

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

候補遺伝子 *DISC1* の機能解析による
統合失調症の病態理解と治療戦略の構築

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 久保 健一郎

平成20（2008）年4月

目 次

I. 総括研究報告

候補遺伝子 *DISC1* の機能解析による
統合失調症の病態理解と治療戦略の構築
(H19-こころ-若手-025)

久保 健一郎

----- 3

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 20

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告

候補遺伝子 *DISC1* の機能解析による統合失調症の病態理解と
治療戦略の構築（H19-こころ-若手-025）

主任研究者 慶應義塾大学医学部解剖学
久保 健一郎

研究要旨

本研究は、統合失調症の病態理解に役立つ事を目的として、統合失調症候補遺伝子 *DISC1* の機能を解析した。これまでに、*DISC1* に結合する分子として pericentriolar material-1(PCM1)および Bardet-Biedl syndrome-4 protein (BBS4) を同定し、機能的関連を証明した。また、*DISC1* 上の薬剤によって調節される部位であるアミノ酸配列を利用して、*DISC1* がどのように薬剤によって機能調節を受ける可能性があるのかを解析した。

今後、現在の解析を進めるとともに、発見された結合分子の機能解析をさらに進める。加えて、新たな結合因子についても検索を進める。すでに知られている抗精神病薬の標的カスケードとの関連に着目し、向精神薬・抗精神病薬の薬理作用について解明を行っていく。

A. 研究の目的

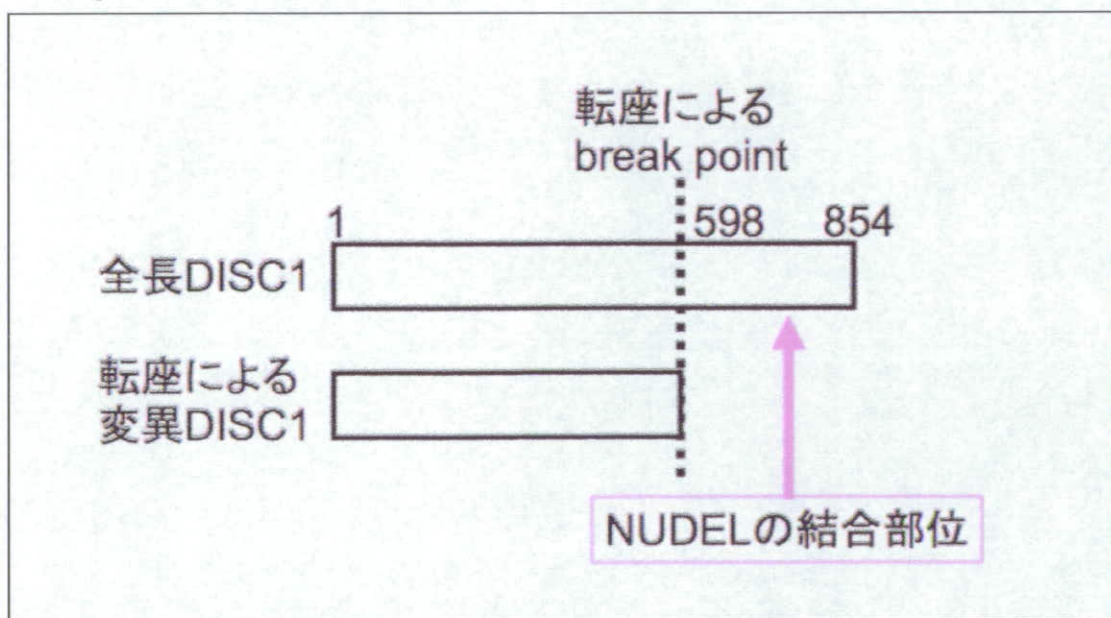
統合失調症の成因についての仮説として、発達段階での脳の異常が、その後の統合失調症ならびに関連した精神疾患に罹患する危険性を増すとする発達障害仮説がある(Weinberger DR, McClure RK. Arch Gen Psychiatry. 2002 Jun;59(6):553-8)。この仮説自体は以前から存在したが、画像診断の発達

によって統合失調症患者に脳の形態異常があることが分かり、再度注目を集めた (Wright IC *et al.* Am J Psychiatry. 2000 Jan;157(1):16-25.)。これらの形態異常を持つ統合失調症の脳の病理組織では、前頭葉を始め、辺縁系、側頭葉などの各脳領域に微細な組織構築の乱れがあるとされており、統合失調症の死後脳で神経変性や神経毒性の亢進を示す所見や顕著なグ

リオーシスが見つからないため、皮質構築過程における異常に起因してこれらの構造変化が起こると考えられている (Harrison PJ. *Brain*. 1999 Apr;122 (Pt 4):593-624)。

さて、大脳皮質形成過程において、神経細胞は、脳室周囲で誕生し、長い距離を移動して脳表面近くに向かい、順序よく配置される。近年の分子遺伝学の急速な進展により、ヒトやマウスの皮質構造の形成に関わる分子が次々と明らかになった (Kubo K, Nakajima K. *Keio J Med*. 2003 Mar;52(1):8-20.)。その一方で、統合失調症についても家系を用いた連鎖解析から、有力な候補遺伝子が見いだされた (Owen MJ *et al. Trends Genet*. 2005 Sep;21(9):518-25)。なかでも、スコットランドの精神疾患多発家系の遺伝学的研究で発見された *disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)* は、その後の

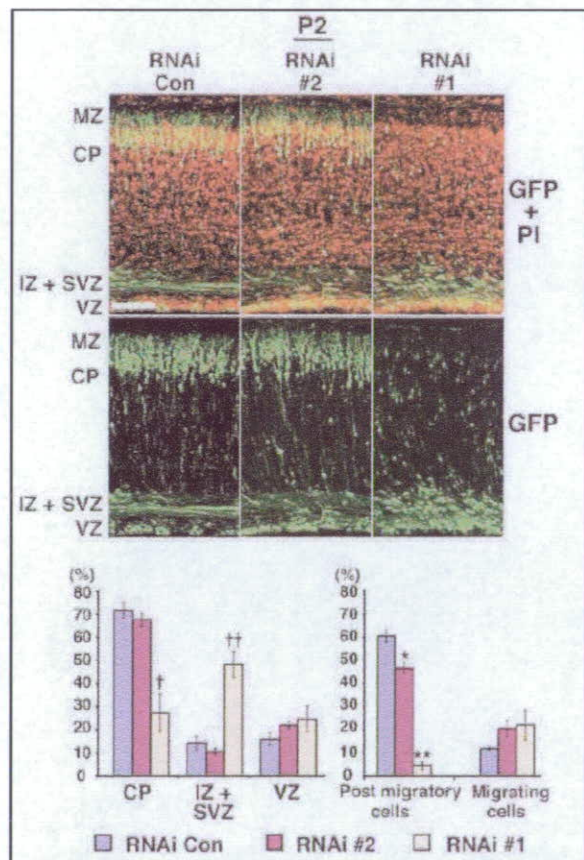
申請者らによる解析の結果、コードする蛋白質が皮質構造形成に関わる可能性が示唆された (後述)。*DISC1* は 854 アミノ酸からなる蛋白質をコードするが、転座によって C 末の 257 アミノ酸が失われると高率で精神疾患に罹患する。共同研究者である澤らは、マウスの *DISC1* ホモログをクローニングした後、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、*DISC1* と結合する可能性のある蛋白質を検索した (Ozeki Y *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7;100(1):289-94)。その結果、C 末端 254 アミノ酸と結合する候補として、*NUDEL* が得られた。免疫沈降や *in vitro binding* の結果により、*DISC1* と *NUDEL* が相互作用していること、そして注目すべきことに、転座の結果 C 末端が失われた *DISC1* は *NUDEL* と結合できなくなることが示された。*NUDEL* は I 型滑脳症の原因遺伝子で



ある LIS1 と結合して神経細胞の移動に重要な役割を果たしていることが知られており、DISC1 の NUDEL への結合は、DISC1 の神経細胞移動への関与を示唆した。DISC1 の機能欠失が統合失調症に結びつくことから、DISC1 の脳の発生における機能を明らかにすることで、統合失調症の脳における病態理解に重要な示唆が得られることが期待された。そこで申請者は、DISC1 の機能解析を生体内で行うため、所属研究室で開発された *in utero* electroporation 法によって脳内にプラスミドを導入し、DISC1 の機能を解析しようと試みた。発生中のマウス大脳皮質における DISC1 の発現が知られているため、まず siRNA 法を用いて、DISC1 をノックダウンしたときの移動中神経細胞への影響を観察した。胎生 14.5 日に *in utero* electroporation 法を用いて、GFP 発現ベクターとともに DISC1 に対する siRNA をマウス大脳皮質に導入した。生後 2 日目に固定して解析したところ、本来ならば脳の最表面に達して移動を終えているはずの神経細胞がほとんど脳の最表面には見当たらず、まだ移動途中であった (右図上右パネル、RNAi#1)。効果の弱い siRNA を導入した場合 (右図上右パネル、RNAi#2)、多くの神経細胞は最表面に達しているものの、それら移動を終えた神経細胞の割合が少な

った (下図右下パネル Post-migratory cells)。これにより、DISC1 のノックダウンにより、神経細胞の移動が容量依存的に遅れることがわかった (より強いノックダウンで遅れが大きくなる)。

転座の結果 C 末端が失われた DISC1 は NUDEL との結合ができなくなる。この DISC1 を培養 PC12 細胞に導入すると、神経細胞突起の伸長が障害される。この効果は、PC12 細胞に DISC1 の siRNA を導入した場合と同



じである。また、株化培養細胞に、全長の DISC1 と C 末端が失われた DISC1 を同時に発現させると、本来 centrosome に局在する全長 DISC1 が細

胞質に局在を変えてしまい、centrosome への局在が失われる。このため、C 末端が失われた DISC1 は全長 DISC1 の機能を阻害すると考えられた。この C 末端が失われた DISC1 を *in utero* electroporation 法を用いて、GFP 発現ベクターマウス大脳皮質に導入した。すると、効果が弱い siRNA を導入したときと同様、多くの神経細胞は最表面に達しているものの、それら移動を終えた神経細胞の割合が少なく、神経細胞の移動が遅れていることが示唆された。転座によって生じる C 末端が失われた DISC1 を発現すると、脳の組織構築に軽微な影響があるというこの結果は、これまで報告されてきた統合失調症の脳における微細組織異常の所見とよく一致する。

そこで本研究では、DISC1 の機能解析をさらに推し進めることを目的として、部位・時期特異的な DISC1 の機

能を解析し、その分子メカニズムについても解明を進める。大脳皮質脳室帯で最終分裂を終えて誕生した興奮性神経細胞は、中間帯（脳室下帯）に入り、そこで多極性移動と命名した特徴的な挙動を約一日間の長きにわたって行う（図1①②）ことが最近明らかになった（Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima. *J. Neurosci.*, 23 (31), 9996-10001 (2003).）。多極性移動細胞は、その時期に軸索を接線方向にのぼし始める（図1③）。その後、軸索をさらに伸ばしながらサブプレートを乗り越え、皮質板の最表層に達するまで、放射状移動と呼ばれる細胞運動を行う（図1④）。そこで移動を終えた後、次に樹状突起形成を行う（図1⑤）。本研究では、各段階における DISC1 の機能を検証し、大脳皮質発生にいかなる機能を有するかを明らかにすることにより、統合失調症の候補遺伝子

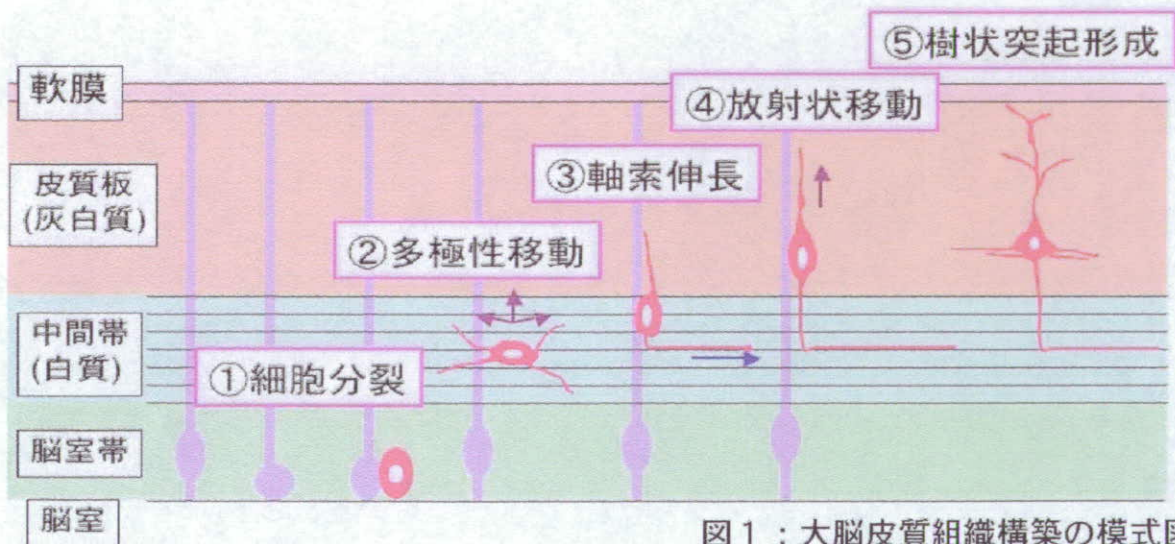


図1：大脳皮質組織構築の模式図

である DISC1 の機能変異がいかにして組織構築の異常を引き起こすのかを解明を試みた。

本研究においては、子宮内マウス胎児脳電気穿孔法による遺伝子導入を頻用している。本手法は所属研究室にて開発（特許出願中）され、ここ数年で世界中に急速に広まった技術である（Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima. *Neuroscience*, 103, 865-872 (2001).）。希望する部位に特異的に遺伝子導入することができ、そして、導入された細胞のその後の挙動や形態を樹状突起や軸索の先端まで詳細に生きたまま観察できるとともに、導入遺伝子の機能獲得（発現阻害ベクターの場合は機能欠失）の影響を容易に解析できる。当研究室では世界中から研究者を受け入れて技術指導を行っており、多くのノウハウを蓄積している。

この子宮内マウス胎児脳電気穿孔法を十分に活用することで、特にこれまで報告されている統合失調症の脳病理所見との関連を中心に解析を行うことにより、病態理解に直結した知見が得られ、新規治療法の開発に貢献できることを期待している。

関連文献：

Ken-ichiro Kubo and Kazunori Nakajima. Cell and molecular mechanisms that control cortical layer formation in the brain. *Keio J. Med.*, 52 (1), 8-20 (2003).

Atsushi Kamiya, Ken-ichiro Kubo, Toshifumi Tomoda, Manabu Takaki, Richard Youn, Yuji Ozeki, Naoya Sawamura, Una Park, Chikako Kudo, Masako Okawa, Christopher A. Ross, Mary E. Hatten, Kazunori Nakajima, and Akira Sawa. Disrupted-In-Schizophrenia-1 in development of the cerebral cortex: perturbation by its schizophrenia-associated mutation. *Nature Cell Biol.*, 7 (12), 1067-1078 (2005).

Weinberger DR, McClure RK. Neurotoxicity, neuroplasticity, and magnetic resonance imaging morphometry: what is happening in the schizophrenic brain? *Arch Gen Psychiatry*. 2002 Jun;59(6):553-8

Wright IC *et al.* Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000 Jan;157(1):16-25.

Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*. 1999 Apr;122 (Pt 4):593-624

Owen MJ *et al.* Schizophrenia: genes at last? *Trends Genet.* 2005

Sep;21(9):518-25

Ozeki Y *et al.*
Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1):
mutant truncation prevents binding to
NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite
outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
2003 Jan 7;100(1):289-94

Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima.
Multipolar migration: the third mode of
radial neuronal migration in the
developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*,
23 (31), 9996-10001 (2003).

Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima.
Efficient *in utero* gene transfer system to
the developing mouse brains using
electroporation-- Visualization of
neuronal migration in the developing
cortex. *Neuroscience*, 103, 865-872
(2001).

B. 研究方法

I) 機能解析のためのプラスミドの作成

1) 様々な強さの siRNA 発現ベクターの作成：ノックダウン効果の程度、すなわち DISC1 の発現量の程度と、その生物学的活性の程度に定量的な相関が得られるかどうかを後述の実験で解析するため、従来用いてきたノックダウン効果の強い RNAi#1、ノックダウン効果の弱い RNAi#2 に加えて、様々な強さの阻害作用を示す siRNA 発現ベクターを作成した。

2) ドメイン解析のための DISC1 変異体の作成：従来用いてきた C 末を欠損した DISC1 だけでなく、様々な変異を持つ DISC1 を作成した。具体的には、DISC1 は分子内相互作用をすることが分かっているため、その相互作用ドメインや、NUDEL との相互作用ドメインなど、それぞれのドメインに特異的な変異を入れた変異体 DISC1 を作成した。これらのうち、DISC1 上プロテインキナーゼ A によりリン酸化されるアミノ酸をアラニンに変異させた変異体を後述する実験で用い、このリン酸化の機能的意義を解析した。実際には、1) の siRNA 発現ベクターと 2) の変異体を組み合わせて同時に導入することにより、内在性の DISC1 をノックダウンした環境下でこのの変異

体の機能解析を行った。この際、それぞれ siRNA によって認識される核酸の配列は、アミノ酸配列は変化しないよう変異を入れた。これによって、導入する変異体は同時に導入する siRNA によってノックダウンされない。この変異体を *in utero* electroporation 法によってマウス胎児大脳皮質脳室面に遺伝子導入し、どの程度、機能・形質を回復できるかを検証した。

II) 子宮内胎児電気穿孔法

すべての動物実験は日本神経学学会のガイドラインに従い、十分な麻酔を行いつつ、動物の苦痛が最小限となるようにあらゆる配慮が払われた。

<器具・機械>

- ・遺伝子導入装置：CUY21E（ネッパジーン社製、フットスイッチ付き）
- ・*in vivo*用電極：CUY650P3（電極の径が3mm）、CUY650P5（電極の径が5mm）
- ・解剖用具（ピンセット中 x 2、解剖用はさみ x 2、リングピンセット x 1、持針器 x 1、INOX No.5などの精密ピンセット）
- ・インジェクション針（成重社製芯入硝子管（GD-1）をプラーで引いて作る。引いていない管に水を吸って、2 μ l ごとに4点の目盛をつける。これ

を定規にして、インジェクション針に目盛をつける。)

・吸引チューブ (Drummond 社 05-2000-00、もとからついている赤いマウスピースを取り外し、ここにポアサイズ0.22 μ mのフィルター (ミリポアMillex-LG(13mm)) を取り付け、さらにピストンを外した1mlのシリンジを新しいマウスピースとして取り付ける。

・ファイバーライト (Kenko, Technolight KTS-100RSV)

・滅菌ガーゼ (ケーパイン、7.5cm x 7.5cm)

・手術台

・外科手術用テープ (3M社製、Transpore)

・ナイロン製縫合糸 (ネスコ社製、HT1605NA75)

・絹製縫合糸 (D&G社製、112451)

<試薬>

・プラスミド溶液はキアゲン社の Maxi kit、または超遠心により精製したプラスミドDNAをHBSバッファーで5mg/mlになるように溶かした。

・HBSバッファー (10xのストック溶液を滅菌水で薄めて用いた)

10xHBSバッファー

HEPES 5g(20%)

NaCl 8g(8%)

KCl 0.37g(50mM)

Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.251g(7mM)

Glucose 1g(1%)

超純水で100mlに調整。ろ過滅菌して分注し、凍結保存する。

・0.1% FastGreen溶液 (Sigma F7258の粉末を滅菌水で溶かす)

・PBS

・1/10希釈ネンブタール注射液 (大日本製薬、ネンブタール注射液 (50mg/mlペントバルビタールNa溶液) を滅菌水で1/10に希釈した。

・70%エタノール

《手順》

1/10に希釈したネンブタール液を体重10g当り120 μ lの割合で、腹腔内に注射して麻酔をかけた。一回分 (約20 μ l) に分注したプラスミド溶液に、1/10量の0.1% FastGreen溶液を加え、マウスを手術台に仰向けに寝かせ、手足を外科手術用テープで固定、子宮壁を通して胎仔が見えるので、FastGreenで着色したプラスミド溶液をインジェクション針に吸引して、これを側脳室の片側に注入した。次に、PBSで子宮をよく濡らし、ピンセット型の電極で胎仔の頭部をはさみ、電気パルスを与えた。電圧33V、パルスオン/オフ50/950msec、パルスの回数4回にて行った。電流の実測値は30-60mAとなった。

子宮内胎児脳電気穿孔法による発生期脳への任意遺伝子の導入により、成熟神経細胞の形態を長期間可視化しつつ、導入遺伝子の機能を解析することが容易にできるようになった

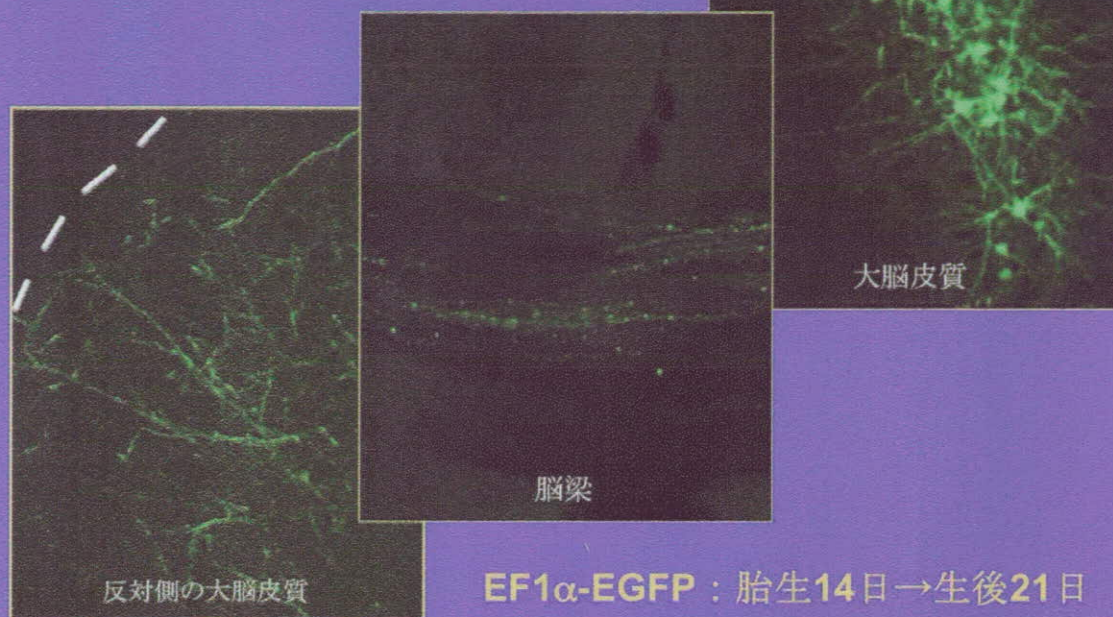


図2：子宮内胎児脳電気穿孔法による遺伝子導入

C. 研究の結果

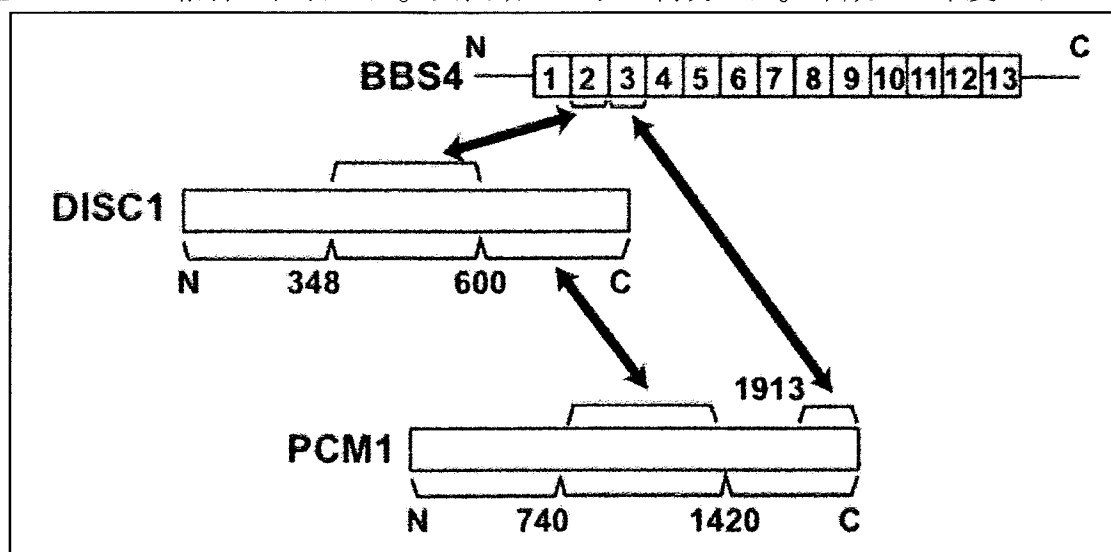
(1) 結合分子の同定

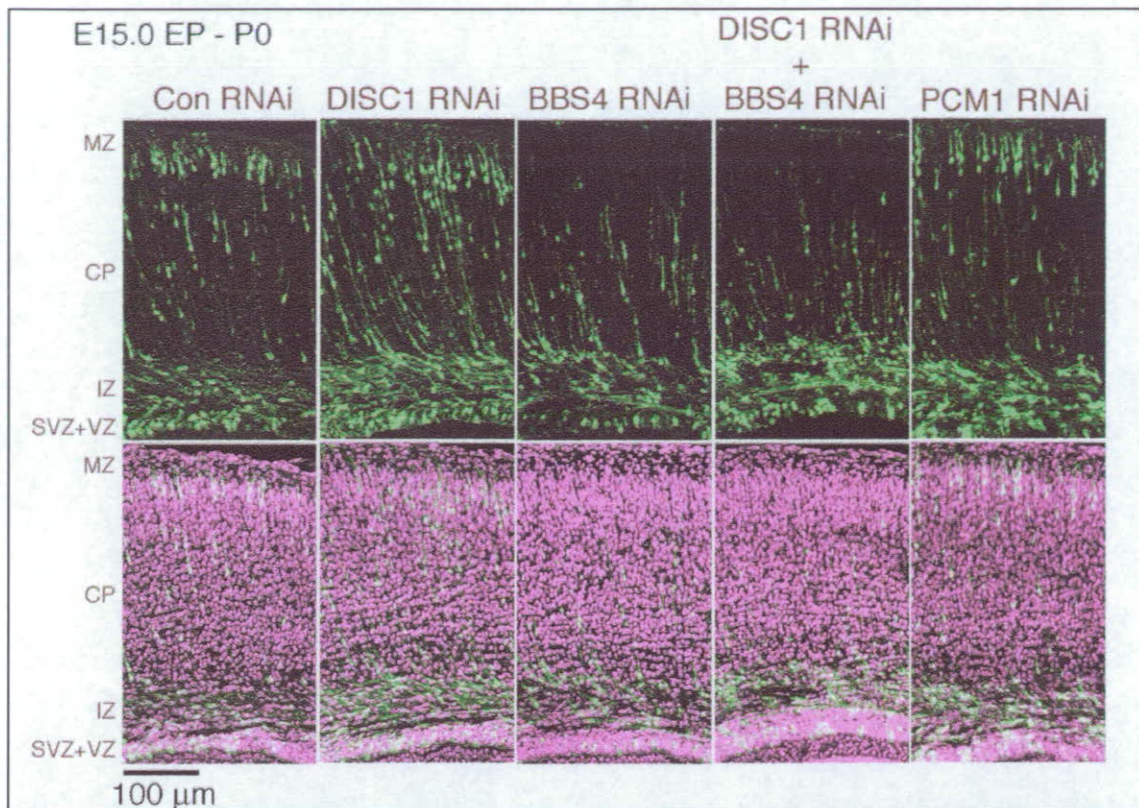
統合失調症候補分子 DISC1 の分子カスケードを明らかにすることを目的として、新たな結合分子の同定を試みた。

その際、DISC1 が脳の発生の初期において、細胞分裂や細胞移動に重要働きをもつ中心体 (centrosome) に局在を示すことに注目した。結合分子の候補として、やはり統合失調症および双極性感情障害に連鎖を示す pericentriolar material-1(PCM1) が中心体に存在すること、さらに DISC1 に結合する p150glued が Bardet-Biedl syndrome の原因遺伝子である Bardet-Biedl syndrome-4 protein (BBS4) に結合して PCM1 を中心体に運ぶことから、PCM1、BBS4 と DISC1 の結合に注目した。共同研

究を通じ、DISC1 が PCM1、BBS4 のいずれとも結合することが生化学的に判明したため、その機能的相関を調べるため、これらの分子に対する siRNA を用いて、脳の発生段階におけるこれらの分子の機能の解析を行った。当研究室で開発した子宮内胎児電気穿孔法を用いて、これらの分子に対する siRNA を発生中のマウス大脳皮質に導入し、それぞれの分子をノックダウンしたときの移動神経細胞への影響を観察したところ、ノックダウンにより、神経細胞の移動に遅れを生じることが判明した。しかも、DISC1 と BBS4 については、それらのノックダウンを同時に行うと、単独で行った場合よりもより大きな遅れが観察され、これらの分子が相補的に神経細胞移動に働いていることが機能的に証明された。

この結果、DISC1 の新たな結合分子が判明した。平成 20 年度において





は、新たな結合因子について解析を行うとともに、これらの結合分子の機能解析をさらに進める。その際、これらの分子が、抗精神病薬の標的分子とどのような相関を持つかに注目して、解析を行っていく。

これらの所見を共同研究者とともにまとめ、国際的精神医学専門誌である *Arch Gen Psychiatry* に投稿し、現在 revise 中である。

(2) 薬剤により調節を受ける部位の機能解析

向精神薬の多くは、細胞内において、細胞内セカンドメッセンジャーであ

る cAMP 濃度に変化を与え、プロテインキナーゼ A の機能を調節する。このプロテインキナーゼ A によって、DISC1 上のアミノ酸がリン酸化を受けることが判明した。このため、本研究では、標的のアミノ酸をアラニンに変化させることにより、この部位がリン酸化されていない状態を模倣すると考えられる DISC1 分子を遺伝子変異により作製した。この変異 DISC1 (mutant DISC1) と本来の DISC1 (intact DISC1) の機能を比較するため、子宮内胎児電気穿孔法を用いて、これらの分子のそれぞれを、DISC1 ノックダウンベクターとともに発生段階の脳内に導入した。この際、導入

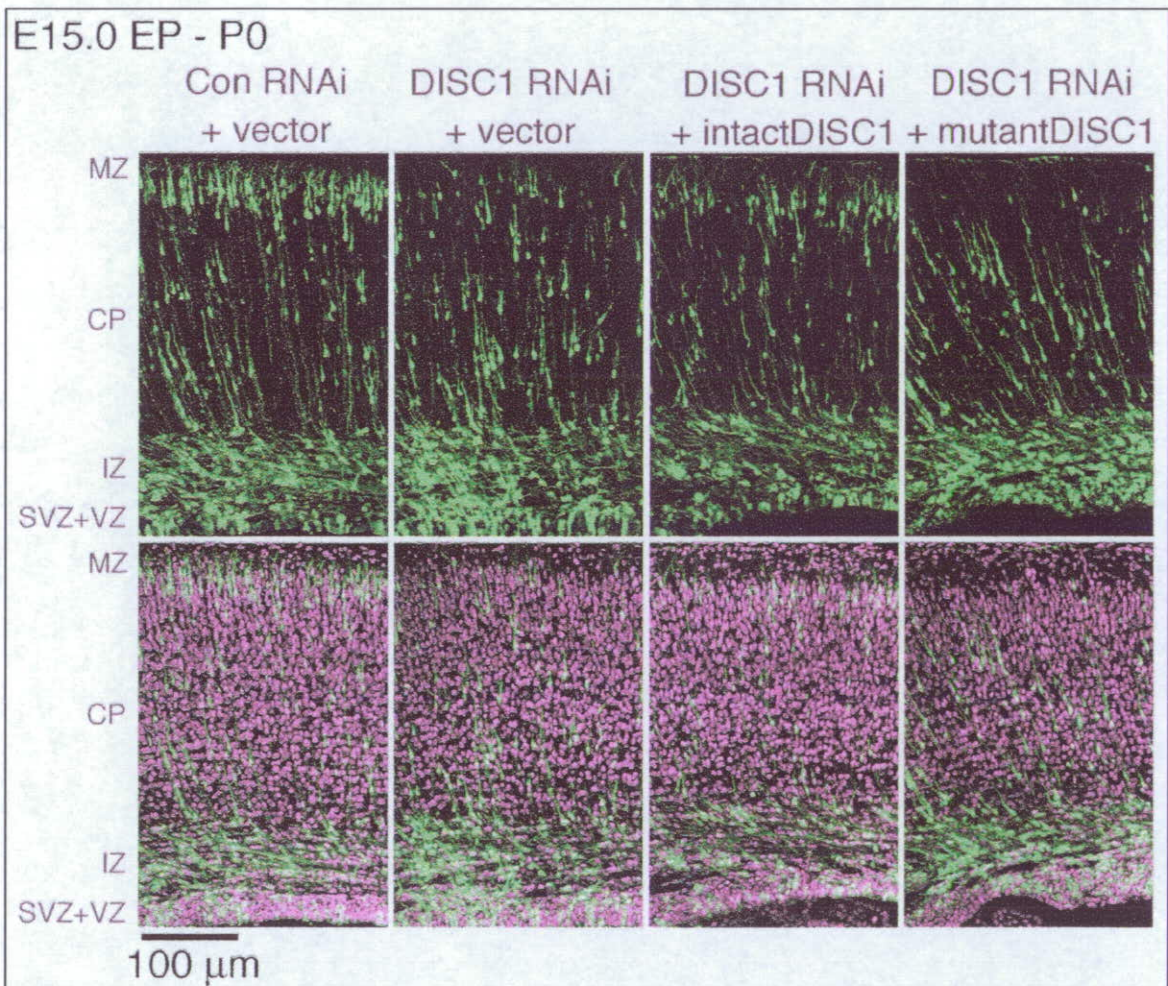
する DISC1 にはノックダウンベクターによるノックダウンを受けないように、アミノ酸配列を変化させない塩基置換を行っておいた。

その結果、本来の DISC1 (intact DISC1) は DISC1 のノックダウンを行う事による神経細胞移動の遅れを回復させるが、変異 DISC1 (mutant DISC1) はほとんど回復させることができなかった。これにより、プロテインキナーゼ A によるリン酸化が、DISC1 の機能に重要な役割を持っている事が判明した。

また、この結果は、向精神薬による

プロテインキナーゼ A の活性の調節により、DISC1 の機能もまた調節を受ける事を意味する。このため、向精神薬の薬理効果の少なくともその一部は、DISC1 の機能を調節することにより発揮される可能性もあると考えられ、DISC1 そのものが、薬剤ターゲット分子の一つである可能性が出てきた。

今後、DISC1 と相互作用する分子への影響を解析していく事により、向精神薬および抗精神病薬の薬理作用について新たな理解が得られる可能性がある。



D. 考察

本研究は、統合失調症の病態理解に役立てる事を目的として、統合失調症候補遺伝子 *DISC1* の機能を解析した。これまでに、*DISC1* に結合する分子として pericentriolar material-1(PCM1) および Bardet-Biedl syndrome-4 protein (BBS4) を同定し、機能的関連を証明した。また、*DISC1* 上の薬剤によって調節される部位であるアミノ酸配列を利用して、*DISC1* がどのように薬剤によって機能調節を受ける可能性があるのかを解析した。

今回報告した siRNA による機能阻害においては、その特異性についてもさらに検証していく必要がある。この問題に対しては、siRNA によって認識される核酸の配列に、アミノ酸配列は変化しないよう変異を入れた *DISC1* の cDNA を作成し、その cDNA を siRNA と同時に導入することによる形質の回復が起こるかどうかを検証する事により、siRNA の特異性を調べる。また、siRNA 以外に、dominant negative 体を中心とした多様な変異体を導入してその形質を観察する事で、siRNA による形質の妥当性についての検証が可能になる。

さらに、今回得られた結合分子については、*in vivo* における機能解析を行

っていく予定である。*in utero* electroporation 法を用いて結合する分子の constitutive active/dominant negative 体を発生中胎児脳に導入し、その機能を明らかにする。その際に、例えば、*DISC1* の機能阻害による形質が、constitutive active 体の導入により回復することが確かめられれば、その分子が *DISC1* と結合してその下流において機能している可能性が高くなる。

また、今回得られた結合分子以外についても、今後も *DISC1* と結合する因子についての探索をさらに進める必要がある。その際、*DISC1* 分子と相互作用する分子が当初の想定と異なり、まだ未発見の分子である可能性がある。この問題に対しては、共同研究を行っている澤明研究室で two-hybrid スクリーニングを行い、相互作用を行う分子の候補が未知の分子を含めてすでに多数見いだされている。今後も当面は神経細胞移動および神経細胞の極性決定に重要な分子を中心に相互作用を検討するが、候補分子が得られなかった場合は、それら未知の分子を含めて機能解析を行っていく。ただし、その場合でもの *in utero* electroporation 法を利用することにより、迅速に多数の遺伝子の機能解析を行う事が可能であると予想される。

本研究で用いる *in utero*

electroporation 法は所属研究室で開発され、現在特許出願中である。この手法は子宮内のマウス胎仔脳に任意の遺伝子を導入することができ、特にその高い解析効率（簡便かつ迅速）ですぐれている。当研究室で開発された事から、この手法に関して、トラブルシューティング・解析方法などの蓄積が得られているため、円滑な研究の遂行が期待される。

国内外で、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作製が行われると考えられるが、それらとは相補的な知見が得られると期待される。また、それらの実験系よりも、はるかに短期間のうちに多くの種類の解析を行うことができ、その上、全身でノックダウンした場合に致死となってしまうような遺伝子でも、時期及び部位特異的に遺伝子操作が行えることで、目的の時期・部位での機能の解析が容易である利点がある。

また、それらの遺伝子改変動物が作成されたとしても、本研究で用いる子宮内マウス胎児脳電気穿孔法を用いた手法においては、1) 周囲は正常な環境下で、遺伝子導入がなされた細胞においてのみ遺伝子のノックダウンが起こるため、cell-intrinsic な機能が明らかになりやすい、2) 発生の途中から、急激にノックダウンが起こるため、他の遺伝子発現の調節等による形質

の redundancy が起こりにくい、などの特徴がある。これらの特徴により、遺伝子機能がより明確になる可能性が期待される。

ところで、DISC1 は、発生中の脳において神経細胞移動や突起伸展等種々の側面で重要な役割を果たすことが判明しているが、これらの機能は、細胞極性の制御によって引き起こされる可能性がある。一方で、神経細胞の極性決定には、IGF-1 receptor → PI3K → Akt/GSK3β というシグナル伝達経路が関わるとされている。最近、分散培養等の *in vitro* の系を用いた解析により、軸索の極性を決定する候補分子が挙げられはじめ、とくに、IGF-1 receptor → PI3K → Akt/GSK3β というシグナル伝達経路が神経細胞の極性決定に関わる可能性が報告されている (Shi SH, DA, *et al.* Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*. 2003 Jan 10;112(1):63-75., Sosa L, *et al.* IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat Neurosci*. 2006 Aug;9(8):993-5. Epub 2006 Jul 16.)。非常に興味深いことに、これらのうち Akt/GSK3β は、代表的な抗精神病薬である haloperidol を投与した際にその活性化状態が変化する (Emamian ES, *et al.* Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in

schizophrenia. Nat Genet. 2004 Feb;36(2):131-7. Epub 2004 Jan 25.). Akt/GSK3 β は細胞移動においても重要な働きを持つ事が示唆されており、細胞移動と神経細胞の極性決定に共通にこれらの分子が関わっている可能性がある。このため、神経細胞の極性決定に重要なこれらの分子と DISC1 がどのように関連するのかに注目して解析を行っていく必要がある。

また、脳の発生過程におけるDISC1の機能は大腦皮質の神経細胞移動のみに留まらない可能性が高い。統合失調症の脳の病理所見として、これまでに死後脳を用いた研究から、シナプスの減少、海馬や辺縁系での組織異常 (Arnold SE, Trojanowski JQ. Recent advances in defining the neuropathology of schizophrenia. Acta Neuropathol (Berl). 1996 Sep;92(3):217-31)、大腦皮質でのGABAの減少 (Lewis DA *et al.* Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. Nat Rev Neurosci. 2005 Apr;6(4):312-24) など多彩な所見が報告されている。

それらの所見が、脳の「灰白質」の異常を示唆するのに対し、一方で、最近の画像研究を用いた解析により、統合失調症の患者脳において、灰白質同士、あるいは大腦灰白質と皮質下の構造を結びつける線維連絡の異常、すな

わち「白質」の異常が報告されはじめた (Walterfang M, *et al.* Neuropathological, neurogenetic and neuroimaging evidence for white matter pathology in schizophrenia. Neurosci Biobehav Rev. 2006 Mar 2)。この線維連絡の異常は、ブロイラーに統合失調症の基礎症状として提唱された「連合の障害・弛緩」を説明する生物学的基盤となる可能性がある点において極めて重要である。

しかし、これらの組織異常がどのような分子的・細胞的な病態にもとづいて起こっているのか、現在はまだ明らかではない。また、「灰白質」の異常と「白質」の異常がどのように関連しているのかも不明である。

本研究では線維連絡の異常に関しても、*in vitro* で神経軸索突起の方向性の決定に重要と考えられている Akt/GSK3 β と DISC1 の相互作用に注目して解析を進めていく予定であるが、それによって、実際の生体内すなわち *in vivo* で陰性症状の基盤となる分子異常が解明されることになれば、それらが薬物療法の新たな分子ターゲットとなる可能性がある。さらに、抗精神病薬によるそれらの分子への活性調節が明らかになれば、限りなく根治療法に近い薬理効果の解析を行うことができ、薬理効果の新たなパラメーターが得られる可能性につなが

るのではないかと期待している。

精神疾患、中でも統合失調症は、いまなお慢性の経過をたどることが多く、社会的な側面からも患者・家族の負担は大きい。このためその病因、病態の把握は急務である。統合失調症の脳の病理組織では、各脳領域に微細な組織構築の乱れがあると考えられている。これまで、これらの形態・組織構築の異常がどのような分子異常に基づいて起こるのか不明であったが、近年の家系を用いた連鎖解析から、*DISC1* をはじめとする統合失調症の有力な候補遺伝子が見いだされてきている。一般的には、大部分の精神疾患は単一の遺伝子によって引き起こされるのではなく、多因子性の複雑遺伝疾患であると予想される。しかし、アルツハイマー病などの神経変性疾患に関する研究の進展もまれな家族例からの遺伝子の発見を契機としており、こうした候補遺伝子に立脚した病態研究から多くの知見が得られると期待され、*DISC1* の解析を手がかりとして、統合失調症の生物学的研究および病態理解を進めていきたいと考えている。今後、抗精神病薬の標的カスケードにも着目することで、*DISC1* とそのカスケードの直接的関係を明らかにして、統合失調症における特に陰性症状が抗精神病薬によっ

て改善する機構の一端を解明し、さらには抗精神病薬の新たな標的分子の発見、創薬に貢献につなげていきたい。

E. 結語

これまでに、*DISC1* に結合する分子として pericentriolar material-1(PCM1) および Bardet-Biedl syndrome-4 protein (BBS4)を同定した。また、*DISC1* 上の薬剤によって調節される部位であるアミノ酸配列を利用して、*DISC1* がどのように薬剤によって機能調節を受ける可能性があるのかを解析した。

今後、現在の解析を進めるとともに、発見された結合分子の機能解析をさらに進める。加えて、新たな結合因子についても検索を進める。現在までに *DISC1* それ自体が向精神病薬によって活性を調節される可能性が出てきたが、すでに知られている抗精神病薬の標的カスケードとの関連に着目し、向精神病薬・抗精神病薬の薬理作用について解明を行っていく。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

学会発表

Ken-ichiro Kubo, Atsushi Kamiya, Akira Sawa, and Kazunori Nakajima “The analysis of the role of DISC1 in the neuronal migration of the neocortex in vivo” Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, CA, U.S.A., 2007年11月3-7日

久保健一郎、神谷篤、澤明、仲嶋一範 “新皮質の形成において DISC1 が果たす役割の解析”第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2007)、横浜、2007年9月10-12日

久保健一郎、神谷篤、澤明、仲嶋一範 “大脳皮質神経細胞移動における DISC1 の役割の解析”第112回日本解剖学会全国学術集会、大阪、2007年3月

現在投稿中の論文

PCM1 is recruited to the centrosome by the cooperative action of DISC1 and BBS4 and is a candidate for psychiatric illness

Atsushi Kamiya, Perciliz L. Tan, Ken-ichiro Kubo, Caitlin Engelhard, Koko Ishizuka, Akiharu Kubo, Sachiko Tsukita, Ann E. Pulver, Kazunori Nakajima, Nicola G. Cascella, Nicholas Katsanis, Akira Sawa

(*Arch Gen Psychiatry* に revise 中)

H. 知的財産権の出願・登録情報

特記すべきことなし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌：現在 revise 中

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 |
|--|--|--|
| (Atsushi Kamiya, Perciliz L. Tan, <u>Ken-ichiro Kubo</u> , Caitlin Engelhard, Koko Ishizuka, Akiharu Kubo, Sachiko Tsukita, Ann E. Pulver, Kazunori Nakajima, Nicola G. Cascella, Nicholas Katsanis, Akira Sawa) | (PCMI is recruited to the centrosome by the cooperative action of DISC1 and BBS4 and is a candidate for psychiatric illness) | <i>(Arch Gen Psychiatry</i> に revise 中) |