

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591702

研究課題名(和文) 出生時低酸素曝露ラットを用いた統合失調症ミクログリア仮説の検証

研究課題名(英文) Testing the microglial activation hypothesis of schizophrenia using perinatal asphyxia model of rats

研究代表者

高橋 太郎 (Takahashi, Taro)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：30402358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素を伴う周産期合併症は統合失調症の疫学研究が示す発症危険因子である。一方この病の病態には、活性化、ミクログリアの関与が示唆されている。本研究では、統合失調症の動物モデルとして出生時低酸素曝露ラットを用い、統合失調症感受性遺伝子の脳内発現とミクログリア活性化について検討した。その結果、このモデルでは内側前頭前野においてニューレグリン遺伝子NRG1のmRNA発現が低下し、カテコールOメチル化酵素遺伝子COMTのmRNA発現は増加していることを見出した。しかしミクログリアの活性化に有意な変化はなかった。出生時低酸素曝露刺激が統合失調症発症リスクを高める機序については、更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies suggest that hypoxia-related perinatal complications increase the risk of schizophrenia. Neuropathological and neuroimaging studies of the disorder have indicated that immunological events such as overt microglial activation might underpin the development of schizophrenia. We hypothesized that birth complications that cause hypoxia in the fetal brain may be associated with dysregulation in the expression of susceptibility genes of schizophrenia and increased microglial activation. To test this, we examined these points in rat model of perinatal asphyxia. We found significantly altered expression of NRG1 and COMT in the mPFC. However, microglial activation was not detected at any developmental periods examined. Although these results failed to support the microglial activation hypothesis of schizophrenia, the results did suggest that perinatal asphyxia may lead to a long-lasting influence on the expression of specific genes, such as NRG1 and COMT.

研究分野：医歯薬学

キーワード：統合失調症 ミクログリア 周産期仮死

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の発症危険因子の全ては出生前に存在する。遺伝要因はもとより母体の低栄養やウイルス感染、ストレス要因への曝露などの様々な妊娠中の環境要因がこの病のリスクであることが、疫学研究から繰り返し示されている。一方、統合失調症の脳画像研究から、患者の背外側前頭前野や上側頭回などの特定の脳部位に萎縮が認められ病態とともに進行すること、そして、このような脳萎縮は未治療の患者で既に存在することが知られている。この脳萎縮の原因は不明だが、その一部には自然免疫系の活性化による脳内炎症が関与していることが示唆される。事実、我々のポジトロン断層法 (PET) による検討によれば、初発・未治療の統合失調症患者において既に、広汎な脳部位で免疫担当細胞であるミクログリアの活性化が増大していた(未発表)。しかし、統合失調症の発症危険因子がいかにしてミクログリア活性化の増大につながるのかは全く不明である。

さて、先に述べた統合失調症の環境要因の一つに周産期の低酸素状態があり、この知見に基づいた統合失調症の動物モデルとして「周産期仮死モデル」がある。すなわち、ラットの出生時に子宮内仮死(低酸素状態)を経験させると、それらのラットでは成熟後に海馬神経細胞数が減少し、覚醒剤メタンフェタミンに対する感受性が亢進する(図1)。すなわち、周産期仮死モデルは、統合失調症の発症危険因子がいかにして成熟後に統合失調症様の異常をもたらすのかを明らかにする上で有用なモデルと考えられる。

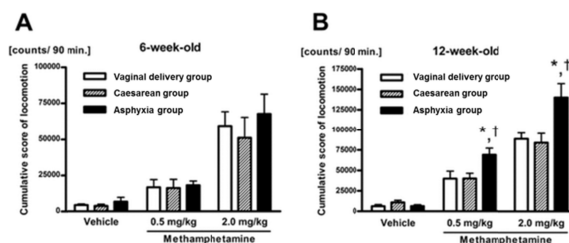


図1 周産期仮死モデルでは成熟前(A)はそうではないが、成熟後(B)にメタンフェタミンに対する反応性が增大する。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、統合失調症の発症に果たすミクログリアの役割を周産期仮死モデルを用いて検討することとした。具体的には、周産期仮死モデルラットにおいて統合失調症患者と同様にミクログリア活性化が増加しているかどうかを検討した。

また、周産期仮死モデルの統合失調症モデルとしての妥当性をさらに検証するために、統合失調症の脆弱性遺伝子とされる NRG1、ErbB4、AKT1、COMT、BDNF の脳内発現を mRNA レベルと蛋白レベルで調べた。

3. 研究の方法

➤ 周産期仮死モデルの作製

Sprague-Dawley (SD)系雌性妊娠ラットを妊娠満期最終日にイソフルラン麻酔下で開腹し、子宮を取り出した。双角子宮の一侧を胎仔ごと 37 の生理食塩水に 15 分間浸し低酸素状態におき子宮内仮死を経験させ、これらを仮死群 Asphyxia (A) group とした。もう一侧の子宮からは速やかに仔を取り出し、これらを帝王切開群 Caesarean-section (C) group とした。両群ともに、仔に代理母ラットをあてがい 3 週間後に離乳し、一定期間の飼育後に以下の実験に供した。

➤ 胎生期疑似感染モデル

周産期仮死モデルと比較する目的で、このモデルと同様に統合失調症の疫学的知見によるモデルである胎生期疑似感染モデルを用いた。SD 系雌性妊娠ラットに、妊娠 13 日目に polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (Poly I:C) を 20 mg/kg の用量で腹腔内投与し、その後自然分娩させた(Poly I:C group)。対照には PBS を腹腔内投与した(PBS group)。両グループの仔らはそのまま母ラットとともに飼育し、3 週齢で離乳し、一定期間の飼育後に以下の実験に供した。

➤ 統合失調症脆弱性遺伝子発現の検討

脆弱性遺伝子の mRNA 発現解析のために A group ラット 12 匹 (6 週齢、n=6; 12 週齢、n=6) と、C group ラット 12 匹 (6 週齢、n=6; 12 週齢、n=6) を用いた。ネンブータル深麻酔下に断頭し脳を取り出し、内側前頭前野 (mPFC) と海馬 (HP) をサンプリングした。これら脳サンプルより TRIZOL reagent (Invitrogen 製) により mRNA を抽出、SuperScript (Invitrogen 製) により cDNA を調整し、ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (ABI 製) による real-time quantitative PCR (qPCR) により計測した。

脆弱性遺伝子の蛋白発現解析には A group ラット 16 匹 (6 週齢、n=8; 12 週齢、n=8) および C group ラット 16 匹 (6 週齢、n=8; 12 週齢、n=8) を用いた。上述の方法で mPFC と HP を取り出し、protein lysis buffer に溶解させ蛋白質サンプルを調整した。これらのサンプルを用い、各脆弱性遺伝子の産物に対する特異抗体による Western blotting 法により発現量を計測した。

➤ ミクログリアの免疫組織化学

A または C group の動物を 4、6、8、12 週齢の各時点でネンブータル深麻酔下にリン酸緩衝パラホルムアルデヒド液で灌流固定した。Poly I:C group および PBS group の動物については 4、8 週齢の時点で灌流固定した。脳を取り出しドライアイスで凍結後、クリオスタット(Thermo Sci 製)にて 20- μ m 厚の凍結連続切片を作成した。抗 Iba-1 抗体による免疫組織化学法によりミクログリアを可視化し、光学顕微鏡下に総数と形態を観察した。

4. 研究成果

1. 周産期仮死モデルにおける統合失調症関連因子の発現変動

6、12 週齢の A、C group の mPFC と HIP 領域での、NRG1、ErbB4、AKT1、COMT、

BDNF の mRNA の発現量を測定した結果、6 週齢と 12 週齢との両時点で mPFC における NRG1 発現が A group で有意に低下していた。また、6 週齢ではそうではなかったが 12 週齢では mPFC の COMT 発現が有意に増加していた。HP においてはいずれの時点でも発現が変化している遺伝子はなかった (表 1)。

| Gene | mPFC | | | HP | | |
|------------------------|------------|--------------|---------|------------|--------------|---------|
| | C group | A group | p value | C group | A group | p value |
| <i>6 weeks of age</i> | | | | | | |
| NRG1 | 100 ± 9.6 | 83.5 ± 6.7 | .049* | 100 ± 13.1 | 86.8 ± 7.4 | .204 |
| ErbB4 | 100 ± 19.1 | 89.3 ± 23.2 | .599 | 100 ± 20.9 | 96.8 ± 17.1 | .865 |
| AKT1 | 100 ± 13.1 | 108.5 ± 8.7 | .473 | 100 ± 5.0 | 101.0 ± 4.9 | .917 |
| COMT | 100 ± 22.6 | 128.4 ± 10.7 | .180 | 100 ± 13.8 | 113.6 ± 14.1 | .373 |
| BDNF | 100 ± 7.2 | 104.0 ± 11.3 | .719 | 100 ± 5.2 | 113.0 ± 6.5 | .059 |
| <i>12 weeks of age</i> | | | | | | |
| NRG1 | 100 ± 8.5 | 75.8 ± 12.7 | .026* | 100 ± 15.6 | 91.5 ± 9.9 | .505 |
| ErbB4 | 100 ± 13.5 | 116.1 ± 16.8 | .341 | 100 ± 10.0 | 92.1 ± 15.2 | .529 |
| AKT1 | 100 ± 22.1 | 79.9 ± 14.6 | .249 | 100 ± 5.9 | 90.6 ± 5.3 | .104 |
| COMT | 100 ± 16.1 | 148.0 ± 12.3 | .019* | 100 ± 14.1 | 95.5 ± 7.5 | .689 |
| BDNF | 100 ± 11.3 | 114.0 ± 12.7 | .293 | 100 ± 4.8 | 91.7 ± 9.5 | .268 |

表1 周産期仮死モデルの mPFC と HP における mRNA 発現。NRG1 と COMT に有意な変化が認められた。

そこで、mPFC における NRG1、ErbB4、AKT1、COMT、BDNF のタンパク質発現量を計測したところ、いずれの遺伝子産物にも A、C group 間に有意な差はなかった (表 2)。

| Protein | mPFC | | p value |
|------------------------|---------------|---------------|---------|
| | C group | A group | |
| <i>6 weeks of age</i> | | | |
| NRG1 | 0.323 ± 0.014 | 0.321 ± 0.014 | .950 |
| ErbB4 | 0.558 ± 0.027 | 0.600 ± 0.021 | .239 |
| AKT1 | 0.479 ± 0.019 | 0.504 ± 0.009 | .253 |
| COMT | 0.335 ± 0.012 | 0.341 ± 0.017 | .768 |
| BDNF | 0.410 ± 0.009 | 0.398 ± 0.012 | .428 |
| <i>12 weeks of age</i> | | | |
| NRG1 | 0.324 ± 0.014 | 0.331 ± 0.010 | .670 |
| ErbB4 | 0.559 ± 0.025 | 0.544 ± 0.021 | .651 |
| AKT1 | 0.466 ± 0.021 | 0.450 ± 0.014 | .540 |
| COMT | 0.343 ± 0.015 | 0.356 ± 0.011 | .462 |
| BDNF | 0.386 ± 0.008 | 0.396 ± 0.008 | .385 |

表2 周産期仮死モデルの mPFC における蛋白発現。

II. 周産期仮死モデルでのミクログリアの形態変化の観察

A および C group の 4、6、8、12 週齢におけるミクログリアの発現を免疫組織化学法により検討した。その結果、ミクログリアの総数にも形態にも有意差は認められなかった (図 2)。

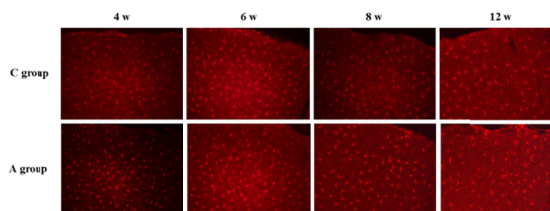


図2 周産期仮死モデルの大脳皮質 mPFC における、抗 Iba-1 免疫染色の結果。

III. 胎生期疑似感染モデルにおけるミクログリアの形態観察

以上の結果のように今回の周産期仮死モデルの検討ではミクログリアが活性化しているような形態変化はみとめられなかった。そこで、統合失調症モデルの有力なひとつとして考えられている、胎生期疑似感染モデルである poly I:C モデルを作成し仔が 4 週齢もしくは 8 週齢になった時点でのミクログリアの総数と形態を大脳皮質で検討した。その結果、8 週齢の大脳皮質において有意な差ではなかったがミクログリアの総数に増加傾向がみとめられた(図 3 A)。また、同時期の poly I:C 投与群のミクログリアの細胞体が大きくなり、さらにミクログリアの突起が太く短くなっているのが観察された(図 3 B)。

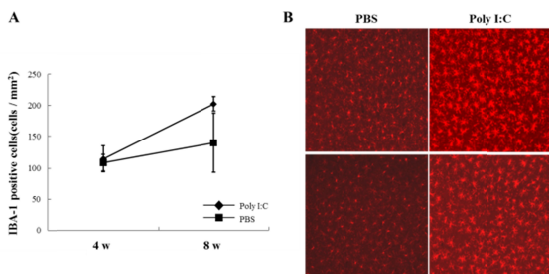


図3 胎生期疑似感染モデル大脳皮質におけるミクログリアの数と形態変化

本研究により、周産期仮死モデルの mPFC において統合失調症の疾患感受性遺伝子である NRG1 と COMT の mRNA の発現量が変化していることが明らかとなった。COMT の発現量が増加した時期はメタンフェタミンに対する行動量の増加率が増加する時期に一致しており、今後ドパミン神経の活動にどのような影響を与えているのかについて、さらなる検討が必要である。

周産期仮死モデルにおいてミクログリアの活性化はみとめられなかったが、胎生期疑似感染モデルである poly I:C モデルの大脳皮質ではミクログリアの総数が増加し、ミクログリアの形態変化がみとめられた。このこと

から、胎児脳の発達時期や脳への侵襲によりミクログリアへの影響は異なるものと考えられた。

以上、統合失調症患者において認められている成長後にみられるミクログリアの活性化メカニズムを明らかにするためには、更なる検討が必要であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Wakuda T, Iwata K, Iwata Y, Anitha A, Takahashi T, Yamada K, Vasu MM, Matsuzaki H, Suzuki K, Mori N. Perinatal asphyxia alters neuregulin-1 and COMT gene expression in the medial prefrontal cortex in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 56:149-54. 2015.
2. Iwata K, Matsuzaki H, Tachibana T, Ohno K, Yoshimura S, Takamura H, Yamada K, Matsuzaki S, Nakamura K, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Tsujii M, Sugiyama T, Katayama T, Mori N. N-ethylmaleimide-sensitive factor interacts with the serotonin transporter and modulates its trafficking: implications for pathophysiology in autism. *Mol Autism*. 5: 33. 2014.
3. Kameno Y, Iwata K, Matsuzaki H, Miyachi T, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Maekawa M, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. Serum levels of soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are decreased in subjects with autism spectrum disorder. *Mol Autism*. 4(1):19. 2013.
4. Shimmura C, Suzuki K, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Ohno K, Matsuzaki H, Iwata K, Kameno Y, Takahashi T, Wakuda T, Nakamura K, Hashimoto K, Mori N. Enzymes in the glutamate-glutamine cycle

in the anterior cingulate cortex in postmortem brain of subjects with autism. *Mol Autism*. 4(1):6. 2013.

5. Iwata K, Izumo N, Matsuzaki H, Manabe T, Ishibashi Y, Ichitani Y, Yamada K, Thanseem I, Anitha A, Vasu MM, Shimmura C, Wakuda T, Kamenno Y, Takahashi T, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Mori N. Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats. *Mol Autism*. 3(1):11. 2012.
6. Thanseem I, Anitha A, Nakamura K, Suda S, Iwata K, Matsuzaki H, Ohtsubo M, Ueki T, Katayama T, Iwata Y, Suzuki K, Minoshima S, Mori N. Elevated transcription factor Sp1 in autism brains alters the expression of autism candidate genes. *Biol Psychiatry*. 71:410-8. 2012

[学会発表](計3件)

●ポスター発表

1. Iwata K, Matsuzaki H, Takei N, Mori N. Alteration of the expression balance of hnRNP C1 and C2 changes the expression of myelination- and schizophrenia-related genes in the human neuroblastoma cell line. 3rd Schizophrenia International Research Society Conference. Florence, Italy. April 14-18, 2012.
2. Wakuda T, Iwata K, Suzuki K, Takei N, Mori N. Alteration of several schizophrenia candidate genes expression in medial prefrontal cortex in perinatal psychosis rodent model. 3rd Schizophrenia International Research Society Conference. Florence, Italy. April 14-18, 2012.

●シンポジウム発表

1. 和久田智靖. 統合失調症動物モデルとしての低酸素仮死ラットの遺伝子発現量

の検討、精神神経系薬物治療研究報告会、平成24年12月、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 太郎 (Takahashi, Taro)

浜松医科大学・精神医学講座・特任助教

研究者番号：30402358

(2) 研究分担者

和久田 智靖 (Wakuda, Tomoyasu)

浜松医科大学・精神医学講座・助教

研究者番号：80444355

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