

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390289

研究課題名(和文)統合失調症の病態発生病因因子としてのミクログリアの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of microglia as a therapeutic target of schizophrenia

研究代表者

佐藤 康二 (Sato, Kohji)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：80235340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：活性化ミクログリアが統合失調症初発患者脳で確認されたことから、ミクログリアの活性化を惹起する脳内因子の賦活が統合失調症の病態早期に起こると考えられた。そこで、本研究では統合失調症の病態早期におけるミクログリア活性化の仕組みを解明することを目的として、ミクログリアが特異的に緑色蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスの胎仔を、poly(I:C)に感染させることで統合失調症マウスモデルを作製した。さらに、それに独自の蛍光機能プローブを投与することにより、炎症反応過程の初段階におけるカスパーゼ1によるIL-1前駆体からのIL-1のプロセッシングを、二光子励起レーザー走査型顕微鏡を用い画像化した。

研究成果の概要(英文)：Aberrant microglial activation was recently observed in the affected brain with schizophrenia at its early developmental stage. This observation implies the involvement of pathological activation in the pathophysiology of schizophrenia. Thus the present study aimed at the investigation of molecular machinery underlying microglial activation in the pathological condition. Firstly, mice expressing fluorescently labeled green fluorescent protein specifically in microglia were infected with poly(I:C) and model mice of schizophrenia were established. Secondly, newly developed fluorescent imaging probe was administered to the established schizophrenic model mice, and the activation of Caspase-1 and subsequent IL-1 β production at early phase of inflammation were visualized in vivo under two-photon microscope.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：精神病理学

1. 研究開始当初の背景

近年、研究代表者らはPETにより初発未治療の統合失調症患者17名で活性化ミクログリアの脳内分布と、その程度について精査した。PETイメージングは、活性化ミクログリアに結合するトレーサーである $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ によった。その結果、すべての統合失調症患者脳で、健常者脳と比較し、2倍以上の活性化ミクログリアの増加を認めた。

統合失調症は、多因子疾患であり、症候群である。しかし、この疾患の別個の症例の依って立つ共通の生物学的基盤を同定することにより、発症前、あるいは発症初期に治療的介入を行うことは可能であると考えられた。それまでに、統合失調症患者でのMRI(磁気共鳴画像法)による脳構造解析の結果、脳局所での容積変化が、また、患者血清の生化学的解析の結果、種々の脳内タンパク質の挙動変化が報告される等、神経活動に関連した諸因子について、統合失調症患者で健常人との有為差が認められていたが、個々の因子は、患者間での標準偏差が大きく、それらを統合失調症の診断のための指標とすることは困難であった。対して、活性化ミクログリアの著明な増加は、未治療の統合失調症患者の全てにおいて認められる現象であり、統合失調症患者と健常人とを識別するのに極めて有用な指標であると考えられた。統合失調症患者で活性化ミクログリアの脳画像研究を行った例は、それまでも van Berckel らや、Doorduyn らによる研究があったが、そこでは抗精神病薬を服用している患者で解析が行われており、活性化ミクログリアの増加は顕著ではなかった。わずかな差しかなかったという彼らの結果は、抗精神病薬がミクログリアの活性化を抑制することに由来すると考えられた。

2. 研究の目的

統合失調症患者脳でのミクログリアの活性化は、脳内での炎症反応の生起を示唆しており、また、活性化ミクログリアが初発患者脳で確認されたことから、ミクログリアの活性化を惹起する脳内因子の賦活が統合失調症の病態早期に起こると考えられた。そこで、本研究では統合失調症の病態早期におけるミクログリア活性化の仕組みを解明することを目的として、ミクログリアが特異的に緑色蛍光タンパク質(EGFP)を発現する遺伝子改変マウス(Ibal-EGFP マウス)の胎仔を、polyribonucleosinic-polyribocytidilic acid(poly(I:C))に感染させることで統合失調症マウスモデル(EGFP-Schi マウス)を作製し、さらに、それに申請者ら独自の蛍光機能プローブを投与することにより、炎症反応過程の初段階におけるカスパーゼ1によるIL-1前駆体からのIL-1のプロセッシングを、in vivo で二光子励起レーザー走査型顕微鏡を用い画像化することを目的とした。

一方で、近年、ミクログリアは神経伝達物

質に応答することにより神経可塑性に関与することが報告されていた。よって、本研究では、統合失調症患者脳で $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ の結合を認めた内側前頭前野等の脳領域について、マウスモデルで電子顕微鏡による形態学的解析と in vivo パッチクランプ法による神経回路解析を行うことにより、当該領域におけるミクログリアの性状を探索して、統合失調症特異的な神経活動の反映としてのミクログリア活性化の分子基盤を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず、ミクログリア特異的にEGFPを発現する統合失調症マウスモデル(EGFP-Schi マウス)に、独自の蛍光機能プローブを導入することにより、炎症反応初段階のIL-1の生成を、in vivo でミクログリアとともに画像化し、炎症反応の惹起の伴うミクログリアにおける遺伝子発現変化を、ミクログリアで laser capture microdissection (LCM)を行い解析した。また、統合失調症患者で、活性化ミクログリアの集積を認めた脳領域について、EGFP-Schi マウスで形態学的解析と電気生理学的解析を行い、統合失調症特異的な神経活動の賦活とミクログリアの活性化の関連を検討した。それにより、ミクログリア活性化の統合失調症特異的な分子基盤を解明した。さらに、EGFP-Schi マウスで、ミクログリアを治療標的とした薬剤候補化合物のスクリーニングを行い、その統合失調症治療に向けた創薬への応用を図った。

4. 研究成果

(1)EGFP-Schi マウスの作成

妊娠中のIbal-EGFP マウスに、poly(I:C)を一回あたりの容量を5.0mg/kgとして6日間連続(E12~E17)で腹腔内投与し、EGFP-Schi マウスを作製した。

(2)若年個体脳からの脳スライスでの検討

脳スライスの作成と蛍光プローブの導入：EGFP-Schi マウスの若年個体脳より脳スライス培養系を調製した。ここでは、研究代表者ら独自の蛍光機能プローブを、調製した培養系に導入することにより、IL-1前駆体からIL-1を生成するカスパーゼ1の酵素活性を、生組織中でリアルタイムにイメージングし、ミクログリア活性化に先立つ炎症反応の惹起を検出した。この蛍光機能プローブは、IL-1前駆体中のカスパーゼ1基質部位の両端に、蛍光物質と消光剤を結合し、IL-1前駆体がカスパーゼ1により切断されIL-1を生成する結果、消光剤が遊離され蛍光を発するもので、さらに、付加されたHIV-TatのCPP(cell penetrating peptide)活性による膜透過能を持つ。

ミクログリアの活性化を誘引する炎症性因子の探索：

当該培養系ではミクログリアが特異的にEGFPを発現しているため、炎症反応の初段階

におけるカスパーゼ1の賦活と、それに続くIL-1産生に伴う蛍光機能プローブからの蛍光を検出した直後に、laser capture microdissection (LCM)によりミクログリアを分離し、DNAマイクロアレイを用いて、ミクログリアでの遺伝子発現変化を解析した。それによって、DNAマイクロアレイでの解析結果に基づき、ミクログリアの活性化を誘引する炎症性因子の探索を行った。

ミクログリア活性化の神経活動依存性の電気生理学的基盤の解明：

次に、研究代表者らの統合失調症患者でのPETによるミクログリアの脳内動態解析の結果、顕著なミクログリアの活性化を認めた内側前頭前野等の脳領域について、EGFP-Schiマウスの脳スライスで、電子顕微鏡による形態学的解析とパッチクランプ法による神経回路解析を行った。ここでは、ミクログリア近傍の局所神経回路を刺激あるいは抑制することによる活性化ミクログリアの挙動変化を、脳スライスで蛍光顕微鏡下に解析した。それにより、当該脳領域における活性化ミクログリア・ニューロン相関の形態学的基礎と、ミクログリア活性化の神経活動依存性の電気生理学的基盤を解明した。

特異的遺伝子の同定とその遺伝子機能の解明

統合失調症患者での脳領域特異的なミクログリアの活性化の分子的背景を探索することを目的として、統合失調症患者脳での¹¹C]PK11195への高い結合性を持つ領域と、微弱な結合性のみ呈する領域について、EGFP-Schiマウスの各々の相当領域から、LCMによりミクログリアの周囲組織を分離し、DNAマイクロアレイを用い二つの領域での遺伝子発現パターンを比較解析した。それによって、活性化ミクログリアの周囲組織で特異的に発現が亢進している遺伝子を同定し、その遺伝子のコードするタンパク質を、EGFP-Schiマウスで阻害あるいは賦活し、成熟マウスでみられるPPIの障害やメタンメタンフェタミンへの反応性がどのように修飾されるかを検討した。

二重遺伝子改変マウスの作成と、より詳細な検討

ニューロン特異的に赤色蛍光タンパク質を発現するNSE-RFPマウスとIba1-EGFPマウスを交配し作製した二重遺伝子改変マウスの胎仔に、poly(I:C)を感染させた統合失調症マウスモデル(NSE-RFP/Iba1-EGFP・Schiマウス)を用い、二光子励起レーザー走査型顕微鏡により樹状突起スパイン形成・発達と活性化ミクログリアの関連を評価した。そして著明なミクログリアの活性化を認める内側前頭前野等の当該マウス脳領域で、ミクログリアが隣接する神経線維の活動電位をin vivoパッチクランプ記録法により計測しながら、ミクログリアの形態変化をリアルタイムで二光子励起レーザー走査型顕微鏡を用いて解析した。これにより、ミクログリアの活性化

に近接神経の神経活動が及ぼす影響を電気生理学的に生体脳で検討した。ここでは、また、NMDA受容体ブロッカーMK801やカイニン酸受容体ブロッカーUBP296の他、ドパミンD1/D2受容体ブロッカーである抗精神病薬ハロペリドール等を顕微注入することで、隣接神経線維活動の抑止による活性化ミクログリアの動態変化を形態学的に解析し、ミクログリア活性化の神経活動依存性を併せて検討した。本研究では、さらに、先に探索したミクログリアの活性化に關与する炎症性因子が、神経活動や、それへの近接ミクログリアの応答性に及ぼす影響についても、in vivoで電気生理学的に検討した。

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 9件)

- 1: Sato K. Minimum dynamic core in consciousness. *J Theor Biol.* 343: 208-10 (2014)
doi:10.1016/j.jtbi.2013.09.034.
- 2: Sato K. Why does serotonergic activity drastically decrease during REM sleep? *Med Hypotheses.* 81:734-7. (2013)
doi:10.1016/j.mehy.2013.07.041.
- 3: Sato K. Disruption of spine homeostasis causes depression. *Med Hypotheses.* 81:5-9. (2013) doi: 10.1016/j.mehy.2013.03.025.
- 4: Sato K. Placenta-derived hypo-serotonin situations in the developing forebrain cause autism. *Med Hypotheses.* 80:368-72. (2013)
doi:10.1016/j.mehy.2013.01.002.
- 5: Sato K. Disruption of spine homeostasis causes dopaminergic compensatory up-regulation, resulting in schizophrenia. *Med Hypotheses.* 79:304-7. (2012)
doi:10.1016/j.mehy.2012.05.015.
- 6: Miyazaki K, Ohno K, Tamura N, Sasaki T, Sato K. CLP36 and RIL recruit -actinin-1 to stress fibers and differentially regulate stress fiber dynamics in F2408 fibroblasts. *Exp Cell Res.* 318:1716-25. (2012)
doi:10.1016/j.yexcr.2012.05.006.
- 7: Sasaki T, Nakamura K, Sasada K, Okada S, Cheng XW, Suzuki T, Murohara T, Sato K., Kuzuya M. Matrix metalloproteinase-2 deficiency impairs aortic atherosclerotic calcification in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 227:43-50. (2012)
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.12.008.
- 8: Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Onoue K, Ikegami K,

- Morita Y, Yamamoto N, Mano Y, Sano M, Saito T, Sato K, Konno H, Setou M, Unno N. Adventitial vasa vasorum arteriosclerosis in abdominal aortic aneurysm. PLoS One. 8:e57398. (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0057398.
- 9: Sano M, Sasaki T, Hirakawa S, Sakabe J, Ogawa M, Baba S, Zaima N, Tanaka H, Inuzuka K, Yamamoto N, Setou M, Sato K, Konno H, Unno N. Lymphangiogenesis and angiogenesis in abdominal aortic aneurysm. PLoS One. 9:e89830. (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0089830.

〔学会発表〕(計 1件)

- 1: 植木孝俊、第119回日本解剖学会総会全国学術集会シンポジウム、「グリア細胞研究の最前線:ミクログリアを治療標的とした神経変性疾患治療戦略の構築」平成26年3月29日、下野市

〔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〕

ホームページ等
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 康二 (Kohji Sato)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：80235340

(2) 研究分担者

森 則夫 (Norio Mori)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：00174376

松崎 秀夫 (Hideo Matsuzaki)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：00334970

植木 孝俊 (Takatoshi Ueki)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60317328

中村 和彦 (Kazuhiko Nakamura)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80263911