

平成 23 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008-2010

課題番号：20591400

研究課題名 (和文)

統合失調症モデル動物および死後脳における神経病理学的検討

研究課題名 (英文)

Neuropathological investigation in the brain of schizophrenia and animal model

研究代表者

入谷 修司 (IRITANI SHUJI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60191904

研究成果の概要 (和文)：今研究は、統合失調症の病態解明を目的とし、神経発達障害仮説を検証するために、統合失調症動物モデルおよびヒト死後脳を用いて、神経病理学的な側面から病態検討をおこなった。その結果、疾患モデルにおいて、神経線維の走行異常や、神経伝達に関わるタンパク発現の相違を見だし、これらの神経伝達物質および神経修飾物質についての疾患における関与が強く示唆された。また、ヒト死後脳においても同様な現象が確認され病態にこういった現象が大きく関与することが明確になった。

研究成果の概要 (英文)：This study will be aiming to clarify the pathophysiology of schizophrenia from the view point of neurodevelopmental hypothesis through investigating the brain of animal model and postmortem human brain neuropathologically. As the results, I found the differences of the formation of neuronal fiber and the appearance of neuromodulator protein or neurotransmitter in the brain of model mouse compared to the control. Also, these findings observed in animal model were detected in the brain of schizophrenia. These facts indicated that there existed the neurodevelopmental problem in the pathophysiology of the schizophrenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症、モデル動物、神経病理、免疫組織学

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の有病率は全人口の約 1%と推量されており、様々な疾病のなかでも頻度の高い疾患のひとつである。この疾患概念を提

唱したクレペリンは、100 年以上前にこの疾患の脳神経細胞に何らかの不可逆的な変化が起きている事を示唆し、アルツハイマーら

神経病理学の先駆者たちもこの疾患の死後脳の顕微鏡的組織観察を精力的におこなった。しかし、有意な所見をみいだされることなく神経病理学的検討はその後衰退して行った。約半世紀前に統合失調症の薬物療法が出現してから医療的なアプローチがめざましく進歩した。様々な薬物開発の結果、臨床薬理学的な理解は進んだが、統合失調症の治療成果は未だ十分とは言い難い。統合失調症の根本的な病態は不明であり、よって根治的な治療法は見いだされない。その高い有病率から、この疾患を克服することは社会的にも急務であり、目下、神経画像研究やゲノム研究、死後脳における神経病理学的研究などの多様な観点から精力的な生物学的研究アプローチがなされている。にもかかわらず統合失調症の病因・病態に関しては未だ混沌としているのが現状である。現時点でこの病態を理解するのに two-hit theory が提唱されている。

すなわち、この疾患の背景には元来の遺伝子上の脆弱性が存在し、それが発生から周産期にいたるある時点で感染や栄養の影響を受け (First hit)、それが脳の発達/成熟に影響を及ぼし、それが思春期や成年前期の結婚や就職といった社会的ストレス (Second hit) が症状発現をひきおこし、さらなる不適切な対応が疾病を進展させるというものである。

CTやMRIなどの、神経画像技術の進歩から、この疾患での脳の Volume の現象が再現性をもって報告されるようになった。Selemonら (Selemon et al 1995) は、統合失調症の脳の volume の変化は統合失調症の神経細胞の細胞体や神経突起の発達が不十分であり、そのために皮質の厚さが減少していると推測し、“reduced neuropil hypothesis”を提唱している。基本的に皮質の neuropil (神経突

起) は、axon と dendrites と前後シナプス器官で構成されている。これらの統合失調症における前頭葉および側頭葉皮質の錐体細胞の神経突起の dendritic spine の減少や dendarite の長さの減少が報告されている (Glantz and Lewis 2000)。しかしながら、こういった脳の現象の神経病理学的な観点からの検証はいまだ十分になされていない。

一方で、この疾患の病態背景として、神経障害発達仮説が提唱されており、神経画像研究の成果やゲノム研究の成果等からこの仮説を支持する報告がなされている。神経発達障害仮説とは、神経の発達や成熟、分化、神経ネットワークの形成には神経伝達物質、神経修飾物質やサイトカインなどの機能が重要で、それらの機能不全がこの病態であるとする仮説である。これを説明する証左としてゲノム研究でみいだされた多くのリスク遺伝子が神経線維の伸長等にかかわっていることなどがあげられる。

さらに、近年の分子精神医学の成果からは、いくつかの統合失調症のリスク遺伝子が前述した脳形態変化や脳神経病理所見と関連することを示唆する報告が相次いでいる。Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) もそのリスク遺伝子の最も有力なひとつであり、統合失調症および感情障害が多発するスコットランドの大家系での研究から見つかった。DISC1 遺伝子はヒト 1 番染色体に存在し、染色体の転座によってカルボキシ末端が切断され、容易に失活化する変異型タンパク質が生成される。この遺伝子について、タンパク質の詳しい機能はまだ明らかにされていないが、これまでの研究から、脳皮質の発生や、神経軸索の伸長に関わる因子であることが示唆されている。また DISC1 は、人脳ではタンパク質レベルで特定関心領域において強く発現していることが明らかになって

おり、これらのことから、統合失調症に関わる重要な遺伝子であると予想されている。

以上の病態の手がかりを元にして、病態解明において神経画像研究成果とゲノム研究成果を結びつける手段として神経病理学的な検討は不可欠な課題である。すなわち、遺伝子的な疾患脆弱性が、脳神経系の形態学的な変化をどのように起こしているかが明らかになれば、神経画像とゲノム研究が結びつけることができ病態理解が大きく進む。Weinberger (2005) らは “genetic cytoarchitecture” の検討は、統合失調症のさらなる病因理解をもたらすことを指摘している。このように、統合失調症の神経病理学的病態検索は非常に重要である。

2. 研究の目的

この研究の目標は、統合失調症のモデルマウスを用いて、脳を神経病理学手に検討し、この疾患において神経形成の病態について明らかにすることである。すなわち、神経伸長、神経シナプスの形成、ネットワークの形成、神経細胞の大きさ、細胞分布、細胞密度などについて検証して病態とどのように関わっているかを明らかにするものである。また、動物モデルで観察された現象が、実際のヒト疾患脳でおきているかを検証する。このことによって、病態把握と治療的な突破口を見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

統合失調症モデル動物として、genetic な背景が明確な 14-3-3 ϵ のノックアウトマウスおよび、薬理的な PCP 投与マウスを用いた。

(1) PCP 投与モデルマウス

脳内のモノアミン神経伝達物質を強くレギュレートする神経伝達修飾物質の VMAT2 (Vesicle Monoamin Transporter 2) に着目して、免疫組織学的染色を施して顕微鏡的組

織観察を行った。生食投与マウスのそれと比較検討をおこなった。

(2) 14-3-3 ϵ ノックアウトモデルマウス

①VMAT2 に関して免疫染色をおこない、同様に顕微鏡的組織観察をおこなった。WILD のマウスのそれと比較検討した。

②ドーパミン神経系の指標である TH

(Tyrosine Hydroxylase) を免疫組織学的に染色し同様に顕微鏡的組織観察をおこなった。WILD のマウスのそれと比較検討した。

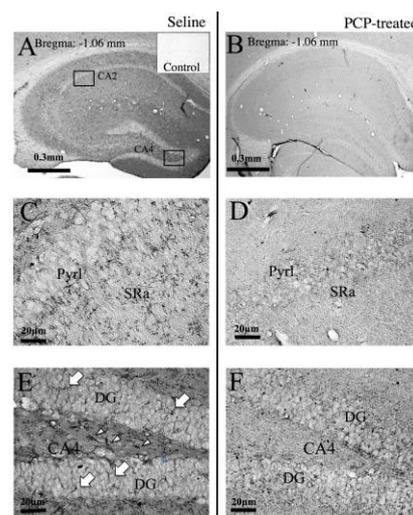
③GABA 神経系の指標である CaBP (Calcium Binding Protein) に着目し、同様に免疫染色を行い、同様に顕微鏡的組織観察をおこなった。WILD のマウスのそれと比較検討した。

(3) ヒト死後脳 (疾患脳および正常対照脳組織) を用いて、モデル動物で観察された現象が観察されるかを検証した。

4. 研究成果

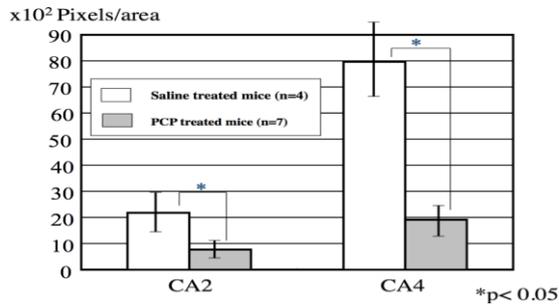
(1) PCP 投与モデルマウスにおける VMAT2 の発現について

モデルマウスおよび対照脳の VMAT 免疫染色顕微鏡像は以下のものであった。



写真で左側列は生食投与対照脳 (A、弱拡大全体像、C、CA2 領域、E、CA4 領域) と右列はモデルマウス脳 (B、D、F、(それぞれ A、C、E に対比する部位)) PCP 投与マウスでは海馬

領域において明らかに VMAT2 の出現が減少していた。これらの出現を、画像解析ソフトを用いてタンパクの出現を定量した。

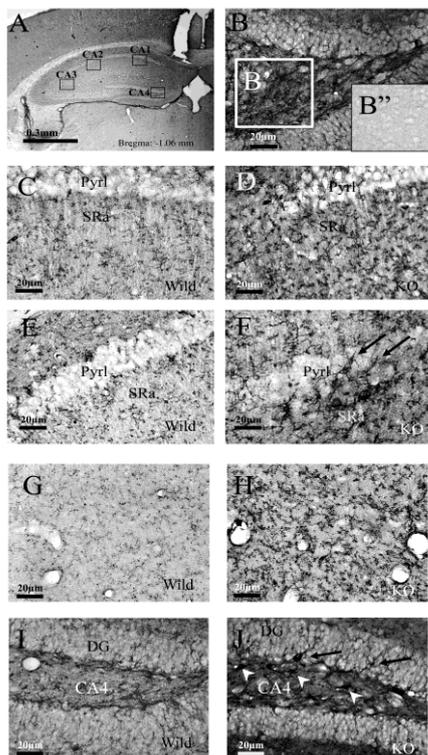


その結果、PCP 投与群に関しては、統計学的に各領域に有意に減少していた（上記グラフ）。

(2) 14-3-3ε ノックアウトモデルマウス

① VMAT2 の出現について

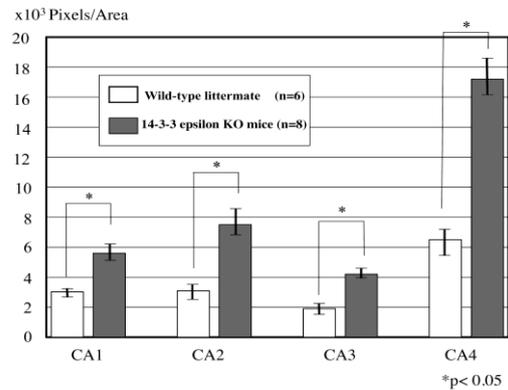
以下の様な海馬領域の顕微鏡観察が得られた。



A : 概観 B : CA4 虜域の強拡大 (B' は B' における免疫反応コントロール試験部位であり、免疫反応物質が VMAT2 であることを確認した) C、E、G、I はそれぞれ Wild マウスの海馬 CA1、2、3、4 領域で、D、F、H、G は

それぞれノックアウトマウスの同部位である。

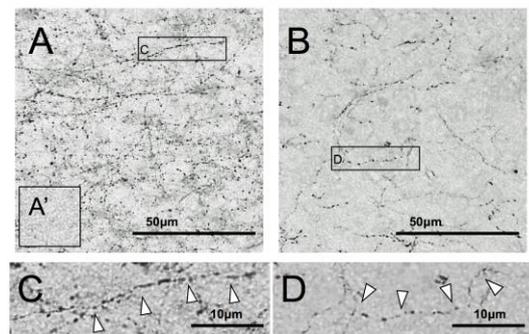
これらを、画像解析ソフトで定量的に発現を



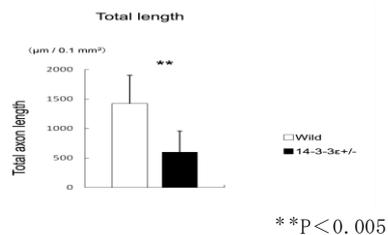
計測すると、ノックアウトマウスでは VMAT2 の発現は有意に増加していた（上記グラフ参照）。

② TH (Tyrosine Hydroxylase) の出現について

以下の様な眼窩面皮質における顕微鏡写真がえられた。



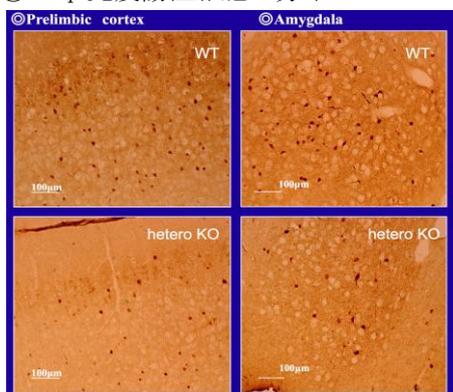
A、C が wild マウスで、B、D、がモデルマウスである。C、D はそれぞれ拡大写真。これらの TH 免疫陽性線維の長さを一定面積あたりで定量すると、モデルマウスで線維の減少がみられた（以下グラフ参照）。



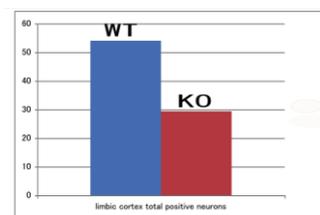
**p < 0.005

このことは、モデルマウスにおいて、ドーパミン系神経ネットワークの形成不全が存在することをしめしていることが考えられる。

③CaBp 免疫陽性細胞の分布



写真上段左は対照 Prelimbic 皮質の、上段右扁桃体の CaBp 免疫陽性細胞の顕微鏡写真で、下段はそれぞれの同部維のモデルマウスの顕微鏡写真である。一定の面積あたりの陽性細胞数を数えると以下のグラフの様になり、モデルマウスで CaBp 含有細胞の減少、すなわち GABA 神経系の障害があることを示唆している。

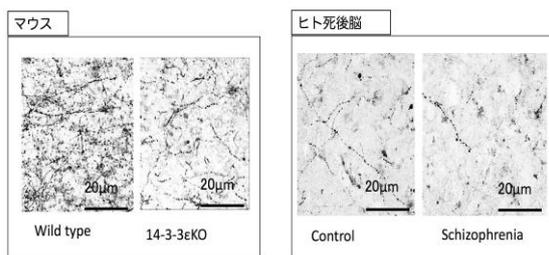


(3) ヒト死後脳の検討

ヒト死後脳の場合はその組織上のテクニカルな問題もあり、実験動物と同じ様に免疫染色を得るのは、時間を要し、現在進行中である。

今までのところ、TH の免疫染色で、上記(2)②で示した様に、モデルマウスで TH 陽性線維の短小化がみられたが、一方死後脳でも前頭葉皮質でも TH 免疫陽性線維の出現に関して統合失調症と同じ傾向の結果が観察された(下記写真)。すなわち、統合失調症脳で

は TH 陽性線維の短小化の傾向があった。現在症例をふやし定量化を行っている。



また、他の VMAT2 や CaBp についても、ヒト死後脳についても検証実験中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- ①Habuchi C, Iritani S et al (全8名中2番目)、Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy、J Neurol Sci.、査読有、30巻、pp. 77-85, 2011
- ②入谷 修司、死後脳研究、精神科、査読無、18巻、pp. 29-35, 2011
- ③Syu A, Iritani S et al (全 18 名中 10 番目)、Association of the HSPG2 gene with neuroleptic-induced tardive dyskinesia、Neuropsychopharmacology、査読有、35 巻、pp. 1155-1164, 2010
- ④Iritani S et al (全 10 名中 1 番目)、Immunohistochemical study of vesicle monoamine transporter 2 in the hippocampal formation of PCP-treated mice、Neurosci Res、査読有、68 巻、pp. 125-130, 2010
- ⑤Iritani S et al (全 7 名中 1 番目)、Immunohistochemical study of vesicle monoamine transporter 2 in the hippocampal region of genetic animal model of schizophrenia、Synapse、査読有、64 巻、pp. 948-953, 2010
- ⑥入谷 修司、統合失調症に組織病理学的異常はあるか、精神医学、査読無、52巻、pp. 329-339, 2010
- ⑦羽瀨知可子、入谷 修司 ほか(全3名中2番目)、脳の老化の神経化学、分子精神医学、査読無、52巻、pp. 105-112, 2010
- ⑧入谷 修司 ほか、(全3名中1番目)、精神科臨床から脳科学へ、日本生物学的精神医

学会誌、査読無、21巻、pp.113-119、2010

〔学会発表〕（計2件）

①関口裕孝、入谷修司ほか、14-3-3 ε hetero K0 マウスの前頭前野と海馬における免疫組織学的検討、第32回日本生物学的精神医学会、2010年9月8日、リーガロイヤルホテル（北九州市）

②鳥居洋太、入谷修司ほか、統合失調症死後脳 Heschl 回、上側頭回における加齢による形態変化、第6回統合失調症学会（発表確定）、2011年3月25日、コラッセふくしま（福島市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入谷 修司 (IRITANI SHUJI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60191904

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：