

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月19日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791340

研究課題名（和文）神経免疫異常による統合失調症発症機構としてのエピジェネティック異常
研究課題名（英文）Aberrant neuro-immune responses are involved in abnormalities of epigenetic mechanisms in schizophrenia.

研究代表者

関 善弘（SEKI YOSHIHIRO）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30597274

研究成果の概要（和文）：近年、急速に発達したイメージング研究により、ミクログリアが統合失調症の病態に深く関わるようになってきた。ミクログリアは炎症性サイトカインの産生を介して白質に異常をきたし、病態を形成することが明らかになりつつある。また、統合失調症モデル動物においてオリゴデンドロサイト障害が指摘されており、活性化ミクログリアがオリゴデンドロサイトに影響を及ぼすことが想定されているが、いまだ詳細な報告はない。そこで本研究では活性化ミクログリア／オリゴデンドロサイトの共培養系を用いて、活性化ミクログリアと共培養後のオリゴデンドロサイトの病理学的変化について検討を行い、以下の①-③の結果を得た。①活性化ミクログリアはオリゴデンドロサイトにアポトーシスを誘導した。②非定型抗精神病薬であるアリピプラゾール（ARI）と抗生物質であるミノサイクリン（MINO）はオリゴデンドロサイトのアポトーシスを抑制した。③MINOは活性化ミクログリアの細胞内において Signal Transduction and Activator of Transcription（STAT）-1 のリン酸化を抑制し、炎症性サイトカインの産生を減少させていた。本実験の結果を受け、統合失調症モデル動物で *in vitro* 実験の結果を検証すべく、免疫組織学的検索、分子生物学的検索や、代謝イメージング法などを用いた動物実験を推進している。

研究成果の概要（英文）：Recent imaging studies have indicated that the pathophysiology of schizophrenia is closely related to white matter abnormalities and microglial activation. Additionally, clinical trials have suggested that minocycline, an antibiotic with inhibitory effects on microglial activation, improves symptoms of schizophrenia. We have reported that not only atypical antipsychotics with dopamine D2 receptor (D2R) antagonism but also aripiprazole. A unique antipsychotic drug with D2R partial agonism, inhibit microglial activation *in vitro*. Thus, antipsychotics may exert a beneficial influence on both of microglia and oligodendrocytes, while these mechanisms have not been clarified. Here, we investigated whether antipsychotics suppress oligodendrocyte damage by suppressing microglial activation utilizing co-culture model with microglia and oligodendrocytes. Aripiprazole and minocycline suppressed the apoptosis of the oligodendrocytes in the co-culture model with interferon- γ (IFN- γ)-activated microglia, while haloperidol, a traditional antipsychotic drug, did not. Aripiprazole and minocycline inhibited the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) from IFN- γ -activated microglia. Moreover, aripiprazole and minocycline attenuated the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) in microglia. Overall, our results suggest that aripiprazole and minocycline may have antipsychotic effects through reducing oligodendrocyte damage caused by microglial activation. These results put forward a novel therapeutic hypothesis in schizophrenia research. Future *in vivo* studies to confirm the present results should also be performed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：ミクログリア、オリゴデンドロサイト、ミノサイクリン、STAT1、SOCS1

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は世界的に100人に1人の罹病率で、幻覚妄想などの陽性症状と人格荒廃などの陰性症状を主とする代表的精神疾患である。近年、急速に発達したイメージング研究により、ミクログリアが統合失調症の病態に深く関わるようになってきた。ミクログリアは炎症性サイトカインの産生を介して白質に異常をきたし、統合失調症の病態を形成することが明らかになりつつある。また、本疾患モデル動物においてミエリン障害が指摘されており、活性化ミクログリアがオリゴデンドロサイトに影響を及ぼすことが想定されている。しかしながら、いまだ詳細な報告はなく、医学の進展が熱望される分野である。

2. 研究の目的

本研究では、白質の異常を、特にオリゴデンドロサイトの反応に着目して、細胞レベルで検討し、エピジェネティクス要因が関与する精神疾患の病態機序についての研究の先駆けとし、将来の治療法開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 初代培養オリゴデンドロサイトへの分化誘導

生後3日目SDラットの脳から脳室下帯から分散培養を行い、EGFおよびFGFの存在下で細胞培養を行う。グリア前駆細胞が増殖した段階で甲状腺ホルモンであるT3、およびT4を添加し、オリゴデンドロサイトへ分化誘導を施行した。

(2) 活性化ミクログリアと初代培養オリゴデンドロサイトの共培養

準備した初代培養オリゴデンドロサイトとIFN- γ で活性化させたミクログリア細胞株(HAPI細胞; Drs. Morales NP. and Hyodo F. 両博士より供与を受けたミクログリア細胞株)を共培養に付し、24時間培養した後に、オリゴデンドロサイトの形態学的変化、および免疫組織学的変化(Cleaved caspase-3)を観察した。また、将来の医療応用に向けて、同様の実験系を用い、抗生物質であるが、さ

まざまな薬効が知られているミノマイシン(MINO)を活性化ミクログリアに前投与し、オリゴデンドロサイト保護作用の有無について検討を加えた。上記実験については、すでに臨床的に効果が認められている非定型抗精神病薬であるアリピプラゾール(ARI)と比較しながら実験を行った。

(3) Real-time PCR (iNOSとTNF- α)

活性化ミクログリアにおいて、MINOがもつ炎症性サイトカイン産生抑制効果を検討するため、iNOS、TNF- α に対してmRNAレベルで検討した。

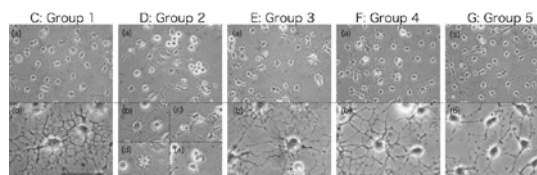
(4) リン酸化STAT-1に対する免疫細胞染色

活性化ミクログリアにおけるARIやMINOの分子標的を検索するため、JAK-STAT経路から、STAT-1のリン酸化抑制効果について免疫細胞学的に検討した。

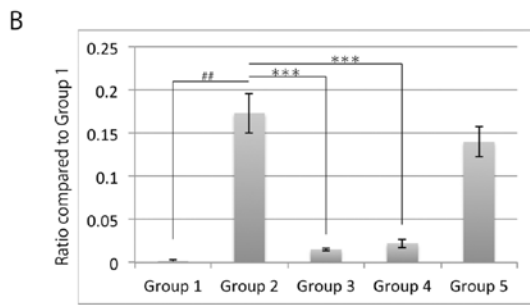
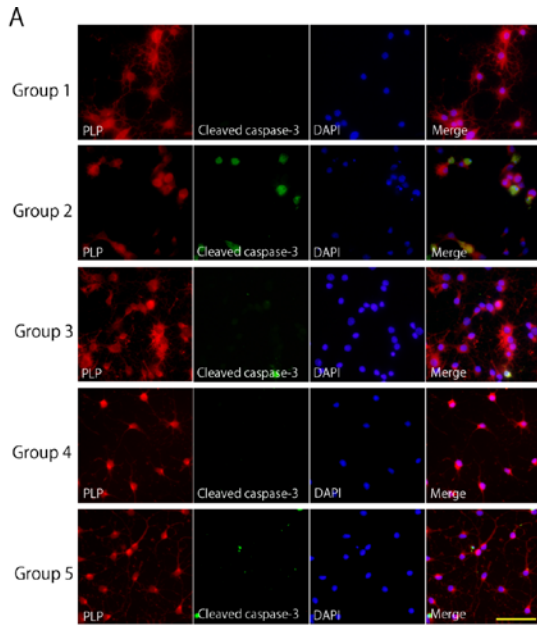
4. 研究成果

①活性化ミクログリアはオリゴデンドロサイトにさまざまな変性変化(D)を引き起こすが、MINO(E)と非定型抗精神病薬であるアリピプラゾール(ARI)(F)はオリゴデンドロサイト変性変化を抑制した。

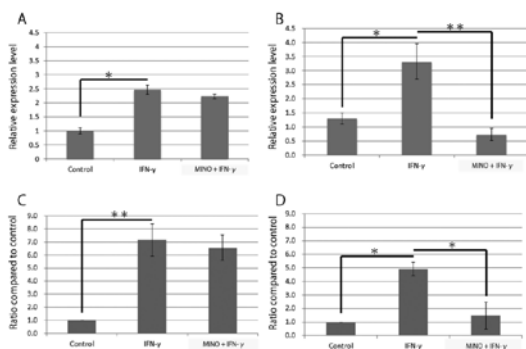
古典的抗精神病薬であるハロペリドール(HAL)(G)前投与群は細胞死や空砲変性(D-c, d,やe)は認められなかったが、オリゴデンドロサイトの突起の断片化という初期の変性変化が観察された。



②Cleaved caspase-3に対する免疫細胞染色の結果を示す。活性化ミクログリア(IFN- γ 刺激)と共培養した初代培養オリゴデンドロサイトはコントロール群よりアポトーシスを有意に誘導した(Group 2)。MINO(Group 3)およびARI(Group 4)はオリゴデンドロサイトのアポトーシスを有意に抑制した。HAL(Group 5)は抑制しなかった。

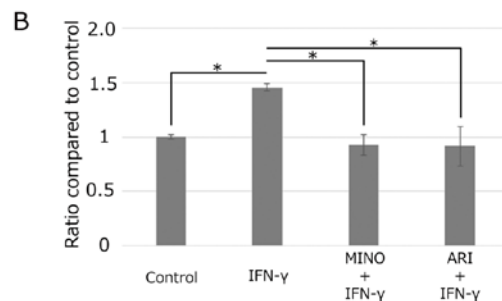
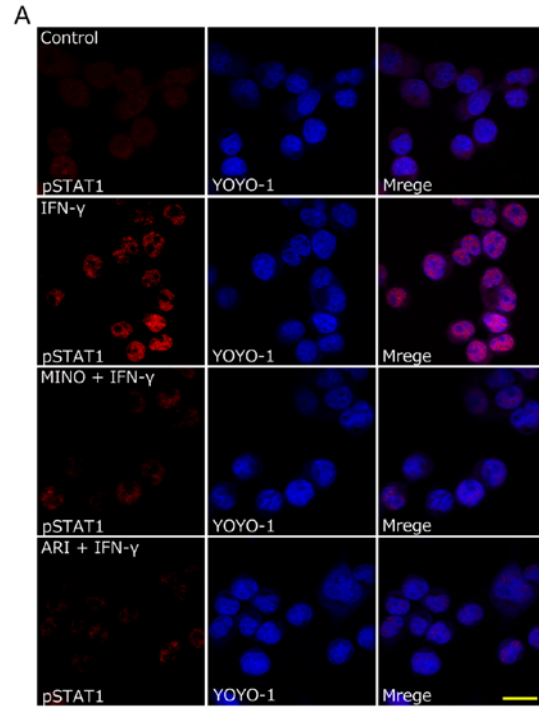


③活性化ミクログリアにおける MINO の炎症性サイトカイン産生抑制効果を Real-time PCR 法、および ELISA 法で解析した。IFN- γ で刺激した HAPI 細胞は iNOS および TNF- α の mRNA の発現量が上昇し、MINO は iNOS および TNF- α の mRNA の発現を抑制した (A と B)。MINO は培養液中に放出される NO₂ の産生は抑制せず (C)、TNF- α の産生は抑制した (B)。



④活性化ミクログリアにおける MINO および ARI の STAT-1 のリン酸化抑制効果を示す。活性化ミクログリア (IFN- γ 刺激) はリン酸化 STAT-1 (p-STAT-1) の発現が細胞核内に認められた。

MINO、および ARI を前投与した活性化ミクログリアにおいては、p-STAT-1 の発現は有意に抑制されていた。



結果のまとめ

活性化ミクログリアはオリゴデンドロサイト傷害作用をもつ。

その障害作用は MINO、および ARI の前投与で抑制される。

MINO、および ARI を前投与した活性化ミクログリアと共培養したオリゴデンドロサイトは、MINO、および ARI 前投与群よりもアポトーシスが誘導されなかった。

活性化ミクログリアにおいて MINO は iNOS の mRNA の発現を抑制しなかったが、TNF- α の mRNA の発現を抑制した。

活性化ミクログリアにおいて MINO は NO₂ の放出は抑制しなかったが、TNF- α の放出

は抑制した。

MINO、および ARI を前投与した活性化ミクログリアにおいて p-STAT-1 の核内で染色されなかったことから、STAT-1 のリン酸化が抑制されていたことが示唆された。

以上の結果から、MINO や ARI は活性化ミクログリアにおける STAT-1 のリン酸化を抑制することで炎症性サイトカインの産生を減少させ、オリゴデンドロサイトに対し保護作用を示すと考えられた。今後は統合失調症モデル動物で *in vitro* 実験の結果を検証すべく、免疫組織学的検索、分子生物学的検索や、代謝イメージング法などを用いた動物実験を推進する予定である。

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 0 件)

なし。

〔学会発表〕(計 0 件)

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 善弘 (SEKI YOSHIHIRO)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：30597274

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：