的結果を得たが、ヒト健常者の感覚情報処理に与える影響について検討を始めている。

分担研究者の尾崎は、NMDAR 複合体の構成分子である neuropilin and toll-like 1 と統合失調症との関連について詳細な検討を行った。

分担研究者の岩田は、日本人統合失調症患者を対象とした全ゲノム解析を行い、そのデータを利用して遺伝子多型と末梢血での遺伝子発現を組み合わせる eQTL の手法を用い、発現を規定する可能性のある一塩基多型(SNP)が疾患感受性と重複するかを検討した。

分担研究者の那波は、昨年度までに構築してきた統合失調症モデル動物として、上皮成長因子(EGF)の新生児ラット投与モデルに引き続き、ニューレグリン1の新生児ラット

投与モデルを統合失調症モデル動物として用い、その神経回路発達の変化、認知行動変化との対応、抗精神病薬の作用機序など、その病態機序の解明を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の主要部分は、精神疾患患者、健常対照群を対象とした遺伝子解析研究や臨床研究である。遺伝子解析研究では、試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、倫理審査委員会において承認を受けた上で研究を行っている。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報 の 厳 重 な 管 理 (匿 名 化) な ど を 徹 底 し て い る 。 ま た 、 脳 画 像 、 認 知 機 能 検 査 、 生 理 機 能 検 査 な ど の デ ー タ 収 集 に 際 し て は 、 「 臨 床 研 究 に 関 す る 倫 理 指 針 」 に 準 拠 し た 研 究 計 画 に よ っ て 、 倫 理 審 査 委 員 会 で の 承 認 を 受 け て 行 っ て い る 。 動 物 実 験 に つ い て も 研 究 機 関 の 倫 理 委 員 会 の 審 査 を 経 て 行 っ て お り 、 苦 痛 を 最 小 限 に す る な ど の 必 要 な 処 置 を 講 じ て い る 。

C. D. 研究結果、考察

①高次脳機能異常

WAIS-R を用いた統合失調症の診断法の開発

統合失調症では、IQ が低下することが知られており、知能検査として汎用されている WAIS-R を用いて、統合失調症を気分障害や健常者と判別する方法を開発した。統合失調症 171 名、うつ病 113 名、健常者 488 名を対象に WAIS-R を測定した結果について詳細に検討した結果、WAIS-R の下位検査項目のプロフィールを比較すると、統合失調症高機能群とうつ病とでは大きく異なることが明らかになった。これは、統合失調症では知識などの結晶性知能は比較的保たれているが、臨機応変な対応を必要とする流動性知能が低下しているという指摘と一致している。両疾患を判別するモデルを作成したところ、感受性 80.3%、特異性 78.8% であり、うつ病との鑑別に有用である。

統合失調症の情報処理障害の指標となる PPI の異常に関しても、1100 名以上のデータを収集し、統合失調症での低下や、うつ病との比較を行い、臨床的有用性を実証する世界最大級のデータベースを構築した。

②統合失調症の生化学的指標

統合失調症において免疫学的異常が関与する可能性については古くから指摘があり、功刀らは、血中、脳脊髄液中における IL-6 について検討した結果、統合失調症やうつ病において健常者と比較して IL-6 濃度が上昇していることを明らかにした。興味深いことに脳脊髄液中の濃度の方が血中濃度より高かった。従って、

IL-6 はうつ病との鑑別などの診断マーカーとしての有用性は乏しいものの、これらの精神疾患の病態を反映している分子であることが明らかになった。

また、独創的な試みとして、安定同位体で標識した ^{13}C フェニルアラニンの呼気ガス検査の臨床的有用性について検討した。平成 23 年度は、うつ病 53 名、双極性障害 27 名と健常者 23 名の ^{13}C -フェニルアラニン呼気検査の結果を得た。統合失調症と健常者の比較を平成 22 年度までに行っていた結果と合わせると、統合失調症患者 (計 91 名)の呼気ガス中の $^{13}\text{CO}_2$ 排出量は健常者 (計 181 名)に比較して有意に低下していた ($p=0.0005$)。本研究は安定同位体を用いた精神疾患を対象とした検査としては世界でも最先端の試みであり、画期的な成果である。さらに、フェニルアラニン代謝に必要な補酵素であるテトラヒドロビオプテリン(BH4)の血中濃度を測定した結果、統合失調症では BH4 が低下していることが明らかになった。以上の結果は、統合失調症の病態にフェニルアラニンの低下や BH4 の低下があり、フェニルアラニンはノルアドレナリンやドーパミンなどの神経伝達物質の前駆物質であることから、BH4 の低下による神経伝達物質産生の異常が統合失調症の病態に関与している可能性を示唆する。

③統合失調症のリスク遺伝子研究

功刀らは、ABCA1、インターロイキン 18 を候補遺伝子として検討し、これらの分子が性特異的に統合失調症のリスクと関連することを明らかにした。すなわち、中枢神経系においてコレステロール輸送を司る ABCA1 をコードする遺伝子多型の 1 つ(rs2230808)が男性において統合失調症リスクと関連し(556 名の男性患者と 594 名の男性健常者のサンプルで検討)、MRI で測定した灰白質体積の減少と関連することを初めて報告した。IL-18 については、rs1143633 が統合失調症リスクと関連しており ($p=0.0089$)、特に女性において関連が強かった。

以上の結果は、統合失調症の脳病態や病因解明に有用な知見である。

分担研究者の尾崎は、NMDAR 複合体の構成分子である neuropilin and tollod-like 1 と統合失調症との関連について詳細な検討を行い、リスクと関連を示唆する結果を得た。

分担研究者の岩田は、日本人統合失調症患者を対象とした全ゲノム解析を行い、そのデータを利用して遺伝子多型と末梢血での遺伝子発現を組み合わせる eQTL の手法を用い、発現を規定する可能性のある一塩基多型(SNP)が疾患感受性と重複するかを検討した。その結果、発現と有意に関連する SNP($P<0.01$)は、疾患感受性のリスクに有意に多く存在することを同定した。

④脳画像解析

研究代表者の功刀らは、MRIによるVBM法と拡散テンソル画像を用いた診断応用に関する検討を行っている。昨年度は統合失調症と健常者の判別についての報告を行ったが、23年度には統合失調症とうつ病の判別に有用な方法の開発を行った。その結果、第一サンプルでは、統合失調症、うつ病をそれぞれ80%の正答率で判別する方法を見出した。それを第二サンプルに適用したところ、統合失調症で72%、うつ病で81%の正答率を得た。以上から、MRI構造画像を用いて、統合失調症とうつ病を判別することが可能であることが示唆された。なお、この研究によって、統合失調症やうつ病に特徴的な脳構造変化が明らかになった。

分担研究者の佐藤は、上記の統合失調症リスク遺伝子であることが示唆されたABCA1遺伝子と統合失調症皮質体積との関連を検討し、統合失調症リスクとなるABCA1遺伝子型が男性において皮質の体積減少と関連することを明らかにした。

分担研究者の石川は、統合失調症再燃例と、慢性期統合失調症および健常人を対象にMRSによるグルタミン神経伝達系の変化を検討した。MRSによるglutamine + glutamate測定が統合失調症の再発と関連するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

⑤細胞生物学や動物モデルによる機能解析

分担研究者の沼川は、統合失調症の病態の鍵分子である脳由来神経栄養因子(BDNF)に注

目し、統合失調症症状を惹起することで知られるフェンサイクリジン(PCP)の培養ニューロンシナプス減少作用におけるBDNFの役割について検討した。その結果、PCPはNMDA型グルタミン酸受容体を介したカルシウムの流入を阻害することによってBDNFの分泌を抑制し、その結果シナプスを減少させることを見いだした。これは、統合失調症におけるミクロの形態学的異常を説明するメカニズムとして極めて重要な知見である。

分担研究者の那波は、ニューレグリン1の新生児ラット投与モデルを統合失調症モデル動物として用い、その神経回路発達の変化、認知行動変化との対応、抗精神病薬の作用機序など、その病態機序の解明を行った。このモデルでは、前頭葉内側部への永続的なドーパミン神経支配を示すとともに、社会行動において顕著な認知行動異常を示した。昨年度までの上皮成長因子を用いたモデルと同様に、中脳ドーパミン神経の自発発火頻度、もしくはその頻度分布、反応性に異常が観察された。これらの事実は、統合失調症の関連認知行動変化にドーパミンが確かに関与していることを実証するもので、ドーパミン仮説の再検証と関連薬物の再評価を促すものである。

⑥創薬研究

統合失調症の病態においてグルタミン酸が重要であることが古くから指摘されている。研

究代表者の功刀らのグループは、グルタミン酸誘導体であり、緑茶の旨味成分であるテアニンの向精神薬作用についてマウスを用いた前臨床的検討を行った。その結果、テアニンはマウスのPPIを改善し、強制水泳の無動時間を減少させることなどを見出し、新たな抗精神病薬として有望である前臨床的結果を得た論文が出版された (Wakabayashi et al, *Psychopharmacology*, 2012)。23年度は、ヒト投与試験を開始し、PPIの改善効果に関することを示唆する予備的結果を得ており、臨床的に有用であることをさらに示唆する結果を得た。

E. 結論

統合失調症における知能低下、記憶障害、実行機能などに重度の認知機能障害があることをさらに症例数を増やして明らかにした。WAIS-Rを統合失調症の診断に用いる方法を開発した。PPIの世界最大級のデータベースを構築し、診断的有用性について明らかにした。統合失調症の脳脊髄液、末梢血においてIL-6が高いことを明らかにした。また、安定同位体¹³Cで標識したフ

ェニルアラニンの呼気ガス検査によって統合失調症のフェニルアラニン代謝に異常があることを明らかにした。これも診断法に活用できる。遺伝子解析によって統合失調症リスク遺伝子に関する検討を行った。細胞生物学的検討や動物モデルによってBDNFやニューレグリンの統合失調症の神経発達障害形成に関与するメカニズムについて極めて興味深い知見を得た。テアニンの抗精神病薬様作用について明らかにした。

以上のように、統合失調症の多次元生物学的診断法の確立、それに基づいた病態解明、創薬などの多くの成果が得られた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

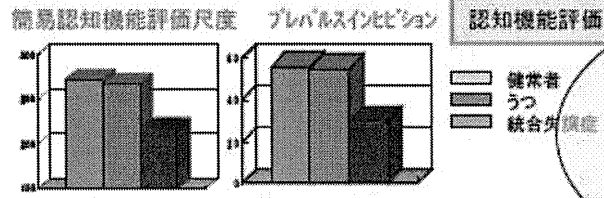
それぞれの分担研究報告書に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

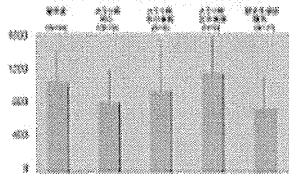
それぞれの分担研究報告書に記載した。

統合失調症の多次元生物学的診断法と 新たな治療薬の開発をめざした病態解明研究

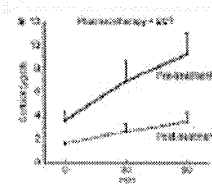
多次元生物学的診断法の確立



呼吸ガス検査



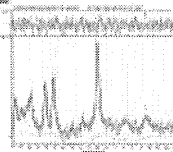
ストレスホルモン検査



血中バイオマーカー
脳脊髄液中マーカー

•BDNF
•サイトカイン

MRI/プロトンMRSIによる
脳の構造/機能



⇒ 多次元生物学的診断システムの構築

統合失調症

- 患者数70万人・21万人が入院
- 就職率1割程度
- 平均入院期間300日以上
- 医療費1兆円規模
- 経済損失3~4兆円

研究目的

- ① 多次元生物学的診断システム確立
- ② 根本的治療薬の開発

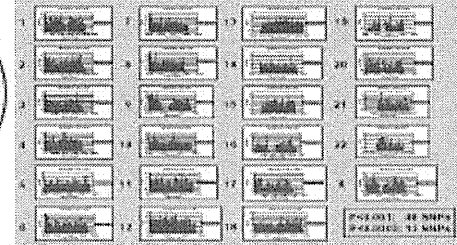
成果

- 客観的診断法・早期発見
- 医療費削減・長期入院からの脱却
- 就職率向上・知的財産

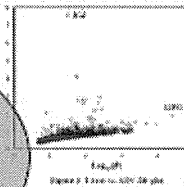
治療標的解明と創薬

全ゲノムSNPs解析

統合失調症のゲノムワイド関連解析結果

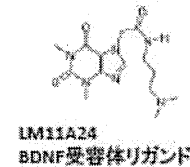
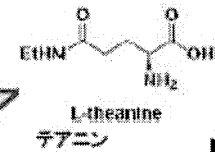


末梢血マイクロアレイ



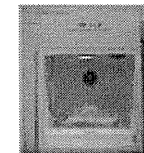
最先端のゲノム解析技術
とバイオインフォマティクス
による治療薬標的分子の解明

標的分子に作用する低分子化合物の
抗精神病作用や認知機能改善作用の検証



T字迷路

PPI



神経心理・神経生理・分子遺伝学を用いた統合失調症の病態解明

分担研究者 功刀 浩

国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第三部・部長

研究要旨

統合失調症における多次元生物学的診断法の開発とそれに基づいた病態解明、鍵分子の探索を目的として、統合失調症、うつ病、健常者を対象に詳細な認知機能テストバッテリー(知能検査 WAIS-R、ウェックスラー記憶力検査、実行機能[WCST]など)、簡易認知機能テスト(BACS)、運動機能(pegboard、握力)、感覚情報処理の異常を検出するプレパルスインヒビション、ストレスホルモン系を調べるデキサメサゾン(DEX)/CRH 負荷テスト、モノアミン産生の材料となるフェニルアラニン代謝を推定する呼気ガス検査、血液中や脳脊髄液中のタンパク質やモノアミン代謝産物、MRI 脳構造画像、プロトン MRS を同一被験者に施行した。その結果、多次元生物学的診断法の確立のためのデータベースの構築が大きく進んだ。ここでは、23 年度に得られた主要成果として、①知能検査として汎用されている WAIS-R の下位項目スコアを指標とし比較的高い感度、特異性で統合失調症とうつ病や健常者とを判別する方法を開発したこと、②統合失調症では血液や脳脊髄液中の IL-6 が増加していることを明らかにしたこと、③統合失調症のリスク遺伝子として ABCA1、インターロイキン 1 β の遺伝子多型を同定したこと、④安定同位体で標識した ^{13}C フェニルアラニンの呼気ガス検査によって統合失調症におけるフェニルアラニン代謝の低下を明らかにしたこと、⑤MRI 画像によって女性の統合失調症とうつ病とを判別する方法を開発したこと、について報告する。

A. 研究目的

統合失調症の病態は、神経心理、神経生理、生化学、画像、遺伝子解析などによって研究されており、いずれの方法においても健常者と比較して差がみられるという所見はある一方、統合失調症だけに特異的に見られる単一の異常所

見は存在しない。これは、統合失調症が明確に定義できる疾患単位というより、異種性をもち、統合失調症型人格や気分障害などとの間に連続性がある病態であることによると考えられる。そこで本研究は、統合失調症の発病仮説に関連する各種の生物学的検査（換言すればエンドフ

ェノタイプ)を同一患者に施行し、多次的に病態を解明し、生物学的診断や類型化に役立つ診断システムを開発することを第一の目的とする。実際には、簡易認知機能テスト、感覚情報処理の異常を検出するプレパルスインヒビション(PPI)、ストレスホルモン系を調べるデキサメサゾン(DEX)/CRH負荷テスト、モノアミン産生量を推定する呼気ガス検査、MRI脳構造画像、プロトンMRSを同一被験者に施行する。さらに、血液や脳脊髄液を採取し、これらの試料の遺伝子発現プロファイルやモノアミン代謝産物の測定、神経発達障害に関与するタンパク質の解析を行う。各検査について、統合失調症と健常者や気分障害を最も効率よく識別する基準値を明らかにし、複数の検査を活用することによって中核的な統合失調症を100%近く正確に診断でき、機能性精神疾患を多次元生物学的診断システムで評価する方法を開発することを目的とする。

次に、これらの生物学的所見をエンドフェノタイプとして網羅的遺伝子解析などの最先端の手法によって分子基盤について明らかにし、新しい治療薬を開発することを第二の目的とする。

23年度に得られた主要成果として、①知能検査として汎用されているWAIS-Rの下位項目スコアを指標とし比較的高い感度、特異性で統合失調症とうつ病や健常者とを判別する方法を開発したこと、②統合失調症では血液や脳脊髄液中のIL-6が増加していることを明らかにしたこと、③統合失

調症のリスク遺伝子としてABCA1、インターロイキン1βの遺伝子多型を同定したこと、④安定同位体で標識した¹³Cフェニルアラニンの呼気ガス検査によって統合失調症におけるフェニルアラニン代謝の低下を明らかにしたこと、⑤MRI画像によって女性の統合失調症とうつ病とを判別する方法を開発したこと、について報告する。

本研究の全体図を図1に示す。

B. 研究方法

昨年度までの検討に引き続き、国立精神・神経医療研究センターにおいて、統合失調症患者、気分障害患者、健常者を対象にゲノムDNA、血液中のRNA、血漿サンプルを多数収集するとともに、詳細な認知機能テストバッテリー(知能検査WAIS-R、ウェックスラー記憶力検査、実行機能[WCST]など)、簡易認知機能テスト(BACS)、運動機能(pegboard、握力)、感覚情報処理の異常を検出するプレパルスインヒビション、ストレスホルモン系を調べるデキサメサゾン(DEX)/CRH負荷テストや低用量デキサメサゾン抑制テスト、カテコラーミンの前駆物質であるフェニルアラニンの代謝速度をみる呼気ガス検査、血液中のタンパク質(サイトカイン)、MRI脳構造画像、プロトンMRSを同一被験者に施行した。統合失調症患者は国立精神・神経センター急性期病棟において、気分障害患者は国立精神・神経センターうつ病外来において系統的に(原則として全患者に)研究への参加協力

を要請した。また、今年度までに、統合失調症患者、気分障害患者、健常者およそ300名からの脳脊髄液を収集した。精神症状は陽性・陰性症状評価尺度(PANSS)やハミルトンうつ病評価尺度(GRID-HAMD-21)を用いた。健常者において、精神疾患の既往の有無については、精神疾患簡易構造化面接法(M.I.N.I.)を用いてスクリーニングした。

統合失調症認知機能簡易評価尺度日本語版(BACS-J: 兼田ら、2008)と感覚情報処理をみるプレパルスインヒビション(PPI)は、臨床心理士が行い、PPIは申請者らによる既報に基づいて行った。遺伝子解析は、研究協力者の篠山大明がインターロイキン1 β を候補遺伝子として、藤井崇がABCA1を候補遺伝子として解析した。サイトカインの役割に注目し、血中や脳脊髄液中のIL-6については、研究協力者の篠山や若林千里が中心に解析した。視床下部—下垂体—副腎系の機能検査であるDEX/CRHテストは申請者らが提唱した方法(Kunugi et al, 2006)により、研究協力者堀弘明(精神科医)が担当して行った。呼気ガス検査は安定同位体 ^{13}C で標識したフェニルアラニン100mgを投与し、その後2時間、15分間隔で呼気中に排出される $^{13}\text{CO}_2$ を採取することでカテコラミン産生量を推定した(研究協力者寺石俊也、精神科医)。MRIは1.5テスラの装置で撮像し、SPMによる脳構造体積測定や拡散テンソル画像による神経ネットワーク異常に関する解析を行った。今年度は、統合失調症

とうつ病とを判別する方法を開発した。MRIと同時にプロトンMRSの撮像を行い、N-acetylaspartate (NAA)、choline-containing compounds (Cho)、creatine、lactate、glutamine、GABAについて関心領域ごとに測定した。MRIは分担研究者の佐藤、石川と研究協力者太田深秀(精神科医)が行った。

(倫理面への配慮)

本研究の主要部分は、精神疾患患者、健常対照群を対象とした遺伝子解析研究や臨床研究である。遺伝子解析研究では、試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、国立精神・神経医療研究センター倫理審査委員会において承認を受けた上で研究を行っている。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理(匿名化)などを徹底している。また、脳画像、認知機能検査、生理機能検査などのデータ収集に際しては、「臨床研究に関する倫理指針」に準拠した研究計画によって、倫理審査委員会での承認を受けて行っている。

動物実験に関しては、犠牲となる動物の数を苦痛を最小限にするように研究計画を立て、国立精神・神経医療研究センター神経研究所の小

型動物倫理委員会の承認を受けて行っている。

C. D. 研究結果、考察

①WAIS-R を用いた統合失調症の診断法の開発

統合失調症では、IQ が低下することが知られており、知能検査として汎用されている WAIS-R を用いて、統合失調症を気分障害や健常者と判別する方法を開発した。なお、現在は臨床での知能検査には WAIS-III が主に用いられるようになっているが、以前からのデータ集積が豊富であることから本研究では WAIS-R を用いた。統合失調症 171 名、うつ病 113 名、健常者 488 名を対象に WAIS-R を測定した結果について詳細に検討した。高機能群 (HF-SZ) と低機能群 (LF-SZ) に分け、双極性障害 (BP) や大うつ病 (MDD) と WAIS-R の下位項目テストについて比較した。

その結果、WAIS-R の下位検査項目のプロフィールを比較すると、統合失調症高機能群とうつ病とでは大きく異なることが明らかになった (図 1) ($p < 0.0001$: 数唱、算数、理解、絵画完成、絵画列、組み合わせ)。これは、統合失調症では知識などの結晶性知能は比較的保たれているが、臨機応変な対応を必要とする流動性知能 (新たな問題を解決し、未知のパターンを認識することにかかわる能力全般) が低下しているという指摘と一致している。両疾患を判別するモデルを作成したところ、感受性 80.3%、特異性 78.8%であり、うつ病との鑑別に有用である (論文準備中)。

②統合失調症の血中、脳脊髄液中における IL-6 高値 (図 2)

IL-6 は炎症性サイトカインの 1 つであり、統合失調症やうつ病で高値を示すことが報告されている。しかし、結果は必ずしも一致せず、わが国での検討も殆どない。また、IL-6 の受容体 (IL-6R) の遺伝子には Asp358Ala のアミノ酸置換を伴う遺伝子多型があり、これによって健常者の可溶性 IL-6R 濃度や IL-6 濃度が規定されていることが知られている。

そこで、われわれは、104 人の統合失調症患者および 112 人の健常者において血漿 IL-6 濃度、遺伝子型を、可溶性 IL-6R 濃度については、そのうちの 53 人の統合失調症患者および 49 人の健常者について検討した。その結果、統合失調症患者では健常者と比較していずれの遺伝子型においても血漿 IL-6 濃度が有意に高かったが、可溶性 IL-6R 濃度は有意な差を認めなかった。また、健常者では血漿 IL-6 濃度と遺伝子型との間に相関がみられたが、統合失調症では相関がみられなかった (Sasayama et al, J Psychiatr Res, 2011)。 (図 2 左)

さらに、脳脊髄液中の IL6 についても検討を行った。32 名の統合失調症患者、30 名の大うつ病患者、35 名の健常者について脳脊髄液中、および同時に採取された血漿中の IL-6 について検討したところ、統合失調症も大うつ病でも健常者と比較して脳脊髄液中 IL-6 濃度が増加してお

り (統合失調症: $P = 0.0027$; 大うつ病: $P = 0.012$)、興味深いことに、IL-6 濃度は血漿中濃度より有意に高い結果であり、両者には有意な相関が無かった (図 2 右; Sasayama et al, 論文投稿中)。

さらに、上記の IL-6 受容体遺伝子多型 Asp358Ala と認知機能との関連を調べるために、健常成人 576 名に対しウェクスラー成人知能検査を施行した。Asp/Asp 遺伝子型の対象者は Ala アレル保有者と比較して言語性 IQ が高く ($P = 0.005$)、とくに、長期記憶を必要とする言語性の下位検査で有意な差がみられた。Ala アレル保有者では IL-6 および可溶性 IL-6 受容体濃度が高いことが知られており、過剰の IL-6 シグナルが長期記憶を必要とする言語性認知能力の獲得に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された (Sasayama et al, J Neural Transm, 2012)。

以上から、IL-6 はうつ病との鑑別などの診断マーカーとしての有用性は乏しいものの、これらの精神疾患の病態を反映している分子であることが明らかになった。特に、脳脊髄液中での IL-6 濃度の方が血漿中濃度より高く、脳内で IL-6 を産生する細胞が精神疾患の病態に関与している可能性が示唆される。

③統合失調症のリスク遺伝子研究

23 年度は、ABCA1、インターロイキン 1 β が統合失調症のリスクと関連することを明らかにした。

中枢神経系においてコレステロール輸送を司る

ABCA1 をコードする遺伝子多型の 1 つ (rs2230808) が男性において統合失調症リスクと関連し (556 名の男性患者と 594 名の男性健常者のサンプルで検討)、MRI で測定した灰白質体積の減少と関連することを初めて報告した (図 3) (Ota et al, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011)。

炎症性サイトカインと統合失調症との関連が指摘されており、IL-6 については、上記のごとくの検討を行ったが、IL-1 β については、遺伝子関連研究を行った。533 人の統合失調症と 1136 人の健常者について 5 つのタグ SNPs について遺伝子型を決定し、関連をみた。その結果、rs1143633 が統合失調症リスクと関連しており ($p=0.0089$)、特に女性において関連が強かった (Sasayama et al, Behav Brain Func, 2011)。

以上の結果は、統合失調症の脳病態や病因解明に有用な知見である。

④安定同位体で標識した ^{13}C フェニルアラニンの呼気ガス検査

平成 23 年度は、うつ病 53 名、双極性障害 27 名と健常者 23 名の ^{13}C -フェニルアラニン呼気検査の結果を得た。統合失調症と健常者の比較を平成 22 年度までに行っていた結果と合わせると、統合失調症患者 (計 91 名) の呼気ガス中の $^{13}\text{CO}_2$ 排出量は健常者 (計 181 名) に比較して有意に低下していた ($p=0.0005$ 、図 4 左)。本研究は安定同位体を用いた精神疾患を対象とした検査としては世

界でも最先端の試みであり、画期的な成果である。さらに、フェニルアラニン代謝に必要な補酵素であるテトラヒドロビオプテリン(BH4)の血中濃度を測定した結果、統合失調症ではBH4が低下していることが明らかになった(図4右)。以上の結果は、統合失調症の病態にフェニルアラニンの低下やBH4の低下があり、フェニルアラニンはノルアドレナリンやドーパミンなどの神経伝達物質の前駆物質であることから、BH4の低下による神経伝達物質産生の異常が統合失調症の病態に関与している可能性を示唆する。

⑤MRI画像による統合失調症とうつ病の判別

MRIによる統合失調症の脳構造物の体積変化についての研究は非常に多いが、それを診断や鑑別に用いようという試みはいまだに少ない。われわれは、voxel-based morphometry (VBM法)を用いて、統合失調症の診断に有用な方法の開発を行い、22年度に報告した(Ota et al, *Psychiatry Clin Neurosci*, in press)。23年度はVBMと拡散テンソル画像(DTI)を用いて統合失調症とうつ病を判別する方法を開発した。

25名の女性統合失調症患者と同数の女性うつ病患者のMRI画像を用いて、視床、島、前部帯状回、脳梁をいくつかの領域に分けて解析し、体積や判別する方法とDTIの係数を用いて統合失調症とうつ病とを判別する方法を決定した。その結果を18名の女性統合失調症と16名の女性うつ病患者に当てはめて妥当性を検証した。

その結果、第一サンプルでは、統合失調症、うつ病をそれぞれ80%の正答率で判別する方法を見出した。それを第二サンプルに適用したところ、統合失調症で72%、うつ病で81%の正答率を得た。以上から、MRI構造画像を用いて、統合失調症とうつ病を判別することが可能であることが示唆された。なお、この研究によって、統合失調症やうつ病に特徴的な脳構造変化が明らかになった。今後、男性についても症例数を増やして検討する予定である。

E. 結論

昨年度までに引き続いて被験者数を多数増やし、多次元の生物学的検査を行うとともに、うつ病との比較方法の開発などを行った。多次元生物学的診断法の確立のためのデータ構築が大きく進展した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記入。

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Sasayama D, Hori H, Teraishi T, Hattori K, Ota M, Tatsumi M, Higuchi T, Amano N, Kunugi H. Possible impact of ADRB3 Trp64Arg polymorphism on BMI in patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol*

- Biol Psychiatry. 2012 May 17. [Epubahead of print]
- 2: Adachi N, Numakawa T, Kumamaru E, Itami C, Chiba S, Iijima Y, Richards M, Katoh-Semba R, Kunugi H. Phencyclidine-Induced Decrease of Synaptic Connectivity via Inhibition of BDNF Secretion in Cultured Cortical Neurons. *Cereb Cortex*. 2012 Mar 30. [Epub ahead of print]
- 3: Ota M, Ishikawa M, Sato N, Hori H, Sasayama D, Hattori K, Teraishi T, Nakata Y, Kunugi H. Glutamatergic changes in the cerebral white matter associated with schizophrenic exacerbation. *Acta Psychiatr Scand*. 2012 Mar 20. [Epub ahead of print]
- 4: Watanabe Y, Egawa J, Iijima Y, Nunokawa A, Kaneko N, Shibuya M, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N, Tochigi M, Kunugi H, Itokawa M, Ozaki N, Hashimoto R, Someya T. A two-stage case-control association study between the tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene and schizophrenia in a Japanese population. *Schizophr Res*. 2012 May;137(1-3):264-6. Epub 2012 Feb 17.
- 5: Uezato A, Kimura-Sato J, Yamamoto N, Iijima Y, Kunugi H, Nishikawa T. Further evidence for a male-selective genetic association of synapse-associated protein 97 (SAP97) gene with schizophrenia. *Behav Brain Funct*. 2012 Jan 6;8:2.
- 6: Horiuchi Y, Iida S, Koga M, Ishiguro H, Iijima Y, Inada T, Watanabe Y, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Tochigi M, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Association of SNPs linked to increased expression of SLC1A1 with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2012 Jan;159B(1):30-7.
- 7: Deng X, Takaki H, Wang L, Kuroki T, Nakahara T, Hashimoto K, Ninomiya H, Arinami T, Inada T, Ujike H, Itokawa M, Tochigi M, Watanabe Y, Someya T, Kunugi H, Iwata N, Ozaki N, Shibata H, Fukumaki Y. Positive association of phencyclidine-responsive genes, PDE4A and PLAT, with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011 Dec;156B(7):850-8.
- 8: Sasayama D, Hori H, Teraishi T, Hattori K, Ota M, Iijima Y, Tatsumi M, Higuchi T, Amano N, Kunugi H. Possible association between interleukin-1 β gene and schizophrenia in a Japanese population. *Behav Brain Funct*. 2011 Aug 16;7:35.
- 9: Ota M, Fujii T, Nemoto K, Tatsumi M, Moriguchi Y, Hashimoto R, Sato N, Iwata N, Kunugi H. A polymorphism of the ABCA1 gene confers susceptibility to schizophrenia and related brain