

## 特集 統合失調症の思春期病態と早期介入

## 統合失調症の分子病態と思春期までの予防戦略

糸川 昌成<sup>1,2,3)</sup>, 新井 誠<sup>1)</sup>, 市川 智恵<sup>1)</sup>, 宮下 光弘<sup>1,3)</sup>,  
吉川 武男<sup>2)</sup>, 岡崎 祐士<sup>1,3)</sup>, 宮田 敏男<sup>4)</sup>

統合失調症の多発家系の発端者から *glyoxalase 1* (*GLO1*) 遺伝子に新規のフレームシフト変異を同定した。症例では、フレームシフトによって酵素活性が 50 % 低下しており、基質であるカルボニル化合物がメイラード反応を介して生成する終末糖化産物 (advanced glycation end products ; AGEs) が対照の 3.7 倍に増加し、カルボニル消去系分子であるビタミン B6 が 20 % レベルまで低下していた。*GLO1* 遺伝子について症例・対照研究を行った結果、Glu111Ala の Ala アレルが脆弱性リスクである可能性が示唆された。*GLO1* の cDNA を COS-7 細胞に導入し酵素活性を計測したところ、Glu 型 *GLO1* より Ala 型 *GLO1* の活性が低かった。赤血球を用いた *GLO1* 活性の測定では、Ala111 ホモ接合体の活性がその他の genotype より 16 % 低かった。そこで、45 例の統合失調症と 61 例の健常者の末梢血を検討したところ、AGEs は統合失調症で有意な蓄積を認め、ビタミン B6 も有意に患者で低下していた。*GLO1* 遺伝子に変異を持った症例では、発症前から長期間 AGEs が高かった可能性が示唆され、こうした症例にビタミン B6 を発症前に補充することで、思春期までの予防戦略となる可能性が示唆された。

<索引用語：カルボニルストレス性統合失調症，終末糖化産物，ペントシジン，ビタミン B6，*GLO1*>

## I. はじめに

ある珍しい症例において代謝異常を同定したことをきっかけに、これを一般症例まで敷衍して代謝異常を伴う統合失調症の一群が存在することを見出した。発端症例において、遺伝子変異が代謝障害と関連した可能性が示唆されたことから、こうした障害は発症前から長い期間持続していたことが推測された。ここで述べる代謝障害は内科領域を中心に十分検討されており、これを改善させる物質も複数見出されている。中でもビタミンのよ

うに安全性の確立されたものを発症前の個体に補充することで、思春期の予防戦略となる可能性を呈示する。本稿では、以下の 2 つのことにについて考察したい。1 つは、代謝障害の改善を視野においた生物学的早期介入についてであり、もう 1 つは症例研究の重要性についてである。近年、欧米を中心に被験者と対象遺伝子の規模を万の単位まで拡大した、国家プロジェクト級のビッグサイエンスが精神医学研究にも導入されている<sup>6,7)</sup>。日本の特に精神科領域の科学研究予算は、こうした

著者所属：1) 東京都医学総合研究所統合失調症・うつ病プロジェクト

2) 理化学研究所脳科学総合研究センター分子精神科学研究チーム

3) 東京都立松沢病院精神科

4) 東北大学大学院医学系研究科分子病態解析分野

第 106 回日本精神神経学会総会=会期：2010 年 5 月 20~22 日，会場：広島国際会議場・アステールプラザ

総会基本テーマ：求められる精神医学の将来ビジョン：多様な領域の連携と統合

シンポジウム 統合失調症の思春期病態と早期介入 座長：福田 正人（群馬大学大学院医学系研究科神経精神医学分野），岡崎 祐士（東京都立松沢病院） コーディネーター：岡崎 祐士

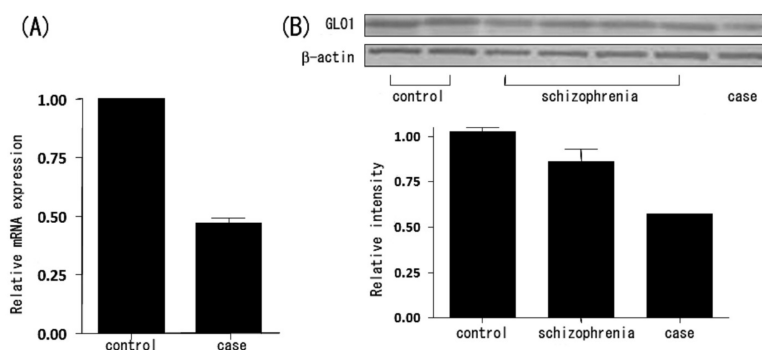


図1 症例における GLO1 の mRNA および蛋白発現  
 (A) GLO1 の mRNA 発現。対照を 1.0 とした時の相対発現量を示す。TaqMan 法により定量。(B) GLO1 の蛋白発現。対照を 1.0 としたときの相対発現量を示す。Western blot 法により  $\beta$ -actin を内部標準として定量。case；GLO1 にフレームシフトを持った発端症例，schizophrenia；GLO1 にフレームシフトを持たない統合失調症，control；変異を GLO1 に持たない健常対照

大規模研究を許容する額は配分されていない。日本においても先進諸国なみの予算を精神医学研究に配分されることが望まれる。国家プロジェクト級のビッグサイエンスが待望される一方で、疾患の病態解明における症例研究の重要性は依然として高く評価されるべきである。本稿では、臨床で出会う症例の注意深い検討が、貴重な発見のきっかけとなることを示したい。

本研究は、東京都精神医学総合研究所および都立松沢病院と共同研究施設の研究倫理委員会の承認を得て、被験者に研究の説明と書面による同意を得て行われた。

## II. 症 例

48歳の男性で、3人同胞の第3子として出生した。3親等内に同胞全員を含め5名の統合失調症罹患者がいる。高校入学ごろより、同級生の女子を「自分の双子だ」などと妄想が認められたため精神科に通院を始めた。間もなく「マイクで行動を探られている」と興奮状態になり入院した。以後4回の入院歴がある。24歳ごろから父母と兄に対し「顔はそっくりだが中身は入れ替わった偽物である」と訴えCapgras症候群を認めた。43歳のとき同症候群に基づく家人への傷害により入

院した。その後5年が経過したが、治療抵抗性の妄想と解体症状が持続し電気痙攣療法が繰り返され、閉鎖病棟での入院が継続していた。

## III. 稀な遺伝子変異の同定

我々は、症例が強い遺伝負因を持っていることから、比較的大きな機能変化を伴う遺伝子変異が家系内に存在する可能性が高いと考えた。そこで、遺伝子解析を目的として、研究協力について本人と後見人に説明し書面による同意を得て末梢血を採取した。6番染色体短腕6p21は、連鎖解析研究により複数のグループから統合失調症との連鎖が報告されており<sup>3,4,9)</sup>、ここにコードされている *glyoxalase 1* (GLO1) に注目した。GLO1は、酸化ストレスなどで生じる有害なカルボニル化合物を分解する解毒酵素である。症例のDNAを用いて GLO1 遺伝子の解析をしたところ、exon 1 に adenine が1塩基挿入する新規のフレームシフト変異を同定した。症例の GLO1 遺伝子ではフレームシフトにより早期終始コドンが発生し、全長184アミノ酸のGLO1が症例では42アミノ酸しか合成されていない可能性が示唆された。そこで、症例のリンパ球を用いて GLO1 の発現を測定したところ、mRNA、蛋白量ともに健常者

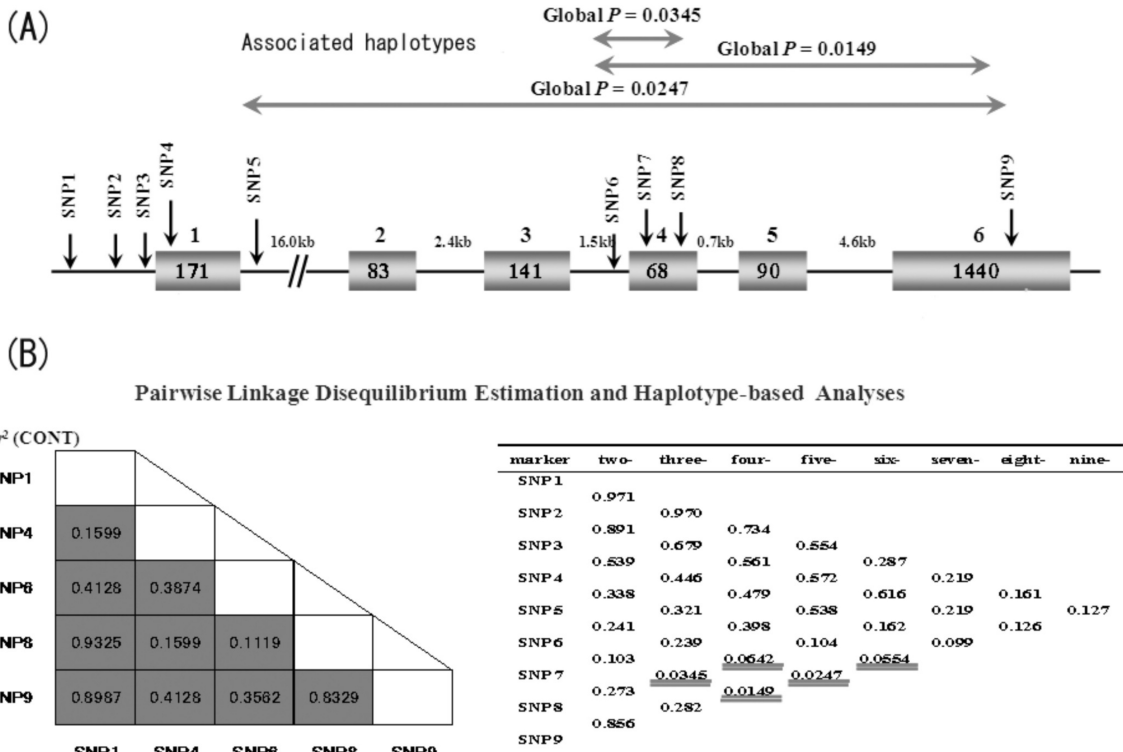


図2 GLO1 遺伝子の患者・対照研究

DSM-IV で統合失調症と診断された患者 202 例と健常対照 187 例の DNA を用いて、GLO1 遺伝子の 9 SNP との関連を調べた。3 つのハプロタイプで有意な関連が得られた。(A) GLO1 の遺伝子構造と有意な関連を示したハプロタイプを構成する SNP の範囲。(B)連鎖不平衡 (左) と sliding window によるハプロタイプ解析 (右)。

の 50 % まで低下していた (図 1)。カルボニル化合物はメイラード反応を介して蛋白質などを修飾し、終末糖化産物 (advanced glycation end products; AGEs) を生成する。AGEs が蓄積する状態は「カルボニルストレス」と提唱され<sup>9)</sup>、糖尿病性網膜症や動脈硬化の発症、進展、増悪に関与し、心不全や冠動脈疾患による死亡率とも相関する。カルボニルストレス消去系には、GLO1 以外にビタミン B6 があり、カルボニル化合物と結合して AGEs の腎排泄を促進し、メイラード反応を抑制する。症例では GLO1 活性が 50 % まで低下していることから、血中 AGEs (ペントシジン) 濃度の上昇、およびカルボニル消去に動員されることによるビタミン B6 の低下が予測された。そこで、症例の末梢血を解析したところ、

AGEs 濃度は対照の 3.7 倍に増加し、ビタミン B6 は対照の 20 % レベルにまで低下していた。

#### IV. 稀な症例から一般症例への敷衍

症例では稀な新規のフレームシフト変異によって、GLO1 活性が 50 % 低下するという大きな機能変化をもたらされていた。一般症例では、より軽度な活性低下を伴った頻度の高い多型が存在するのではないかと考え、GLO1 遺伝子の関連研究を行った。統合失調症 202 例と年齢・性別の一致した対照 187 例を用いて、データベースに登録されている 9 ヶ所の SNP (single nucleotide polymorphism) の頻度を比較した。その結果、3 つのハプロタイプで有意な関連を認めた (図 2)。ハプロタイプが重なりあう部分の SNP7 は

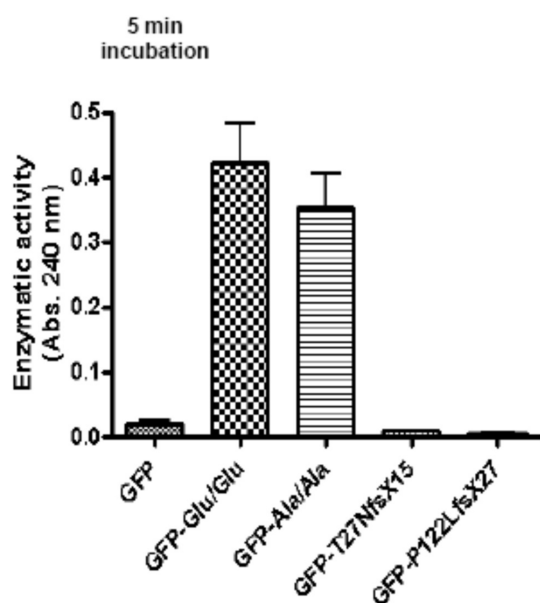


図3 GLO1をCOS-7細胞に強制発現させたときの活性GFPを融合させたGLO1のcDNAをCOS-7細胞へ導入し、細胞を調整後GFPで免疫沈降してGLO1蛋白を回収し活性を比較した。カルボニル化合物（メチオグリオキサール）とグルタチオンを被験者の赤血球から調整したGLO1と5分間37°Cでincubateし、240nmの吸光度により乳酸量を測定した。文献7から一部改変して引用。T27NfsX15；フレームシフト変異を持ったGLO1, P122LfsX27；フレームシフト変異を持ったGLO1（本文に記載なし。文献2に記載。多検体解析により別のフレームシフトを同定）

Glu111Alaであり、有意ではないがAlaのアレルが統合失調症で高い頻度で認められた（患者8%，対照5%）。特にAla111ホモ接合体は4例同定されたが、全て統合失調症だった。そこで、Glu111型とAla111型のGLO1のcDNAにGFPを融合したコンストラクトをCOS-7細胞へ導入し、強制発現させたGLO1蛋白をGFPで免疫沈降して回収し活性を測定した。その結果、Glu111型よりAla111型のGLO1で活性が低かった（図3）。次に、Alaホモ接合体3名の赤血球を用いて酵素活性を測定したところ、Glu/Glu, Glu/Ala型のヒトより有意にGLO1活性が低下していた（16%低下,  $P=0.0003$ ）。

50%活性低下を伴うフレームシフト変異だけ

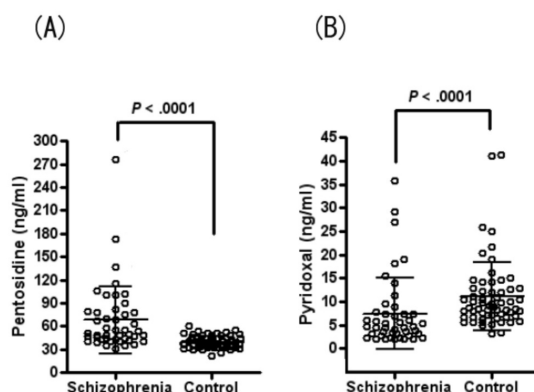


図4 統合失調症と対照の末梢血におけるAGEsとビタミンB6濃度

DSM-IVで統合失調症と診断された患者45例と健常対照61例の末梢血を用いAGEs（ペントシジン）とビタミンB6（ピリドキサール）を定量した。(A)血清ペントシジン濃度。(B)血清ビタミンB6濃度。文献2から一部改変して引用。

でなく、一般症例にも16%活性低下を伴うAla111ホモ接合体が存在することから、統合失調症には軽度でAGEsが蓄積している症例が多く存在する可能性があると考えた。そこで、AGEsの蓄積要因である糖尿病、腎障害、炎症性疾患を除外規定にして、45例の統合失調症と61例の健常対照の末梢血を用いてAGEsとビタミンB6を測定した。その結果、統合失調症では対照より有意にAGEs濃度が上昇し（ $P<0.001$ ）、ビタミンB6濃度が有意に低下していた（ $P<0.001$ ）（図4）<sup>2)</sup>。AGEs蓄積の有無と患者・対照を $\chi^2$ 検定したところ、統合失調症はAGEs蓄積と有意に関連した（ $\chi^2=28.69$ ,  $df=1$ ,  $P<0.0001$ , オッズ比=25.81, 95%信頼区間=3.515-57.64）。ビタミンB6低下の有無と患者・対照を $\chi^2$ 検定した結果、統合失調症はビタミンB6低下と有意に関連した（ $\chi^2=25.90$ ,  $df=1$ ,  $P<0.0001$ , Odds比=10.58, 95%信頼区間=3.942-28.27）。

## V. 考 察

多発家系の発端者から、GLO1遺伝子に50%

の活性低下をもたらす新規のフレームシフト変異を同定した。症例では、カルボニル消去系に機能不全を招来し AGEs が対照の 3.7 倍に増加し、カルボニルスカベンジャーであるビタミン B6 の枯渇を認めた。稀だが大きな活性低下をもたらす変異を持った症例において、顕著な AGEs 蓄積を同定し、これをプロトタイプとして一般症例に敷衍し 46.7% の患者で AGEs 蓄積を認めることができた (ペントシジン蓄積あり >55.2 ng/mL; 対照の平均+2 SD をカットオフ値)。強い効果の単一遺伝子が病態に関与することを予測し多発家系に注目したからこそ、顕著なカルボニルストレスを同定することができた。また、この症例をプロトタイプとしてとらえた結果、一般症例からもカルボニルストレスを見出せたと考える。130 ng/mL を超える顕著な AGEs 蓄積と 3 ng を下回る顕著なビタミン B6 低下を併せ持つ症例は全体の 6% に過ぎない。やみくもに検体を検討しても、カルボニルストレスを見逃した可能性が高かった。近年、欧米では万の単位の検体を用いて、万のオーダーで遺伝子解析を行うビッグサイエンスが流行である。日本の精神医学研究において、こうした国家プロジェクト級の研究予算は配分されておらず、欧米型の大規模研究の実現は難しいのが現状である。しかし、症例を丁寧に検討することによって病態を明らかにすることは可能であり、疾患名しかラベルのない万の検体より、家族歴や病状経過、服薬内容などが詳細な 50 検体のほうが、はるかに有用な研究情報をもたらしてくれる。統合失調症は異種性を内包した症候群であり、今回はカルボニルストレスを伴う比較的均一で小さな一群を抽出することができたと考えている。

50% という大きな活性低下をもたらすフレームシフト変異の発見ののち、16% 活性低下という軽度の活性低下を伴う Ala111 ホモ接合体を同定したことも、一般症例へ敷衍する過程では重要なステップだったと考える。すなわち、*in vitro* と *in vivo* の結果が一致したことで、一般症例のスクリーニングを実施する見通しがついた。

AGEs 蓄積の統合失調症に対するオッズ比は 25.81 だった。統合失調症の遺伝子研究は、2011 年 4 月現在、1008 遺伝子、8788 多型が検討され、メタ解析も 287 多型に及ぶが、ほとんどのオッズ比が 1.5 未満と小さい効果しかない<sup>8)</sup>。遺伝子研究の結果と比べたとき、AGEs 蓄積の統合失調症へのリスクファクターとしての寄与は、きわめて大きい可能性が示唆される。

対象から AGEs の増加要因である糖尿病、腎障害、炎症性疾患は除外してある。カルボニルストレスを認めた症例の一部は GLO1 の遺伝的活性低下が AGEs 蓄積に寄与したと考える ( $\chi^2=7.727$ ;  $df=1$ ;  $P=0.0054$ ; オッズ比=5.632)。しかし、フレームシフトや Ala111 ホモ接合体を認めた症例は一部であり、多くのカルボニルストレスの発生機序解明は不明である。GLO1 遺伝子に変異を持たない症例から、その後の解析で複数のカルボニル消去経路に異常を同定しており、統合失調症のカルボニルストレスにも異種性がある可能性が示唆された (未発表)。

遺伝子変異を持った症例については、カルボニルストレスが発症前から存在した可能性が考えられ、こうした症例に発症前からピリドキサミンの予防的投与を行うことで、発症回避の可能性が期待できる。また、一部であるが健常者からもフレームシフト変異を同定しており、これら健常者では AGEs 蓄積が認められなかった。この保因者では、GLO1 の補酵素であるグルタチオンや亜鉛の血中濃度が、平均より高い濃度で認められており (未発表)、これが GLO1 の活性低下を代償してカルボニルストレスを抑制した可能性を考えると、発症回避に向けた思春期の予防戦略としてカルボニル消去系因子の補充療法に検討の価値がある。

ビタミン B6 はピリドキサル、ピリドキシン、ピリドキサミンからなり、互いに平衡関係にある。生体内ではピリドキサルがほとんどを占め、今回計測したビタミン B6 もピリドキサルである。カルボニル消去作用を持つのはピリドキサミンだけであり、市販のビタミン B6 (ピリドキサル)

を服用しても、体内でピリドキサミンに移行する量は微量である。我々は、カルボニルストレスの改善効果を狙いピリドキサミンの第一相臨床試験を実施した。有害事象を認めず、Zucker fatty rat で AGEs 生成阻害に有効な1日暴露量 ( $AUC_{0-24}$ )  $46 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}^1$  に達するピリドキサミン投与量も決定した。現在第二相試験を準備中である。

#### 文 献

- 1) Alderson, N.L., Chachich, M.E., Youssef, N.N., et al.: The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int*, 63; 2123-2133, 2003
- 2) Arai, M., Yuzawa, H., Nohara, I., et al.: Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 67; 589-597, 2010
- 3) Arolt, V., Lencer, R., Nolte, A., et al.: Eye tracking dysfunction is a putative phenotypic susceptibility marker of schizophrenia and maps to a locus on chromosome 6p in families with multiple occurrence of the disease. *Am J Med Genet*, 67; 564-579, 1996
- 4) Hwu, H.G., Lin, M.W., Lee, P.C., et al.: Evaluation of linkage of markers on chromosome 6p with schizophrenia in Taiwanese families. *Am J Med Genet*, 96; 74-78, 2000
- 5) Miyata, T., van Ypersele de Strihou, C., Kurokawa, K., et al.: Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int*, 55; 389-399, 1999
- 6) Stefansson, H., Ophoff, R.A., Steinberg, S., et al.: Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature*, 460; 744-747, 2009
- 7) Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., et al.: Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, 455; 232-236, 2008
- 8) SZ gene: <http://www.schizophreniaforum.org/res/sczgene/default.asp>
- 9) Wright, P., Donaldson, P.T., Underhill, J.A., et al.: Genetic association of the HLA DRB1 gene locus on chromosome 6p21.3 with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 153; 1530-1553, 1996

## Molecular Pathophysiology of Schizophrenia and Preventive Strategy in Pubertal Period

Masanari ITOKAWA<sup>1,2,3)</sup>, Makoto ARAI<sup>1)</sup>, Tomoe ICHIKAWA<sup>1)</sup>, Mitsuhiro MIYASHITA<sup>1,3)</sup>, Takeo YOSHIKAWA<sup>2)</sup>, Yuji OKAZAKI<sup>1,3)</sup>, Toshio MIYATA<sup>4)</sup>

1) *Project for Schizophrenia and Affective Disorders Research, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science*

2) *Laboratory for Molecular Psychiatry, Brain Science Institute, RIKEN*

3) *Department of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Matsuzawa Hospital*

4) *Center for Translational and Advanced Research on Human Disease, Tohoku University Graduate School of Medicine*

A novel frameshift mutation in *glyoxalase 1 (GLO1)* gene was detected in a patient with schizophrenia of a pedigree with multiple affected individuals. The patient carrying the mutation showed decreased enzymatic activity by 50%, 3.7 times high level of advanced glycation end products (AGEs) that is substrate of GLO1 and 20% of serum vitamin B6 compared to controls. Case-control study of *GLO1* gene suggested that Ala allele of Glu111Ala was associated with schizophrenia. In vitro study using COS-7 cells transfected with cDNA of *GLO1* yielded that enzymatic activity is lower in GLO1 with Ala111 than that of Glu111. The homozygotes of Ala111 showed 16% decreased GLO1 activities in RBC as compared with that of Glu111/Ala111 and Glu111/Glu111. Plasma AGEs levels were significantly high and serum vitamin B6 was significantly low in 45 schizophrenics than that of 61 control subjects. Supplementation of vitamin B6 to cases with the genetic defect of GLO1 before onset of psychosis is suggested to be possible strategy for prevention of schizophrenia until pubertal stage since such mutation carriers could have been exposed by high level of AGEs for a long time before disease onset.

<Authors' abstract>

---