

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04894

研究課題名(和文) 治療抵抗性統合失調症におけるグリア-ニューロン回路網異常の解明

研究課題名(英文) Analysis of glial-neuronal network abnormalities in treatment-resistant schizophrenia

研究代表者

宮岡 剛 (Miyaka, Tsuyoshi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：50284047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、治療抵抗性統合失調症の成立過程におけるグリア細胞機能異常の関与とグリア細胞の神経細胞への異常な関与について解析を進めている。今回の研究では、統合失調症死後脳におけるグリア細胞の可視化を行うために献体脳を用いて抗原賦活化と蛍光免疫染色を実施した。その結果、20年以上ホルマリン浸漬保存されていた献体脳の一部では、海馬歯状回においてIba-1陽性のミクログリアとS100-β陽性のアストロサイトを良好に可視化することができた。さらに、ケタミン投与を行った治療抵抗性統合失調症モデル動物(Gunnラット)を用いた行動学的解析において、本モデル動物の薬剤脆弱性を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの統合失調症の治療薬はドパミン仮説に基づいて開発されたドパミン受容体遮断薬が主流であるが、治療抵抗性統合失調症にグリア-ニューロン回路網の変化が関与していること(神経炎症仮説)をヒト死後脳で解明する試みは他に例がない。本研究により治療抵抗性統合失調症の治療戦略として「神経炎症を鎮静する」物質を探索することの重要性が高まると同時に、我々が提唱する塩酸ミノサイクリン療法が統合失調症の根治治療薬として位置づけられる可能性も高くなり、学術的にも社会的にも意義深い研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We are investigating the relationship between glial activation and schizophrenia. In this study, we investigated the postmortem expression of glial cells in the hippocampal region of brains of patients with schizophrenia using an immunofluorescence technique. As a result, although difficult in many cases, we successfully detected immunoreactivities for Iba-1 and S100-β in the dentate gyrus in the postmortem brains. In addition, we compared the sensitivity of the NMDA-antagonist, ketamine to validate the Gunn rat as a schizophrenia model. By inducing ketamine, Gunn rats exhibited acute hyperactivity and PPI deficits which are positive and negative symptoms respectively of schizophrenia. Despite its limitations, efforts to document immunohistochemical glial expressions in postmortem brains will provide possible in situ information for the various approaches to using animal models for patients with schizophrenia.

研究分野：内科学

キーワード：統合失調症 グリア細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 【研究の学術的背景】

統合失調症は生涯罹患率が約 0.8%であり、精神疾患の中でも最も主要な疾患の一つである。1950年代に抗精神病薬が開発されて以来、統合失調症の治療は抗精神病薬による薬物療法が主流となっている。さらに近年、第二世代抗精神病薬が開発されその有用性が確認されている。しかしこれらの薬物治療にも拘らず、病状が改善しない治療抵抗性統合失調症患者が、未だ、多く存在するのも事実である(約20%以上)。治療抵抗性統合失調症患者の中には、脳室の拡大や大脳皮質の萎縮などの脳器質変化が強く認められるものが存在し、その変化は進行性のものであることが明らかになりつつある。従って、従来の統合失調症の発症機序としてのドパミン仮説をもとにした新規治療薬の開発の他に、脳器質変化の進行を阻止することを目的とした治療薬の開発や治療戦略の必要性が指摘されている。

我々は統合失調症に高ビリルビン血症を合併する統合失調症症例の臨床研究成果をもとに、治療抵抗性統合失調症に高ビリルビン代謝異常が極めて密接に関与することを明らかにした。その結果、高ビリルビン血症ラット(Gunnラット)が治療抵抗性統合失調症モデル動物の一つになり得るといふ仮説を実証する一連の研究成果を得た。このGunnラットは、常染色体劣性遺伝の高ビリルビン血症を呈するWistarラットのミュータントで核黄疸のモデルとして、あるいはビリルビンの神経毒性の機序の解明や高ビリルビン血症の治療法の開発などの研究に利用されてきたものである。我々はこれまで、Gunnラットが統合失調症患者に類似する行動異常を示すこと(Hayashida, 2009)、抗精神病薬の投与でその行動異常に改善がみられること(Tsuchie, 2013)を報告してきた。またGunnラット海馬歯状回マイクログリアが過剰な活性亢進を示すことを、活性型マイクログリアのマーカー、Iba-1およびCD11bを用いて顕微鏡および電顕レベルで明らかにした(Liaury and Miyaoka, 2012)。さらに我々は、塩酸ミノサイクリンなどの抗炎症剤の投与によりGunnラット海馬歯状回におけるマイクログリア過剰活性が抑制され、同時に統合失調症様行動異常を改善することを報告した(Liaury and Miyaoka, 2014)。

しかしながら、モデル動物を使用した研究により我々が得た仮説—治療抵抗性統合失調症の成立過程におけるグリア細胞機能異常の関与とグリア細胞の神経細胞への異常な介入の可能性—について、未だそれらを示唆するヒトでの所見は得られていない。

一方、統合失調症病因仮説においてはドパミン仮説、グルタミン仮説が有名であるが、統合失調症発症患者においては、ドーパミンアゴニスト、NMDAレセプターアンタゴニストなどの薬物に対し、少量でも容易に陽性症状、陰性症状、認知障害を呈するという数多くの報告がある。Gunnラットの統合失調症モデル動物としてのさらなる有用性を目指すためには、統合失調症発症患者に見られるこれらの薬剤脆弱性についても検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

モデル動物を使用した研究により我々が得た仮説—治療抵抗性統合失調症の成立過程におけるグリア細胞機能異常の関与とグリア細胞の神経細胞への異常な介入の可能性—について、統合失調症死後脳を用いた免疫組織化学的解析を行うことにより、ヒト脳での実証につながる形態学的知見を得ることを目的とする。さらに、Gunnラットを用いてNMDA-アンタゴニストに対する薬理的解析を行い、統合失調症発症患者に見られる薬剤脆弱性を再現するモデル動物としての有用性を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 献体脳を用いた海馬領域のグリア細胞の検出

島根大学精神医学講座および解剖学講座にてホルマリン浸漬保存されている献体脳のうち、統合失調症病歴のある脳標本および統合失調症病歴のない脳標本で、脳血管障害以外の死因のものを対象とした。1 cm 厚の前頭断脳スライスを作成して海馬を含む領域を切り出し、30% ショ糖液で置換した後液体窒素で凍結し、クリオスタットにて 30 μm の前頭断凍結切片を作成してスライドガラスに貼り付けた。抗原賦活化処理の後、抗 Iba-1 抗体、抗 S100- 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、どのような条件下であれば献体脳の海馬領域におけるグリア細胞の検出が可能かどうか、また、統合失調症脳と対象脳標本のグリア細胞の様態を比較してどのような所見が得られるかを蛍光顕微鏡下で検討した。

(2) 統合失調症モデルラット (Gunn ラット) におけるストレス脆弱性に関する薬理学および行動学的検討

Gunn ラットと対照群の Wistar ラットにそれぞれ 10mg/kg、15mg/kg のケタミン (NMDA-アンタゴニスト) を投与し、オープンフィールドテストとプレパルス・インヒビション (PPI) テストを行って行動学的変化を比較した。

本研究は、島根大学医学部医の倫理委員会 (承認日: 2017 年 4 月 12 日、通知番号: 2601) および島根大学出雲キャンパス動物実験専門委員会 (承認日: 2018 年 3 月 30 日、承認番号: IZ30-12) において承認済みである。

#### 4. 研究成果

(1) 献体脳海馬歯状回におけるマイクログリアとアストログリアの発現

今回の解析に使用した献体脳は、統合失調症病歴のある標本 6 例 (死亡時期 1957 ~ 1998 年)、統合失調症病歴のない標本 5 例 (死亡時期 1991 ~ 1996 年) であった。抗原賦活化法と蛍光免疫染色法を組み合わせ、マイクログリアのマーカーである Iba-1 とアストロサイトのマーカーである S100- の免疫陽性部位を歯状回全体にわたって良好に検出できた標本もあったが (患者脳・健常脳ともに 1 例ずつ)、大部分の標本では部分的にしか陽性反応を得ることができなかった。また、検出成績と献体脳の保存期間の長さとの間には明瞭な関係はなかった。良好な染色結果が得られた標本では、Iba-1 陽性のマイクログリアは突起を有する桿状の細胞体を持つ細胞として検出されたが、一部には突起の少ない大きな丸い細胞体を呈する細胞も存在した (図 1)。患者脳の 1 例では血管周囲に後者のタイプのマイクログリアが多数集合する像も観察された (図 2)。一方 S100- 陽性のアストロサイトは、放射型に広がる多数の細い突起を持つ典型的な形態が示され、血管壁に接触するエンドフィートもしばしば観察されたが (図 3)、患者脳と病歴のない脳との間に大きな違いは得られなかった。

今回の死後脳を使用したアプローチでは、20 年以上ホルマリン浸漬保存されていた献体脳においてグリア細胞のマーカーを使用した免疫染色が可能になることが示され、死後脳でのグリア細胞の形態解析に道を開くことができた。

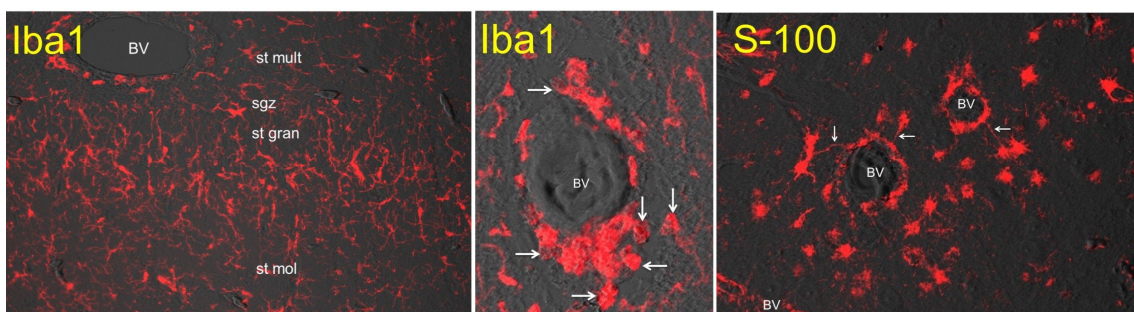


図 1

図 2

図 3

## (2) Gunn ラットにおけるストレス脆弱性

ケタミン投与群の Gunn ラットでは、Wistar ラットと比較してその活動量（オープンフィールドテスト）の亢進（図4）とPPI障害がみられた（図5）。さらに、ケタミン投与群のGunnラットでは陽性症状および陰性症状の悪化が示された。これらのことから、Gunn ラットには他の統合失調症モデル動物と同様な薬剤脆弱性がみられ、それはNMDA受容体が統合失調症の病態生理に關与する可能性を示唆する結果となった。

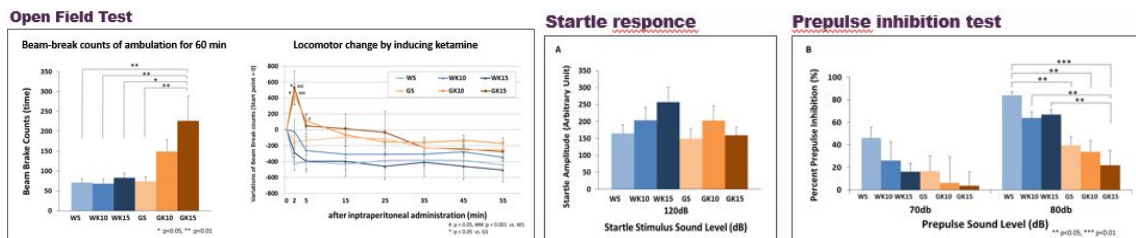


図4

図5

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6件)

1. Ryosuke Arauchi, Sadayuki Hashioka, Keiko Tsuchie, Tsuyoshi Miyaoka, Toshiko Tsumori, Eryln Limoa, Ilhamuddin A. Azis, Arata Oh-Nishi, Shoko Miura, Koji Otsuki, Misako Kanayama, Muneto Izuhara, Michiharu Nagahama, Kiminori Kawano, Tomoko Araki, Kristian Liaury, Rostia A. Abdullah, Rei Wake, Maiko Hayashida, Ken Inoue, Jun Horiguchi. Gunn rats with glial activation in the hippocampus show prolonged immobility time in the forced swimming test and tail suspension test. *Brain and Behavior*. Aug;8(8):e01028, 2018
2. Tsuyoshi Miyaoka, Rei Wake, Sadayuki Hashioka, Maiko Hayashida, Arata Oh-Nishi, Ilhamuddin Abdul Azis, Muneto Izuhara, Keiko Tsuchie, Tomoko Araki, Ryosuke Arauchi, Rostia Arianna Abdullah, Jun Horiguchi: Remission of Psychosis in Treatment-Resistant Schizophrenia Transplantation: A Case Report. *Frontiers in Psychiatry* 8:174, 2017
3. Eryln Limoa, Sadayuki Hashioka, Tsuyoshi Miyaoka, Keiko Tsuchie, Ryosuke Arauchi, Ilhamuddin Abdul Azis, Rei Wake, Maiko Hayashida, Tomoko Araki, Motohide Furuya, Kristian Liaury, Andi Jayalangkara Tanra, Jun Horiguchi: Electroconvulsive shock attenuated microgliosis and astrogliosis in the hippocampus and ameliorated schizophrenia-like behavior of Gunn rat. *Journal of Neuroinflammation* 13(1): 230, 2016
4. Hashioka S, Edith G. McGeer, Miyaoka T, Wake R, Horiguchi J, Patrick L. McGeer: Interferon- $\gamma$ -Induced Neurotoxicity of Human Astrocytes. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* 14(2): 251-256, 2015
5. Wake R, Miyaoka T, Araki T, Kawakami K, Furuya M, Limoa E, Hashioka S, Horiguchi J: Regional cerebral blood flow in late-onset schizophrenia: a SPECT study using 99mTc-ECD. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 266(1): 13, 2016., 2015
6. Miyaoka T, Ieda M, Hashioka S, Wake R, Furuya M, Liaury K, Hayashida M, Tsuchie K, Arauchi R, Araki T, Shioji I, Ezoe S, Inoue K, Yamaguchi T, Horiguchi J: Analysis of oxidative stress expressed by urinary level of biopyrins and 8-hydroxydeoxyguanosine in patients with chronic schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* 69(11): 693-698, 2015

〔学会発表〕(計 12件)

1. Azis Ilhamuddin A., 橋岡禎征, 宮岡剛, 土江景子, 荒内亮輔, 三浦章子, Abdullah Rostia Arianna, 和氣玲, 林田麻衣子, 大西新, Tanra Andi J., 堀口淳, 稲垣正俊: Gunn rats with decreased coverage of brain blood vessels by aquaporin 4 show learned helplessness and impaired working memory. 第59回中国・四国精神神経学会. 広島, 2018.11.22-23
2. 宮岡剛: 統合失調症の層別化と根治療法の創出を目指した研究. 第3回黒潮カンファレンス. 松江, 2018.10.13-14
3. Keiko Tsuchie, Toshiko Tsumori, Sadayuki Hashioka, Tsuyoshi Miyaoka: Postmortem expression of Iba1 and S100 $\beta$  immunoreactivities in the hippocampal dentate gyrus in patients with schizophrenia. 第41回日本神経科学大会. 神戸, 2018.07.26-29
4. 宮岡剛: 統合失調症という病を抱える人々から学んだこと - 情熱精神医学の扉をあける -. 第41回日本心身医学会中国・四国地方会. 出雲, 2017.12.3
5. Tsuyoshi Miyaoka: Schizophrenia and Idiopathic Unconjugated Hyperbilirubinemia(Gilbert's Syndrome). The 5th Congress of AsCNP. Bali, April 27-29, 2017

6. Maiko Hayashida, Keiko Tsuchie, Tomoko Araki, Masayuki Koike, Yasuyuki Matsuda, Hiroyuki Miki, Shoko Miura, Ippei Tanaka, Misako Kanayama, Satoko Yamashita, Michiharu Nagahama, Kiminori Kawano, Motohide Furuya, Shiho Okazaki, Erlin Limoa, Ilhamuddin Abdul Azis, Sharmeen Romana, Ryosuke Arauchi, Rei Wake, [Sadayuki Hashioka](#), [Tsuyoshi Miyaoka](#), Jun Horiguchi: Validated Gunn rat as a Schizophrenia animal model ; Ketamine induced behavioral changes and decreased prepulse inhibition. 30th CINP WORLD CONGRESS OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY. Seoul, July 3-5, 2016
7. Erlin Limoa, [Sadayuki Hashioka](#), [Tsuyoshi Miyaoka](#), Keiko Tsuchie, Ryosuke Arauchi, Rei Wake, Maiko Hayashida, Tomoko Araki, Motohide Furuya, Ilhamuddin Abdul Azis, Kristian Liaury, Andi Jayalangkara Tanra, Jun Horiguchi: Electroconvulsive shock ameliorated the schizophrenia-like behavior and attenuated the glial activation in the hippocampus of Gunn Rat. 30th CINP WORLD CONGRESS OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY. Seoul, July 3-5, 2016
8. [Tsuyoshi Miyaoka](#), Rei Wake, Motohide Furuya, Maiko Hayashida, Michiharu Nagahama, [Sadayuki Hashioka](#), Jun Horiguchi: Analysis of urinary oxidative stress in patients with chronic schizophrenia. 第112回日本精神神経学会学術総会. 千葉, 2016.6.2-4
9. [Tsuyoshi Miyaoka](#), Masa Ieda, [Sadayuki Hashioka](#), Rei Wake, Motohide Furuya, Maiko Hayashida, Jun Horiguchi: Analysis of oxidative stress expressed by urinary level of biopyrrins and 8-hydroxydeoxyguanosine in patients with chronic schizophrenia. The 11th Annual Meeting of Japanese Society of Schizophrenia Research. 前橋, 2016.3.25-26
10. Erlin Limoa: The Effect of Electroconvulsive Shock on Activated Microglia and Astrocyte in Animal Model. WPA International Congress 2015 (ACSR). Taipei, TAIWAN, November 18-22, 2015
11. 橋岡禎征, 宮岡剛, 和氣玲, 林田麻衣子, 堀口淳: 活性化ミクログリアの抑制によって統合失調症は治療できるのか? 第63回山陰精神神経学会. 米子, 2015.7.4
12. 宮岡剛: 統合失調症の予防と治療～体質性黄疸を合併する緊張型統合失調症に関する検討をもとに～. 第111回日本精神神経学会学術総会. 教育講演 1.大阪, 2015.6.4-6

〔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：  
 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：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名： 津森 登志子  
 ローマ字氏名： (TSUMORI, toshiko)  
 所属研究機関名： 県立広島大学  
 部局名： 保健福祉学部  
 職名： 教授  
 研究者番号(8桁): 30217377

研究分担者氏名： 橋岡 禎征  
ローマ字氏名： (HASHIOKA, sadayuki)  
所属研究機関名： 島根大学  
部局名： 医学部  
職名： 講師  
研究者番号(8桁): 00622523

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 土江 景子  
ローマ字氏名： (TSUCHIE, keiko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。