

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03580

研究課題名(和文)統合失調症の抑制性介在ニューロン変化への μ 型オピオイド受容体の関与研究課題名(英文) Relationship between μ -opioid receptor and neuronal alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia

研究代表者

橋本 隆紀 (Hashimoto, Takanori)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：40249959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の前頭前野では μ 型オピオイド受容体(MOR)が増加している。MORは、統合失調症で変化が報告されている抑制性介在ニューロンに属するパルブアルブミン(PV)ニューロン及びソマトスタチン(SST)ニューロンに発現する。本研究では、MOR発現増加の疾患特異性、MOR発現ニューロン種、統合失調症のニューロン変化とMORの関係を調べた。MOR発現は、統合失調症とうつ病で増加し、対照者ではPVニューロン、SSTニューロン、錐体ニューロンの多くに確認された。統合失調症の前頭前野では、MORの発現はSSTに加え錐体ニューロン変化の指標であるアクチン関連分子ARPC3及びCDC42と負の相関を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症では、認知機能に中心的役割を果たす前頭前野において、抑制性介在ニューロンに属するPVニューロン及びSSTニューロン、そして興奮性の錐体ニューロンの変化が報告されている。本研究では、統合失調症の前頭前野で発現の増加が認められる μ 型オピオイド受容体(MOR)が、これらのニューロンに広く発現すること、SSTニューロン及び錐体ニューロンの変化と負の相関を示すことが明らかになった。統合失調症におけるMORの増加は、SSTニューロンおよび錐体ニューロンの変化の分子メカニズムに関連すると考えられる。本研究の成果は難治性の認知機能障害の病態メカニズムとそれに基づいた治療法の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) of subjects with schizophrenia (SZ), alterations have been reported for cortical inhibitory neuron subtypes that express parvalbumin (PV) or somatostatin (SST). The μ -type opioid receptor (MOR), which was shown to be enriched in PV and SST neurons and regulates neurotransmission by these neurons, was found to be upregulated in DLPFC of SZ subjects. Here, we tried to clarify 1) neuron types that express MOR, 2) MOR upregulation in other psychiatric diagnoses and 3) relationship between MOR upregulation and alterations of cortical neurons in SZ. We found that excitatory pyramidal neurons also express MOR and MOR was upregulated in major depression. Alteration in MOR expression was negatively correlated with expression of SST as well as RPC3 and CDC42, which regulate dendritic spines of pyramidal neurons, suggesting that MOR is associated with alterations of inhibitory as well as excitatory neurons in DLPFC of SZ subjects.

研究分野：精神神経科学

キーワード：死後脳 パルブアルブミン ソマトスタチン アクチン関連

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, JAMA Psychiatry 2013)、病態メカニズムの解明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画像研究により報告されている(Brach and Ceaser, Trends Cogn Sci 2012)。前頭前野を含む大脳皮質の神経回路は、興奮性の錐体ニューロンと抑制性の介在ニューロンにより形成される。そして、後者はその形態と機能により大きく3つのサブタイプに分類され、それぞれがパルプアルブミン(PV)、ソマトスタチン(SST)、血管作動性腸管ペプチド(VIP)を特異的に発現する(Tremblay et al. Neuron 2016)。我々は、ヒト死後脳の解析を通して統合失調症の前頭前野において、PVニューロンとSSTニューロンの機能低下を示す多くの分子発現変化を報告してきた(Hashimoto et al. J Neurosci 2003, Mol Psychiatry 2008; Georgiev et al. Am J Psychiatry 2014)。

大脳皮質において、介在ニューロンの機能に大きな影響を及ぼす分子として注目されるのが μ 型オピオイド受容体(MOR)である。MORは介在ニューロンに選択的に発現し、その活性化は介在ニューロンによる抑制性(GABA)神経伝達を抑制する(Baldo, Trends Neurosci 2016)。本研究の開始時期までに、統合失調症患者の前頭前野では、健常者に比べ、MORの発現増加が報告され(Volk et al. Cereb Cortex 2012)、介在ニューロンの機能変化に関与している可能性が想定されていた。

2. 研究の目的

本研究では、MORの発現増加の疾患特異性を調べるために、統合失調症に加え双極性障害、うつ病の背外側前頭前野におけるMORの発現変化を評価した。次に、MORを発現する大脳皮質ニューロン種の同定を健常対照例の背外側前頭前野において行った結果、MORは介在ニューロンだけでなく錐体ニューロンにも発現していることが判明した。そこで、MORの発現変化と介在ニューロンの変化を反映するPVおよびSSTの発現変化の関係、ならびにMORの発現変化と錐体ニューロンの樹状突起スパインの変化を反映するアクチン関連分子の遺伝子発現変化との関係を明らかにした。

3. 研究の方法

3.1 統合失調症、双極性障害、うつ病の背外側前頭前野におけるMORの発現変化

性別は同じで年齢および死後経過時間が近い対照者ならびに統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害の患者の各1名ずつから成るテトラド40組から得られた死後脳を用いた。これら4つの診断別グループの間では、脳組織の品質の指標であるRNA integrity number(RIN)およびpH、組織の凍結保存期間に、有意差はなかった($F_{3,155} < 1.83$, $p > 0.15$)。凍結保存された各脳組織より、背外側前頭前野(9野)の灰白質を切り出し、Trizol液に攪拌溶解したサンプルを作製した。各サンプルより得られたRNAをcDNAに変換し、MORの発現レベルを定量するために特異プライマーを用いてreal-time PCRで増幅した。Real-time PCRでは、MORの遺伝子断片と同時に内部標準遺伝子としてbeta-actin, cyclophilin, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の断片を増幅し、MORの発現レベルはこれら内部標準遺伝子の発現の平均に対する比として求めた。さらに、MOR発現の各疾患における変化を、すでに得られていたPVおよびSSTの発現変化と比較した。

3.2 健常対照例の大脳皮質においてMORを発現するニューロン種の同定

精神神経疾患歴のない対照者4名から得られた背外側前頭前野の組織切片を用い、MORを発現するニューロン種の同定を、2重標識 in situ hybridization (ISH)によりおこなった。MORは35Sで放射標識したRNAプローブと介在ニューロンのサブタイプマーカーmRNAをdigoxigenin (DIG)で標識したRNAプローブを用いて行った。まずMORのRNAプローブによる特異的MORシグナルの検出のため、MORプローブ単独によるISHを行い、プローブが乳剤に形成する銀粒子の密度を、804個のニューロンと924個のグリアの核の周囲で行い、グリアにおける平均密度の3倍をMOR陽性と判断する閾値として定義した。介在ニューロンサブタイプはパルプアルブミン(PV)とソマトスタチン(SST)に対するdigoxigenin(DIG)標識RNAプローブでそれぞれ染色した。これらの2重ISHによる実験に加え、ヒト大脳皮質中側頭回の各層より切り出された単一ニューロンのRNA sequencingによって作成された遺伝子発現データベース(Allen Brain Atlasにより公開)を用いてMORを発現するニューロンの特性(興奮性の錐体ニューロンまたは抑制性の介在ニューロン)と層分布を解析した。

3.3 MORの発現変化と介在ニューロンおよび錐体ニューロンの変化の関係について

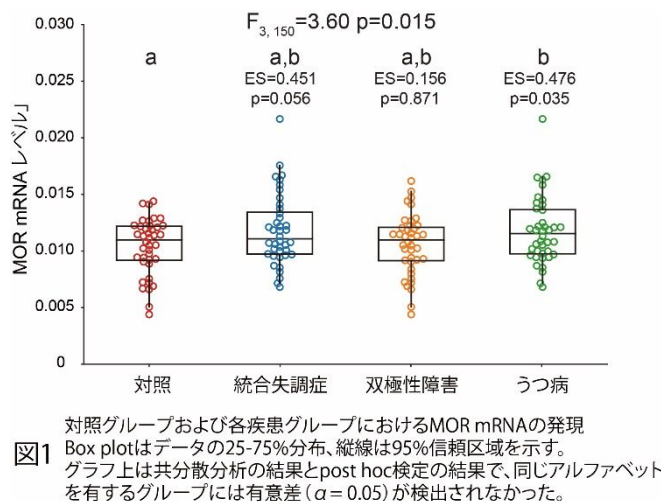
統合失調症の介在ニューロン、特にPVニューロンとSSTニューロンの変化を反映するPVおよびSSTの変化の関係を調べるために、3.1と同じ各40名の対照者および統合失調症患者で背外側前頭前野におけるPVおよびSSTの発現を計測し、MORの発現との相関をピアソンの積率相関

係数と t 検定を用いて調べた。また、錐体ニューロン樹状突起におけるスパインの制御に関与し、統合失調症での低下が報告されているアクチン関連遺伝子 ARPC3、ARPC4 および CDC42 の発現を、各 20 例の対照者および統合失調症患者の背外側前頭前野において計測した。各症例からすべての領域の灰白質を切り出し、Trizol 液に攪拌溶解したサンプルを作製した。各サンプルより得られた RNA を cDNA に変換し、ARPC3、ARPC4 および CDC42 の発現レベルを、特異プライマーを用いて、3.1 と同様に real-time PCR で増幅し、内部標準遺伝子の発現に標準化して発現レベルを決定した。

4. 研究成果

4.1 統合失調症、双極性障害、うつ病の背外側前頭前野における MOR の発現変化

MOR 発現増加の疾患特異性の評価のため、精神神経疾患のない対照者ならびに統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害の患者の背外側前頭前野において MOR mRNA の発現を検討した。それぞれの群に属する 40 名の計 160 名の背外側前頭前野から得られた RNA を用いて、real-time PCR を行い、3 つの内部標準遺伝子の発現に標準化して MOR の発現を定量した結果、MOR の発現は、対照群とくらべ、統合失調症で 11.2%、双極性障害で 3.3%、うつ病で 9.9%増加していた。診断グループを主要因として、性別、年齢、死後経過時間、RNA の保存状態、脳組織の pH を共変数とする分散分析では、診断による有意な影響が検出された ($F_{3,150} = 3.34, p = 0.021$)。post hoc 検定では、対照群とうつ病群の差が有意 ($p = 0.035$) であり、対照群と統合失調症群の差にも有意傾向 ($p = 0.056$) を認めた。一方、対照群と双極性障害群、統合失調症群と双極性障害群には有意な差を認めなかった (図 1)。



4.2 MOR を発現するニューロン種の同定

健常者の大脳皮質では、放射性同位元素の 35-S で標識したプローブにより MOR mRNA の発現は、大脳皮質 1 層から 6 層まで検出された。細胞レベルでは、銀粒子の集積が Nissl 染色により薄い青色で染まるニューロンの核周囲に検出され (図 2 左)、暗視野では集積する粒子の輪郭が錐体状に見えるものもあり (図 2 右)、介在ニューロンに加え錐体ニューロンにおいて MOR mRNA が発現していることが想定された。2 重標識 ISH では、MOR mRNA の銀粒子の集積は、DIG 標識プローブにより検出された PV および SST ニューロンに認められた (図 3)。そして、MOR と PV および MOR と SST の各 2 重標識 ISH で標識されるニューロンを前頭前野の大脳皮質 1 層から 6 層までマッピングを行い、細胞数を算定した (図 4)。

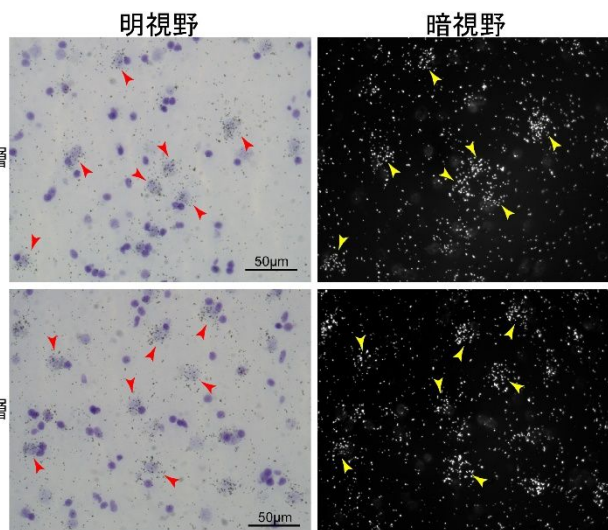


図 2 MOR mRNA の放射ラベルプローブによる検出

MOR と PV の 2 重 ISH では、各症例あたり PV ニューロン 186 ± 76 (計 744) 個、MOR 陽性ニューロン 885 ± 44 (計 3540) 個を特定した。PV ニューロンの中で MOR 陽性のものは $17.5 \pm 4.3\%$ 、MOR ニューロンの中で PV 陽性のものは $3.5 \pm 1.3\%$ であった。同様に MOR と SST の 2 重 ISH では、各症例あたり SST ニューロン 324 ± 144 (計 1297) 個、MOR 陽性ニューロン 1164 ± 145 個を特定した。SST ニューロンの中で MOR 陽性のものは $35.8 \pm 8.7\%$ 、MOR ニューロンの中で SST 陽性のものは $9.8 \pm 4.1\%$ であった。PV および SST との 2 重標識 ISH において、MOR 発現ニューロンの大部分 (96.5% および 91.2%) は PV 陽性でも SST 陽性でもなかった。錐体ニューロンと介在ニューロンが大脳皮質ニューロンのそれぞれ 75% および 25% を占め、PV ニューロンや SST ニューロンが介在ニューロンのそれぞれ 25% を占めることを考慮すると、MOR は錐体ニューロンにも発現していることが考えられた。

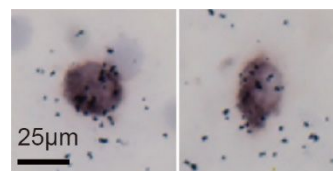


図 3 SST ニューロンにおける MOR mRNA の発現

MORの錐体ニューロンにおける発現を確認するために、ヒト大脳皮質中側頭回の各層より切り出された単一ニューロンのRNA sequencing によって作成された遺伝子発現データベース (Allen Brain Atlas により公開) を用いて MOR を発現するニューロンの特性 (興奮性または抑制性) と層分布を解析した。MOR は皮質 3-6 層において錐体ニューロンの 34-48% に 89-106 count per million read (CPM) の発現が認められた。また MOR は、皮質 2-6 層の介在ニューロンの 14-32% に 135-208 CPM の発現が認められた。すなわち、MOR は介在ニューロンの一部に強く発現すると同時に、多くの錐体ニューロンにも介在ニューロンに比べ低い量で発現していることが判明した。そして、統合失調症の背外側前頭前野において認められたミュー型オピオイド受容体 (MOR) の増加は、抑制性の介在ニューロンのみならず、興奮性の錐体ニューロンにおいて認められる可能性が示唆された。

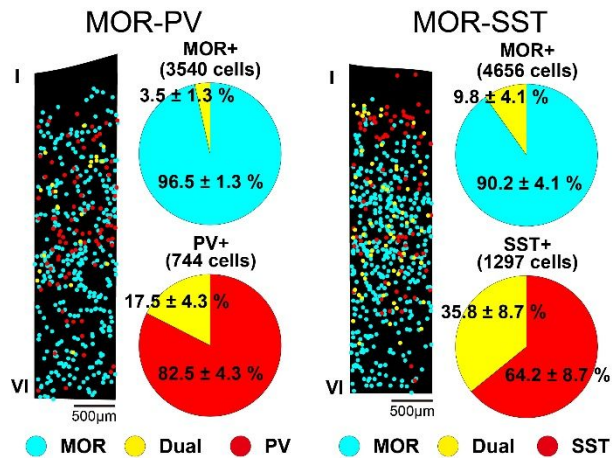


図 4 2重標識 ISH により検出された各 mRNA 陽性ニューロンの大脳皮質 I-VI 層における分布と数

4.3 介在ニューロンおよび錐体ニューロンの変化と MOR の関係について

統合失調症における MOR mRNA の発現増加と介在ニューロンの変化の関係を調べるために、PV ニューロンおよび SST ニューロンの選択的マーカーで、統合失調症で発現低下が多く報告されている PV mRNA および SST mRNA の発現と MOR mRNA の発現の相関関係を、4.1 で用いた対照者および統合失調症患者の各 40 名のデータを用いて評価した (図 5)。その結果、MOR mRNA と PV mRNA との間には、対照者 ($r = 0.09$, $p = 0.583$) および統合失調症患者 ($r = -0.02$, $p = 0.892$) で有意な相関は検出できなかった。MOR mRNA と SST mRNA に関しては、対照者 ($r = -0.17$, $p = 0.289$) で有意な相関は無かったが、統合失調症患者では有意な負の相関が検出された ($r = -0.41$, $p = 0.009$)。

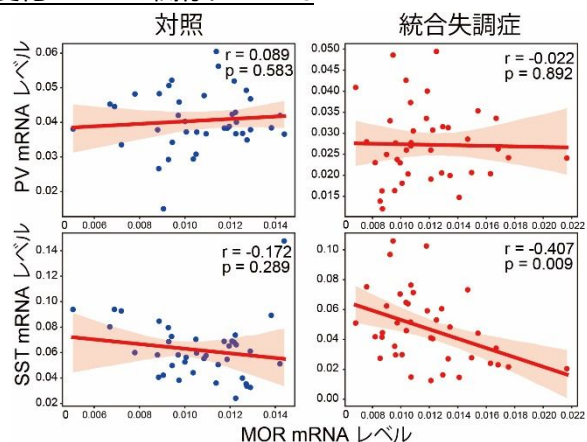


図 5 DLPFC における MOR と PV 又は SST の相関

次に、4.2 で MOR の発現が抑制性の介在ニューロンだけでなく、興奮性の錐体ニューロンにも発現していることが示唆されたことを踏まえ、MOR mRNA の発現増加と錐体ニューロンの変化の関係を調べるために、統合失調症の前頭前野で報告されている錐体ニューロン樹状突起スパインの減少に関連するアクチン関連遺伝子 ARPC3, ARPC4, CDC42 の発現を、対照者と統合失調症患者の各 20 名の背外側前頭前野において計測した。その結果、ARPC4 及び CDC42 に有意な発現変化が検出された。対照者と比べ統合失調症では、ARPC4 の発現は 5.8% ($F_{1,32} = 4.57$, $p = 0.040$) 低下しており、CDC42 の発現は 12.4% ($F_{1,32} = 11.03$, $p = 0.002$) 低下していた。一方 ARPC3 の発現には変化が検出できなかった ($F_{1,32} = 0.15$, $p = 0.903$) (図 6)。そこで、MOR の発現上昇と錐体ニューロンのスパイン減少との関係を評価するために、MOR mRNA と ARPC4 mRNA 又は CDC42 mRNA の発現レベルの相関解析を、対照者および統合失調症患者でそれぞれ行った。その結果 MOR と ARPC4 については、有意な負の相関が対照者 ($r = -0.62$, $p = 0.003$) および統合失調症患者 ($r = -0.46$, $p = 0.012$) で検出され、MOR と CDC42 については統合失調症患者で有意な負の相関が ($r = -0.542$, $p = 0.014$) が検出された (図 7)。

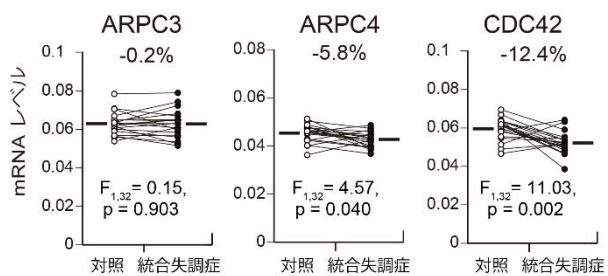


図 6 背外側前頭前野におけるアクチン関連遺伝子の発現変化

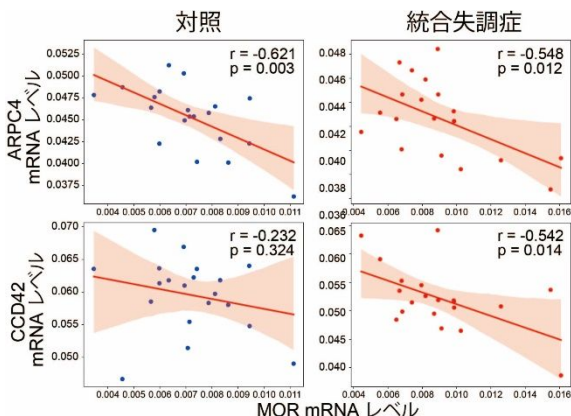


図 7 DLPFC における MOR と CDC42 又は ARPC4 の相関

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kimoto Sohei, Hashimoto Takanori, Berry Kimberly J., Tsubomoto Makoto, Yamaguchi Yasunari, Enwright John F., Chen Kehui, Kawabata Rika, Kikuchi Mitsuru, Kishimoto Toshifumi, Lewis David A.	4. 巻 47
2. 論文標題 Expression of actin- and oxidative phosphorylation-related transcripts across the cortical visuospatial working memory network in unaffected comparison and schizophrenia subjects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 2061 ~ 2070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-022-01274-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takeshi Okuda, Rika Kawabata, Sohei Kimoto, Yufan Bian, Mitsuru Kikuchi, Takanori Hashimoto and David A Lewis
2. 発表標題 Prefrontal transcript levels for GABA neuron subset markers in schizophrenia and mood disorders.
3. 学会等名 76th Annual Meeting, Society of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yufan Bian, Rika Kawabata, Makoto Tsubomoto, Takeshi Okuda, Kohei Kamikawa, Sohei Kimoto, Mitsuru Kikuchi, Takanori Hashimoto and David A. Lewis
2. 発表標題 Activity-regulated transcript expression in pyramidal neurons across cortical regions of a working memory network in schizophrenia.
3. 学会等名 76th Annual Meeting, Society of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hashimoto T, Lewis DA. In: Tamminga CA, Ivleva EI, Reininghas U, Van Os J, eds.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Oxford University Press	5. 総ページ数 700
3. 書名 GABAergic Mechanisms in Psychosis, 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	紀本 創兵 (Kimoto Sohei) (00405391)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	

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			
米国	ピッツバーグ大学精神医学			