

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00858

研究課題名(和文)植物性エストロゲンを用いた新たな統合失調症の発症制御

研究課題名(英文)A novel therapeutic effects of phytoestrogens in schizophrenia

研究代表者

大籠 友博(Ohgomori, Tomohiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80584755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：銅のキレーターであるクプリゾンを含む飼料を与えたマウスを統合失調症や多発性硬化症のモデル動物として用いて、植物性エストロゲンであるゲニステインによる治療効果を調べた。クプリゾン含有飼料を5週間与えたマウスの脳梁および海馬では、MBPの発現量や成熟オリゴデンドロサイトの空間分布密度が低下し、脱髄が起こっていることが明らかとなった。ゲニステインはMBPの発現、成熟型オリゴデンドロサイトの空間分布密度、ミエリン関連遺伝子の発現のすべてを回復させた。以上からゲニステインは、クプリゾン摂取によって誘発される成熟型オリゴデンドロサイトの細胞死を抑制すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性ホルモンの1つであるエストロゲンの量的な変動は体において様々な精神症状を引き起こす。近年、多発性硬化症や統合失調症などの疾患において脳の白質における形態異常が明らかになりつつある。本研究ではクプリゾン投与した多発性硬化症モデルマウスを用いて、植物性エストロゲンであるゲニステインによる治療効果を調べた。本研究の成果は食品成分による精神症状の軽減に対して大きな一助を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：One of the major female sex hormones, estrogen, can influence a variety of mental states. Individuals with multiple sclerosis (MS) often suffer from mental health issues, which are correlated with the pathology of gray matter. In this study, we aimed to elucidate the validity of phytoestrogen genistein (GEN) for the cuprizone (CPZ)-induced demyelination. Five weeks CPZ intoxication induced demyelination in the hippocampus, and that myelination was successfully recovered by GEN. Loss of mature oligodendrocytes following CPZ intoxication was counteracted by GEN. The expression levels of myelin-related genes in the whole hippocampal tissue were decreased by CPZ but recovered by GEN. These results show that GEN may act on mature oligodendrocytes in the hippocampus by promoting their survival and myelin formation, and suggest the therapeutic potential of phytoestrogens for treating MS patients suffering from mental health issues.

研究分野：神経科学

キーワード：海馬 オリゴデンドロサイト ゲニステイン エストロゲン グリア

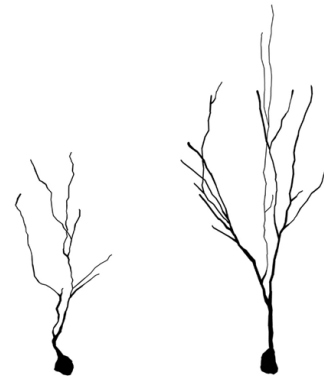
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A. エストロゲンの作用標的は生殖器のみではない。

大豆由来のイソフラボンやゲニステインはその化学構造がエストロゲンと類似しており、植物性エストロゲンといわれる。エストロゲンは代表的な性ホルモンであり、その主たる標的組織は子宮である。一方で、エストロゲン受容体 (ER) の発現は、生殖器のみならず骨、骨髄、肺、膀胱、腸など多岐に渡る。さらに脳の様々な領域 (大脳皮質、海馬、黒質、小脳など) にも発現することが分かっていた。最近では ER の活性化は記憶学習機能を亢進させることが、齧歯類でも哺乳類でも報告されている

(Kitamura et al., PLoS One, 2009, Kohama et al., J Neurosci, 2016)。申請者の所属研究室でも最近、初老期の雌マウスにおいて、大豆イソフラボンが成体海馬で起こる神経新生を促進することを解明した (Yamada et al., Neuropharmacology, 2016)。このようなことから、植物性エストロゲンの新規作用標的としての「脳」は近年益々脚光を浴びている。実際に、アルツハイマー病に対する効果 (Carey et al., J Alzheimers Dis, 2015) や脳卒中に対する効果 (Kim et al., J Neurosci, 2015) などが報告されている。一方で、植物性エストロゲンの精神疾患に対する効果を個体レベルで評価した研究は少ない。また、個体レベルのアウトプットに至るまでの作用機序の多くは未だブラックボックスである。本研究では植物性エストロゲンによって精神疾患の発症を制御できる可能性と、その詳細な作用機序について個体レベル、分子レベルでの解明を目的とする。



《未処理》 《大豆イソフラボン処理》

図1 大豆イソフラボンの神経新生促進効果

B. エストロゲンと精神疾患

イギリスの画家、ルイス・ウェインは晩年に精神疾患の一種である統合失調症を罹患したといわれる。彼の作品一覧は統合失調症の紹介にしばしば使用されるが、時系列で並べて見ると衝撃的な変貌ぶりである。統合失調症は、今ではおよそ 100 人に 1 人弱がかかるといわれる極めて頻度の高い精神疾患である。その発症メカニズムは遺伝的要因で説明できない部分も多く、依然として不明である。

統合失調症の生涯発症率には男女差がほとんどないが、興味深いことに女性では発症年齢に明確な 2 つの発症ピークが存在する (Bale et al., Nat Neurosci, 2015, Lindamer et al., Psychopharm Bull, 1997, Häfner et al., Psychol Med, 1993, Stevens et al., Am J Psychiatry, 2002)。第 1 のピークは男性とほぼ同時期の 20 歳から 25 歳、第 2 のピークは 45 歳から 55 歳ごろにそれぞれ見られる。これら 2 つの時期は多くの女性が出産や閉経を迎え、エストロゲンの濃度が急速に低下する時期とほぼ一致する。このことは、エストロゲンが統合失調症の発症を抑制している可能性を強く示唆している。またこれを支持する様に、統合失調症患者に対するエストラジオールの投与は、従来の向精神薬に比べて高い効果があるといわれる (Akhondzadeh et al., Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003)。

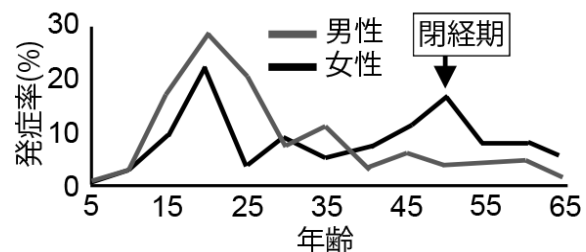


図3 統合失調症発症時期の性別差

C. 統合失調症におけるニューロンやグリア細胞の変容

現在、統合失調症の病態形成過程では「前頭前野」における抑制性ニューロンの機能異常 (Hashimoto et al., J Neurosci, 2003) やグリア細胞の異常な活性化 (Gomez et al., Schizophr Res, 2015) が注目されている。エストロゲンは前頭前野に対してシナプス結合を調節すること、グリア細胞の活性化を制御することが知られていることから (Lenz et al., J Neurosci, 2013, Glantz et al., Arch Gen Psychiatry, 2000)、前頭前野領域における植物性エストロゲンの効果を調べるのが実験的に適切である。

2. 研究の目的

上に示したように、植物性エストロゲンには統合失調症に対する治療効果がある可能性が高いが、その効果の詳細と作用機序は不明である。本研究では、統合失調症動物モデルとして銅キレーターであるクプリズンを摂取させたマウスを使用する。この動物モデルは最も汎用性が高く、エストロゲン濃度が低い雄マウスの方が劇症性である (Valeiras et al., GLIA, 2014)。植物性エストロゲンとしては、エストロゲン様の生物活性が最も高いゲニステインを使用し、以下の実験を行う。万一、ゲニステインで治療効果が見られない場合はダイゼイン、イソフラボン、グリシテインなどを追加検討する。さらに、いずれにおいても効果が見られない場合は、先行研究で治療効果が認められているエストラジオールの使用に切り替え、下記 B 以降の実験に重点を置くようにする。

- A. モデル動物に対してゲニステインを与えて継時的な行動評価を行い、その治療効果を個体レベルで明らかにする。
- B. ニューロンに対する効果を、ニューロンの数的変化とマーカー遺伝子の発現変動について、組織化学的・生化学的に明らかにする。
- C. グリア細胞に対する効果を、アストロサイト・ミクログリア・オリゴデンドロサイトの数的変化と活性化マーカー遺伝子の発現変動について、組織化学的・生化学的な解析を行い、ゲニステインの作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

実験動物

本研究では合計 40 頭の C57BL6J 系統の成獣メスマウス（8 週令）を使用した。AIN-93G のダイス油をコーン油に置換した通常餌（NORM）もしくは同餌に CPZ（0.2% w/w）を添加した CPZ 添加餌による飼育を 5 週間行った。同期間に対照群（NORM-VEH 10 頭、CPZ-VEH 10 頭）には生理食塩水（vehicle, VEH）、GEN 群（NORM-GEN 10 頭、CPZ-GEN 10 頭）には生理食塩水に懸濁した GEN（30 mg/kg）をそれぞれ腹腔内投与した。免疫染色に用いるマウス（各群 6 頭）は深麻酔下に、濃度 0.05% グルタルアルデヒド含有 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液による灌流固定を行い、クライオスタットを用いて 50 μ m の冠状断切片を作成した。リアルタイム PCR に用いるマウス（各群 4 頭）は深麻酔下に、PBS による脱血処理を行い、実体顕微鏡下に海馬を摘出した。

免疫組織化学

以下の一次抗体に適切な蛍光色素標識二次抗体を組み合わせ免疫染色を行った。

- 1) マウスモノクローナル抗 keratan sulfate (KS) 抗体 (1:2000)
- 2) マウスモノクローナル抗 myelin basic protein (MBP) 抗体 (1:10000)
- 3) ウサギポリクローナル抗 ionized calcium binding adaptor-1 (Iba1) 抗体 (1:10000)
- 4) マウスモノクローナル抗 S100 β 交代 (1:25000)
- 5) ウサギポリクローナル抗 platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α) 抗体 (1:5000)
- 6) ヤギポリクローナル抗 oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2) 抗体 (1:5000)
- 7) モルモット抗ポリクローナル抗 GFAP 抗体 (1:10000)

オプティカルダイセクター解析

各マウスから 2 枚の切片を選択し、免疫染色を行った。画像解析アプリケーション ImageJ を用いて、成熟オリゴデンドロサイト (OL)、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC)、アストロサイト、ミクログリアについて、海馬 CA1 領域の各層における空間分布密度 (ND) を計測した。

フローサイトメトリー

各群 4 頭の子マウス組織を、PBS に 5 mg/ml で溶解した Collagenase 溶液を用いて 60 分間酵素処理 (37 $^{\circ}$ C) を行った。70 μ m 孔のセルストレーナーを通したホモジネートを PBS で希釈した 38% Percoll 溶液に懸濁し、2000 \times g で 20 分間遠心した。沈殿として得られる細胞を FACS buffer (PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) に懸濁した後、ラットモノクローナル抗 cluster of differentiation molecule 16/32 (CD16/32) 抗体 (1:200) による FcR 受容体のブロッキングを行った。Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ラットモノクローナル抗マウス CD11b 抗体 (1:50)、Allophycocyanin (APC) 標識ラット抗マウス Lymphocyte antigen 6 complex (Ly6C) 抗体 (1:25) と反応させた後、35 μ m 孔のメッシュを通し、蛍光活性化セルソーター (BD FACSAria TM II) を用いて CD11b + /Ly6C - 領域をミクログリアとして分取した。

リアルタイム定量 PCR 法

ソーティングしたミクログリアから RNeasy kit を用いて、全 RNA を抽出した。cDNA は鋳型として 35 ng の RNA を使用し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit のオリゴ dT プライマーを使用して、全量 20 μ l の反応系で 30 分間逆転写酵素処理 (55 $^{\circ}$ C) を行うことを用いて作製した。リアルタイム定量 PCR の反応には作製した cDNA 0.5 μ l を鋳型として、下記プライマーと Power SYBR $^{\circledR}$ Green Master Mix を使用して、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System で測定した。反応条件は、50 $^{\circ}$ C 2 分と 95 $^{\circ}$ C 10 分の加熱反応後、[95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分] の反応を 40 サイクル行うことで増幅させた。使用したプライマーの特異性は融解曲線を毎回作製することで複製産物が 1 種であることを確認した。発現レベルの定量化には $\Delta\Delta$ Threshold Cycle (C_T) 法 (相対的遺伝子発現量 = 2^{-(cycle threshold (CT) experimental sample-CT internal control sample)}) を使用し、内部標準の測定には Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を使用した。標的遺伝子は下記のとおりである。

- 1) IFN- γ
- 2) IL-6
- 3) IL-1 β
- 4) IL-10

- 5) IL-4
- 6) CD68
- 7) purinergic receptor subtype P2Y6 (P2Y6R)
- 8) Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2)
- 9) Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)
- 10) LAMP2

画像間演算によるミクログリアとシナプス・ミエリン間のコンタクト解析

各マウスから2枚の切片を選択し、免疫蛍光染色を行った。画像解析アプリケーション Fiji を用いて、Otsu 法による二値化と3次元メディアンフィルタによる画像間演算によってミエリンとミクログリアを抽出し、共存領域の密度 (VD) を計測した。

統計解析と画像処理

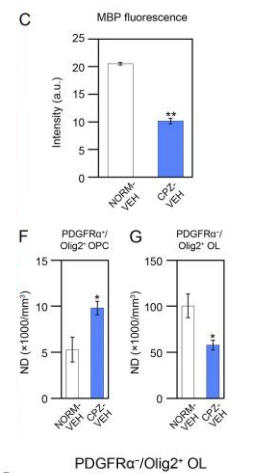
統計解析には Kaleidagraph 4.5 (ヒューリンクス) を使用し、4群間の検定には One-way ANOVA を、2群間の検定には Welch の t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。画像処理には Photoshop CS6 (Adobe) を使用した。

4. 研究成果

CPZ による脳梁のミエリンとオリゴデンドロサイトの障害

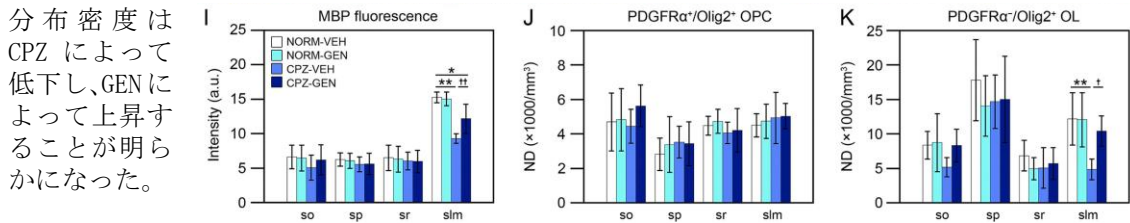
ミエリン関連分子である MBP に対する免疫染色を行い、CPZ 添加餌で生じるミエリン障害を脳梁において検討した。その結果、CPZ 添加餌群では通常餌群に比べて脳梁における MBP の染色性が低いことが明らかになった。

ミエリン産生を担う成熟オリゴデンドロサイトと、オリゴデンドロサイト新生に関わる前駆細胞に対する CPZ の効果を検討したところ、CPZ によってオリゴデンドロサイト前駆細胞の分布密度が上昇し、成熟オリゴデンドロサイトの分布密度が低下することが明らかになった。



CPZ による海馬のミエリンとオリゴデンドロサイトの障害

脳梁の場合と同様にして海馬に対する検討も実施した。その結果、CPZ によって網状分子層における MBP の蛍光強度が低下し、GEN によって上昇することが明らかになった。またオリゴデンドロサイト前駆細胞の分布密度は CPZ や GEN の影響を受けないが、成熟オリゴデンドロサイトの分布密度は

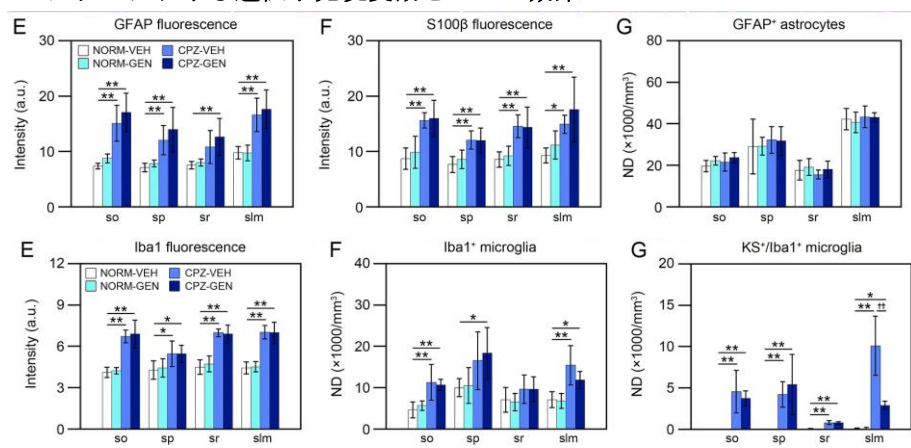


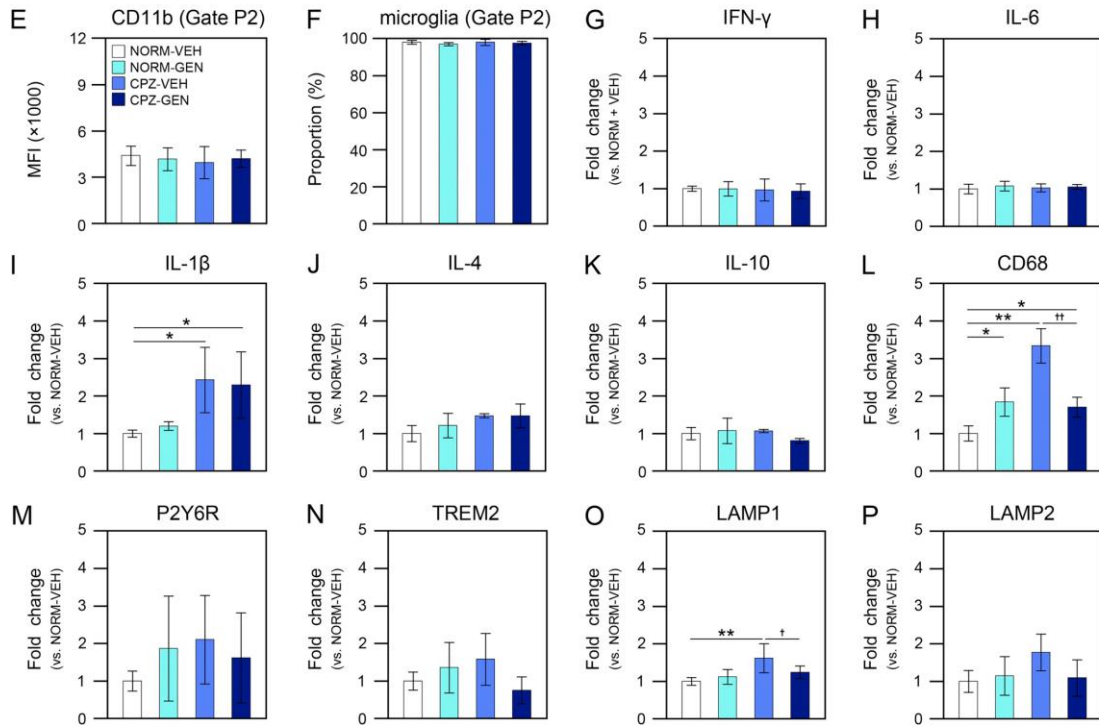
海馬のアストロサイト・ミクログリアに対する CPZ と GEN の作用

アストロサイトの分子マーカーである GFAP と S100β、ミクログリアのマーカーである Iba1、KS を用いて、CPZ と GEN が海馬のアストロサイトやミクログリアに与える影響を評価した。その結果、CPZ によって GFAP、S100β 両者の染色強度が増加することが明らかになった。しかしながら、GEN による抑制効果はなかった。また CPZ によって Iba1、KS の染色強度も増加することが明らかになった。KS の染色強度については、網状分子層に限り GEN による抑制効果が認められた。

CPZ による海馬ミクログリアにおける遺伝子発現変動と GEN の効果

FACS で分取したミクログリアについて、定量 PCR 法による遺伝子発現変動の解析を行った。向炎症性サイトカインとして IFN-γ、IL-6、IL-1β を解析したところ、IFN-γ と IL-6 はクプリゾン投与とゲニステイン投与のいずれに





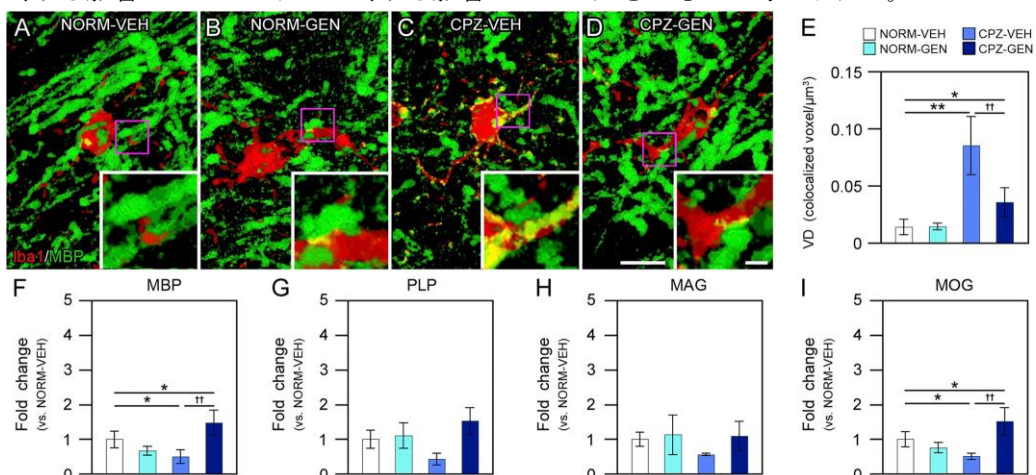
においても変動がなかったが、IL-1 β はクプリゾン投与によって発現が上昇し、ゲニステイン投与によって抑制された。また、抗炎症性サイトカインとされているIL-10、IL-4の遺伝子発現を調べた。IL-10の遺伝子発現はクプリゾン投与とゲニステイン投与いずれにおいても変動がなかった。一方で、IL-4の遺伝子発現はクプリゾン投与によって上昇したが、ゲニステインによる抑制は認められなかった。さらに、食食性マーカーとしてCD68、P2Y6R、TREM2、LAMP1、LAMP2の遺伝子発現を解析した。コレステロール受容体であり、脂質食食に関わるCD68はクプリゾン投与によって上昇し、ゲニステイン投与によって抑制された。一方で、UDPによって活性化され、食食に関わるP2Y6Rや、A β の食食に関わるTREM2、ライソゾームに存在するLAMP1、LAMP2については、クプリゾン投与とゲニステイン投与のいずれによっても発現変動は認められなかった。このことから、ミクログリアに対するGENの効果は極めて限定的であると考えられた。

CPZによるミクログリアとミエリンの共存の増加とGENによる抑制

ミクログリアマーカーであるIba1とミエリンのマーカーであるMBPを用いた免疫染色を行い、海馬のミクログリアによるミエリンの食食について評価した。Iba1とMBPが共存し、ミエリンがミクログリアによって食食されている可能性がある領域は、CPZによって増加しGENによって減少した。

CPZによるミエリン関連遺伝子の発現低下とGENによる回復

リアルタイムPCRを用いて、海馬におけるミエリン関連遺伝子の発現を解析した。MBPやMOG遺伝子の発現量はCPZによって減少し、GENによって上昇した。一方でPLPやMAG遺伝子の発現量はCPZやGENによる影響を受けなかった。この結果から、CPZやGENの成熟オリゴデンドロサイトに対する影響はミクログリアに対する影響に比べて大きいものと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohgomori Tomohiro, Jinno Shozo	4. 巻 363
2. 論文標題 Cuprizone-induced demyelination in the mouse hippocampus is alleviated by phytoestrogen genistein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2018.11.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohgomori Tomohiro, Yamasaki Ryo, Kira Jun-ichi, Jinno Shozo	4. 巻 33
2. 論文標題 Upregulation of Vesicular Glutamate Transporter 2 and STAT3 Activation in the Spinal Cord of Mice Receiving 3,3'-Iminodipropionitrile	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurotoxicity Research	6. 最初と最後の頁 768 ~ 780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12640-017-9822-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohgomori Tomohiro, Yamasaki Ryo, Takeuchi Hideyuki, Kadomatsu Kenji, Kira Jun-ichi, Jinno Shozo	4. 巻 46
2. 論文標題 Differential activation of neuronal and glial STAT3 in the spinal cord of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2001 ~ 2014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.13650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohgomori Tomohiro, Yamasaki Ryo, Takeuchi Hideyuki, Kadomatsu Kenji, Kira Jun-ichi, Jinno Shozo	4. 巻 356
2. 論文標題 Differential involvement of vesicular and glial glutamate transporters around spinal motoneurons in the pathogenesis of SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience.	6. 最初と最後の頁 114 ~ 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2017.05.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Jun, Ohgomori Tomohiro, Jinno Shozo	4. 巻 525
2. 論文標題 Alterations in expression of Cat 315 epitope of perineuronal nets during normal ageing, and its modulation by an open channel NMDA receptor blocker, memantine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2035 ~ 2049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大籠友博、神野尚三
2. 発表標題 白質障害モデルマウスにおける生体海馬神経新生の抑制とその治療法の探索
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大籠友博、神野尚三
2. 発表標題 リポ多糖によるミクログリアのプライミングは側頭葉てんかんの病態形成を抑制する可能性がある
3. 学会等名 日本解剖学会 第74回 九州支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大籠友博、神野尚三
2. 発表標題 側頭葉てんかんモデルマウスで見られるケラタン硫酸陽性ミクログリアの機能
3. 学会等名 第30回日本生化学会九州支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大筆友博、神野尚三
2. 発表標題 Phenotypic and quantitative analysis of 5D4 keratan-sulfate expressing microglia in the hippocampus of mouse models for temporal lobe epilepsy
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大筆友博、神野尚三
2. 発表標題 統合失調症モデルマウスの海馬グリア細胞に対する 植物由来エストロゲン類縁体の作用
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大筆友博
2. 発表標題 側頭葉てんかんモデルマウスの海馬に見られる microglia subpopulationに関する形態学的・分子生物学的検討
3. 学会等名 包括的神経グリア研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大筆友博、神野尚三
2. 発表標題 側頭葉てんかんモデルマウスの海馬に発現誘導されるケラタン硫酸陽性ミクログリアの形態学的・分子生物学的検討
3. 学会等名 第73回日本解剖学会九州支部学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大籠友博、神野尚三
2. 発表標題 クプリゾン投与統合失調症モデルマウス海馬の微小環境に対する植物由来エストロゲンの作用
3. 学会等名 第40回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神野尚三、大籠友博
2. 発表標題 統合失調症モデルマウスの海馬におけるゲニステインの抗神経炎症作用
3. 学会等名 不二たん白研究振興財団 第20回研究報告会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考