

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17122

研究課題名（和文）統合失調症新規病態仮説「脂質生合成代謝異常 - 脳梁形成・機能不全仮説」の検証と応用

研究課題名（英文）Verification of the potential role of impaired lipid metabolism in the white matter abnormalities in schizophrenia

研究代表者

島本 知英 (Shimamoto, Chie)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・訪問研究員

研究者番号：90755117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、統合失調症新規病態仮説「脂質生合成代謝異常 - 脳梁形成・機能不全仮説」の検証を目指した。ヒト死後脳解析より、統合失調症患者の脳梁では複数の脂質代謝関連遺伝子や転写因子、ミクログリアマーカーの発現が変動していることがわかった。さらに、変動がみられたいくつかの脂質代謝関連遺伝子や転写因子の上流に、転写因子NFATC2が位置することを予測した。また、新規に作成したNfatc2 KOマウスは一部の統合失調症様行動異常を示した。これらのことから、NFATC2を起点とした遺伝子ネットワークとミクログリアの異常が関連した脂質組成変化が、統合失調症病態の形成に関与する可能性が高まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脳梁における脂質代謝に着目し、統合失調症患者でみられる脳梁のサイズやミエリン構造・機能の変化が起こる分子メカニズムを理解することを目指した。本研究により、NFATC2を起点とした遺伝子ネットワークとミクログリアの異常が関連した脂質組成変化が、統合失調症病態の形成に関与する可能性を見出した。この発見は、一部の統合失調症患者で観察される白質病変の原因となるメカニズムの理解に役立つもので、将来的に転写因子をターゲットとした新たな治療法開発の切り口になると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that abnormal lipid homeostasis may underlie the pathological changes in schizophrenia. To test this hypothesis, we performed gene expression analysis using the corpora callosa from patients with schizophrenia and age- and sex-matched controls. The result shows that altered expression levels of lipid metabolism-related genes and their potential upstream transcription factors in schizophrenia. We also detected the low expression levels of microglia markers in schizophrenia. Subsequent pathway analysis identified a gene regulatory network where nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2) is placed most upstream. Newly generated Nfatc2 knockout mice show some schizophrenia-related behavioral abnormalities. Collectively, this study provides evidence regarding lipid abnormalities in the corpora callosa of patients with schizophrenia, and proposes the potential role of impaired NFATC2-relevant gene network and decreased microglia as its underlying mechanism.

研究分野：生物学的精神医学

キーワード：統合失調症 死後脳 脳梁 マウス行動解析 脂質代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

幻覚・妄想などの陽性症状、感情鈍麻や自閉などの陰性症状、認知機能障害等の症状を呈する統合失調症の病因は不明であるが、近年、画像解析技術の進歩により、統合失調症の注目すべき病理所見の一つとして、「脳梁」のサイズやミエリンの構造、白質走行の変化が数多く報告されている(引用 など)。しかし、このマクロレベルの変化がどのような分子メカニズムによって引き起こされているのかはほとんどわかっていない。脳梁は、ミエリン(約 70-80%が脂質で構成)が豊富に存在していることから、脳の中でも特に「脂質」が豊富な領域である。脂質(特に脂肪酸)の変動は、統合失調症患者の重要な臨床所見として注目されてきたが(引用 、 など)、その原因もまた不明なままであった。

これまでに、研究代表者は、液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS)を用いてヒト死後脳(脳梁部位:対照群 15 例、疾患群 15 例)の脂質定量解析を行い、統合失調症患者群でグリセロリン脂質(18 分子種)とスフィンゴ糖脂質(2 分子種)の含量が有意に減少していることを明らかにした。興味深いことに、これらの脂肪酸側鎖にはアラキドン酸(20:4)がエンリッチされていた。アラキドン酸は、統合失調症患者サンプル(血漿など)で変動が報告されている脂肪酸の一つであり、リン脂質からホスホリパーゼ A2(PLA2)により切り出され、シクロオキシゲナーゼ(COX:アラキドン酸をプロスタノイドに代謝する酵素)やリポキシゲナーゼ(LOX:アラキドン酸をロイコトリエン類に代謝する酵素)により様々な生理活性物質に代謝されることが知られている。さらに、脳梁における *de novo* 脂質生合成代謝・脂肪酸リモデリングに関与する遺伝子(特にアラキドン酸との関連が示唆されるもの)に着目して発現解析を行ったところ、10 種の脂質代謝関連遺伝子の発現が統合失調症患者群で低下していることを発見した。これらの知見をもとに、研究代表者は、脂質生合成代謝パスウェイの異常が、統合失調症患者でみられる白質異常(脳梁のサイズや構造の異常など)の原因に関与しているのではないかと考えた(新規「脂質生合成代謝異常 - 脳梁形成・機能不全仮説」)。

### 2. 研究の目的

本研究では、新規「脂質生合成代謝異常 - 脳梁形成・機能不全仮説」を検証し、ミクロからマクロまでの多層的なつながりを明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

- (1) *in silico* プロモーター配列解析: TRANSFAC (TRANSFAC matrix table, Release 2017.3; <http://genexplain.com/transfac/>)ソフトウェアを用いて、統合失調症サンプルで変動がみられた脂質代謝関連遺伝子のうち、最低 5 つ以上の遺伝子のプロモーター領域に結合する可能性の高い転写因子を探索し、予測した。
- (2) 遺伝子発現解析: ヒト死後脳(脳梁部位)における(1)で同定した統合失調症関連転写因子候補や細胞種マーカーなどの遺伝子の発現を、Taqman プローブを用いた定量的 RT-PCR により解析した。サンプルは脂質関連遺伝子の発現解析に用いたものと同じサンプル(対照群 92 例、統合失調症 95 例)を用いた。
- (3) パスウェイ解析: 統合失調症関連遺伝子間のネットワークを予測するため、IPA (Ingenuity Pathways Analysis) ソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行った。
- (4) 遺伝子改変マウスの作成: CRISPR-Cas9n システムを用いて、master regulator 候補遺伝子である *Nfatc2* を欠損させたマウスを作成した。
- (5) マウス行動解析: *Nfatc2* <sup>-/-</sup> (KO)マウス、*Nfatc2* <sup>+/-</sup> (HET)マウス及び *Nfatc2* <sup>+/+</sup> (WT)マウスを用いて精神疾患関連行動テストバッテリー[ホームケージ活動解析テスト(活動性を評価)、オープンフィールドテスト(活動性や情動性を評価)、居住者-侵入者テスト・3チャンパー試験(社会性を評価)、強制水泳試験(意欲を評価)、プレパルスインヒビションテスト(統合失調症中間表現型を評価)、モリス水迷路・恐怖条件付け試験(記憶・学習を評価)、高架式十字型迷路・明暗箱試験(情動を評価)、インテリケージを用いた解析(自然環境下かつ集団におけるマウスの行動を評価)、アンフェタミン(ドパミン作動薬)や MK801 (NMDA 受容体遮断薬)投与による自発運動量の測定(薬剤に対する感受性及び行動感作の形成を評価)]により *Nfatc2* HET/KO マウスの表現型を調べた。
- (6) *Nfatc2* HET/KO マウスの組織学的解析: マウスの脳切片を用いて、免疫組織染色法によりミクログリアマーカー(Iba1)の発現を調べた。
- (7) *Nfatc2* WT/HET/KO マウスの Visium 空間的遺伝子発現解析: マウス脳凍結切片を用い、切片の画像取得及び Visium Spatial Gene Expression Slides & Reagents Kit により作成したライブラリのシーケンス解析を行った。シーケンスファイルは 10x Genomics 社製ソフトウェア SpaceRanger を用いて切片上の各遺伝子の発現を可視化した。

### 4. 研究成果

- (1) 脂質関連遺伝子の発現を制御する要因の探索・同定:

脂質関連遺伝子の発現を変動させる要因として、上流に位置する転写因子の影響、発現する細胞種の変動、を考えた。まず、を検証するために、*in silico* プロモーター配列解析により regulator となる転写因子を探索し、14 種の候補転写因子を予測した。これら候補転写因子の遺伝子発現を、脂質関連遺伝子の発現解析に用いたものと同じ死後脳サンプルを用いて検証したところ、統合失調症サンプルで変動している転写因子 7 種を同定した (図 1)。次に、を検証するため、各種細胞種マーカー遺伝子の発現量を調べたところ、統合失調症サンプルではミクログリアマーカー遺伝子の発現量が低いことが判明した (図 2)。さらに、ミクログリアの細胞密度調節に関与していることが知られている分子の一つである CSF1R をコードする遺伝子の発現について調べたところ、統合失調症群で *CSF1R* 遺伝子の発現低下が見られた。

統合失調症群で変動していた脂質代謝関連遺伝子と転写因子、各細胞種マーカー遺伝子との発現量の相関関係を調べたところ、複数の遺伝子がミクログリアやオリゴデンドロサイトのマーカー遺伝子と正の相関を示した (図 3)。

(2) 統合失調症関連遺伝子ネットワークの予測: 統合失調症関連遺伝子間のネットワークを予測するため、各遺伝子の発現プロファイルをもとにパスウェイ解析をおこなったところ、統合失調症で変動していた転写因子の多くが、同一の遺伝子ネットワーク上に位置して相互に関連していることが予測され、さらにそれらの下流で、統合失調症で変動がみられた脂質関連遺伝子や *CSF1R* とつながっていること予測された (図 4)。また、遺伝子ネットワークの上流に、転写因子 *NFATC2* (Nuclear Factor of Activated T Cells 2) が位置していると予測されたため、*NFATC2* が master regulator である可能性が高まった。

(3) *Nfatc2* 遺伝子欠損マウスの作成:

*Nfatc2* が master regulator であるかどうかを検証するため、CRISPR-Cas9n システムを用いて、*Nfatc2* 遺伝子を欠損させたマウス (エクソン 2 に 29bp の欠損によりフレームシフトが生じたマウス) を作成した。Western blotting により、KO マウスで *Nfatc2* タンパク質が欠損していることが確認できた。また、HET マウスは *Nfatc2* タンパク質の発現が半減していた。

(4) *Nfatc2* の機能解析:

作成した *Nfatc2* 遺伝子欠損マウスを用いて、以下の解析を行った。

精神疾患関連行動解析: 精神疾患関連行動バッテリーを用いて *Nfatc2* WT/HET/KO マウスの行動を評価したところ、*Nfatc2* Het/KO マウスは、プレパルスインヒビションの低下など一部の精神疾患関連行動異常を示すことがわかった。

ミクログリアマーカー遺伝子の発現解析: *NFATC2* はミクログリアで高発現しており、ミクログリアの生存、活性、サイトカイン産生に関与していることが報告されているため (引用 ~

(図 1)

Gene	Con		SZ		p value <sup>§</sup>	FDR q value
	Mean	SD	Mean	SD		
<i>KLF6</i>	0.949	0.283	0.841	0.246	0.0079**	0.0167†
<i>GTF2IRD1</i>	0.984	0.229	0.972	0.187	0.9673	0.6250
<i>TFAP2A</i>	0.994	0.265	0.908	0.245	0.0353*	0.0423†
<i>CHURC1</i>	0.952	0.160	0.940	0.140	0.6190	0.4773
<i>KLF4</i>	0.964	0.520	0.714	0.420	0.0004****	0.0010††
<i>ING4</i>	0.956	0.214	0.946	0.218	0.7131	0.4992
<i>MZF1</i>	1.025	0.253	0.868	0.263	0.0003****	0.0010††
<i>AHR</i>	0.972	0.251	0.915	0.240	0.1383	0.1291
<i>NFATC2</i>	0.946	0.318	0.836	0.359	0.0101†	0.0170†
<i>ZBTB14</i>	0.992	0.144	1.044	0.173	0.0347*	0.0423†
<i>ZNF333</i>	1.047	0.223	1.030	0.237	0.6251	0.4773
<i>IKZF1</i>	1.064	0.443	0.748	0.417	<0.0001****	<0.0001††††
<i>MYOG</i>	0.797	0.382	0.711	0.413	0.0510	0.0536

Values were normalized to *GAPDH*.

†:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , ††:  $q < 0.05$ , †††:  $q < 0.001$ , ††††:  $q < 0.0001$ , \* CRX was not detected.

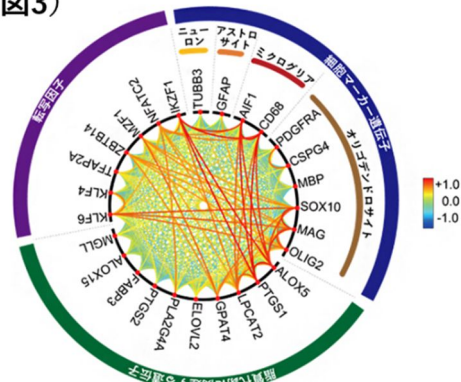
(図 2)

Gene	Con		SZ		p value <sup>§</sup>	FDR q value
	Mean	SD	Mean	SD		
<i>AIF1</i>	1.076	0.514	0.659	0.434	<0.0001****	<0.0001††††
<i>CD68</i>	1.135	0.509	0.736	0.443	<0.0001****	<0.0001††††
<i>TUBB3</i>	0.806	0.375	0.710	0.296	0.1127	0.3157
<i>GFAP</i>	0.908	0.311	0.880	0.331	0.6037	0.5634
<i>PDGFRA</i>	0.932	0.298	0.875	0.324	0.2796	0.5634
<i>CSPG4</i>	1.081	0.321	1.141	0.399	0.4418	0.5634
<i>SOX10</i>	0.954	0.253	0.926	0.233	0.4554	0.5634
<i>OLIG2</i>	1.042	0.288	1.010	0.266	0.5997	0.5634
<i>MBP</i>	1.270	0.671	1.360	0.724	0.5712	0.5634
<i>MAG</i>	1.019	0.271	1.018	0.279	0.8782	0.7377

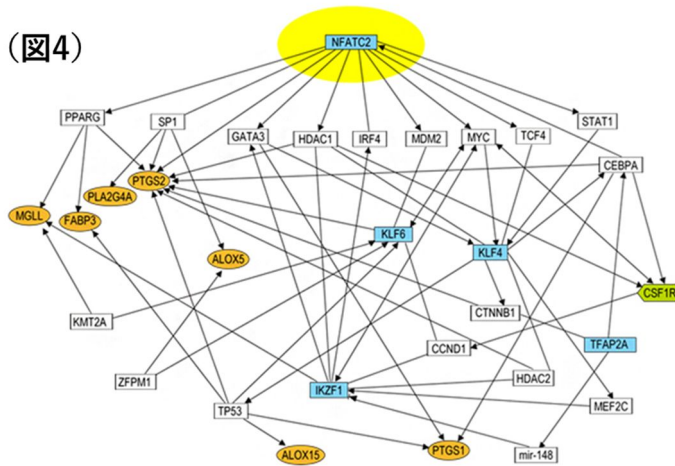
Values were normalized to *GAPDH*. \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ , ††††:  $q < 0.0001$ ,

§: Mann Whitney U test

(図 3)



(図 4)



）Nfatc2の低下/欠損がミクログリアの分布や密度の影響をあたえる可能性を考えた。そこで、Nfatc2 WT/Het/KO マウスの脳切片を用いてミクログリアマーカー（Iba1）の発現を調べたが、WTとHET/KOに大きな差はみられなかった。

Visium 空間的遺伝子発現解析：脳組織切片全体の遺伝子発現をプロファイリングするため、Visium 空間的遺伝子発現解析（組織切片から細胞の位置情報を保持したまま遺伝子発現解析を行う方法）を実施し、切片上の各遺伝子の発現を可視化した。今後、得られたデータをもとにバイオインフォマティクス解析を行い、Nfatc2 の欠損が脳の各領域の遺伝子発現へ与える影響を、包括的に理解することを目指していく。

(4) 成果発表：(1)～(3)の結果から、NFATC2を起点とした遺伝子ネットワークとミクログリアの異常が関連した脂質組成変化が、統合失調症病態形成に関与する可能性が高まった。今後更なる検証が必要であるが、本研究成果は一部の統合失調症患者で観察される白質病変の原因となるメカニズムの理解に役立つと期待される。本研究成果は、国内外の学会で発表し、(1)-(2)の成果については、Cerebral CORTEX 誌へ発表(引用)、プレスリリースを行った。

#### <引用文献>

Arnone D, McIntosh A, Tan G, Ebmeier K., ‘Meta-analysis of magnetic resonance imaging studies of the corpus callosum in schizophrenia.’, Schizophr Res., 101:124-132., 2008

Glen AI, Glen EM, Horrobin DF, Vaddadi KS, Spellman M, Morse-Fisher N, Ellis K, Skinner FS. ‘A red cell membrane abnormality in a subgroup of schizophrenic patients: evidence for two diseases.’, Schizophr Res., 12:53-61, 1994

McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Hahn CG, Richtand NM, Stanford KE., ‘Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem orbitofrontal cortex of schizophrenic patients: gender differences and partial normalization with antipsychotic medications.’, Schizophr Res., 91:37-50, 2007

Nagamoto-Combs K, Combs CK., ‘Microglial phenotype is regulated by activity of the transcription factor, NFAT (nuclear factor of activated T cells).’, J Neurosci., 30:9641-9646, 2010

Manocha GD, Ghatak A, Puig KL, Kraner SD, Norris CM, Combs CK., ‘NFATc2 modulates microglial activation in the A PP/PS1 mouse model of Alzheimer’s disease.’, J Alzheimers Dis., 58:775-787, 2017

Weider M, Starost LJ, Groll K, Kuspert M, Sock E, Wedel M, Fröb F, Schmitt C, Baroti T, Hartwig AC., ‘Nfat/calcineurin signaling promotes oligodendrocyte differentiation and myelination by transcription factor network tuning.’, Nat Commun., 9:899, 2018

Shimamoto-Mitsuyama C, Nakaya A, Esaki K, Balan S, Iwayama Y, Ohnishi T, Maekawa M, Toyota T, Dean B, Yoshikawa T, ‘Lipid pathology of the corpus callosum in schizophrenia and the potential role of abnormal gene regulatory networks with reduced microglial marker expression’, Cerebral Cortex, 31(1), 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimamoto-Mitsuyama Chie, Nakaya Akihiro, Esaki Kayoko, Balan Shabeesh, Iwayama Yoshimi, Ohnishi Tetsuo, Maekawa Motoko, Toyota Tomoko, Dean Brian, Yoshikawa Takeo	4. 巻 31
2. 論文標題 Lipid Pathology of the Corpus Callosum in Schizophrenia and the Potential Role of Abnormal Gene Regulatory Networks with Reduced Microglial Marker Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 448 ~ 462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhaa236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 島本知英、中谷明弘、江崎加代子、 Shabeesh Balan、岩山佳美、大西哲生、前川素子、豊田倫子、大羽尚子、久野泰子、Brian Dean、吉川武男、上口裕之
2. 発表標題 統合失調症患者の白質における脂質代謝異常
3. 学会等名 第16回日本統合失調症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chie Shimamoto-Mitsuyama, Kayoko Esaki, Tetsuo Ohnishi, Motoko Maekawa, Yoshimi Iwayama, Shabeesh Balan, Brian Dean and Takeo Yoshikawa
2. 発表標題 Dysregulated lipid metabolism in the corpus callosum from patients with schizophrenia
3. 学会等名 CINP 2021 Virtual World Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島本知英、Shabeesh Balan、岩山佳美、江崎加代子、大西哲生、前川素子、Brian Dean、吉川武男
2. 発表標題 脳梁における脂質代謝異常と統合失調症
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会年会・第42回日本生物学的精神医学会年会・第4回日本精神薬学会総会（NPBPPP2020合同年会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chie Shimamoto-Mitsuyama, Kayoko Esaki, Tetsuo Ohnishi, Motoko Maekawa, Yoshimi Iwayama, Shabeesh Balan, Brian Dean and Takeo Yoshikawa
2. 発表標題 Altered lipid metabolism of the corpus callosum of patients with schizophrenia
3. 学会等名 6th Congress of AsCNP (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島本知英、大西哲生、吉川武男、上口裕之
2. 発表標題 統合失調症関連遺伝子Nfatc2ノックアウトマウスを用いた包括的行動解析 (Comprehensive behavioral analysis of a schizophrenia-relevant gene, Nfatc2 -deficient mice)
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 日本生物物理学会 共催
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

統合失調症患者の白質における脂質代謝の乱れ - 統合失調症の病因解明に新たな光 -  
[https://www.riken.jp/press/2020/20200914\\_1/index.html](https://www.riken.jp/press/2020/20200914_1/index.html)

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	The Florey Institute			