

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15741

研究課題名（和文）統合失調症の認知機能障害を引き起こす分子機構解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms causing cognitive dysfunction in schizophrenia and development of novel therapeutic strategies

研究代表者

福田 菜由（Fukuda, Mayu）

筑波大学・プレジジョン・メディシン開発研究センター・研究員

研究者番号：60894798

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）：本研究では、統合失調症と因果関係の明確なDf(16)A<sup>+/-</sup>-マウスおよびSetd1a<sup>+/-</sup>-マウスに加え、KMTアイソフォームに関する神経発達障害の単一遺伝子疾患マウスモデルKmt2c<sup>+/-</sup>-マウスおよびKmt2e<sup>+/-</sup>-マウスを使用した各種行動実験や、これらのマウスの前頭前野細胞から得たサンプルを用いて、異なる発達段階におけるトランスクリプトーム解析、メタボローム解析、プロテオーム解析などのマルチオミクス解析の実施を目指した。その結果、それぞれのマウスラインに特徴的な行動異常が観察され、また、それぞれのマウスライン、および異なる発達ステージにおいて複数の異なる遺伝子が変動していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症における認知機能障害はこの疾患の本質であり、長期の治療によっても耐性を示し、患者の社会生活及び社会復帰を拒む。認知機能障害の核となる作業記憶の障害は、推論や認識、意思決定等に深刻な影響を与え、日常生活に重大な支障を来すため、患者本人、家族、地域社会における経済的、社会的負担も大きい。認知機能障害に対する薬剤の開発は、統一病態生理の不在と複雑な遺伝学的構造により依然として困難であり、革新的な治療法の創出が求められている。本研究の成果が、新規治療法・治療薬の開発の基礎となり、将来的に患者本人、および家族の負担軽減に繋がることが期待される

研究成果の概要（英文）：In this study, in addition to Df(16)A<sup>+/-</sup> and Setd1a<sup>+/-</sup>, which have a clear causal relationship with schizophrenia, we conducted various behavioral experiments using Kmt2c<sup>+/-</sup> and Kmt2e<sup>+/-</sup>, which are mouse models of a single-gene disorder of neurodevelopmental disorders related to KMT isoforms, and also aimed to perform multi-omics analyses including transcriptomic, metabolomic, and proteomic analyses at different developmental stages using samples obtained from the prefrontal cortex of the mouse brain. The results showed that characteristic behavioral abnormalities were observed in each mouse line, and that several different genes were up- and down-regulated in each mouse line and at each developmental stage.

研究分野：神経科学

キーワード：統合失調症 22q11.2欠失症候群 認知機能障害

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、陽性症状 (妄想、幻覚や無秩序な思考)、陰性症状 (社会的引きこもりや無気力)、および認知機能障害 (記憶力・注意力・情報処理能力などの機能低下) によって定義される深刻な精神神経疾患である。統合失調症における認知機能障害はこの疾患の本質であり、長期の治療によっても耐性を示し、患者の社会生活及び社会復帰を拒む。従来の抗精神病薬は陽性症状には有効であるが、陰性症状や認知機能障害には効果が限定的であり、特に認知機能障害の核となる作業記憶 (working memory) の障害は、推論や認識、意思決定等に深刻な影響を与え、日常生活に重大な支障を来す。認知機能障害に対する薬剤の開発は、統一病態生理の不在と複雑な遺伝学的構造により依然として困難であり、これまでに認知機能障害に対する承認された治療薬は無く、革新的な治療法の創出が求められている。

22q11.2 欠失症候群 (22q11.2DS) は、染色体領域 22q11.2 のヘミ接合体欠失に起因する染色体異常症の 1 つで、4000 出生例に 1 人の割合で発生し、その約 30% が小児～思春期に統合失調症を発症する。また統合失調症散発例のうち 1~2% がこの欠失を持つが、一般に de novo に起こり、通常 3Mb の長さである。この領域のさらに限定された 1.5Mb の欠失においても統合失調症を高率に発症することから、この 27 遺伝子を含む 1.5Mb 領域は schizophrenia critical region と呼ばれる (図 1. 右上)。この欠失とシンテニクなマウス 16 番染色体上の 27 遺伝子をヘミ接合体欠失させたマウス *Df(16)A<sup>+/+</sup>* (Stark et al., *Nat.Genet.*, 2008; 図 1. 右上) は、シナプス数や樹状突起、軸索の形態異常等の解剖学的接続性の異常 (Mukai et al., *Nat. Neurosci.*, 2008) と、海馬-前頭前野間のシンクロニーの低下や感覚刺激によるアンサンブルの低下等の機能的接続性の異常により、作業記憶の障害を示す (Mukai et al., *Neuron*, 2015)。これらの接続性の異常には、27 遺伝子の 1 つ *Zdhhc8* のコピー数の減少による *Gsk3b* キナーゼの過剰活性化が少なくとも部分的に関与しており、*Gsk3* 阻害剤 SB216763 を発達早期 (P7-P28) に *Df(16)A<sup>+/+</sup>* マウスへ投与すると、8 週齢マウスの解剖学的機能的な接続性の増強と作業記憶の改善を示すことが分かっている (Tamura et al., *Neuron*, 2016)。この発見は、脳内に異常な回路が発生する前の発達早期のステージにおける治療介入の重要性を強調する。マウスの出生後 3 週間は、神経回路の集積及び可塑性の臨界期であり、大量のシナプス形成期と一致するが、出生前後のマウスへのアプローチが技術的困難のため、病的神経回路構築のメカニズムは未だ不明な点が多い。

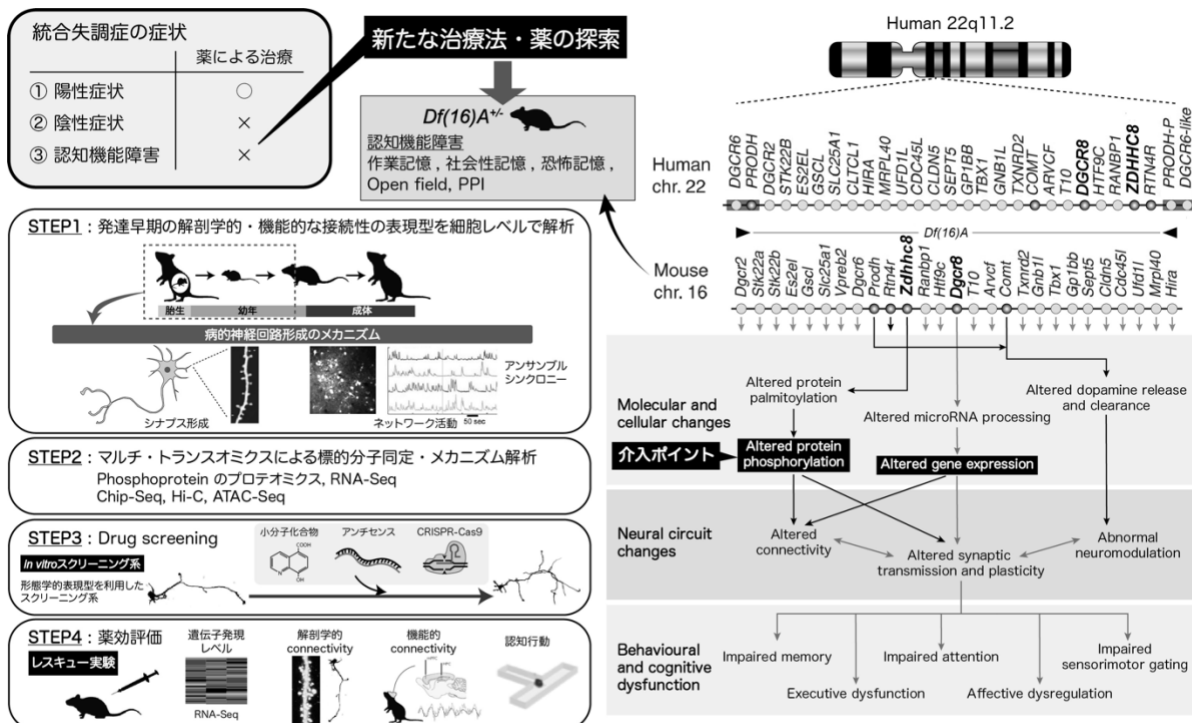


図 1. 本研究計画の概要 (左) と 22q11.2 の病因と病態生理のための Framework (右)

発達早期における CNV による病的神経回路の解剖学的機能的 “dysconnection” の分子基盤と制御機構破綻の解明は、取り組むべき核心的問題である。22q11.2DS は、miRNA プロセッサー *Dgcr8* と *mir185* の両方を CNV 内でヘミ接合体欠失し、その結果、*mir185* の標的遺伝子 *Mirna22* の脱転写抑制が起こり、神経成熟阻害因子 *Mirna22* の発現を増強する (Xu et al., *Cell*, 2013)。そこで、*Df(16)A<sup>+/+</sup>* マウスに *Mirna22* のヘミ接合体欠失を germ line で導入したところ、作業記憶、社会的

記憶などの認知機能障害をレスキューした (Mukai et al., *PNAS*, 2017)。この発見は、CNV 内遺伝子の下流標的遺伝子の発現異常が治療標的になる可能性や miRNA を含む転写制御ネットワークに対するエピゲノム治療薬の可能性を示した。

## 2. 研究の目的

本研究は、統合失調症の認知機能障害に関する病的神経回路形成の分子メカニズムを解明し、治療的介入可能な発達段階における時間枠を特定し、新規治療法の開発に向けた知見を創出することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、以上のような臨床的、科学的背景を鑑み、“統合失調症認知機能障害の難治性”という学術的難問に対して、先行研究の豊富な予備データを基盤として取り組む。具体的には、統合失調症の認知機能障害の分子機構解明と治療法の開発に向けて、以下の研究の遂行を目指した。

*Setd1a* は、統合失調症と最も強固な因果関係を持つ遺伝子の1つである。*Setd1a* はヒストンメチル化酵素 (KMT) をコードしており、KMT はヒストン3のリジン4残基 (H3K4) のメチル化を触媒し、ヒストン脱メチル化酵素 (KDM) とともに転写を制御している。*KMT* アイソフォームにおける Loss of Function rare variant は自閉症を含む神経発達障害の発症リスクを上昇させることが判明している (図2)。

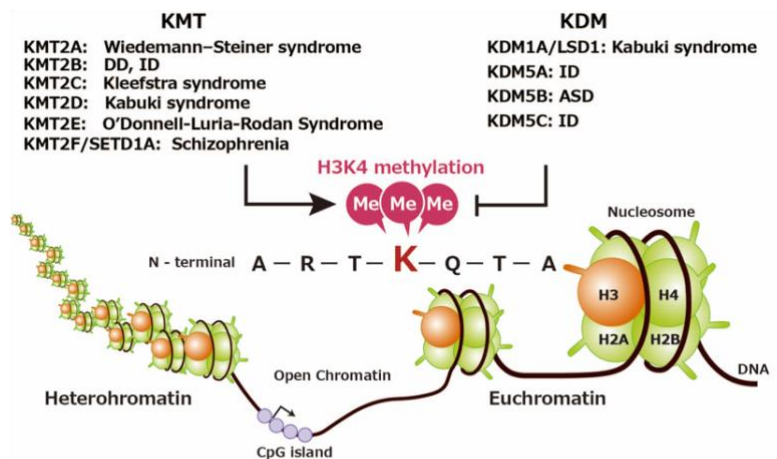


図2. KMTおよびKDM遺伝子が関与する精神神経疾患

本研究では、統合失調症と因果関係の明確な *Df(16)A<sup>+/-</sup>* マウスおよび *Setd1a<sup>+/-</sup>* マウスに加え、*KMT* アイソフォームに関する神経発達障害の単一遺伝子疾患マウスモデル *Kmt2c<sup>+/-</sup>* マウスおよび *Kmt2e<sup>+/-</sup>* マウスを作製し (図2)、これらを使用して各種行動実験や、これらのマウス脳の前頭前野から得たサンプルを用いて、異なる発達ステージごとのトランスクリプトーム解析、メタボローム解析、プロテオーム解析等のマルチオミクス解析を実施する。また、クロマチンと各種 KMT 酵素との相互作用を解析するため、CUT&Tag 法を実施する。これらのマルチ・トランスオミクスによって、認知機能表現型と直結する変化を時間軸に沿って解析し、その標的分子を同定し、発達早期における病的神経回路構築の分子機構を解明する。

## 4. 研究成果

*Df(16)A<sup>+/-</sup>*、*Setd1a<sup>+/-</sup>*、*Kmt2c<sup>+/-</sup>* および *Kmt2e<sup>+/-</sup>* マウスを使用して各種行動実験を実施した。まず、作業記憶障害の有無を測る T-maze テストにおいて、*Df(16)A<sup>+/-</sup>* および *Setd1a<sup>+/-</sup>* マウスと同様に (Mukai et al., *Neuron*, 2015, 2019)、*Kmt2c<sup>+/-</sup>* マウスと *Kmt2e<sup>+/-</sup>* マウスにおいても作業記憶の障害を持つ可能性が高いことが判明した。次に、Social memory を測る 3-Chamber テストでは、いずれのマウスラインにおいても WT と比較した際に顕著な行動差は観察されなかった。一方で、*Df(16)A<sup>+/-</sup>* マウスにおいては、WT と比較して新規マウスに対してもオブジェクトに対しても、WT と比較して接触時間が長くなる傾向があった。次に、活動量および不安行動を測る Open Field テストにおいて、*Df(16)A<sup>+/-</sup>* マウスは WT と比較して総移動距離が長く、Hyperactive であり、またチャンバーのセンターエリアに滞在する時間が短く、不安が強い傾向があった (図3)。*Setd1a<sup>+/-</sup>* マウスでは、活動量および不安行動の両方において、異常行動は観察されなかった。*Kmt2c<sup>+/-</sup>* マウスでは、WT と比較して活動量に有意差が見られ、Hyperactive であったが、不安行動は観察され

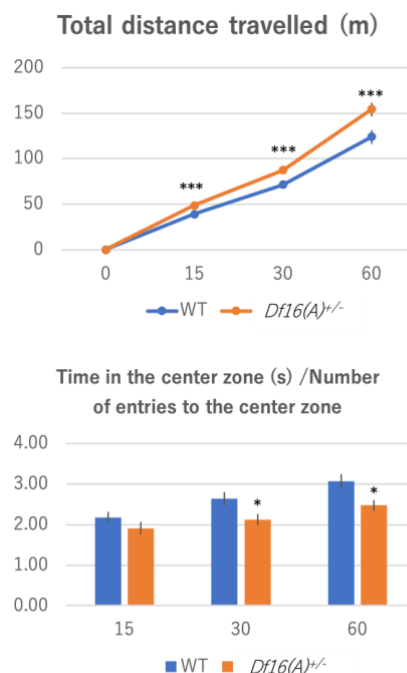


図3. *Df16(A)<sup>+/-</sup>* マウス Open field test 結果

なかった。一方 *Kmt2e*<sup>+/-</sup>マウスは、Hyperactive を示し、さらに不安行動も観察された。

今後同定する計画の標的分子や新規治療薬により、これらのマウスラインに特徴的な行動異常が改善されるかが重要となり、今回観察された行動異常はその指標となると考える。

それぞれのマウスラインを使用し、異なる発達段階【生後1日後 (P1), P7, P14, P28, (P42), P56】において、脳の前頭前野細胞をサンプルとした bulkRNAseq を実施した。その結果、それぞれのマウスライン、および異なる発達ステージにおいて、複数の異なる遺伝子の変動していることが検出された (図4)。

また、当初計画していた ChIP-Seq の代わりに、より精度が高く多くの情報を得られる multi-CUT&Tag による解析を実施することに変更し、マウス前頭前野細胞を用いたプロトコル開発を進めた。pA-Tn5 の精製ステップや、Cocanavalin A coated magnetic beads と細胞の結合ステップにおいて不具合が起り、複数の条件検討によるプロトコルの変更が必要となり時間を要したが、シーケンスをかける前段階のライブラリー作製までのプロトコルの最適化が完了した。

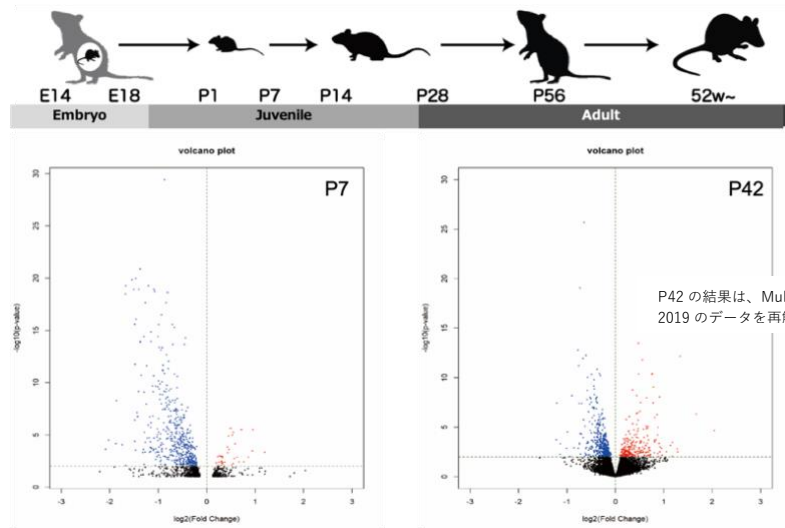


図4. *Setd1a*<sup>+/-</sup> マウスRNAseq結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 向井淳, 福田茉由	4. 巻 286 (6)
2. 論文標題 統合失調症のエピゲノムを標的とした治療薬	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 週刊 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 545 - 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 福田茉由, 向井淳	4. 巻 38 (2)
2. 論文標題 統合失調症の認知機能障害を改善するエピゲノム治療薬の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 精神科	6. 最初と最後の頁 220 - 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田 茉由、Gogos Joseph、向井 淳
2. 発表標題 統合失調症の認知機能障害を改善するエピゲノム治療薬・治療法の探索
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（神戸・オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田 茉由、向井 淳
2. 発表標題 Analysis of the mechanism of pathological neural circuit formation in schizophrenia mouse model
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（沖縄）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田 茉由、 向井 淳
2. 発表標題 Development of epigenome therapeutic agents and treatments to improve cognitive impairments in schizophrenia
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（札幌・オンライン）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	向井 淳  (Mukai Jun)  (70263019)	筑波大学・プレジジョン・メディスン開発研究センター・教授    (12102)	

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	Columbia University		