

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700347

研究課題名（和文） 候補遺伝子 DISC1 の機能解析を通じた精神疾患の病態理解

研究課題名（英文） Analysis of the function of DISC1 to understand the pathology of schizophrenia

研究代表者

久保 健一郎 (KUBO KEN-ICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20348791

研究成果の概要：

スコットランドの精神疾患多発家系の遺伝学的研究で発見された *disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)* は、その後の解析の結果、脳の形成に関わる可能性が示唆され、世界的な注目を集めている。本研究では、脳内皮質構造の発生過程において、どのような組織構築の異常が DISC1 の機能欠失によって起こるのかを明らかにすることを試みた。DISC1 の siRNA 発現ベクターおよび変異体遺伝子発現ベクターを作成し、子宮内電気穿孔法を用いて発生中の中枢神経系に導入した。その結果、DISC1 が発生中の大脳皮質興奮性神経細胞のみならず、海馬皮質の発生にも重要な役割を果たしていることが判明した。さらに、DISC1 結合分子である、やはり統合失調症および双極性感情障害に連鎖を示す pericentriolar material-1 protein (PCM1)、さらに Bardet-Biedl syndrome の原因遺伝子である Bardet-Biedl syndrome 4 protein (BBS4) が、DISC1 とともに発生中の大脳皮質形成に重要な役割を持つことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患、統合失調症、双極性感情障害、脳の発生、大脳皮質、海馬、*disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)*、Bardet-Biedl syndrome

1. 研究開始当初の背景

分子遺伝学の急速な進展により、ヒトやマウスの皮質構造の形成に関わる分子が次々と明らかになった (Kubo K, Nakajima K. Keio J Med. 2003 Mar;52(1):8-20.)。さらに、統合失調症についても家系を用いた連鎖解析から、スコットランドの精神疾患多発家系の遺伝学的研究で発見された *disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)* をはじめとした、有力な候補遺伝子が見いだされた。その後の我々による解析の結果、コードする蛋白質が皮質構造形成に関わる可能性が示唆され、世界的な注目を集めていたが、どのようなメカニズムで皮質構造形成に関わるのかは不明であった。また、DISC1 が発生段階の脳のなかで大脳皮質の層構造形成に関わる可能性が示唆されていたが、その他の部位でも同じような機能を持っているのかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、統合失調症候補遺伝子 *DISC1* の機能を解析する事により、統合失調症の病態理解に役立てる事を目的とした。とくに、どのような分子カスケードで層構造形成に関わるのかに注目してその機能解析を試みた。また、大脳皮質以外の脳部位で層構造形成に関わるのかどうかを明らかにすることを目的とした。実際には、発生時期の海馬特異的な遺伝子導入法を開発し、DISC1 に対するノックダウンベクターを導入し、DISC1 の機能障害が起きることによる発生段階海馬での影響を観察することにより、DISC1 の機能とその障害時の病態を解析した。

3. 研究の方法

(1) 子宮内胎児電気穿孔法

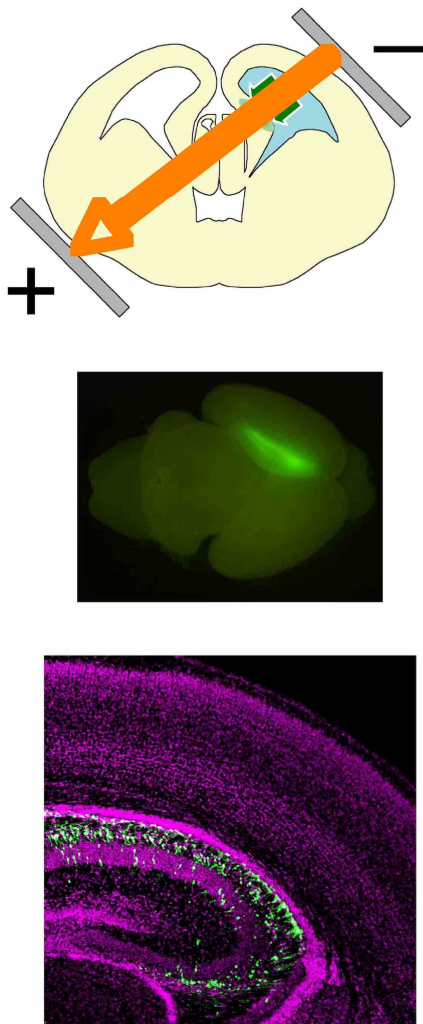
すべての動物実験は日本神経学会のガイドラインに従い、十分な麻酔を行いつつ、動物の苦痛が最小限となるようあらゆる配慮が払われた。1/10 に希釈したネブタール液を体重 10g 当り 120 μ l の割合で、腹腔内に注射して麻酔をかけた。一回分 (約 20 μ l) に分注したプラスミド溶液に、1/10 量の 0.1% FastGreen 溶液を加え、マウスを手術台に仰向けに寝かせ、手足を外科手術用テープで固定、子宮壁を通して胎仔が見えるので、FastGreen で着色したプラスミド溶液をインジェクション針に吸引して、これを側脳室の片側に注入した。次に、PBS で子宮をよく濡らし、ピンセット型の電極で胎仔の頭部をはさみ、電気パルスを与えた。電圧 33V、パルスオン/オフ 50/950msec、パルスの回数 4 回にて行った。電流の実測値は 30-60mA となった。

(2) DISC1 に対するノックダウンベクターおよび DISC1 に結合する分子である PCM1 と BBS4 に対するノックダウンベクターを作成した。そのノックダウン効率はウエスタンブロットリング法により確認した。

4. 研究成果

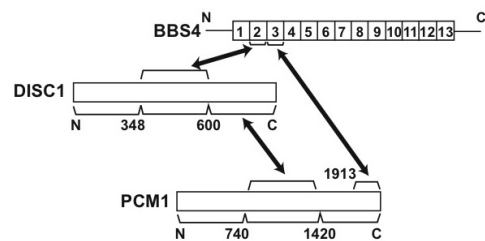
(1) DISC1 およびその結合分子の生体脳内での機能を解析するため、子宮内胎児電気穿孔法を用いた発生段階海馬への部位特異的な遺伝子導入法を確立した。右の図のように、通常の大脳皮質への遺伝子導入の場合と逆

の方向に電場をかけることで、海馬皮質に特異的な遺伝子導入が可能になった。この方法を利用して、発生中海馬皮質における DISC1 のノックダウンを行った所、発生中海馬錐体細胞の移動が大きく障害され、成熟後の海馬錐体細胞層において組織構築の乱れが観察された。この所見をまとめ、現在投稿中である。



<図の説明> (上) プラスミド溶液を脳室内に注入し、海馬側にプラス極をあてて電気パルスかけた。(中) 海馬に GFP タンパク質(緑)が導入されている様子が観察された。(下) 脳切片を作成すると、海馬特異的な遺伝子導入(緑)が確認できた。紫は核染色。

(2) また、統合失調症候補分子 DISC1 の分子カスケードを明らかにすることを目的として、新たな結合分子の同定を試みた。その際、DISC1 が脳の発生の初期において、細胞分裂や細胞移動に重要は働きをもつ中心体 (centrosome) に局在を示すことに注目した。結合分子の候補として、やはり統合失調症および双極性感情障害に連鎖を示す pericentriolar material 1 (PCM1) が中心体に存在すること、さらに DISC1 に結合する p150glued が Bardet Biedl syndrome の原因遺伝子である Bardet Biedl syndrome 4 protein (BBS4) に結合して PCM1 を中心体に運ぶことから、PCM1、BBS4 と DISC1 の結合に注目した。免疫沈降法によって PCM1 と DISC1、BBS4 と DISC1 が直接結合することが判明した。培養神経細胞では内在性の PCM1、BBS4 と DISC1 がいずれも centrosome に分布して共存していることがわかった。さらに、変異体を用いた解析により、DISC1 はその N 末と C 末でそれぞれ別個に PCM1 と結合し、また DISC1 の中心部分が BBS4 と結合することが判明した(下図)。



さらに、その機能的相関を調べるため、これらの分子に対する siRNA を用いて、脳の発生段階におけるこれらの分子の機能の解析を行った。当研究室で開発した子宮内胎児電気穿孔法を用いて、これらの分子に対する siRNA を発生中のマウス大脳皮質に導入し、それぞれの分子をノックダウンしたときの移動神経細胞への影響を観察したところ、ノックダウンにより、神経細胞の移動に遅れを

生じることが判明した。しかも、DISC1 と BBS4 については、それらのノックダウンを同時に 行うと、単独で行った場合よりもより大きな 遅れが観察され、これらの分子が相補的に神 経細胞移動に働いていることが機能的に証 明された。

これらの所見を共同研究者とともにまと め、国際的精神医学専門誌である Arch Gen Psychiatry に発表した。

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 1 件)

Atsushi Kamiya, Perciliz L. Tan, Ken-ichiro Kubo, Caitlin Engelhard, Koko Ishizuka, Akiharu Kubo, Sachiko Tsukita, Ann E. Pulver, Kazunori Nakajima, Nicola G. Cascella, Nicholas Katsanis, and Akira Sawa., Recruitment of PCM1 to the centrosome by the cooperative action of DISC1 and BBS4: a candidate for psychiatric illnesses. **Arch. Gen. Psychiatry** 65 (9), 2008, p.996-1006, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

Kenji Tomita, Ken-ichiro Kubo, Asuka Uto, Atsushi Kamiya, Akira Sawa, and Kazunori Nakajima, The analysis of the role of DISC1 in the cortical neuronal migration, 第 38 回慶應ニ ューロサイエンス研究会, 2009 年 3 月 14 日, 東京

宇都飛鳥、久保健一郎、金谷繁明、仲嶋 一範, 大脳皮質抑制性神経細胞における

DISC1 の機能解析, 日本解剖学会関東支部第 96 回学術集会, 2008 年 11 月 22 日, つくば

Atsushi Kamiya, Minae Niwa, Rina Murai, Yukihiro Noda, Ken-ichiro Kubo, Hanna Jaaro-Peled, Saurav Seshadri, Kazunori Nakajima, Toshitaka Nabeshima, and Akira Sawa, Genetic disturbance of cortical development: exploring novel animal models for schizophrenia via in utero gene transfer, Society for Neuroscience, 38th Annual Meeting, 2008.11.15-19, Washington, D.C., U.S.A

Toshitaka Nabeshima, Minae Niwa, Rina Murai, Yukihiro Noda, Ken-ichiro Kubo, Atsushi Kamiya, Hanna Jaaro-Peled, Kazunori Nakajima, and Akira Sawa, Transient knockdown of DISC1 in the developing cerebral cortex leads to dopaminergic disturbance and schizophrenia-like deficits in young adult mice, 第 51 回日本神経化学学会大会 2008.9.11-13, 富山

Kenji Tomita, Ken-ichiro Kubo, Asuka Uto, Atsushi Kamiya, Akira Sawa, and Kazunori Nakajima, The analysis of the role of DISC1 in the brain layer formation in vivo, 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 9-11 日, 東京

Ken-ichiro Kubo, Atsushi Kamiya, Akira Sawa, and Kazunori Nakajima "The analysis of the role of DISC1 in the neuronal migration of the neocortex in vivo" Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, CA, U.S.A., 2007 年 11 月 3-7 日

久保健一郎、神谷篤、澤明、仲嶋一範“新皮質の形成において DISC1 が果たす役割の解析”第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本

神経化学会大会・第17回日本神経回路学会
大会合同大会 (Neuro2007)、横浜、2007年9
月10-12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 健一郎 (KUBO KEN-ICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20348791

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

澤 明 (SAWA AKIRA)

ジョンスホプキンス大学・精神科・教授

神谷 篤 (KAMIYA ATSUSHI)

ジョンスホプキンス大学・精神科・講師