

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15063

研究課題名(和文)精神疾患の分子病態における脂質の役割の解明

研究課題名(英文)The roles of lipids in the molecular pathology of the psychiatric disorders

研究代表者

近藤 豪 (KONDO, Takeshi)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：10712705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症やうつ病などの精神疾患は、大きな社会的損失をもたらす医学的に重要な課題である。しかし、その発症機序の分子メカニズムは未だに解明されておらず、従って十分な治療法も確立していない。本研究課題では、技術的障壁を解決するための脂質光制御技術を開発し、精神疾患における脂質の機能的な重要性の解明に取り組んだ。特に治療薬の作用における脂質の寄与に着目することで、従来の遺伝子やタンパク質の研究だけでは説明が不十分であった分子病態について検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症は世界人口の約1%が罹患する代表的な精神疾患であり、社会的な回復率の低さが今なお問題であるが、その原因は未だ明らかになっておらず従って発症機序に基づいた治療法も存在しない。近年の分析技術の向上により、脂質をはじめとする代謝物の異常が報告されるようになったが、その意義についてはほとんど分かっていない。

本研究では代表者らがこれまで見出した患者死後脳における脂質異常の意義を解明するために、脂質研究に資する新たな研究技術を開発した。これによって疾患における脂質の意義の解明が進み、脂質に着目した創薬基盤形成につながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Psychiatric disorders, including schizophrenia and depression, are important medical issues today. Understanding the etiologies of these disorders is a major challenge for establishment of treatment. In this study, we developed optical control methods to control lipids and tried to clarify the functions of lipids in the etiologies in psychiatric disorders. Especially, we focused on the role of lipids in the mechanisms of antipsychotic agents and provided new insights distinct from previous studies on genes and proteins related to these disorders.

研究分野：病態医化学

キーワード：脂質 光遺伝学 イメージング質量分析 統合失調症 抗精神病薬

1. 研究開始当初の背景

大きな社会的損失をもたらす脳の疾患は、現代医学における最も重要な課題の一つである。遺伝性がはっきりしている神経変性疾患等については原因遺伝子が特定されつつあり、その発症メカニズムに則った治療法の開発が進められている。一方で、罹患率が高く症例のほとんどが孤発性である脳疾患の多くについては、発症メカニズムが未解明のままであり、したがって機序に則った治療法の確立が難しい状況にある。特に精神疾患は、神経変性疾患で認められる神経細胞死や凝集体形成のような明確な基質的異常を認めないことから、最近まで分子レベルでの理解が相対的に遅れてきた。

脂質は細胞膜の構成成分やエネルギー貯蔵、シグナル伝達分子として重要な生理機能を担う生体分子である。脳はその乾燥重量の約60%が脂質であり、古くから脳機能における脂質の重要性が考えられてきた。しかし脂質は遺伝子(核酸)ならびにその直接の産物であるタンパク質に比べて解析が困難なことから、相対的に理解が遅れている。近年の質量分析法の発達によって、理解が急激に進んでいる分野でもある。また脂質は分析だけでなく介入も難しい。遺伝子は導入技術(トランスフェクション、各種ウイルス感染、トランスジェニックマウスなど)や欠損技術(RNA干渉や遺伝子ノックアウト、最近ではCRISPR/Cas9によるゲノム編集など)が充実しているが、脂質は該当する技術がほぼ無いに等しい。従来の研究は脂質の合成・代謝酵素(あるいは受容体)の導入・欠損により行われてきた。ひとつの脂質は複数の酵素反応により存在量が制御されるため、個々の酵素の発現・欠損は脂質そのものの機能を評価するには不十分である。また、生体維持に重要な脂質の場合には、完全欠損により細胞の生存、個体の発生に影響が大きすぎるため、解析に支障をきたす場合もある。これらの問題を解決するには、用いる実験系の中で脂質自体を時間的・空間的に自由に制御する手法が必要になる。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでの研究において、統合失調症患者死後脳において減少する特定の脂質(以下、標的脂質と呼ぶ)を同定し、この標的脂質が抗精神病薬の作用に関わることを見出している。これらの知見を基に、統合失調症の分子病態における標的脂質の役割を明らかにすることを目的とした。脂質研究の技術的障壁を解決するために、光応答性タンパク質を利用した脂質の光制御技術の開発を進めた。

3. 研究の方法

A. 既存技術を用いた統合失調症・抗精神病薬と脂質の関連性研究

A-1. 標的脂質の機能に対する抗精神病薬の効果：

培養細胞を用いた *in vitro* の実験系において、標的脂質が関与する細胞内シグナル伝達や膜輸送に対して抗精神病薬が与える影響について評価した。標的脂質の合成酵素阻害薬を用いることで標的脂質を介した作用であることを確認するほか、CRISPR/Cas9を用いた遺伝子ノックアウト(KO)またはノックダウン(KD)を応用することで、観察されたイベントに関わるタンパク質の寄与を検証した。

A-2. 神経細胞樹状突起のスパイン構造への影響：

統合失調症では大脳皮質の神経樹状突起スパイン構造に異常が認められるため、マウス初代培養神経細胞を用いてスパイン形成に対する抗精神病薬の効果と標的脂質の関連性を解析した。また、NMDA受容体阻害薬 MK-801 による統合失調症モデルマウスに対して標的脂質代謝酵素阻害薬を投与し、脳内の標的脂質レベルの変動についてはイメージング質量分析法により、スパイン構造に与える影響についてゴルジ染色法により評価した。

A-3. 脂質異常と機能障害の関連性：

A-2に関連して、疾患モデルマウス脳内において標的脂質を増加させることが、統合失調症に治療的効果を示すか検証した。理化学研究所の吉川武男博士らの協力の元で、Y字迷路試験、強制水泳試験(FST)、驚愕反応によるプレパルス抑制試験(PPI)などの行動試験を実施した。

A-4. 抗精神病薬が標的脂質に与える分子レベルでの影響：

標的脂質の膜上分布に対する抗精神病薬の影響を評価するために、標的脂質結合プローブの細胞内分布をSTORM型超解像顕微鏡により観察した。また人工リポソームと結合ドメインのリコンビナントタンパク質を用いることで、無細胞系における直接的な影響や脂質-タンパク質相互作用に与える影響を評価した。

B. 脂質光操作技術の開発と脂質機能研究への応用

B-1. 標的脂質の光制御ツールの開発：

光で標的脂質を操作する技術を開発し、光制御能を *in vitro* で評価した。その後 CRISPR/Cas9 シ

システムを用いて制御ツールをマウスゲノムへ挿入し、Cre/loxP システムにより発現制御可能なノックイン (KI) マウス系統の樹立を試みた。プロトタイプとして細胞膜膜から標的脂質を除くタイプの光操作ツールを開発し、標的脂質を増加させるタイプの光操作ツールについても試作し培養細胞において機能を検証した。

B-2. 光制御による脂質操作と統合失調症関連の機能障害の関連性：

前述の光制御ツール技術を導入した標的脂質光制御マウスを用いて、in vivo における脳内標的脂質変動と、それによる神経細胞の形態やマウスの行動への影響について解析した。

4. 研究成果

A. 既存技術を用いた統合失調症・抗精神病薬と脂質の関連性研究

A-1. 標的脂質の機能に対する抗精神病薬の効果：

既知の標的脂質機能に対する抗精神病薬の影響を解析した。培養細胞を抗精神病薬で処理すると、穏やかではあるもののアクチン重合やエンドサイトーシスといったイベントに広範な影響が認められた (図 1A,B)。標的脂質合成酵素阻害薬を併用するとこれらの効果は減弱したため、標的脂質を介したものであることが示唆された。但し、我々の解析系では当阻害薬による標的脂質レベルの明確な減少が認められなかったため、別の機序による影響の恐れがある。そこで後述する光操作技術を用いたところ、やはりアクチン重合の阻害されたことから、標的脂質が関与していることが確認された (図 1C)。

標的脂質関連の細胞内イベントのうち、アクチン骨格制御への影響が比較的顕著であった。また MAPK などのシグナルにも影響が認められたことから、観察されたイベントにタンパク質 A が関与する可能性が考えられた。そこで CRISPR interference 法を用いた遺伝子 KD および CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子 KO によりタンパク質 A の寄与が確認された (図 1D,E)。タンパク質 A は統合失調症との関わりが深い各種 G タンパク質共役型受容体の下流でも機能するため、これらの受容体下流のシグナル伝達についても影響を解析するとともに、KO 細胞を神経細胞にリプログラミングすることで、神経細胞に特徴的なイベントの解析を進めている。

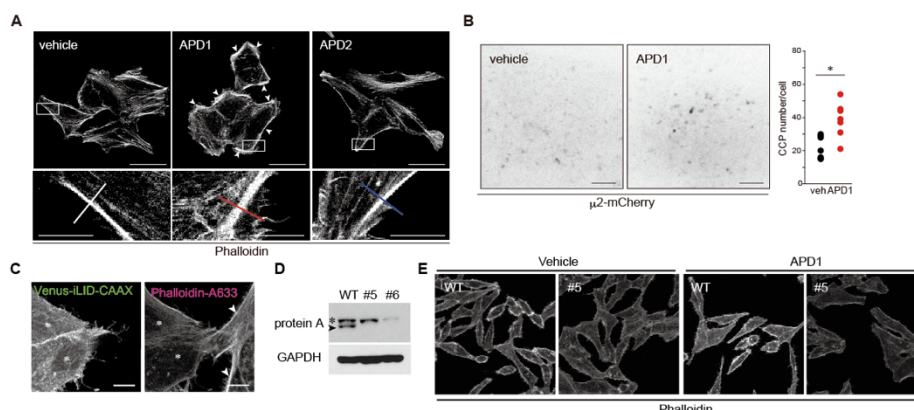


図 1 標的脂質の機能に対する抗精神病薬の効果

A-2. 神経細胞樹状突起のスパイン構造への影響：

野生型マウスの新生児から採取した大脳皮質または海馬の初代培養神経細胞を抗精神病薬で処理し、PSD95 抗体を用いてポストシナプス形態を観察した。抗精神病薬で処理した細胞では PSD95 陽性構造が肥大しており、シナプス形成の亢進作用が示唆された (図 2A)。また標的脂質合成酵素阻害薬を併用した場合には PSD95 シグナルが低下したが、前述のとおり本阻害剤の効果と標的脂質の関係についての解釈には注意が必要である。また、Cas9-KI マウス由来神経細胞に標的脂質合成酵素遺伝子を狙った gRNA を導入して観察したところ、抗精神病薬の作用が打ち消されたことから、標的脂質に依存した効果であることが確認された (図 2B)。

以上の結果を受けて、脳内標的脂質の増加がシナプス形成促進につながるか評価した。NMDA 受容体阻害薬投与による統合失調症モデルマウスにおいては、大脳皮質の樹状突起スパインの形態に異常をきたす。このモデルに対して標的脂質代謝酵素阻害薬を投与し、標的脂質増加による効果を検証した。標的脂質代謝阻害薬投与により確かに脳内標的脂質レベルが上昇することがイメージング質量分析法により確認された (図 2C)。さらにゴルジ染色による形態観察では、疾患モデルで減少する小～中サイズのスパイン数が、標的脂質代謝阻害薬投与によって部分的に改善することが確認された (図 2D)。なお、当初は野生型マウスに標的脂質合成酵素阻害薬を投与することも検討していたが、前述のとおり阻害剤の効果が不明瞭であったため実施を見送った。

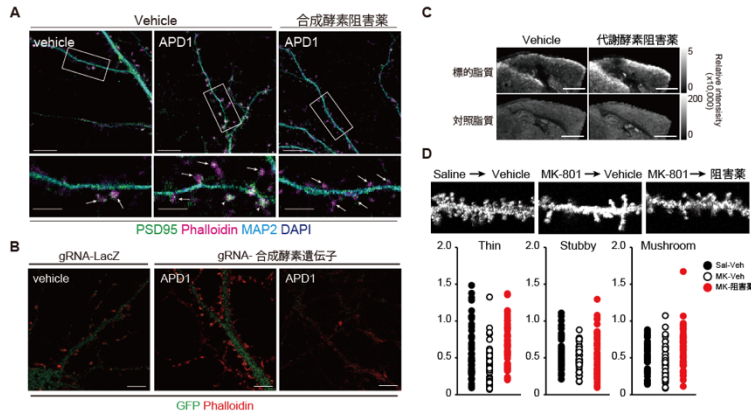


図 2 神経樹状突起スパイン構造への影響

A-3. 脂質異常と機能障害の関連性：

A-2 の結果から、疾患モデルに対して標的脂質を補充することで、脳機能低下に対する治療的効果が期待された。しかし、いくつかの行動試験を実施したものの、明確な治療効果を見出すことは難しかった (図 3)。理由としては、用いた疾患モデルはスパイン形態の明確な変化に対し行動面の異常が小さく、病態モデルと評価系の組み合わせが不適切であったこと、標的脂質代謝阻害薬の脳室投与は脳領域を問わず広い範囲の脂質増加につながるため、望ましくない効果も生じたことが考えられる。実際、MK-801 慢性投与モデルにおける脳内の標的脂質変化は軽微であり、より適切なモデルにおいて領域選択的に標的脂質レベルを回復することが重要と思われる。

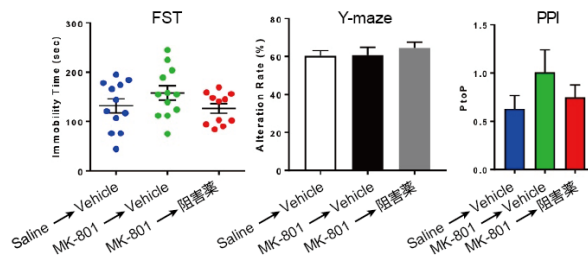


図 3 疾患モデルマウスの機能障害と標的脂質の関係

A-4. 抗精神病薬が標的脂質に与える分子レベルでの影響：

標的脂質の膜上分布に対する抗精神病薬の影響を評価するために、標的脂質結合プローブの細胞膜分布を STORM 型超解像顕微鏡により観察した。プローブは細胞膜全域にわたり細かいドット状に観察された。抗精神病薬処理した細胞では、全体的に小さいサイズのドット数が増加した。このことから、抗精神病薬は標的脂質の膜上分布に影響することが示唆された (図 4A)。より直接的な影響を評価するために、標的脂質を含む人工リポソームと標的脂質結合プローブのリコンビナントタンパク質を用いた FRET 解析を行った。シグナルの変化が微小であるため安定的な結果は得られなかったが、抗精神病薬存在下ではプローブ同士の相互作用に減少傾向が認められた (図 4B)。超遠心分離を用いた解析ではリポソームとプローブの結合は維持されていたため、抗精神病薬は標的脂質の膜上分布に影響し、薬剤間でその傾向が異なることが示唆された。

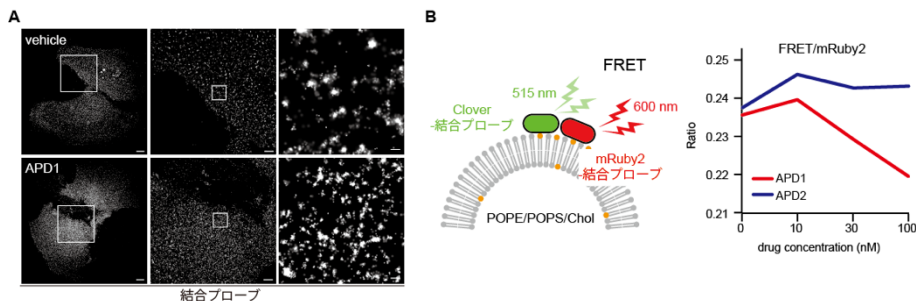


図 4 標的脂質の膜上分布に抗精神病薬が与える影響

B. 脂質光操作技術の開発と脂質機能研究への応用

B-1. 標的脂質の光制御ツールの開発：

光応答タンパク質 iLID-SSPB ドメインを用いて新たに標的脂質の光操作技術を開発し、光制御活性を培養細胞で確認した (図 5A,B)。このツールを CAG プロモータや Cre/loxP システム、相同組換え用のアーム配列とともに組み込んだドナーベクターを作製し、リコンビナント Cas9 タ

ンパク質および Rosa26 遺伝子座標的 gRNA とともにマウス受精卵にインジェクションした。得られた産仔の一部のゲノムにドナー配列の挿入を認め、野生型と交配することでツールが遺伝した次世代の個体が得られた。

光操作ツールノックイン (KI) マウスと Parvalbumin (PV) -Cre マウスを交配して得られた産仔について、ツールの組織特異的発現と *in vivo* における標的脂質光操作活性を評価した。ツールに組み込まれた蛍光タンパク質をウェスタンブロットで検出したところ、Cre 陰性 KI マウスの組織ではツールの発現が認められず、Cre 陽性 KI マウスでは脳や一部の末梢組織において発現を認めた。このマウスの脳に無線 LED を用いて青色光を照射し、脳内の脂質をイメージング質量分析法により解析した。コントロールである同腹の PV-Cre マウスと比較し、KI/PV-Cre マウスでは標的脂質由来のシグナルが顕著に低下する一方で、操作標的ではない脂質については量的変動を認めなかった (図 5C)。よって当初の計画どおり標的脂質を *in vivo* で光操作可能になった。

標的脂質減少を光操作可能になったことから、標的脂質増加ツール開発も検討した。標的脂質合成酵素の全長あるいは酵素活性ドメインを用いたツールを試したところ、光照射に依存しない膜局在などの問題を認めた。ドメイン構造や局在性に影響するアミノ酸変異体なども試したものの、十分な改善に至らなかった。

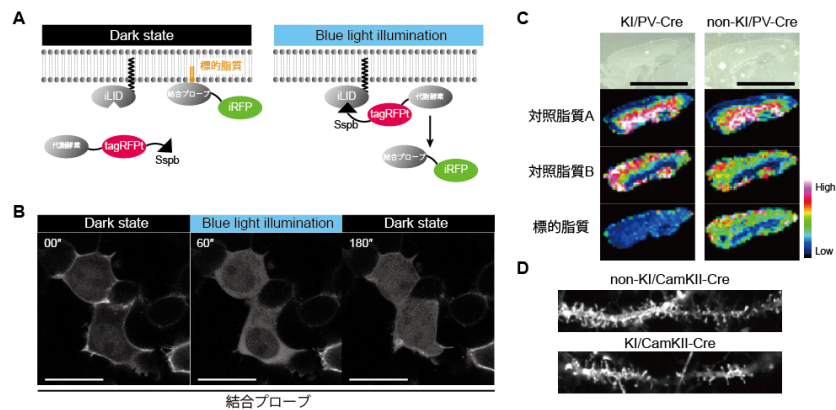


図 5 脂質光操作技術の開発と *in vivo* 解析への応用

B-2. 光制御による脂質操作と統合失調症関連の機能障害の関連性：

B-1 で開発した標的脂質光制御マウスを用いて、脳内における脂質光操作が与える解剖学的・生理的影響について検証した。CamKII α -Cre マウスと交配した KI マウスの脳に青色光を照射した後、組織透明化技術 ScaleSQ を用いて大脳皮質神経樹状突起の形態を解析したところ、統合失調症モデルに類似した形態異常の傾向が認められた (図 5D)。光照射による標的脂質レベルの減少が迅速かつ顕著であることから行動への影響を期待したが、意外なことに光照射中の顕著な異常行動は認められなかった。標的脂質レベルの変化に伴う神経細胞の形態変化と行動変化については、A-2、A-3 の実験結果と一致してギャップがあるようである。記憶や学習などへの影響を踏まえて、光照射と行動評価のタイミングを検討する必要がある。また、現在は脂質操作の確認が解剖後の質量分析による解析に依存しているため、光照射の時間や強度などの条件が必ずしも適切でない可能性がある。照射条件の最適化を進めるとともに、標的脂質レベルをライブイメージングするための技術開発が必要である。よって、脳高次機能に対する影響を行動評価する項目については課題が残った。

以上の検討項目から、統合失調症の病態と治療における標的脂質の役割について新たな知見が得られた。課題 A では、抗精神病薬の作用と標的脂質の関係がタンパク質 A の制御によって説明できる可能性が出たため、疾患病態において重要な受容体シグナルとの関係解明が今後の課題である。当初予定していた分子スケールにおける標的脂質の挙動などについての解析については、方法や結果の解釈に課題が残った。分子スケールの標的脂質の挙動については、直接的に病態の理解につながるかもしれないが、創薬上有益な情報になる可能性もあるため、異分野の専門家と協力するなどして今後検討したい。

課題 B については、当初の計画に準じた脂質光制御法の確立とそれを組織特異的に発現する KI マウス系統の樹立に成功した。行動解析による脳機能への影響評価には課題が残るものの、脂質の光操作が少なくとも神経シナプスの形態に影響することは確認できたため、病態における標的脂質の寄与解明に役立つものと考えられる。

これらの解析に加えて、以前から進めてきた統合失調症患者死後脳のマルチオミクス解析の一環として、トランスクリプトームとリポドームの相関解析を実施した ([bioRxiv, 2022.03.14.483348](https://doi.org/10.1101/2022.03.14.483348))。トランスクリプトーム解析から疾患群で有意に発現変動する遺伝子が確認され、さらに脂質レベルとの相関解析により単独のオミクス解析では注目されなかったシグナルパスウェイが新たに同定された。本研究課題で扱った標的脂質以外の脂質についても異常を示唆する結果であり、統合失調症と脂質の関係理解に寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arihisa Wataru, Kondo Takeshi, Yamaguchi Katsushi, Matsumoto Junya, Nakanishi Hiroki, Kunii Yasuto, Akatsu Hiroyasu, Hino Mizuki, Hashizume Yoshio, Sato Shumpei, Sato Shinji, Niwa Shin-ichi, Yabe Hirooki, Sasaki Takehiko, Shigenobu Shuji, Setou Mitsutoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Lipid-correlated alterations in the transcriptome are enriched in several specific pathways in the postmortem prefrontal cortex of Japanese patients with schizophrenia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.03.14.483348	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤 豪, 丸山 健太, 畠山 鎮次.
2. 発表標題 非自己成分の認識機構とその生理的意義についての研究
3. 学会等名 第58回日本生化学会北海道支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学融合科学領域リーダー育成システム 研究者個人ウェブサイト https://tenure-track.cris.hokudai.ac.jp/lab/kondo/ 北海道大学 テニュアトラック普及・定着事業 研究者紹介サイト https://tenure-track.cris.hokudai.ac.jp/lab/kondo/

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------