

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月27日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19753

研究課題名(和文)統合失調症患者における脳内コンドロイチン硫酸鎖とペリニューロナルネットの変化

研究課題名(英文) Pathological alterations of chondroitin sulfate moiety and perineuronal net in postmortem brain of patients with schizophrenia

研究代表者

湯川 尊行 (Yukawa, Takayuki)

新潟大学・医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40761151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症と脳内コンドロイチン硫酸鎖の関連を解明するため、統合失調症患者と正常対照者の死後脳組織を対象として、前頭前野、海馬、尾状核の各脳部位について発現変化をウエスタンブロット法を用いて解析した。結果として、海馬領域における一部のコンドロイチン硫酸鎖に変化を見出した。さらに、変化が認められた脳部位について、抗精神病薬を慢性投与されたラットの死後脳サンプルを用いて薬剤の影響を検討し、検出された変化が疾患に関連した変化である可能性が高いことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Perineuronal nets comprise chondroitin sulfate moieties and their core proteins, and their neuropathological alterations have been implicated in schizophrenia. To explore the molecular mechanism of the perineuronal net impairments in schizophrenia, we measured the immunoreactivity of chondroitin sulfate moieties, major components of perineuronal nets, in three brain regions (postmortem dorsoprefrontal cortex, caudate nucleus, and hippocampus) of schizophrenia patients and control subjects. Immunoblotting for chondroitin 4-sulfate moiety revealed a significant increase in intensity of a 180 kDa band of chondroitin 4-sulfate immunoreactivity in the hippocampus of patients. The results suggest that the level alteration of the chondroitin 4-sulfate moiety might contribute to the perineuronal net abnormality found in patients with schizophrenia.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 死後脳 海馬 ペリニューロナルネット コンドロイチン硫酸プロテオグリカン コンドロイチン硫酸鎖

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、幻覚、妄想、まとまらない言動などによって特徴づけられる精神症候学的に定義される精神疾患である。統合失調症を生物学的に定義づける脳病理学的所見は未だ見つかっていないが、近年、chondroitin sulfate (CS) 鎖を検出する染色法である wisteria floribunda agglutinin (WFA)染色や、CS 鎖に対する抗体を用いた免疫組織化学染色で、統合失調症患者と正常対照者の死後脳の染色性に差異があるという報告が相次いでいる(Pantazopoulos H et al., 2010; Mauney SA et al., 2013; Pantazopoulos H et al., 2015)。

WFA で染色される神経細胞、その中でも特にパルプアルブミン陽性抑制性 GABA 神経細胞(PV ニューロン)の細胞体や軸索周囲に発達している網状の構造はペリニューロナルネット(perineuronal net:PNN)と呼ばれ、統合失調症をはじめとした精神疾患との関わりが注目されている(Berretta S et al., 2014; Bitanihirwe BK, Woo TU., 2014)。PNN は神経の保護・栄養、可塑性の制御など様々な働きを有すると考えられており、動物実験を用いた検討からは、PNN の酵素的な分解が、PV ニューロンの酸化ストレスに対する脆弱性(Cabungcal JH et al., 2013)や統合失調症様のドパミン神経系の異常を惹起すること(Shah A, Lodge DJ., 2013)も示されている。CSPG の発現は、EGF、TGF- β などのサイトカインにより調節されていることが示されている(Smith GM, Strunz C., 2005)が、これらのサイトカインは統合失調症との関連が報告されている(Watanabe Y et al., 2010)。統合失調症患者において、PV ニューロンの機能低下が、生理学的研究や死後脳研究から繰り返し報告されていること(Lewis DA et al., 2005)も、PNN の異常と統合失調症の病態生理の関連を示唆する知見である。

CS 鎖は、2 糖の繰り返し構造をとり、コアタンパクに共有結合した chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG)のかたちで、脳内の細胞外基質に多く存在する。CSPG はコアタンパクの違いにより多くの種類が存在する。また、CS 鎖は N-アセチルガラクトサミンへの硫酸基の結合部位の違いにより、主に 4-硫酸化コンドロチン(C4S)と 6-硫酸化コンドロイチン(C6S)に分けられる。C4S と C6S は発達に伴い、その発現量が拮抗的に変化し、可塑性の制御に重要な働きを担っていることが示されている(Miyata S et al., 2012)。

申請者は、これらの知見から、統合失調症の病態生理に C4S、C6S の量的な異常が関与している可能性が高いと考え、本研究の着想に至ったものである。

2. 研究の目的

本研究では、統合失調症の病態生理と脳内 CS 鎖、PNN の関連を解明するため、統合失調

症患者死後脳の前頭前野、尾状核、海馬の各領域における CS 鎖の発現変化を明らかにし、さらに、変化が認められた部位に関して、抗精神病薬を慢性投与されたラットの脳組織サンプルを用いて、薬剤の影響を検討し、検出された変化が疾患に関連する変化であることを確認することを目的とする。

3. 研究の方法

統合失調症患者と正常対照者の死後脳を対象として、C4S および C6S の発現変化が、前頭前野、海馬、尾状核領域において存在するかどうかを確認するために、ウエスタンブロット法を用いて解析した。

新潟大学医学部精神医学分野およびその関連病院、新潟大学脳研究所分子神経生物学分野、新潟大学脳研究所病理学分野、福島県立医科大学医学部神経精神医学講座、東京都立松沢病院精神科の協力を得て対象サンプルを収集した。

統合失調症患者 36 例と正常対照者 26 例を対象とし、統合失調症との関連がしばしば報告されている 3 つの脳領域、前頭前野、尾状核、海馬の凍結死後脳組織(それぞれ患者群 n=21, 18, 18、対照群 n = 19, 15, 9)の C4S と C6S の免疫反応性を計測した。

凍結死後脳組織から Triton-X-100 含有バッファーを用いてタンパク溶解液を調製し、Micro BCA 法でタンパク濃度を測定した。タンパク溶解液は、抗原基を露出するために、コンドロイチナーゼ ABC(Chase)で酵素処理した。

C4S、C6S に対するモノクローナル抗体を使用し免疫反応性をウエスタンブロット法で化学発光により検出し、シグナル強度を CCD カメラシステムにより測定し、半定量解析を行った。得られたシグナル強度の値は、組織量を反映すると考えられる glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)をローディングコントロールとして用い標準化を行った。

抗精神病薬(ハロペリドール)を 1 年間投与したラットを用いて、C4S および C6S の発現を上述の方法で解析しヒト死後脳のデータと比較検討した。

4. 研究成果

結果として統合失調症患者の海馬領域における一部の C4S に変化を見出した。さらに、変化が認められた脳部位について、抗精神病薬を慢性投与されたラットの死後脳サンプルを用いて薬剤の影響を検討し、検出された変化が疾患に関連した変化である可能性が高いことを確認した。

CSPG はコアタンパクの多様性のため、多くの種類があるため、複数のバンドが検出された(図 1. A)。

今回我々がウエスタンブロット法による解析を行った 3 つの脳領域のうち、前頭前野と尾状核においては、患者群と正常対照群の

間に C4S と C6S の免疫反応性の有意差は認められなかった。海馬の C6S においても有意差は認められなかった。一方、統合失調症患者群の海馬において、検出された複数の C4S のバンドのうち、180kD のバンドの免疫反応性の有意な増加が認められた (図 1. B, C)。

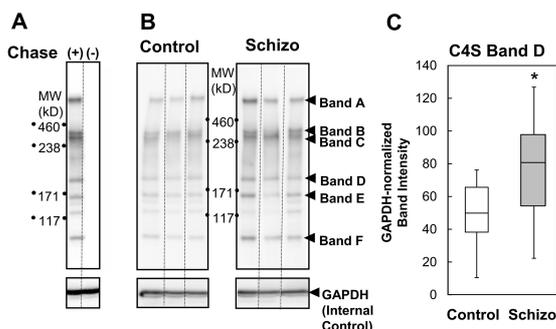


図 1.

- A. ヒト海馬組織からタンパク溶解液を調製し、抗原露出のためにコンドロイチナーゼ ABC (Chase) で酵素処理し、C4S に対するモノクローナル抗体で検出した。ローディングコントロールとして GAPDH を用いた
- B. 正常対照者と統合失調症患者の海馬領域 C4S のウエスタンブロット
- C. 統合失調症患者の海馬領域 C4S の 180kDa のバンドに免疫反応性の有意な増加が認められた

死後経過時間と冷凍保存期間の有意差が前頭前野と海馬領域の 2 群間で認められた。しかし、海馬の C4S の 180kDa のバンドの免疫反応性とそれらの指標との間に相関関係はなかった (図 2)。

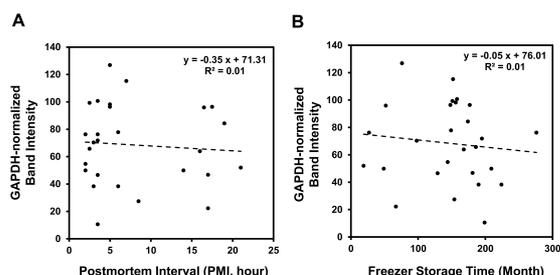


図 2.

- A. 死後経過時間とシグナル強度との相関
- B. 冷凍保存期間とシグナル強度との相関

コンドロイチン硫酸鎖の変化と統合失調症の関連が示されても、抗精神病薬がコンドロイチン硫酸鎖の異常に潜在的に影響を与えている可能性がある。

本研究においては抗精神病薬の影響についても検討した。抗精神病薬の影響を評価するために、ハロペリドールを 1 年間成体ラットに投与した。C4S の免疫反応性が、これらのラットと対照ラットの海馬領域で計測された。ハロペリドール投与群の C4S 免疫反応

性はむしろ低下しており、本研究において示された統合失調症患者の海馬領域の C4S の免疫反応性の変化は、疾患に関連した変化である可能性が大きいことが示唆された (図 3)。

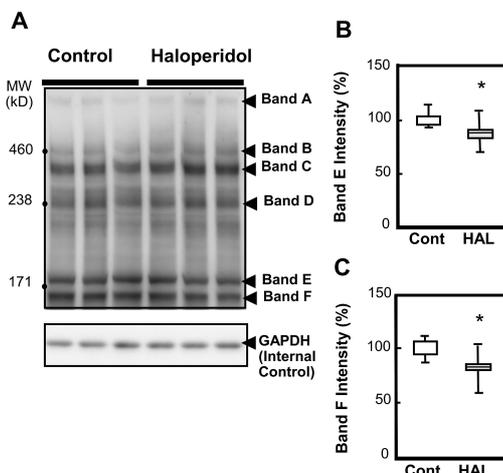


図 3. ハロペリドール投与群と対照群のラット海馬領域 C4S のウエスタンブロット

海馬は、統合失調症の病理との関連が度々論じられてきた脳領域である (Benes et al, 2007; Harrison and Eastwood, 2001; Heckers and Konradi, 2015; Knable et al, 2004; Konradi et al, 2011; Shah and Lodge, 2013; Tamminga et al, 2010)。統合失調症患者において、海馬の PV ニューロンの神経化学的、電気生理学的異常が繰り返し報告されている (Benes et al, 2007; Harrison and Eastwood, 2001; Heckers and Konradi, 2015; Knable et al, 2004; Konradi et al, 2011; Tamminga et al, 2010)。動物実験では、海馬の PNN をコンドロイチナーゼ ABC によって分解すると、海馬のグルタミン神経の過活動を来し、統合失調症様の行動異常とドパミン神経の過活動を惹起するという報告もある (Shah A, Lodge DJ., 2013)。

今回の研究から得られた結果から、統合失調症患者の海馬に、統合失調症の病態生理に関連した C4S の変化が存在することが示唆される。また、海馬における C4S の変化が、PV ニューロンの異常を介して、統合失調症の病態生理に寄与するという仮説も提起されるであろう。

しかし、現在のところ、海馬領域の C4S の異常が、PV ニューロンの異常や統合失調症を引き起こすという直接的な証拠はない。海馬領域の C4S の異常と統合失調症の病態生理との関連を明らかにするためには、今後のさらなる研究が必要である。

本研究で得られた知見が端緒となり、今後、その変化の病理学的意義が動物実験などから解明され、将来的に、CS 鎖の発現や PNN の形成、分解を制御することにより、その生理活性を介して、統合失調症の予防や治療につながる効果が得られることを期待したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yuriko Iwakura, Yutaro Kobayashi, Hisaaki Namba, Yuichiro Watanabe, Toshiyuki Someya, Hiroyuki Nawa, Takayuki Yukawa.
Epidermal growth factor regulates accumulation of perineuronal nets in the developing GABA neurons. 第41回日本神経科学大会. 2018年7月26日~7月29日. 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

湯川 尊行 (YUKAWA, Takayuki)

新潟大学・医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40761151