

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19727

研究課題名(和文)統合失調症の神経免疫仮説におけるマクロファージ遊走阻止因子(MIF)の役割

研究課題名(英文)The role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the neuroimmunological hypothesis of schizophrenia

研究代表者

岡崎 賢志 (OKAZAKI, Satoshi)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70722867

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):統合失調症の病態機序を解明するために、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)に着目し解析を行った。血清MIF濃度については、対照群と比べ患者群で有意に高く、抗精神病薬投与量と正の相関を認めた。死後脳MIF蛋白レベルについては、患者群と対照群で有意差は認めなかった。さらにMIF遺伝子多型と女性の若年発症統合失調症に有意な関連を認めた。これらの知見により、MIFが統合失調症の病態機序に関与している可能性、およびバイオマーカーとして利用できる可能性を示した。今後はさらに、マウス由来初代神経系培養細胞や患者由来iPS細胞を用いて検討を継続する予定である。

研究成果の概要(英文):We explored the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the pathophysiology of schizophrenia. We found that serum MIF level is significantly higher in patients with schizophrenia than in controls. In addition, serum MIF level is significantly positively correlated with antipsychotic dose. However, there is no difference in post-mortem brain MIF level between schizophrenia and control groups. On the other hand, we found significant association of MIF gene polymorphisms with adolescent-onset female schizophrenia. Our findings suggest that MIF is involved in the pathophysiology of schizophrenia and it might be useful for a biomarker of schizophrenia. We are going to continue the investigation of the mechanism of MIF in schizophrenia using primary mouse neural cells and human iPS cells derived from patients with schizophrenia and it might be useful for a biomarker of schizophrenia.

研究分野：精神医学分野

キーワード：統合失調症 MIF SNP マイクロサテライト 死後脳 アストロサイト 神経幹細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は世界的に有病率約 1%のありふれた疾患であるが、その生物学的基盤は明らかでなく、診断や治療は症状と経過に依存している。早期診断と早期介入治療のためにも、病態機序の解明と有用なバイオマーカーの確立が喫緊の課題となっている。

統合失調症の病態メカニズムの 1 つとして、胎生期からの神経免疫系の擾乱が中枢神経系の障害を惹起するという神経免疫仮説が提唱されている。神経系と免疫系のクロストークにはサイトカインが中心的な役割を果たしている。申請者はサイトカインの中でもケモカイン群に着目し、健常群 14 例、統合失調症群 43 例を対象に、Bio-Plex Pro® Human Chemokine Assay (バイオ・ラッド社) を用いて網羅的に解析し、特徴的な変化を示すバイオマーカー候補として、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) を同定した。

MIF は、活性化 T リンパ球から産生されマクロファージの遊走を阻止し炎症反応を惹起する液性因子として発見された。現在では、中枢神経系を含む非免疫系細胞でも全身性に発現し、ケモカイン受容体 CXCR2/4/7 に結合しケモカイン様機能を持つこと、CD74/CD44 複合体に結合し ERK/MAPK シグナル活性化による細胞周期への関与、がん抑制遺伝子 p53 の阻害作用、NF κ B における抗グルココルチコイド作用が知られている。さらに近年のマウスを使った研究で、脳では特にアストロサイトで高発現し、また神経幹細胞の増殖/生存への関与など、神経系への重要な役割も報告されている (Ohta et al. J Cell Science 2012)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MIF の統合失調症の病態機序への関与およびバイオマーカーとしての可能性を、ヒト臨床サンプル (血液・死後脳)、マウス由来神経幹細胞 (NSC) /ニューロン/アストロサイト、およびヒト由来 iPS 細胞を用いて解析し、統合失調症の病態機序を解明するための研究基盤を確立することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト臨床サンプルを用いた解析

予備実験とは独立した統合失調症患者および健常対照群の血清サンプルを用いて、MIF 血清濃度の確認 (ELISA 法)、mRNA 発現解析 (Q-RT-PCR 法) を行った。次に、死後脳における MIF 蛋白発現をウエスタンブロッティング法で測定し、比較解析した。さらに MIF 遺伝子プロモーター領域の既知の機能的多型 (SNP およびマイクロサテライト) の関連解析を行った。

(2) マウス初代培養細胞を用いた解析

新生仔マウスから、皮質由来アストロサイト、海馬由来神経幹細胞 (NSC) ・ニューロン

の初代培養系を確立した。NSC にリコンビナント MIF を投与し、生存 (BrdU 法) と抗アポトーシス (TUNEL 法) を測定した。

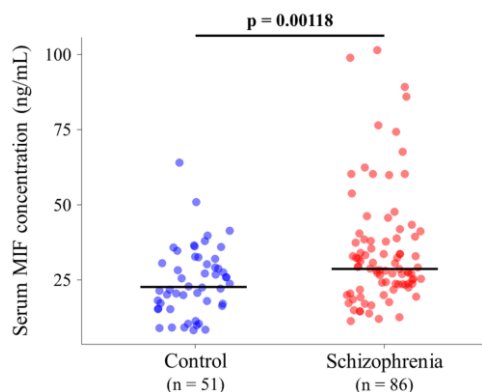
(3) ヒト iPS 細胞を用いた解析

ヒト末梢血からの iPS 細胞樹立維持培養系を確立した。さらに統合失調症患者由来のヒト iPS 細胞の集積を進めている。統合失調症の中でも、遺伝的変異が特定されている 22q11.2 欠損症候群に着目し、患者由来 iPS 細胞を用いて MIF 発現および関連遺伝子の変化の解析を進めている。

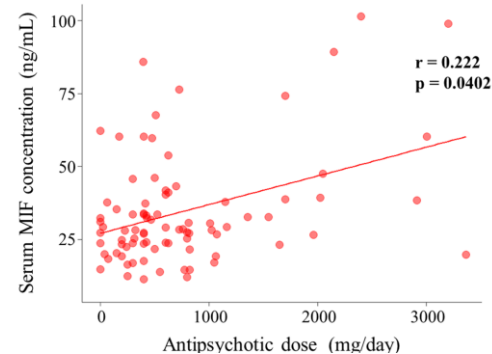
4. 研究成果

(1) ヒト臨床サンプルを用いた解析

患者 86 例、健常対象者 51 例の血清サンプルの血清 MIF 濃度を測定した。その結果、患者で有意な高値を認めた (下図)。



さらに抗精神病薬投与量 (クロルプロマジン換算量) との正相関を認めた (下図)。



血液由来 mRNA 発現解析では有意な差は認めなかった。さらに患者 22 例と対照者 18 例の死後脳前頭前野における MIF 蛋白発現解析を行ったが、有意な差は認めなかった。

MIF 遺伝子プロモーター領域の多型 (-794CATT₅₋₈ microsatellite と -173G>C SNP) について、患者約 1483 例と健常対象者約 1454 例の末梢血から抽出した DNA を用いて関連解析を行った。統合失調症全体では有意な多型は認めなかった。性別と発症年齢でサブグループ解析を行ったところ、女性の若年発症統合失調症において有意に少ない多型を同定した (CATT₆ アレルおよび CATT₆-G ハプロタイプ)。CATT₆ アレルは MIF 遺伝子の高発現アレルであることから、胎生期の MIF 発現が、女

性の若年発症統合失調症にプロテクティブであることが示唆された (下図)。

Distribution of the MIF-794C/T1 microsatellite and MIF-776G/C SNP in controls (CTL, n = 1454) and patients with adolescent-onset schizophrenia (AOS, n = 486), further subdivided by sex.

Polymorphism	Sex	CTL				AOS				Odds ratio (95%CI)	Power		
		Genotype distribution ^a	Allele	Genotype distribution ^a	Allele	Genotype distribution ^a	Allele	p-value ^b					
MIF-794C/T1 microsatellite (rs1844572)	All	220	700	534	392	82	236	168	0.412	0.280	0.282	1.085 (0.935-1.257)	0.198
	Male	115	333	261	0.397	37	126	97	0.385	0.621	0.620	0.849 (0.772-1.07)	0.076
	Female	105	367	273	0.387	45	110	71	0.442	0.836	0.836 (0.617)	1.256 (1.015-1.564)	0.051
CAT1	All	300	707	447	0.440	83	239	164	0.417	0.076	0.075	0.875 (0.755-1.013)	0.412
	Male	148	335	226	0.445	52	129	79	0.448	0.905	0.904	1.013 (0.827-1.239)	0.052
	Female	152	372	221	0.454	31	110	85	0.381	0.06879	0.06861 (0.0222)	0.740 (0.596-0.918)	0.786
CAT2	All	41	374	1039	0.157	17	132	337	0.171	0.311	0.304	1.107 (0.912-1.345)	0.181
	Male	23	174	512	0.155	9	69	182	0.167	0.528	0.516	1.094 (0.914-1.315)	0.102
	Female	18	200	527	0.158	8	63	155	0.175	0.400	0.408	1.125 (0.851-1.489)	0.144
CAT3	All	0	5	1449	0.002	0	1	485	0.001	0.635	0.635	0.598 (0.076-1.124)	0.061
	Male	0	4	705	0.003	0	0	260	0.000	0.225	0.225	-	0.120
	Female	0	1	744	0.001	0	1	225	0.002	0.371	0.371	3.302 (0.206-52.889)	0.135
MIF-776G/C SNP (rs755522)	All	72	472	910	0.212	30	165	291	0.231	0.205	0.198	1.121 (0.942-1.333)	0.241
	Male	37	222	450	0.209	19	81	160	0.229	0.356	0.339	1.125 (0.884-1.432)	0.162
	Female	35	250	460	0.215	11	84	131	0.235	0.373	0.374	1.120 (0.872-1.439)	0.151

Boldface type indicates significant differences between the adolescent-onset schizophrenia and control groups.
^a This column shows the reference allele homozygote, heterozygote, and others as x/x, x/-, and -/-, respectively.
^b Genotype p-values were calculated with the Cochran-Mantel-Haenszel test.
^c Allele p-values were calculated with the χ^2 -test. If the nominal p-value showed significance ($p < 0.05$), the corrected p-value for multiple testing (10,000 permutations) is presented.

Distribution of the macrophage migration inhibitory factor (MIF) haplotypes in controls (CTL, n = 1454) and patients with adolescent-onset schizophrenia (AOS, n = 486), further subdivided by sex.

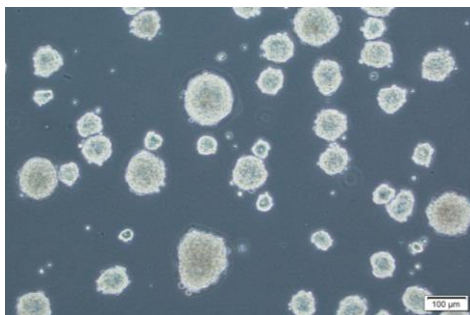
Polymorphism	Sex	CTL		AOS		P-value ^a	Odds ratio (95%CI)	Power
		n	Frequency	n	Frequency			
MIF-794C/T1+776G/C haplotype	All	1024	0.352	361	0.372	0.200	1.689 (0.936-1.206)	0.204
	Male	516	0.359	182	0.350	0.462	0.910 (0.776-1.12)	0.065
	Female	508	0.345	179	0.397	0.8397 (0.192)	1.250 (1.006-1.552)	0.024
CAT1-C	All	116	0.040	39	0.040	0.947	0.997 (0.68-1.445)	0.050
	Male	53	0.038	18	0.035	0.806	0.929 (0.548-1.597)	0.057
	Female	63	0.042	21	0.046	0.811	1.082 (0.654-1.799)	0.075
CAT2-G	All	1287	0.436	368	0.394	0.8222 (0.6991)	0.848 (0.728-0.979)	0.451
	Male	609	0.430	217	0.417	0.828	0.940 (0.774-1.143)	0.080
	Female	678	0.442	149	0.367	0.00489 (0.0147)	0.733 (0.599-0.911)	0.011
CAT3-C	All	40	0.014	22	0.023	0.051	1.697 (1.004-2.869)	0.488
	Male	22	0.015	16	0.031	0.8205 (0.0846)	2.079 (1.083-3.991)	0.004
	Female	18	0.012	6	0.013	0.791	1.125 (0.443-2.800)	0.078
CAT3-G	All	4	0.001	2	0.002	0.647	1.462 (0.280-7.626)	0.166
	Male	2	0.001	1	0.002	0.805	1.299 (0.125-14.085)	0.129
	Female	2	0.001	1	0.002	0.486	1.499 (0.141-15.979)	0.135
CAT3-C	All	452	0.155	164	0.169	0.326	1.103 (0.907-1.341)	0.183
	Male	218	0.154	86	0.165	0.532	1.091 (0.831-1.433)	0.094
	Female	234	0.157	78	0.173	0.611	1.121 (0.846-1.484)	0.133
CAT3-G	All	1	0.001	0	0.000	3.000	-	0.046
	Male	0	0.000	0	0.000	-	-	-
	Female	1	0.001	0	0.000	3.000	-	0.010
CAT3-C	All	4	0.001	1	0.001	0.795	0.748 (0.083-6.697)	0.050
	Male	4	0.003	0	0.000	0.225	-	0.120
	Female	0	0.000	1	0.002	0.527	-	0.470

Boldface type indicates significant differences between the adolescent-onset schizophrenia and control groups.
^a Haplotype p-values were calculated using the χ^2 -test. If the nominal p-value showed significance ($p < 0.05$), the corrected p-value for multiple testing (10,000 permutations) is presented.

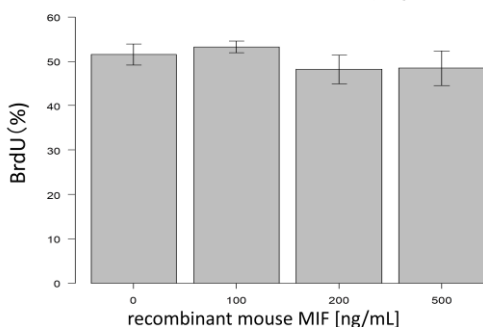
(2) マウス初代培養細胞を用いた解析

マウス海馬由来 NSC を用いて、MIF による増殖・生存といった細胞表現型に及ぼす変化を解析した。リコンビナントマウス MIF を投与し、48 時間後の変化を測定した。増殖については FACS を用いた BrdU アッセイ、生存 (抗アポトーシス) については FACS を用いた TUNEL 法で評価したが、現在のところ有意な結果は認めていない (下図)。

新生仔マウス海馬由来 NSC



NSCにリコンビナントMIF処置

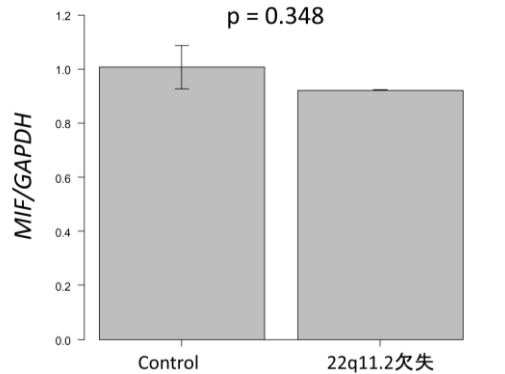
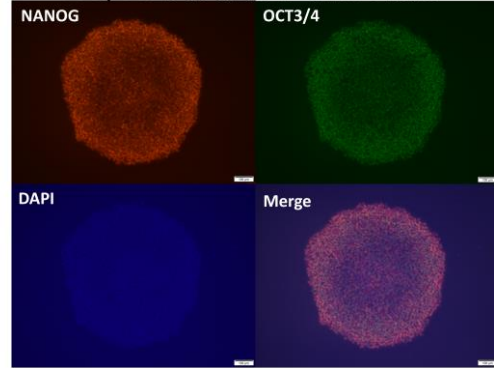


The data expressed as the mean \pm S.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$ vs. basal (Dunnett's test; $n = 3$)

(3) ヒト iPS 細胞を用いた解析

患者および健常者由来 iPS 細胞の樹立と集積も継続している。統合失調症との関連が示唆されている 22q11.2 欠失症候群患者および健常者由来の iPS 細胞から RNA を抽出し、MIF mRNA 発現を測定したが、有意な差は認めなかった (下図)。

22q11.2欠失患者由来iPS細胞



統合失調症患者で血清 MIF 濃度が高く、また抗精神病薬と正の相関を示した。関連解析の結果からも、サブグループの影響も考慮する必要があるが、MIF が統合失調症の病態に関与する可能性が示唆された。但し、死後脳では有意差はなく、末梢と中枢での動態の違いを検討する必要があると考えられた。

今後はさらにヒト iPS 細胞を用いた解析も進め、胎生期から思春期に渡る神経免疫系の擾乱が推定されている統合失調症の病態機序において、MIF が果たしている役割を解明したいと考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. **Okazaki S**, Hishimoto A, Otsuka I, Watanabe Y, Numata S, Boku S, Shimmyo N, Kinoshita M, Inoue E, Ohmori T, Someya T, Sora I. Increased serum levels and promoter polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.

- 2018 Apr 20;83:33-41. 査読有
doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.01.001.
2. Kimura A, Hishimoto A, Otsuka I, **Okazaki S**, Boku S, Horai T, Izumi T, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I. Loss of chromosome Y in blood, but not in brain, of suicide completers. PLoS One. 2018 Jan 4;13(1):e0190667. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0190667.
 3. Otsuka I, Izumi T, Boku S, Kimura A, Zhang Y, Mouri K, **Okazaki S**, Shiroyiwa K, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I, Hishimoto A. Aberrant telomere length and mitochondrial DNA copy number in suicide completers. Sci Rep. 2017 Jun 9;7(1):3176. 査読有
doi: 10.1038/s41598-017-03599-8.
 4. Shimmyo N, Hishimoto A, Otsuka I, **Okazaki S**, Boku S, Mouri K, Horai T, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I. Association study of MIF promoter polymorphisms with suicide completers in the Japanese population. Neuropsychiatr Dis Treat. 2017 Mar 22;13:899-908. 査読有
doi: 10.2147/NDT.S130855.
 5. **Okazaki S**, Boku S, Otsuka I, Mouri K, Aoyama S, Shiroyiwa K, Sora I, Fujita A, Shirai Y, Shirakawa O, Kokai M, Hishimoto A. The cell cycle-related genes as biomarkers for schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2016 Oct 3;70:85-91. 査読有
doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.05.005.
 6. Watanabe Y, Nunokawa A, Shibuya M, Ikeda M, Hishimoto A, Kondo K, Egawa J, Kaneko N, Muratake T, Saito T, **Okazaki S**, Shimasaki A, Igeta H, Inoue E, Hoya S, Sugai T, Sora I, Iwata N, Someya T. Rare truncating variations and risk of schizophrenia: Whole-exome sequencing in three families with affected siblings and a three-stage follow-up study in a Japanese population. Psychiatry Res. 2016 Jan 30;235:13-8. 査読有
doi: 10.1016/j.psychres.2015.12.011.
 7. Ratta-Apha W, Mouri K, Boku S, Ishiguro H, **Okazaki S**, Otsuka I, Sora I, Arinami T, Shirakawa O, Hishimoto A. A decrease in protein level and a missense polymorphism of KIF17 are associated with schizophrenia. Psychiatry Res. 2015 Dec 15;230(2):424-9. 査読有
doi: 10.1016/j.psychres.2015.09.031.
 8. Ratta-apha W, Boku S, Mouri K, **Okazaki S**, Otsuka I, Watanabe Y, Nunokawa A, Someya T, Shirakawa O, Sora I, Hishimoto A. Association analysis of the HLA-DRB1*01 and HLA-DRB1*04 with schizophrenia by tag SNP genotyping in the Japanese population. Psychiatry Res. 2015 Sep 30;229(1-2):627-8. 査読有
doi: 10.1016/j.psychres.2015.07.016.
 9. Otsuka I, Watanabe Y, Hishimoto A, Boku S, Mouri K, Shiroyiwa K, **Okazaki S**, Nunokawa A, Shirakawa O, Someya T, Sora I. Association analysis of the Cadherin13 gene with schizophrenia in the Japanese population. Neuropsychiatr Dis Treat. 2015 Jun 2;11:1381-93. 査読有
doi: 10.2147/NDT.S84736.
- [学会発表] (計 8 件)
1. Maruyama S, Boku S, **Okazaki S**, Kikuyama H, Kanazawa T, Yoneda H. Mechanism of modified electroconvulsive therapy - electrical stimulation to neurogenesis. World Psychiatric Association's Thematic Congress. 2018.2.25-28. Melbourne (Australia).
 2. 新名 尚史, 菱本 明豊, 大塚 郁夫, **岡崎 賢志**, 朴 秀賢, 毛利 健太郎, 蓬萊政, 江口 典臣, 木村 敦, 山木 愛久, 平田 尚士, 高橋 玄倫, 上野 易弘, 白川 治, 曾良 一郎. 日本人自殺既遂者におけるMIF遺伝子プロモーター領域機能的多型の関連解析. 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会. 2017年9月28日. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).
 3. 大塚 郁夫, 菱本 明豊, 泉 剛, 朴 秀賢, 木村 敦, 張 園, 毛利 健太郎, **岡崎 賢志**, 高橋 玄倫, 上野 易弘, 白川 治, 曾良 一郎. 自殺既遂者におけるテロメア異常短縮. 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会. 2017年9月29日. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).
 4. 大塚 郁夫, 菱本 明豊, 朴 秀賢, **岡崎 賢志**, 毛利 健太郎, 曾良 一郎. ニコチン依存におけるCDH13の役割 マウス神経前駆細胞と統合失調症臨床サンプルを用いた解析. 第46回日本神経精神薬理学会年会. 2016年7月2日. ソウル(韓国).
 5. **岡崎 賢志**, 菱本 明豊, 朴 秀賢, 毛利 健太郎, 竹村 幸洋, 麻生 克郎, 山本 訓也, 曾良 一郎. 危険ドラッグの臨床症状への影響および遺伝子多型との関連の検討. 第27回日本依存神経精神科学会. 2015年10月13日. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市).

6. 菱本 明豊, 大塚 郁夫, 岡崎 賢志, 朴秀賢. アルコール・薬物依存症の神経生物学・遺伝学的研究の動向 若手精神科医を中心に 細胞接着因子と精神疾患. 第 27 回日本依存神経精神科学会. 2015 年 10 月 13 日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).
7. 岡崎 賢志, 菱本 明豊, 朴 秀賢, 毛利 健太郎, 白岩 恭一, 大塚 郁夫, 白井 豊, 藤田 愛子, 白川 治, 湖海 正尋, 曾良 一郎. 統合失調症における細胞周期関連遺伝子に着目した 3 段階 mRNA 発現解析. 第 37 回日本生物学的精神医学会・第 45 回日本神経精神薬理学会合同年会. 2015 年 9 月 26 日. タワーホール船堀 (東京都江戸川区).
8. 大塚 郁夫, 渡部 雄一郎, 菱本 明豊, 朴 秀賢, 毛利 健太郎, 白岩 恭一, 岡崎 賢志, 布川 綾子, 白川 治, 染矢俊幸, 曾良 一郎. 統合失調症における Cadherin13 遺伝子多型解析. 第 37 回日本生物学的精神医学会・第 45 回日本神経精神薬理学会合同年会. 2015 年 9 月 25 日. タワーホール船堀 (東京都江戸川区).

[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]

ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/psyneu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 賢志 (OKAZAKI, Satoshi)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70722867

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし