

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18392

研究課題名(和文) ミクログリア細胞における統合失調症発症関連分子DISC1の役割

研究課題名(英文) Role of Disrupted-In-Schizophrenia-1 on microglia

研究代表者

坪井 大輔 (TSUBOI, DAISUKE)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：80584672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミクログリア細胞ライセートから50種類以上のDISC1相互作用分子を同定し、その中でTRAF6に着目してDISC1との結合を実証した。そして、DISC1ノックアウトマウス由来のミクログリア細胞ではTRAF6が脱局在していることを見出した。更に研究代表者は、グリア細胞特異的なDISC1生理機能を評価するため、Disc1コンディショナルノックアウトマウスを作製した。Genome PCRやmRNA発現実験から、Cre依存的にDisc1遺伝子欠損を確認した。更に、ミクログリア細胞特異的発現Creマウスと交配することで、細胞種特異的DISC1欠損マウスを樹立しつつある。

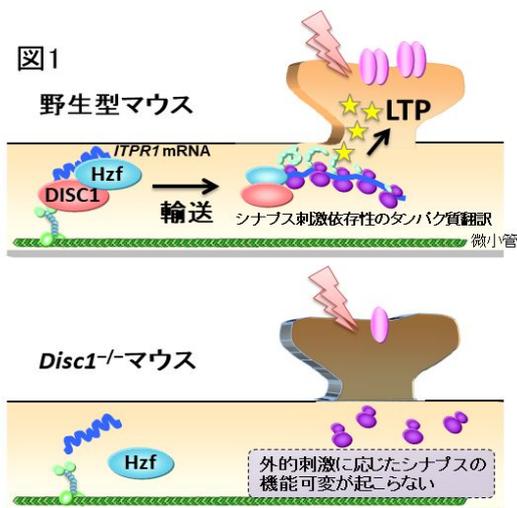
研究成果の概要(英文)：In this study, I identified more than 50 of DISC1-interactors by mass spectrometry, I focused on the physiological interaction of DISC1 with TRAF6. I found that DISC1 bound to TRAF6 in vitro and in vivo and that TRAF6 was delocalized in the microglia cells derived from Disc1-deficient mice. These results suggested that DISC1 was involved in intracellular signal transduction related to stress response and innate immunity through localization control of TRAF complex. In addition, to evaluate the glial cell specific DISC1 physiological function, I generated a Disc1-conditional knockout mouse. Based on Genome PCR and mRNA expression experiments, Disc1 gene deficiency was confirmed Cre-dependent. Furthermore, by mating with Cre mice expressing microglial cells specifically, cell type specific Disc1-deficient mice are being established.

研究分野：神経科学

キーワード：DISC1 統合失調症 ミクログリア サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は世界人口のおよそ1%もの罹患率を有する重篤な精神疾患であるが、病因や病態メカニズムは殆ど明らかになっていない。これまでの統合失調症多発家系を用いた連鎖及び関連解析から、幾つかの遺伝子が統合失調症発症脆弱性因子として同定されている(Harrison and Weinberger, Mol. Psychiatry, review, 2005)。  
 Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1)有望な統合失調症発症脆弱性因子である。幾つかの研究グループにより、DISC1は、神経突起の伸長やシナプス機能に関与していることが報告されていたが(Ozeki et al., Proc Natl Acad USA, 2003; Wang et al., Mol Psychiatry, 2010)、その分子機序は不明であった。これまでに研究代表者は、成体ラット脳可溶化物を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー解析により、DISC1 相互作用分子としてHZF(RNA 結合タンパク質)を同定した。DISC1はHZF と協調してITPR1(シナプス制御タンパク質)をコードするmRNA に結合し、そのmRNAのシナプス輸送を制御していることを明らかにした。そして、DISC1 とmRNA の結合障害がシナプス可塑性に異常を引き起こすことを見出した。これらの結果から研究代表者は、DISC1 がmRNA のシナプス輸送を制御することでシナプス可塑性に関与していることを明らかにした(図1)。



研究代表者はDISC1 が神経細胞とともにミクログリア細胞で高発現していることを見出した。脳神経回路の構築が盛んに起こる脳発達初期でミクログリア細胞は、神経保護や不要な神経シナプスの除去を介して神経ネットワーク機能制御に関わっていること知られている。また成体脳において当該細胞は、病原体や細胞(環境)ストレスに応答して速やかに活性化することで、神経保護因子の分泌、または神経壊死因子による脱髄および神経細胞死を引き起こすことが知られている。しかしながら、上述したミクログリア細胞におけるDISC1の生理作用、またその分子基盤が如何なるものかについては分かっていない。

2. 研究の目的

研究代表者は、ミクログリア細胞でのDISC1の生理機能やその分子基盤解明にあたり、以下の課題について研究した。

(1)ミクログリア細胞におけるDISC1の生理機能の解明

免疫組織学的解析から研究代表者は、野生型マウスに比べてDISC1ノックアウト(Disc1<sup>-/-</sup>)マウス由来海馬でミクログリア細胞(CD11b陽性細胞)の数が増加していることを見出している。この結果は、DISC1がミクログリア細胞の増殖または、活性/不活化に関与している可能性を生じさせる。本研究課題で研究代表者は、CD11b(活性型ミクログリアマーカー)や細胞内局在マーカー分子を用いた免疫染色法を用いて、Disc1<sup>-/-</sup>ミクログリア細胞の形態解析を行い、当該細胞の活性化状態や神経グリア相互作用について検討した。また、活性化したミクログリア細胞は炎症性サイトカイン(IL1bやTNFalpha等)や神経栄養因子(BDNF)を分泌することが知られている。研究代表者は幾つかのミクログリア活性化モデルを用いて野生型およびDisc1<sup>-/-</sup>ミクログリア細胞からのサイトカイン分泌をELISA測定することで、免疫応答におけるDISC1の関与を明らかにした。

(2)ミクログリア細胞におけるDISC1シグナル伝達機構の解明

研究代表者はミクログリア細胞において

DISC1 が関わる細胞内シグナルを探索するため、高感度質量分析装置(Orbitrap FUSION)によりDISC1 相互作用分子を網羅的に同定する。そして、研究代表者は質量分析から得られた同定タンパク質群を用いてin silico シグナル解析を行い、免疫応答や小胞輸送に関連したDISC1 相互作用分子に着目して解析を行った。研究代表者はDISC1 と得られた相互作用分子について結合実験を行い、結合領域を決定する。そして、特定のタンパク質結合能を欠いた変異体(ドミナントネガティブ)を作製し、ミクログリア細胞へ遺伝子導入する。これらの解析から研究代表者は、ミクログリア細胞においてDISC1 を含むタンパク質複合体がどのような細胞内シグナルを制御しているかについて検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1)ミクログリア細胞におけるDISC1 の生理機能の解明

これまでの形態学的解析から、高度に分枝した突起を持つミクログリア(分枝型ミクログリア)は不活性化状態にあるとされ、活性化に伴いアメーバ状に形態変化することが示されている。そこで研究代表者は野生型およびDisc1<sup>-/-</sup>マウスの脳発達過程におけるミクログリアの細胞数や形態、細胞内分布を免疫染色実験で評価した。研究代表者は成体脳でミクログリア細胞の炎症応答作用におけるDISC1 の関与を検討するため、Poly I:C (polyinosinic-polycytidylic acid; 合成二本鎖RNAアナログ)を用いた疑似RNAウイルス感染モデルにおけるミクログリアの活性化モデルでDisc1<sup>-/-</sup>ミクログリア細胞の形態変化や損傷部位への走化性について野生型細胞との比較検討を行った。ミクログリア活性化は末梢マクロファージと同様に、細胞障害性(M1)と組織保護性(M2)の両面性があると考えられている。M1 型ミクログリアは、TNF などの炎症性サイトカインや活性酸素などの細胞傷害因子の放出する一方で、M2 型ミクログリアは神経栄養因子放出を介して神経保護に働く。研究代表者は野生型およびDisc1<sup>-/-</sup>マウス脳、または分散培養したミクログリア細胞を用いて各種のサイトカイン特異的抗体を

コーティングしたELISA プレートを作成し、分泌されたサイトカインの種類や量を測定した。

#### (2)ミクログリア細胞におけるDISC1 シグナル伝達機構の解明

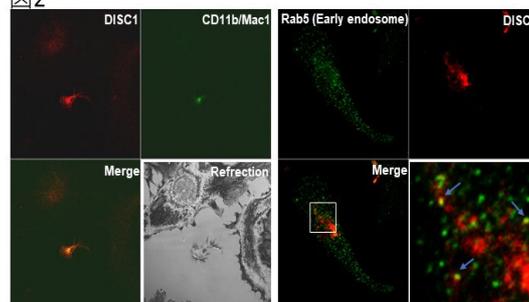
ミクログリア細胞ライセートからの DISC1 免疫沈降産物を用いて質量分析を行い、DISC1 相互作用分子を同定するとともに、その相互作用をプルダウン実験により検証する。また、免疫組織学的解析から、DISC1 と相互作用分子の生理的意義を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)ミクログリア細胞におけるDISC1 の生理機能の解明

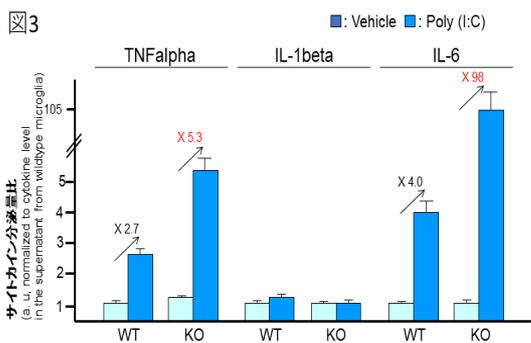
混合グリア培養細胞において、DISC1 はミクログリアマーカーである CD11b(インテグリン分子)陽性細胞において強い発現が認められた(図 2)。さらにミクログリア細胞における DISC1 の細胞内局在を調べるため、DISC1 と幾つかの細胞内マーカー分子との共染色実験を行った。細胞内レベルでDISC1 は点状の局在パターンを示し、DISC1 顆粒はゴルジ体に強く濃縮しており、その一部はエンドソームマーカーと共局在していた(図 2)。これらの結果から、DISC1 が小胞輸送に関与していることが示唆された。

図2



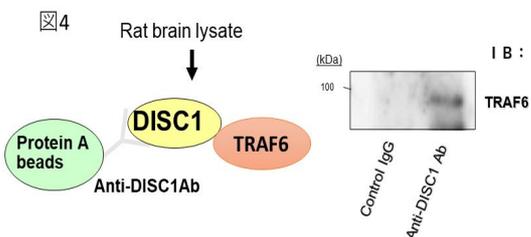
ミクログリア細胞は周囲環境の変化に応じてサイトカイン(IL1b や TNFalpha 等)を分泌する。研究代表者は Poly I:C(二本鎖 RNA アナログ)を用いた疑似ウイルス感染モデルでサイトカイン分泌プロセスにおける DISC1 の関与を検討した。野生型細胞(WT)と Disc1 ノックアウト細胞(KO)に Poly I:C 刺激を加え、サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF)の分泌

量を調べる実験を行ったところ、*Disc1*-KO 細胞は WT と比較して Poly (1:C) 誘導時の TNF や IL-6 の分泌量比が増大していることを見出した(図 3)。一方で IL-1beta では影響が認められなかった。この結果は、DISC1 がサイトカイン関連シグナルに関わっていることを示唆した。



## (2) ミクログリア細胞における DISC1 シグナル伝達機構の解明

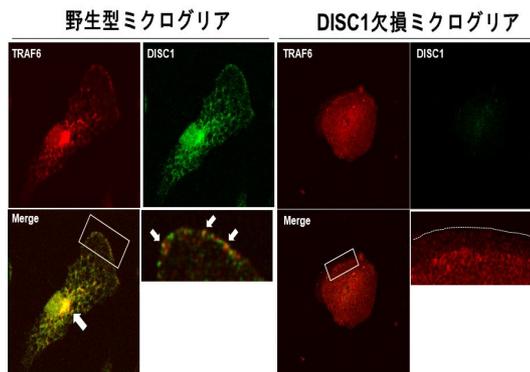
研究代表者はラット脳可溶化物を用いた DISC1 アフィニティーカラムクロマトグラフィー解析と質量分析から、DISC1 インタークトームを調べたところ、50 種類以上の DISC1 相互作用分子を同定した。そして同定された DISC1 相互作用分子の中で、ストレス応答および自然免疫シグナル伝達経路に関わる TRAF6 に着目した。研究代表者はミクログリア細胞において DISC1 が TRAF6 と複合体を形成するかどうかを検討するため、ラット脳可溶化物を用いた免疫沈降実験を行った。DISC1 免疫沈降産物に TRAF6 の共沈が認められた(図 4)。この結果は生体内において DISC1 は TRAF6 と複合体を形成していることを示唆していた。



更に研究代表者は、TRAF 複合体における DISC1 の関与を検討するため、野生型、または DISC1 ノックアウトマウス由来のミクログ

リア細胞での TRAF6 局在を調べた。野生型において、DISC1 や TRAF6 はゴルジ体周辺や細胞膜辺縁部で点状に局在しており、一部で共局在している(図 5)。一方で DISC1 欠損ミクログリア細胞では、ゴルジ体周辺や細胞膜辺縁部からの TRAF6 脱局在が認められた(図 5)。これまでの解析結果から、DISC1 が欠損している条件では、様々な環境因子(例: ウイルス感染)で惹起されるべき免疫応答が正常に

図5



機能しないため、神経発達およびネットワーク障害がより生じやすい環境になっているものと推察される。

## 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2件)

1. Nagai T, Nakamuta S, Kuroda K, Nakauchi S, Nishioka T, Takano T, Zhang X, Tsuboi D, Funahashi Y, Nakano T, Yoshimoto J, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Miura M, Nishi A, Kobayashi K, Yamada K, Amano M, Kaibuchi K. Phosphoproteomics of the Dopamine Pathway Enables Discovery of Rap1 Activation as a Reward Signal In Vivo. *Neuron*, 89(3):550-65 (2016). 査読有
2. Kobayashi K, Nakano S, Amano M, Tsuboi D, Nishioka T, Ikeda S, Yokoyama G, Kaibuchi K, Mori I. Single-Cell Memory Regulates a Neural Circuit for Sensory Behavior. *Cell Rep*, 14(1):11-21 (2016). 査読有

査読有

[学会発表](計0件)

〔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

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Yakuri/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坪井 大輔 (TSUBOI DAISUKE)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：80584672

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

貝淵 弘三 (KAIBUCHI KOZO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00169377