

## 特集 精神疾患の病態研究の最前線

## 統合失調症とカルボニルストレス

新井 誠, 宮下 光弘, 市川 智恵, 糸川 昌成

生体内の糖, 脂質, アミノ酸の酸化・還元, 過酸化に由来する種々の反応性カルボニル化合物は, 終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) を形成する。このような非酵素的タンパク質修飾反応が亢進している状態は, カルボニルストレスと呼ばれている。これまで, カルボニルストレスは, 動脈硬化の促進因子や糖尿病性合併症の増悪要因として内科領域で精神的に検討されてきた。我々は, およそ2割の統合失調症患者において, AGEsのひとつであるペントシジンの蓄積とビタミン B<sub>6</sub>の減少を同定し, カルボニルストレスに *glyoxalase I (GLO1)* の変異による機能低下が関連することを明らかにした。また, カルボニルスカベンジャーであるピリドキサミン (活性型ビタミン B<sub>6</sub>) がカルボニルストレス性統合失調症患者の治療に結びつく可能性を見出した。

〈索引用語: 統合失調症, ペントシジン, ビタミン B<sub>6</sub>, オミックス, メタボローム〉

## 1. はじめに

遺伝子研究や生化学研究で用いられる生理検体の非均一性のため, 統合失調症の発症の要因とその病態を把握可能なバイオマーカーはいまだに同定されていない。また, 統合失調症は単一の病態である保証がないため, 研究対象に異種性の問題を生じ, 統合失調症の原因究明を困難にしている。しかしながら, 従来の研究手法や仮説からは予測できない新規な病態を同定することによって, これまでの抗精神病薬の作用機序とは異なる分子基盤を発見し, 革新性のある診断・治療・予防法開発を進展させることが期待される。

筆者らは, ある統合失調症多発家系の発端者において, 反応性カルボニル化合物 (reactive carbonyl compounds: RCOs) を解毒する律速酵素 *glyoxalase I (GLO1)* に稀なフレームシフト変異 (T27NfsX15) を同定した。この症例ではカルボニルストレスが亢進しており, これを一般症例に敷衍し, 統合失調症の病態の一部に GLO1 代謝のネットワークの破綻が関連することを明ら

かにした<sup>3)</sup>。GLO1 のエクソン1 にフレームシフト変異をもつヘテロ接合体症例は, mRNA 量およびタンパク質発現はともに野生型の50%まで低下していた。また, 症例の末梢血リンパ球の酵素活性は野生型のおよそ半分にまで低下していた。さらに, GLO1 のエクソン4 にフレームシフト変異 (P122LfsX27) をもつヘテロ接合体の第2症例を新たに同定し, 第1症例で発見した酵素活性の低下を再現した。第1症例, 第2症例とも顕著な GLO1 の酵素活性低下を生じ, ペントシジンの血漿中濃度は, 第1症例では 137 ng/mL, 第2症例では 74.7 ng/mL と変異を持たない健常者と比較して有意な増加を認めた。また, ビタミン B<sub>6</sub> もそれぞれの症例で, 2.8 ng/mL, <2.0 ng/mL と顕著な低下が認められた。さらに, 304 例の統合失調症患者の末梢血を用いて, カルボニルストレスを検討した結果, 約39%がペントシジン蓄積を呈し, これら症例の約45%にビタミン B<sub>6</sub> 低下を確認し, カルボニルストレス性統合失調症が全体の約17.4%に存在するこ

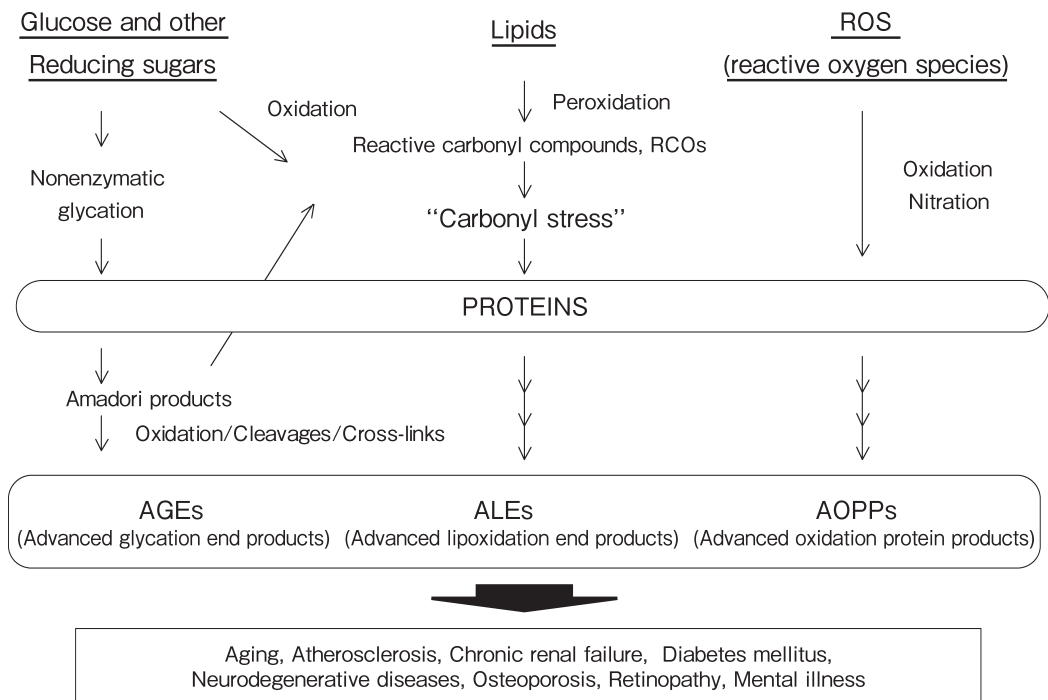


図1 非酵素的・累積的な翻訳後修飾

生体内タンパク質の酸化、過酸化、カルボニル化など不可逆のプロセスによる非酵素的な翻訳後修飾は、糖尿病合併症、腎不全合併症、動脈硬化あるいは神経変性疾患など、種々の疾患の発症と進展に関与することが報告されている（文献6より一部改変して引用）。

とを明らかにした<sup>2)</sup>。

本稿では、これまで筆者らが行ってきた統合失調症におけるカルボニルストレスについて概説し、バイオマーカーによる症例のプロファイルが代謝経路の同定に有用であること、さらに代謝システムの比較的均一な分子基盤抽出や新規治療薬創出のために有用であることを述べた。

## 2. カルボニルストレス

生体内タンパク質の oxidation, carbonylation, glycation, nitration など不可逆のプロセスによる非酵素的な翻訳後修飾は、糖尿病合併症、腎不全合併症、動脈硬化あるいは神経変性疾患など、種々の内科・神経科疾患の発症と進展に関与することが報告されている。RCOs の蓄積は、糖や脂質、アミノ酸から形成され、タンパク質修飾

を介し非酵素的反応に終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) 蓄積を引き起こす<sup>6)</sup> (図1)。このような RCOs によりタンパク質修飾反応が亢進している状態は「カルボニルストレス」と呼ばれている<sup>7)</sup>。酸化ストレスや高血糖は、AGEs 産生の促進要因のひとつであり、カルボニルストレスの亢進とも密接に関連している。ピリドキサミンは、RCOs 捕捉能を有するカルボニルスカベンジャーとして作用し、RCOs によるタンパク質修飾、AGEs 産生の抑制に働いている<sup>6)</sup>。近年では、気分障害、自閉症、不安障害など複数の精神疾患にこれらの代謝系の機能不全が影響を及ぼし、AGEs による修飾タンパク質が病因となる可能性が示唆される<sup>4)</sup>。

血液中、尿中、組織にみられる代表的な AGEs 構造体としては、ペントシジンをはじめ、CML

[Nε - (carboxymethyl) lysine], CEL[Nε - (carboxyethyl) lysine], MOLD (methylglyoxal-lysine dimer), GOLD (glyoxal-lysine dimer), Argpyrimidine, G-H1 (glyoxal-derived hydroimidazolone), MG-H1 (methylglyoxal-derived hydroimidazolone), G-H1 (glyoxal-derived hydroimidazolone), MetSO (methionine sulphoxide), 3-NT (3-nitrotyrosine) などが知られている。これらの構造体は、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography : HPLC), HPLC と質量分析法 (mass spectrometry : MS) を組み合わせた LC-MS あるいは酵素免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) などの手法により測定がなされている<sup>5,6,8)</sup>。AGEs の構造による生理作用の違いや病態との関連性はいまだ不明な点も多く、AGEs の病態生理の解明は疾患の治療・予防法確立にとってその意義は大きい。

### 3. ペントシジン蓄積とビタミン B<sub>6</sub> 低下

我々は、45名の統合失調症の血漿成分中のペントシジンレベルを定量したところ、21例 (46.7%) において 55.2 ng/mL (健常対照の平均値+2 SD を cutoff とした) 以上のペントシジン上昇が認められた<sup>3)</sup>。統合失調症患者の平均ペントシジン値は、68.4 ng/mL であり、健常者の平均値である 39.6 ng/mL の約 1.7 倍にまで達していた ( $P < 0.0001$ , odds ratio = 25.81, 95% CI = 5.609~118.8)。これまでに、上記の 45 症例を含む 304 例の統合失調症患者の末梢血を用いてカルボニルストレスを検討した結果、統合失調症における GLOI 変異は、ペントシジン蓄積のリスクを約 3.3 倍高めた ( $P = 0.025$ , odds ratio = 3.3, 95% CI = 1.10~9.92)<sup>2)</sup>。

また、末梢で観察されたカルボニルストレスが、脳内組織の状態を反映しているのか、予備的に統合失調症の剖検脳で検討を試みた。男性 31 例、女性 15 例の前頭葉組織を利用して、ペントシジンの脳内蓄積を HPLC にて分析した結果、統合

失調症剖検脳のペントシジン蓄積は、平均  $0.459 \pm 0.40$  pmol/mg で健常者剖検脳 2 症例の  $0.163 \pm 0.012$  pmol/mg と比較しておよそ 2.8 倍の値であった。剖検脳においても、一部の統合失調症症例でペントシジン蓄積が認められた (未発表)。今後、脳部位毎のペントシジン蓄積の差異などを明らかにし、薬剤、死亡原因の影響など交絡因子についてもより詳細な検討が不可欠と思われる。

### 4. カルボニルストレス性統合失調症の臨床症状

The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders : DSM-IV (精神障害の分類と診断の手引き第 4 版) で統合失調症と診断された患者群のうち、ペントシジン蓄積、ビタミン B<sub>6</sub> 低下をバイオマーカーとして、カルボニルストレス性統合失調症群と定義し、臨床症状を Positive and Negative Syndrome Scale : PANSS (陽性・陰性症状評価尺度) で評価した。また、既往歴、入院歴、発症年齢、罹病期間、入院期間、教育年数、家族歴などの臨床情報についても検討を加えた。なお、匿名化検体の連結は倫理委員会の審査を経て行われた。本研究は、被験者に十分なインフォームドコンセントを行い、書面にて同意を得て行われた。

ペントシジンレベルが 100 ng/mL 以上の統合失調症 18 例 (平均年齢  $53.3 \pm 8.3$  歳) と 100 ng/mL 以下の 85 例 (平均年齢  $49.0 \pm 12.6$  歳) を対象にして臨床症状評価を実施した。ペントシジン高値群の 63% に精神疾患の家族歴を認めた。一方、ペントシジン低値群では、47% とペントシジン高値群と比較して家族歴の頻度が低かった。発症年齢は、ペントシジン高値群が  $21.0 \pm 5.5$  歳に対し、ペントシジン低値群では  $25.9 \pm 10.0$  歳と発症年齢の若年化傾向を認めた ( $P = 0.056$ )。また、罹病期間は、ペントシジン高値群が  $31.9 \pm 11.1$  年に対して、ペントシジン低値群では  $23.4 \pm 14.8$  年と有意に期間の増大が認められた ( $P = 0.020$ )。PANSS による症状評価を検討したところ、ペントシジン高値群の症例では、

### 症状

- 会話がまとまらず、時に減裂
- 生き生きとした感情が見られない
- 病気であることを自覚できない(拒薬→再発→長期罹病)
- 内的異常世界に没頭し現実感に乏しい(独語、空笑)
- 統合失調症らしい奇妙さ(不自然な姿勢など)

### 経過

- 若年発症で長期間の罹病



### バイオマーカーとしてのペントシジンによる早期診断 カルボニルストレス抑制分子が根本的な治療法となる可能性

図2 高ペントシジン値の症例における臨床症状と経過の特徴

ペントシジン高値群の症例では、表情・仕草の減少、思考の流動性・柔軟性が欠如、反復・常同的な動作と姿勢、注意・集中力の困難、判断力・病識の欠如、思考発動・維持・制御の障害、幻覚や妄想への没頭した行動が目立つ。ペントシジンは、罹患者の症状と経過のバイオマーカーとしての有用性が高い。

N1 (感情の平板化), N7 (常同的思考), G5 (反復・常同的な動作と姿勢), G11 (注意の障害), G12 (判断力と病識の欠如), G13 (意思の障害), G15 (没入性) がペントシジン低値の症例と比較して顕著に重症化していた ( $P < 0.05$ )。また, P2 (概念の統合の障害), N2 (情緒的引きこもり), N6 (会話の自発性・流暢性の欠如), G3 (罪責感), G8 (非協調性), G14 (衝動制御の障害) の症状尺度が重症化傾向にあった。

これらの所見から、ペントシジン高値の症例では、①思考障害が目立つ傾向にある、②感情が平板化し、思考の柔軟性が欠如している、③不自然で奇妙な動作が多く、病気の認識を持たず、内的異常体験に没頭している、④現実感に乏しく、注意力が散漫で、独語や空笑が目立つといった特徴があることが示唆された。また、若年発症傾向、長期罹病という経過の特徴が認められた (図2)。

## 5. ペントシジンとピリドキサミンの臨床応用

統合失調患者の入院症例、外来症例のペントシジン値を比較検討したところ、外来症例は入院症例に比べて有意に低下していた ( $P < 0.05$ )。退

院後まで縦断的にフォローできた入院症例の予備的検討では、入院時よりも退院後に有意なペントシジン濃度の低下 ( $P = 0.01$ ) と GLO1 酵素活性の上昇 ( $P = 0.04$ ) を認めた。また、ビタミン B<sub>6</sub> の回復も認められたことから、ペントシジン濃度や酵素活性は、患者の臨床経過のバイオマーカーとしての有用性が示唆された。また、ペントシジン上昇を呈していた at-risk mental state (ARMS) 症例では、マイナートランキライザーの頓用使用と精神療法により症状の改善を認め、ペントシジン値も健常者レベルに減少した<sup>1)</sup>。多くの症例では、様々な投薬が施されているが、ペントシジン蓄積症例群の服薬量 ( $17.0 \pm 12.4$  mg/day) はペントシジン正常群 ( $12.4 \pm 9.1$  mg/day) と比較して有意な差は認められなかった ( $P = 0.50$ )。また、1日の平均服薬量はペントシジン値と相関を認めず (ペントシジン蓄積群  $r = 0.03$ ,  $P = 0.93$ ; ペントシジン正常群  $r = -0.07$ ,  $P = 0.78$ )、喫煙や入院期間の影響も否定的であった。

ビタミン B<sub>6</sub> は、ピリドキサル、ピリドキシン、ピリドキサミンと3種類が存在し、このうち、カルボニルストレスを消去する能力があるのはピリドキサミンのみである<sup>10)</sup>。実際に、ピリドキサミンのペントシジン産生の抑制効果を *in vitro* で検討した結果、濃度依存的にペントシジン産生を抑制した (特願 2007-209412, 特開 2009-39088)。筆者らは、未承認薬であるピリドキサミンの第 I 相試験をすでに実施し、ピリドキサミンの安全性を確認した。さらに、2011年11月現在、少数例を対象としたピリドキサミン投与による医師主導型治験を実施中である (臨床試験登録 UMIN000006398)。

## 6. オミックス情報の臨床応用

カルボニルストレスを認めた症例の一部では、GLO1 の遺伝的活性低下がペントシジン蓄積に寄与したと考えられる ( $P = 0.03$ ; odds ratio = 3.30)。しかしながら、GLO1 のフレームシフトヘテロ接合体やミスセンス変異のホモ接合体を認

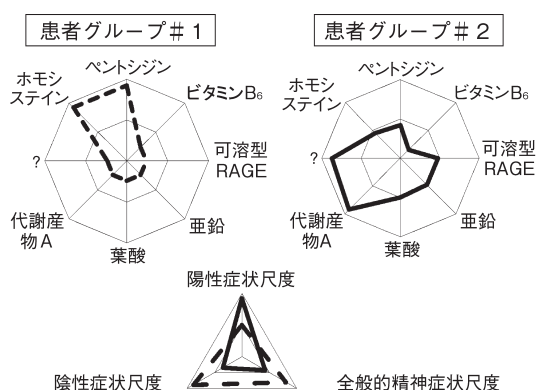


図3 統合失調症の異種性回避（研究対象のプロファイル）

統合失調症患者では、ペントシジン、ビタミンB<sub>6</sub>、可溶性 RAGE、亜鉛、葉酸、ホモシステインなど様々な分子の変動があり、研究対象の異種性がある。メタボローム解析と臨床症状の相互プロファイルは、ある患者グループの多様性を包括的に理解することに繋がる。

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は不明である。AGEsの消去系として機能する分泌型 AGE 受容体 (esRAGE) をコードする *AGER* に関して resequence をした結果、esRAGEの血中濃度の低下が *AGER* の variants により制御される可能性が示唆された。健常者群の平均値-1 SD 以下 (185 pg/mL) を基準として群間比較をしたところ、統合失調症群のおよそ 34% (36名/106名中) に esRAGEの低下が認められたのに対し、健常者群では 80名中 11名 (13.8%) であった ( $P=0.002$ , odds ratio=3.23, 95%CI=1.52~6.85)。このことは、esRAGE 低下に遺伝的要因が関与し、統合失調症のカルボニルストレス抑制に AGEs-RAGE 代謝経路の関連が示唆された。esRAGE 低下症例では、敵意、衝動制御の障害といった症状評価尺度の下位項目と関連も認められた。

ペントシジン蓄積・ビタミン B<sub>6</sub> 低下・esRAGE 低下を伴う 3 症例と、これら 3 因子全てが正常な 3 症例について、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現変化を解析したところ、Cell adhesion\_Gap junctions, Proteolysis\_Role of

Parkin in the Ubiquitin-Proteasomal Pathway, Cytoskeleton remodeling\_Neurofilaments, Neurophysiological process\_Glutamate regulation of Dopamine D1A receptor signaling, Apoptosis and survival\_Endoplasmic reticulum stress response pathway といったパスウェイ関連遺伝子群の発現量が健常者群と有意に異なっていた。このことは、3 因子が病態の客観的指標としてだけでなく、新規治療薬ターゲットとなる代謝パスウェイを同定するのに有用であることを示唆した。統合失調症は異種性の問題から対象の均一化が困難を伴い、病因研究が難航してきた経緯がある。これまでに、統合失調症患者では、ペントシジン蓄積やビタミン B<sub>6</sub> 低下に加え、亜鉛低下、葉酸低下、ホモシステイン増加など様々な分子の変動があり、異種性があることも明らかになってきている (図 3)。

今後、統合失調症の病態生理の分子基盤を把握するためには、確かなバイオマーカーの同定が不可欠である。統合失調症の遺伝-環境要因を理解するためには、オミックス解析による研究対象のプロファイルによって、生体代謝の多様性を包括的に理解することが重要となる。「現にある今の病態を表す網羅的情報」に基づいたオミックス情報の革新性は、診断、治療、予後に対する病態理解の分解能・予測力の向上、臨床的有効性を引き出し、実現するための臨床支援システムであり<sup>9)</sup>、今後、精神科医療にも求められる必要不可欠な情報ツールとなろう。

## 7. おわりに

本稿では、①カルボニルストレス性統合失調症患者は、ペントシジン、ビタミン B<sub>6</sub> といった分子マーカー、*GLO1* の遺伝子型によって早期診断と病態の把握が可能であること、②ピリドキサミンは、カルボニルストレス性統合失調症の病態に根ざした治療・予防薬となる可能性が高いこと、③バイオマーカーによる症例のプロファイルは、代謝経路同定に有用であること、④代謝システムの比較的均一な分子基盤抽出は、新規治療薬創出

のために有用であることを述べた。今後、パーソナルゲノム研究、脳画像研究、死後脳研究、疫学研究など、集積された情報を統合・整備し、研究対象のオミックス情報を適切に活用することが、健康維持や病気の発症予防に有効な視点を提供できるものと考えられる。

本稿の内容は、第107回日本精神神経学会学術総会シンポジウム37「精神疾患の病態研究の最前線」にてその一部を発表しました。本研究は、基盤研究(C)、公益財団法人先進医薬研究振興財団研究助成、公益財団法人アステラス病態代謝研究会研究助成、統合失調症研究会研究助成より助成を受けて実施した成果の一部です。また、今回の統合失調症におけるカルボニルストレス研究に対し、ご理解とご協力を頂いた当事者の方々、そしてご家族の皆様に、心より感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Arai, M., Koike, S., Oshima, N., et al.: Idiopathic carbonyl stress in a drug-naïve case of at-risk mental state. *Psychiatry Clin Neurosci*, 65; 606-607, 2011
- 2) 新井 誠, 宮下光弘, 市川智恵ほか: 統合失調症の病態仮説と将来的な治療法についての展望. *精神経誌* (印刷中)
- 3) Arai, M., Yuzawa, H., Nohara, I., et al.: Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 67; 589-597, 2010
- 4) Hambsch, B.: Altered glyoxalase 1 expression in psychiatric disorders: cause or consequence? *Semin Cell Dev Biol*, 22; 302-308, 2011
- 5) Izuhara, Y., Miyata, T., Ueda, Y., et al.: A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine. *Nephrol Dial Transplant*, 14; 576-580, 1999
- 6) Jaisson, S., Gillery, P.: Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin Chem*, 56; 1401-1412, 2010
- 7) 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
- 8) Rabbani, N., Thornalley, P.J.: Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids* (in press)
- 9) 田中 博: オミックス医療と情報科学. *日本化学会情報化学部会誌*, 24; 113-119, 2006
- 10) Voziyan, P.A., Hudson, B.G.: Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell Mol Life Sci*, 62; 1671-1681, 2005

## Schizophrenia and Carbonyl Stress

Makoto ARAI, Mitsuhiro MIYASHITA, Tomoe ICHIKAWA, Masanari ITOKAWA

*Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Project for Schizophrenia & Affective Disorders Research*

Glyoxalase I (GLO1) is an enzyme essential for the cellular detoxification of reactive carbonyl compounds. Its impairment leads to carbonyl stress and the eventual formation of advanced glycation end products (AGEs) including pentosidine. In the present study, we provide for the first time evidence of genetic abnormalities in *GLO1* with their attendant derangements of biochemistry in a small population of schizophrenia. We found that seventeen schizophrenia (~17.4%) showed increases in plasma pentosidine content although they have no physical complications, and concomitantly marked decrease of pyridoxal levels was found in schizophrenia. Vitamin B<sub>6</sub> exists in three forms, i.e., pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine. Pyridoxamine has potent ability to entrap RCOs and prevent their toxicity. Further study of profiling of metabolomics and clinical manifestations in schizophrenia could pave the way for novel, better therapeutic/preventive measures for this devastating disease.

<Authors' abstract>

---