

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249060

研究課題名(和文) 不飽和脂肪酸 - オリゴデンドロサイト前駆細胞の相関による精神疾患の包括的理解

研究課題名(英文) Comprehensive understanding of pathobiology of mental illnesses by examining relationship between polyunsaturated fatty acids and oligodendrocyte precursor cells

研究代表者

吉川 武男 (YOSHIKAWA, TAKEO)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：30249958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,800,000円、(間接経費) 11,040,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の病因仮説である、「脳発達期にかけての神経発達障害が発症脆弱性を形成する」という説を、マウスを用いて脳発達期の多価不飽和脂肪酸(PUFA: polyunsaturated fatty acid)欠乏という環境要因からアプローチした。PUFA欠乏食で育てたマウスは、薬理行動上は「統合失調症の前駆状態」の表現型、遺伝子発現ではオリゴデンドロサイト関連の遺伝子群の発現レベルが低下しており、その原因として上記遺伝子をドライブする転写因子TF-AとTF-Bのプロモーター領域のDNAメチル化亢進による、転写因子発現量の低下が考えられた。

研究成果の概要(英文)：One of the cogent hypotheses of schizophrenia etiology is "neurodevelopmental abnormality theory", which proposes that subtle insults during brain developmental period underlies the susceptibility of schizophrenia. We tested this theory by raising mice with polyunsaturated fatty acid (PUFA)-deficient diet during neurodevelopmental stage (PUFA(-)-mice). The PUFA(-)-mice displayed behavioral phenotypes reminiscent of early stage of schizophrenia. Interestingly, myelin-related genes were down-regulated in the frontal cortex of PUFA(-)-mice as in the postmortem brains of schizophrenia. We revealed that the above downregulations are caused by decreased expressions of transcription factor genes, TF-A and TF-B. The promoter regions of TF-A and TF-B from the brains of PUFA(-)-mice showed elevated DNA methylation, which probably lead to the lowered expressions of TF-A and TF-B.

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 神経発達障害仮説 マウス 多価不飽和脂肪酸 オリゴデンドロサイト ミエリン 転写因子 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の有力な病因仮説として、“胎生期～生後発達期にかけての神経発達障害が統合失調症の脆弱性を形成する”という説が知られている(Weinberger et al., 1987)。一方で、妊娠中の母親が一時的に飢餓にさらされると子供の将来の統合失調症発症率が2倍に高まる(Susser et al., 1992; St Clair et al., 2005)との疫学研究から、妊娠期の栄養状態の重要性が認識されている。

(1) 精神疾患では

統合失調症や気分障害の患者の赤血球膜や死後脳で n-3 系 PUFA(多価不飽和脂肪酸)が低下している、

統合失調症前駆状態を示した若年者に n-3 系 PUFA を投与すると顕在発症を抑制できる(Amminger et al., 2010)、など PUFA との関連を示唆する知見が多々ある。

また、申請者らはこれまでに脳発達期のラットにアラキドン酸(AA)やドコサヘキサエン酸(DHA)を投与すると脳発達が促進される、統合失調症様行動異常を示すラットに AA を投与すると行動異常が部分的に改善する (Maekawa et al., 2009)ことを報告している。

(2) また、統合失調症および気分障害の死後脳を用いた遺伝子発現解析において、

オリゴデンドロサイト関連遺伝子群の網羅的発現低下が報告されている。

かつ、オリゴデンドロサイト前駆細胞 [NG2(+)]細胞と関係が深い GABA 作動性ニューロン関連遺伝子群に関しても、死後脳における発現の低下が報告されている。

(3) さらに、申請者らは統合失調症および気分障害の死後脳において FABP7(脂肪酸結合タンパク)の発現が増加するという逆説的所見を見出し、これは脳の発達期における脂肪酸代謝不全の代償的応答を表していると考察した(Watanabe et al., 2007)。

以上の知見から、申請者らは、“精神疾患の脆弱性形成(なりやすさ)に PUFA の欠乏(環境:栄養素) FABP7(関連分子) NG2(+)]細胞/オリゴデンドロサイト(関連細胞)のリンク”という新しいパラダイムを考えた。

2. 研究の目的

上記のように、申請者らはこれまでに、脳発達期の多価不飽和脂肪酸 (PUFA: polyunsaturated fatty acid)の摂取不足が精神疾患脆弱性形成の誘因となる可能性、オリゴデンドロサイト前駆細胞が精神疾患の発症に重要な役割を担う可能性を示唆するデータを、他研究室とは別の角度で得てきた。そこで本研究では、

(1) PUFA の摂取不足が動物にどのような精神疾患関連の表現型を引き起こすかの解析、(2) PUFA とオリゴデンドロサイト前駆細胞を繋ぐメカニズム解明、を主として目指し、精神疾患のこれまで見えてこなかった包括

的生物学的基盤に切り込む、ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PUFA 欠乏餌投与実験: PUFA の欠乏が動物でどのような精神疾患類似表現型に繋がるか、PPI(プレパルス抑制)が良好な C57BL/6 マウスを用いて、まず行動の面(神経薬理学的観点も含む)から検討する。その後、Mn-enhanced MRI を用いたイメージング解析、脳組織を用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。

(2) 発現レベルが変化した遺伝子群に関して bioinformatics を用いた解析を行い、パスウェイを抽出する。その中でも特にオリゴデンドロサイト系の遺伝子群、および GABA 系の遺伝子群に着目する。遺伝子カスケードを理解するアプローチとして、エピジェネティクスに注目し、DNA のメチル化を調べる。

(3) 注目の遺伝子に関して、in vitro の解析系を立ち上げ、新規向精神薬の検討を行う。

(4) ヒト遺伝学的解析: 脂肪酸の輸送や転写制御に関連する遺伝子として FABPファミリー遺伝子に着目し、統合失調症や自閉症に寄与するか、遺伝子の再シークエンスを含めて解析を行う。興味深い変異については、機能解析の対象とする。

(5) 統合的理解: (1)-(4)の結果を包括的に考察し、精神疾患の治療や予防の具体的な新しい新規な方策を考える。

4. 研究成果

(1) PUFA 欠乏餌投与実験

Protocol

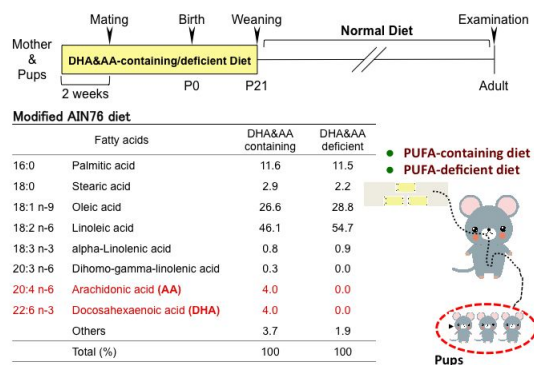


図1: PUFA 投与実験プロトコール

図1のように、PUFA 欠乏食としては、AA & DHA を抜いた食餌を用意し、対照の食餌と共に、妊娠2週間前から離乳期まで母マウスに投与し、離乳後は通常の食餌を仔マウスに投与し、生後12週前後に行動測定を行った。解析した項目は、PPI、強制水泳テスト、尾懸垂水テスト、明暗箱テスト、オープンフィールドテスト、Y迷路テスト、高架式十字路テスト、ホームケージ活動量、の合計8種類である。図2のように、3種類の行動試験で有意差が認められ、解釈としては、

解釈としては、脳発達期に PUFA が不足すると、マウスでは「意欲」の低下という表現型が生じると考えた。

Behavior analyses: lowered motivation

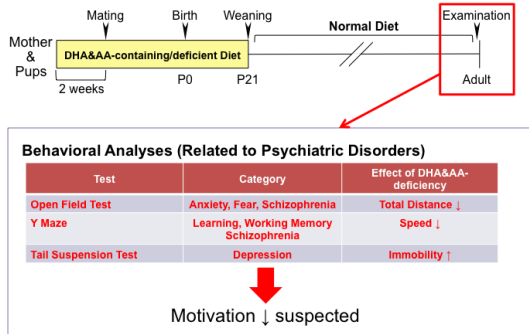


図2：オープンフィールドテスト、Y迷路テスト、尾懸垂水テストの結果

上記マウスの「意欲」低下状態が、ヒトに当てはめた場合、精神病の初期（前駆）状態 (ARMS: At Risk Mental State) かどうか調べるため、精神病状態惹起物質である MK-801 に対する反応性を調べてみた。その結果、図3のように、PUFA 欠乏食を与えたマウスは MK-801 (NMDA 受容体 antagonist) に対する感受性が亢進していた。

Behavior analyses: hallucinogenic drug sensitivity

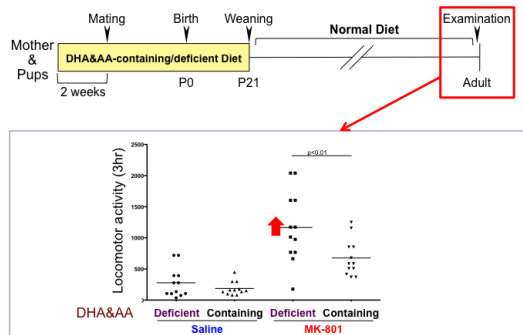


図3：MK-801 に対する感受性試験

Mn-enhanced MRI を用いたイメージング解析

金属イオン Mn は、電氣的に興奮した神経細胞において、Ca チャンネルを通して取り込まれ、一旦取り込まれると排出されず細胞内にとどまるために、活動した神経細胞をラベルできる。

統合失調症では作業記憶能力の障害がみられるが、マウスで作業記憶能力を反映すると思われる行動指標に Y 迷路テストがある。そこで、我々は食餌条件の異なるマウスにこの行動テストを施行し、Mn-enhanced MRI を撮像した。図4のように、PUFA 欠乏食餌投与マウスでは、このテストを負荷した際、内側前頭葉および側坐核からの信号強度が対照食餌群に比較して増強していた。これは、ヒト統合失調症と同様 PUFA 欠乏食餌投与マウスでは、Cortico-striato-thalamo-cortical

(CSTC) circuits の機能不全が生じており、行動を負荷すると機能不全を代償するためにかえって神経細胞の興奮が必要とされた結果であると考察できる。

Neuroimaging: Mn-enhanced MRI (Y maze)

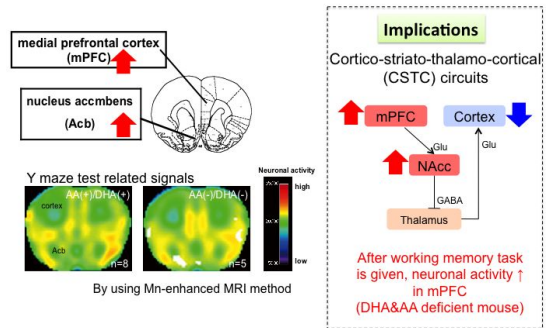


図4：Mn-enhanced MRI 計測の結果

以上の解析結果から、脳の発達期に栄養素として PUFA を欠乏させると、マウスが成体になったとき、ヒトにおける ARMS と類似の表現型が惹起される可能性が考えられた。

マウス前頭葉を用いて、microarray 解析を行った結果は、431 個の遺伝子の発現レベルが、PUFA 欠乏食によって有意に変化していた。

(2) 遺伝子発現の bioinformatics 解析

431 個の遺伝子を gene ontology で解析したところ、PUFA 欠乏食によって有意に発現量が低下した遺伝子群の中から、ミエリン (オリゴデンドロサイト) 関連の遺伝子が抽出された (図5)。

Gene ontology analysis of 431 genes

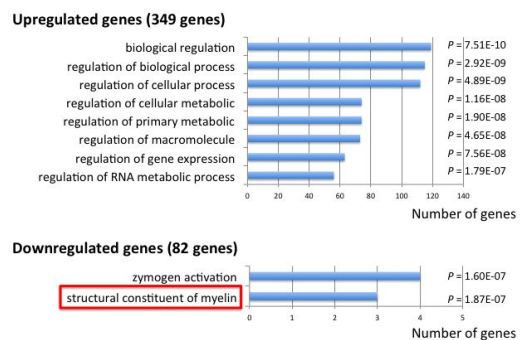


図5：Gene ontology 解析の結果

統合失調症死後脳遺伝子発現解析においても、前頭葉でオリゴデンドロサイト関連の遺伝子群の発現レベル低下が、Stanley Brain Collection database はじめその他で報告されている。

マウスモデルにおいて、具体的に発現レベルの低下(傾向)が認められたのは、図6に示した5個の遺伝子である。

Validation of Gene Expression (qRT-PCR)

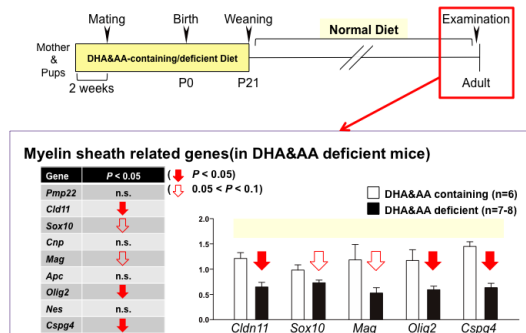


図6: PUFA 欠乏食で発現レベルの低下が検出されたオリゴデンドロサイト関連遺伝子

我々は、これらの遺伝子群の変化の上流には「マスター」遺伝子が働いている可能性を考え、IPA (Ingenuity Pathway Analysis)および TRANSFAC professional といった bioinformatics ツールを用いて、発現レベルに変化があったオリゴデンドロサイト関連遺伝子群のプロモーター領域に共通してある、転写因子のコンセンサス配列を探索した。この作業の中で候補に上がってきたのは、TF-A と TF-B という転写因子であった(図7)。

TRANSFAC Professional: MATCH

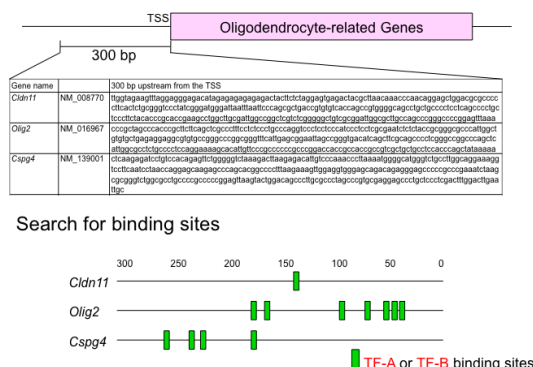


図7: 「マスター遺伝子」候補としての TF-A および TF-B 遺伝子

TF-A には TF-A-1, TF-A-2, TF-A-3 という3つのアイソフォームがあり、TF-B には TF-B-1, TF-B-2, TF-B-3 という3つのアイソフォームがあることが知られている。これらアイソフォームの発現レベルが食餌の影響をどのように受けるのか解析した。PUFA 欠乏食で発現レベルの有意な低下をきたしたのは、TF-A-1, TF-A-2, TF-B-1, TF-B-2 の4遺伝子であった。

興味深いことに、実際免疫染色で Olig2 と TF-A-1、TF-B-1 の局在を調べてみると、TF-A-1、TF-B-1 は Olig2 と共同在していた

(図8)

Co-localization

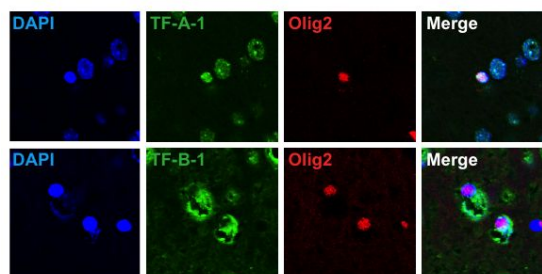


図8: Olig2 と TF-A-1、TF-B-1 の免疫組織化学的解析

以上の結果から、PUFA 欠乏食投与群では、TF-A-1、TF-B-1 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が亢進し、遺伝子発現レベルが低下する可能性が考えられた。そこで、bisulfite 法を用いて解析した。両遺伝子プロモーター領域は、PUFA 欠乏食投与群マウスで、DNA メチル化が実際亢進していた(TF-A-1については図9)。

Methylation analysis: bisulfite sequencing

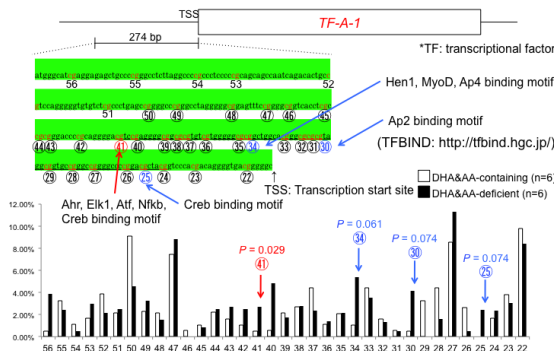


図9: TF-A-1 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化

(3) TF-A, TF-B 作動薬の効果: in vitro の解析

これまでの結果から、脳の発達期にマウスに PUFA 欠乏食を投与すると、転写因子 TF-A, TF-B のプロモーター領域の DNA メチル化が亢進し、このために両遺伝子の発現レベルの低下、オリゴデンドロサイト関連遺伝子群の発現レベルの低下、が生じるといふシナリオが考えられた。

そこで、TF-A, TF-B 作動薬が実際にオリゴデンドロサイト関連の遺伝子発現レベルを上昇させるかどうか、in vitro で調べてみた。使った細胞は、OLP6 という rat oligodendrocyte progenitor cells である。図10のように、TF-A, TF-B 作動薬は濃度依存的に Olig2, Cldn11, Mal, Mbp-long 遺伝子の発現レベルを増加させた。

In vitro study

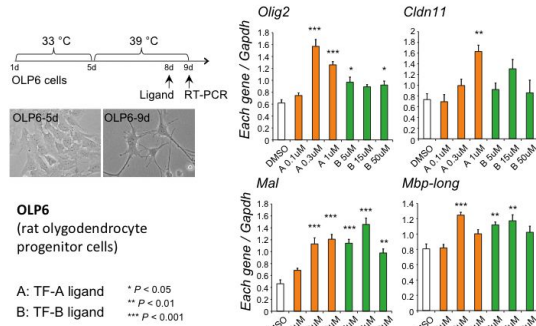


図 10 : TF-A, TF-B 作動薬の効果

(4) ヒト遺伝学的解析

近年、統合失調症と自閉症では感受性遺伝子のオーバーラップがあることが報告されており、かつ両疾患とも脂質代謝の異常が報告されていることから、遺伝学的解析対象疾患として統合失調症と自閉症を選択した。また、脂質関連分子として FABP(Fatty Acid Binding Protein: 脂肪酸結合タンパク)は、脂肪酸の運搬、核内受容体との相互作用を通して数多くの遺伝子の発現を調節している事実などにより、FABP 遺伝子ファミリーのうち、脳で発現している FABP3, 5, 7 を解析対象遺伝子とした。これらの遺伝子のタンパクコーディング領域を再シークエンシング解析したところ、稀ではあるが疾患特異的なアミノ酸変化やフレームシフト変異が見出された。

(5) 以上の結果を包括的に考察すると、図 11 のようにまとめられる。

まとめ

- ❖ 統合失調症の環境リスクファクターとして、母親の飢饉がある。
- ❖ 今回、統合失調症の発症脆弱性に関与する栄養素として、多価不飽和脂肪酸(PUFA: AA, DHA)に着目した。
- ❖ 脳発達期にPUFAを欠乏させると、行動上ARMS類似所見と考えられる表現型が観察された(表面妥当性)。
- ❖ 脳発達期のPUFA欠乏は、精神疾患発症脆弱性を形成し、発症に至る one hit になり得る可能性が考えられた。
- ❖ 遺伝子発現解析では、ミエリン関連遺伝子の発現量が低下していた(構成妥当性)。
- ❖ 上記の上流原因として、転写因子の発現低下が示唆された。
- ❖ 転写因子の発現低下は、少なくとも1つの原因としてプロモーター領域のDNAメチル化亢進が考えられた。
- ❖ 一連の現象の間には未だブラックボックスがあるが、転写因子作動薬は、精神病の顕在発症を抑制することができるかも知れない。

図 11 : 本研究のまとめ

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 13 件)

Okahara K, Kizuka Y, Kitazume S, Ota F, Nakajima K, Hirabayashi Y, Maekawa M, Yoshikawa T, Taniguchi N: Ceramide

galactosyltransferase expression is regulated positively by Nkx2.2 and negatively by OLIG2. Glycobiology, in press. 査読有り

吉川武男, 前川素子: 栄養と統合失調症 . 生体の科学, Vol. 65, No. 1, 60-64, 2014. 査読無し

Nose-Ishibashi K, Yamada K, Maekawa M, Yoshikawa T (16 人中 3, 4, 15 番目) , : Soft-diet feeding after weaning affects behavior, hippocampal neurogenesis, and BDNF gene expression in mice: potential increased vulnerability to mental disorders. Neuroscience 263: 257-268, 2014. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.12.065. 査読有り

Sharifi K, Yoshikawa T (11 人中 10 番目) : Differential expression and regulatory roles of FABP5 and FABP7 in oligodendrocyte lineage cells, Cell and Tissue Research 354: 683-695, 2013. doi: 10.1007/s00441-013-1730-7, 査読有り

前川素子, 渡辺明子, 大西哲生, 豊島学, 吉川武男: 精神疾患モデルマウスにおけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の挙動、精神薬療研究年報第 45、P59、2013、査読無し

Matsumata M, Sakayori N, Maekawa M, Owada Y, Yoshikawa T, Osumi N: The effects of Fabp7 and Fabp5 on postnatal hippocampal neurogenesis in the mouse. Stem Cells 30: 1532-1543, 2012. doi: 10.1002/stem.1124. 査読有り

前川素子, DOHaD(Developmental Origins of Health and Disease) 仮説からみた統合失調症, 日本生物学的精神医学会誌, 23:103-107、2012、査読無し

吉川武男: 特集 脂質と精神機能 はじめに . 最新精神医学, Vol. 17, No. 3, 197-199、2012、査読無し

島本知英, 吉川武男: 3 多価不飽和脂肪酸の代謝不全と統合失調症 . 精神科, 21, 4, 433-438、2012、査読無し

Sharifi K, Maekawa M, Yoshikawa T, (12 人中 3、10 番目) : FABP7 expression in normal and stab-injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. Histochem Cell Biol

136: 501-513, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00418-011-0865-4>, 査読有り

Jitoku D, Hattori E, Iwayama Y, Toyota T, Kikuchi M, Yamada K, 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. 156: 581-592, 2011. DOI 10.1002/ajmg.b.31199, 査読有り

Yamada K, Iwayama Y, Hattori E, Iwamoto K, Toyota T, Tetsuo Ohnishi T, Ohba H, Maekawa M, Kato K, Yoshikawa T: Genome-wide association study of schizophrenia. PLoS ONE. 6: e20468, 2011, doi:10.1371/journal.pone.0020468, 査読有り

Maekawa M, Yuji Owada Y, Yoshikawa T: Role of polyunsaturated fatty acids and fatty acid binding protein in the pathogenesis of schizophrenia. Current Pharmaceutical Design. 17 (2):168-175, 2011 <http://dx.doi.org/10.2174/138161211795049615>, 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

吉川武男 前川素子, 多価不飽和脂肪酸と統合失調症, 2014 年度日本農芸化学会, 平成 26 年 3 月 30 日, 明治大学生田キャンパス (神奈川県)

吉川武男, 脳発達期の栄養状態が統合失調症脆弱性に与える影響-マウスを用いた検討, 平成 25 年 9 月 2 日, 平成 25 年度生理学研究所研究会 (愛知県)

Maekawa M, Biology for the role of nutrients in psychiatric disorders, ISNPR, 平成 25 年 6 月 21 日, NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH AND NUTRITION (TOKYO)

前川素子, 発達期の脂肪酸欠乏食投与による精神疾患関連遺伝子の発現変化, Neuro2013, 平成 25 年 6 月 20 日, 国立京都国際会館 (京都市)

吉川武男, 統合失調症 GABA 仮説の遺伝学的検証およびマウスにおける評価, 日本実験動物科学・技術 九州 2012, 平成 24 年 5 月 25 日, 別府国際コンベンションセンター (大分県)

吉川武男, Schizophrenia and fatty acids, Framework for Understanding Psychosis Based on Its Biological

Treatment Symposium, 平成 23 年 11 月 5 日, ソウル大学医学部 (韓国)

吉川武男, Schizophrenia and fatty acids, 第 32 回内藤カンファレンス: Biological basis of mental functions and disorders, 平成 23 年 10 月 19 日, ハヶ岳ロイヤルホテル (山梨県)

吉川武男, 脂質の基礎生物学および精神機能との関連, 第 34 回日本神経化学大会, 平成 23 年 9 月 16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

吉川武男, 統合失調: 遺伝と環境 (脂肪酸), 平成 23 年度第 1 回都民講座, 平成 23 年 6 月 8 日, 津田塾大学 津田ホール (東京都)

〔図書〕(計 3 件) 吉川武男, 前川素子, 島本知英: 医学ジャーナル社、精神と栄養～メンタルヘルスの新たな視点～、2013、P12-24

糸川昌成、前川素子、吉川武男: 脳とこころのプライマリ・ケア 第 6 巻 幻覚と妄想, シナジー出版, 2011, ページ数 5

大西哲生、吉川武男: 生命科学研究の戦略: 疾患モデルマウスの表現型解析-これだけ調べれば論文が書ける-, 中山書店, 2011, ページ数 8

〔その他〕ホームページ

<http://www.brain.riken.jp/en/faculty/details/54>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 武男 (YOSHIKAWA, Takeo)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号: 30249958

(2) 研究分担者

山田 和男 (YAMADA, Kazuo)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・副チームリーダー
研究者番号: 10322695

前川素子 (MAEKAWA, Motoko)
独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号: 50435731

濱崎 景 (HAMASAKI, Kei)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教
研究者番号: 50533494