



Searching for biomarkers in schizophrenia and psychosis: Case-control study using capillary electrophoresis and liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry and systematic...

金, 世賢

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8301号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008301>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Searching for biomarkers in schizophrenia and psychosis: Case-control study using capillary electrophoresis and liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry and systematic review for biofluid metabolites

統合失調症および精神病におけるバイオマーカーの探索：キャピラリー電気泳動法と液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析法を用いた症例対照研究、および類似研究のシステマティックレビュー

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
精神医学
(指導教員：曽良一郎教授)

金 世賢

[概要]

統合失調症は、一般人口の約 1%が罹患する、慢性的で身体障害を伴う精神疾患である。これまでの研究では、ドーパミン神経系やグルタミン神経系の神経細胞の機能障害、解糖や酸化ストレス応答などの代謝異常、免疫系の亢進などが統合失調症の病態に関与している可能性が示唆されている。

統合失調症の病理学的研究において、磁気共鳴スペクトロスコピー、PET、磁気共鳴画像などの神経化学イメージングツールや、唾液コルチゾールや血液ベースのバイオマーカー（炎症、酸化ストレス、免疫分析物）などが研究されてきたが、近年、代謝系バイオマーカーが注目されている。体液（血液、尿、脳脊髄液）、死後脳、磁気共鳴スペクトロスコピーを用いた代謝物の解析を通して、統合失調症やその他の精神疾患のバイオマーカーを同定しようとする研究が近年急速に増えている。

今回我々は、統合失調症患者と健常対照者の、血清中の脂肪酸、アミノ酸、その他の有機酸を含む 378 種類の代謝物を、2つの分析装置（CE-TOFMS と LC-TOFMS）を組み合わせて分析した。これらのデータを多変量解析にかけ、統合失調症患者と健常対照者の間で有意差のある代謝物を特定し、患者の疾患特性を評価できるバイオマーカーの構築を試みた。また、同じ統合失調症患者の急性期と寛解期の状態を比較し、その違いに対応するバイオマーカーの同定も試みた。

バイオマーカーの研究では単変量解析が一般的であり、多変量解析を用いた研究報告はあまり多くない。メタボロームは多数の要因が交錯した結果であり、多変量解析では、得られた結果について多因子を同時に解析することで、単変量解析よりも包括的な視点を持つことが可能になる。

これに加えて我々は、過去 20 年間に行われた、統合失調症または精神病性障害の患者における代謝物の違いを調べた研究について、システマティックレビューを行った。

[対象および方法]

(対象)

対象は全て日本人として。被験者として慢性統合失調症患者（SCZc）20 名と、健常対照者（CTL）20 名、さらに、急性精神病のために入院した患者 20 名から、入院時（SCZa-Acute）と退院直前（SCZa-Remission）にそれぞれ 1 回ずつ血液を採取した。

(代謝物の測定)

メタボロームの測定は、Human Metabolome Technologies Inc.のサービスを利用した。血清中の脂肪酸、アミノ酸、その他の有機酸を含む 378 種類の代謝物を、CE-飛行時間型質量分析装置（TOFMS）と LC-TOFMS を組み合わせて分析した。

(統計)

収集したデータを SIMCA software v.16.0.2 (Sartorius Stedim Data Analytics AB, Sweden)にインポートし、多変量解析を行った。まず、主成分分析（PCA）を行い、4つの対象グループ（CTL、SCZa-Acute、SCZa-Remission、SCZc）間で、すべての代謝物がどのように異なるかを調べた。

次に、直交部分最小二乗法による判別分析（OPLS-DA）を行い、CTL と SCZc の 2つのグループで、どの代謝産物がこれらの 2 グループを強く区別するのに役立つかを確認した。この結果の妥当性について、Mann-Whitney U-test を用いて、全ての代謝物で有意差を確認した。

最後に OPLS 回帰モデル（OPLS-EP）を用いて、SCZa-Acute と SCZa-Remission

のペアサンプルの代謝物を比較し、同じ患者の急性期と寛解期を区別するのにどの代謝物が最も貢献しているかを検証した。この結果の妥当性について、Wilcoxon signed rank test を用いて、全ての代謝物で有意差を確認した。

(システマティックレビュー)

過去の類似文献について、PubMed と Web of Science の 2 つのデータベースで検索した。ヒットして 12,805 の論文から、重複を削除して 9,653 が残り、これらを 2 人の独立した査読者 (S Kim と Y Shinko) が審査した。スクリーニングの結果、32 件の論文をレビューの対象とした。

[結果]

PCA の結果、CTL 群と SCZc 群は明確に分離しており、SCZa-Acute 群と SCZa-Remission 群はこの 2 つの群の間に分布していた。OPLS-DA の結果、SCZc と CTL の 2 群が明確に分離され、6 つの代謝産物 (アラニン、グルタミン酸、乳酸、オルニチン、セリン、尿素) がクラス分離に大きく関与していた。これらについて Mann-Whitney U 検定を行ったところ、すべての代謝産物に有意な差が認められた ($p < 0.000132$)。SCZa-Acute と SCZa-Remission の 2 群での OPLS モデルでは、2 群が適度に分離され、5 つの代謝産物 (奇数鎖脂肪酸 3 種 (脂肪酸(15:0)、(17:0)、(19:1))、一価不飽和脂肪酸 1 種 (cis-11-eicosenoic acid)、サイロキシン) がクラス分けに最も関与していると考えられた。これら 5 つの代謝物のレベルは、Wilcoxon signed rank test ($p < 0.05$) によると、SCZa-Acute の方が SCZa-Remission よりも有意に高かった。

この我々のデータに加えて、過去の文献 32 報告をレビューし、4 つ以上の報告において有意性が報告された代謝物をまとめた。グルタミン酸、クエン酸を初めとするいくつかの代謝物では、複数の文献で統一した結果が得られた。

[考察]

我々の研究では、CTL 群と SCZc 群の間で、数種類のアミノ酸、乳酸、尿素の濃度に有意な差が認められた。さらに、急性期と寛解期の同一患者 (SCZa-Acute 群と SCZa-Remission 群) では、数種類の脂肪酸とサイロキシンに有意な差が見られた。これらの物質は抗精神病薬の服用量とは関連しなかったことから、第 1 セットで同定された代謝物は統合失調症のバイオマーカーであり、第 2 セットで同定された代謝物は急性精神病の状態マーカーである可能性があると考えた。

2018 年の大規模なシステマティックレビュー (Davison ら、2018 年) に続き、この分野ではいくつかの研究が行われている。グルタミン酸や乳酸など、いくつか報告されている代謝物は今回の我々の結果と一致していたが、これまでに報告されている他の代謝物 (一部の脂肪酸、クエン酸、キヌレニンなど) には、我々の研究では有意な差は認められなかった。同一の患者から採取した異なるサンプル間 (血清と尿など) では、矛盾した結果が報告されている研究もあり、これは異なる臓器で代謝/分泌速度が異なることが原因である可能性を示唆している。したがって、精神病的障害における中枢と末梢の変化をマッピングするために Quinones and Kaddurah-Daouk(2009) の脳脊髄液と血液を含めたレビューのような、より多くの比較研究が必要である。

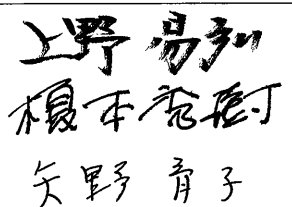
この分野における最大の課題の一つは、抗精神病薬の服用、食事、活動、入院などの影響によるバイアスを排除することの難しさである。重度の症状を持つ患者は、迅速かつ適切な治療を必要とするため、抗精神病薬を使用しない患者のデータを得ることは倫理的に困難である。

もう一つの大きな課題は、統合失調症は単一の疾患ではなく、多様な遺伝的・生物

学的変数の影響を受ける症候群である可能性があることである。統合失調症におけるメタボロームの結果が一致しないのは、これらの多様な病態に起因する可能性がある。しかし精神病的障害、薬物療法、精神病の急性期と寛解期における代謝物の動態をより正確に特定することができれば、まだ完全には解明されていない統合失調症の病態も明らかになるかもしれない。

この研究の限界の一つは、サンプルサイズが各グループ 20 人と小さいことである。また、患者群が入院していることによるバイアスを除外できていない。本研究の対象となった患者はすべて重症であり、入院して治療を受ける必要があったため、このバイアスを除外することは不可能であった。ただし、抗精神病薬の影響については、ロジスティック回帰解析やスパイアマン解析を用いて、可能な限り除外した。

今回の我々の研究とシステマティックレビューは、近年急速に拡大しているメタボローム研究において、重要な役割を担い、今後の研究の大きな足掛かりの一つになると考えている。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3 1 5 2 号	氏 名	金 世 賢
論 文 題 目 Title of Dissertation	統合失調症および精神病におけるバイオマーカーの探索：キャピラリー電気泳動法と液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析法を用いた症例対照研究、および類似研究のシステマティックレビュー Searching for biomarkers in schizophrenia and psychosis: Case-control study using capillary electrophoresis and liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry and systematic review for biofluid metabolites		
審 査 委 員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner 		

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）
（要旨は1，000字～2，000字程度）

<p>[研究の背景]</p> <p>統合失調症の病態には、ドーパミン神経系やグルタミン神経系の神経細胞の機能障害、解糖や酸化ストレス応答などの代謝異常、免疫系の亢進等が関与している可能性が示唆されている。近年は代謝系バイオマーカーが注目され、体液（血液、尿、脳脊髄液）、死後脳、磁気共鳴スペクトロスコピーを用いた代謝物の解析を通して、統合失調症やその他の精神疾患のバイオマーカーを同定しようとする研究が増えている。</p> <p>本研究は、統合失調症患者と健常対照者の、血清中の脂肪酸、アミノ酸、その他の有機酸を含む 378 種類の代謝物を、質量分析計（CE-TOFMS 及び LC-TOFMS）により分析し、多変量解析によって、統合失調症患者と健常対照者との間で有意差のある代謝物を特定し、患者の疾患特性を評価できるバイオマーカーを構築すること、並びに、同じ統合失調症患者の急性期と寛解期の状態の違いに対応するバイオマーカーを同定することを試みたものである。</p> <p>更に、過去 20 年間に行われた、統合失調症又は精神病的障害の患者における代謝物の違いを調べた研究についてのシステマティックレビューも行っている。</p>
<p>[研究方法]</p> <p>(対象)</p> <p>日本人を対象とし、被験者を慢性統合失調症患者（SCZc）20 名、健常対照者（CTL）20 名とした。更に、急性精神病入院患者 20 名から入院時（SCZa-Acute）と退院直前（SCZa-Remission）にそれぞれ血液を採取した。</p> <p>(代謝物の測定・解析)</p> <p>メタボロームの測定は、血清中の脂肪酸、アミノ酸、その他の有機酸を含む 378 種類の代謝物を、CE-飛行時間型質量分析装置（TOFMS）と LC-TOFMS を組み合わせて分析し、その結果を多変量解析して代謝物の群間差を検討している。</p> <p>(システマティックレビュー)</p> <p>過去の類似研究の文献 12,805 編から重複を削除し、更に独立した査読者二名（本研究論文の筆頭著者と共同著者）が審査して、最終的に 32 件の論文をレビューの対象としている。</p>
<p>[研究結果]</p> <p>主成分分析 PCA の結果、CTL 群と SCZc 群は明確に分離されており、SCZa-Acute 群と SCZa-Remission 群はこの 2 つの群の間に分布していた。</p> <p>判別分析 OPLS-DA の結果、SCZc と CTL の 2 群が明確に分離され、6 つの代謝産物（アラニン、グルタミン酸、乳酸、オルニチン、セリン、尿素）がクラス分離に大きく関与し、統計検定により全代謝産物に有意差が認められた（$p < 0.000132$）。</p> <p>SCZa-Acute と SCZa-Remission の 2 群での OPLS 回帰モデルでは 2 群が適度に分離され、5 つの代謝産物「奇数鎖飽和脂肪酸三種〔脂肪酸(15:0)、(17:0)、(19:1)〕、一価不飽和脂肪酸一種</p>

(cis-11-eicosenoic acid)、サイロキシシ」がクラス分けに最も関与していると考えられ、これら5つの代謝物のレベルは SCZa-Acuteの方が SCZa-Remission よりも有意に高かった。

尚、これらの代謝物は、抗精神病薬服用量とは関連しなかった。

過去の文献32編のレビューでは、4つ以上の報告において有意性が報告された代謝物をまとめている。その結果、グルタミン酸・クエン酸等の幾つかの代謝物は複数の文献で統一した結果が得られている。

[考察]

本研究は、統合失調症患者の疾患特性、並びに、急性精神病の状態を評価できる各バイオマーカーの構築を試みた研究であるが、4種類のアミノ酸（アラニン、グルタミン酸、オルニチン、セリン）及び乳酸、尿素は統合失調症のバイオマーカー、4種類の脂肪酸「奇数鎖飽和脂肪酸三種〔脂肪酸(15:0)、(17:0)、(19:1)〕、一価不飽和脂肪酸一種（cis-11-eicosenoic acid）」及びサイロキシシは急性精神病の状態マーカーである可能性がある事を明らかにし、従来殆ど行われていなかったメタボローム解析による統合失調症の病態の理解について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。