

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790840

研究課題名（和文）

統合失調症疾患候補遺伝子 DISC-1 はカリリンを制御しシナプスを維持する。

研究課題名（英文） Disrupted in Schizophrenia-1 (Disc-1), a candidate gene of schizophrenia regulates kalirin and maintains synapse.

研究代表者

高木 学 (TAKAKI MANABU)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：60452570

研究成果の概要（和文）：神経発達を観察すると、DISC-1 と同様に DISC-1 結合蛋白であるダイニン、BBS4 は中心体からスパインに移行するのに対し、 $\alpha$ -チューブリン、PCM-1 はスパインに移行しなかった。統合失調症疾患候補遺伝子 DISC-1 はカリリン、Rac1 との結合に関与し、カリリン機能を制御しシナプス維持に関与した。難治の統合失調症に効果があり NMDA 受容体機能に影響を及ぼすクロザピンが後シナプスのマーカー PSD95 を増やすことを発見した。

研究成果の概要（英文）：Disrupted in Schizophrenia-1 (Disc-1) is a candidate gene of schizophrenia. Following to the development, Disc-1, dynein and BBS4, the binding protein of Disc-1 moved from centrosome to spine. On the other hand,  $\alpha$ -tubulin and PCM-1 did not. Disc-1 regulates kalirin and maintains spine. Disc-1 inhibited the binding of Kalirin-7 and Rac1. Clozapine, one of the atypical psychotics, which is effective to intractable schizophrenia and related to NMDA receptor function, increased PSD95, a post synaptic marker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症、DISC-1、カリリン、シナプス、セントロソーム、PCM-1、BBS4

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 統合失調症は、1%の有病率をもち、様々な遺伝的検討により、発症への遺伝的要因の関与が確実であり、根治が困難な慢性疾

患であるため、病因や病態の解明が急務となっている。統合失調症患者では、神経病理学的研究により、海馬、大脳皮質錐体細胞の体積の減少が指摘され、画像研究により、側脳

室の拡大が指摘されており、中枢神経の器質的な変化が存在することが報告されている。この変化は、グリオシスを伴わないで起こるという報告が多く、統合失調症患者の中枢神経系の異常は、発症以前しかも胎生期の神経発達障害にあるという仮説があり、神経発達障害仮説と呼ばれている。神経の形態変化には、シナプス、神経突起、樹状突起の構造変化が関与していると考えられる。この神経発達障害がそれだけで統合失調症の病因となるわけではなく、発症への脆弱性として強く働くと考えられている。

(2) 統合失調症の疾患候補遺伝子の一つとして Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC-1) がある。相関研究において複数のグループが独立した人種について有意な結果を得ており、連鎖解析でも DISC-1 遺伝子内のマーカーが最大のロッドスコアを示した。DISC-1 の Yeast two hybrid 法による結合蛋白から推測して、核における転写因子、神経遊走、神経突起伸長、シナプス形成に関与し、重要な構成因子である微小管、アクチン系両者に関与していることが予想される。DISC-1 遺伝子では、染色体(1;11) (q42.1;q14.3) の転座が発見され、DISC-1 の翻訳タンパク質は、この転座によって全 854 アミノ酸のうち C 末端側の 257 アミノ酸を失う。C 末端側のアミノ酸を欠失した DISC-1 が、神経細胞の移動や神経突起の伸張に関連している NUDEL、Lis1 と結合出来なくなることで、微小管の機能を障害し、神経突起伸張、神経遊走が障害される (Kamiya A et. al. Nat Cell Biol. 2005)。

(3) 更に、統合失調症の死後脳研究で、シナプスの数が減っていることが報告されている (Glantz LA et. al. Arch. Gen. Psy. 2000, Black JE et. al. Am. J. Psy. 2004)。

また、統合失調症は発症が早くとも思春期以降であり、発達におけるシナプスの刈り込みが発症と関係が推測されている (Mirnics K et. al. Trends Neurosci. 2001)。実際、電顕を用いて DISC-1 はシナプスの PSD (Post synaptic density) に局在することが分かった (Kirkpatrick B et. al. J. Comp. Neurol. 2006)。

## 2. 研究の目的

(1) DISC-1 の後シナプス形成における具体的な機能の検討：シナプスの形成維持に small Rho GTPases が関わる。カリリンは Rac1 を制御し、アクチンの再構築に影響することでシナプス形成に関与する (Penzes P et. al. Neuron 2003)。シトロンは RhoA を抑制し、NMDA 受容体の NR2B サブユニットに結合、集積に関与し、後シナプスの形態変化に関与すること。既に、DISC-1 とカリリン、シトロンが結合することは分かっている。そこでカリリンと DISC-1 の機能解析を行う。

(2) DISC-1 は細胞の核、中心体、樹状突起、シナプスと神経発達時期に応じて分布することが推測される。統合失調症の疾患候補遺伝子である Pericentriole material1 (PCM1) や精神症状を伴うバーデー・ビードル症候群の疾患遺伝子である BBS4 も DISC-1 結合蛋白である。そこで、DISC-1 とカリリンのシナプスでの機能解析を中心として、DISC-1 や他の DISC-1 結合蛋白の神経発達の段階における分布、機能解析を検討する。

(3) 臨床的に NMDA 受容体機能を促進することにより統合失調症の陰性症状（意欲低下、感情鈍麻など）を改善させることが期待されており、D-セリンなどの薬剤が現在日本にて治験中である。また、難治の統合失調症に効果があると言われているクロザピンは、ハロ

ペリドールを代表とする従来の抗精神病薬と異なり NMDA 受容体機能に影響を及ぼす。そこで、NMDA 受容体機能が DISC-1 のカリリンの Rac 1 制御機能を通じてのシナプスの形態変化に影響が生じるかを検討し統合失調症の臨床と研究との一貫性を追求していく。

### 3. 研究の方法

#### (1) DISC-1 とカリリン 7 の結合と分布

ラット大脳皮質を用い DISC-1、カリリン結合を免疫共沈降法で確認する。DISC-1 と関連蛋白の分布をラット大脳皮質の PSD 分画解析と大脳皮質初代培養細胞を 28 日間培養し、シナプスを形成したものを用い、各抗体で蛍光抗体法により二重染色し分布を確認する。

#### (2) カリリン 7 の Rac 1 制御機能に対する DISC-1 の影響

カリリン 7 を培養細胞と大脳皮質初代培養細胞に強制発現させて見られる形態の変化が DISC-1 を強制発現、RNAi 干渉を用いて発現抑制して変化するか検討する。また、この変化が起こる機序を、免疫共沈降法を用いてカリリン 7 と Rac1 の結合への DISC-1 蛋白の影響を調べる。

(3) DISC-1 の生体内でのシナプスへの効果  
In utero 法を用いてラットの脳内に DISC-1 RNA-i を GFP と共に導入し、DISC-1 を発現抑制し、シナプスの数を調べる。

(4) 神経発達の段階における DISC-1 と結合蛋白の中心体、樹状突起、スパインへの分布の経時的変化をみるために、大脳皮質初代培養細胞を経時的に固定して観察する。

(5) NMDA 受容体機能のシナプスの形態に対する影響

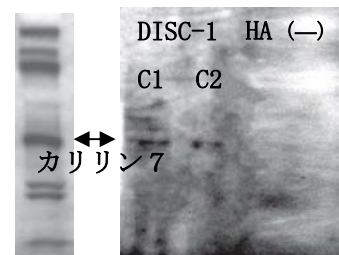
定型薬のハロペリドールと、非定型薬のクロザピンを大脳皮質ニューロンに処置することで後シナプスのマーカーである PSD95 蛋白量と蛍光抗体法で分布の変化を観察する。

### 4. 研究成果

#### (1) DISC-1 とカリリン 7 の結合と分布

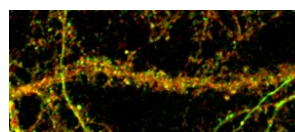
DISC-1、カリリン 7 の結合をラットの大脳皮質でも確認した (図 1)。DISC-1、カリリン結合はカリリン 7 に特異的であった。また、大脳皮質の初代培養細胞 28 日において、DISC-1 がカリリン 7、アクチン、PSD95 と、共存し、シナプトフィジンとの共存はやや少なかった (図 2)。ラットの大脳皮質の PSD 分画解析により、DISC-1 が PSD 分画に存在することを確認した (図 3)。このことから、DISC-1 は主に後シナプスに存在していることが分かった。

(図 1)

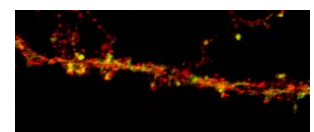


(図 2) DISC-1 (赤)

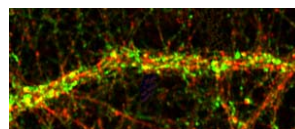
カリリン 7 (緑)



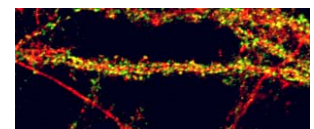
アクチン (緑)

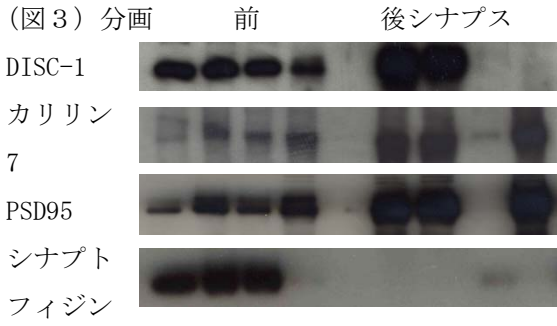


シナプトフィジン (緑)



PSD95 (緑)

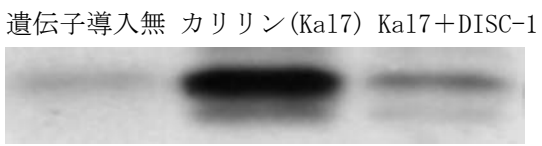
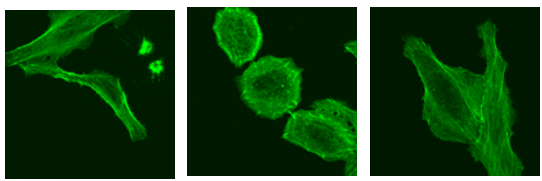




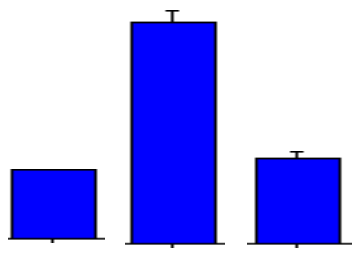
(2) カリリン7の Rac GEF 制御機能に対する DISC-1 の影響

培養細胞を用いて、DISC-1 が Kalirin-7 の Rac GEF 制御機能を抑制することを示した(図4)。

(図4) 免疫染色(上)、Rac1 活性(下2図)

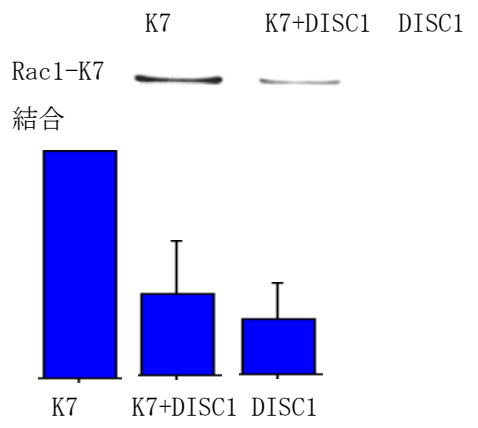


遺伝子導入無 カリリン(Kal7) Kal7+DISC-1

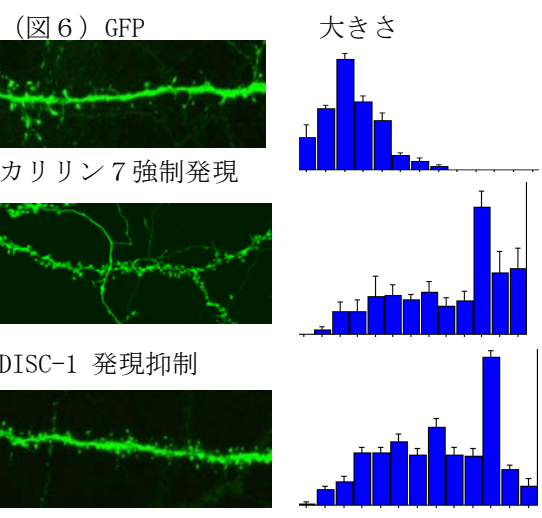


これは、DISC-1 が、Kalirin-7 と Rac1 の結合を阻害することによっておこることを示した。

(図5)

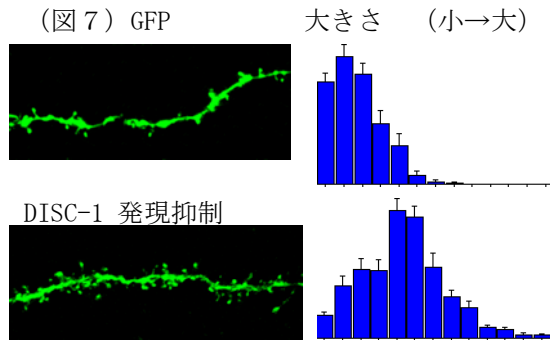


大脳皮質の初代培養細胞 28 日を用いて、DISC-1 RNA-i で DISC-1 の発現を抑制すると、カリリン7を強制発現させたものと同じ表現型(数の増加、大きさの増加)が見られた(図6)。



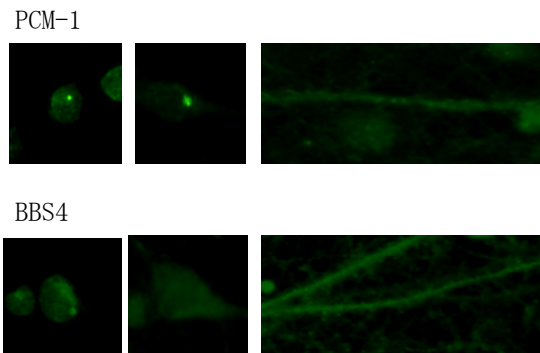
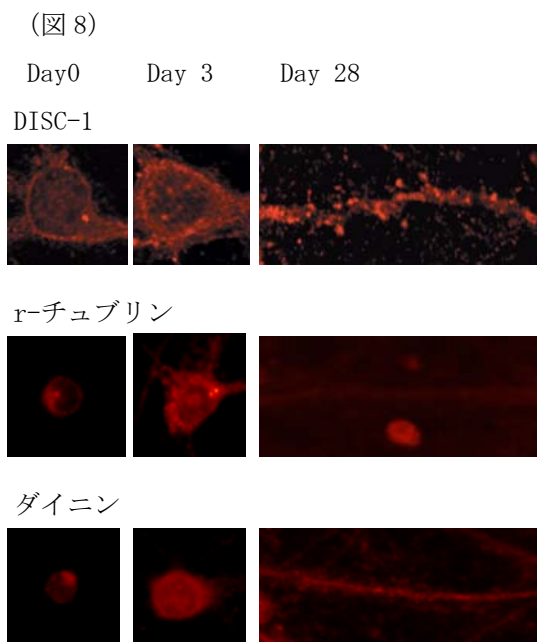
(3) DISC-1 の生体内でのシナプスへの効果

In utero 法を用いてラットの脳内に DISC-1 RNA-i を導入し、DISC-1 を発現抑制すると、生体内ではシナプスの数が減少し、統合失調症患者と同じ表現系が見られることが分かった (図 7)。



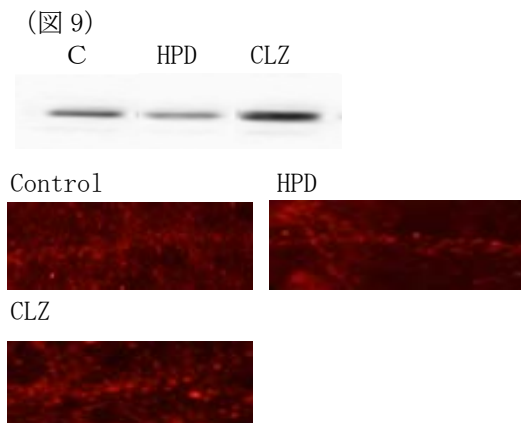
(4) 神経発達の段階における DISC-1 と結合蛋白の中心体、樹状突起、スパインへの分布の変化

大脳皮質の初代培養細胞を経時的に固定して観察したところ、DISC-1 は 7 日には中心体から消失し、モーター蛋白であるダイニンや、BBS4 と同じ動きをするのに対し、 $\alpha$ -チューブリン、PCM-1 は 7 日において中心体に存在していた。一方 28 日には DISC-1、ダイニン、BBS4 はスパインに存在するのに対し、 $\alpha$ -チューブリン、PCM-1 は存在しなかった (図 8)。



(5) NMDA 受容体機能のシナプスの形態に対する影響

定型薬のハロペリドール (HPD) 処置が後シナプスのマーカーである PSD95 を減らすのに対して、クロザピン (CLZ) は増やす (図 9) ことから、NMDA 受容体刺激がシナプスの維持に関係している可能性が示唆された。今後、DISC-1 を中心としたシナプス関連蛋白との関係を検討していく予定である。



## 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)  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高木 学 (TAKAKI MANABU)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：60452570