

令和元年6月5日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15096

研究課題名(和文) 6位硫酸化コンドロイチン硫酸欠損による統合失調症様症状発現機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the onset of schizophrenia-like phenotypes in chondroitin 6-sulfate-deficient mice

研究代表者

内藤 裕子(Naito, Yuko)

神戸薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：10456775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、糖鎖による生体応答の制御機構や糖鎖構造の疾患特異的な変化が明らかにされつつあり、厳密な糖鎖発現制御の破綻と疾患との関連が注目されている。研究代表者らの予備的研究により、コンドロイチン硫酸(CS)の硫酸化酵素のノックアウトマウスが統合失調症様症状を示すことが明らかとなった。そこで本研究では、CSの硫酸化異常による統合失調症様症状発現の分子メカニズムの解明を目的とし、このノックアウトマウスの表現型の詳細な解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症は、複数の遺伝的要因、環境要因が組み合わさって発症すると考えられており、発症の分子機構が未だ不明であることから、対症療法的治療が行われている。根本的な治療法確立のため、症状をもたらす分子メカニズムの解明が強く求められている。本研究により明らかにしたコンドロイチン硫酸の硫酸化異常がもたらす表現型を今後さらに詳しく解析することは、統合失調症の分子メカニズムの解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Glycans regulate various biological reactions. Not only a number of disease-specific changes in glycan structures have been reported, but also the failure to make these structures is linked to the onsets of various diseases. Our preliminary study revealed that knockout mice of one of the chondroitin sulfate (CS) sulfatase genes show schizophrenia-like phenotypes. To examine the underlying molecular mechanisms of these schizophrenia-like phenotypes caused by the altered sulfation of CS, detailed phenotypes of these mice were analyzed.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：コンドロイチン硫酸 糖鎖 統合失調症 パルプアルブミン陽性細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

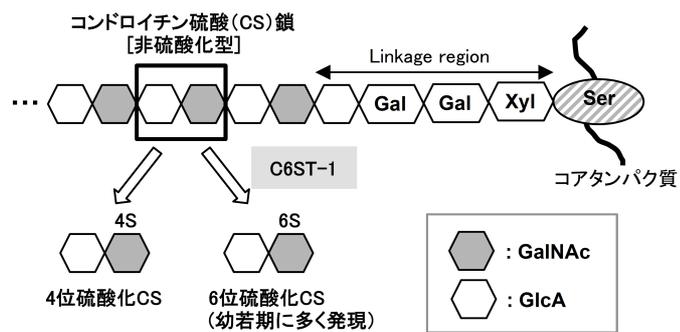
統合失調症は、鬱病に次いで患者数の多い精神疾患であり、精神病床入院患者の過半数を占めている。思春期～青年期を中心に発症し、幻覚、妄想、認知機能障害など多彩な精神症状を示す。発症の原因として、ドパミン神経の活動異常や神経発達障害、神経変性などが示唆されているものの、複数の遺伝的要因、環境要因が組み合わさって発症すると考えられることから、疾患発症の分子機構は未だ不明であり、対症療法的治療が行われているのが現状である。根本的な治療法の確立が必須であり、このため、症状をもたらす分子メカニズムの解明が強く求められている。

一方、糖鎖関連遺伝子改変マウスで統合失調症様の症状を示す例が複数あること、最近のゲノムワイドな相関解析等により、精神疾患の関連遺伝子として糖鎖の生合成を担う糖転移酵素が挙げられていることなどから、糖鎖修飾の異常が発症原因の一端を担っている可能性が高い。あらゆる細胞の表面を覆っている糖鎖は、構造的に非常に多様性に富む。その発現パターンは細胞の種類や分化、成熟、活性化に依存して厳密に制御されており、発現制御の破綻は、発達異常や様々な疾患の原因となることが明らかになってきている。

統合失調症の神経発達障害仮説は、胎生期における神経発達障害が成熟期に脳機能の異常をもたらす、発症に至るとする説である。上述の知見から、脳の発達期に特異的な糖鎖の発現異常が神経系の正常な発達を妨げ、その結果、統合失調症を始めとする精神疾患発症の土台を作るのではないかと仮説を立てた。実際、研究代表者がこれまで研究を行ってきたポリシアル酸という糖鎖も、やはり胎仔期の脳および成体脳の神経再構築部位に発現しており、その生合成を担う糖転移酵素が統合失調症の感受性遺伝子として報告されている。つまり、発達段階にある脳特有の糖鎖構造の欠損が、将来の疾患発症の基盤となることが強く示唆され、脳・神経系において、特に発達に伴ってその発現が変化する糖鎖の機能解明が、統合失調症の分子病態の理解に必須であると考えられた。

本研究では、このような糖鎖として、コンドロイチン硫酸 (CS) に着目した。CS は、グルクロン酸 (GlcA) と *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) から成る二糖単位が数十回繰り返した直鎖状の硫酸化多糖であり、特定のタンパク質のセリン残基に 4 糖結合領域を介して結合したプロテオグリカンとして細胞表面や細胞外マトリクスに存在する (図 1)。哺乳動物細胞に存在する CS の多くは、硫酸基転移酵素により GalNAc 残基の 6 位または 4 位に硫酸化修飾を受けている。研究代表者の所属研究室では、胎仔～幼若マウスでは 6 位硫酸化 CS が多く発現しているが、その後 6 位硫酸化 CS は減少し、代わりに 4 位硫酸化 CS が増加することを明らかにした¹⁾。また、CS が、硫酸化パターン依存的に軸索の伸長や神経可塑性を制御することを世界に先駆けて明らかにしてきた^{1,2)}。

本研究開始前の予備的研究において、幼若期の脳に多く発現する 6 位硫酸化 CS の生合成を担うコンドロイチン 6-*O*-硫酸基転移酵素-1 (*C6ST-1*) のノックアウト (KO) マウスの行動実験を行ったところ、プレパルス抑制試験において、野生型マウスとの差が見られた。プレパルス抑制試験は、驚愕音刺激の直前に微弱な刺激を提示することで生じる驚愕反応の抑制をみる試験であり、プレパルス抑制の低下は、ヒトと動物に共通する統合失調症の指標として広く知られている。*C6ST-1* KO マウスでは、野生型マウスに比べ、このプレパルス抑制が低下しており、統合失調症様の症状を示すことが明らかとなった。さらに、*C6ST-1* KO マウスでは、統合失調症患者で報告されているパルブアルブミン (PV) 陽性抑制性ニューロン (PV 陽性細胞) の減少も見られ、*C6ST-1* を欠損することにより統合失調症の病態を示すことが示唆された。



引用文献

- 1) Miyata, S. *et al.* (2012) *Nat. Neurosci.* 15, p.414
- 2) Mikami, T. *et al.* (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, p.536

2. 研究の目的

本研究では、*C6ST-1* KO マウスにおけるプレパルス抑制の低下、PV 陽性細胞の減少という予備的研究の結果を踏まえて、CS の構造多様性による神経系の制御機構の解明に向け、CS の硫酸化パターン異常による統合失調症様症状の発現機構を明らかにすることを目的として、*C6ST-1* KO マウスの脳・神経系の詳細な表現型解析を行うことにした。

また、精神疾患の研究においてはこれまで神経細胞の異常にのみ注目が集まっていたが、近年、精神疾患と脳内における慢性炎症との関連も示唆されている。そこで本研究では、神経細胞ネットワークへの影響だけでなく、ミクログリアをはじめとする免疫系の関与についても検

討し、複合的な視点で *C6ST-1* KO マウスにおける統合失調症様症状発現の分子メカニズムの解明を目指すことにした。

3. 研究の方法

本研究では、疾患の原因分子として、CS の硫酸化パターンの違いに着目した。CS の機能に関する研究は、そのほとんどがコンドロイチナーゼで処理することにより CS を分解するという方法で行われてきたが、コンドロイチナーゼ処理では硫酸化に関わらず全ての CS が失われてしまい、硫酸化パターンに依存した機能を明らかにすることはできない。そこで本研究では、CS の発現は正常であるが、その硫酸化パターンのみが改変された遺伝子改変動物を用いて研究を行った。

(1) 6 位硫酸化 CS による抑制性神経細胞の分化・成熟・維持の制御機構

予備的研究により、成体 (3~4 ヶ月齢) の *C6ST-1* KO マウスでは、ペリニューロナルネット (PNN) を形成する PV 陽性細胞の数が野生型マウスと比較して減少していることが明らかとなり、6 位硫酸化 CS が正常な神経ネットワークの形成に関わることが示唆された。この PV 陽性細胞減少の原因が、分化・成熟の異常であるのか、それとも細胞死の異常であるのか明らかにするため、発達期の野生型マウスと *C6ST-1* KO マウスで PV 陽性細胞数に差があるか、また、週齢を重ねることでその差が変化するか、PNN を染色することが知られている WFA レクチン及び抗 PV 抗体を用いた脳凍結切片の免疫組織染色により調べた。

さらに、*C6ST-1* 欠損で影響を受ける脳内部位やシグナル分子の同定を進めていく上で必要な知見を得るため、精神疾患との関係が深く、PV 陽性細胞と同じく抑制性の神経細胞であるソマトスタチン陽性細胞、カルレチニン陽性細胞、そして総神経細胞の数についても、*C6ST-1* KO マウスで変化しているか、各種細胞に対する特異的抗体を用いた脳凍結切片の免疫組織染色により調べた。

(2) *C6ST-1* 欠損が脳内免疫応答にもたらす影響

近年、神経変性疾患のみならず、精神・認知障害においても脳内炎症の関与が示唆されている。そこで、*C6ST-1* KO マウスにおいて脳内免疫応答に変化が生じているか調べるため、まずミクログリアの数に差があるか、抗 Iba-1 抗体を用いた免疫染色により、野生型マウスとの比較を行った。

(3) 妊娠マウスへのストレス負荷が胎仔脳における *C6ST-1* 発現に及ぼす影響

妊娠期の母体へのストレスが、子の統合失調症発症リスクを高めるという報告があること、また、妊娠マウスへのストレス負荷が胎仔の脳の遺伝子発現に影響するという報告があることから、妊娠時ストレスなどの環境要因により、仔の脳において *C6ST-1* の発現が変化する可能性が考えられた。そこで、妊娠時のストレスモデルとして知られる、拘束ストレス及び光・音・電気刺激等のストレスを妊娠後期の野生型マウスに与え (胎生 14.5 日: 拘束ストレス、胎生 15.5 日: 光・音・電気刺激、胎生 16.5 日: 拘束ストレス、胎生 17.5 日: 強制水泳)、ストレスを与えなかったコントロール群に比べ、生まれてきた仔の脳において *C6ST-1* および 6 位硫酸化 CS の発現量が減少するか、リアルタイム PCR および HPLC を用いた二糖組成解析により調べた。

4. 研究成果

(1) 6 位硫酸化 CS による抑制性神経細胞の分化・成熟・維持の制御機構

統合失調症患者の死後脳の解析において、PV 陽性細胞の減少や機能障害、PV 陽性細胞の周囲に形成される細胞外マトリクス、ペリニューロナルネット (PNN) の減少が報告されており、疾患との関連が注目されている。

予備的研究で成体マウス (3~4 ヶ月齢) における PNN 形成 PV 陽性細胞の数を調べたところ、野生型マウスと比較して、*C6ST-1* KO マウスではその数が有意に減少していることが明らかになった。この差の原因を同定するため、さらに若いマウスについても、成体マウスと同様に PNN 形成 PV 陽性細胞数を比較したところ、6 週齢 (青年期) のマウスの脳では、3~4 ヶ月齢で見られていた *C6ST-1* KO マウスにおける PNN 形成 PV 陽性細胞数の減少は見られなかった。さらに、PV 陽性細胞以外の抑制性神経細胞として、ソマトスタチン陽性細胞、カルレチニン陽性細胞の数についても 3~4 ヶ月齢の野生型マウスと *C6ST-1* KO マウスで比較を行ったところ、これらの細胞数には PV 陽性細胞のような差は見られなかった。以上の結果から、*C6ST-1* の欠損による抑制性神経細胞の減少は PV 陽性細胞特異的であり、PV 陽性細胞への分化が障害されるのではなく、PV 陽性細胞へと分化してきた *C6ST-1* KO 細胞が細胞死を起こすなどして野生型の PV 陽性細胞よりも早く、もしくは大幅に減少するのではないかと考えられた。

(2) *C6ST-1* 欠損が脳内免疫応答にもたらす影響

近年、様々な脳疾患、精神疾患の患者の死後脳においてミクログリアが活性化していることが報告され、神経変性疾患のみならず、精神・認知障害においても脳内炎症の関与が示唆されている。*C6ST-1* KO マウスでは、実験的自己免疫性脳脊髄炎が野生型マウスに比べて増悪する

ことが研究代表者の所属研究室らの研究により明らかになっており、免疫応答に障害がある可能性が考えられた³⁾。

そこで、*C6ST-1* KO マウスにおいて脳内免疫応答に変化が生じているか調べるため、まず、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアの数に差があるか、野生型マウスとの比較を行った。成体マウスの脳凍結切片の免疫染色を行ったところ、予想に反し、*C6ST-1* KO マウスにおいて（活性化）ミクログリアの増加は認められず、*C6ST-1* の欠損が慢性的な脳内免疫応答の亢進をもたらしているわけではないと考えられた。

(3) 妊娠マウスへのストレス負荷が胎仔脳における *C6ST-1* 発現に及ぼす影響

妊娠期の母体へのストレスが胎児の脳の発達を妨げ、将来的に子の統合失調症発症リスクを高めるといった報告がある。また、妊娠マウスへのストレス負荷が胎仔の脳における遺伝子発現に影響することが明らかになりつつある。

予備的研究において *C6ST-1* KO マウスで統合失調症様症状が見られたことから、胎仔期にストレス負荷を受けることにより、野生型マウスの胎仔脳において *C6ST-1* の発現が変化するか調べることにした。妊娠後期の野生型マウスに拘束、光・音・電気刺激などのストレスを与え、生まれてきた仔マウスの脳における *C6ST-1* および 6 位硫酸化 CS の発現量を、ストレスを与えなかったコントロールマウスから生まれた仔と比較した。その結果、出生直後の仔マウスの脳において、胎仔期のストレス負荷により、*C6ST-1* の発現量に変化が見られた。また、*C6ST-1* による酵素反応の産物である 6 位硫酸化 CS の発現量も、胎仔期にストレス負荷を受けた仔でわずかながら変化していた。これらの結果から、胎仔期のストレス（妊娠時ストレス）が脳において *C6ST-1* の発現を変化させ、将来的な統合失調症の発症に関わる可能性が示唆された。今後、ストレスの負荷条件を変更するなど、さらなる検討を行う必要がある。

引用文献

³⁾ Miyamoto, K. *et al.* (2014) *Glycobiology* 24, p.469

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

内藤裕子、三松舞、後藤倫子、林剛史、門松健治、北川裕之
6 位硫酸化コンドロイチン硫酸欠損による神経機能障害、ConBio2017、2017 年

内藤裕子、三松舞、後藤倫子、林剛史、門松健治、北川裕之
6 位硫酸化コンドロイチン硫酸欠損マウスにおける統合失調症様症状の発現、第 36 回 日本糖質学会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。