

原

著

慢性分裂病患者における血小板からの 脳由来神経栄養因子の放出異常

新潟大学大学院医歯学総合研究科精神医学教室

(主任：染矢俊幸教授)

豊岡和彦

Abnormal BDNF release from Platelets of Patients with Chronic Schizophrenia

Kazuhiko TOYOOKA

Department of Psychiatry, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Toshiyuki SOMEYA)

要 旨

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は分裂病患者脳, 特に辺縁系で増加することが知られている. 本研究では分裂病が末梢 BDNF に対して及ぼす影響を検討するために, 分裂病患者の血清中 BDNF 量を測定した.

血清 BDNF レベルは分裂病群でコントロール群に比べ低下していた (Mann-Whitney 検定, $p < 0.001$). 抗精神病薬の力価と血清 BDNF レベル間に関連はなかった. また抗精神病薬を慢性に投与したラットにおいて, 血清中 BDNF のレベルに変化はなかった. さらに BDNF と同様に血清中へ放出される上皮成長因子 (EGF) の濃度を同時に測定した結果, 血清 EGF レベルと血清中 BDNF のレベルの間には関連が認められた. これらの結果は, 分裂病において BDNF をはじめとする神経栄養因子の放出異常がその病態に関係する可能性を示唆している.

キーワード: 分裂病, BDNF, EGF, ハロペリドール, 血小板

Reprint requests to: Kazuhiko TOYOOKA
Department of Psychiatry
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科精神医学教室
豊岡和彦

Abstract

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is known to increase specifically in the limbic regions of schizophrenic patients. To assess the central effect on peripheral BDNF, we measured peripheral BDNF content in the serum of schizophrenic patients. BDNF protein levels were determined in fresh serum of chronic schizophrenic patients and healthy control volunteers. BDNF levels were significantly reduced in the serum of schizophrenic patients ($p < 0.001$, Mann-Whitney's U-test). Antipsychotic dose did not correlate with serum BDNF levels. Moreover, chronic administration of antipsychotic drugs failed to decrease serum BDNF levels in rats. Abnormal levels of BDNF are evident not only the brain of schizophrenic patients, but also in their peripheral blood. BDNF and epidermal growth factor (EGF) are known to be liberated from platelets. A similar trend of patients was seen in serum EGF levels and correlated with serum BDNF levels. These observations suggest a potential deficit in neurotrophic factor release in patients with schizophrenia.

Key words: schizophrenia, BDNF, EGF, haloperidol, platelet

緒言

分裂病の病因は未だ不明であるが、その発病に脳の発達障害が関与しているという仮説がある¹⁾²⁾。その脳の発達を調節しているのが、脳内神経栄養因子やサイトカインであることからそれらの精神疾患への関与が推定されている³⁾。とりわけBDNFのような神経栄養因子は、中枢神経の発達を制御していることがマウスの遺伝子操作で明らかにされている⁴⁾⁵⁾。

分裂病死後脳の皮質辺縁系においては、BDNFレベルが上昇し、そのレセプターの発現は低下していることをすでに報告した⁶⁾が、抗精神病薬であるハロペリドールを投与してBDNFおよびレセプターに対する影響をみた動物実験では、分裂病における変化と逆方向の変化が報告されており⁷⁾、このことは前述の分裂病死後脳における変化が抗精神病薬による影響ではないことを示している。最近の研究では脳においてBDNFシグナルとドーパミン機能は密接に関係していることも明らかにされた⁸⁾⁹⁾。これらを考え合わせると、神経栄養因子の異常は分裂病の病態および原因に深く関わっている可能性が高い。

BDNFやそのレセプターであるTrkBは脳だけでなく筋肉や血液細胞を含む様々な末梢組織に多

く発現している¹⁰⁾¹¹⁾。BDNFの発現が分裂病に深く関わっているとすれば、分裂病患者で他の末梢組織においても、同様な異常が起こっている可能性がある。今回の研究では、その可能性を検証した。分裂病患者の血清中のBDNFのタンパクレベルを測定するとともに、薬物の影響の評価を行い、さらに血清中の他の栄養因子EGFとの関連について考察した。

対象および方法

1. 対象および手順

ヒト血清は、研究の趣旨を説明し書面にて同意の得られた87人の慢性分裂病患者（男61人、女26人、年齢 54.1 ± 10.16 歳）と、精神神経疾患のない88人の健常対照群（男28人、女60人、年齢 42.25 ± 10.1 歳）から採取した。血液採取後、血小板濃度を測定し、室温にて1～2時間放置した後遠心分離して、血清は分析までの間 -20°C で保存した。すべての実験は新潟大学倫理委員会にて承認を得て行った。

2. Enzyme immunoassay

血清BDNFレベルはサンドイッチ型EIA法にて測定した¹²⁾。この分析の信頼性は先に報告したとおりであり、他の神経栄養因子との交差反応性

は0.2%以下である¹²⁾. 血清を10倍もしくは100倍に希釈し, BDNF スタンダード (1–300pg) とともに抗 BDNF 抗体 (一次抗体; 100ng/well) であらかじめコートしてある EIA titer plate にロードする. 次にビオチン化抗 BDNF 抗体 (10–30ng/ml) を各ウエルに加え, その後 streptavidin- β -galactosidase (1:10,000; Sigma, USA) を結合させる. 各ウエルに残っている β -galactosidase 活性を 200 μ M 4-methylumbelliferyl- β -D-galactosidase (Sigma, USA) を基質として測定した. 反応物の蛍光強度は Fluorolite-1000 fluorometer (Dynatech Laboratories) (励起光: 364nm, 検出光: 448nm) を使用し測定した. なお血清サンプルは 2 点で, BDNF スタンダードは 3 点で測定した.

3. 薬物投与の影響の検討

対象者とした分裂病患者 87 人中 66 人で, 定型抗精神病薬であるハロペリドールが投与されていたため, ハロペリドール投与の影響を評価するために雄の成体ラットに 2 週間もしくは 5 ヶ月慢性投与し血清 BDNF レベルの変化を測定した. ハロペリドールは餌に混ぜて (30mg haloperidol/kg food) 投与し, 目標投与量は 2 mg/kg/day とした. 血液サンプル (0.1ml) はエーテル麻酔下で尾より採取した.

4. 統計

血清 BDNF レベルの分布パターンは正規性が認められなかったため, ノンパラメトリック法で解析を行った. 年齢, 血小板濃度, 薬物投与量は潜在的に BDNF レベルに影響を及ぼしている可能性があり, Spearman の順位相関係数を用いそれぞれ血清 BDNF レベルとの間で相関を検討した. また性差も BDNF レベルに影響を及ぼしている可能性があり, 性別間での血清 BDNF レベルを Mann-Whitney 検定を用い検討した. 有意水準は p 値が 5% 未満とし, 全てのデータは平均値 \pm 標準偏差と表記した.

結 果

血清 BDNF レベルは個体により大きくばらつ

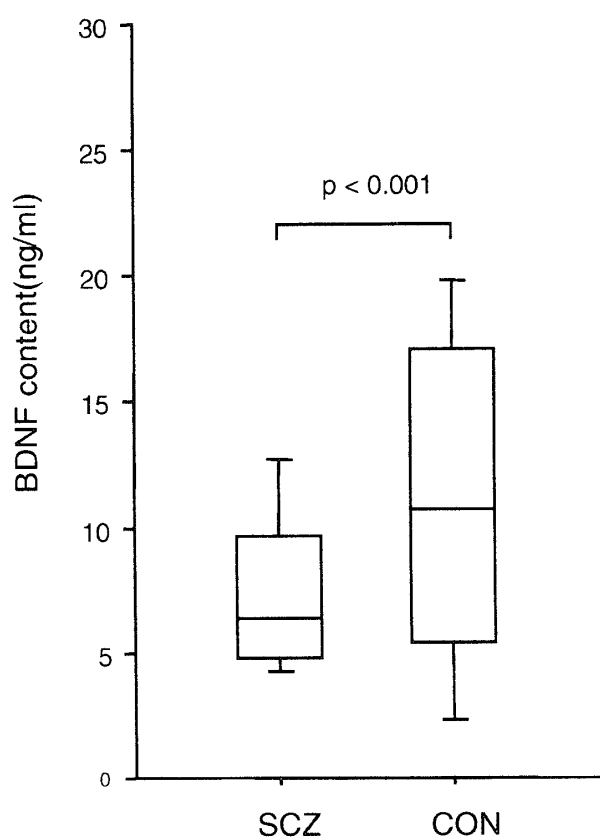


図 1 分裂病患者における血清 BDNF レベル

血清 BDNF レベルは, 分裂病患者群がコントロール群よりも有意に低下していた (Mann-Whitney's U-test, $p < 0.001$). 分裂病患者 (SCZ), コントロール (CON)

くものの, 健常対照群の血清 BDNF レベルは平均 11.12 (± 6.86) ng/ml であり (図 1), 以前の報告¹¹⁾ によく一致する値であった. 一方, 分裂病患者においては血清 BDNF レベルは健常対照群の 67% と有意に低下していた (7.48 ± 4.06 ng/ml, Mann-Whitney 検定, $p < 0.001$). 血清 BDNF レベルでは性差は見られず (Mann-Whitney 検定, male: $n = 28$, female: $n = 60$, $p = 0.41$), さらに年齢との相関も認めなかった (Spearman の順位相関係数, $n = 88$, $p = 0.53$).

2 週間もしくは 5 ヶ月間ハロペリドールを投与されたラットにおいて血清 BDNF レベルは低下していなかった. むしろ 2 週間および 5 ヶ月間投

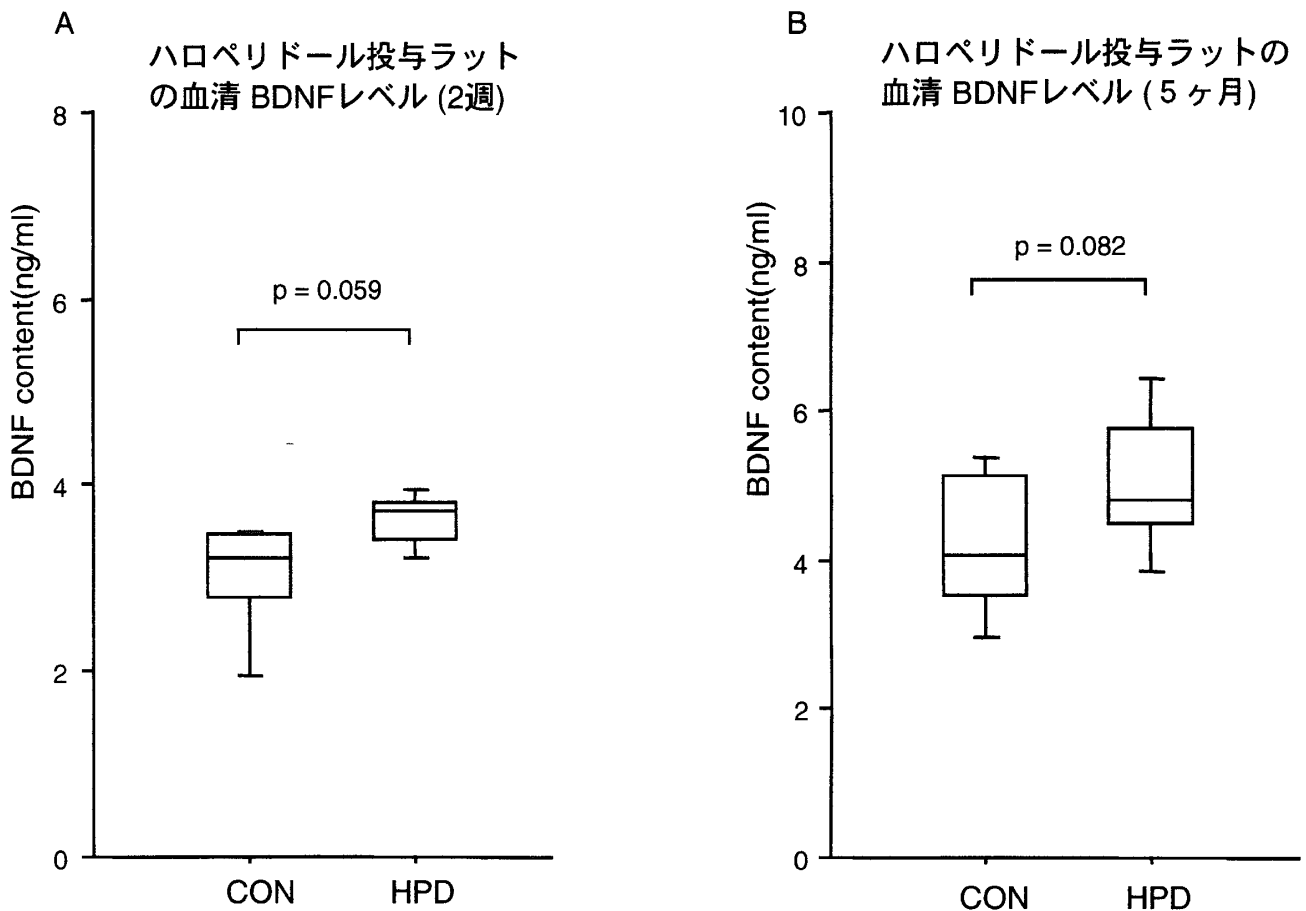


図2 ハロペリドール慢性投与ラット血清 BDNF レベルに対する影響

定型的抗精神病薬であるハロペリドール（目標投与量，2 mg/kg/day）を成体雄ラットに経口的に2週間もしくは5ヶ月間投与した（n=5；2週間投与，n=10；5ヶ月間投与）。ハロペリドール投与ラット（HPD）、コントロールラット（CON）。両群間で血清 BDNF レベルの違いは見られなかった。

与されたラットでともに血清 BDNF レベルは増加の傾向があった（Mann-Whitney 検定，2 W: n=5, p=0.06, 5 M: n=10, p=0.08; 図2）。

採血時点での抗精神病薬の一日の投与量は American Psychiatric Association (1997)¹³⁾ の基準に基づいてハロペリドール等価量を換算し、血清 BDNF レベルとの関連を検討した（図3）。その結果患者において血清 BDNF レベルとハロペリドール換算力価との間には関係は認められなかった。

分裂病患者では健常対照群に比べて血小板濃度はわずかだが（-9%）有意に低下していたため、

分裂病患者における BDNF の血清への放出低下が血小板数の低下に由来する可能性の検討を行った。血清 BDNF レベルと血小板濃度の比を算出し、両群で比較したところ、血清 BDNF レベルを血小板濃度で標準化した値においても分裂病群では有意な低下が認められた（Mann-Whitney 検定，p=0.03; 図4）。

さらに同じ患者血清を用いて、サンドイッチ型 EIA 法により同様に EGF を測定し、BDNF との相関を検討した。その結果両者の間には図5に示したような有意な強い正に相関が認められた。

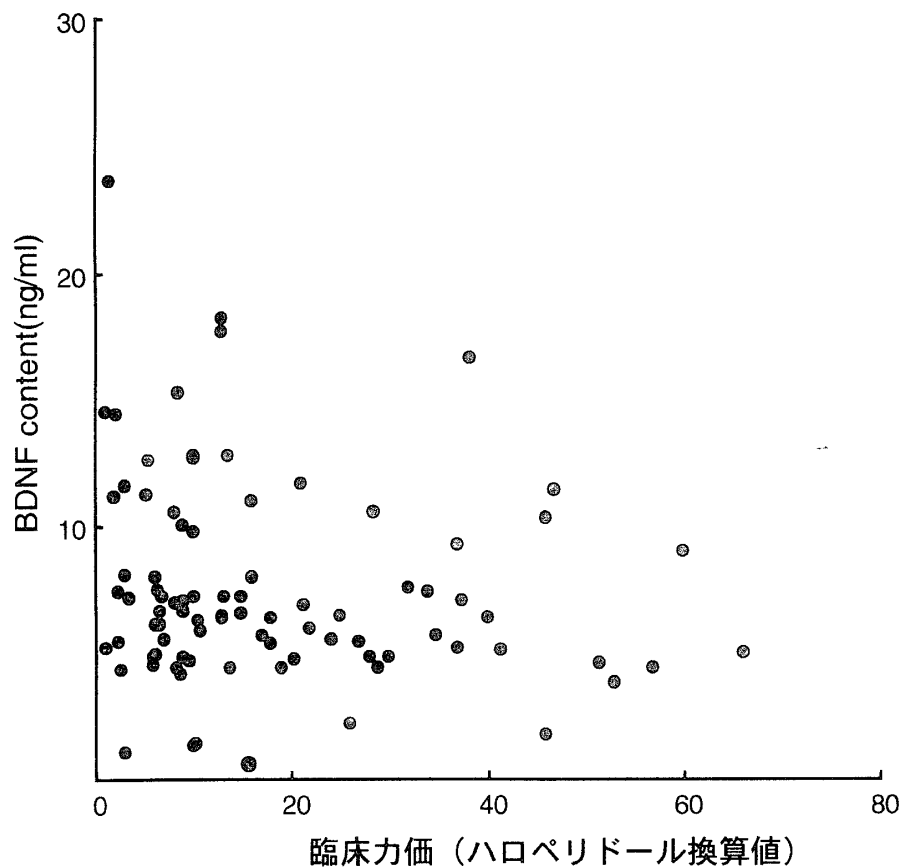


図3 血清 BDNF レベルと抗精神病薬の臨床力価の関係

患者に投与されているハロペリドール以外の抗精神病薬の投薬量を neuroleptic threshold³⁴⁾ の理論に基づきハロペリドールと等価換算し一日の投薬量を算出した。そしてその投薬量と血清 BDNF レベルを個々に対応させスピアマンの順位相関係数の検定を行ったが、これらの間の関係は見られなかった ($n=34$, $r=-0.18$, $p=0.085$)。

考 察

サンドイッチ型 EIA 法により血清中 BDNF を測定したところ、分裂病患者の血清中 BDNF はコントロール血清中 BDNF と比べ 67% に有意に低下していることを示した。この変化は、定型的な抗精神病薬であるハロペリドールのラットへの慢性投与では再現出来ず、慢性の薬物投与による影響の可能性は低いと考えられる。さらに患者の血清 BDNF レベルが抗精神病薬の毎日の投与量とは関係しなかったことから、血清中の BDNF 低

下がそうした薬物投与の影響ではなくむしろ分裂病の本態に関連している可能性を示唆している。

ところで血清中の BDNF はそのほとんどが血小板由来である¹⁴⁾。したがって分裂病患者では血清中へ血小板からの BDNF の放出率が低下しているかもしくは血小板の凝集そのものに影響している可能性がある。さまざまな抗精神病薬治療もしくは分裂病そのものが血小板凝集に影響していることが報告され^{15)–18)}、分裂病において抗精神病薬が血小板の損傷とその結果の凝集を促進し、より多くの凝固因子の放出を促すとされているの

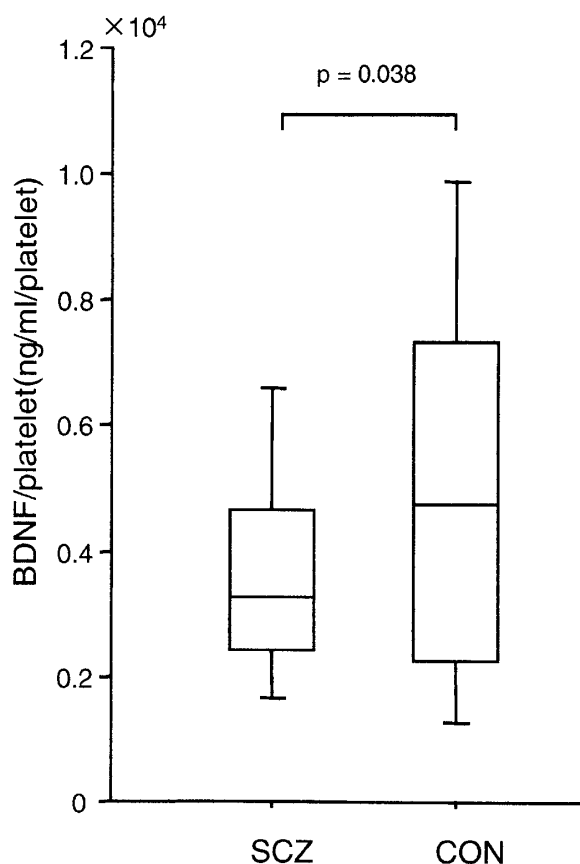


図4 分裂病患者における血清 BDNF レベルと血小板濃度比

血清 BDNF レベルを血中の血小板濃度で割って標準化し、比率を比較した。血小板濃度あたりの血清 BDNF レベルも分裂病群で低下していた (Mann-Whitney 検定, $p=0.038$)。分裂病患者 (SCZ)、コントロール (CON)

で¹⁹⁾²⁰⁾、その場合 BDNF 放出も増加し血清 BDNF レベルは増加することが予想される。しかし今回の結果はこれとは逆で、分裂病血清 BDNF レベルは減少していた。今回の結果でハロペリドールを投与したラットにおいて、血清 BDNF レベルが増加傾向にあったことはこのことと矛盾しない。それゆえ今回の分裂病における血清 BDNF レベルの低下は血小板凝集の変化によるものとは考えにくく、そこで BDNF 放出率の変化による可能性を考慮する必要がある。

血小板はメガカリオサイトから分化した後、様々

な成長因子の発現を始める²¹⁾。そのような血小板由来の液性因子には、血小板由来増殖因子、EGF、BDNF などが含まれる²²⁾²³⁾、これらの中では BDNF が最も豊富に存在する因子の一つである¹⁴⁾。これらの因子は血小板中のアルファ顆粒に貯蔵され、神経伝達物質の開口放出の様に定型的な放出機構により放出されると考えられる²⁴⁾。それはカルシウムイオン依存性で SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor) メカニズムといわれる²⁵⁾。したがって、放出率の変化はこの機構のどこかの過程で何らかの変化があるのかもしれない。また、分裂病患者において血清中の上皮成長因子 (EGF) が低下していることを以前報告したが²⁶⁾、血清 BDNF レベルと血清 EGF レベルの間に正の相関がみられたことは、血小板の開口放出の障害が BDNF のみならず広汎に起こっている可能性を示している。

次に中枢との関連について考察する。以前より脳神経細胞は神経興奮依存的に BDNF を放出していることが知られているが²⁷⁾²⁸⁾、最近プレシナプスから放出しているという知見が増えている²⁹⁾。様々なシナプスマーカーのなかで、分裂病に関連して最もよく研究されているシナプトフィジンは、その発現は分裂病患者の前頭葉皮質および視床で低下^{30)–32)}、していることが報告されている。シナプシン I の発現も分裂病患者の海馬において低下していると報告されている³³⁾。こうした分裂病死後脳におけるプレシナプス部位での様々な小胞分子の発現低下を示した先行研究の結果は、BDNF の放出にも障害をおこすと考えられる。ところで分裂病患者脳で BDNF タンパクレベルも報告されており、海馬と帯状回皮質における増加⁶⁾がみられている。この脳内 BDNF の結果は、今回測定した血清 BDNF レベルが低下していたのとは逆方向である。BDNF の放出の障害が分裂病の病理的な特徴の一つであると仮定すると、報告されている脳内 BDNF の増加は、BDNF 放出が減少し、脳内では神経栄養因子の貯蔵が増加していることを反映しているのかもしれない。

分裂病患者において神経伝達物質の放出異常の

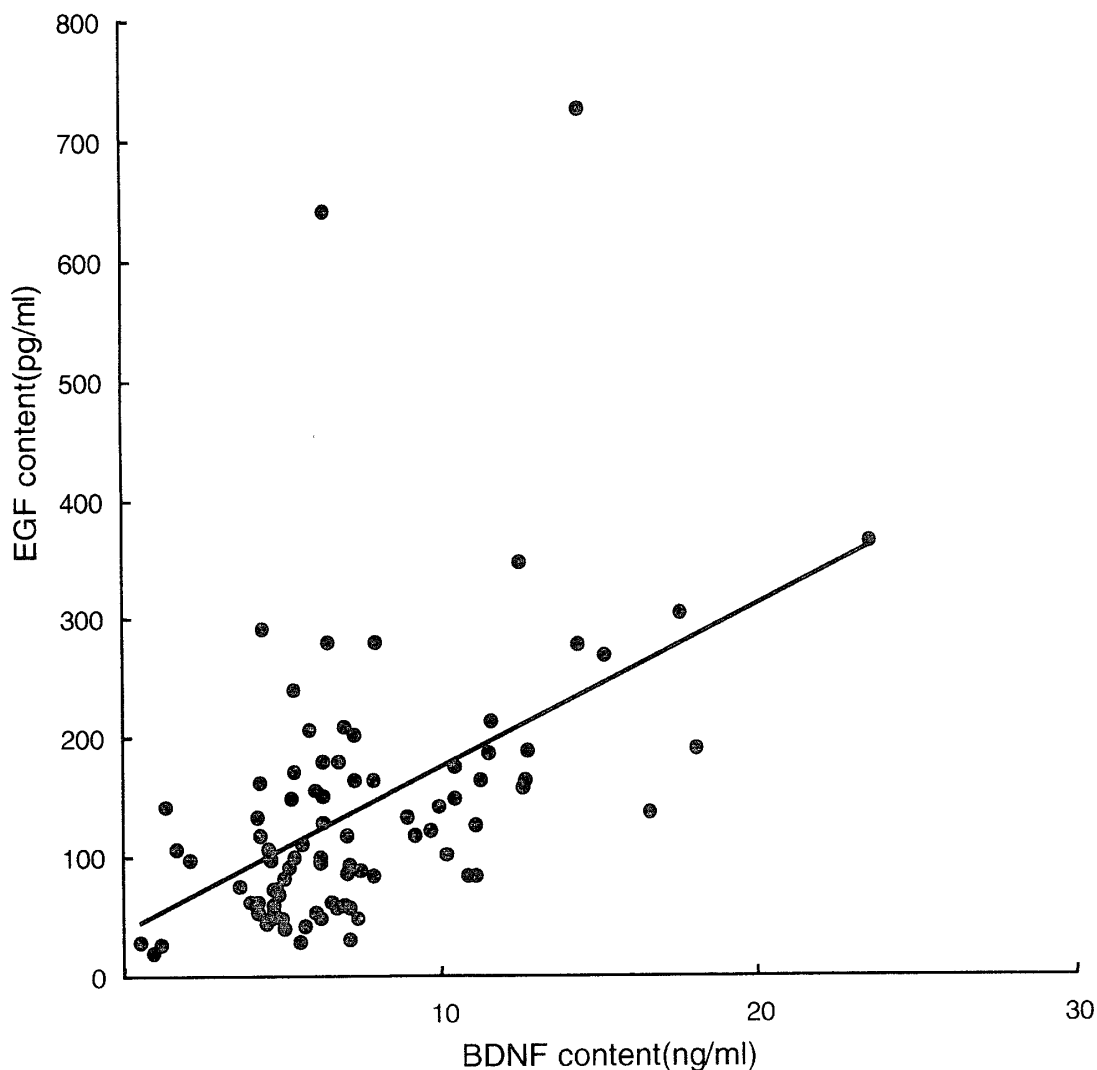


図5 血清 BDNF レベルと血清 EGF レベルの関係

患者血清における BDNF と EGF の測定結果を個々の患者においてその関係を見た。スピアマンの順位相関係数の検定を行ったところ有意に相関がみられた ($n=87$, $r_s=0.53$, $p<0.01$)。 (参考までに近似曲線を図中に記載した。 $y=13.7x+34.9$)

可能性は今まであまり示されていないが、今回の結果はむしろ神経栄養因子の小胞からの開口放出が本疾患に伴い障害されている可能性を示すものであった。今後の課題としては分裂病において血小板からの BDNF の放出が妨害されているのか、どのように神経栄養因子の放出の障害が疾患に結びついているかを決定する必要がある。

謝 辞

本研究の遂行のために、終始ご指導、ご助力をいただ

きました新潟大学大学院医歯学総合研究科感覚統合医学講座精神医学分野の染矢俊幸教授および新潟大学脳研究所分子神経生物学分野の那波宏之教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Kerwin RW and Murray RM: A developmental perspective on the pathology and neurochemistry of the temporal lobe in schizophrenia. *Schizophr Res* 7: 1-12 1992.

- 2) Marenco S and Weinberger DR: The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: following a trail of evidence from cradle to grave. *Dev Psychopathol* 12: 501-527 2000.
- 3) Nawa H, Takahashi M and Patterson PH: Cytokine and growth factor involvement in schizophrenia – support for the developmental model. *Mol Psychiatry* 5: 594-603 2000.
- 4) Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS and Scharfman HE: Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93: 1491-1506 1999.
- 5) Xu B, Zang K, Ruff NL, Zhang YA, McConnell SK, Stryker MP and Reichardt LF: Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB. *Neuron* 26: 233-245 2000.
- 6) Takahashi M, Shirakawa O, Toyooka K, Kitamura N, Hashimoto T, Maeda K, Koizumi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Someya T and Nawa H: Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 5: 293-300 2000.
- 7) Angelucci F, Mathe AA and Aloe L: Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor TrkB in rat brain are significantly altered after haloperidol and risperidone administration. *J Neuroscience Res* 60: 783-794 2000.
- 8) Batchelor PE, Liberatore GT, Porritt MJ, Donnan GA and Howells DW: Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. *Eur J Neurosci* 12: 3462-3468 2000.
- 9) Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC and Sokoloff P: BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioral sensitization. *Nature* 411: 86-89 2001.
- 10) Shibayama E and Koizumi H: Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol* 148: 1807-1818 1996.
- 11) Radka SF, Holst PA, Fritsche M and Altar CA: Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res* 709: 122-301 1996.
- 12) Nawa H, Carnahan J and Gall C: BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* 7: 1527-1535 1995.
- 13) American Psychiatric Association: Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia. III. Treatment principles and alternatives. *Am J Psychiatry* 154 (4 Suppl): 7-37 1997.
- 14) Yamamoto H and Gurney ME: Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neuroscience* 10: 3469-3478 1990.
- 15) Das I, Essali MA, de Belleruche J and Hirsch SR: Inositol phospholipid turnover in platelets of schizophrenic patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 46: 65-66 1992.
- 16) Yao JK, Yasaei P and van Kammen DP: Increased turnover of platelet phosphatidylinositol in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 46: 39-46 1992.
- 17) Yao JK, van Kammen DP, Moss HB and Sokulski DE: Decreased serotonergic responsiveness in platelets of drug-free patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 63: 123-132 1996.
- 18) Tardito D, Tura GB, Bocchio L, Bignotti S, Pioli R, Racagni G and Perez J: Abnormal levels of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunits in platelets from

- schizophrenic patients. *Neuropsychopharmacology* 23: 216-219 2000.
- 19) Orr MW, Knox JM, Allen R, Gelder MG and Grahame-Smith DG: The effects of neuroleptic drugs on 5-hydroxytryptamine induced platelet aggregation in schizophrenic patients. *Br J Clin Pharmacol* 11: 255-259 1981.
- 20) Thorup M and Fog R: Clozapine treatment of schizophrenic patients. Plasma concentration and coagulation factors. *Acta Psychiatr Scand* 55: 123-126 1977.
- 21) Ross R, Raines EW and Bowen-Pope DF: The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46: 155-169 1986.
- 22) Alitalo R, Andersson LC, Betsholtz C, Nilsson K, Westermarck B, Heldin CH and Alitalo K: Induction of platelet-derived growth factor gene expression during megakaryoblastic and monocytic differentiation of human leukemia cell lines. *EMBO J* 6: 1213-1218 1987.
- 23) Ben-Ezra J, Sheibani K, Hwang DL and Lev-Ran A: Megakaryocyte synthesis is the source of epidermal growth factor in human platelets. *Am J Pathol* 137: 755-759 1990.
- 24) Flaumenhaft R, Croce K, Chen E, Furie B and Furie BC: Proteins of the exocytotic core complex mediate platelet alpha-granule secretion. Roles of vesicle-associated membrane protein, SNAP-23, and syntaxin 4. *J Biol Chem* 274: 2492-2501 1999.
- 25) Sollner TH and Rothman JE: Molecular machinery mediating vesicle budding, docking and fusion. *Experientia* 52: 1021-1025 1996.
- 26) Toyooka K, Futamura T, Iritani S, Makifuchi T, Niizato K, Nakamura R, Kakita A, Takahashi H and Nawa H: Abnormal expression of epidermal growth factor and its receptor in the forebrain and serum of schizophrenic patients. Society for Neuroscience 31th annual meeting abstract: 446. 11 2001.
- 27) Griesbeck O, Canossa M, Campana G, Gartner A, Hoener MC, Nawa H, Kolbeck R and Thoenen H: Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc Res Tech* 45: 262-275 1999.
- 28) Kohara K, Kitamura A, Morishima M and Tsumoto T: Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291: 2419-2423 2001.
- 29) Nawa H and Takei N: BDNF as an anterograde; a novel neurotrophic relationship between brain neurons. *Trends Neurosci* 24: 683-684 2001.
- 30) Eastwood SL and Harrison PJ: Decreased synaptophysin in the medial temporal lobe in schizophrenia demonstrated using immunautoradiography. *Neuroscience* 69: 339-343 1995.
- 31) Glantz LA and Lewis DA: Reduction of synaptophysin immunoreactivity in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. Regional and diagnostic specificity. *Arch Gen Psychiatry* 54: 660-669 1997.
- 32) Landen M, Davidsson P, Gottfries CG, Grenfeldt B, Stridsberg M and Blennow K: Reduction of the small synaptic vesicle protein synaptophysin but not the large dense core chromogranins in the left thalamus of subjects with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 46: 1698-1702 1999.
- 33) Browning MD, Dudek EM, Rapier JL, Leonard S and Freedman R: Significant reductions in synapsin but not synaptophysin specific activity in the brains of some schizophrenics. *Biol Psychiatry* 34: 529-535 1993.
- 34) Bitter I, Volavka J and Scheurer J: The concept of the neuroleptic threshold: An update. *J Clin Psychopharmacol* 11: 28-33 1991.

(平成14年1月29日受付)