

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17124

研究課題名（和文）関連候補遺伝子WDR3に着目した統合失調症の女性に特異的な分子病態の解明

研究課題名（英文）Elucidating the role of WDR3 in molecular pathogenesis of female schizophrenia

研究代表者

小林 桃子（Kobayashi, Momoko）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・リサーチフェロー

研究者番号：30837274

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）：WD repeat domain 3 (WDR3) 遺伝子は、申請者らの分子遺伝学的研究において、女性の統合失調症との関連が認められた新規の統合失調症関連遺伝子である。しかし、性差を含む統合失調症メカニズムとの関連性だけでなく、中枢神経系における役割自体も不明であった。そこで本研究では、マウス脳におけるWDR3発現とWDR3ノックアウトによる中枢神経系への影響を検討した。その結果、WDR3は海馬をはじめ脳に広く発現していることが確認され、WDR3ヘテロノックアウトマウスの海馬においてNMDA受容体NR2AおよびNR2Bサブユニットの発現量が減少してい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

統合失調症における認知機能障害は、幻覚や妄想などの陽性症状、感情鈍麻や意欲減退などの陰性症状に並び、疾患の主要な症状の一つであり、統合失調症患者の健康的な生活を脅かす大きな原因となっている。また、精神病症状の出現に先立って認められるといった報告や、統合失調症患者の第一度親族では、発症をしていなくても認知機能障害が認められる傾向にあるなど、遺伝的な中間表現型のひとつであると考えられている。本研究では、WDR3が海馬依存的な認知機能へ影響している可能性が示唆された。これらの結果は、認知機能障害を念頭に置いた統合失調症研究を進める上で重要な手がかりになるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported that the WD repeat domain 3 (WDR3) gene showed the genetic association with female schizophrenics. However, the role of WDR3 is still unclear not only in the molecular pathogenesis of schizophrenia but also in the physiological functions in the brain. In this study, we examined the expression of WDR3 in the mouse brain and the effects of WDR3 knockout on the central nervous system. As a result, the WDR3 was widely expressed in the brain including the hippocampus. Interestingly, mRNA expression of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors were significantly decreased in the hippocampus of WDR3 hetero knockout mice compared with wild-type mice. These results may suggest that WDR3 presumably associate with the hippocampus dependent cognitive function.

研究分野：ライフサイエンス / 基盤脳科学 /

キーワード：統合失調症 海馬 認知機能 疾患感受性 WD repeat domain 3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は約 0.8% の高頻度で発症する重篤な精神疾患であり、一般に思春期以降に発症する。申請者らは、統合失調症のグルタミン酸仮説およびドーパミン仮説に着目し、統合失調症で障害されると推測される分子の探索を行ったところ、NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬である phencyclidine およびドーパミン作動薬である methamphetamine の双方に応答を示して、ラット脳内で発現量の上昇が認められた WDR3 遺伝子を見出した。この遺伝子について、統合失調症との関連解析を行った結果、申請者らは WDR3 遺伝子と女性の統合失調症との関連を報告した (Kobayashi, 2018)。関連が認められた SNP は、クロマチン構造の制御にかかわる領域に座位しており、アレルの違いにより WDR3 の発現量に影響をおよぼす可能性がある。しかし、既存の統合失調症死後脳データベースでは、疾患における発現量の変化は明らかとなっていない。加えて、WDR3 は、18S rRNA のプロセッシングに関与しているため 40S サブユニットの合成に必須であり (Dragon, 2002; McMahon, 2010)、脳を含む幅広い組織で発現しているが、中枢神経系における機能は不明である。

統合失調症の性差については、男性は女性より早期発症であるのに対し、女性は発症年齢に二峰性のピークを示す特徴がある (Hambrecht, 1992)。症状および経過についても、男性は陰性症状や認知機能障害が目立つ傾向があり重症の経過をとるのに対し、女性では情動性症状が出現しやすい他、抗精神病薬への反応性がよく、予後がよいなどの臨床所見の違いが報告されている。性差による症状の出現メカニズムは明らかになっていないが、エストロゲンが統合失調症の病理過程に関与する可能性が示唆されている (Grigoriadis, 2002)。

申請者らの WDR3 と統合失調症との遺伝子関連解析では、エストロゲンの分泌が多い年代と一致する 26 ~ 35 歳の発症年齢群において、 $P < 0.05$ の水準で関連の傾向を示す SNPs が複数認められた。さらに、WDR3 は 18S rRNA のプロセッシングに関与しているが、ラットの脳における rRNA レベルがエストロゲンにより増加すると報告 (Jones, 1986) があることから、WDR3 はエストロゲンにより制御を受けている可能性が考えられる。WDR3 の中枢神経系における機能および性別因子が発現に与える影響も明らかでないことから、中枢神経系での役割、発現動態 (特に性差に関して)、およびその異常による神経機能破綻を明らかにすることは、女性の統合失調症病態を理解するために非常に重要である。

2. 研究の目的

WDR3 は、ラットにおいて NMDA 受容体遮断薬およびドーパミン作動薬の双方に応答を示し、ヒトの遺伝子関連解析においても女性の統合失調症との関連を示した、新規の統合失調症関連遺伝子である (Kobayashi, 2018)。しかし、WDR3 遺伝子の機能は癌との関連での報告はあるが (McMahon, 2010; García-Quiques, 2012; Figlioli, 2016)、性差を含む統合失調症病態メカニズムとの関連性はもちろん、通常の中枢神経系での機能は全く不明である。そこで、本研究では、WDR3 の中枢神経系での発現と機能を明らかにするとともに統合失調症の女性に特異的な分子病態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) WDR3 ノックアウトマウスの個体化および繁殖

KOMP より C57BL/6N バックグラウンドの WDR3 ヘテロノックアウト (WDR3-HKO) マウスの凍結精子を入手し (targeting project number: CSD23237, <https://www.komp.org>)、当研究所動物施設において個体化を行った。WDR3-HKO マウス同士で交配を行い得られた仔マウスの遺伝子型を確認し、各遺伝型の出生率を算出した。系統維持においては、ホモノックアウトマウスは生まれられないため、雄性の WDR3-HKO マウスと雌性の C57BL/6N マウスを用いた。

(2) 組織解析

マウス WDR3 に特異的な抗体が市販されていないため、新たに抗マウス WDR3 抗体を作製して、免疫吸収試験を行い、ウエスタンブロットおよび免疫組織化学染色にて特異性の評価を行った。組織解析には、10 週齢の雄性 WDR3-HKO および野生型 (WT) マウスの凍結切片を用いた。WDR3 の発現分布は、免疫組織化学染色による方法と ガラクトシダーゼをレポーターとして有する WDR3-HKO マウスの組織を用いた X-gal 染色にて評価した。

(3) 発達期別・性別の WDR3 mRNA 発現量の評価

雌雄の C57BL/6N マウスを用いて、発達期別 (neonate: 7 日齢、juvenile: 5 週齢、adult: 10 週齢)・性別に、海馬に着目した WDR3 遺伝子発現定量解析を行った。

(4) 統合失調症関連遺伝子のリアルタイム PCR

10 週齢の雄性 WDR3-HKO および WT マウスの海馬サンプルを用いて、統合失調症で発現変化が報告されている分子 (NR1, NR2A, NR2B, Parvalbumin, GAD67, Reelin, CNPase, MBP, Calretinin, Calbindin) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて定量解析を行い、WDR3 ノックアウトによる影響を検討した。

4 . 研究成果

(1) WDR3 ノックアウトマウスの個体化および繁殖

WDR3-HKO マウス同士で交配を行い得られた仔マウスの出生率は、メンデルの法則に従っておらず、ホモノックアウトマウスは出生しなかった。妊娠 12~16 日の妊娠マウスの胎仔を調べたが、ホモノックアウトの個体は認められなかったことから、発生の初期段階に原因があるものと考えられる。雄性 WDR3-HKO および WT マウスでは、発達期における体重増加に差は認められなかった。

(2) 組織解析

WDR3 は 106-kDa の核タンパク質であることが推定されているが、ウエスタンブロットにおいて、標的サイズのバンドは核画分のみが存在し、細胞質には認められないことが確認された。免疫吸収試験において、このバンドは抗体と WDR3 の組み換えタンパク質抗原を反応させた抗体液で消失した。同様に免疫組織化学染色でも反応が消失したことから、新たに作製した抗マウス WDR3 抗体は、WDR3 を特異的に検出していると考えられた。この抗体を用いた免疫組織化学染色では、WDR3 は海馬をはじめ脳に広く発現していることが確認された。さらに WDR3-HKO マウスの脳を用いて X-gal 染色にて発現分布を調べたところ、特に海馬 CA1 で高いガラクトシダーゼ活性が認められた。Nissl 染色においては、ヘテロ欠損による大脳皮質および海馬の層構造の乱れは認められなかった。

(3) 発達期別・性別の WDR3 mRNA 発現量の評価

海馬に着目をして、発達期別・性別に WDR3 遺伝子発現定量解析を行ったところ、雄では発達に伴い、有意に発現量が減少しているのに対し、雌では有意な減少は認められなかった。雌雄間の比較では、5 週齢および 10 週齢で雄における発現量が有意に低いことが示された。

(4) 統合失調症関連遺伝子のリアルタイム PCR

統合失調症の海馬で発現変化が報告されている分子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法を用いて解析を行った結果、WDR3-HKO マウスの海馬において NMDA 受容体 NR2A および NR2B サブユニットの発現量が減少していることが明らかとなった。これらの結果から、WDR3 が海馬依存的な認知機能に参与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林桃子, 古家宏樹, 三輪秀樹, 山田美佐, 山田光彦
2. 発表標題 WD repeat domain 3 遺伝子ヘテロ欠損マウス海馬におけるNMDA受容体 (NR2A, NR2B) の発現低下
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------