

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791125

研究課題名（和文） 統合失調症疾患候補遺伝子PCMIのシナプスにおける機能解析

研究課題名（英文） The functional analysis of the Pericentriolar material 1 (PCMI), one of the candidate genes of schizophrenia at synapse

研究代表者

高木 学 (TAKAKI MANABU)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：60452570

研究成果の概要（和文）：

日本人統合失調症と PCMI 遺伝子の機能的 4 多型は関連しなかった。PCMI は胎生期に発現量が増加し、発達の後期まで中心体に留まりシナプスへ分布せず、r-tubulin と同様の特徴がみられた。ARHGEF11 は後シナプスの PSD95 と共在した。また、2 型糖尿病と関連する機能的多型を含む 4 多型で、妄想型統合失調症とも関連した。シナプス蛋白 ARHGEF11 は、2 型糖尿病と統合失調症の共通リスク遺伝子かもしれない。

研究成果の概要（英文）：

Four functional polymorphism of the pericentriolar material 1 (PCMI) gene is not associated with the schizophrenia in a Japanese population. The PCMI protein expresses more in E17 than in adult. The PCMI protein exists at centrosome until D. I. V. 7 days, diminishes until D. I. V. 14 days, and doesn't exist on spine in D. I. V. 28 days. The period of expression and the distribution of PCMI are same with r-tubulin. The human Rho guanine nucleotide exchange factor 11 (ARHGEF11) gene has been reported to be associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Four polymorphism of ARHGEF11 which was reported to be associated with T2DM were also associated with the paranoid subtype of schizophrenia in a Japanese population. ARHGEF11 has co-localized with PSD95, one of the post synaptic marker. ARHGEF11 may be one of the genetic links between schizophrenia and T2DM and have integrated the synaptic morphology through the interaction with Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC-1).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、臨床精神分子遺伝学、Pericentriolar material 1 (PCMI)、シナプス、Bardet-Biedl syndrome (BBS)、The human Rho guanine nucleotide exchange factor 11 (ARHGEF11)、PSD-95

1. 研究開始当初の背景

(1) 統合失調症は、1%の有病率をもち、様々な遺伝的検討により、発症への遺伝的

因の関与が確実であり、根治が困難な慢性疾患であるため、病因や病態の解明が急務となっている。統合失調症患者では、神経病理学

的研究により、海馬、大脳皮質錐体細胞の体積の減少が指摘され、画像研究により、前頭葉の萎縮、側脳室の拡大が指摘されており、中枢神経の器質的変化が存在することが報告されている。この変化は、グリオシスを伴わないで起こるという報告が多く、統合失調症患者の中枢神経系の異常は、発症以前しかも胎生期の神経発達障害にあるという仮説があり、神経発達障害仮説と呼ばれている。神経の形態変化には、シナプス、神経突起、樹状突起の構造変化が関与していると考えられる。この神経発達障害がそれだけで統合失調症の病因となるわけではなく、発症への脆弱性として強く働くと考えられている。

(2) PCM1 は統合失調症、躁うつ病と関連がある 8p22 に存在し、前頭葉萎縮との関係が指摘されている。また、相関研究において複数のグループが有意な結果を得ている。PCM-1 は中心体（セントロソーム）サテライトの構成成分であり、微小管を制御する。また、統合失調症の疾患候補遺伝子の Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC-1)、腎機能障害、多指症、肥満、精神発達遅滞を生じる遺伝性疾患の Bardet-Bedel syndrome (BBS) の原因遺伝子 BBS4 と結合し、大脳皮質の発達における神経遊走に関与している。

(3) 統合失調症の死後脳研究で、シナプスの数が減っていることが報告されている。また、統合失調症は発症が早くとも思春期以降であり、発達におけるシナプスの刈り込み (pruning) が発症と関係していることも推測されている。

(4) NMDA 受容体刺激はシナプスの形成維持に関与している。DISC1 は Kalirin7 と結合し Kalirin7 の Rac1 の活性化作用を阻害する。また、電気生理学的にシナプス活性に影響すること、更に *in vivo* でも DISC1 RNAi がシナプスの数を減らしていることが筆者らにより報告されている。D-セリンなどの NMDA 受容体部分作動薬 (治験中) が統合失調症の陰性症状 (意欲低下、感情鈍麻など) を改善することから NMDA 受容体は臨床との関連も期待されている。

2. 研究の目的

(1) 統合失調症の疾患候補遺伝子の機能解析は、中心体、樹状突起、シナプスに分けて検討が行なわれた。本研究では、PCM1、BBS4 を中心として、神経発達の段階における中心体、樹状突起、スパインへの分布の変化と各段階での機能解析を、*r-tubulin*、ダイナクチンなどの中心体構成タンパク、ダイニン、キネシンなどのモーター蛋白、PSD95 などの

シナプス関連蛋白との関係を通じて検討する。更に、PCM1、BBS4 の RNAi による発現抑制を行い、正常な神経発達の際に見られる上記タンパクの分布や機能にどのような影響を及ぼすかを検討する。DISC1 も細胞の核、中心体、樹状突起、スパインとその神経発達時期に応じて分布しており、DISC1 との関係も合わせて検討する。

(2) PCM1 遺伝子の機能的多型の検討として、既報のない機能的多型 rs412750、rs208753、rs17635381 と、既報で有意差が報告された機能的多型 rs370429 について日本人統合失調症において遺伝子関連解析を行う。

(3) 次に難治の統合失調症に効果があると言われるクロザピンのみが、他の抗精神病薬と異なり NMDA 受容体機能に影響することが知られており、クロザピンを用いて NMDA 受容体の関与について検討する。

(4) PCM1 遺伝子を通じて基礎研究から臨床までの統合失調症の発症と治療メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 成体と胎児ラット脳と、ラットプライマリーカルチャーニューロンを DIV 0、3、5、7、14、21、28 日と経時的に固定し、神経の発達の段階に分け、細胞蛍光抗体染色法にて分布の変化を、免疫染色法にて発現量、分画の変化を併せて検討する。

(2) ラットの脳皮質における発現時期の検討には、胎生期 17 日と成体ラットの脳皮質より蛋白を抽出し、同量の蛋白を Western blot 法にて発現量を確認した。

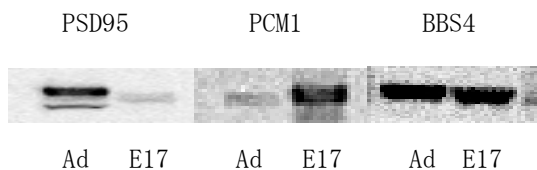
(3) 遺伝子の機能的多型の検討は、末梢白血球から抽出した DNA を用いて、TaqMan assay 法にて行った。本研究は各施設の倫理委員会の承認を受け、対象者全員から同意を書面で得ている。

(4) NMDA 受容体機能への影響はラットプライマリーカルチャーニューロンを DIV 26 日にクロザピンで処置し、28 日に固定し PCM1 蛋白の発現変化をみた。

4. 研究成果

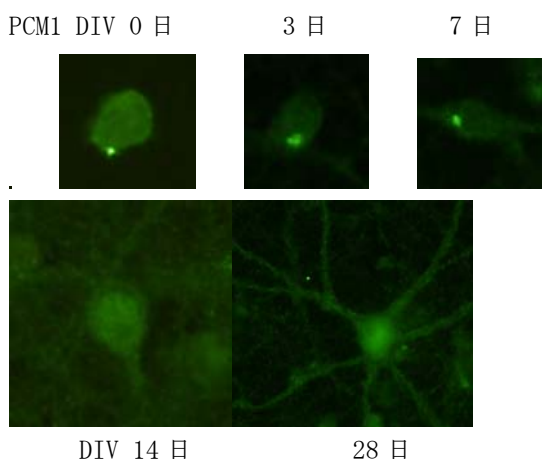
(1) ラットの脳皮質における発現時期 PCM1 は胎生 17 日に多く発現し、成体においては発現量が減少した。ダイナクチン、ダイニンなどの PCM1 結合蛋白も同様であった。BBS4 は胎生期 17 日、成体において発現量は変化が見られなかった。後シナプス蛋白 PSD95 は逆に、成体で発現が多くなった。こ

のことから、PCMI は発達段階の初期において発現量が増加し、脳の正常な発達に参与していることが示唆された。



(2) ラットプライマリーカルチャーニューロンにおける発達段階における分布の変化。r-tubulin、PCMI は、発達の後期まで中心体にとどまるのに対し、ダイナクチン、ダイニン、BBS4 は中心体から発達の早期において消失した。DIV 28 日では、r-tubulin、PCMI は、スパインに分布せず、軸索に留まるのに対し、ダイナクチン、ダイニン、BBS4 はスパインまで分布していた。また PCMI、BBS4 遺伝子を各 RNAi で発現抑制すると、DIV 3 日において、ダイナクチン、ダイニン、PCMI、BBS4 は中心体に分布しなくなったが r-tubulin には影響がなかった。

D.I.V.	中心体						スパイン
	0	3	5	7	14	28	28
r-tub	+	+	+	+	-	-	-
ダイニン	+	+	-	-	-	-	+
ダイナクチン	+	+	-	-	-	-	+
PCMI	+	+	+	+	-	-	-
BBS4	+	-	-	-	-	-	+
DISC1	+	+	?	-	-	-	+
NDEL	+	+	?	-	-	-	+



(3) PCMI 遺伝子の機能的多型の検討
4 機能的多型 (rs412750、rs208753、rs17635381、rs370429) はすべてハーディ・ワインベルグの法則を満たした。4 多型において、アレル頻度、遺伝子型分布は共に統合

失調症患者と健常対照群でいずれも有意な関連を示さなかった。また、rs412750 と rs208753 と rs17635381 の間で連鎖不平衡を認めためハプロタイプ解析をしたところ、破瓜型統合失調症において rs412750-rs208753 の G-A ハプロタイプが危険ハプロタイプとなった (permutation $p=2.5 \times 10^{-3}$)。以上のことから、rs412750-rs208753 の A-G ハプロタイプが、破瓜型統合失調症発症の危険因子となる可能性が示唆された。

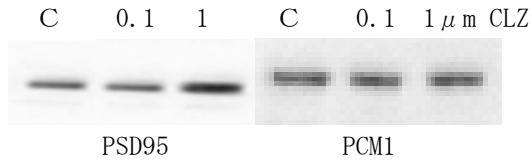
	N	genotype	allele
rs412750 (S159A)		p	p
controls	493		
schizophrenia	466	0.56	0.46
Hebephrenic	229	0.55	0.84
Paranoid	211	0.74	0.48
rs208753 (M597V)			
controls	492		
patients	467	0.72	0.47
Hebephrenic	229	0.60	0.90
Paranoid	213	0.57	0.32
rs17635381 (A691S)			
controls	493		
patients	473	0.18	0.09
Hebephrenic	232	0.51	0.27
Paranoid	215	0.43	0.23
rs370429 (T1543I)			
controls	493		
patients	472	0.88	0.65
Hebephrenic	230	1.00	0.99
Paranoid	216	0.69	0.65

ハプロタイプ解析

rs412750/rs208753	Permutation
Haplotype	p value
G-G	0.43
A-A	0.57
A-G	0.10
G-A	0.0025

(4) PCMI 遺伝子と NMDA 受容体に関する検討
NMDA 受容体と唯一関係があるとされる抗

精神病薬クロザピンによる刺激が、PCM1 を通じてスパインの形態変化に与える影響も検討するために、DIV 28 日においてクロザピンを投与すると、スパインのマーカである PSD95 の発現量は増加したが、PCM1 の発現量には変化が見られなかった。



(5) ARHGEF11 遺伝子の機能的多型の検討

①背景

PCM1 遺伝子は日本人統合失調症において相関がみられず、また、シナプスに分布しない傾向が確認された。そこで、Yeast 2 hybrid 法にて DISC1 結合蛋白である可能性が報告されている、The human Rho guanine nucleotide exchange factor 11 (ARHGEF11) に注目した。

ARHGEF11 は Rho GTPases の特異的な small GTP-binding proteins of Rho families (GEF) であり、ARHGEF11 は、アクチンと結合し、細胞骨格の再構築に関与している。RhoA GTPases は樹状突起、軸索の構成に関与している。また、Rho GTPases は、糖尿病において、 β -cell apoptosis, insulin secretion, insulin signaling に関与している。

一方、統合失調症患者は 2 型糖尿病のリスクが高く 6%~21% で起こると言われ、2~3 倍のリスクといわれている。抗精神病薬の副作用や、生活習慣などの環境要因との関連も考えられるが、初発統合失調症または抗精神病薬で未治療の患者においてもリスクが高まることから、共通の遺伝的要因が存在すると推測されている。

ARHGEF11 遺伝子は Chromosome 1q21 に存在し 2 型糖尿病と統合失調症の共通するリスク部位である。ARHGEF11 遺伝子は、Pima Indians, Old Order Amish, German Caucasians, Koreans, Chinese などアジア人を含む多人種で、2 型糖尿病との関連が報告されている。そこで、今までに 2 型糖尿病と有意であると報告された 8 多型において、日本人統合失調症患者との遺伝子関連研究を行った。

②遺伝子解析

8 多型は Hardy-Weinberg 平衡を逸脱していなかった。統合失調症患者全体では有意差を認めなかったが、妄想型統合失調症では、機能的多型を含む、rs822585, rs6427340, rs6427339, rs868188 (S1456G) で有意差を認めた ($P=0.031$, $P=0.036$, $P=0.023$, $P=0.020$)。オッズ比は、1.34, 1.33, 1.36, 1.31 であった。一方、破瓜型統合失調症にお

いて有意差はみとめなかった。

妄想型統合失調症において、rs945508 (R1467H) のアレル頻度は、 $P=0.053$ と有意傾向にとどまったが、マイナーアレルである A allele 保持者は $P=0.046$ と有意差を認めた。他にも、妄想型統合失調症において、rs822585, rs6427340, rs6427339 のマイナーアレル保持者が有意に多かった ($P=0.030$, $P=0.036$, $P=0.045$)。

		Genotype	Allele	
rs822585	5' flank	P value	P value	
Control	488			
Schizophrenia	462	0.34	0.15	
Paranoid	209	0.093	0.031	
Hebephrenic	228	0.91	0.7	
rs6427340	Intron2			
Control	490			
Schizophrenia	475	0.58	0.3	
Paranoid	215	0.1	0.036	
Hebephrenic	234	0.99	0.93	
rs6427339	Intron2			
Control	489			
Schizophrenia	475	0.19	0.12	
Paranoid	213	0.095	0.023	
Hebephrenic	235	0.12	0.38	
rs1006168	Intron6			
Control	493			
Schizophrenia	467	0.98	0.89	
Paranoid	212	0.81	0.57	
Hebephrenic	229	0.74	0.52	
rs12136088	Intron8			
Control	494			
Schizophrenia	474	0.85	0.59	
Paranoid	215	0.91	0.77	
Hebephrenic	233	0.63	0.33	
rs2275199	(N1207N)			
Control	492			
Schizophrenia	480	0.8	0.75	
Paranoid	217	0.27	0.11	
Hebephrenic	236	0.56	0.4	

rs868188 (S1456G)			
Control	496		
Schizophrenia	480	0.73	0.48
Paranoid	216	0.056	0.02
Hebephrenic	236	0.41	0.36
rs945508 (R1467H)			
Control	488		
Schizophrenia	484	0.56	0.27
Paranoid	219	0.13	0.053
Hebephrenic	238	0.36	0.89

③ハプロタイプ解析

rs822585, rs6427340, rs6427339, rs1006168, rs12136088 (*D'* ranging between 0.86 and 0.98) を含む block1 と、rs2275199, rs868188 (S1456G), rs945508 (R1467H) (*D'* ranging between 0.83 and 0.97) を含む block 2 の二つの LD blocks を認めた。

block1 は rs6427340-rs6427339-rs1006168 (global $P=0.00099$) が、最も有意差を認め、block2 は、機能的多型を含む、rs2275199-rs868188 (S1456G)-rs945508 (R1467H) (global $P=0.00066$) が、最も有意差を認めた。block 1 において、rs6427340-rs6427339-rs1006168 の C-T-A haplotype が妄想型統合失調症と関連がみられた ($P=0.019$)。block 2 において、rs2275199-rs868188 (S1456G)-rs945508 (R1467H) の C-G-G, T-A-A, T-G-G haplotype が妄想型統合失調症と関連がみられた (individual $P=0.0046$, $P=0.017$, $P=0.017$)。rs2275199-rs868188 (S1456G)-rs945508 (R1467H) の T-A-A, T-G-G haplotype が、統合失調症の危険因子であり、rs6427340-rs6427339-rs1006168 の C-T-A haplotype と rs2275199-rs868188 (S1456G)-rs945508 (R1467H) の C-G-G haplotype が、保護的因子であることが推測された。

	<i>P</i> value
Block1	
rs6427340-rs6427339-rs1006168	0.00099
Block2	
rs2275199-rs868188 (S1456G)-rs945508 (R1467H)	0.00066

④以上よりの考察

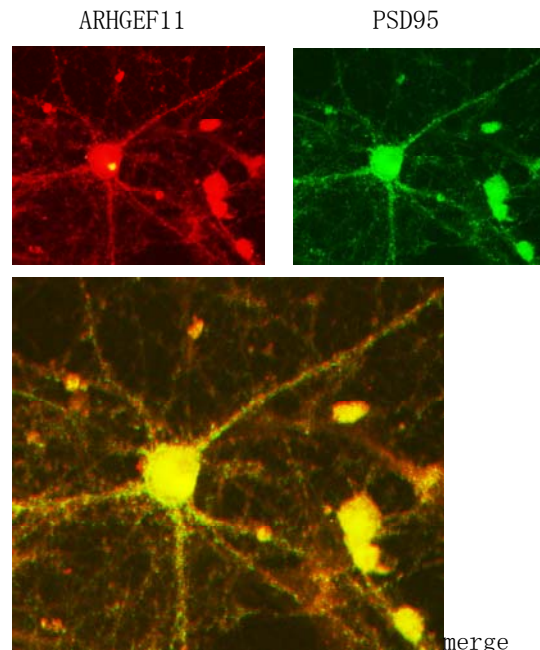
rs868188 (S1456G) と rs945508 (R1467H) は機能的多型であり、rs868188 (S1456G) の

serine から glycine への変化は、細胞骨格構造を変化させる可能性がある。ARHGEF11 の蛋白結合の変化が、RhoA GTPases の機能に影響を与え、軸索伸長やシナプス形成に影響をあたえるかもしれない。

ARHGEF11 mRNA は、健常者と比較して、統合失調症患者の死後脳の視床で発現が多いことが知られている。視床は、様々な機能をつかさどる神経と連絡しており、統合失調症患者の幻覚に関連があるという報告がある。妄想型は幻覚妄想などの陽性症状を主体とし、破瓜型は無為自閉などの陰性症状を主体とするが、ARHGEF11 遺伝子が妄想型統合失調症においてのみ関連がみられたことは、何かの関係があるのかもしれない。

rs945508 (R1467H) のマイナーアレルである A allele (GA + AA genotype) の頻度が、妄想型統合失調症でも有意に低下していた。この多型は、多人種において、2 型糖尿病において有意な関連が報告されており、rs945508 は、2 型糖尿病と統合失調症の遺伝子リンクの一つの可能性はある。

(6) ARHGEF11 蛋白のシナプスでの機能解析
ARHGEF11 は、PSD95 と co-localize することが示され、ARHGEF11 はシナプス関連蛋白であることが予想された。DISC1 は、賦活的に働く Rac1 の GEF である KALRN と結合し、かつ、逆に機能する RhoA の GEF である ARHGEF11 と結合することでシナプスの機能を制御し、統合失調症の病態に関係している可能性がある。現在も、細胞や動物実験によって、DISC1 との関連を中心に ARHGEF11 の機能解析を継続している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

(1) Blonanserin, an antipsychotic and

dopamine D(2)/D(3) receptor antagonist, and ameliorated alcohol dependence. Takaki M, Ujike H. Clin Neuropharmacol. 2013 36(2):68-9. 査読有り. doi: 10.1097/WNF.0b013e318280028a.

(2) Blonanserin improved dystonia induced by risperidone or olanzapine in two patients with schizophrenia. Takaki M, Mizuki Y, Miki T. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. In press. 査読有り

(3) Adjunctive yokukansan treatment improved cognitive functions in a patient with schizophrenia. Sakamoto S, Ujike H, Takaki M, Mizuki Y, Okahisa Y, Kodama M, Uchitomi Y, J Neuropsychiatry Clin Neurosci. In press. 査読有り

(4) Efficacy and tolerability of blonanserin in 48 patients with intractable schizophrenia. Takaki M, Okahisa Y, Kodama M, Mizuki Y, Sakamoto S, Ujike H, Uchitomi Y. Acta Neuropsychiatrica 2012 (24): 380-383. 査読有り. DOI:10.1111/j.1601-5215.2012.00663.x

(5) High doses or rapid dose escalation of aripiprazole may be more effective for treating schizophrenia. Takaki M, Bunta Yoshimura. Clinical Neuropharmacology and Therapeutics, 2012 (3) 3-4. 査読有り.

(6) Okahisa Y, Kodama M, Takaki M, Inada T, Uchimura N, Yamada M, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Ujike H. Association between the Regulator of G-protein Signaling 9 Gene and Patients with Methamphetamine Use Disorder and Schizophrenia. Curr Neuropharmacol. 2011 9(1): 190-4. 査読有り. doi: 10.2174/157015911795017029.

(7) Okahisa Y, Kodama M, Takaki M, Inada T, Uchimura N, Yamada M, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Ujike H. Association Study of Two Cannabinoid Receptor Genes, CNR1 and CNR2, with Methamphetamine Dependence. Curr Neuropharmacol. 2011 9(1):183-9. 査読有り. doi: 10.2174/157015911795017191.

(8) Yokobayashi E, Ujike H, Kotaka T, Okahisa Y, Takaki M, Kodama M, Inada T, Uchimura N, Yamada M, Iwata N, Iyo M, Sora

I, Ozaki N, Kuroda S. Association study of serine racemase gene with methamphetamine psychosis. Curr Neuropharmacol. 2011 9(1):169-75. 査読有り. doi: 10.2174/157015911795017092.

(9) Ujike H, Kishimoto M, Okahisa Y, Kodama M, Takaki M, Inada T, Uchimura N, Yamada M, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N. Association Between 5HT1b Receptor Gene and Methamphetamine Dependence. Curr Neuropharmacol. 2011 9(1):163-8. 査読有り. doi: 10.2174/157015911795017137.

(10) Hayashi-Takagi A, Takaki M, Graziane N, Seshadri S, Murdoch H, Dunlop AJ, Makino Y, Seshadri AJ, Ishizuka K, Srivastava DP, Xie Z, Baraban JM, Houslay MD, Tomoda T, Brandon NJ, Kamiya A, Yan Z, Penzes P, Sawa A. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac-1. Nat Neurosci. 2010 13(3):327-32. 査読有り. doi: 10.1038/nn.2487.

(11) Okahisa Y, Ujike H, Kunugi H, Ishihara T, Kodama M, Takaki M, Kotaka T, Kuroda S. Leukemia inhibitory factor gene is associated with schizophrenia and working memory function. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2010 34(1):172-6. 査読有り. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.10.020.

[学会発表] (計 3 件)

(1) 水木寛、高木学、酒本真次、岡久祐子、児玉匡史、氏家寛、内富庸介、第 34 回日本生物学的精神医学会 (神戸)、「2 型糖尿病疾患候補遺伝子 ARHGFB11 の統合失調症における関連解析」、2012/9/28-30

(2) 酒本真次、高木学、水木寛、岡久祐子、児玉匡史、氏家寛、内富庸介、第 34 回日本生物学的精神医学会 (神戸)、「PCMI 遺伝子と統合失調症の関連解析」、2012/9/28-30

(3) 高木学、水木寛、酒本真次、岡久祐子、児玉匡史、氏家寛、内富庸介、第 34 回日本生物学的精神医学会 (神戸)、「抗精神病薬ハロペリドール、クロザピン、アリピプラゾールのスパインへの影響と作用機能の検討」、2012/9/28-30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 学 (TAKAKI MANABU)

岡山大学病院精神科神経科・助教

研究者番号: 60452570