

令和元年5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05372

研究課題名(和文)統合失調症の認知機能障害とパルプアルブミン陽性細胞のオキシトシンシグナル

研究課題名(英文) Cognitive Deficits and Oxytocin Signaling in Cortical Parvalbumin Neurons in Schizophrenia

研究代表者

橋本 隆紀 (HASHIMOTO, TAKANORI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：40249959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症では抑制性のパルプアルブミン陽性ニューロン(PVニューロン)の変化が前頭前野に存在する。本研究では、げっ歯類でPVニューロン機能を促進するオキシトシン(OXT)の病態への関与を解明するため、ヒト死後脳でOXT受容体(OXTR)の発現を調べた。OXTRの発現は、大脳皮質で低く主に非抑制性ニューロンに認められ、黒質ではドーパミン作動性ニューロンに認められた。黒質ではOXTRの発現に有意な変化はなく、統合失調症の病態におけるOXTの関与は支持されなかった。一方、PVニューロンの機能を担う分子の発現変化は、神経ネットワークを構成する複数の皮質領域に共通して存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、統合失調症の認知機能障害に関与していると考えられる大脳皮質のパルプアルブミン陽性ニューロン(PVニューロン)の変化に対してオキシトシンが関与している可能性は指示されなかった。一方、PVニューロンの変化は、認知機能を担う神経ネットワークを構成する大脳皮質領域に広く存在し、このニューロンの機能変化の是正が、難治性の認知機能障害に対する有効な治療法になる可能性が考えられた。げっ歯類と異なりヒト大脳皮質ではPVニューロンにはオキシトシン受容体の発現は検出できなかったが、今後もこのニューロンに選択的に発現しその機能を調節する分子を同定することが有効な治療法の確立に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the prefrontal cortex (PFC) of schizophrenia subjects, local inhibitory neurons that express parvalbumin (PV) appear to be altered. In the rodent cortex, PV neurons were shown to be modulated by neuropeptide oxytocin (OXT) through the OXT receptor (OXTR). In this study, we first aimed to detect OXTR expression in PV neurons in control human subjects. However, OXTR expression was detected mainly in non-inhibitory neurons in the PFC and anterior cingulate cortex. Although OXTR expression was detected in dopamine neurons in the substantia nigra, the mRNA levels were not different between control and schizophrenia subjects. These findings indicate that OXT signaling might not be involved in altered function of PV or dopamine neurons in subjects with schizophrenia. However, the expression levels of other genes in PV neurons, such as GAD1 and KCNS3, were similarly affected in PV neurons across multiple cortical regions in schizophrenia.

研究分野：精神医学

キーワード：死後脳 遺伝子発現 大脳皮質

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

1. 研究開始当初の背景

統合失調症では作業記憶や社会認知などの広汎な認知機能に低下が認められ、死後脳解析や脳機能研究からは、大脳皮質における抑制性ニューロン的一种であるパルブアルブミン陽性ニューロン(PVニューロン)の異常が、その機能分子の発現変化として背外側前頭前野において多く報告されている。PVニューロンは、異なる大脳皮質領域により形成される神経ネットワークにおいて、各領域に発生し領域間の情報伝達を促進する律動的神経活動オシレーションの形成を担っている。すなわち、PVニューロンの変化は、統合失調症患者で多く報告されているオシレーションの形成異常を介して、認知機能障害に関与していると考えられる。本研究の開始当初は、げっ歯類の大脳皮質PVニューロンにおいて神経ペプチドのオキシトシン(OXT)受容体の発現が報告され(Marlin et al. *Nature* 2015)、さらに、OXTがPVニューロンに直接作用しオシレーションの形成を促進する可能性が指摘されていた(Owen et al. *Nature* 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、統合失調症ではPVニューロンにおけるOXTシグナルが低下し、オシレーション形成の低下を経て、認知機能障害に結び付いているという仮説の検証を試みた。しかし、健常例の大脳皮質においてOXT受容体(OXTR)の発現は、従来の放射活性によりラベルされRNAプローブを用いたin situ hybridization (ISH)法では検出できなかった。そこで、より感度の高いRNAscope技術を用いて、大脳皮質抑制ニューロンにおけるOXTR mRNAの発現を検証した。

ヒト健常例の脳組織における遺伝子発現の包括的なデータベースAllen Brain Atlasでも、OXTR mRNAのISHデータを存在せず、マイクロアレイデータでも大脳皮質における発現は極めて低かった。一方、統合失調症の陽性症状の発現に関係するドーパミンニューロンが存在する黒質では、マイクロアレイにてOXTR mRNAの強い発現が検出されていた。そこで、我々は、統合失調症の陽性症状へのOXTシグナルの関与を調べるため、1)健常例の黒質においてOXTRを発現するのニューロン種の同定、2)統合失調症におけるOXTRの発現変化を調べた。

一方、PVニューロンについては、ヒトの大脳皮質においてはOXTシグナルがPVニューロンの機能調節に関与することを示唆する所見は得られなかった。そこで統合失調症の背外側前頭前野で報告されているPVニューロンにおける機能分子の発現変化が、機能的なネットワークを構成する大脳皮質の異なる領域に存在するのかどうかを調べた。

3. 研究の方法

(1) 健常対照例の大脳皮質におけるOXTR mRNAの発現 4名の健常対照例(男2名 女2名、24-43才、RNA integrity number 8.0-9.1)の死後脳より、前頭前野(9野) 後部頭頂野(7野) 前帯状回(24野) 一次視覚野(17野)の凍結切片を作製した。

OXTR mRNAに対するantisense RNAおよびsense RNAを放射性同位元素³⁵Sにより標識されたCTPの存在化で合成し、プローブとして、凍結切片上でin situ hybridization (ISH)を行った。ISHを行った切片は、放射能感受性フィルムに露光しRNAプローブの存在を大脳皮質の組織レベルで検出し、さらに乳剤を切片に塗布しRNAプローブの存在の検出を細胞レベルで試みた。

上記4領域におけるOXTR mRNAの検出は、PVニューロンを含む抑制性ニューロンにて、放射活性を有するRNAプローブより感度が高く理論上1コピーのRNA分子の発現を検出できるとされるRNAscope技術により試みた。抑制性ニューロンの可視化は伝達物質GABAの合成を行うGAD67に対するC2プローブ(赤を発色)で行い、mOXTR mRNAの検出はC1プローブ(緑色を発色)により、同時に行った。

(2) 統合失調症の黒質ドーパミンニューロンにおけるOXTRの発現

解析に用いた黒質を含む中脳の凍結切片は、統合失調症患者と健常者から成るペア15組(表1)から、遺族から文書による承諾を得て得た脳組織を用いた。それぞれのペアの患者と健常者は性別が同じで、年齢、死後経過時間、脳内のRNAの状態を反映する指標(RIN)がほぼ等しくなるように選ばれている。

黒質の切片でも、大脳皮質組織と同様にOXTR mRNAに対するantisense RNAを放射性同位元素³⁵Sにより標識しISHを行った。また、ドーパミン作動性ニューロンを同定するため、ドーパミン合成を行うチロシン水酸化酵素(tyrosine hydroxylase, TH)

診断	健常	統合失調症
数	14	14
性	男12,女2	男12,女2
年齢	51.3(14.3)	50.5(13.4)
死後経過時間	17.4(5.4)	18.3(8.3)
脳内pH	6.6(0.2)	6.5(0.2)
RIN*	8.1(0.5)	7.9(0.5)

表1: 黒質OXTR発現解析のための死後脳組織平均(標準偏差), *RIN: RNA integrity number

mRNA に対する antisense RNA を 35S により標識しつつ合成した。切片は、放射能感受性フィルムに露光し RNA プローブの存在を組織レベルで検出し、さらに乳剤を切片に塗布し OXTR mRNA および TH mRNA を発現するニューロンの同定を行った。

ドーパミン作動性ニューロンが存在する黒質ち密層の輪郭を TH mRNA のシグナル分布に基づいて定義して、その輪郭内で TH mRNA および OXTR mRNA の発現を定量した。

統合失調症と健常の群間での TH mRNA および OXTR mRNA の発現レベルの比較は、死後脳の性別、年齢、死後経過時間、脳内 pH、RIN を共変数とする共分散分析により行った。

(3) 作業記憶ネットワークを構成する4つの大脳皮質領域におけるパルプアルプミンニューロンの変化

解析には、性別が同じで、年齢、死後経過時間、脳内の RNA の状態を反映する指標 (RIN) がほぼ等しくなるように選ばれた統合失調症患者と健常者から成るペア 20 組 (表 1) から得られた脳組織を用いた。

各症例の大脳右半球から、背外側前頭前野 (DLPFC)、後部頭頂野 (PPC)、2 次視覚野 (V2)、1 次視覚野 (V1) の灰白質を切り出し (図 1)、Trizol 液に攪拌し、RNA を抽出した。

RNA サンプルを cDNA に変換し、統合失調症の背外側前頭前野の PV ニューロンにおいて発現低下が報告されている PV mRNA, GAD67 mRNA, KCNS3 mRNA にたいする特異プライマーを用いて、real-time PCR を行いこれらの mRNA の発現定量を行った。各 mRNA の発現は、内部標準遺伝子として beta-actin および cyclophilin-A の発現の平均に対する比として定量した。

各領域におけるそれぞれの mRNA の発現の統合失調症例と健常例の間の比較は、統合失調症の有無を症例間の主効果、領域を症例内の主効果、性別、年齢、死後経過時間、脳内 pH、RIN を共変数とする混合モデル共分散分析により行った。

診断	健常	統合失調症
数	20	20
性	男 14, 女 6	男 14, 女 6
年齢	45.4(11.6)	44.3(10.4)
死後経過時間	15.4(5.8)	14.3(6.4)
脳内 pH	6.7(0.3)	6.5(0.3)
RIN*	8.3(0.5)	8.3(0.6)

表 2: 4 領域の解析のための死後脳組織平均 (標準偏差), *RIN: RNA integrity number

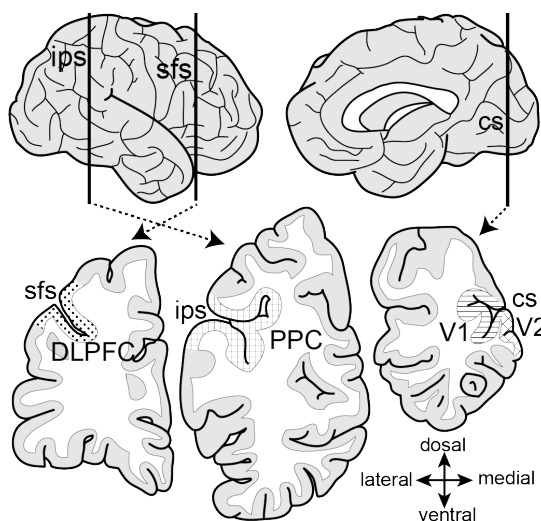


図 1: 4 領域の灰白質組織の切り出し

ips: intraparietal sulcus, sfs: superior frontal sulcus, cs: calcarine sulcus

4. 研究成果

(1) 健常対照例の大脳皮質および黒質における OXTR mRNA の発現

通常の 35S で標識された RNA probe を用いた ISH 法では、前頭前野 (DLPFC)、前帯状回 (ACC)、後部頭頂野、一次視覚野のいずれにおいても、OXTR mRNA に対する antisense RNA プローブにより、コントロールの sense RNA プローブと比べて強いシグナルは検出できなかった。

一方、高感度の RNAscop 技術では、DLPFC と ACC において OXTR mRNA に対する C1 プローブによる緑色のシグナルがニューロンの核周囲に認められた。そこで、PV ニューロンを含む抑制性ニューロンにおける OXTR の発現を確認するため、抑制性伝達物質 GABA の合成を行う GAD67 mRNA に対する C2 プローブ (赤) と OXTR mRNA に対する C1 プローブを同時にハイブリダイズさせたところ、DLPFC や ACC においては、GAD67 mRNA を発現する抑制性ニューロン (赤シグナル) の多くには、OXTR mRNA (緑のシグナル) の発現が認められず、OXTR mRNA の発現は他のニューロンの核周囲に検出された (図 2)。

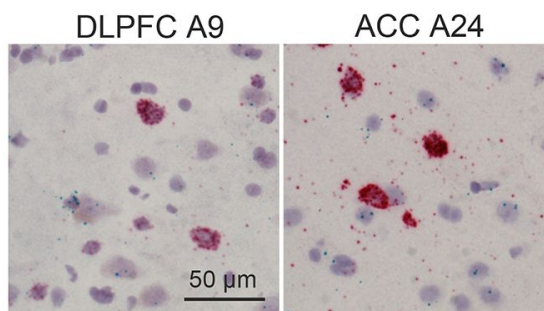


図 2: 健常例の大脳皮質の 2 領域における OXTR mRNA (緑) と GAD67 mRNA (赤) の発現
OXTR mRNA の発現は、主に GAD67 mRNA のシグナルを有さないニューロンに認められる。

(2) 統合失調症の黒質ドーパミンニューロンにおける TH mRNA と OXTR mRNA の発現

放射能感受性フィルムで検出された中脳切片における OXTR mRNA の発現は、TH mRNA

の発現が強く集積している黒質ち密層に一致して認められ(図3) OXTR mRNA がドーパミンニューロンに発現していることが考えられた。

さらに、乳剤を塗布して mRNA の発現を細胞レベルで検出したところ、TH mRNA および OXTR mRNA の発現を示す銀粒子の密度はメラニン色素陽性のドーパミン合成ニューロンで周囲より高く(図4) OXTR が TH 陽性のドーパミンニューロンに発現していることが確認された。

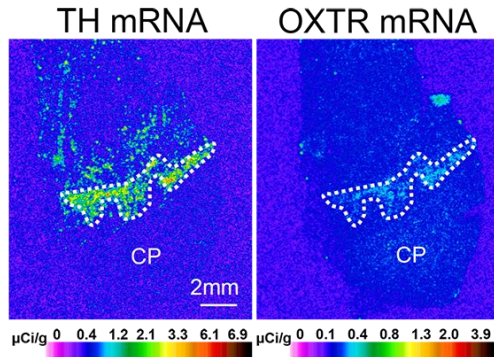


図3: 健常例の中脳における TH mRNA (左) と OXTR mRNA (右) の発現シグナル。放射能シグナルの強さは疑似カラー表示されている。点線で囲われた領域は TH mRNA を発現するドーパミンニューロンが集積する黒質ち密層で、この輪郭内で TH mRNA と OXTR mRNA のシグナル密度を計測した。

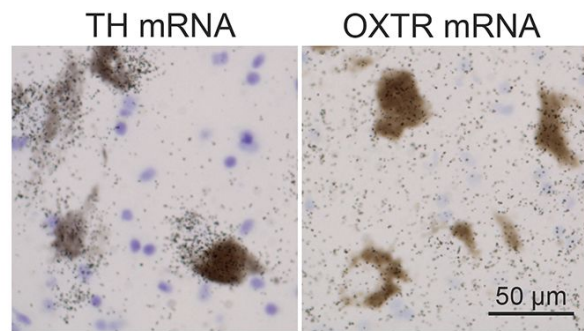


図4: 健常例の黒質ち密層における TH mRNA (左) と OXTR mRNA (右) の細胞レベルの発現。放射活性を有するプローブが乳剤に形成する銀粒子が、茶色いメラニン色素が細胞体全体に存在するドーパミンニューロンに認められる。

そこで、ドーパミンニューロンが集積する黒質ち密層における TH mRNA と OXTR mRNA の発現を、性別が同じで年齢、死後経過時間、脳組織 pH、RIN が近い統合失調症例と健常対照例のペア 14 組(表1)を用いて定量した。その結果、統合失調症の黒質ち密層では、健常対照例の同領域に比べ TH mRNA の発現の平均値が 8%低下し、OXTR mRNA の発現の平均値が 10%上昇していた(図5)。しかし、これらの変化には統計学的な有意性は認められなかった(TH: $F_{1,21}=0.06$, $P=0.81$, OXTR: $F_{1,21}=0.05$, $P=0.82$)。

(3) 統合失調症で認められる大脳皮質パルプアルブミンニューロンの変化の作業記憶ネットワークを構成する4皮質領域における分布

統合失調症の背外側前頭前野 DLPFC では PV ニューロンにおいて PV mRNA の他に伝達物質 GABA を合成する酵素 GAD67、PV ニューロンの興奮性を制御している KCNS3 カリウムチャンネルサブユニットの発現低下が mRNA レベルで報告されている。作業記憶ネットワークを構成する複数の皮質領域(DLPFC, PPC, V2, V1)(図1)において、PV mRNA、GAD67 mRNA、KCNS3 mRNA の発現を real-time PCR で定量し、統合失調症における変化を評価した(図6)。

PV mRNA は、4領域を通して 17%から 31%の低下を示し、統計学的には診断の有無に有意性を認めた($F_{1,114}=8.4$, $P=0.02$)。GAD67 mRNA も、4領域を通して 8%から 19%の低下を示し、診断の有無に有意な効果を検出した($F_{1,114}=9.3$, $P=0.02$)。KCNS3 mRNA についても、10%から 22%の低下を認め、診断の有無に有意な効果をも認めた($F_{1,114}=21.6$, $P<0.001$)。

一方で、これらの mRNA の発現に対しては、診断の有無と領域の相互作用に有意性は認めず($F_{3,114}<4.0$, $P>0.07$)、発現レベルは4領域でほぼ一様に低下している可能性がうかがわれた。

それぞれの領域において、各 mRNA の発現量に対する統合失調症に関連する因子(物質濫用・依存、抗精神病薬・抗うつ薬・ベンゾジアゼピン系薬・抗てんかん薬の使用、死因としての自殺)の有意な効果($t_{16}<2.4$, $P>0.24$)は認めなかった。

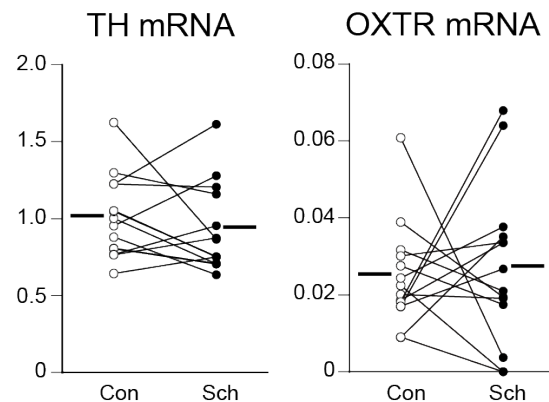
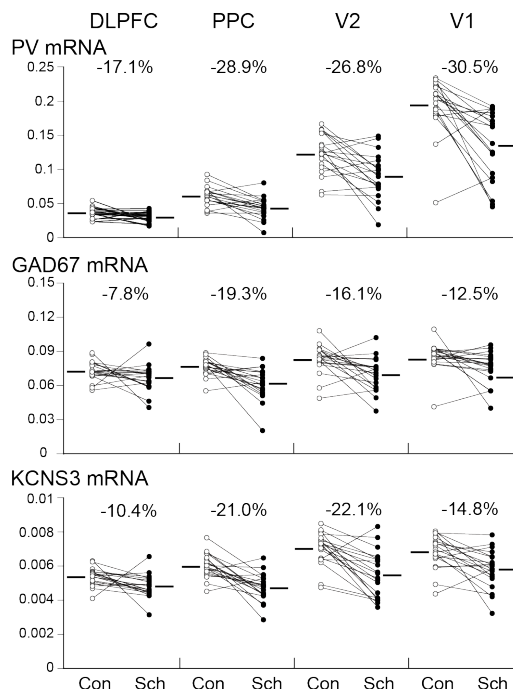


図5: 黒質ち密層における TH mRNA (左) と OXTR mRNA (右) の発現レベルの健常例(Con)と統合失調症例(Sch)の比較。各ペアに属する健常例(○)と統合失調症例(●)は線で結ばれている。横棒は各群における平均値を示す。

(4) まとめと今後の方向性

PV ニューロンは、オシレーションの形成を担うことで機能的ネットワークを構成する離れた領域間の情報伝達を促進する。本研究から PV ニューロンの変化が作業記憶ネットワークを構成する複数の領域に同様に存在することが判明した。今後は OXT シグナル以外に、PV ニューロンに発現し、その機能を制御するシグナル伝達系の検索を続け、その変化を統合失調症の死後脳で調べた上で、モデル動物や臨床研究を通して、PV ニューロンの機能変化の是正を介した認知機能障害の治療法の開発に役立てたい。

図 6(右)：背外側前頭前野(DLPFC)、後部頭頂野(PPC)、二次視覚野(V2)、一次視覚野(V1)における PV mRNA、GAD67 mRNA、KCNS3 mRNA の健常例(Con)と統合失調症例(Sch)の比較。各ペアに属する健常例(○)と統合失調症例(●)は線で結ばれている。横棒は各群における平均値を示す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Expression of Transcripts Selective for GABA Neuron Subpopulations across the Cortical Visuospatial Working Memory Network in the Healthy State and Schizophrenia. Tsubomoto M, Kawabata R, Zhu X, Minabe Y, Chen K, Lewis DA, Hashimoto T. *Cerebral Cortex* Sept 24 (2018) Epub ahead of print. 査読あり
2. Oxytocin and excitation/inhibition balance in social recognition. Lopatina OL, Komleva YK, Gorina YV, Olovyannikova RY, Trufanova LV, Hashimoto T, Takahashi T, Kikuchi M, Minabe Y, Higashida H, Salmina AB. *Neuropeptides* 72:1-11 (2018) 査読あり
3. 橋本隆紀 金田礼三 坪本真 大脳皮質パルプアルブミンニューロンと統合失調症の認知機能障害 *日本生物学的精神医学会誌* 28: 32-40 (2017) 査読なし

〔学会発表〕(計 3 件)

1. “Cortical GAD67 deficits and the pathophysiology of schizophrenia” *Symposium* “Current topics in GABA synthetic enzyme and psychiatric disorder” 橋本隆紀 第 40 回生物学的精神医学会、第 61 回日本神経化学会 合同年会 2018.9.6 (神戸・神戸国際会議場)
2. Tsubomoto M, Kawabata R, Minabe Y, Hashimoto T, Lewis DA. Expression of GABA neuron markers across the cortical visuospatial working memory network in schizophrenia. 72nd Annual Meeting, Society of Biological Psychiatry 166 an Diego May 18th 2017
3. 「統合失調症の認知機能障害と大脳皮質パルプアルブミン陽性ニューロン」橋本隆紀 第 38 回生物学的精神医学会第 59 回日本神経化学会 合同年会 合同シンポジウム「神経可塑性と精神疾患」2016.9.8 (福岡・福岡国際会議場)

〔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) 研究代表者

研究代表者氏名：橋本 隆紀
ローマ字氏名：HASHIMOTO, Takanori
所属研究機関名：金沢大学
部局名：医学系
職名：准教授
研究者番号：40249959

(2) 研究分担者

研究分担氏名：菊知 充
ローマ字氏名：KIKUCHI, Mitsuru
所属研究機関名：金沢大学
部局名：子どもこころの発達研究センター
職名：教授
研究者番号：00377384

研究分担氏名：東田 博陽
ローマ字氏名：Higashida, Haruhiro
所属研究機関名：金沢大学
部局名：子どもこころの発達研究センター
職名：特任教授
研究者番号：30093066

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

研究協力者氏名：ルイス, デーヴィッド
ローマ字氏名：LEWIS, David

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。