

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 19 年度採択研究代表者

貝淵 弘三

名古屋大学大学院医学系研究科・教授

神経発達関連因子を標的とした統合失調症の分子病態解明

1. 研究実施の概要

統合失調症は人口の約1%が思春期・青年期に発症し、現在でも多くの難治例が存在する精神障害である。統合失調症の発症には、中枢神経系の発達障害が関与していると考えられている。遺伝疫学的研究により、多因子疾患であるが発症には遺伝因子の関与が比較的強いと推測されている。本研究では、統合失調症の発症脆弱性因子の結合分子を生化学的手法により同定し、機能解析を行う。また、遺伝学的にも全ゲノム領域対象の関連解析を進める。そして、機能面と全ゲノム解析による位置情報を勘案して候補遺伝子を絞り込み、統合失調症患者から得たゲノムを用いて、診断的表現型に抗精神病薬治療反応性、認知機能、神経画像、リンパ球における遺伝子・蛋白発現といった中間表現型も加味して関連解析を行う。その上で、遺伝統計学的に抽出された統合失調症発症脆弱性候補遺伝子の変異マウスを作成し、病理学的、生理学的、行動学的解析を行い、統合的に分子病態解明を進め、新たな予防法・治療法へと繋げる。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

(1) 統合失調症発症脆弱性因子の同定と機能解析(担当:貝淵、橋本、尾崎美和子)

1) DISC1(担当:貝淵)

DISC1 結合蛋白質を網羅的に解析し、Kinesin-1、Nudel 複合体、Grb2 以外に 100 種以上の結合蛋白質をすでに同定している。これらの結合蛋白質の生理機能や病態への関与を、生化学、分子生物学、細胞生物学(培養神経細胞、分子イメージング)、マウス発生工学(子宮内遺伝子導入)の手法を用いて解析する(H19-21年度)。

mRNA 蛋白質複合体(mRNP 複合体)構成蛋白質グループ——DISC1 結合蛋白質として Pur α や Syncrip に代表される mRNP 複合体構成蛋白質を多数同定している。シナプス可塑性発現に必

要とされる蛋白質の mRNA が、mRNP 複合体を介してポストシナプス領域に輸送され、局所的に蛋白質合成されると考えられる。mRNP 複合体は RNA を介して結合する分子が多いことが報告されている。H19年度は、DISC1 が mRNP 複合体蛋白質の中でも、RNA を介さず Syncrin と直接結合することを明らかにした。

樹状突起のスパイン形成に關与するグループ——研究代表者らは、DISC1 が軸索の遠位側だけでなく、樹状突起のスパインに濃縮し、スパイン形成に關与していることを見出している。H19年度は、DISC1 を発現抑制させたラット海馬初代培養神経細胞においてスパインが未成熟になることを明らかにした。

DISC1 の活性制御機構——DISC1 は積み荷受容体あるいは scaffold 蛋白質として多種類の蛋白質の局在化や機能を制御すると推定されるが、その活性制御機構は全く不明である。研究代表者らは、DISC1 がリン酸化によってその機能が制御されることを見出した。H19年度は、DISC1 を直接リン酸化する酵素として PKA などを同定した。

2) DISC1 以外の脆弱性因子 (担当: 貝淵、橋本、尾崎美和子)

DISC1 以外の脆弱性因子の結合蛋白質を同定すると共に、その生理機能について解析する。

Dysbindin——H19年度は、高性能の質量分析器を用いて、Dysbindin 結合蛋白質を網羅的に同定した。その結果、Dysbindin が AP3 複合体 (小胞輸送を制御する蛋白質群) と Munc-18 (神経伝達物質の放出に關与する蛋白質) に生理的に結合することを見出した。

Neuregulin-1——H19年度は、新規 Neuregulin-1 結合蛋白質を網羅的に同定した。

14-3-3 ϵ ——H19年度は、新規 14-3-3 ϵ 結合蛋白質を網羅的に同定した。

3) 結合蛋白質のマウス生体脳での機能解析 (担当: 貝淵)

In vitro の解析で得られた結果が、in vivo で反映されるか検討する。具体的には、発生初期段階ではエレクトロポレーションによる子宮内遺伝子導入、発生後期段階では Gene Gun による遺伝子導入する技術を用いて解析する。H19年度は、実験系の確立に着手した。

(2) 全ゲノム領域対象の關連解析 (担当: 岩田、尾崎紀夫)

1) 日本人統合失調症 600 名と健常コントロール 600 名の一次解析を終了した。現時点での脱落率は約 5% 程度であり概ね良好な結果を得ている。脱落サンプルの補充を含めて約 100 サンプルの追加実験を行う予定である。平成 20 年度第一四半期までに一次解析の実験を終了する。同時にデータ解析を行う。全ゲノムにわたり平均 5.9Kb の間隔で配置した SNP での解析であるが関心領域については連鎖不平衡を考慮した追加の SNP タイピングを行い、統合失調症と有意な關連を示すゲノム座位を詳細に確定する。この中からまず上位 10 位までの座位を選出し二次解析の後方領域として選出する (第二四半期まで)。二次解析としては 1. 一次解析とは独立して収集した日本人統合失調症と健常コントロール各 1000 名を対象にした詳細な連鎖不平衡關連解析を行う (第四四半期まで)。

2) 別の人種での再現性について欧州白人サンプルについての解析を、Cardiff University の

Michel Owen 及び Michael O'Donovan らのグループとの共同研究として追試をすすめる。

(3) 脆弱性因子とその結合分子を候補遺伝子とした関連解析 (担当: 尾崎紀夫)

(H19-23年度)

上記(1)から明らかにした神経発達への関与という機能的側面に加え、統合失調症脆弱性遺伝子の存在位置を全ゲノムにわたり関連解析により検索し、両者を勘案して候補遺伝子を選定する。(2)によって選択した各候補遺伝子に関して SNPs データベースから選定した SNPs を用い、HapMap データベースを参照しながら haplotype tagging SNPs を選択する。統合失調症患者および健常者各 300 名を用い関連が見られた SNPs については各 1000 名の独立したサンプルによって確認し、陽性所見に関してはさらに各 1000 名の独立したサンプルによる再確認を行い擬陽性の可能性を排除する。また、多因子疾患であることを加味して、遺伝子-遺伝子相互作用の検証もファジーニューラルネットワークを用いた方法論により実施する。

(4) 中間表現型との関連解析 (担当: 貝淵、尾崎紀夫、川崎、橋本)

(H19-24年度)

モデル動物においても確認可能な表現型である認知機能、MRIによって計測した脳構造、リンパ球を用いた遺伝発現及び蛋白発現、抗精神病薬反応性といった中間表現型が確立している。H19年度は、14-3-3 ϵ の発現が低下していると考えられる遺伝子型の統合失調症患者で海馬の萎縮が観察されるという予備的な結果が得られた。また、統合失調症患者で脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子多型と海馬傍回²、BDNF遺伝子多型とドーパミンD3受容体遺伝子多型の組み合わせと視床間橋や海馬⁴などの脳形態変化に関連がみられた。中間表現型としてより洗練させるために、事象関連電位所見を画像化する技術や、脳形態特徴を数値化する技術³の開発と応用をおこなった。

(5) モデルマウス(KO, TG)の作成 (担当: 貝淵、尾崎美和子)

(H19-23年度)

DISC1のKOマウス、Neuregulin-1のTGマウスを作成に着手した。また、129sv/evラインのマウスDISC1の発現を確認した¹。

(6) モデルマウスの神経病理学的解析および行動解析 (担当: 貝淵、山田)

(H19-24年度)

モデルマウスの認知機能を含む行動解析を行い、統合失調症様の認知機能障害および行動障害の有無を検討する。H19年度は、14-3-3 ϵ ノックアウトマウスの行動解析を行い、統合失調症に関連する異常が認められるという結果を得た。また、薬物誘発性統合失調症モデルマウスにおける感覚情報処理の障害はGABA_B受容体作動薬により改善するという結果を得た⁵。さらに、幼児期長期隔離飼育を施したマウスを用いて環境因子の影響について検討した。幼児期長期隔離飼育マウスでは空間学習・記憶障害と情動性障害が認められ、これら異常行動の発現には海馬の神経新生

の障害が関連しているという結果が得られた⁶。

3. 研究実施体制

(1)「名古屋大学」グループ

① 研究分担グループ長: 貝淵 弘三 (名古屋大学、教授)

② 研究項目

・統合失調症発症脆弱性因子の機能解析

統合失調症発症脆弱性因子の結合蛋白質の生理機能や病態への関与を、生化学、分子生物学、細胞生物学、マウス発生工学の手法を用いて解析する。

・脆弱性遺伝子とその結合分子を候補遺伝子とした関連解析

神経発達への機能的関与と位置情報から選択した候補遺伝子によるゲノム解析を行う。また、藤田保健衛生大の岩田らと共同して、全ゲノム領域を対象とした関連解析を行う。

・中間表現型の解析

モデル動物においても共通の表現型として検討可能な認知機能、リンパ球を用いた遺伝発現及び蛋白質発現といった中間表現型の解析を行う。

・脆弱性遺伝子のモデルマウスの作成

統合失調症発症脆弱性因子、またはその関連が示唆された遺伝子のトランスジェニックマウスあるいはノックアウトマウスを作成する。研究には早稲田大学の尾崎美和子も参加する。

・統合失調症発症脆弱性遺伝子変異マウスの行動解析

統合失調症発症脆弱性遺伝子変異マウスの行動を系統的に解析し、統合失調症様行動異常あるいは認知機能障害の有無を検討する。研究には早稲田大学の尾崎美和子も参加する。

(2)「藤田保健衛生大学」グループ

① 研究分担グループ長: 岩田 仲生 (藤田保健衛生大学、教授)

② 研究項目

・統合失調症発症脆弱性因子とその結合分子を候補遺伝子とした関連解析

全ゲノム領域を対象とした関連解析を行う。新たな脆弱性遺伝子座位を事前の仮説なく検出する。

(3)「富山大学」グループ

① 研究分担グループ長: 川崎 康弘 (富山大学、講師)

② 研究項目

- ・統合失調症患者のMRI画像と事象関連電位による中間表現型解析

統合失調症患者と健常者において、或は SNP の影響を検討するために MRI 撮像データにより関心領域の体積を測定し、聴覚性 odd-ball 課題遂行時の事象関連電位の振幅および潜時を測定する。

(4)「大阪大学」グループ

- ① 研究分担グループ長:橋本 亮太(大阪大学、特任助教)

② 研究項目

- ・統合失調症発症脆弱性因子Dysbindinの機能解析

Dysbindinの生理機能や病態への関与を、細胞生物学、マウス発生工学の手法を用いて解析する。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- 1 Ishizuka K, Chen J, Taya S, Li W, Millar JK, Xu Y, Clapcote SJ, Hookway C, Morita M, Kamiya A, Tomoda T, Lipska BK, Roder JC, Pletnikov M, Porteous D, Silva AJ, Cannon TD, Kaibuchi K, Brandon NJ, Weinberger DR, Sawa A.
Evidence that many of the DISC1 isoforms in C57BL/6J mice are also expressed in 129S6/SvEv mice. *Mol Psychiatry*. 10, 897-899, 2007
- 2 Takahashi T, Suzuki M, Tsunoda M, Kawamura Y, Takahashi N, Tsuneki H, Kawasaki Y, Zhou S.Y, Kobayashi S, Sasaoka T, Seto H, Kurachi M, Ozaki N.:
Association between the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and brain morphology in a Japanese sample of schizophrenia and healthy comparisons. *Neurosci. Letters*, 435:34-39, 2008.
- 3 Kawasaki Y, Suzuki M, Takahashi T, Nohara S, McGuire P.K., Seto H, Kurachi M. Anomalous cerebral asymmetry in patients with schizophrenia demonstrated by voxel-based morphometry. *Biol Psychiatry*, 63:793-800, 2008.
- 4 Takahashi T, Suzuki M, Tsunoda M, Kawamura Y, Takahashi N, Maeno N, Kawasaki Y, Zhou S.Y, Hagino H, Niu L, Tsuneki H, Kobayashi S, Sasaoka T, Seto H, Kurachi M, Ozaki N.: The association of genotypic combination of the DRD3 and BDNF polymorphisms on the adhesion interthalamica and medial temporal lobe structures. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, in press
- 5 Arai S, Takuma K, Mizoguchi H, Ibi D, Nagai T, Takahashi K, Kamei H,

Nabeshima T, Yamada K. Involvement of pallidotegmental neurons in methamphetamine- and MK-801-induced impairment of prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in mice: reversal by GABA_B receptor agonist baclofen. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Mar 19; [Epub ahead of print]

- 6 Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *J. Neurochem*. 2008 Jan 22; [Epub ahead of print]