

## 特集 2 ブレインバンク / 死後脳研究

## 2. 統合失調症死後脳におけるタンパク定量解析 -ALDH4A1 とその発現に影響する遺伝子多型

長岡 敦子<sup>1)</sup> 國井 泰人<sup>1,2)</sup> 日野 瑞城<sup>1)</sup> 泉 竜太<sup>1)</sup>  
 宍戸 理紗<sup>1)</sup> 齊ノ内 信<sup>3)</sup> 柿田 明美<sup>3)</sup> 矢部 博興<sup>1)</sup>

**抄録**：機能分子であるタンパク質の脳における発現解析は、統合失調症の分子病態を解明するうえで不可欠である。死後脳研究には病態以外のさまざまな条件に由来する交絡因子が存在するため、その評価とコントロールは重要である。筆者らは統合失調症死後脳におけるタンパク質発現を中間表現型として、遺伝子多型 (SNPs) との関連を解析する研究を行っており、解析には当施設で保管する精神疾患を主とした死後脳と新潟脳研究所に保管されている非精神疾患対照の死後脳を用いて行っている。本稿では、死後脳試料の保管施設の違いという交絡因子によって生じるタンパク質発現への影響について検討した研究と、統合失調症患者死後脳におけるタンパク質発現解析の一例として、aldehyde dehydrogenase 4 family member A1 (ALDH4A1) とその発現に影響する SNPs についての研究を取り上げて、それぞれ概説する。

日本生物学的精神医学会誌 32 (4) : 186-190, 2021

**Key words** : postmortem brain, schizophrenia, protein, ALDH4A1, GAPDH, GFAP

## はじめに

近年、統合失調症における遺伝子関連研究は、2014 年に大規模に行われたゲノムワイド関連解析では 108 個の領域で統合失調症発症との有意な関連が報告<sup>13)</sup>され、次世代シーケンサーを用いた全エクソン/ゲノムシーケンス解析によって *de novo* 変異が数多く同定される<sup>2,3)</sup>など、テクノロジーの恩恵を受け大きな進展がみられている。一方で核酸よりも機能、構造とも格段に複雑であるタンパク質についてはその解析は遅れているものの、機能分子であるタンパク質の脳における発現解析は統合失調症の病態メカニズムを解明するのに不可欠である。筆者らはこれまで、統合失調症死後脳におけるタンパク質発現を中間表現型として、遺伝子多型

(single nucleotide polymorphism : SNPs) との関連を解析する研究を多数行ってきた<sup>6, 8, 9)</sup>。本稿ではわが国のブレインバンクに集積された死後脳を用いたタンパク定量解析研究について概説する。

## 1. 異なる施設で保管された脳試料のタンパク質発現量の比較について

死後脳研究では、精神疾患の分子病態の解明のため、mRNA やタンパク質の発現、DNA メチル化、CNV などについて解析を行い、疾患病態に影響する因子の同定を行うが、疾患病態のほかにも生前および死後にさまざまな因子が死後脳試料の分子発現に影響を及ぼすと考えられている<sup>16)</sup>。例えば生前であれば身体合併症、服薬歴、性別、死亡時の年齢、

Quantitative protein expression study in the postmortem brains of patients with schizophrenia-ALDH4A1 expression and its association with genetic polymorphism

1) 福島県立医科大学 神経精神医学講座 (〒960-1295 福島県福島市光が丘 1) Atsuko Nagaoka, Yasuto Kunii, Mizuki Hino, Ryuta Izumi, Risa Shishido, Hirooki Yabe : Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Fukushima Medical University, Hikarigaoka 1, Fukushima-shi, Fukushima 960-1295, Japan

2) 東北大学災害科学国際研究所 災害精神医学分野 (〒980-8573 仙台市青葉区星陵町 2-1) Yasuto Kunii : Department of Disaster Psychiatry, International Research Institute of Disaster Science, Tohoku University, Seiryō-cho 2-1, Sendai-shi, Miyagi 980-8573, Japan

3) 新潟大学脳研究所 病理学分野 (〒951-8122 新潟県新潟市中央区旭町通 1-757) Makoto Sainouchi, Akiyoshi Kakita : Department of Pathology, Brain Research Institute, Niigata University, 1-757, Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata-shi, Niigata 951-8122, Japan

【長岡 敦子 E-mail : atsukony@fmu.ac.jp】

死戦期因子が挙げられ、死後であれば、死後から凍結までの死後経過時間 (postmortem interval: PMI)、凍結から解析までの保管期間などが挙げられる<sup>16)</sup>。これらは死後脳研究で病態による影響を同定する際の交絡因子となりうる。そのため、このような交絡因子の記録や評価、コントロールは死後脳研究の再現性を確保し、信頼性、有効性を高めるために重要で、この課題は欧米では早くから quality control として認識されている<sup>4)</sup>。筆者らも、欧米でのブレインバンクの取り組みに倣い、遺族からの詳細な聞き取りや主治医からの情報提供の協力を得ることによって、生前の診断、服薬歴、併存した身体疾患などの臨床プロフィールを作成し、死後については解剖に際し解剖開始時間、凍結開始時間などを詳細に記録し、交絡因子の影響の評価に対応できるブレインバンク体制の構築に力を入れてきた。

一方で、解剖の際の手技や使用した機材、凍結の方法など定量化できない因子が死後脳研究における所見に影響を与える可能性があるが、これらの評価は難しい。福島精神疾患ブレインバンクは、統合失調症をはじめとする精神疾患の病態解明を目標とし、死後脳の集積を行うため 1997 年に設立されたが、その特性上、精神疾患死後脳に比べ非精神疾患対照例 (精神疾患の既往が確認できない例) の死後脳の集積は少なく、2021 年 2 月の時点で統合失調症 33 例、双極性障害 10 例に対して非精神疾患対照は 7 例となっている。そのため、新潟大学脳研究所に保管される死後脳試料から精神疾患の既往のない症例を対照群として用い、これまで比較研究を行ってきた。このように異なる施設で保管された死後脳試料を研究に用いる場合には、施設による相違という定量化できないさまざまな交絡因子の積み重ねで生じるであろう影響の評価が問題となる。さまざまな交絡因子が死後脳試料に与える影響については、mRNA 発現を対象とした研究においては RNA integrity number を用いることで、ある程度客観的に RNA の安定性を評価することができるが<sup>14)</sup>、タンパク質発現解析においては、そのような客観的評価に用いる指標は定まっていない。

そこで、ウエスタンブロッティングのローディングコントロールとして広く使用されており、ハウスキーピング分子の 1 つとして認識されている glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と、中間径フィラメントタンパク質の 1 つであり、アストロサイトで特異的に発現するため、脳内のアストロサイトマーカーとして一般的に使用されている glial fibrillary acidic protein (GFAP) に

注目し、死後脳を集積するブレインバンクの違いが死後脳試料のタンパク質発現に影響を与えるかどうかを検討した。まず、福島精神疾患ブレインバンクと、新潟大学脳研究所に保管された死後脳について、性別、死亡時年齢、PMI、保管期間、pH を比較したところ、PMI は福島精神疾患ブレインバンクで保管された死後脳で有意に長く、保管期間は新潟大学脳研究所で保管された死後脳で有意に長かった。次に、GAPDH、GFAP のタンパク質発現量について、福島精神疾患ブレインバンクで保管された死後脳 36 例と、新潟大学脳研究所にて保管された死後脳 28 例の、前頭前野と上側頭回についてそれぞれ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて測定した。両施設間で有意差のみられた交絡因子を加味して統計的に比較したところ、有意な差は認められなかった。このことから、死後脳を集積する上記の 2 施設の違いによってタンパク質発現に生じる影響は有意なものではなく、これらの脳試料を用いて疾患対照のタンパク質比較解析は可能と考えられた。また、GAPDH、GFAP は、定量化できない交絡因子による影響の有無について、タンパク質発現解析を行う際の客観的指標になりうる可能性が示唆された (現在論文投稿準備中)。

## 2. 統合失調症患者死後脳における ALDH4A1 発現とそれに影響する遺伝子多型について

筆者らはこれまで、ドパミン作動性シグナル伝達の調整にかかわる dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, 32KD (DARPP-32) と calcineurin (CaN) について死後脳の前頭前野と側坐核におけるタンパク質発現量を ELISA 法で測定し、前頭前野では DARPP-32 と CaN の発現の間に正の相関があり、統合失調症では DARPP-32/CaN 比が低いということ<sup>8)</sup>や、Akt シグナル伝達系メンバー分子について、同じく前頭前野および側坐核を用いてこれらのタンパク質発現量を Bead-Based Multiple Immunoassay 法を用いて測定し、vascular endothelial growth factor receptor 2 発現量と統合失調症の陽性症状に対する評価尺度との間に負の相関がみられること<sup>6)</sup>、また、30 個の炎症性サイトカインの上側頭回におけるタンパク質発現について Bead-Based Multiple Immunoassay 法で測定し、統合失調症患者で IL1- $\alpha$  と IP-10 の発現が減少し、INF- $\alpha$  の発現が増加することを報告する<sup>11)</sup> など、すでに統合失調症病態との関連が指摘されている分子やカスケードを標的として、そのタンパク質発現量について死後脳試料を

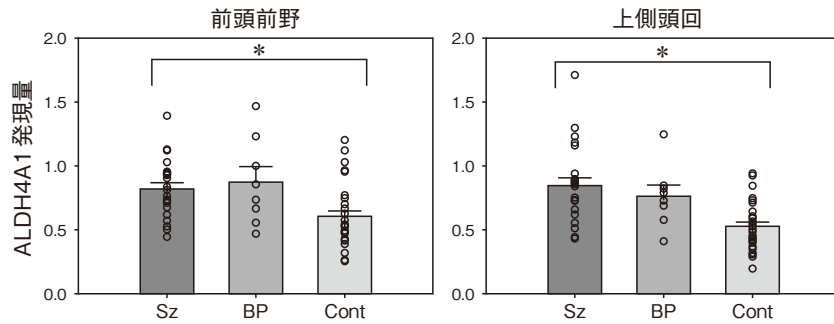


図1 前頭前野、上側頭回におけるALDH4A1発現量

統合失調症群 (Sz), 双極性障害群 (BP), 非精神疾患対照群 (Cont) の前頭前野、上側頭回におけるALDH4A1発現量について比較したところ、統合失調症群において両領域で有意に上昇していた。(文献9より改変)

用いて解析するという研究を行ってきた。このように、死後脳におけるタンパク質発現解析は従来、検証的な役割を担ってきたが、近年では、解析技術の進化によって、死後脳に発現する分子を網羅的に解析することが可能となり、このことから、これまで注目されていなかった統合失調症病態に関与する分子を新たに見出すというような、探索的役割も期待されるようになってきている。

このような探索的死後脳研究として筆者らは、熊本大学との共同研究で統合失調症10例と非精神疾患対照群10例の死後脳を用いて、新規の技術によるプロテオーム解析(2-dimensional image converted analysis of LMS: 2DICAL法)を実施し、統合失調症死後脳の前頭前皮質においてaldehyde dehydrogenase 4 family member A1 (ALDH4A1)が著明に上昇していることを見いだした<sup>7)</sup>。そこで、見いだされたALDH4A1について、より定量性の高いタンパク質測定法であるELISA法を用い、統合失調症24例、双極性障害8例、非精神疾患対照32例、計64例の前頭前野および上側頭回の2領域について発現量を測定し、ALDH4A1と統合失調症病態との関連について詳細に調べた<sup>9)</sup>。用いた非精神疾患対照28例は新潟大学脳研究所に保管されていた死後脳試料であるが、前述の検討において2施設間でGAPDH, GFAPの発現量に有意差がないことを確認したものと同様のセットである。その結果、前頭前野と上側頭回で、統合失調症群においてALDH4A1が有意に上昇しており(図1)、同じサンプルセットの一部におけるALDH4A1の発現量とプロリン代謝経路にかかわる分子の遺伝子多型との関連を解析したところ、前頭前野におけるALDH4A1発現量は、プロリン代謝にかかわる分子であるプロリダーゼの遺伝子のSNPs (rs33823, rs153508)とP5Cシンターゼの遺伝子のSNPs (rs10882639)

とそれぞれ有意に相関することがわかった。また、免疫染色法を用いて前頭前野におけるALDH4A1の分布を観察したところ、ALDH4A1は、ニューロン、血管内皮細胞、グリア細胞、ニューロピルなどに広く分布し、さらにALDH4A1とミトコンドリアが共局在することが確認された。

統合失調症の主要な病態仮説の1つに、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の機能低下が統合失調症の陽性症状および陰性症状を引き起こすというグルタミン酸仮説がある。NMDA受容体拮抗薬であるフェンサイクリジンの乱用がNMDA受容体機能低下を引き起こし、統合失調症の陽性症状および陰性症状に類似した症状を呈するために提唱された仮説だが<sup>1)</sup>、なぜNMDA受容体機能低下が引き起こされるかは解明されていない。既報にある、統合失調症患者におけるプロリン合成酵素プロリダーゼ活性の亢進<sup>5)</sup>と統合失調症患者の血漿プロリン値の上昇<sup>10)</sup>、そして上述した筆者らの研究で見いだされた統合失調症患者死後脳におけるALDH4A1発現上昇の所見を合わせて考えると、統合失調症患者においてプロリンの合成、分解が亢進した結果、グルタミン酸産生過剰を招き、二次的にNMDA受容体の機能低下につながることを示唆された。ALDH4A1の機能を阻害することが統合失調症薬物治療の標的となり、ドパミン仮説に基づく既存の抗精神病薬とは異なる新規の観点からの創薬につながる可能性がある。

## おわりに

福島精神疾患ブレインバンクの死後脳試料を用いたタンパク質定量解析研究について概説した。統合失調症の病態に関連が予想されるタンパク質発現解析を死後脳で行い、タンパク質発現量と遺伝子多型と

の関連を見いだすことができれば、血液や唾液から得た遺伝子情報から生体脳におけるタンパク質発現を予測し、より病態に即したオーダーメイド治療などの臨床応用へと発展が期待される。

なお、本稿に記載した研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則った倫理的配慮に留意し、福島県立医科大学の倫理委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言に基づいた倫理的原則に則り実施された。本論文に関して開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) Coyle JT (1996) The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harv Rev Psychiatry*, 3 : 241-253.
- 2) De Rubeis S, He X, Goldberg AP, et al (2014) Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515 : 209-215.
- 3) Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, et al (2014) De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature*, 506 : 179-184.
- 4) Graeber MB (2008) Twenty-first century brain banking : at the crossroads. *Acta Neuropathol*, 115 : 493-496.
- 5) Gunes M, Bulut M, Demir S, et al (2016) Diagnostic performance of increased prolidase activity in schizophrenia. *Neurosci Lett*, 613 : 36-40.
- 6) Hino M, Kunii Y, Matsumoto J, et al (2016) Decreased VEGFR2 expression and increased phosphorylated Akt1 in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *J Psychiatr Res*, 82 : 100-108.
- 7) Hirayama-Kurogi M, Takizawa Y, Kunii Y, et al (2017) Downregulation of GNA13-ERK network in prefrontal cortex of schizophrenia brain identified by combined focused and targeted quantitative proteomics. *J Proteomics*, 158 : 31-42.
- 8) Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, et al (2019) Differential protein expression of DARPP-32 versus Calcineurin in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in schizophrenia and bipolar disorder. *Sci Rep*, 9 : 14877.
- 9) Nagaoka A, Kunii Y, Hino M, et al (2020) ALDH4A1 expression levels are elevated in postmortem brains of patients with schizophrenia and are associated with genetic variants in enzymes related to proline metabolism. *J Psychiatr Res*, 123 : 119-127.
- 10) Oresic M, Tang J, Seppanen-Laakso T, et al (2011) Metabolome in schizophrenia and other psychotic disorders : a general population-based study. *Genome Med*, 3 : 19.
- 11) Ryuta I, Mizuki H, Akira W, et al (2021) Detailed postmortem profiling of inflammatory mediators expression revealed post-inflammatory alternation in the superior temporal gyrus of schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 12 : 653821.
- 12) Saia-Cereda VM, Cassoli JS, Schmitt A, et al (2015) Proteomics of the corpus callosum unravel pivotal players in the dysfunction of cell signaling, structure, and myelination in schizophrenia brains. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 265 : 601-612.
- 13) Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511 : 421-427.
- 14) Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al (2006) The RIN : an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7 : 3.
- 15) Sun L, Cheng Z, Zhang F, et al (2015) Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells of early-onset schizophrenia. *Genom Data*, 5 : 169-170.
- 16) 富田博秋, 田中千晶, 兪志前 (2009) 交絡因子に配慮した脳バンク構築の必要性. *脳と精神の医学*, 20 : 17-24.

■ ABSTRACT

---

**Quantitative protein expression study in the postmortem brains of patients with schizophrenia-ALDH4A1 expression and its association with genetic polymorphism**

Atsuko Nagaoka<sup>1)</sup>, Yasuto Kunii<sup>1,2)</sup>, Mizuki Hino<sup>1)</sup>, Ryuta Izumi<sup>1)</sup>,  
Risa Shishido<sup>1)</sup>, Makoto Sainouchi<sup>3)</sup>, Akiyoshi Kakita<sup>3)</sup>, Hirooki Yabe<sup>1)</sup>

1) *Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Fukushima Medical University*

2) *Department of Disaster Psychiatry, International Research Institute of Disaster Science, Tohoku University*

3) *Department of Pathology, Brain Research Institute, Niigata University*

Protein expression studies in postmortem brain are necessary for investigating molecular mechanisms underlying the pathogenesis of neuropsychiatric disorders including schizophrenia. Since there are a number of confounding factors originated from various conditions other than pathological conditions in postmortem brain studies, so it is vital that evaluate and control them carefully. We have investigated the relationship between the expression level of candidate proteins in the postmortem brain of schizophrenia as an intermediate phenotype and their association with single nucleotide polymorphism (SNPs). These studies have conducted using the postmortem brain samples with mainly psychiatric diseases preserved at Fukushima Brain Bank and them with healthy controls preserved at Brain Research Institute, Niigata University. In this article, we show the investigation whether differences between two different brain banks had any effect on protein expression in postmortem brain samples, and the study of Aldehyde dehydrogenase 4 family member A1 (ALDH4A1) expression levels in postmortem brains of patients with schizophrenia and their association with SNPs.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 32 (4) : 186-190, 2021)

---