

平成23年5月31日現在

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2010～2010

課題番号： 22890239

研究課題名（和文）

精神疾患病態解明を目的とした NG2 (+)細胞時期特異的障害マウスの作製

研究課題名（英文）The production of NG2 (+) cell conditional dysfunction mice for purposes of elucidation of schizophrenia.

研究代表者

豊島 学 (TOYOSHIMA MANABU)

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学研究チーム・研究員

研究者番号： 90582750

研究成果の概要（和文）：

本研究では、統合失調症の発症メカニズムやその病態に対して NG2(+)細胞がどのように関与しているかを明らかにするため、時期特異的に NG2(+)細胞を障害（細胞死）させることが可能なマウス（NG2(+)細胞時期特異的障害マウス）を作製した。この NG2(+)細胞時期特異的障害マウスに薬剤（tamoxifen）を連続投与することで、半数の NG2(+)細胞に障害を与え、細胞死させることが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

We produced the NG2 (+) cell conditional dysfunction mice for purposes of elucidation of schizophrenia. About 50 % of NG2 (+) cells were impaired by tamoxifen treatment in the NG2 (+) cell conditional dysfunction mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,230,000	369,000	1,599,000

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、NG2(+)細胞、FABP7

1. 研究開始当初の背景

(1)統合失調症感受性遺伝子としての FABP7

我々は、統合失調症のエンドフェノタイプの一つであるプレパルス抑制 (prepulse inhibition: PPI) に注目し、マウスの PPI の制御に関与する遺伝子を探索 (QTL 解析) した結果、Fabp7 (Fatty acid binding protein 7)

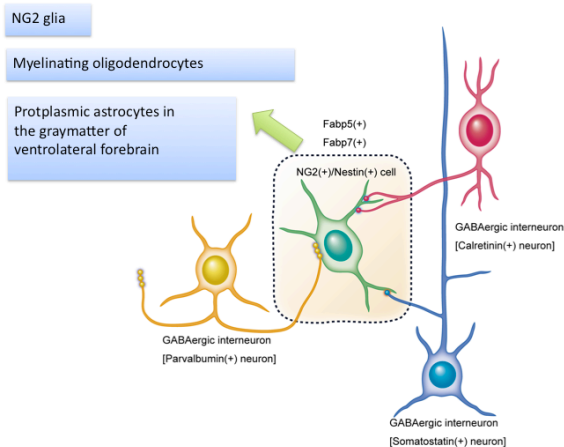
を責任遺伝子の一つとして同定した。実際 Fabp7 遺伝子欠損 (Fabp7 KO) マウスには PPI の顕著な障害が認められた。さらに、ヒトにおいても、FABP7 遺伝子が統合失調症の感受性遺伝子であることを明らかにした (Watanabe et al., PLoS Biology 2007)。

## (2) 多価不飽和脂肪と統合失調症

FABP7 (ヒトでの表記) /Fabp7 (ヒト以外での表記) 遺伝子産物は、多価不飽和脂肪酸結合タンパク質をコードする。FABP7/Fabp7 は主に発達期の脳に発現し、細胞質に存在してミトコンドリア、小胞体、核内へ脂肪酸を輸送する事により様々な生命現象に関わると考えられている。一方、ヒトの疫学データでは、飢饉の際に母親の胎内にいた子は、成長した後の統合失調症発症率が増加するという報告がある(St Clair et al., JAMA 2005)。そこで、当研究チームでは、発達期の脳内の栄養状態(特に多価不飽和脂肪酸の欠乏)が統合失調症発症メカニズムに関わる可能性を考えた。この仮説を確かめるために、発達期に多価不飽和脂肪酸欠乏食を投与したマウスを作製したところ、成長後の大脳皮質で統合失調症様の遺伝子発現変化と脳内の神経活動の変化を示す所見を得た。

## (3) NG2(+)細胞と統合失調症

マウス脳における Fabp7 の発現解析を行った結果、前頭葉において Fabp7 はその 90 %以上が NG2(+)細胞に一致して発現していることを明らかにした。NG2(+)細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞と考えられているが、第4のグリアとも呼ばれ、成体脳で分裂している細胞の中では最大の集団を構成している。この細胞は多能性を有しており、分裂して同じNG2(+)細胞を自己複製する他、オリゴデンドロサイトに分化するなどの性質を持っている(図1)。更にNG2(+)細胞はGABA入力を受けたり、GABA入力後にBDNFを分泌し、他の細胞にシグナルを伝えることが報告されている(Tanaka et al., Cereb Cortex 2009)。



精神疾患との関連としては、過去の文献から、

図1 NG2(+)細胞の性質

NG2(+)細胞は、オリゴデンドロサイト等の細胞に分化する。また、GABA含有ニューロンから投射を受けている。

統合失調症の死後脳においてオリゴデンドロサイト系およびGABA系関連遺伝子群の網羅的発現低下が報告されている(Sequeria and Turecki, OMICS 2006)。NG2(+)細胞は、(1)オリゴデンドロサイトに分化しうる細胞であること、(2)GABA入力を受けていること、という2つの事実から、NG2(+)細胞が統合失調症の病態と密接に関わる可能性を考えるに至った。なお、当研究室で作製した発達期に多価不飽和脂肪酸欠乏食投与マウス(統合失調症モデルマウス)でも、大脳皮質のNG2, オリゴデンドロサイト系, GABA系の遺伝子発現低下を確認している(投稿準備中)。また、我々は、NG2(+)細胞が統合失調症だけでなく、気分障害の病態にも関与しているデータを得ている。

## 2. 研究の目的

上述の背景から、我々は、摂取する多価不飽和脂肪酸の質や量の不足、FABP7に代表される多価不飽和脂肪酸結合タンパク質の機能異常が、NG2(+)細胞の機能に影響を与えて統合失調症の発症脆弱性形成に関わる、もしくは病態そのものに関わるのではないかと考えるに至った。そこで本研究では、この仮説を検証するためのツールとして、時期特異的にNG2(+)細胞の生存を制御できるモデル動物を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) NG2(+)細胞時期特異的障害マウスの作製

NG2(+)細胞時期特異的障害マウスはCreER-LoxPシステムを用いて作製した。具体的にはNG2プロモーター制御下でCreERを発現するtransgenic(Tg)マウス(NG2-CreER)とCAGプロモーターの下流にfloxed Neo-DTAを配置したTgマウス(CAG-floxed Neo-DTA)を交配することで作製した。NG2-CreER Tgマウスは、NG2(+)細胞特異的にCreER(Creリコンビナーゼ-エストロゲン受容体<ER>融合タンパク質)を発現する。このマウスの優れた特徴は、Creリコンビナーゼの活性を薬剤(tamoxifen)により自在に調節できることである。このトランスジェンと、CAG-floxed Neo-DTAトランスジェンを持つダブルTgマウスは、任意の時期のtamoxifen投与により、ジフテリア毒素(DTA; diphtheria toxin A)の発現が誘導され、その結果として時期特異的にNG2(+)細胞に障害を与えることが出来る。本研究で用いたNG2-CreER Tgマウスは米国Connecticut大学・西山明子教授から、CAG-floxed Neo-DTA Tgマウスは理研バイオリソースセンターから入手した。

### (2) tamoxifenの投与によるNG2(+)細胞の障害

作製したNG2(+)細胞時期特異的障害マウス(10週齢)にtamoxifenを投与し、NG2(+)細胞に障害(細胞死)が起きるのか解析した。コーン油にtamoxifenを溶かしたもの(200mg/ml)をゾンデ針を用いて、1日1回、0.2ml経口投与し、4日間連続して行った。その後、マウスの脳切片を作製

し、NG2(+)細胞のマーカーである PDGFRA と Olig2 の抗体を用いて免疫染色を行い、NG2(+)細胞数を解析した。

### (3) CNS の NG2(+)細胞時期特異的に発現する遺伝子の解析

NG2 は、中枢神経系(CNS)に存在する NG2(+)細胞で発現しているが、血管の周皮細胞(pericyte)や末梢神経系(PNS)の SGCs (satellite glial cells)や未成熟なシュワン細胞においても発現している。そのため、前述(3-1)のような手法で NG2 発現細胞を障害させた場合、CNS の NG2(+)細胞だけではなく、NG2 を発現する他の細胞へも影響が現れ、その結果、実験結果(たとえば行動実験)の解釈において、予期できない困難さに遭遇する可能性がある。この問題点を解決するため、CNS の NG2(+)細胞特異的に影響を与えることが可能なマウスを作製するための予備検討を行った。NG2-DsRed Tg マウスは、Connecticut 大学の西山教授らによって作製されたもので、NG2(+)細胞が赤色蛍光蛋白質 DsRed で標識される。この NG2DsRed マウスを用いて、NG2(+)細胞のマーカー(PDGFRA、Olig2)の抗体を用いて免疫染色を行い、NG2(+)細胞では発現し、他の細胞では発現していない遺伝子を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) tamoxifen の投与による NG2(+)細胞の障害

作製した NG2(+)細胞時期特異的障害マウスに tamoxifen を投与した後、NG2(+)細胞数を計数し、NG2(+)細胞の障害の程度を評価した。NG2(+)細胞のマーカーである PDGFRA の抗体を用いて免疫染色を行い NG2(+)細胞数を計数した結果、tamoxifen を投与しないマウスの大脳皮質では、NG2(+)細胞数は 1 mm<sup>2</sup> 当たり 96 個だったが、tamoxifen を投与したマウスでは、51 個だった。Tamoxifen の投与によって、約 50% の NG2(+)細胞を(PDGFRA 陽性)減少させることができた(図 2)。

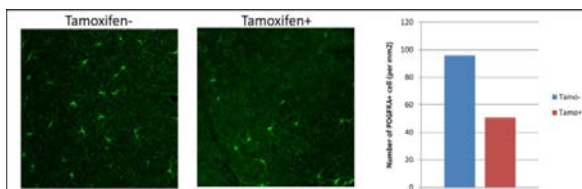


図 2 NG2(+)細胞数の解析(PDGFRA) NG2(+)細胞の障害の程度を PDGFRA の免疫染色により評価した。Tamoxifen の連続投与によって、約 50% の NG2(+)細胞が減少した。

同様に、NG2(+)細胞のマーカーである Olig2 の抗体を用いて免疫染色を行い NG2(+)細胞数を計数した結果では、NG2(+)細胞数は 1 mm<sup>2</sup> 当たり 126 個だったが、tamoxifen を投与したマウスでは、83 個だった。tamoxifen の投与によって、約 65% の NG2(+)細胞 (Olig2 陽性) を減少させることができた(図 3)。

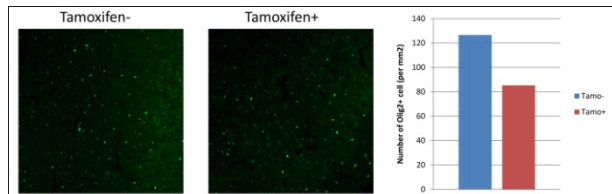


図 3 NG2(+)細胞数の解析(Olig2) NG2(+)細胞の障害の程度を Olig2 の免疫染色により評価した。Tamoxifen の連続投与によって、約 65% の NG2(+)細胞が減少した。

これらの結果から、今回作製した NG2(+)細胞時期特異的障害マウスは、tamoxifen の連続投与によって半数の NG2(+)細胞に障害を与え、細胞死させることが可能であった。今後、この NG2(+)細胞時期特異的障害マウスを用いて、NG2(+)細胞の減少がマウスに与える影響を解析することで、NG2(+)細胞が統合失調症の病因や病態にどのように関わってくるのか明らかにできると考える。

### (2) CNS の NG2(+)細胞時期特異的に発現する遺伝子の解析

NG2-DsRed Tg マウスの脳(大脳皮質)、坐骨神経、後根神経節の組織切片を作製し、NG2(+)細胞のマーカー(PDGFRA、Olig2)の抗体を用いて免疫染色を行った。大脳皮質において PDGFRA は、90% 以上の NG2(+)細胞で発現していたが、pericyte では PDGFRA の発現は見られなかった(図 4: 矢印)。Olig2 の発現が見られる NG2(+)細胞は、PDGFRA に比べて少なく 30% 程度だった。pericyte では PDGFRA と同様に Olig2 の発現は見られなかった。

坐骨神経において NG2 は未成熟なシュワン細胞で発現している。この細胞では、PDGFRA や Olig2 の発現が見られたが、その数は少なかった(図 4: 矢印)。後根神経節において NG2 は、SGCs で発現している。この SGCs では、PDGFRA の発現は見られなかった。Olig2 は後根神経節の神経細胞で発現しているが SGCs では発現は見られなかった。

これらの結果より、NG2 と PDGFRA のプロモーターを用いることで CNS の NG2(+)細胞特異的に発現制御が可能と考えられる。

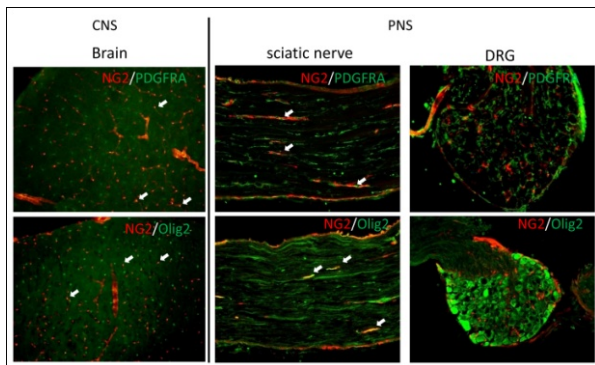


図4 NG2(+)細胞に特異的に発現する遺伝子 NG2-DsRed Tg マウスを用いて NG2(+)細胞に特異的に発現する遺伝子を調べた。PDGFRA は、多くの NG2(+)細胞に発現するが、他の NG2 発現細胞 (pericyte、SGCs) では発現が見られなかった。

#### 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 2 件)

1. 吉川 武男、豊島 学、前川 素子:NG2 陽性細胞 (ポリデンドロサイト) と精神疾患: 精神科 17:401-406, 2010.

2. Maekawa M, Iwayama Y, Watanabe A, Nozaki Y, Ohnishi T, Ohba H, Toyoshima M, Hamazaki K, Osumi N, Aruga J, Yoshikawa T. Excessive ingestion of long chain polyunsaturated fatty acids during developmental stage causes strain and sex dependent eye abnormalities in mice. Biochem Biophys Res Commun 402: 431-437, 2010.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

豊島 学 (TOYOSHIMA MANABU)

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学研究チーム・研究員

90582750