

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：84203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460381

研究課題名(和文)統合失調症様行動異常におけるDgcr8の機能と作用部位の同定

研究課題名(英文) Investigation of neural circuits responsible for behavioral abnormalities caused by Dgcr8 deficiency

研究代表者

村木 一枝 (Muraki, Kazue)

滋賀県立成人病センター(研究所)・神経病態研究部門・主査

研究者番号：10725857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒトで高率に統合失調症を発症する22q11欠損症候群のモデルマウスを用い、Dgcr8の欠損が海馬歯状回、介在神経細胞の発生異常の原因となることを見出してきた。今回我々は、Cre/loxPの技術を用いDgcr8を部位特異的、細胞腫特異的に発現させ、Dgcr8の再発現による補償実験を可能とする系の構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：22q11 deletion syndrome is a chromosome disorder. 20-30% of the patients with this deletion develop schizophrenia. We demonstrated the heterozygous deletion of Dgcr8 caused developmental abnormalities in the dentate gyrus of the hippocampus and cortical interneurons. To perform rescue experiments by Dgcr8 overexpression, we newly generated ROSA-CAG-stop-Dgcr8 BAC transgenic mice, which express Dgcr8 specifically in Cre-expressing cells.

研究分野：神経発生学

キーワード：Dgcr8 22q11 deletion syndrome schizophrenia Cre BAC hippocampus interneuron dentate gyrus

1. 研究開始当初の背景

22q11.2 領域欠損症候群は 3000 人から 4000 人に一人発症する染色体異常である。22q11 領域に欠損を持つ人は高頻度に統合失調症を発症することが知られており、統合失調症患者全体の約 0.5% をしめることから、22q11.2 領域の欠損によって発症する統合失調症者の治療法の開発は意義が大きいと考えられる。

ヒトの 22q11.2 領域には約 30 の遺伝子が存在しており、22q11.2 領域に相当する領域はマウスでは第 16 番染色体に存在し、一部の領域に逆位は認められるが、ほぼ全ての遺伝子群がその領域に保存されていることが知られている。このため、Cre/loxP の技術による染色体欠損技術を用いれば、22q11.2 欠損症候群モデルマウスの樹立が可能である。実際に我々は、22q11 欠損症候群モデルマウスを用いて、行動学的解析を行い、このモデルマウスがヒトの統合失調症患者と同様に感覚情報処理の異常や methamphetamine や NMDA 受容体阻害剤の MK801 への感受性の亢進を示すことを見出している。このことは、このモデルマウスがヒトの統合失調症に類似した神経機能異常を持っている可能性を示している。

22q11.2 欠損症候群モデルマウスで認められる行動異常に関与する神経回路網を解明するため、我々は、ウイルスベクターによる生体内遺伝子過剰発現系を利用して 22q11 欠損領域に存在する遺伝子を特定の脳領域に再発現させ行動異常が補償できるか検討を行った。その結果、Comt を前頭前野特異的にレンチウイルスで再発現させることで統合失調症様行動異常を不完全ではあるが補償できることが明らかとなり、前頭前野の Comt の発現減少が 22q11 欠損症候群モデルマウスの行動異常に関与する可能性が示された (Selective overexpression of Comt in prefrontal cortex rescues schizophrenia-like phenotypes in a mouse model of 22q11 deletion syndrome. Kimoto S, Muraki K, Toritsuka M, Mugikura S, Kajiwara K, Kishimoto T, Illingworth E, Tanigaki K. *Transl Psychiatry*. 2012 Aug 7;2:e146.)

さらに、我々は、22q11.2 欠損症候群モデルマウスで神経発生異常が生じていないか検討するため、胎児期、成体期のモデルマウス脳の連続切片を作成し stereology の解析を行うことによって、海馬の歯状回と大脳皮

質の介在神経細胞の発生異常が存在することを証明した。介在神経細胞の前駆細胞が存在する medial ganglionic eminence (MGE) の器官培養及び、介在神経細胞前駆細胞培養の系を用いて、この神経発生異常がケモカインである Cxcl12 (Sdf1)/Cxcr4 シグナルの異常によって生じること、Cxcl12 (Sdf1)/Cxcr4 シグナルの異常は 22q11.2 領域に存在する miRNA のプロセッサの Dgcr8 の欠損によって生じること示した (Deficits in microRNA-mediated Cxcr4/Cxcl12 signaling in neurodevelopmental deficits in a 22q11 deletion syndrome mouse model. Toritsuka M, Kimoto S, Muraki K, Landek-Salgado MA, Yoshida A, Yamamoto N, Horiuchi Y, Hiyama H, Tajinda K, Keni N, Illingworth E, Iwamoto T, Kishimoto T, Sawa A, Tanigaki K. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 22;110(43):17552-7.)

Dgcr8 の欠損が前頭葉依存性の作業記憶障害などの統合失調症様行動異常を起こすこと (*Nat Genet*. 2008 40:751-60)、Dgcr8 欠損で生じるような介在神経発生異常が統合失調症でも認められることを考え合わせると、Dgcr8 が 22q11.2 欠損症候群の統合失調症発症の原因遺伝子の一つである可能性が示唆された。

我々は、Cxcl12 の発現がヒトの sporadic な統合失調症患者の嗅上皮で発現減少していることも Johns Hopkins 大学の澤明教授との共同研究で明らかにしている。このことは、Cxcl12 (Sdf1)/Cxcr4 シグナルの異常が、統合失調症全般でも認められる可能性を示唆している。また、22q11.2 欠損症候群の脳で認められる Serca2 の発現上昇が、一般的な統合失調症者でも確認されること (*JNS*, 2012, 32(41):14132-14144) から、22q11.2 欠損症候群の統合失調症と一般の統合失調症の分子機構の共通性が示されており、22q11 欠損症候群による統合失調症の分子機構の解明が統合失調症全般の治療に貢献できる可能性があると考えられる。

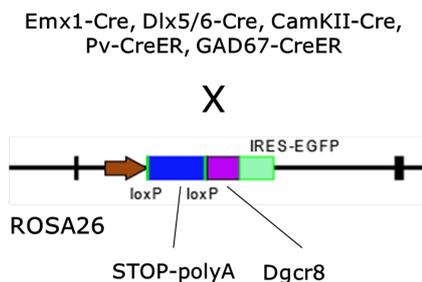
2. 研究の目的

Dgcr8 が 22q11.2 欠損症候群モデルマウスの示す統合失調症様行動異常に関与しているか明らかにするため、Cre/loxP を用いて部位特異的、細胞種特異的に Dgcr8 を再発現できるシステムを構築し、22q11 欠損症候群モデルマウスが示す行動異常の補償実験を

行う。この 22q11.2 欠損症候群モデルマウスのシステムは、22q11.2 欠損領域の遺伝子群が、どの神経回路網で発現減少するために行動異常が生じるのか直接的に検証できるシステムとなる可能性がある。

3. 研究の方法

全組織で発現している ROSA26 locus を含む BAC に CAG-promoter- Dgcr8 と Cre で除去可能な Stop codon を導入した BAC transgenic mice を作成し、その BAC transgenic mice を部位特異的、細胞種特異的な Cre transgenic mice と掛け合わせることで、細胞種特異的、発生段階特異的の遺伝子強制発現を実現する。掛け合わせに用いる Cre transgenic mice は Emx1-Cre (背側前脳特異的), Dlx5/6-Cre (腹側前脳、介在神経細胞特異的), CamKII-Cre (成熟神経細胞特異的), Parvalbumin-CreER (Parvalbumin 陽性介在神経細胞特異的), GAD67-Cre transgenic mice (GABA 作動性神経細胞特異的) を用いる。



Cre/loxP を用いた細胞種特異的遺伝子過剰発現システムによる 22q11.2 モデルマウスの神経発生異常・統合失調症様行動異常の補償実験

4. 研究成果

全組織で発現している ROSA locus の上流 153 kb、下流 15 kb の配列を含む bacterial artificial chromosome (BAC) clone RP23-401D9 を用いて BAC transgenic mice の作成を行った。ROSA locus の transcript 1 の 1st exon の nucleotide 521 に CAG-STOP-polyA-Dgcr8 のカセットを挿入した。

作成した BAC (ROSA-CAG-STOP-polyA-Dgcr8) を Cre の発現ベクターと共に 293 細胞に transfection を行い、Cre 依存的に

Dgcr8 発現が誘導されることを western blotting にて確認した。

マウス受精卵に BAC: ROSA-CAG-STOP-polyA-Dgcr8 をマイクロインジェクションすることで、独立した 2 系統の BAC transgenic mice を得た。そのうち 1 系統に germ line transmission が認められた。

得られた、ROSA-CAG-STOP-polyA-Dgcr8 BAC transgenic mice を Emx1-Cre, Dlx5/6-Cre transgenic mice と掛け合わせたところ、中枢神経系の発生異常が顕著に認められた。Dgcr8 は 1 コピー失われたとしても微細な神経発生異常しかきたさないが、過剰発現された場合は、神経発生に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

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 4 件)

1. Muraki K, Tanigaki K. Neuronal migration abnormalities and its possible implications for schizophrenia. *Front Neurosci.* 2015 Mar 10;9:74. doi: 10.3389/fnins.2015.00074. eCollection 2015.
2. Yoshimura Y, Shiino A, Muraki K, Fukami T, Yamada S, Satow T, Fukuda M, Saiki M, Hojo M, Miyamoto S, Onishi N, Saya H, Inubushi T, Nozaki K, Tanigaki K. Arsenic trioxide sensitizes glioblastoma to a myc inhibitor. *PLoS One.* 2015 Jun 3;10(6):e0128288.
3. Isobe M, Tanigaki K, Muraki K, Miyata J, Takemura A, Sugihara G, Takahashi H, Aso T, Fukuyama H, Hazama M, Murai T. Polymorphism within a Neuronal Activity-Dependent Enhancer of NgR1 Is Associated with Corpus Callosum Morphology in Humans. *Mol Neuropsychiatry.* 2015 Jul;1(2):105-15.
4. Toritsuka M, Kimoto S, Muraki K, Kitagawa M, Kishimoto T, Sawa A, Tanigaki K. Regulation of striatal dopamine

responsiveness by Notch/RBP-J
signaling.
Transl Psychiatry. 2017 Mar
7;7(3):e1049.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村木 一枝 (Muraki Kazue)
滋賀県立成人病センター (研究所)・神経
病態研究部門・主査
研究者番号 : 10725857