

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 久保 健一郎

平成22（2010）年5月

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 久保 健一郎

平成22(2010)年5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

----- 3

久保 健一郎

II. 分担研究報告

GABA 作動性神経細胞の移植に夜治療戦略の構築

----- 16

田中 大介

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 21

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 22

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）

研究代表者 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と治療戦略の構築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。本研究では、発生中マウス胎児脳前頭皮質における *DISC1* に対するノックダウンを子宮内胎児電気穿孔法を用いて行い、その成熟後の行動を解析した。その結果、発生中マウス胎児脳前頭皮質における錐体細胞特異的な *DISC1* に対するノックダウンは、成熟後の中脳皮質ドーパミン経路の成熟の異常と思春期以後の行動異常に結びつくことが判明した。この結果、発生段階における神経細胞での分子的な異常が成熟後の行動異常に結びつく可能性が示された。

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

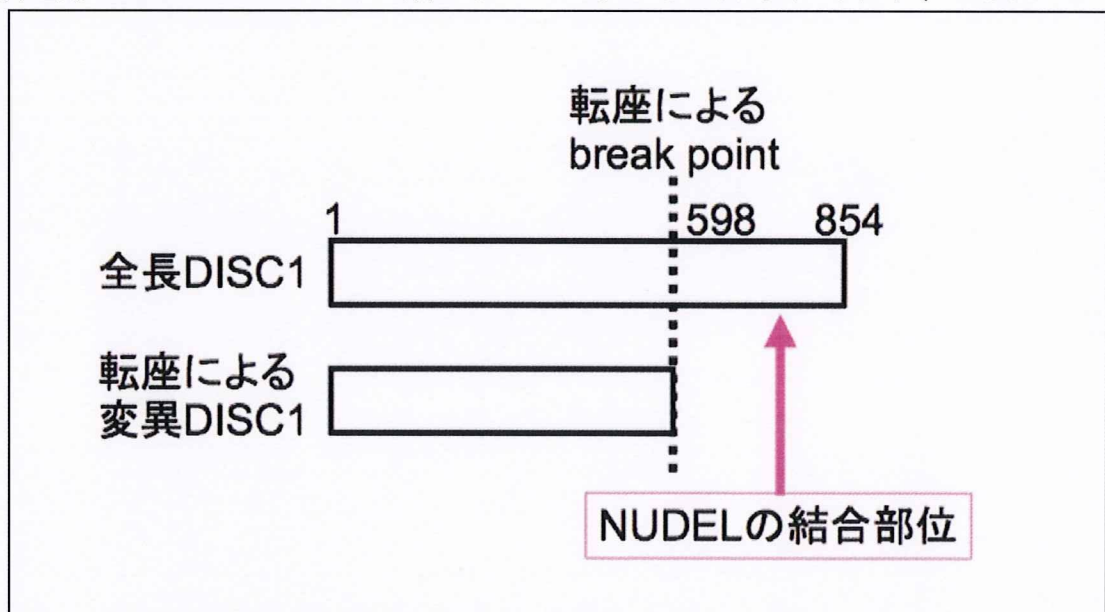
Apr;122 (Pt 4):593-624)。

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(上図)(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

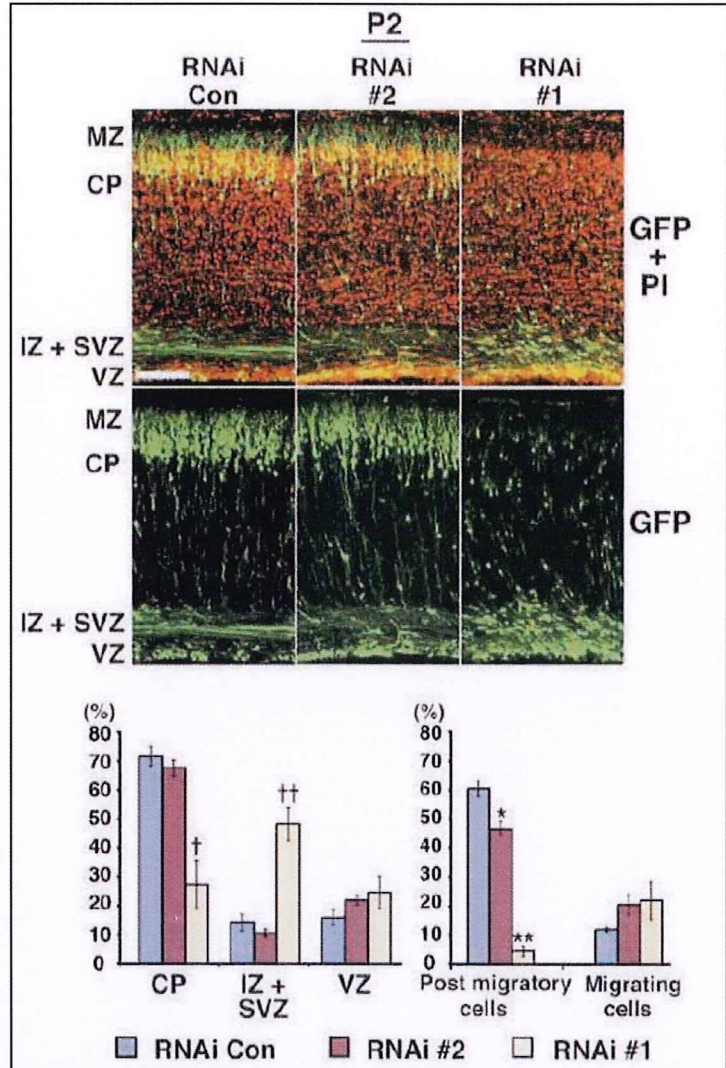
なる蛋白質をコードするが、転座によってC末の 257 アミノ酸が失われると高率で精神疾患に罹患する。共同研究者である澤らは、マウスの *DISC1* ホモログをクローニングした後、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、*DISC1* と結合する可能性のある蛋白質を検索した(Ozeki Y *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):289-94)。その結果、C末端 254 アミノ酸と結合する候補として、*NUDEL* が得られた(上図)。

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、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（下図上右パネル、RNAi#1）。効果の弱い siRNA を導入した場合（下図上右パネル、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かった（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



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。

さらに、本研究においては前頭前野に対する部位特異的な遺伝子導入法を開発し、遺伝子導入されたマウス脳組織を生後に解析し、どのような神経組織構築の異常が生じているのかを解析した。また、成熟後のマウス行動を解析し、発生段階の分子的異常が成熟後に与える影響の解析を行った。

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が期待された。

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

(倫理面への配慮)

本研究計画における組換え DNA 実験及び動物実験については、文部科学省及び学内の実験指針に従い申請書を提出し承認を得たのち、その指針に基づいて行った。

(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 (ミリボア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)
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	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10 g 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。

C. 研究の結果

(1) 子宮内胎児電気穿孔法による前頭前野特異的な遺伝子導入法の開発

子宮内胎児電気穿孔法の前頭前皮質特異的な遺伝子発現調節への有効性を調べるために、まず緑色蛍光蛋白質 (GFP) を胎生 14 日目のマウスの両側の側脳室に注入して電気穿孔法を行った。生後 56 日目にこの脳を解析すると、GFP 陽性細胞が背外側前頭前皮質 dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC)、正中前頭前皮質 medial prefrontal cortex (mPFC)、眼窩前前頭前皮質 orbitofrontal cortex (OFC)、前帯状回皮質 anterior cingulate cortex に分布しているのが分かった。このため、この方法が前頭前皮質特異的な遺伝子導入に用いることが分かった。マーカーを用いて染色すると、この方法では興奮性の錐体細胞に遺伝子導入されており、抑制性神経細胞やグリアには遺伝子導入されていなかった。

(2) DISC1 ノックダウンによる神経細胞突起の異常

次に、開発された遺伝子導入法を用いて、DISC1 のノックダウンベクタ

一の導入を行った。同時に緑色蛍光蛋白質 (GFP) の導入を行い、遺伝子導入された神経細胞の形態を観察した。すると、生後 14 日目において、遺伝子導入された神経細胞は樹状突起の形態が貧弱であった。この所見は電気生理学的方法でも確認され、神経細胞膜のキャパシタンスが低下していた。これは膜の総量が減っていることを示し、突起の発達が乏しいことが裏付けられた。

(3) DISC1 ノックダウンマウスにおける中脳皮質ドーパミン投射の異常

DISC1 のノックダウンベクターを胎生期に導入したマウスの体重を生後 14 日、28 日、56 日後に調べた。ノックダウンしたマウスとコントロールのマウスでは、体重に差を認めなかった。

それに対し、マイクロダイアリシス法を用いて測定した前頭前皮質の細胞外のドーパミンの量は、ノックダウンしたマウスで 56 日後に著明に減少していたが、28 日後では変化を認めなかった。グルタミン酸、ノルエピネフリン、セロトニンではそのような変化を認めなかったため、この変化はドーパミン特異的なものであると考えられた。出生以降のドーパミン量の

増加はドーパミン投射の増加を反映していると考えられるため、ノックダウンしたマウスで生後56日後にドーパミンが減少しているのはドーパミン作動性神経の成熟に異常があるのではないかと考えられた。この所見と一致して、生後56日後のノックダウンしたマウスでは Tyrosine Hydroxylase (TH)の免疫染色反応が低下していた。

ドーパミン作動性神経は GABA 作動性抑制性神経細胞にもシナプス接合を行うため、この異常なドーパミン投射はドーパミン作動性神経に影響を与えている可能性もあった。このため、parvalbumin (PV)の免疫染色を用いて PV の発現レベルを調べた。すると生後56日後のノックダウンしたマウスでは PV の免疫染色反応が低下していた。

(4) DISC1 ノックダウンマウスにおける行動異常

このような神経化学的な異常所見が、マウスの行動にどのような影響を与えるかを観察するため、Prepulse Inhibition (PPI)法を用いて sensory gating 機能を測定した。これは皮質の情報処理の主要な指標とされる。コントロールのマウスに比較すると、DISC1 ノックダウンマウスは生後5

6日目において PPI の減弱を示した。しかも、この PPI の減弱はクロザピンの投与によって回復した。そのとき、細胞外のドーパミン量はクロザピンの投与によって正常化していた。また、メタアンフェタミン投与は生後56日後のノックダウンマウスにおいて過敏な反応を示した。またその時の細胞外のドーパミン量はむしろ上昇していることが観察され、ドーパミンに関連した行動異常が励起されていることをさらに裏付ける結果となった。

D. 考察

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。子宮内胎児電気穿孔法を用いた前頭前野への部位特異的な遺伝子導入法を確立し、それと siRNA 技術を組み合わせることで、簡単に部位特異的な遺伝子機能調節が可能になった。これまでのノックアウトマウスでの解析に比べてはるかに容易に遺伝子の機能調節が可能になったことで、特定の脳部位での遺伝子機能を解析するうえで重要な研究手法が得られた。

さらに本研究では、特定の脳部位での遺伝子機能が成熟後の行動に与える影響にまで踏み込むことができた。本研究で用いた子宮内胎児電気穿孔

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。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たと考えられる。この方法は、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、本研究で用いた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、本研究の手法を応用していくことで、遺伝子機能がより明確になる可能性が期待される。

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)、大脳皮質での 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。今回、我々は子宮内胎児電気穿孔法を用いた前頭前野への部位特異的な遺伝子導入法を確立したが、その結果、前頭前野における parvalbumin 陽性の GABA 作動性抑制性神経細胞の減少が観察された。統合失調症の病理仮説として、長年ドーパミン仮説が有力であったが、死後脳の病理所見からは、前頭葉や海馬の抑制性 GABA 作動性神経細胞の機能低下が指摘されている (Lewis DA, *et al.*, *Nat Rev Neurosci.* 2005 Apr;6(4):312-24.)。GABA を介した興奮性神経細胞の抑制の不全は統合失調症における認知機能低下の要因とも考えられている (Daskalakis ZJ, *et al.*, *Brain Res Rev.* 2007 Dec;56(2):427-42.)ため、本研究をさらに発展させることにより、統合失調症における認知機能低下の病態理解

に有用であることが期待される。また、研究分担者である田中が示すように（分担研究報告書参照）、GABA 作動性抑制性神経細胞は生後も高い移動能を保ち、細胞補充療法のよいツールとして注目されているため、今後これらの細胞における病態が明らかになれば、たとえば成体において抑制性神経細胞の発生分化や移動・配置を調節するような化合物が治療薬となりうる可能性がある。

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。本研究の結果、*DISC1* の機能異常によって生じる分子病態・神経病態の解明については、その機能異常が与える様々な影響が明らかになった。また発生過程における分子的異常が、成熟後のマウスに統合失調様の行動異常を引き起こすことが明らかになり、これまで不明であった統合失調症発症の分子の実体を提示することができた。

これは、方法論的な意義が大きいのみならず、病態理解の上で重要であると考えられる。本研究で標的とした前頭前野は、統合失調症における認知機能障害の重要な責任部位であると考えられる。この認知機能障害は日常生活機能の障害につながり、社会復帰から自殺企図までを含めた社会予後全般と深く関わりとされる。このため、この認知機能障害の病態を理解し、それに対する治療戦略を得ることは、社会的入院を減らし、自殺件数を減少させることにもつながるため、行政的な意義も大きいと考えられる。

E. 結語

本研究の結果、発生段階における分子的異常が神経細胞の発生・発達に障害を及ぼし、成熟後の統合失調症発症を準備する可能性が示唆された。また本研究で開発されたマウスモデルは、統合失調症における認知機能低下の病態理解および治療戦略の構築に有用であることが期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

発表論文

Minae Niwa, Atsushi Kamiya, Rina Murai, Ken-ichiro Kubo, Aaron J Gruber, Kenji Tomita, Lingling Lu, Shuta Tomisato, Hanna Jaaro-Peled, Saurav Seshadri, Hideki Hiyama, Beverly Huang, Kazuhisa Kohda, Yukihiro Noda, Patricio O'Donnell, Kazunori Nakajima, Akira Sawa, and Toshitaka Nabeshima.
Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *Neuron*, 65 (4), 480-489 (2010).

学会発表

Ishizuka K., Kamiya A., Oh E., Robinson J., Mitsuma N., Furukori K., Seshadri S., Huang B., Kubo K., Nakajima K., Katsanis N., Sawa A.
“Phosphorylation of DISC1 activates a molecular switch from cell proliferation to neuronal migration in the developing cortex” Society for Neuroscience, Neuroscience 2009 Meeting (39th Annual Meeting), Chicago, U.S.A., 2009.10.17-21

丹羽美苗、神谷篤、村井里菜、久保健一郎、Hanna Jaaro-Peled、陸玲玲、尾崎紀夫、仲嶋一範、野田幸裕、澤明、鍋島俊隆“発生期大脳皮質における Disrupted-in-Schizophrenia-1 の発現異常はドパミン作動性神経系機能異常を伴う精神疾患表現型を発現する (Disturbance of Disrupted-in-Schizophrenia-1 during neurodevelopment develops phenotypes of psychiatric disorders related to dysfunction of the dopaminergic system)”シンポジウム：“統合失調症”第32回日本神経科学大会、名古屋、2009年9月16-18日

H. 知的財産権の出願・登録情報 特記すべきことなし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告

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）

研究分担者 慶應義塾大学医学部解剖学
田中 大介

研究要旨

認知機能障害は統合失調症患者の85%に認められ、患者が直面する生活障害の主要な背景をなす。現在、統合失調症認知機能障害を著明に改善する治療法はなく、薬物療法に代わる新たな治療法の開発が希求されている。本研究は、「GABA作動性神経細胞(GABA細胞)を前頭葉に移植することで、副作用を引き起こさずに統合失調症認知機能障害を予防・治療できるのではないか」という仮説を立て、これを検証することを目的に本研究を行った。

A. 研究目的

精神神経疾患の一つである統合失調症の症状は、陽性症状と陰性症状、認知機能障害の3つに大別される。これらのうち、認知機能障害は統合失調症患者の85%に認められ、患者が直面する生活障害の主要な背景をなす。現在、統合失調症認知機能障害の治療には抗精神病薬による薬物療法が行われているが、注意持続や感覚処理など比較的単純な障害は改善する一方で、記憶や実行、思考、判断などの複雑な認知機能の一部はやや悪化することが

報告されており、薬物療法に代わる新たな治療法の開発が希求されている。

薬物療法において副作用として脳機能の一部が悪化してしまうことの原因は、投与された薬物の影響が標的としている脳領域以外にも及ぶためである可能性が高く、副作用を低減させるためには治療標的としている脳機能が担われている脳領域を特異的に治療することが必要であると考えられる。

統合失調症患者で障害されている認知機能の多くは、前頭葉皮質との関連が深い。患者の前頭葉では血流低下

や代謝低下が確認されており、また正常ではみられる認知刺激での血流増加がみられないことより、この部位の機能低下が指摘されている。興味深いことに、統合失調症死後前頭葉ではγ-アミノ酪酸(GABA)の低下や GABA 生合成に関わるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の低下が報告されており、前頭葉 GABA 機能の低下が統合失調症の病因となっている可能性が指摘されている (Lewis et al., *Nat. Rev. Neurosci.*, 2005)。

これらの報告に基づき、我々は「GABA 作動性神経細胞(GABA 細胞)を前頭葉に移植することで、副作用を引き起こさずに統合失調症認知機能障害を予防・治療できるのではないか」という仮説を立て、これを検証することを目的に本研究を行った。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

本研究計画における組換え DNA 実験及び動物実験については、文部科学省及び学内の実験指針に従い申請書を提出し承認を得たのち、その指針に基づいて行った。

(抑制性神経細胞の前頭前野への移植)

発生中の基底核原基 (MGE) を取り出して、大脳皮質前頭前野への移植を

行った。その後、PCP を投与して行動解析を行い、PCP が誘導する行動異常が軽減されるかどうかを解析する。

C. 研究結果

上記仮説の検証に向けて、まず始めに統合失調症モデルマウスにおいて GABA 細胞の前頭皮質への移植による認知機能障害の発症予防効果を検証することにした。統合失調症モデルマウスとしては非競合的 NMDA 受容体アンタゴニストであるフェンサイクリジン(Phencyclidine: PCP)を急性投与したマウスを用いた。PCP は、ヒトにおいて統合失調症の主要な 3 つの症状全て、すなわち陽性症状と陰性症状、認知機能障害と類似した行動を引き起こすことが知られており (Javitt and Zukin, *Am J Psychiatry*, 1991)、またサルやマウスなどの実験動物においても、認知機能障害を含む統合失調症様の症状が再現されることが知られている。実験を始めるにあたりまず、マウス新生仔内側前頭皮質へ、多くの大脳皮質 GABA 細胞を産生することが知られているマウス胎仔内側基底核原基(Medial ganglionic eminence: MGE)細胞を移植し、移植後 3 ヶ月目に GABA 細胞が生着していることを確かめた(図 1)。今後、次に移植細胞の、認知機能障害に対する予防効果を

検証するために、移植後 1.5 ヶ月目に PCP を急性投与し、認知機能を計測するテストを行う。

D. 考察

細胞移植による神経疾患の治療はこれまで特にパーキンソン病や脊髄損傷において採用され一定の成果を上げているが、統合失調症に対する予防および治療を目的とした細胞移植の研究は実験モデル動物での基礎研究も含め全く報告がない。本研究がおそらく統合失調症に対する予防および治療戦略として最初の事例であり、極めて独自性の高いアプローチを考案できたと考えている。

本研究の提示した予防・再発予防策である細胞補充療法は、本研究のような動物を対象とした基礎的な研究でしか検証のできない全く新しい手法である。それをそのまま実際の治療での実行に移す可能性は低い、「(特定の性質の) 神経細胞を増やすこと (あるいは、そのような刺激を加えること) が統合失調症予防 (あるいは再発予防) ・治療に有効か否か」という命題に対して一つの答えを与えるものである。抗うつ薬が脳内の神経細胞新生を増加させるという知見が集まりつつあるが、「どのような神経細胞をどこで増加させる必要があるか」など、

より焦点をしばった研究開発に結びつく可能性がある点で意義があると考えている。

また、この細胞補充療法は、研究開発の方向性に新たなヒントを与える上で重要である。現在手詰まりとなっている新規薬剤開発の新たな方向性を見いだすうえでも、あるいは全く新しい治療方法を開発するうえでも、その一助となることが期待される。現時点では想像しにくいだが、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) に関する研究と結びついて画期的な治療法を生み出す可能性も否定できない。その場合、我が国で発見され、世界に先駆けてその実用化を進めることが国家戦略となっている、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作成技術を精神神経科領域で応用する上での道標となる可能性がある。

E. 結語

「GABA 作動性神経細胞 (GABA 細胞) を前頭葉に移植することで、統合失調症認知機能障害を予防・治療できる可能性があるか」という仮説を立て、これを検証した。

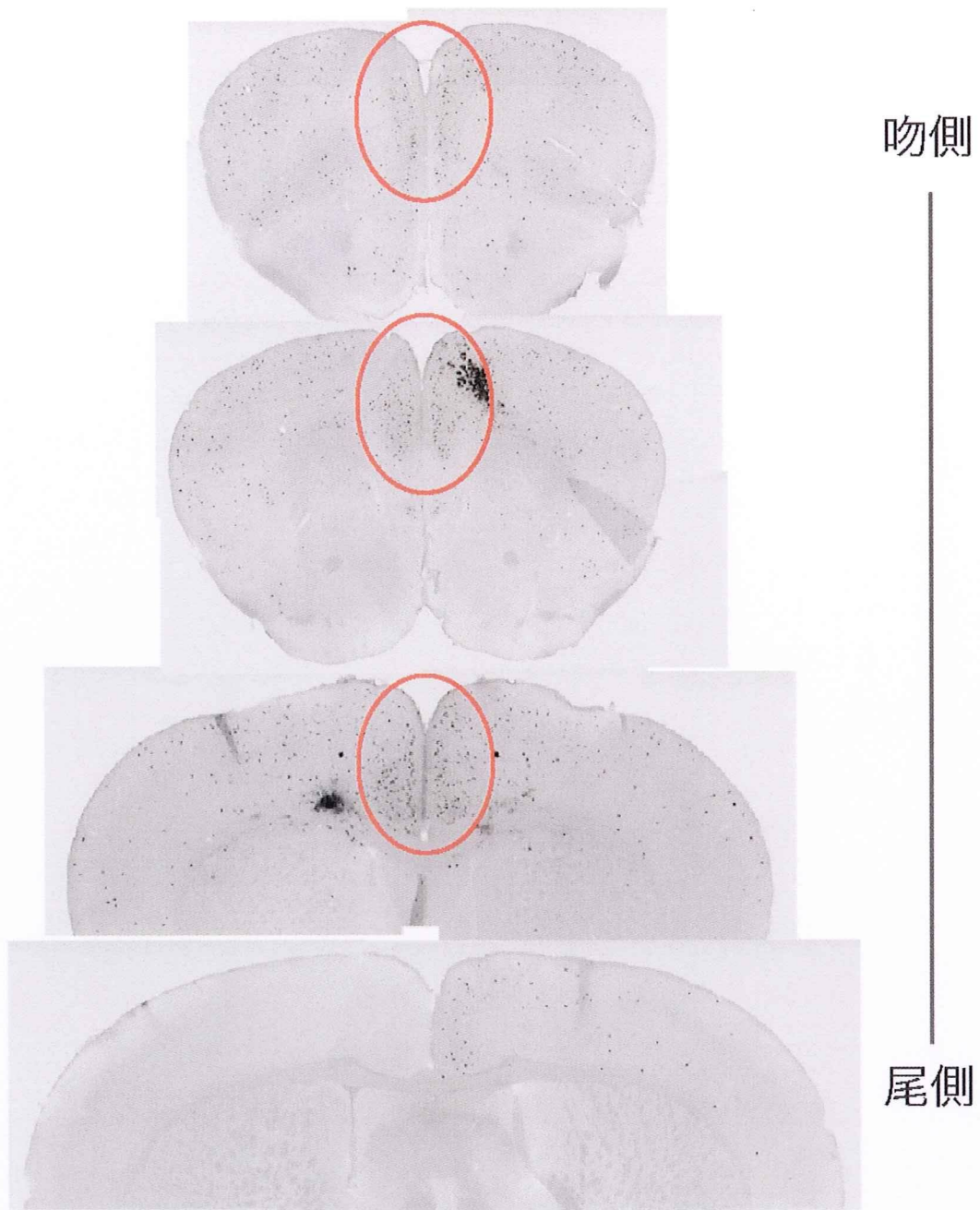


図1. マウス新生仔内側前頭皮質への移植から
3ヶ月後の移植細胞(黒点)の分布(冠状断)
内側前頭皮質(赤○領域)に多くの細胞が生着している