

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591687

研究課題名(和文)統合失調症における補体制御因子機能とシナプスプルーニング機構解析

研究課題名(英文)Role of complement regulatory factors in synapse pruning and in schizophrenia pathology

研究代表者

岸本 年史(Kishimoto, Toshifumi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60201456

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)：統合失調症の病態生理には依然として不明な点が多いが、最近の遺伝学研究から補体制御因子が関与している可能性が示された。一方、細胞生物学や免疫神経科学の進歩により、補体活性化がマウスの脳発達期におけるシナプスプルーニングに関与していることが示された。これらの発見から、新たな統合失調症病態モデルとして補体制御因子異常に基づくシナプスプルーニング障害を想定し、研究を行った。iPS細胞を用いた培養系モデルにおいて、統合失調症患者および非発症双生児同胞由来神経細胞では、健常者に比べて補体制御因子の発現量が低く、さらに統合失調症患者ではシナプス形成が低下していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The pathology or pathophysiology of schizophrenia is still unclear. Recent genetic studies revealed complement regulatory factors as schizophrenia candidate genes. Additionally, studies of cell biology and neuroimmunology have reported activation of complement cascade plays an important role in synapse pruning in developing mouse brain. According to these findings, we suppose the deficit of synapse pruning due to complement dysregulation as a new pathological model of schizophrenia. In our study of cell culture model, neurons differentiated from iPSCs of schizophrenia patient and his discordant twin sibling showed lower expression of complement regulatory factor CSMD1 than that of control subject, and synapse formation was impaired in neurons of schizophrenia patient.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 シナプス 補体 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症の病態生理には依然として不明な点が多いが、最近では免疫系の関与について議論される機会が増加している (Gaughran, *Int Rev Neurobiol*, 2002; Mayilyan *et al*, *Drug News Perspect*, 2008)。2011年、Havikらによって統合失調症発症に、補体制御因子 (CUB and SUSHI Multiple Domains 1,2 [CSMD1,2]) が関与している可能性が示された (Havik *et al*, *Biological Psychiatry*, 2011)。また、別のグループから同年に報告された新たな関連遺伝子5つのうちの1つは補体制御因子 (CSMD1) であり、最も強い相関がみられた microRNA137 [mir137] もコンピューター解析から補体制御因子であることが示された (The Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium *et al*, *Nature Genetics*, 2011)。これらの報告から、統合失調症発症に補体制御因子が関与している可能性が考えられた。

一方、細胞生物学や免疫神経科学の進歩により、補体活性化がマウスの脳発達期におけるシナプスプルーニングに関与していることが示され (Stevens, *Cell*, 2007)、さらにはそのシナプスプルーニング機構には、マイクログリアの働きが必須であることが示された (Paolicelli, *Science*, 2011)。

脳発達期のシナプスプルーニング障害は数多くある統合失調症病態モデルのひとつであるが、その具体的なメカニズムを明らかにした報告は申請者が調査した限りでは存在しない。補体活性化がシナプスプルーニング機構に関与していることが示され、補体制御因子が統合失調症発症に寄与している可能性が強く示された現在、統合失調症の病態モデルとして、補体制御因子異常に基づくシナプスプルーニング障害を想定することは極めて妥当であるといえる。これらから以下に示すような目的で研究を開始した。

## 2. 研究の目的

第一に、先述の通り、遺伝子多型解析において統合失調症患者で認められた補体制御因子との相関が、日本人検体で認められるかを解析し、明らかにする。

第二に、補体制御因子の機能について、どのようにシナプス動態に関わるのか、また遺伝子多型・発現量とどのような相関があるのかを検討するため、マウス脳に加えて、患者及び健常者から樹立したヒト iPS 細胞から神経細胞を誘導し、ヒト神経細胞における培養系も用いて解析し、明らかにする。

第三に、補体制御因子ノックアウトマウスの行動解析を行い、個体レベルでどのような影響を与えるのか、また統合失調症の病態のどのような側面に影響するのかを解析し明らかにする。

これらを総合して、新たな統合失調症モデルを提唱することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 我々が保有している奈良県内の統合失調症患者 200 名と、年齢、性別分布が同様である健常者 200 名の DNA サンプルを用いて、2011 年に報告された補体制御因子である CSMD1, CSMD2, mir137 の遺伝子多型について解析し、その疾患特異性や症状特異性を検討した。

(2) 神経細胞における補体制御因子機能を解析するため、まずマウス脳における補体と補体制御因子、シナプスタンパク質の発現パターンを観察した。次に、マウス神経細胞において、CSMD1, CSMD2, mir137 を過剰発現やノックダウンさせ、補体因子の変化及びシナプス動態を qRT-PCR 法、免疫染色法などを用いて観察した。また、補体を介したシナプスプルーニングにはマイクログリアの働きが必須であることが報告されているため、神経

細胞とマイクログリアの共培養を行い、同様に神経細胞の補体制御因子の発現量を変化させ、シナプス動態を観察した。

次に、患者及び健常者の一部から作製した iPS 細胞由来神経細胞における補体制御因子の発現量が、疾患の有無、症状の重症度、遺伝子多型とどのような相関を示すのか qRT-PCR 法、免疫染色法により確認した。さらに補体制御因子発現量が異なるヒト神経細胞のシナプス動態につき観察し、遺伝子操作によらない補体制御因子の発現量の相違が、どのようにシナプス動態に関わるのかを確認した。マウス共培養により有用な結果を得た際には、ヒト iPS 細胞由来神経細胞とヒトマイクログリアの共培養を行い、個人情報に基づく解析を行った。

(3) 海外共同研究者である Havik らは CSMD1 ノックアウトマウス及び CSMD2 ノックアウトマウスを作製し、現在組織学的、電気生理学的な解析を試みているが、我々はそのマウスの行動を解析した。聴性驚愕反射、プレパルスインヒビションテスト、オープンフィールドテスト、社会行動テスト、Y 字迷路テスト、モリス水迷路テスト、新奇物体認識テスト、新奇位置認識テスト、強制水泳テスト、尾懸垂テスト、マーブルベ어링行動テスト、高架式十字迷路テスト、メタンフェタミン反応テスト、抗精神病薬・抗うつ薬反応テストを行った。補体制御因子の欠損が、統合失調症症状のどのような側面と相関するのかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子多型解析

統合失調症患者 140 名、健常者 208 名の DNA サンプルにおいて、補体関連因子 CSMD1(rs10503253, rs2554585, rs2740931) 及び CSMD2 (rs911213) の遺伝子多型を解析したが、群間の比較では有意な差は認められ

なかった。

##### (2) マウス脳およびヒト神経細胞における解析

マウス脳における補体制御因子の発現パターンを抗 C1q 抗体および抗 Csm1 抗体を用いた免疫組織学法により調べたところ、補体 C1q と補体制御因子 Csm1 とはマウス神経細胞上で排他的に発現していることがわかった。

次に、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた培養系で検討を行った。統合失調症患者 1 名およびその非発症双生児同胞 1 名と健常者 1 名の計 3 名のサンプルを用いて解析した。分化誘導にて得られる神経細胞は 90% 以上がグルタミン酸作動性神経であった (図 1)。

培養神経細胞におけるシナプス発現を、

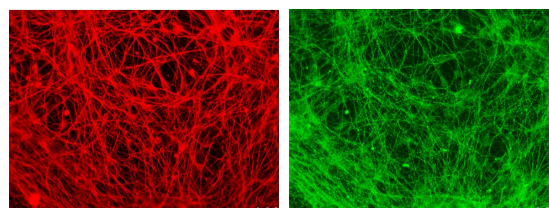


図 1

qRT-PCR 法及び免疫組織学法にて解析した。健常者由来神経細胞では、qRT-PCR 法で継時的にシナプス前蛋白質である Synapsin1 の発現量増加が認められたが、統合失調症患者由来神経細胞ではこの増加が低い傾向にあった (図 2)。

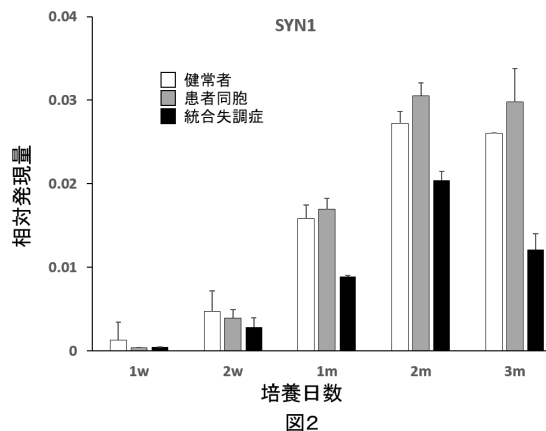


図 2

また、免疫組織学法で調べると、シナプス前蛋白質である Synaptophysin (SYP) の発現

が、健常者および非発症双生児同胞に比較して低下していた（図 3；PSD95 はシナプス後蛋白質）。

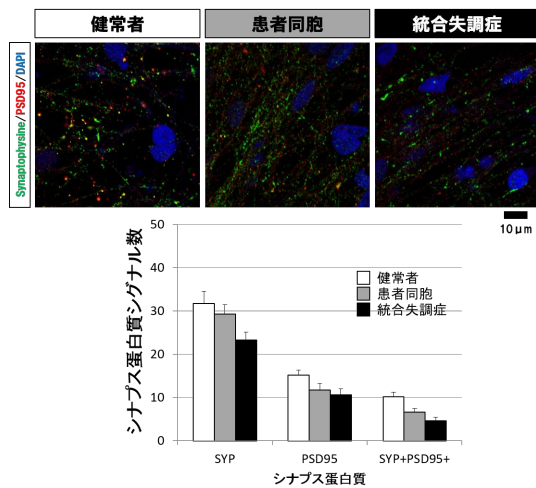


図3

これら神経細胞における補体制御因子 CSMD1、CSMD2 ならびに補体 C1q の発現を qRT-PCR 法にて解析すると、興味深いことに、CSMD1 の発現量が統合失調症患者および非発症双生児同胞由来神経細胞で低下している傾向にあることがわかった（図 4）。CSMD2、C1q の発現については差は無かった。

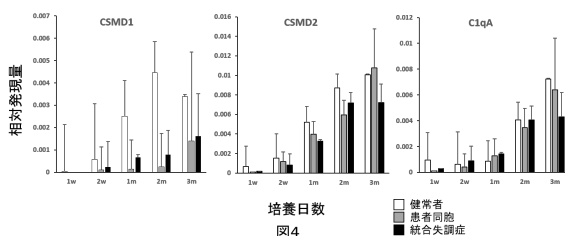


図4

パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析では、周囲の神経細胞からのシナプスを介した入力を反映する spontaneous post synaptic current (sPSC) の頻度低下が認められ、上述のシナプス形成の低下が機能的にも示された（図 5）。

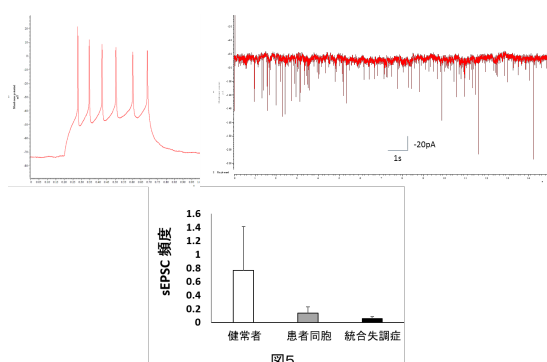


図5

ヒト神経細胞におけるシナプス蛋白質と補体制御因子 CSMD の発現との相関については、抗ヒト CSMD 1 抗体、抗ヒト CSMD 2 抗体を用いて免疫組織学的に検討中である。また、上記の結果から、健常者由来神経細胞において CSMD 遺伝子をノックダウンした場合に、結果としてシナプス形成が統合失調症患者由来神経細胞様の表現型になるかについては、レンチウイルスベクターを用いて shRNA を強制発現する実験系を構築し、解析中である。

### （3）ノックアウトマウスを用いた解析

Csmd2 ノックアウトマウスにおいて、オープンフィールドテスト、尾懸垂テストを行った。オープンフィールドテストでは、コントロールマウスに比べて Csmd2 ノックアウトマウスで中央に侵入する割合が増加していた。全体の移動量には差がなかった。また、尾懸垂テストでは、コントロールマウスに比べて Csmd2 ノックアウトマウスでは無動時間が減少しており、より意欲的である様子がうかがえた。

以上の結果から、補体制御因子である CSMD1 の発現と、シナプス形成には何らかの相関がある可能性が示唆された。今後は、上述したような方法でこの相関を確かめて、補体制御因子が統合失調症の病態に与える影響を明らかにしていきたい。

## 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6件)

Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Kitsuki M, Tatsumi K, Furukawa-Hibi Y, Hirai H, Nagai T, Yamada K, Tsuboi A: Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent

dendritic spine development of newborn olfactory bulb interneurons. *Cell Reports* 8, 843-857 (2014).

Yoshihara S, Takahashi H, Naritsuka H, Nishimura N, Shirao T, Torashima T, Hirai H, Yoshihara Y, Mori K, Stern PL, Tsuboi A: 5T4 glycoprotein regulates the sensory input-dependent development of a specific subtype of newborn interneuron in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 32, 2217-2226 (2012).

吉原誠一, 高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅球ニューロンにおける匂い刺激依存的なシナプス形成の分子機構. *Aroma Research* 第15巻 第3号 pp.248-249 (2014).

高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅覚系における CO<sub>2</sub> センシングの分子機構. *化学と生物*, 第 51 巻, pp.437-439 (2013).

吉原誠一, 坪井昭夫: 嗅球における感覚入力依存的な神経回路再編の分子機構. *Aroma Research*, 第 13 巻, 第 3 号, pp.235-239 (2012).

高橋弘雄, 坪井昭夫: 嗅覚系における神経回路形成と CO<sub>2</sub> センシングの分子機構. *日本応用酵素協会誌*, 第 46 巻, pp.23-30 (2012).

[学会発表](計2件)

(国際学会・シンポジウム)

Tsuboi A, Yoshihara S, Tamada Y and Takahashi H: Time-lapse imaging of neuronal migration in the mouse olfactory bulb. *In: iCheMS Symposia: The 14<sup>th</sup> International Membrane Research Forum*, Kyoto Univ., Kyoto, March 15-17 (2013).

Tsuboi A, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Mori K, Stern PL and Yoshihara S: Sensory input regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb. *In: The 16th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)*, Stockholm, Sweden, June 23-27 (2012).

[図書](計2件)

Takahashi H, Yoshihara S, Asahina R, Tamada Y, Tsuboi A: Characterization of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb using postnatal electroporation. *In Electroporation Methods in Neuroscience, Neuromethods* 102 (Springer), pp.93-103 (2015).

坪井昭夫: 嗅覚系における匂い地図の形成機構. 嗅覚と匂い・香りの産業利用最前線, NTS 出版, pp. 69-79 (2013).

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

特に無し。

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸本年史 (KISHIMOTO TOSHIYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60201456

(2)研究分担者

坪井昭夫 (TSUBOI AKIO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20163868

(3)研究分担者

深見伸一 (FUKAMI SHIN-ICHI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90424150