

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659542

研究課題名(和文) 統合失調症死後脳と周産期仮死モデル脳に共通する遺伝子メチル化の探索

研究課題名(英文) common DNA methylation search of postmortem brain of individuals with schizophrenia and perinatal asphyxia-exposed rat model

研究代表者

武井 教使 (takei, noriyoshi)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・教授

研究者番号：80206937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々は統合失調症の疫学報告に着目した動物モデルとして周産期仮死モデルを検討し、ドパミン神経系の感受性亢進を再現している。本計画では仮死モデルと統合失調症死後脳に共通する脳内遺伝子の発現変化とメチル化を評価し、統合失調症の病態解明をめざした。

その結果、仮死モデル12週齢の前頭前野にのみ有意なCOMT mRNAの増加およびNeuregulin-1 mRNAの減少があり、海馬には有意差がなかった。このmRNA発現量の変化が統合失調症の病態であるドパミン系の機能異常に關与する可能性が考えられた。統合失調症死後脳で同遺伝子のメチル化を解析する必要があったが、交付期間中の解析には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies suggest that perinatal complications increase the risk of schizophrenia. Recent genetic studies have identified several putative susceptibility genes. It can be postulated therefore that birth complications that cause hypoxia in the fetal brain may be associated with a dysregulation in the expression of schizophrenia susceptibility genes. To test this, we used an animal model of perinatal asphyxia, and examined the expression of mRNA of five susceptibility genes by real-time quantitative PCR in the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus at 6 and 12 weeks after birth. The expression of NRG1 mRNA was significantly decreased in the mPFC, but not in the hippocampus. In addition, a significant increase in COMT mRNA expression was observed in the mPFC. These results suggest that perinatal asphyxia may lead to disturbances in the PFC, which in turn may exert a long-lasting influence on the expression of specific genes, such as NRG1 and COMT.

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 エピジェネティクス 仮死モデル

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、思春期以降に幻覚や妄想、思考障害を主症状として顕現化し、注意、記憶、実行機能などの認知機能が著しく障害される精神疾患である。その病態は依然として不明だが、出生前に端を発する神経発達障害が基盤にあり (Murray et al 1987, Weinberger 1987)、遺伝要因と環境要因の相互作用が統合失調症を来すとする「gene-environment interaction」が病態形成に深く関わるとされる (Van Winkel et al 2010)。

我々は出生時の低酸素が統合失調症の危険因子であるとする疫学研究 (Cannon et al 2002) に着目してモデル動物を作製し、統合失調症モデルとしての妥当性を検討した。その結果、周産期に子宮内仮死 (低酸素状態) を経験したラット (仮死モデル) では成熟後に覚醒剤に対する感受性が亢進することを見出した (Wakuda et al 2008)。これは、統合失調症が思春期後にドパミン系亢進の症状を呈するのに符合する。我々はこの仮死モデルに脳内線条体でのドパミン分泌亢進を確認したが、そのメカニズムは明らかではない。周産期事象 (周産期の低酸素、感染、ストレス等) に由来する疾患では、複数の遺伝子発現が複雑に絡み合いながら、病態を形成している (Nawa and Takei 2006)。以上より、我々は周産期の低酸素状態が統合失調症候補遺伝子の発現量を調節し、成熟後に統合失調症発症にかかわる病態につながるという仮説を立て、本研究を計画した。

2. 研究の目的

仮死モデルと統合失調症死後脳を用いて、ドパミン分泌制御にまつわる様々な脳内の遺伝子発現変化を調べ、その原因として共通する DNA のメチル化異常を探索・同定して統合失調症の病態メカニズム解明をめざす。

3. 研究の方法

(概要) 仮死モデルの脳および統合失調症の死後脳サンプルを用い、ドパミン神経系の感受性亢進に関連する遺伝子群の発現変化を網羅的に解析する。続いて、これら遺伝子における DNA のメチル化状態の変化を解析し、環境要因 (仮死) によってメチル化異常がおこる遺伝子と、統合失調症死後脳においてメチル化異常がおこる遺伝子を比較し、同様の異常が起きているかについて検討する。さらに異常の認められたドパミン神経系の感受性亢進に関連する遺伝子の個々の特性を組み合わせて、統合失調症の病態メカニズムへの関与を考察する。すべての動物実験は浜松医科大学動物実験規程に基づき、同大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

平成 24 年度

3-1. 低酸素仮死モデルラットの作製

妊娠満期 SD ラットを帝王切開し、双角子宮

の片側からすぐに仔を摘出する。これをコントロール群とした。もう片側を子宮ごと 37 度の生理食塩水に 15 分間浸け、低酸素状態を経験させ、誕生させた群を仮死群とした。それらを継母に飼育させ、雄ラットのみを実験に用いた。

3-2. 仮死モデルラット脳内のメチル化酵素遺伝子発現の解析

出生直後 (仮死 24 時間後)、生後 6 週齢および 12 週齢の各時点の段階の脳を用い、メチル化酵素、DNA methyltransferase 1 (DNMT1)、DNMT3a および DNMT3b の発現を、mRNA の発現は定量的 real time PCR で、タンパク質発現はそれぞれに対する抗体を用いたイムノプロット法によって検討する。なお、内部標準 (internal control) として β -actin もしくは GAPDH を用いる。統計学的な有意差は $p < 0.05$ とした。

平成 25 年度

3-3. 仮死モデルラット脳内の統合失調症候補遺伝子発現の解析

6 週齢 (思春期) と 12 週齢 (成長後) ラットの前頭前野皮質 (Prefrontal cortex: PFC) と海馬を取り出し、Real-time quantitative PCR 法を用いて統合失調症候補遺伝子の mRNA 発現量を測定した。解析は Ct 法を用いた。候補遺伝子としてドパミンと関連が深い 5 種類 (AKT1, BDNF, COMT, ErbB4, 及び Neuregulin-1; Schmidt-Kastner et al., 2006) を選定した。また、ウエスタンプロット法を用いてタンパク質量を測定した。統計学的な有意差は $p < 0.05$ とした。

4. 研究成果

平成 24 年度は、仮死モデルラット脳内のメチル化酵素の発現解析を試みた。生後 6 週および生後 12 週の仮死モデルの脳サンプルを用い、メチル化酵素 DNA methyltransferase 1 (DNMT1)、DNMT3a および DNMT3b の発現を検討した。mRNA の発現は定量的 real time PCR で、タンパク質発現はイムノプロット法によって行った。しかし、定量的 real time PCR についてはプライマーのデザインに問題があったためか結果が安定しなかった。タンパク質発現の結果も、予備実験の段階で用いた抗体によって異なる結果がみられ、エピトープの設定によって結果が左右される可能性が考えられた。このためヒト死後脳サンプルを用いた解析については進展しなかった。

平成 25 年度には、6 週齢 (思春期) と 12 週齢 (成長後) の仮死モデルラットから前頭前野皮質 (Prefrontal cortex: PFC) と海馬を取り出し、リアルタイム PCR 法を用いて統合失調症候補遺伝子の mRNA 発現量を測定した。候補遺伝子にはドパミンと関連が深い AKT1, BDNF, COMT, ErbB4, および Neuregulin-1 の 5 種類を選定した。また、ウエスタンプロット

ト法を用いてタンパク質量を測定した。この結果、仮死モデル12週齢のPFCにのみ有意な遺伝子発現変化があり、海馬には有意差は認められなかった。PFCで認められた有意な変化はCOMT mRNAの増加およびNeuregulin-1 mRNAの減少であったが、同部位でのCOMTとNeuregulin-1のタンパク質発現量に有意な変化は見られなかった。以上の仮死モデル12週齢のPFCの遺伝子発現の変化は、すでに我々が報告した仮死モデル12週齢の側坐核ドパミン系の機能異常に關与する可能性を示唆する。なお他の遺伝子AKT1, BDNFおよびErbB4については、いずれも有意差は見られなかった。以上の結果から、PFCにおけるCOMTとNeuregulin-1 mRNA発現量の変化が、統合失調症の病態であるドパミン系の機能異常に關与している可能性が考えられた。

【考察】本研究の結果から、6週齢および12週齢でPFCのNeuregulin-1 mRNA発現量が減少していたことから、PFCのNeuregulin-1 mRNAの発現量減少は長期に及んでいた可能性がある。動物実験では、Neuregulin-1ヘテロノックアウトマウスが統合失調症様の行動異常を表すことが報告されており (Ehrlichman et al., 2009; O'Tuathaigh et al., 2007, 2010)、Neuregulin-1発現量の変化が行動変化に影響を与える結果と矛盾しない。また、エピジェネティクスの観点から言えば、出生時の低酸素負荷が、遺伝子発現に關与し、長期的に発現量を抑制したのかもしれない。また、12週齢のPFCのCOMT mRNAの発現量が増加していた結果は、我々の先行研究結果である、12週齢で見られた側坐核におけるドパミン系の機能異常に寄与している可能性があると考えられた。本研究の結果から、PFCにおけるCOMTとNeuregulin-1 mRNA発現量の変化が、統合失調症の病態であるドパミン系の機能異常に寄与している可能性が示唆された。

統合失調症死後脳に關しては、抽出したmRNAをヒト用アレイSurePrint G3 Human Gene Expression 8x60Kにかけて遺伝子発現の網羅的解析を行う予定であったが、交付期間中の解析には至らなかった。解析対象を仮死モデルで抽出されたCOMT遺伝子とNeuregulin-1遺伝子にしばり、脳内メチル化変化を統合失調症死後脳で解析することは今後の課題として有益と思われる。

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)

[学会発表](計 1件)

Lam S, Wakuda T, Li Q, Wei R, Zhang X, Sham PC, Wang Y, Chua SE, Takei N and McAlonan GM. Effect of Perinatal Asphyxia on Protein Expression in Rat Prefrontal Cortex during Postnatal Development. International Meeting for Autism Research 2014年5月Marriott Marquis Atlanta, GA, USA

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

武井教使 (Takei Noriyoshi)
浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・教授
研究者番号：80206937

(2)研究分担者

松崎秀夫 (Matsuzaki Hideo)
福井大学・子どものこころの発達研究センター・教授
研究者番号：00334970

岩田圭子 (Iwata Keiko)
福井大学・子どものこころの発達研究センター・特命助教
研究者番号：30415088

和久田智靖 (Wakuda Tomoyasu)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80444355

(3)連携研究者

秦健一郎 (Hata Kenichiro)
国立成育医療研究センター・周産期病態研

究部・部長
研究者番号：60360335