

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16394

研究課題名(和文)統合失調症の脳神経スパイン密度低下におけるRNA結合タンパク質の制御機構の解明

研究課題名(英文) Exploration of the regulatory mechanism of RNA binding protein for the dendritic spine pathology in schizophrenia

研究代表者

紀本 創兵(KIMOTO, Sohei)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：00405391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症では認知機能障害が認められる。認知機能に中心的役割を有する大脳皮質の前頭前野では、興奮性の錐体ニューロンにおいて棘突起の減少やRGS4やアクチン制御遺伝子といった遺伝子の発現変化が認められる。この変化が起こるメカニズムにRNA結合タンパク質であるstau2(STAU2)が鍵遺伝子となっており、認知機能障害の分子病理に関連するかを死後脳解析により検証した。結果、統合失調症の前頭前野の全灰白質でSTAU2発現は変化を認めなかった。よって、STAU2発現は皮質層・細胞特異的な変化を受けている可能性や、錐体ニューロンで観察される変化にはSTAU2とは別の因子が関与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症では、難治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、病態メカニズムの解明とそれに基づく効果的な治療法の開発が急務となっている。統合失調症患者で観察される前頭前野の錐体ニューロンの棘突起の変化に焦点を当て、当該疾患患者から得られた死後脳組織を用いて棘突起の形態や維持にとって鍵となる遺伝子を同定することを目的とし研究を行った。今後、本研究の成果を棘突起の機能回復を目指した認知機能障害の治療法の開発に役立てる。

研究成果の概要(英文)：Cognitive dysfunction is commonly observed in patients with schizophrenia.

In the prefrontal cortex (PFC) which is a core region in performing cognitive function, lower dendritic spine density and alterations of transcript expression such as actin-regulating genes and RGS4 have been reported to be observed in excitatory pyramidal neurons of PFC in schizophrenia.

Here, using postmortem brains, we examined whether RNA binding protein stau2 (STAU2) that may regulate both actin-regulating genes and RGS4 can play a critical role in the molecular basis underlying cognitive deficit in schizophrenia. As a result, STAU2 expression in total gray matter of PFC did not differ between schizophrenia and controls. In conclusion, STAU2 expression may be altered in cortical layer- or cell-type specific manner. Alternatively, other molecular factors might contribute to the PFC dendritic spine pathology in schizophrenia.

研究分野：分子精神医学

キーワード：統合失調症 前野 RNA結合タンパク質 stau2 脳神経スパイン アクチン細胞骨格 認知機能障害 前頭

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

1. 研究開始当初の背景

統合失調症では、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と治療法の開発が急務となっている。大脳皮質の前頭前野は認知機能において中心的役割を果たす領域であり、統合失調症ではその機能障害が多くの画像研究により報告されてきた(Brach and Ceaser, 2012)。分子病理所見では、統合失調症の前頭前野では皮質第 3 層での興奮性の錐体ニューロンでの樹状突起の総距離の減少や樹状突起上のスパインの密度の減少が観察され、これが認知機能の低下に関与することが想定されている (Moyer et al, 2015)。実際に錐体ニューロンのスパインの形態や維持を担う CDC42 シグナル系などのアクチン細胞骨格制御遺伝子の発現が統合失調症患者の前頭前野において変化していることが死後脳研究より繰り返し報告されてきた(Ide and Lewis, 2010, Datta et al, 2015)。また研究責任者はこれまでに CDC42 シグナル系の制御に少なくとも一部に関与する(Zhao et al, 2015)と考えられている RGS4 (Regulator of G-Protein Signaling 4)の発現量が統合失調症患者の前頭前野の錐体ニューロンにおいて有意に低いことを明らかにしている (Kimoto et al, 2016)。よって、錐体ニューロン内で起こるアクチン細胞骨格制御遺伝子や RGS4 発現の変化が起きるメカニズムを追求することが、統合失調症の病態基盤の解明と新規治療薬の開発に結びつくと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、錐体ニューロンのスパイン密度の低下が起きる原因をアクチン細胞骨格制御遺伝子や RGS4 発現の変化に着目し、それらの遺伝子発現を制御する上流因子や鍵となる遺伝子の同定することである。今回着目する Stauf2(STAU2)は、RNA 結合タンパクの一つである。RNA 結合タンパクは、一般的には標的遺伝子の 3' 側非翻訳領域に結合して、microRNA などと共役しながら標的 mRNA の局在や mRNA の安定性、タンパクへの翻訳を制御すると考えられている。また、STAU2 は、神経活動依存性に発現され標的分子を制御することがわかっており、錐体ニューロンの樹状突起上では mRNA の安定性やタンパク合成の制御し、スパインの形成に関与することがわかってきた (Goetze et al, 2006)。更に興味深いことに STAU2 の標的分子には RGS4 や CDC42 シグナル内のいくつかの遺伝子が含まれていることが近年の研究わかってきた (Heraud-Farlow et al, 2013)。よって、STAU2 が統合失調症患者の脳内で変化し、STAU2 が上流因子となってアクチン細胞骨格制御遺伝子や RGS4 発現の変化に寄与するという仮説を立て、これを明らかにするために以下の研究を行なうことにした。

3. 研究の方法

死後脳を用いた遺伝子発現解析については、米国ピッツバーグ大学精神医学部門 David A. Lewis 教授との共同研究により、脳サンプルの提供を受けることの承諾を得た。また STAU2 を中心とした遺伝子発現解析は、統合失調症にて障害が多く報告されている作業記憶の中核であり、スパイン関連遺伝子の変化について最も詳細な研究が行われている前頭前野(46 野)を対象とし、性別、年齢、死後経過時間がマッチした健常対照例と統合失調症例のペアから成る、20 組の脳組織を使用する。

A) STAU2 mRNA の発現低下が、統合失調症の疾患過程により生じていることの確認

STAU2 mRNA 発現の定量的解析には、real-time PCR 法と in situ hybridization(ISH)法を用いる。ISH 法では、プラスミドベクターを用いて STAU2 をクローニングする。in vitro 転写の後にヒト STAU2 mRNA 配列に相補的な RNA プロブを合成し、前頭前野の脳切片において STAU2 mRNA を検出することにする。Real-time PCR 法では、各例の前頭前野の灰白質より抽出された RNA を cDNA に変換し、目的 DNA 断片を増幅する。標的遺伝子の mRNA レベルは、2-CT 法により同時に増幅されるコントロール遺伝子の DNA 断片の平均に対する比として求める。また統合失調症患者には、様々な

副次的因子が存在するため、認められた遺伝子発現の変化が疾患過程によって生じているのか、副次的因子を反映するのかを評価する必要がある。20例の統合失調症患者には、物質依存の合併、抗精神病薬投与、抗うつ薬投与、GABA作動性薬物投与、社会経済的悪条件(教育・職業から算出される Hollingshead 指標が 24 を Cut-off 値)などの臨床的交絡因子がある。real-time PCR 法で測定された STAU2 mRNA の発現レベルを、それぞれの因子で定義される患者グループの間で比較する。

B) STAU2 タンパクの発現が統合失調症で変化しているかの確認

western blot 法を用い、凍結ブロックより切り出した灰白質組織を攪拌・遠心して得られた上清サンプルを電気泳動にて展開し、抗 STAU2 抗体により STAU2 の検出定量し至適濃度を決定した後に STAU2 タンパクを検出する。サンプル間の蛋白質量の違いを補正するために、抗 tubulin 抗体による検出も同時に行い、目的タンパクの発現量は tubulin に対する比として算出する。

4. 研究成果

A) STAU2 mRNA の発現低下が、統合失調症の疾患過程により生じていることの確認

ヒト健常対照例の大脳皮質において STAU2 遺伝子の発現がどのように大脳皮質に分布するかをまず調べた。死後脳組織は精神神経疾患歴のない 2 名より得た。それぞれの大脳皮質から凍結切片を作成し、STAU2 に特異的な RNA プローブを作成し、DIG 法にて in situ hybridization を行った。STAU2 遺伝子の発現は神経細胞で観察され、形態学的に錐体ニューロンで高い発現が観察され、STAU2 は錐体ニューロンで強く機能を有する可能性が示唆された。次に、性別・年齢などをマッチした健常対照例と統合失調症の 20 対の前頭前野の全灰白質から抽出された RNA より、real-time PCR 法にて STAU2、RGS4、アクチン細胞骨格制御遺伝子の mRNA の発現量を網羅的に検出し比較した。その結果、20 対のサンプルにおいても、過去の研究に一致して統合失調症患者の前頭前野において、RGS4 や CDC42EP3、LIMK1、ARPC4 などのアクチン細胞骨格制御遺伝子の発現変化が確認された。しかし、STAU2 の発現は 2 群間において有意な差を認めなかった。STAU2 には大きくわけて 2 つの variant(short variant と long variant)が存在することがわかっている。そこで次に STAU2 発現の変化が variant 特異的に生じる可能性を考え、個々の variant の発現を同定できる primer を作成し、同様に real-time PCR 解析を行なった。しかし、2 つの variant の発現量においても 2 群間で有意な変化はなかった。また統合失調症患者における STAU2 発現に、性・薬物投与歴・併存疾患・社会的経済状態などの副次的因子が関連するかを検討したが、関連を認めなかった。最後に、共同研究者である David A. Lewis 教授らは、統合失調症と健常対照の前頭前皮質の RNA を用いて RNA-seq を行っており、研究申請者はそのデータベースを利用して、STAU2 発現について統計学的解析を行なったが結果は同様の傾向にあり、STAU2 の発現変化は検出できなかった。

B) STAU2 タンパクの発現が統合失調症で変化しているかの確認

脳凍結ブロックの灰白質組織の上清サンプルを得たが、STAU2 mRNA 発現が統合失調症患者の前頭前野全灰白質で健常者と比べても発現量に変化がなかったため、タンパク質定量比較の実験を行うことを見送ることにした。

本研究により統合失調症の前頭前野の全灰白質で STAU2 発現は変化を認めなかった。統合失調症の前頭前野では層特異的にスパイン密度が低下していることなどに鑑みれば、STAU2 発現は皮質層・細胞特異的な変化を受けている可能性が考えられる。あるいは、錐体ニューロンで観察されるスパイン密度の低下、RGS4、アクチン細胞骨格制御遺伝子の発現変化には STAU2 とは別の上流因子が関与する可能性が想定され、今後の検討課題となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

Kimoto S, Makinodan M, Kishimoto T. Neurobiology and treatment of social cognition in schizophrenia: Bridging the bed-bench gap. *Neurobiology of Disease*. 2018 Nov 2 [Epub ahead of print]

Yamaguchi Y, **Kimoto S**, Nagahama T, Kishimoto T. Dosage-related nature of escitalopram treatment-emergent mania/hypomania: a case series. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018 Aug 17;14:2099-2104.

Toritsuka M, Makinodan M, Yamauchi T, Yamashita Y, Ikawa D, Komori T, **Kimoto S**, Hamano-Iwasa K, Matsuzaki H, Kishimoto T. Altered gene expression in lymphoblastoid cell lines after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2018 Aug;54(7):523-527.

Yamamuro K, **Kimoto S**, Iida J, Kishimoto N, Tanaka S, Toritsuka M, Ikawa D, Yamashita Y, Ota T, Makinodan M, Yoshino H, Kishimoto T. Distinct patterns of blood oxygenation in the prefrontal cortex in clinical phenotypes of schizophrenia and bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2018 Jul;234:45-53.

Makinodan M, Okumura K, Ikawa D, Yamashita Y, Yamamuro K, Toritsuka M, **Kimoto S**, Yamauchi T, Komori T, Kayashima Y, Yoshino H, Wanaka A, Kishimoto T. Effects of cross-rearing with social peers on myelination in the medial prefrontal cortex of a mouse model with autism spectrum disorder. *Heliyon*. 2017 Dec 1;3(11):e00468

Makinodan M, Ikawa D, Yamamuro K, Yamashita Y, Toritsuka M, **Kimoto S**, Yamauchi T, Okumura K, Komori T, Fukami SI, Yoshino H, Kanba S, Wanaka A, Kishimoto T. Effects of the mode of re-socialization after juvenile social isolation on medial prefrontal cortex myelination and function. *Sci Rep*. 2017 Jul 14;7(1):5481.

[学会発表] (計4件)

(国際学会)

ポスター)

Sohei Kimoto, Takanori Hashimoto, Makoto Tsubomoto, Yasunari Yamaguchi, Rika Kawabata, Toshifumi Kishimoto, David Lewis.

Expression of Stau2-Regulated Transcripts Across the Cortical Visuospatial Working Memory Network in Schizophrenia

Society of Biological Psychiatry 73rd Annual Meeting, New York USA, 2018

ポスター)

Kimoto S, Yamamuro K, Kishimoto N, Uratani M, Yamaguchi Y, Kishimoto T.

Different patterns of blood oxygenation in the prefrontal cortex in clinical phenotypes of schizophrenia and bipolar disorder.

The 5th Asian Congress of Schizophrenia Research, Thailand, 2017

(国内学会)

シンポジウム)

GABA 合成酵素と精神疾患、最近の知見

紀本 創兵, 死後脳研究から考える統合失調症の認知機能障害と E-I balance 変化の分子基盤

第 40 回日本生物学的精神医学会・第 61 回日本神経化学学会大会 合同年会, 神戸, 2018

シンポジウム)

紀本 創兵, 山口泰成, 岸本年史. Lower expression of regulator of G protein signaling 4 in schizophrenia: contribution of altered cortical excitation-inhibition balance.

第 60 回日本神経化学学会, 仙台, 2017

(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)

特になし

6. 研究組織

該当せず