

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293247

研究課題名(和文)統合失調症の病態におけるKv9.3カリウムチャンネルサブユニットの重要性について

研究課題名(英文) Reduced gene expression for Kv9.3 potassium channel subunit and cortical dysfunction in schizophrenia

研究代表者

橋本 隆紀 (Hashimoto, Takanori)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：40249959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症患者の大脳皮質では、認知機能を促進するパルブアルブミン(parvalbumin, PV)陽性ニューロン(PVニューロン)に選択的に発現するKv9.3カリウムチャンネルサブユニットの発現低下が認められ、患者の認知機能障害に関与していると考えられる。本研究では、ヒト死後脳解析により、この発現低下を個々のニューロンレベルで確認し、抗精神病薬を投与した霊長類モデルを用いて、発現低下が薬物投与でなく病態を反映することを示した。また、Kv9.3をコードするkcns3遺伝子を不活化したマウスを複製し、mRNA発現がPVニューロンで低下していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In the prefrontal cortex (PFC) of subjects with schizophrenia, alterations in parvalbumin (PV)-containing neurons are thought to contribute to cognitive deficits. Kv9.3 is a potassium channel subunit that is selectively expressed in PV neurons and critical to their roles in cognitive functions. Our cellular level quantification of the mRNA levels for KCNS3, the gene encoding Kv9.3, revealed that the number of KCNS3 mRNA-expressing neurons and the mRNA level per neuron were significantly reduced in the PFC of schizophrenia subjects. KCNS3 mRNA levels were unaffected in the PFC of monkeys exposed to antipsychotics, indicating that the lower KCNS3 expression is not solely due to the antipsychotic treatment. To test the effect of lower Kv9.3 subunit expression on cognitive functions, we inactivated the kcns3 gene in mice and confirmed reduced kcns3 mRNA expression in the PFC of these mice.

研究分野：統合失調症の病態生理

キーワード：ヒト死後脳 霊長類モデル 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症では、作業記憶などの認知機能に障害が認められるが、治療法が未確立であり、罹患者の自立や社会復帰を妨げる要因となっている。そこで、各種の認知機能を司る大脳皮質における病態メカニズムの理解とそれに基づいた効果的な治療法の開発が望まれている。

我々はこれまで統合失調症の死後脳研究を行い、大脳皮質の GABA 作動性介在ニューロンのうちパルプアルブミン(PV)を発現するもの(PV ニューロン)の機能変化を示唆する所見を多く報告してきた(Hashimoto et al. *Mol Psychiatry* 2008, *Am J Psychiatry* 2008)。PV ニューロンは、周期性皮質活動 オシレーションの形成を担うことで認知機能に重要な役割を持つ(Sohal et al. *Nature* 2009)。

Kv9.3 は、KCNS3 遺伝子によりコードされ、ヒト大脳皮質の PV ニューロンに選択的に発現する電位依存性カリウムチャンネルのサブユニットである(Georgiev et al. *PLoS ONE* 2012)。Kv9.3 はその特性により PV ニューロンによるオシレーションの形成を促進していると考えられる。我々はこの研究に先立って Kv9.3 をコードする KCNS3 mRNA が統合失調症で低下していることを見出した。

2. 研究の目的

統合失調症の認知機能障害の病態生理における Kv9.3 サブユニットの重要性を確立するために以下の研究を行う。(1) 統合失調症における KCNS3 mRNA の発現変化を細胞レベルで明らかにする。(2) 統合失調症の死後脳で検出された KCNS3 mRNA 発現変化に対する抗精神病薬の影響を評価する。(3) KCNS3 遺伝子に外来遺伝子を導入し KCNS3 の発現を低下させたマウスを作成する。

3. 研究の方法

(1) ヒト死後脳解析 統合失調症患者と健常者から成るペア 22 組(下表)から、遺族から文書による承諾を得て得た脳組織を用いた。それぞれのペアの患者と健常者は性別が同じで、年齢、死後経過時間、脳内の RNA の状態を反映する指標 (RIN) がほぼ等しい。

診断	健常	統合失調症
数	22	22
性	男 17, 女 5	男 17, 女 5
年齢	48.1(15.3)	47.9(14.5)
死後経過時間	18(5.4)	18(9.0)
脳内 pH	6.8(0.3)	6.8(0.3)
RIN*	8.6(0.4)	8.4(0.7)

表：死後脳組織平均(標準偏差), *RIN: RNA integrity number

前頭葉の凍結脳ブロックから、前頭前野(9野)の切片を作成し、KCNS3 mRNA に特異的な放射性同位元素 35-S でラベルされたアンチセンス RNA プローブを用い、in situ hybridization (ISH) を行った。

そして、細胞レベルでの発現解析のために、切片に放射脳感受性の乳剤を塗り 4 週間後に現像した。現像した切片では、KCNS3 mRNA の発現

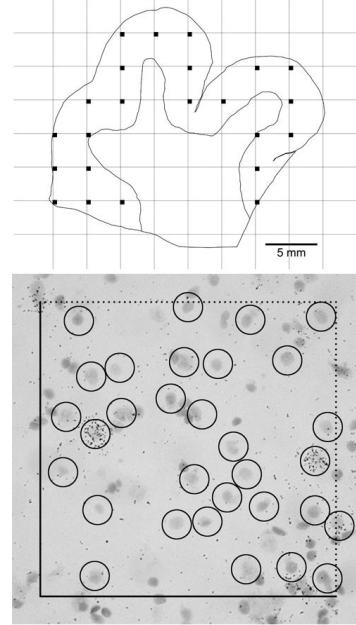


図 1: 上: 灰白質に均等に置かれたサンプリング領域() 下: 各神経細胞について直径 22um の円内で銀粒子の密度を計測した。矢印は陽性細胞

に一致して銀粒子の集積が確認された(図 1)。前頭前野 9 野の灰白質に均等でランダムにおいたサンプリング域において(図 1)、集積の密度と集積あたりの銀粒子密度を計測し、KCNS3 mRNA 陽性細胞の密度および陽性細胞あたりの KCNS3 mRNA 発現レベルの推定値とした。

(2) 薬物投与サル解析 本研究で解析した 22 例の患者のうち大多数には、死亡時に至るまでの抗精神病薬服用歴があるため、患者で認められる KCNS3 mRNA 発現変化に対しての抗精神病薬長期投与の影響を評価する必要がある。そこで我々は、オスの成体サル 18 頭を 3 グループに分け、それぞれに対してプラセボ、ハロペリドール、オランザピンの経口投与を 1 年 5 か月以上行った(Hashimoto et al. *Mol Psychiatry* 2008)。これらのサルから前頭前野の組織切片を作成し、ヒト KCNS3 mRNA の検出に使用した放射性同位元素 35-S を含むプローブを用い ISH を行った。ISH 後の切片は放射線感受性フィルムに感光し、KCNS3 mRNA の発現量を、前頭前野の灰白質における放射活性シグナルとして定量した。

(3) 遺伝子改変マウス解析 死後脳研究で明らかになった Kv9.3 カリウムチャンネルサブユニットの発現低下の、統合失調症の病態メカニズムにおける重要性を検証する

ために、遺伝子操作により Kv9.3 の発現低下を再現したマウスモデルを作成した。

まずマウス的大脑皮質における、KCNS3 遺伝子発現の PV ニューロンへの選択性を評価するために、野生型マウスより大脑皮質切片を作成し、KCNS3 mRNA と PV mRNA を同時検出する 2重 ISH を行った。2重 ISH では、KCNS3 mRNA の検出には放射線同位元素 35-S で標識された RNA プローブを PV mRNA の検出には digoxigenin(DIG) により標識した RNA プローブを用い、放射活性は乳剤に形成される銀粒子の集積として、DIG は抗 DIG 抗体に付加された酵素による色素形成により検出した。

Kv9.3 サブユニットの発現低下は KCNS3 遺伝子に相同組み換えで neomycin 耐性遺伝子を含む外来遺伝子を挿入したマウス (KCNS3-neo マウス) を作成した。KCNS3 遺伝子は、その第 3 エクソンが Kv9.3 蛋白質をコードしている。外来遺伝子は、第 2 およ

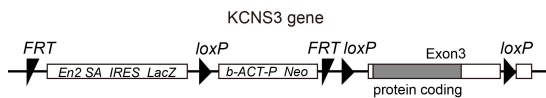


図 1 KCNS3 遺伝子操作

び第 3 エクソンの間に挿入し(図 1)、KCNS3 遺伝子発現を抑制する効果が期待される。

この遺伝子操作が KCNS3 遺伝子の発現変化を引き起こしていることを確認するために、ヘテロ接合体の KCNS3-neo マウス (neo/+) 同士を交配し、KCNS3 遺伝子について野生型 (+/+)、ヘテロ (neo/+), ホモ (neo/neo) の同腹のマウスを 5 組得た。これらのマウス的大脑皮質組織より RNA を抽出し、同時に組織切片も作成した。

RNA サンプルを cDNA に変換し、KCNS3 mRNA にたいする特異プライマーを用いて、real-time PCR を行い KCNS3 mRNA の発現定量を行った。KCNS3 mRNA の発現は、内部標準遺伝子として beta-actin, GAPDH, cyclophilin-A の発現の平均に対する比として定量した。

組織切片は、KCNS3 mRNA と PV mRNA を同時検出する 2重 ISH に用い、KCNS3 mRNA の検出には放射線同位元素 35-S で標識された RNA プローブを PV mRNA の検出には DIG により標識した RNA プローブを用い、放射活性は銀粒子の集積として、DIG は色素形成により検出した。

4. 研究成果

(1) ヒト死後脳解析 統合失調症患者から計 39,373、健常者から計 37,025 のニューロンをサンプリングした。その結果、健常者に比べ患者では、Kv9.3 mRNA 陽性細胞の密度が 33% 低下し、陽性細胞あたりの Kv9.3 mRNA 発現量は 16% 低下しており、統計学的に有意であった (密度: $F_{1,19} = 30.0, P < 0.001$, 陽性細胞あたり: $F_{1,19} = 16.9, P < 0.004$) (図 2)。

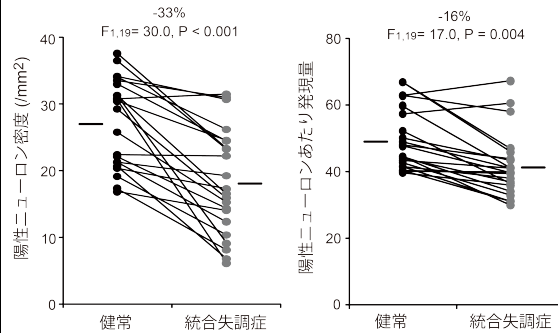


図 2: KCNS3 mRNA 発現変化 (細胞レベル)

(2) 薬物投与サル解析 プラセボ (コントロール)、ハロペリドール、またはオランザピンの長期経口投与を行ったサルの前頭前野において、KCNS3 mRNA の発現パターンに変化は認められなかった (図 3)。

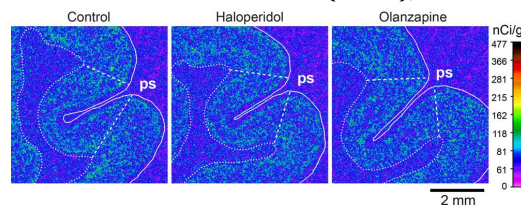


図 3: サル前頭前野における KCNS3 mRNA の発現, PS: principle sulcus

図 3 の点線で挟まれた領域における KCNS3 mRNA の発現量を示す放射活性シグナルにもグループ間での有意差は無かった ($F_{2,10} = 0.4, P = 0.66$) (図 4)。

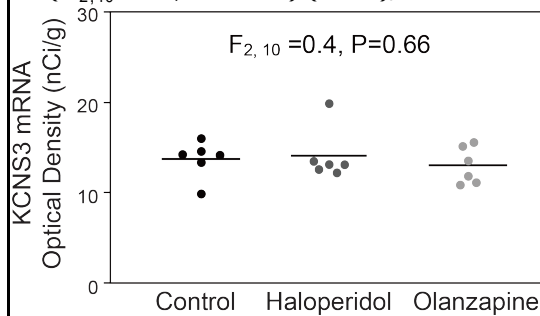


図 4: 抗精神病薬長期投与の KCNS3 mRNA 発現への影響

(3) 遺伝子改変マウス解析 2重 ISH により、野生型マウス (C57BL6) の

大脑皮質において、kcns3 mRNA の発現は PV mRNA 陽性細胞に認められた (図 5)。

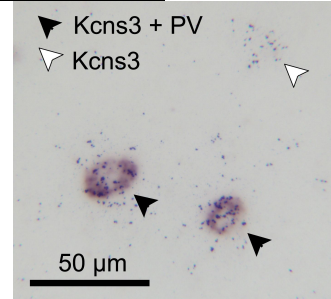


図 5: PV mRNA 陽性細胞 (染色) における kcns3 mRNA の発現 (銀粒子集積)

前頭前野

(PFC)および運動体性感覚野(SMC)において、標識される細胞をプロットし(図6)各遺伝子型5匹のマウスを用いて解析した。

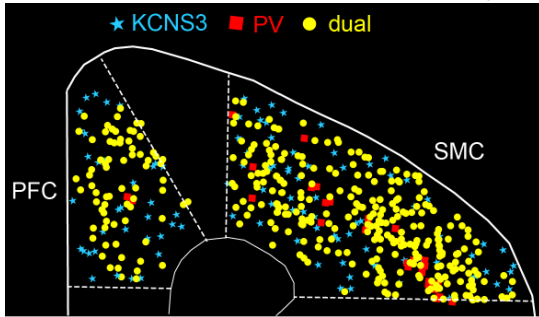


図6: 2重ISHにより標識される細胞のプロット例(左半球)

PFCでは、682個のkcns3 mRNA陽性細胞のうち62%でPV mRNAが検出され、1008個のPV mRNA陽性細胞のうち92%でkcns3 mRNAが検出された。また、SMCでは3393個のkcns3 mRNA陽性細胞のうち74%でPV mRNAが検出され、1008個のPV mRNA陽性細胞のうち90%でkcns3 mRNAが検出された。以上よりマウスの大脳皮質においてもkcns3遺伝子がPVニューロンに選択的に発現していることが確認された。

kcns3-neo マウスの大脳皮質におけるkcns3 mRNAの発現は、皮質組織から抽出したRNAを用いreal-time PCRで解析した。

その結果、遺伝子型によりKCNS3 mRNA発現レベルが有意に異なり($F_{2,12}=83$, $P<0.001$)、ホモ接合体(neo/neo)で野生型(+/+)の約50%に、ヘテロ接合体(neo/+)で野生型の約75%に低下していることが判明した(図7)。

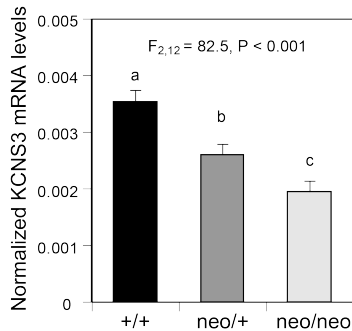


図7: kcns3-neo マウスの大脳皮質におけるKCNS3 mRNAの発現定量(各グループn=5)棒上の文字は有意な違いを示す。

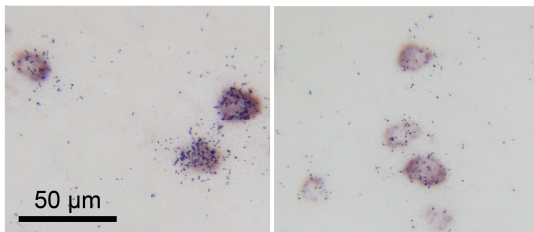


図8: PVニューロン(DIG染色)におけるKCNS3 mRNAの発現(銀粒子)左:野生型(+/+)、右:ホモ接合体(neo/neo)

ホモ接合体(neo/neo)マウスの大脳皮質では、DIGシグナルで染色されるPVニュー

ロンにおけるkcns3 mRNAの銀粒子の集積度は、野生型に比べ明らかに低かった(図8)。

DIG染色で標識されるPVニューロンにおける銀粒子の密度により、PVニューロンに

おけるkcns3 mRNAの発現を定量したところ、組織全体の発現変化を反映して、ホモ接合体(neo/neo)で野生型(+/+)の50%に、ヘテロ接合体(neo/+)で野生型の75%に低下していることが判明した(図9)。

(4)まとめと今後の方向性 本研究により、統合失調症の前頭前野ではKv9.3サブユニットをコードするKCNS3 mRNAの発現が細胞レベルで低下していることが確認された。Kv9.3サブユニットは大脳皮質においてPVニューロンに選択的に発現することから、この発現低下はPVニューロンで生じていると考えられる。そして抗精神病薬を投与したサルの前頭前野ではKCNS3 mRNAの発現には有意な変化は認められなかった。すなわち、統合失調症におけるKv9.3サブユニットの発現低下は、抗精神病薬によりもたらされたものでなく、病態を反映するものであることが示唆された。マウスの大脳皮質でもKv9.3がmRNAレベルでPVニューロンに選択的に発現することを確認した上で、kcns3遺伝子を不活化したマウスを作成し、PVニューロンにおいてkcns3 mRNAの発現が低下していることを確認した。今後は、このkcns3遺伝子不活化マウス(kcns3-neoマウス)を用いて、PVニューロンの機能を反映する律動的脳活動や認知機能などを評価し、統合失調症の病態生理におけるKv9.3サブユニットの重要性を証明してゆく予定である。

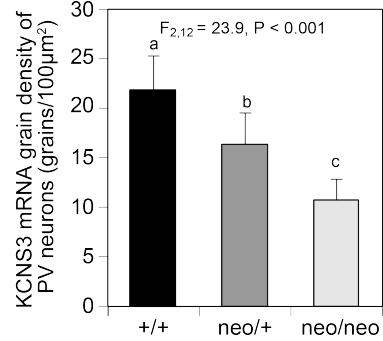


図9: kcns3-neo マウスの大脳皮質PVニューロンにおけるKCNS3 mRNAの発現定量(各グループn=5)棒上の文字は有意な違いを示す。

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2件)

1. Georgiev D, Yoshihara T, Kawabata R, Matsubara T, Tsubomoto M, Minabe Y, Lewis DA, Hashimoto T. Cortical gene

expression after a conditional knockout of 67 kDa glutamic acid decarboxylase in parvalbumin neurons. **Schizophrenia Bulletin** 42(4): 992-1002(2016) 査読有

2. Georgiev D, Arion D, Enwright JF, Kikuchi M, Minabe Y, Corradi JP, Lewis DA, Hashimoto T. Lower gene expression for KCNS3 potassium channel subunit in parvalbumin-containing neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia **American Journal of Psychiatry** 171:62-71 (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 橋本隆紀「統合失調症の認知機能障害と大脳皮質パルブアルブミン陽性ニューロン」第 38 回生物学的精神医学会第 59 回日本神経化学会 合同年会 合同シンポジウム「神経可塑性と精神疾患」2016.9.8 (福岡・福岡国際会議場)
2. 橋本隆紀「統合失調症における大脳皮質パルブアルブミンニューロン選択的遺伝子発現」国際シンポジウム「皮質 GABA 細胞の異常と精神神経疾患」(座長) 第 38 回日本神経科学大会 2015.7.30 (神戸国際会議場)
3. 橋本隆紀「統合失調症の大脳皮質パルブアルブミンニューロンにおけるカリウムチャネル遺伝子発現」第 36 回日本生物精神医学会 シンポジウム「マイクロエンドフェノタイプから考える精神疾患研究」2014.9.30(奈良県立文化会館)
4. 橋本隆紀「統合失調症の認知機能障害の分子メカニズム：大脳皮質パルブアルブミン陽性ニューロンにおける KCNS3 遺伝子の発現変化」第 9 回日本統合失調症学会 シンポジウム「次世代のトランスレーショナルリサーチ」2014.3.15 (京都テルサ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 隆紀 (HASHIMOTO, Takanori)
金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：40249959

(2) 研究分担者

戸田 重誠 (TODA, Shigenobu)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：00323006

吉原 亨 (YOSHIHARA, Toru)
京都大学・医学系研究科(研究院)・助教
研究者番号：00401935

上田 なつ子 (UEDA, Natsuko)
筑波大学・国際睡眠医科学研究機構・
助教
研究者番号：40432166

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

David A Lewis
Department of Psychiatry and
Neuroscience, University of
Pittsburgh