

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390332

研究課題名（和文） 統合失調症の病態生理におけるカンナビノイドの重要性についての研究

研究課題名（英文） Molecular mechanism of altered cannabinoid signaling in the pathophysiology of schizophrenia

研究代表者

橋本 隆紀（HASHIMOTO TAKANORI）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：40249959

研究成果の概要（和文）：思春期に内在性カンナビノイド受容体アゴニストを慢性投与したマウスの大脳皮質では統合失調症に特徴的な GABA 伝達関連遺伝子の発現変化は認められなかった。一方、大脳皮質パルブアルブミン陽性介在ニューロンに特異的なカリウムチャンネルサブユニット遺伝子 KCNS3 の発現は、若年期にマリワナの主成分 tetrahydrocannabinol の慢性投与を受けたサル及び統合失調症患者の大脳皮質において有意に低下していた。

研究成果の概要（英文）：In the neocortex of juvenile mice that received chronic injections of an endocannabinoid receptor agonist, we failed to replicate expression changes of certain GABA-related genes that were observed in schizophrenia. However, juvenile monkeys chronically exposed to tetrahydrocannabinol, the main psychoactive constituent of marijuana, expression levels of KCNS3, which encodes PV neuron-specific potassium channel subunit Kv9.3, were significantly decreased in the prefrontal cortex (PFC). KCNS3 mRNA levels were also decreased in the PFC of subjects with schizophrenia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：精神医学

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：精神薬理学，マリファナ，死後脳

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症では、作業記憶や実行機能などの大脳皮質の前頭前野に依存する認知機能の障害が、多くの患者に共通して持続的に存在する。この認知機能障害に対しては、有効な治療法が未確立であり、その程度が予後の最大の決定因子とされ、病態生理および原因メカニズムの解明が、新規治療法の開発のために強く望まれている。

我々は、本研究の開始に先立ち、統合失調症の認知機能障害に寄与する病態生理として、前頭前野におけるガンマアミノ酪酸（GABA）を介した抑制性神経伝達（GABA 伝達）の変化を報告してきた。特に、GABA を神経伝達物質とする介在ニューロンのなかでもカルシウム結合蛋白質パルブアルブミン（PV）を発現するものにおいては、GABA 合成酵素 GAD67、GABA トランスポーター GAT1 の発現

が低下し、そのシナプスでは各種 GABA-A 受容体サブユニットの発現変化が認められた。PV 陽性介在ニューロン (PV ニューロン) は錐体ニューロンの細胞体に抑制性シナプスを形成し、その発火のタイミングを支配することで皮質情報処理に重要な役割を持つ。すなわち、上記の所見により示される PV ニューロンの変化が認知機能障害に関与することが考えられた。

一方、研究開始時には、思春期から成人早期におけるマリファナ (カンナビノイドを主成分とする) の乱用が、統合失調症の発症リスクを増加させ、統合失調症に似た認知機能障害を引き起こすことが話題となっていた。カンナビノイドは内在性カンナビノイド受容体 CB1 に結合することで精神作用を示すが、CB1 は PV 陽性介在ニューロンと同様に錐体ニューロンの細胞体へ抑制性シナプスをつくるコレシストキニン (CCK) 陽性の介在ニューロンに発現し、CB1 の活性化は CCK ニューロンによる錐体ニューロン細胞体への GABA 神経伝達を抑制する。すなわち、マリファナの乱用は、CCK ニューロンの機能抑制を介して、同じ部位にシナプスを作る PV ニューロンの機能に影響を及ぼす可能性が想定された。そこで、思春期から成人早期におけるマリファナの乱用が、PV ニューロンに異常を引き起こすことで統合失調症の認知機能障害に結びついているという仮説を設定した。

## 2. 研究の目的

思春期及び成人早期におけるカンナビノイド受容体の過剰な刺激が、PV ニューロンに認められる GABA 伝達関連遺伝子の発現変化を引き起こす可能性を検証するために以下の研究目的を設定した。

(1) 思春期において内在性カンナビノイド受容体 CB1 の特異的アゴニストである WIN55, 212-2 の慢性投与を行い、成熟後に大脳皮質において GABA 伝達関連遺伝子の発現を DNA マイクロアレイで網羅的に解析する。

(2) 成人早期におけるマリファナの乱用を、サルにマリファナ主成分である tetrahydrocannabinol (THC) を慢性投与することで再現する。このサルの大脳皮質で、1) で発現変化の認められたものを含む GABA 関連遺伝子の発現を調べる。

(3) THC の投与を受けたサルの大脳皮質で発現変化の認められた GABA 関連遺伝子のうちで、統合失調症における発現の解析が行われていないものについて、統合失調症の前頭前野における発現変化を、死後脳バンクを用いて評価する。

(4) 遺伝的に規定されるカンナビノイド受容体の異常が統合失調症の病態生理に関与する可能性を評価するために、カンナビノイド受容体 CB1 及び CB2 をコードする遺伝子 CNR1 及び CNR2 の一塩基多型 (SNP) が、統合失調症の発症リスクに及ぼす影響の遺伝学的評価を、健常者及び患者血液サンプルを用いて行う。

## 3. 研究の方法

それぞれの研究目的ごとに以下に記す。

(1) 同腹同性の野生型マウス (C57/BL6) から成る 4 ペアを用いた。思春期に相当する時期 (生後 30-50 日) に、ペアの一方のマウスにカンナビノイド受容体アゴニスト WIN55, 212-2 (1.0mg/kg)、もう一方のマウスに生理食塩水の腹腔投与を毎日行った。このマウスが成熟した後、生後 10 週にて脳を取り出し、前頭部大脳皮質より RNA の抽出を行った。それぞれの個体からの RNA は cRNA に変換する過程で蛍光標識し、Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (Agilent Technologies 社) にハイブリダイズし洗浄後、スキャナーにより各プローブスポットのシグナルを計測し、遺伝子発現レベルを決定した。

(2) 3.3-3.7 歳のオスのアカゲザル 14 頭から年齢と体重が近いもの同士の 7 ペアを作った。それぞれペアのうち一方のサルにマリファナの主成分である THC、そしてもう一方のサルにはプラセボを投与した。投与は静脈内留置カテーテルを通して、1 日 1 回で週に 5 日間の頻度で行った。THC の投与量は 3 ペアでは 120  $\mu$ g/kg/日で残りの 4 ペアでは 240  $\mu$ g/kg/日とした。投与はおおよそ 1 年間 (52 週間) 続け、30 日の休薬期間の後で安楽死させ脳組織を摘出した。摘出した脳組織から前頭葉皮質を含む切片を作成した。

THC の慢性投与による PV ニューロン機能への影響を調べるために、PV ニューロンに特異的に発現するカリウムチャンネルサブユニット Kv9.3 をコードする KCNS3 遺伝子の発現を、in situ hybridization (ISH) 法で解析した。このために、放射性同位元素  $^{35}$ S でラベルされたヒト KCNS3 の mRNA 配列に相補的なプローブ RNA を合成し、これを脳組織にハイブリダイズさせた。組織に発現する KCNS3 mRNA に特異的にハイブリダイズしたプローブ RNA の放射活性は、放射線感受性フィルムで検出し、その強度を density として、画像処理装置 Microcomputer Imaging Device (MCID) を用いて計測した。

(3) PV ニューロン特異的カリウムチャンネルサブユニット KCNS3 mRNA の統合失調症の前

頭前野における発現変化を調べるため、ヒト死後脳を用いて ISH 法を行った。死後脳組織は、統合失調症患者と健常者から成るペア 22 組 (表) から、遺族から文書による承諾を得て得た。それぞれのペアの患者と健常者は

診断	健常	統合失調症
数	22	22
性	男 17, 女 5	男 17, 女 5
年齢	48.1 (15.3)	47.9 (14.5)
死後経過時間	18 (5.4)	18 (9.0)
脳内 pH	6.8 (0.3)	6.8 (0.3)
RIN*	8.6 (0.4)	8.4 (0.7)

表：死後脳組織

平均 (標準偏差), \*RIN: RNA integrity number

性別が同じで、年齢、死後経過時間、脳内の RNA の状態を反映する指標 (RIN) がほぼ等しい (表)。前頭葉の凍結脳ブロックから、前頭前野 (9 野) の切片を作成した。

組織における KCNS3 mRNA の検出・定量には、放射性同位元素 <sup>35</sup>S でラベルされたアンチセンス RNA プロブを用いた。各症例について 3 枚の前頭前野切片を使用した。前頭前野 9 野の灰白質における mRNA の発現レベルは、フィルムの density として MCID を用いて計測した。各切片において、灰白質及び皮質各層の境界は、Nissl 染色を施した隣接切片を用いて定義した。

(4) 内在性カンナビノイド受容体遺伝子である CNR1 及び CNR2 や内在性カンナビノイドと関係の深い GABA 伝達関連遺伝子より 384 の Single Nucleotide Marker (SNP) を選択し、カスタム SNP アレイ (Illumina 社) を作成した。この SNP アレイを用い、理化学研究所分子精神科学研究チームの遺伝子バンクに蓄積された約 3,000 人の統合失調症例および対照例の遺伝子サンプルで SNP タイピングを行い、統合失調症への遺伝的脆弱性の検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究で用いた Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイは、4 万個以上のプロブによる約 3 万種類の遺伝子発現が可能であり、その中には統合失調症の大脳皮質において発現変化の認められる GABA 合成酵素 GAD67、GAT1、GABA-A 受容体サブユニットなどすべての遺伝子が含まれる。

解析の結果、GAD67 と GAT1 についてはプロブからのシグナル強度が不十分であり信頼性のある結果は得られなかった。統合失調症で発現低下の認められる GABA-A 受容体  $\alpha 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\delta$  などのサブユニットについては、測定可能なシグナルは検出されたが、

WIN55, 212-2 投与マウスでは、 $\alpha 1$  サブユニットは有意 ( $P < 0.04$ ) な増加を示し、 $\gamma 2$  及び  $\delta$  サブユニットは有意な発現変化を示さなかった。また、統合失調症では発現増加の認められた GABA-A 受容体  $\alpha 2$  サブユニットについては、有意な発現変化は認められなかった。

以上の DNA マイクロアレイによる解析により、マウスでは思春期における CB1 受容体の慢性で過剰な刺激は、統合失調症で認められる GABA 伝達関連遺伝子の発現変化には結びつかないことが示された。しかし今回用いた DNA マイクロアレイでは、マウスの大脳皮質でも豊富に発現している GAD67 や GAT1 について十分なシグナル強度が得られなかったことから、その感度が遺伝子によっては不十分であることが考えられた。また、マウスとヒトでは、大脳皮質の機能や構造の成熟過程に大きな違いがあるので、CB1 受容体の過剰刺激が発達後期の神経回路にもたらす影響も異なることが考えられた。

(2) (1) のマウスを用いた解析の結果を踏まえ、ヒトを同様に大脳皮質の生後発達が成人早期までの長い期間にかけて進むことが知られるサルにおいて、THC の慢性投与が統合失調症で変化の認められる PV ニューロン機能に及ぼす影響を調べるために、PV ニューロンに特異的に発現しその電気生理学的機能に重要な役割を持つ考えられるカリウムチャンネルサブユニット Kv9.3 をコードする KCNS3 遺伝子の発現解析を行った。KCNS3 mRNA の発現は、ISH 法により、サル前頭葉皮質の II 層から VI 層にかけて検出され、そのパターンにはコントロールと THC 投与を受けたサルの間で違いは無かった (図 1)。一方、前頭

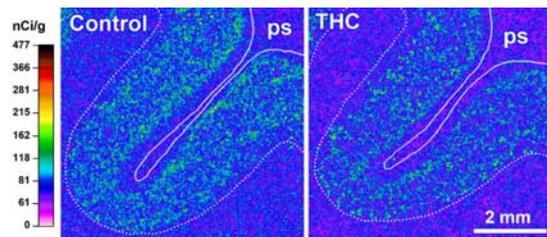


図 1：コントロール及び THC 投与サルの前頭葉における KCNS3 mRNA の発現比較 発現レベルは疑似カラー表示されている。

前野 46 野における発現レベルの定量の結果、THC 投与を受けたサルでは、KCNS3 mRNA の発現レベルが、コントロールに比べ 11% 程低下しており、こ

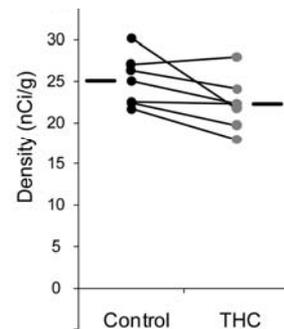


図 2：KCNS3 mRNA 発現の定量

の変化は paired-t 検定にて有意であった ( $t_6=2.52$ ,  $P<0.05$ ) (図 2)。

(3) (2)の解析で、霊長類では成人早期における CB1 受容体の活性化が、PV ニューロン特異的なカリウムチャンネルサブユニット遺伝子 KCNS3 の発現低下を引き起こすことが判明したので、統合失調症に

おける KCNS3 mRNA の発現解析を ISH 法で行った。KCNS3 mRNA の発現は、ヒト前頭前野の II 層から VI 層にかけて検出され、その発現パターンに、統合失調症患者と健常者の間で差は認められなかった (図 3)。一方、KCNS3 mRNA の発現レベルは、患者群にて健常群に比べ平均 23%の減少を認め (図 4)、この変化は分散分析にて有意 ( $F_{1,21} = 9.6$ ,  $P < 0.01$ ) であった。KCNS3 mRNA の発現は健常群にて年齢と負の相関関係を示し、統計学的に有意であった ( $r = -0.488$ ,  $P = 0.021$ )。一方、統合失調症患者に認められる様々な副次的因子 (性別、失調感情障害の診断、物質乱用や依存の合併、薬物による治療、死因としての自殺) による影響は認められなかった。

(4) (2)の結果は、成人期早期における内在性カンナビノイド受容体の過剰な刺激が、KCNS3 遺伝子の発現を低下させることで PV ニューロンの機能変化に寄与している可能性を、さらに (3)の結果は、統合失調症の患者においても KCNS3 遺伝子の発現低下が存在し、PV ニューロンの機能変化に寄与していることを示す。ところで、死後脳研究の対象となった症例の大部分にはマリファナの乱用歴

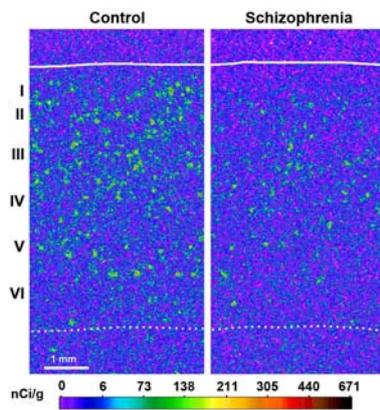


図 3: 健常者 (Control) 及び統合失調症患者 (Schizophrenia) の前頭葉における KCNS3 mRNA の発現

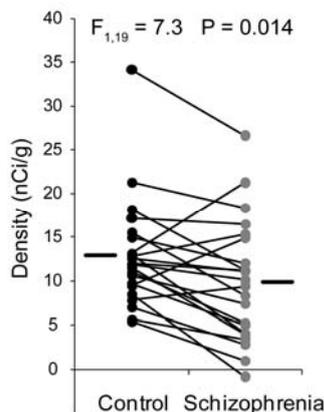


図 4: KCNS3 mRNA 発現の定量

はないので、遺伝子変異などの内因性の原因によるカンナビノイド受容体シグナルの異常が存在することが想定された。そこで、遺伝学的にカンナビノイド受容体 CB1 及び CB2 をコードする遺伝子 CNR1 及び CNR2 の SNP 解析を大規模な患者—健常者群で行った。その結果、CNR1, CNR2 の複数の SNP に統合失調症と有意な関連を認めた。

本研究では、1) 成熟期早期のマリワナ乱用の霊長類モデルの前頭前野において PV ニューロン特異的なカリウムチャンネルサブユニット遺伝子 KCNS3 の発現が低下していること、2) 統合失調症の前頭前野においても KCNS3 の発現が低下していること、3) カンナビノイド受容体遺伝子 CNR1 及び CNR2 の変異が統合失調症の発症リスクに寄与することなどを明らかにした。

これにより、統合失調症の発症には外因性 (マリファナ) あるいは内因性 (CNR1 及び CNR2 遺伝子変異) の原因によるカンナビノイド受容体シグナルの異常が関わっており、その分子メカニズムには PV ニューロンに特異的に発現するカリウムチャンネルサブユニット遺伝子 KCNS3 の発現低下が関与する可能性がある事を発表し、大きな反響を得ることができた。

KCNS3 によりコードされる Kv9.3 サブユニットは、PV ニューロンによる同期的な皮質活動、特に  $\gamma$  オシレーションの形成に役立つので、その発現低下は統合失調症において数多く報告されている  $\gamma$  オシレーション形成異常に寄与することで、認知機能の低下に結びついている可能性が考えられる。Kv9.3 サブユニットは皮質 PV ニューロンに特異的に発現しているため、PV ニューロンを標的にした選択的な治療法の開発に役立つことが期待される。

今後は、マリワナ乱用の霊長類モデルにおいて GABA 関連遺伝子の網羅的発現解析を定量的 PCR 法などで行い、統合失調症の病態生理におけるカンナビノイドシグナル変化の分子機構の全容を明らかにしたい。

## 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 12 件)

- ① Volk DW, Matsubara T, Li S, Sengupta EJ, Georgiev D, Minabe Y, Sampson A, Hashimoto T, Lewis DA. Deficit in transcriptional regulators in cortical parvalbumin neurons in schizophrenia American J Psychiatry

- in press 査読あり
- ② Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Ohnishi T, Ohba H, Maekawa M, Yoshikawa T. Association study of the KCNJ3 gene as a susceptibility candidate for schizophrenia in the Chinese population. Hum Genet 131:443-51 (2012) 査読あり
- ③ Banno M, Koide T, Aleksic B, Yamada K, Kikuchi T, Kohmura K, Adachi Y, Kawano N, Kushima I, Ikeda M, Inada T, Yoshikawa T, Iwata N, Ozaki N. A case control association study and cognitive function analysis of neuropilin and tolloid-like 1 gene and schizophrenia in the Japanese population. PLoS One. 6(12):e28929. (2011) 査読あり
- ④ Beneyto M, Abbott A, Hashimoto T, Lewis DA, Lamina-specific Alterations in Cortical GABAA Receptor Subunit Expression in Schizophrenia Cerebral Cortex 21:999-1101 (2011) 査読あり
- ⑤ Jitoku D, Hattori E, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Kikuchi M, Maekawa M, Nishikawa T, Yoshikawa T. Association study of Nogo-related genes with schizophrenia in a Japanese case-control sample. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 156B:581-92 (2011) 査読あり
- ⑥ Yamada K, Iwayama Y, Hattori E, Iwamoto K, Toyota T, Ohnishi T, Ohba H, Maekawa M, Kato T, Yoshikawa T. Genome-wide association study of schizophrenia in Japanese population. PLoS One. 6(6):e20468 (2011) 査読あり
- ⑦ Gonzalez-Burgos G, Hashimoto T, Lewis DA. Alteration of Cortical GABA Neurons and Network Oscillations in Schizophrenia. Curr Psychiatry Rep 12(4):335-344 (2010) 査読なし
- ⑧ 橋本隆紀 David A Lewis 精神疾患の死後脳研究の成果と問題 実験医学 28(14): 2197-2204 (2010) 査読なし
- ⑨ 橋本隆紀 松原拓郎 David A Lewis 統合失調症と大脳皮質 GABA 伝達 精神神経学雑誌 112:439-452 (2010) 査読あり
- ⑩ 橋本隆紀 David A Lewis 統合失調症の組織病理所見-前頭前野ニューロンの変化とその病態生理 精神医学 52: 341-350 (2010) 査読なし
- ⑪ Hashimoto T, Nugyen QL, Rotaru D, Keenan T, Arion D, Beneyto M, Gonzalez-Burgos G, Lewis DA, Protracted Postnatal Developmental Trajectories of GABAA Receptor alpha and alpha2 Subunit Expression in Primate Prefrontal Cortex Biol Psychiatry 65:1015-23 (2009) 査読あり
- ⑫ Maldonado-Avilés JG, Curley AA, Hashimoto T, Lewis DA, Altered Markers of Tonic Inhibition in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. Am J Psychiatry 166:450-459 (2009) 査読あり
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Georgiev D, Minabe Y, Lewis DA, Hashimoto T. Reduced mRNA levels for KCNS3 potassium channel  $\alpha$ -subunit in parvalbumin-containing neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. Society for Neuroscience Meeting 467.15 2011.11.14 Washington Convention Center (USA)
- ② Volk DW, Matsubara T, Hashimoto T, Sengupta EJ, Lewis DA. Deficits in transcriptional regulators of cortical interneuron subpopulations in schizophrenia Society for Neuroscience Meeting 467.16 2011.11.14 Washington Convention Center (USA)
- ③ Hashimoto T, Georgiev D, Minabe Y, Lewis DA. Decreased KCNS3 K+ Channel Alpha-subunit Gene Expression in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia 第34回日本神経科学大会 04-J-2-1 2011年9月17日 パシフィコ横浜 (横浜)
- ④ Georgiev D, Minabe Y, Lewis DA, Hashimoto T. Identification of Molecular Markers for Parvalbumin- or Somatostatin-Positive GABA Neurons in the Human Dorsolateral Prefrontal Cortex. Society for Neuroscience Meeting 362.12 2010.11.15 San Diego Convention Center (USA)
- ⑤ Georgiev D, Minabe Y, Lewis DA, Hashimoto T. New molecular markers of GABA neurons subsets in the human cerebral cortex 第37回日本脳科学会 Keynote Presentation 2010年10月17日 天津医科大学国際会議センター (中国)
- ⑥ Georgiev D, Minabe Y, Lewis DA, Hashimoto T. Identification of Molecular Markers for GABA Neuron

Subsets in the Human Cerebral Cortex  
第 33 回日本神経科学大会 02-2-1-2  
2010年9月3日 神戸コンベンションセン  
ター (神戸)

- ⑦ 橋本隆紀「死後脳からみた統合失調症の病態」第 106 回日本精神神経学会学術総会 教育講演 2010年5月24日 広島国際会議場 (広島)
- ⑧ 橋本隆紀, Nguyen Q, Rotaru D, Keenan T, Arion D, Beneyto M, Gonzalez-Burgos G, Lewis D, 霊長類前頭前野における GABA 受容体  $\alpha$  サブユニット発現の発達変化 第 32 回日本神経科学大会 02-J4-4 2009年9月17日名古屋国際会議場 (名古屋)
- ⑨ 橋本隆紀, Bazmil HH, Mirnics K, and Lewis DA 統合失調症の大脳皮質他領域における GABA 関連遺伝子の発現解析 第 36 回日本脳科学会 2009年6月12日 金沢大学医学部記念館 (金沢)
- ⑩ 橋本隆紀「統合失調症と大脳皮質 GABA 伝達障害」第 31 回日本生物学的精神医学会 シンポジウム「死後脳研究：その成果と課題」2009年4月24日 国立京都国際会館 (京都)

[図書] (計 2 件)

- ① 橋本隆紀 アメリカ・ピッツバーグ大学での死後脳研究について 光文社 光文新書：脳バンク 精神疾患の謎を解くために (加藤忠史&ブレインバンク委員会編集) 2011年 125頁-130頁
- ② 橋本隆紀 GABA ニューロンと統合失調症 中山書店 精神科リュミエール 16：脳科学エッセンシャル (神庭重信、加藤忠文 編集) 2010年 189頁-191頁

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 隆紀 (HASHIMOTO TAKANORI)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：40249959

### (2) 研究分担者

山田 和男 (YAMADA KAZUO)  
理化学研究所・分子精神科学研究チーム・副チームリーダー  
研究者番号：10322695

戸田 重誠 (TODA SHIGENOBU)  
金沢大学・附属病院・講師  
研究者番号：00323006

吉原 亨 (YOSHIHARA TORU)  
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任助教

研究者番号：00401935

西内 巧 (NISHIUCHI TAKUMI)  
金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
研究者番号：20334790

### (3) 連携研究者

ゲオルギエフ ダンコ (GEORGIEV DANKO)  
金沢大学・医学系・博士研究員  
研究者番号：90532193