

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04245

研究課題名(和文)統合失調症における免疫炎症過程亢進と大脳皮質ニューロンの変化

研究課題名(英文) Relationship between dysregulation of immune-inflammatory processes and alterations of cortical neurons in schizophrenia

研究代表者

三辺 義雄 (MINABE, Yoshio)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・協力研究員

研究者番号：60181947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症では、免疫炎症の亢進が認められ、大脳皮質では情報処理を促進する神経律動の形成を担うニューロンに変化が認められる。本研究では、免疫炎症亢進と大脳皮質ニューロン変化の関係を調べるために、免疫炎症と大脳皮質ニューロンの機能を共に制御し得る分子の発現を評価した。その結果、患者の大脳皮質の複数領域において脳内炎症過程を制御する栄養因子Neuregulin-1の受容体で抑制性ニューロンに発現するErbB4の優勢ネガティブ変異体JMaの発現が有意に増加していることが判明した。一方、末梢血液中の免疫炎症物質や聴覚刺激時の律動的神経活動には、健康者と精神病性障害患者の間で有意な差は検出できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Neuregulin-1(NRG1)は脳内の免疫炎症を担う分子の発現を抑制すると同時に神経律動を形成するパルブアルブミン(PV)陽性ニューロンへの興奮性シナプスの発達を促進する。すなわち、本研究で明らかになったNRG1受容体の優勢ネガティブ変異体であるErbB4-JMaの増加は、NRG1シグナルを弱めることで免疫炎症の亢進やPVニューロンの機能低下を引き起していると考えられ、NRG-1シグナルの増強が、統合失調症における大脳皮質機能障害に対して有効である可能性が想定される。

研究成果の概要(英文)：In schizophrenia, immune-inflammatory dysregulation and alterations of cortical pyramidal and parvalbumin (PV) neurons were thought to contribute to its pathophysiology. To address the relationship between these changes, we assessed 1) expression of genes that regulate both immune-inflammatory processes and cortical neuron functions, and 2) blood cytokines levels and cortical oscillations evoked by auditory stimulations, in healthy control and schizophrenia subjects. Although we failed to detect a significant change in cytokine levels or oscillations, the transcript encoding the dominant negative form of ErbB4, the neurotrophic factor neuregulin-1(NRG1) receptor selectively expressed in PV neurons, was increased across multiple cortical regions in schizophrenia. These findings indicate that reduced NRG1 signaling might be a common mechanism for immune-inflammatory dysregulation and alterations in PV neurons in schizophrenia.

研究分野：精神医学

キーワード：死後脳 サイトカイン オシレーション 錐体ニューロン パルブアルブミンニューロン

1. 研究開始当初の背景

統合失調症では、治療抵抗性の認知機能障害が、患者の自立や社会復帰を妨げる大きな要因となっており(Kahn and Keefe, 2013)、その病態メカニズムの解明が急務となっている。認知機能を担う大脳皮質における情報処理は、ニューロン活動(発火)が同期することで生じる帯域(30-90Hz)の周期的神経活動(オシレーション)により促進されている。皮質オシレーションは、興奮性の錐体ニューロンとパルプアルブミン(PV)を発現する抑制性ニューロン(PVニューロン)の相互作用により形成される。

統合失調症では、錐体ニューロンの樹状突起のスパインの減少(Glausier and Lewis, 2013)や LIMK1, ARPC4, CDC42EP2, CDC42EP3, RhoA など棘突起制御分子の低下が、前頭前野や頭頂葉、側頭葉などで多く報告されている(Hill et al. 2006, Ide and Lewis, 2010, Datta et al. 2017)。また、PVニューロンにおいても、PV そのものに加え抑制性伝達物質 GABA の合成酵素 GAD67 やニューロン活動の同期化を促進する KCNS3 カリウムチャネルサブユニットの低下などが報告されている(Hashimoto et al. 2003, Georgiev et al. 2014)。

一方、統合失調症では、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)などの免疫関連遺伝子の変異が繰り返し報告され、末梢血でのサイトカインなど免疫炎症関連分子の上昇や、脳内免疫炎症過程を担うマイクログリアの活性化を示す脳画像所見も得られている(Miller et al. 2011)。

我々は、これらの知見から統合失調症では免疫炎症過程の亢進が、大脳皮質において錐体ニューロンおよびPVニューロンの機能変化を起し、オシレーションの形成異常を介して、認知機能障害に結びついており、患者末梢血における免疫炎症関連分子の上昇に反映されているという考えに至った。

2. 研究の目的

このような学術的背景を基に本研究では、1) 統合失調症における免疫炎症亢進と大脳皮質ニューロンの変化に関わる分子メカニズムの探索、2) 患者における免疫炎症関連分子の末梢血濃度の変化と錐体ニューロンおよびPVニューロンの機能を反映するオシレーションの変化、を調べた。

I. 統合失調症における免疫炎症亢進と大脳皮質ニューロンの変化に関わる分子メカニズムの探索 Staufen2(Stau2)は、免疫炎症系を含む広汎な細胞機能を担う分子の mRNA の安定性を制御する(Park and Maquat, 2013)。また、錐体ニューロンでは、樹状突起に局在しスパインの形成や維持を担う遺伝子の mRNA の安定性を制御することも報告されている(Heraud-Farlow et al. 2013)。また、ErbB4 は、脳内の免疫炎症過程の調節に参与する神経栄養因子 Neuregulin 1(Simmons et al. 2016)の受容体であり、さらにPVニューロンに選択的に発現し、PVニューロンにおける興奮性シナプスの形成を調節している(Chung et al. 2017)。以上より Stau2 および ErbB4 の遺伝子発現を大脳皮質の4領域で計測した。

II. 患者における免疫炎症関連分子の末梢血濃度の変化と錐体ニューロンおよびPVニューロンの機能を反映するオシレーションの変化 統合失調症をはじめとする精神病性障害の患者で多くの免疫炎症関連分子の血中濃度の増加が報告されている(Miller et al. 2011)。また、40Hzの聴覚刺激により誘導され頭部の表面でも記録されるオシレーションの低下も多く報告されている(Thune et al. 2016)。そこで本研究では、健常対照者および精神病性障害患者において、免疫炎症関連分子としてサイトカインの interferon-gamma (IFNg), interleukin-1beta (IL1b), interleukin-2 (IL2), interleukin-6 (IL6), interleukin-10 (IL10), transforming growth factor-alpha (TGFA), tumor necrosis factor-alpha (TNFA)の血中濃度を計測しつつ、40Hzの聴覚刺激による聴性定常反応を脳波計を用いて記録した。

3. 研究の方法

I. 大脳皮質における錐体ニューロンおよびPVニューロンの変化の上流分子メカニズム

I-1. 死後脳組織: 統合失調症患者と性別が同じで年齢・死後経過時間、RNAの保存状態(RIN, RNA integrity number)に近い健常対照者から成るペア20組から得られた死後脳を用いた(表1)。患者および健常者の各症例の大脳皮質から、背外側前頭前野(DLPFC)・頭頂葉後部(PPC)・連合視覚野(V2)・一次視覚野(V1)を含む凍結ブロックを作成し、各ブロックより薄切切片を作成し(図1)、大脳皮質の灰白質を切り出し、RNAを抽出した。

診断	健常	統合失調症
数	20	20
性	男14,女6	男14,女6
年齢	45.4(11.6)	44.3(10.4)
死後経過時間	15.4(5.8)	14.3(6.4)
脳内 pH	6.7(0.3)	6.5(0.3)
RIN*	8.3(0.5)	8.3(0.6)

表1: 4領域の解析のための死後脳組織

I-2. 遺伝子発現解析: RNAサンプルをcDNAに変換し、Stau2 および ErbB4 遺伝子の alternative splicing により生じる JMa 変異体(ErbB4-JMa)をそれぞれ特異的に増幅するプライマーセットを用いて、これらの遺伝子断片を real-time

平均(標準偏差), *RIN: RNA integrity

PCRにより増幅した。Stau2 および ErbB4-JMa の発現量は同時に増幅した beta-actin および cyclophilin-A の発現量の平均値対する比として計測した。

1-3. 解析：各領域におけるそれぞれの mRNA の発現の統合失調症例と健常例の間の比較は、統合失調症の有無を症例間の主効果、領域を症例内の主効果、性別、年齢、死後経過時間、脳内 pH、RIN を共変数とする混合モデル共分散分析により行った。統合失調症の有無と領域の間に有意な相互作用が認められた場合は、各領域において統合失調症例と健常例の比較を、性別と共変数の影響を最小二乗法により補正した値を用い行った。

II. 統合失調症患者における免疫炎症関連分子の末梢血濃度の変化と錐体ニューロンおよび PV ニューロンの機能を反映する オシレーションの変化

II-1. 被験者：性別および年齢が近い健常対照者および精神病性障害患者をそれぞれ 10 名がボランティアとして参加した(表 2)。研究はヘルシンキ宣言にのっとり人道的配慮に基づいて行い、金沢大学医学倫理委員会から承認を得て行った。また各参加者に研究について説明し文章にて承諾を得た。群間で性別($\chi^2=0.267, p=0.606$)、年齢($t_{18}=-0.435, p=0.669$)、BMI($t_{18}=-0.414, p=0.684$)に有意差は無かったが、教育年数は健常者で有意に高かった(Mann-Whitney $U=22.6, p=0.018$)。患者において、平均罹病期間 \pm SD は 209 ± 166 か月で、平均リスペリドン換算抗精神病薬服用量 \pm SD は 5.4 ± 4.2 であった。

II-2. 血清中サイトカイン濃度計測：各被験者より末梢血 8mL を乾血スピッツに採取し、室温で 30 分凝固させ、3000rpm で 10 分遠心して上清である血清を分離し、解析に用いるまで -80 で保存した。全てのサイトカイン濃度の測定は、全被験者のサンプルで同時に行った。各サイトカインの検出は、それぞれに特異的な抗体が結合し異なる波長の発色反応を引き起こす磁気ビーズの混合物を、各被験者の血清と反応させ、各サイトカインに対応した波長を分光光度計 Luminex200 システム(Merck 社)で行った。サイトカインの血清中濃度は、同時に計測した各サイトカインの標準サンプルの濃度展開サンプルから得られた検量線により、絶対濃度 (pg/mL) として計測した。計測は Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck 社)を用い、そのマニュアルに従って行った。

II-3. 聴性定常反応の記録：脳波は、デジタル脳波計 EE2514 (日本電気)を用い、American Electrographic Society Guidelines for Standard Electrode Position Nomenclature (1991) による 10-20 電極配置法に基づき、左前頭極 FP1、右前頭極 FP2、左前頭部 F3、右前頭部 F4、左中心部 C3、右中心部 C4、左頭頂部 P3、右頭頂部 P4、左後頭部 O1、右後頭部 O2、左側頭前部 F7、右側頭前部 F8、左側頭中央部 T3、右側頭中央部 T4、左側頭後部 T5、右側頭後部 T6、正中前頭部 Fz、正中中心部 Cz、正中頭頂部 Pz、正中頭頂部 Pz の 19 電極から記録した。聴覚刺激としては、Neurobehavioral Systems 社の

Presentation ソフトウェアを用いて、1 msec の矩形波が 24 msec の間隔で 1 秒間に 40 回続くものを作成した(図 2)。この刺激をリラックスした状態で閉眼している被験者にヘッドホンを通じて 40-45dB の大きさで 120 回繰り返し、0.5Hz-200Hz の活動を 500Hz のサンプリング頻度で記録した。各刺激の開始のタイミングをトリガ出力装置(East Medic)により脳波に記録した。

II-4. サイトカイン濃度解析：血中サイトカインの濃度計測においては、計測下限閾値を下回り計測できない被験者が存在し、各サイトカインについて計測可能な被験者の割合を健常者と患者の 2 群の間で χ^2 検定により比較した。血中サイトカイン濃度の分布の正規性は、各被験者の濃度から属する群の平均値を引いた残差(residual)の Shapiro-Wilk 検定により評価した。正規性が棄却されたサイトカインについては、濃度値を自然対数変換した上で残差を求め Shapiro-Wilk 検定をかけ直した。正規性が棄却されない濃度値および自然対数変換した濃度値を用いて t-test にて健常者と患者の間の統計学的比較を行った。

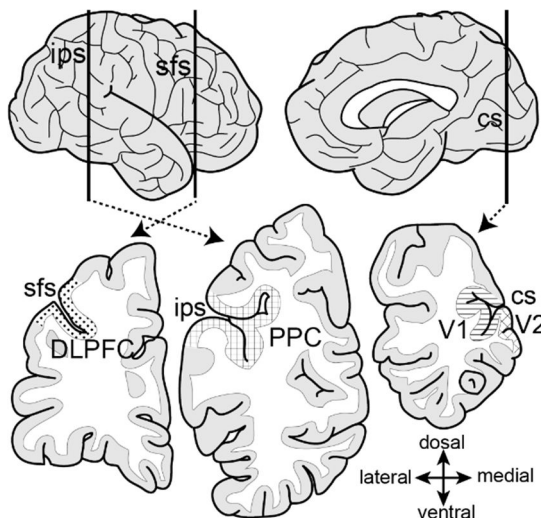


図 1：4 領域の灰白質組織の切り出し

ips: intraparietal sulcus, sfs: superior

診断	健常	精神病性障害
人数	10	10
性別	男 8, 女 2	男 7, 女 3
年齢	33.4(9.4)	35.8(14.7)
BMI	23.2(3.9)	24.2(5.5)
教育年数	16.4(1.3)	12.9(3.1)

表 2：サイトカインと聴性定常反応計測を行った被験者、平均(標準偏差) BMI: body

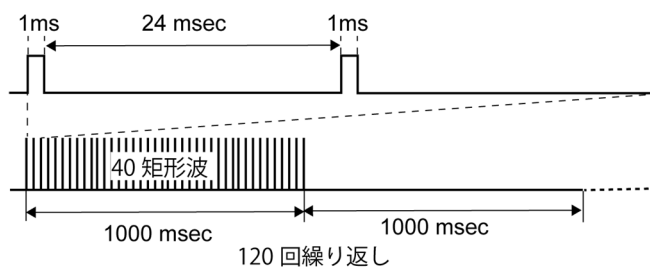


図 2：聴性定常反応計測のための聴覚刺激

II-5. オシレーション解析：各電極から記録される脳波を 40Hz, 1000 msec の聴覚刺激の開始前 100 msec から終了後 100msec までの 1200 msec の間で解析した。この 1200 msec を 2 msec の time bin に分割し、各 time bin においてウェーブレット解析を行い、周波数成分 1Hz ごとにパワー値を求めた。各被験者においてそれぞれの time bin における各周波数のパワー値を 120 回の聴覚刺激の平均値として求め、さらに健常者と患者の各群において被験者間で平均値を求め、時間経過を横軸、周波数を縦軸、パワー値を色で示した time-frequency map を作成した。解析には EMSE suite (CORTECH) を用いた。健常者の患者の統計学的比較は、聴覚刺激の 1000msec を 100msec ごとの時間区分に分割し、各被験者でそれぞれの時間区分における 36Hz から 45Hz の周波数帯域のパワー値の平均値を求め、疾患の有無を被験者間要因、時間区分を被験者内の反復測定とする分散分析により行った。本研究の全ての統計解析には SPSS (IBM) を用いた。

4. 研究成果

I-1. Stau2 mRNA 発現 背外側前頭前野 (DLPFC)、後部頭頂葉 (PPC)、連合視覚野 (V2)、一次視覚野 (V1) の 4 領域を通して、Stau2 mRNA の発現レベルに対する統合失調症の影響は有意ではなかった ($F_{1,32}=0.38, p=0.38$)。また、統合失調症と領域の相互作用にも有意な効果は認められず ($F_{3,114}=0.95, p=0.42$) (図 3)。Stau2 の発現は統合失調症では 4 領域を通して変化が認められないことが判明した。

I-2. ErbB4-JMa mRNA 発現 統合失調症患者では、ErbB4-JMa mRNA の発現が DLPFC で 17.6%、PPC で 37.3%、V2 で 95.2%、V1 で 135.3%、対照者に比べ増加していることが判明した(図

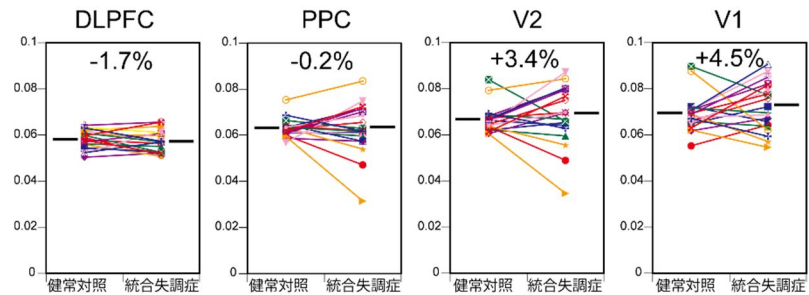


図 3：統合失調症の大脳皮質 4 領域における Stau2 mRNA の発現変化
発現量は beta-actin および cyclophilin-A の平均に対する比。
各ペアのデータは固有のシンボルとそれを結ぶ同じ色の線で表示

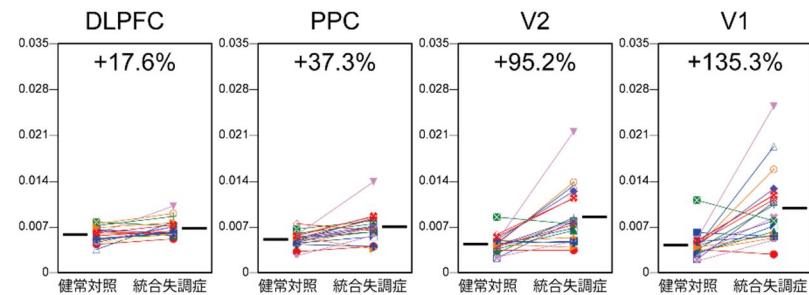


図 4：統合失調症の大脳皮質 4 領域における ErbB4 mRNA の発現変化

4)。統合失調症の影響は大脳皮質 4 領域を通して有意であり ($F_{1,32}=18.77, p=1.3 \times 10^{-4}$)、統合失調症と領域の相互作用も有意であった ($F_{3,114}=19.81, p=2.1 \times 10^{-10}$)。統合失調症における ErbB4-JMa の発現増加は、DLPFC では有意ではなく ($t_{114}=1.06, p=0.29$)、PPC ($t_{114}=2.24, p=0.03$)、V2 ($t_{114}=4.96, p<0.001$)、V1 ($t_{114}=6.76, p<0.001$) と有意で、後頭部にかめてて大きかった。

II-1. 血中サイトカイン濃度 サイトカインを計測した健常者 10 名および精神障害患者 10 名のうちで、血中濃度が検出限界以下だったのは IFNg：健常 5 名、患者 2 名、IL1b：健常 1 名、患者 2 名、IL2：健常 9 名、患者 8 名、IL6：健常 5 名、患者 5 名、IL10：健常 4 名、患者 4 名、TGfA：健常 1 名であった。全てのサイトカインで検出限界以下であった被験者の割合は健常群と患者群の間で有意差は無かった ($\chi^2 < 1.98, p>0.16$)。IL2 が計測できたのは健常 1 名患者 2 名であったため、以後の解析から除いた。患者 1 名は、IFNg, IL1b, TGfA について平均値 \pm 2SD の範囲からの外れ値を取ったので以後の解析から除いた。IFNg の血中濃度 \pm SD (pg/mL) は健常者 3.0 ± 1.8 , 患者 3.0 ± 2.8 であり有意差は無かった ($t_{10}=0.03, p=0.97$)。IL1b は、健常者 1.6 ± 1.9 , 患者 1.8 ± 1.5 で有意差は無かった ($t_{10}=0.36, p=0.72$)。IL6 は、健常者 103 ± 83.4 , 患者 45.9 ± 45.0 で有意差は無かった ($t_{6,3}=1.31, p=0.24$)。IL10 は、健常者 2.2 ± 2.4 , 患者 7.3 ± 98 で有意差はなかった ($t_9=0.18, p=0.86$)。TGfA は、健

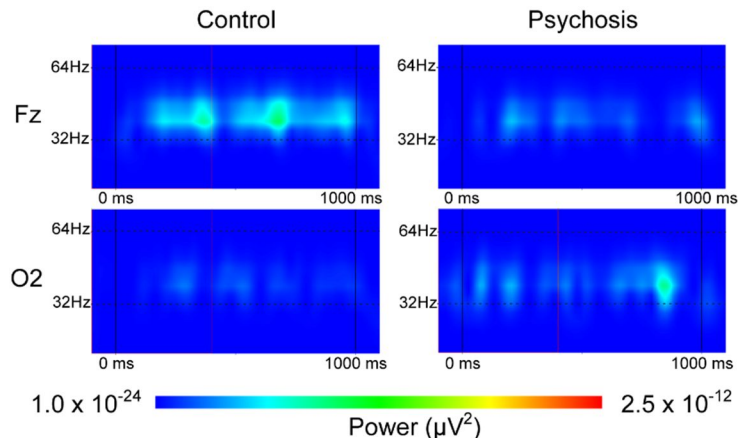


図 5：聴覚刺激時(0ms-1000ms)の各周波数帯域のパワーを疑似カラー表示したものの。パワー値は、健常者(Control)群と精神障害患者(Psychosis)群それぞれ 9 名の被験者の平均値として表示

常者 1.1 ± 0.7 , 患者 0.9 ± 0.9 で有意差はなかった ($t_{16}=0.61$, $p=0.55$)。TNF α は、健常者 14.1 ± 4.9 , 患者 16.5 ± 5.0 で有意差は無かった ($t_{17}=1.04$, $p=0.31$)。

II-2. オシレーション解析

健常者 9 名および精神病性障害患者 10 名より聴覚定常反応を記録したところ、精神病性障害患者 1 名において、Fp1, F3, F4, F7, F8 における聴覚刺激中の 35-45Hz 帯域のパワ

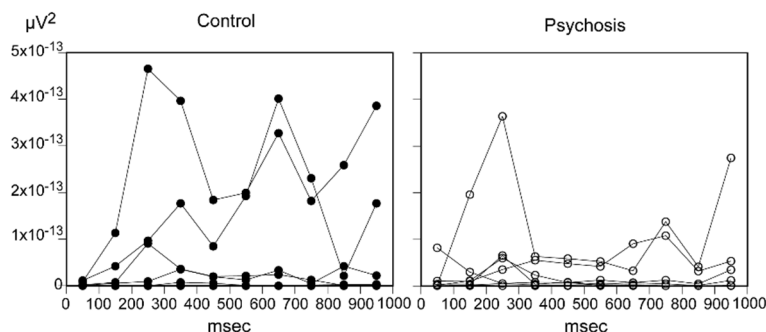


図 6 : 健常者(Control)と患者(Psychosis)の各個人の聴覚刺激期間 (0ms-1000ms)における 36Hz-45Hz のパワー値の継時変化(Cz 電極)

一値が平均値 $\pm 2SD$ の範囲からの外れ値を取った。よってこの症例を外して、各電極から記録された脳活動の time-frequency map で健常者と患者の間の定性的比較を行った。その結果、中心部の Fz および Cz 電極において、帯域活動のパワー値の平均値は精神病性障害患者で健常者より低い傾向が認められた。一方、後頭部など他の電極では両側ともに、健常者と患者の間で違いは認められなかった(図 5)。聴覚刺激により引き起こされる 36Hz-45Hz の帯域のパワーを反復測定分散分析により健常者群および患者群で比較したところ(図 6)、疾患の有無($F_{1,16}=0.59$, $p=0.46$)および疾患と時間経過の相互作用($F_{9,144}=1.06$, $P=0.40$)には有意な効果は認められず、時間経過には有意な効果がみとめられた($F_{9,144}=2.17$, $P=0.03$)。

まとめ 統合失調症患者の大脳皮質では、脳内の炎症活動を制御する Neuregulin-1 の受容体で、PV ニューロンに選択的に発現しその発達をも制御する ErbB4 に発現増加が認められた。発現の増加は ErbB4 の同位体のなかでも ErbB 本来 4 のシグナルを阻害する JM α 同位体に認められ、初期視覚野など後部の皮質領域で前頭前野などの全部の領域に比べ著しく、すでに報告されている PV ニューロンにおける遺伝子発現変化の傾向(Tsubomoto et al. 2019)と一致した。以上より、統合失調症では大脳皮質における免疫炎症過程の亢進と PV ニューロンの機能異常に ErbB4 受容体を介した神経栄養因子 Neuregulin シグナルの低下が関与していることが考えられた。

<引用文献>

1. Glausier and Lewis, Dendritic Spine Pathology in Schizophrenia. *Neurosci* 251:90-107 (2013)
2. Hill et al. Molecular mechanisms contributing to dendritic spine alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11:557-566 (2006)
3. Ide and Lewis, Altered Cortical CDC42 Signaling Pathways in Schizophrenia: Implications for Dendritic Spine Deficits. *Biol Psychiatry* 68:25-36 (2010)
4. Datta et al. Altered Expression of ARP2/3 Complex Signaling Pathway Genes in Prefrontal Layer 3 Pyramidal Cells in Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 174:163-171 (2017)
5. Hashimoto et al. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci* 23:6315-6326 (2003)
6. Georgiev et al. Lower gene expression for KCNS3 potassium channel subunit in parvalbumin-containing neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 171:62-71 (2014)
7. Miller et al. Meta-Analysis of Cytokine Alterations in Schizophrenia: Clinical Status and Antipsychotic Effects. *Biol Psychiatry* 70:663-671 (2011)
8. Park and Maquat, Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4:423-435 (2013)
9. Heraud-Farlow et al. Staufen2 Regulates Neuronal Target. *RNAs Cell Reports* 5:1511-1518 (2013)
10. Simmons et al. Regulation of inflammatory responses by neuregulin-1 in brain ischemia and microglial cells in vitro involves the NF-kappa B pathway. *J Neuroinflammation* 13:237 (2016)
11. Chung et al. Developmental pruning of excitatory synaptic inputs to parvalbumin interneurons in monkey prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E629-E637 (2017)
12. Thune et al. The 40-Hz Auditory Steady-State Response in Patients with Schizophrenia A Meta-analysis. *JAMA Psychiatry* 73:1145-1153 (2016)
13. Tsubomoto et al. Expression of Transcripts Selective for GABA Neuron Subpopulations across the Cortical Visuospatial Working Memory Network in the Healthy State and Schizophrenia. *Cereb Cortex* 29:3540-3550 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kimoto S, Hashimoto T, Tsubomoto M, Yamaguchi Y, Kawabata R, Kishimoto T and Lewis DA
2. 発表標題 Expression of Stau2-regulated transcripts across the cortical visuospatial working memory network in schizophrenia
3. 学会等名 73rd Annual Meeting, Society of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hashimoto T, Lewis DA	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Oxford University Press	5. 総ページ数 -
3. 書名 Alterations in neurotransmitter and molecular systems in psychotic disorders; c. GABA In: Tamminga CA, Ivleva EI, Reininghas U, Van Os J, eds. Dimensions of Psychosis: Comprehensive Conceptualization and Treatments	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸田 重誠 (TODA Shigenobu) (00323006)	昭和大学・医学部・准教授 (32622)	
研究分担者	橋本 隆紀 (HASHIMOTO Takanori) (40249959)	金沢大学・医学系・准教授 (13301)	
研究分担者	廣澤 徹 (HIROSAWA Tetsu) (80645127)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	ルイス デーヴィット (LEWIS DAVID)	ピッツバーグ大学・精神医学部門・教授	