

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591681

研究課題名(和文)統合失調症リスク遺伝子Disc1欠損マウスの解析

研究課題名(英文)Analysis of mice that carry disruption in Disc1, a schizophrenia risk gene

研究代表者

三好 耕 (MIYOSHI, Ko)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：90362996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、統合失調症リスク遺伝子Disc1を欠損するマウスと遺伝子欠損が無い野生型マウスとの差異の有無を調べた。脳各部位での細胞構築やニューロンの突起進展、発生期大脳皮質や成獣海馬歯状回における神経新生については両者に差異は見られなかった。精神疾患に関連する行動学的試験では、Disc1欠損マウスは野生型マウスよりも活動性が高く、また場所に対する恐怖条件付けの成績が低かった。

研究成果の概要(英文)：Disc1 is a risk gene of schizophrenia, a common psychiatric disease. In this research, difference between Disc1-lacking mice and wild-type mice was analyzed. No significant difference was found in regard to the cell architecture and neurite extension of neurons in various brain regions, and to neurogenesis in the developing cerebral cortex and in the hippocampal dentate gyrus of adult mice. In the behavior tests implicated as a hallmark for psychiatric disorders, Disc1-lacking mice demonstrated higher locomotor activity and a lower score in the contextual fear conditioning compared to wild-type mice.

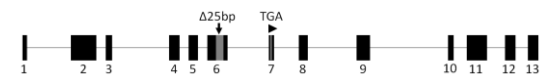
研究分野：神経科学

キーワード：Disc1

1. 研究開始当初の背景

統合失調症リスク遺伝子とされる *Disrupted-in-Schizophrenia-1* (*Disc1*) は、2000年にスコットランドの染色体転座を持つ精神疾患多発家系から同定された (Millar et al. *Hum Mol Genet* 2000)。転座保有者は統合失調症のみならず、気分障害を含む多彩な精神疾患を高率に発症するため、*Disc1* は複数の精神疾患に共通の脆弱性に関わると考えられている。同家系で見つかった変異 (片方の1番と11番染色体の転座により、1番染色体上の *Disc1* が切断される) は *rare mutation* である。一方、*Disc1* と統合失調症、うつ病等との関連を支持、あるいは否定する多くの遺伝研究がその後発表された (Mathieson et al. *Mol Psychiatry* 2011)。並行して *Disc1* の機能についても多数の研究が細胞レベルおよび生体で行われ、多くの結合因子も同定された。研究代表者らは *Disc1* の結合因子として、*FEZ1*、*pericentrin* (*kendrin*)、*DBZ* を見出すとともに、*Disc1* が培養細胞で神経突起の進展に関与することを報告した (Miyoshi et al. *Mol Psychiatry* 2003; Miyoshi et al. *BBRC* 2004; Hattori et al. *Mol Psychiatry* 2007)。一方、129系のマウスは自然発症で *Disc1* 遺伝子の Exon 6 に 25塩基対の欠損を持つことが見出された (Clapcote et al. *Genetics* 2006)。この欠損によりフレームシフトが起こり、Exon 7に終止コドンが生じる [図1]。この変異を持ちつつも系統を維持している 129系マウスの *Disc1* 発現様式は、未だ解明されていない。研究代表者は 129系の *Disc1* 欠損変異を 10回以上の戻し交配により C57BL/6J系に導入した。出生直後の野生型、ホモ変異型の全脳から RNA を抽出し、RT-PCR法により種々の primer pair で Exon 6 を含む cDNA 領域を増幅したところ、Exon 6 を欠く産物は検出されなかった。すなわち全ての *Disc1* アイソフォームは Exon 6 を含み、ホモ変異型では

Disc1 は短い変異型タンパクとしてのみ生成され得ると考えられた。*Disc1* 抗体を用いたウェスタンブロットで出生直後の全脳ホモジネートを解析したところ、野生型では約 100kDa の全長型 *Disc1* に由来すると思われるバンドを認めた。一方、ホモ変異型では全長型のバンドのみならず、Exon 1~7 から生成され得る短い *Disc1* (予想値 58kDa) のバンドも検出されなかったことから、短い *Disc1* は生体で不安定であると考えられた。以上より、ホモ変異型は実質的に *Disc1* 欠損マウスであると考えられた。



[図1] 129系のマウスは *Disc1* 遺伝子の Exon 6 に 25塩基対の欠損を持つ。この欠損によりフレームシフトが起こり、Exon 7に終止コドン (TGA) が生じる。

2. 研究の目的

統合失調症リスク遺伝子 *Disc1* の機能を明らかにするという全体構想の中で、*Disc1* 欠損マウスを作製した。本研究は、*Disc1* 欠損マウスの脳各部位での細胞構築やニューロンの突起進展、発生期大脳皮質や成獣海馬歯状回における *neurogenesis*、新生ニューロンの *migration*、*integration* を観察すると共に、精神疾患に関連する一連の行動実験を行い、野生型との比較により、*Disc1* の欠失が組織学的、発生学的、行動学的な異常を惹起するか否かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Disc1 の欠損変異をホモで持つマウス (Hm) と野生型マウス (Wt) に対して以下の観察を行い、結果を Wt、Hm 間で比較した。

(1) Nissl 染色を用いて細胞構築、ニューロンの突起進展などに焦点を当てて脳の組織学的な観察を行った。

(2) 発生期大脳皮質における progenitor

cell の proliferation および post-mitotic cell の軟膜側への migration を、bromodeoxyuridine (BrdU) による標識を用いて免疫蛍光染色により観察した。

(3) 成獣の海馬歯状回における neurogenesis、新生ニューロンの migration、integration を BrdU による標識を用いて免疫蛍光染色により観察した。抗うつ薬への反応も併せて検討した。

(4) 精神疾患に関連する各種行動実験を行った。

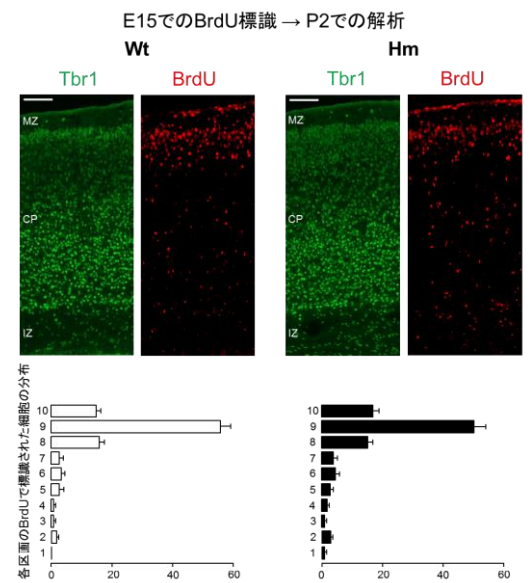
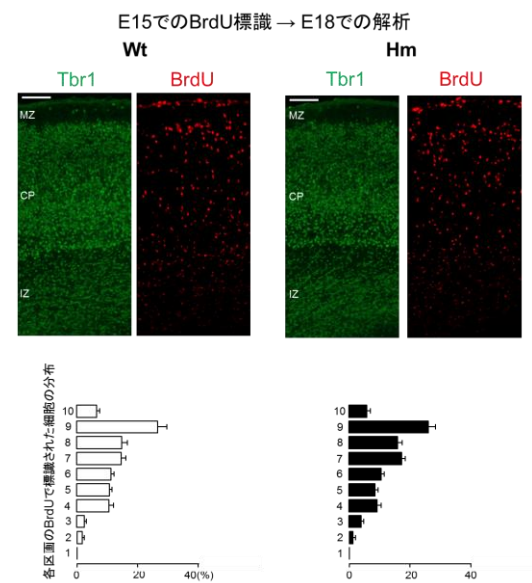
4. 研究成果

(1) ヘテロで *Disc1* 欠損変異を持つマウス同士を交配させ、産仔の尾組織を用い genomic PCR による genotyping を行った。得られた同腹の Wt と Hm について、2 週齢、4 週齢、8 週齢（成獣）で灌流固定を行ったウネクリオスタットを用いて脳組織の凍結切片を作成した。Nissl 染色での観察では、同一面で組織の面積や形状、脳室の面積を測定し、大脳皮質の厚みと層構造、海馬アンモン角、歯状回の細胞構築、および各部位でのニューロンの極性、軸索や樹状突起の伸展およびネットワークの形成に焦点を当てて解析した。またアデニル酸シクラーゼ 3 型抗体を用いた免疫蛍光染色によりニューロンの 1 次繊毛を標識し、脳内各部位で 1 次繊毛の長さを比較すると共に、繊毛受容体の 1 次繊毛への局在についても検討した。これらでは Wt・Hm 間で有意な差異は認めなかった。

(2) *Disc1* 抗体を用いた免疫蛍光染色により、*Disc1* タンパクの脳内発現パターンについて一定の結果が得られた。*Disc1* タンパクは周産期の海馬アンモン角の錐体細胞に発現を認めたが、免疫反応性の低さから発現量は少ないものと考えられた。

(3) ヘテロ変異型同士を交配させ、胎生 15

日目 (E15) にて母親マウスに BrdU を腹腔内投与し胎仔の新生細胞を標識したうえで、E18、出生後 2 日目 (P2) などの各段階でマウスをサンプリングして、BrdU 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った[図 2]。脳室側～軟膜側の各区画に位置する BrdU 陽性 post-mitotic cell の数を集計し、同腹の Wt・Hm 間で比較したが、有意な差異は認めなかった。以上により、*Disc1* の欠失は新生ニューロンの migration に影響を及ぼさないことが示唆された。



[図 2] 皮質 marginal zone ~ intermediate zone を 10 等分し、各区画の BrdU で標識された細胞の分布を計測した。Error bar, 標準

誤差 (n=3); MZ, marginal zone; CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; Scale bar, 100 μ m。

(4) ヘテロ変異型同士を交配させ、E12 に母親マウスに BrdU を腹腔内投与し胎仔の新生細胞を標識したうえで、24 時間後に E13 の胎仔をサンプリングして genotyping を行うと共に、脳切片を作成した。BrdU 抗体および progenitor marker の PAX6 に対する抗体を用いて 2 重免疫蛍光染色を行い、ventricular zone/subventricular zone の progenitor cell のうち、BrdU 陽性のものの比率を算出した。また、mitosis marker である phospho-Histone H3 の陽性細胞の比率すなわち mitotic index を算出した。これらを同腹の Wt・Hm 間で比較したが、有意差を認めなかった。これにより、Disc1 の欠失が progenitor cell の proliferation に影響を及ぼさないことが示唆された。

(5) 同数の Wt と Hm (オス、8 週齢) に BrdU を腹腔内投与し (100 mg/kg; 2 時間おきに 4 回)、最後の投与の 48 時間後に灌流固定し、海馬を含む領域の冠状断連続切片を作成した。同切片の 2 重免疫蛍光染色により、歯状回顆粒細胞層の BrdU、NeuN 両陽性細胞すなわち新生ニューロンの数を計測し Wt・Hm 間で比較したが、有意差を認めなかった。

(6) 同数の Wt と Hm (オス、8 週齢) について、BrdU を腹腔内投与して新生細胞を標識したうえで、1 週、2 週、4 週後に脳をサンプリングして切片を作成した。海馬歯状回における新生ニューロンの survival、分子層側への migration、顆粒細胞層への integration について抗 BrdU・抗 NeuN の 2 重免疫蛍光染色により観察、計測した。さらに Wt・Hm について各々 3 群に分け、生理食塩水、抗うつ薬 imipramine (30 mg/kg)、fluoxetine (20

mg/kg) のいずれかを 21 日間連続で腹腔内投与したうえで同様の計測を行った。いずれの場合においても、Wt・Hm 間で計測値に有意差を認めなかった。これにより、抗うつ薬への反応も併せて Disc1 の欠失は海馬歯状回の neurogenesis に影響を及ぼさないと考えられた。

(7) 同数の Wt と Hm (オス、6~14 週齢) に対する精神疾患に関連する各種行動実験を行った。結果の概要は以下の通りである (n. s. = Wt・Hm 間で有意差が無い)。

・Light/dark transition test (6 週齢)
明箱進入潜時、明箱滞在時間、箱間の移動回数 : n. s.

移動距離 : Wt < Hm ($p < 0.05$)

・Open-field test (7 週齢)
移動距離 : n. s. であつたが Wt < Hm の傾向を認めた ($p < 0.1$)

中心滞在時間 : n. s.

・Crawley's social interaction test (9 週齢)
n. s.

・Home-cage activity test (10~11 週齢)
明期活動量 : n. s.

暗期活動量 : Wt < Hm ($p < 0.05$)

・Fear conditioning test (13 週齢)
場所に対する条件付けの学習成績 : Wt > Hm ($p < 0.01$)

音に対する条件付けの学習成績 : n. s.

・Pre-pulse inhibition test (14 週齢)
Pre-pulse 70db, 75db, 80db, 85db; Pulse 100db での驚愕反応抑制率 : n. s.

研究全体の総括としては、脳内各部位の histology および胎生期・成獣期の neurogenesis に関しては Wt・Hm 間で有意な差異を認めなかったが、行動面では活動性および恐怖条件付けの学習成績で Wt・Hm 間で差異を認めた。Disc1 の欠失による行動面で

の異常に関して、生物学的なバックグラウンドを同定する事が今後の課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

① Long-term systemic exposure to rotenone induces central and peripheral pathology of Parkinson's disease in mice. Murakami S, Miyazaki I, Miyoshi K, Asanuma M.

Neurochem Res, in press. 査読有

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11064-015-1577-2>

② Physiological ER stress mediates the differentiation of fibroblasts.

Matsuzaki S, Hiratsuka T, Taniguchi M, Shingaki K, Kubo T, Kiya K, Fujiwara T, Kanazawa S, Kanematsu R, Maeda T, Takamura H, Yamada K, Miyoshi K, Hosokawa K, Tohyama M, Katayama T.

PLoS One. 10(4):e0123578. (2015) 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0123578.

③ Visualization of astrocytic primary cilia in the mouse brain by immunofluorescent analysis using the cilia marker arll3b.

Kasahara K, Miyoshi K, Murakami S, Miyazaki I, Asanuma M.

Acta Med Okayama. 68(6):317-322 (2014) 査読有

http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/68_6_317.pdf

④ Neuroprotective effects of metallothionein against rotenone-induced myenteric neurodegeneration in parkinsonian mice.

Murakami S, Miyazaki I, Sogawa N, Miyoshi

K, Asanuma M.

Neurotox Res. 26(3):285-298 (2014) 査読有

doi:10.1007/s12640-014-9480-1.

⑤ Lack of dopaminergic inputs elongates the primary cilia of striatal neurons.

Miyoshi K, Kasahara K, Murakami S, Takeshima M, Kumamoto N, Sato A, Miyazaki I, Matsuzaki S, Sasaoka T, Katayama T, Asanuma M.

PLoS One. 9(5):e97918. (2014) 査読有

doi:10.1371/journal.pone.0097918.

⑥ Targeting 5-HT1A receptors in astrocytes to protect dopaminergic neurons in parkinsonian models.

Miyazaki I, Asanuma M, Murakami S, Takeshima M, Torigoe N, Kitamura Y, Miyoshi K.

Neurobiol Dis. 59:244-256 (2013) 査読有

doi:10.1016/j.nbd.2013.08.003.

⑦ Cyclooxygenase-independent neuroprotective effects of aspirin against dopamine quinone-induced neurotoxicity.

Asanuma M, Miyazaki I, Kikkawa Y, Kimoto N, Takeshima M, Murakami S, Miyoshi K.

Neurochem Res. 37(9):1944-1951 (2012) 査読有

doi:10.1007/s11064-012-0813-2.

[学会発表] (計23件)

① 三好 耕 他 「ドパミン欠乏による線条体ニューロンの1次繊毛の伸長」 第41回日本脳科学学会大会 2014年11月23日 福井県県民ホール (福井県・福井市)

② 三好 耕 他 「ニューロンの1次繊毛と

精神神経疾患」 第 36 回日本生物学的精神
医学会 第 57 回日本神経化学会大会 合同
年会 2014 年 9 月 29 日 奈良県文化会館(奈
良県・奈良市)

③三好 耕 他 「Disc1 遺伝子 exon 6 に欠
損を持つマウスを用いた Disc1 の解析」 第
37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 12 日
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

④三好 耕 他 「ニューロンの 1 次繊毛の
解析」 第 40 回日本脳科学会 2013 年 9 月
28 日 アクトシティ浜松コンgresセンター
(静岡県・浜松市)

⑤ 三好 耕 他 「Mice carrying a
25-base-pair deletion in exon 6 of the
Disc1 gene lack the Disc1 protein」 第
11 回世界生物学的精神医学会国際会議 第
35 回日本生物学的精神医学会 合同大会
2013 年 6 月 27 日 国立京都国際会館(京
都府・京都市)

⑥三好 耕 「G protein-coupled receptors
on primary cilia of neurons」 第 36 回日
本神経科学大会 第 56 回日本神経化学会大
会 第 23 回日本神経回路学会大会 合同大
会 2013 年 6 月 21 日 国立京都国際会館(京
都府・京都市)

⑦三好 耕 他 「Primary cilia and
extra-synaptic neurotransmission」 第 11
回アジア太平洋神経化学会大会 第 55 回日
本神経化学会大会 合同大会 2012 年 9 月
30 日 神戸コンベンションセンター (兵庫
県・神戸市)

⑧三好 耕 他 「マウス Disc1 遺伝子 exon
6 の 25 塩基対の欠損は Disc1 タンパクの発現
を消失させる」 第 34 回日本生物学的精神

医学会 2012 年 9 月 28 日 神戸コンベンシ
ョンセンター (兵庫県・神戸市)

⑨三好 耕 他 「Disc1 に 25 塩基対の欠損
を持つマウスの解析」 第 35 回日本神経科
学大会 2012 年 9 月 21 日 名古屋国際会議
場 (愛知県・名古屋市)

[その他]

ホームページ

<http://www.ugscd.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 耕 (MIYOSHI, Ko)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：90362996

(2) 研究分担者

若菜 茂晴 (WAKANA, Shigeharu)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソー
スセンター・チームリーダー

研究者番号：90192434

(平成 26 年 7 月 8 日より研究分担者)