

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591701

研究課題名(和文)統合失調症死後脳の神経病理学的検討ー疾患モデル動物との比較ー

研究課題名(英文)Neuropathology of schizophrenia -compare to model animals-

研究代表者

入谷 修司(Shuji, Iritani)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：60191904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目標は、脳組織病理学的アプローチによって、統合失調症の病因・病態を解明することにある。今回以下のような成果がえられた。1) 統合失調症のモデルマウスの脳の前頭葉皮質において、ドーパミン神経ネットワークの発達の障害が示唆された。2) 同様に、同部位でのGABA神経細胞の発現の低下がみられた。このことは、統合失調症の前頭葉機能不全と関連していると考えられた。3) 統合失調症のヒト死後脳の病理標本での形態計測から、上側頭回の加齢による脆弱性が示された。4) おなじく上側頭回において、ミエリン特異的タンパクの発現の減少がみられた。これはこの部位でのVolume減少に関係していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the pathogenesis of Schizophrenic disorder from the point of view of neuropathological approach. In this period, it has been detected as achievement as follows: 1) Dopaminergic neuronal impairment has been detected in the frontal cortex of genetic modified model animals (mouse) of Schizophrenia. 2) Similarly, it has been detected that the number of GABAergic neurons was reduced in the frontal cortex of the model animals. 3) The vulnerability of the brain tissue in Heschl's gyrus of schizophrenic disease has been detected by the morphometric analysis for the neuropathological specimens of post mortem human brain. 4) In the cortex of same area, the decrease of myelin protein was observed. These phenomena may be thought to relate to the volume reduction by neuroimaging observation in this gyrus.

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 神経病理 死後脳 モデル動物

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症の有病率は全人口の約 1%と推定され、頻度が高く、大きな社会的損失をもたらす疾患のひとつである。統合失調症の疾患概念を提唱したクレペリンは、100 年以上前に本疾患の脳神経細胞に何らかの不可逆的な変化が起きている事を提唱し、アルツハイマーら神経病理学の先駆者たちも本疾患患者死後脳の顕微鏡的組織観察を精力的におこなった。しかし、有意な所見がみいだされることなく神経病理学的検討はその後衰退して行った。約半世紀前に統合失調症の薬物療法が出現し、以降、医療的なアプローチがめざましく進歩し、様々な薬物開発の結果、臨床薬理学的な理解は進んだが、統合失調症の治療成果は未だ十分とは言い難い。統合失調症の根本的な病因・病態は不明であり、根本的な予防・治療法は見いだされていない。大きな社会的損失から、本疾患を克服することは社会的に急務であり、目下、神経画像研究やゲノム研究、死後脳における神経病理学的研究などの多様な観点から精力的な病因・病態解明の試みがなされている。にもかかわらず統合失調症の病因・病態に関しては未だ混沌としているのが現状である。

本疾患の病因・病態を理解するために神経発達障害仮説が提唱されている。脳神経の発達や成熟、分化および神経ネットワークの形成には、神経伝達物質、神経栄養因子、神経栄養因子等がかかわり、それらはシナプスの形成/可塑性や保持といった生涯にわたる神経系の機能保持/維持において、非常に重要であることを示している。このことは、統合失調症の臨床的特徴と考えあわせると非常に興味深い。

ゲノム医学的アプローチによって、統合失調症のリスク遺伝子が見いだされ、その多くが神経の発達や遊走の機能に関わっていることが報告されている。一方で、MRI をはじめとする脳画像研究の進歩により、本疾患で脳の前頭葉・側頭葉などの、いくつかの特定脳部位の体積減少が見いだされている (Shenton et al. 2001)。この脳の Volume 減少は、病勢の進行とともに進む事が再現性をもって報告されている。このゲノム研究成果と神経画像研究成果を結びつけるものとして、死後脳における神経病理学的な組織観察はより病因・病態解明に貢献すると考える。すなわち、遺伝子レベルの疾患脆弱性が、脳神経系の形態学的な変化をどのように起こしているかが明らかになれば、神経画像とゲノム研究が結びつけることができ、病因・病態理解が大きく進歩すると考えられる。 Weinberger ら (2005) は “genetic cytoarchitecture” の検討は、統合失調症のさらなる病因・病態理解をもたらすことを指摘している。このことは、分子生物学的な研究成果を、実際の脳組織の現象として明確化する必要性があることを端的に示唆している。これらの背景から、脳組織学的な現象

をとらえることが、現在求められている。

## 2. 研究の目的

統合失調症の病因・病態として、神経発達障害仮説が広く支持されている。この仮説は、ゲノム医学的手法で見いだされた統合失調症のリスク遺伝子の多くが神経細胞の分化・発達に関することからも強く支持される。しかし、実際に、統合失調症患者脳でどのような神経発達の異常や変化が起きているのかは未だ明確にはなっていない。以上を踏まえ、本研究では、神経病理学的手法を用いて、組織病理学的アプローチによって、統合失調症の病因・病態を解明する。

具体的には、(1) この疾患のモデル動物の脳でどのような組織的な変化が起きているかを検証し、ヒト死後脳の現象と比較する。(2) 神経画像研究で示されているこの脳での疾病経過とともに関心部位の Volume 低下の減少があるが、それが実際の脳(標本)では再現されるかどうかを検証する。(3) 統合失調症の死後脳を用いて、Volume 低下と関連していると想定され、かつ神経ネットワークに関係しているミエリンの発現について組織上での変化を検証する。以上を研究目的とした。

## 3. 研究の方法

今回の研究の方法は大きく二つに分かれる。

1つは、遺伝子改変モデル動物 (DISC1 ノックアウトマウス) を対象にして、その脳における、神経伝達物質を中心にしてそれらの組織発現を検証する。仮説として、ドーパミン神経と GABA 神経のアンバランスが統合失調症の病態に関係していると考えられており、それぞれの伝達物質に着目した。モデル動物を、深麻酔下において固定液にて還流固定し、速やかに脳をとりだしクリオスタットにて 5 ミクロン厚の切片を作成する。その脳に対して、免疫組織学的技法を用いて、ドーパミン神経系を抗チロシン水酸化酵素 (TH) 抗体によって、GABA 神経系は、抗カルシウム結合タンパク (CalbindinD28Kd, Parvalbumin) 抗体を用いて染色した。

2つめは、統合失調症の古典的神経病理学標本を用いて、神経画像研究で示されている、脳の容量の減少について、実際の標本から計測した。統合失調症 22 例および正常対照 24 例の病理剖検脳から作成された脳標本を使用した。すべての症例で死後、遺体は 4℃ に保たれ、剖検は死後 48 時間 (平均 8.0 時間) 以内に行われた。脳標本は 10%ホルマリンによる固定の後、パラフィンにて包埋。冠状断で 10 μm に薄切された。切片はクリューバー・バレラ、およびヘマトキシリン・エオジンにて染色した。海馬-視床下核を通る左側冠状断の染色組織標本をスキャナー (CanoScan LiDE 500F) にてコンピューターへ取り込み、photo shop 6.0、ImageJ 1.41o を用いてトレースし、関心領域 (Heschl 回: 灰白質、上側頭回: 灰白質、白質) の断面積 (absolute area) を計測した。脳个体差の補正のため、脳梁溝から後頭側頭溝までの脳表長 (以下、脳表長) を計測し、標準化した断面積 (relative area)

を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) モデル動物の組織学的検討

(統合失調症の多発家系からみだされた Schizophrenia Candidate Gene である DISC1 ノックアウト (KO) マウスを用いて、脳における神経ネットワークの検討)

##### ① ドーパミン神経ネットワークの検討

TH はドーパミン合成の律速酵素であり、ドーパミン神経の指標として用いられる。今回、統合失調症のモデル動物である DISC1KO マウスをもちいて、前頭葉眼下面皮質の神経ネットワーク発現を観察した。方法として、モデルマウスの脳および対象脳の薄切切片を作成し、抗 TH 免疫組織学的染色をし、デジタル画像としてパソコンに保存し、画像ソフトを用いて陽性線維を画像抽出し、一定の組織面積あたりに出現している陽性線維の長さの総和を指標として、ネットワークの発達程度を比較した (Fig. 1)。

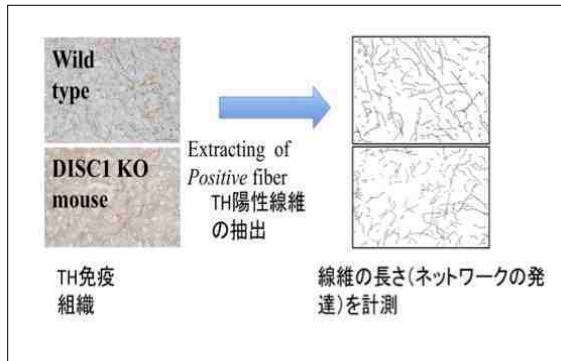


Fig. 1

その結果、一定面積の脳組織に出現する線維の長さの総和は、有意にモデル動物で減少していた (Fig. 2)。

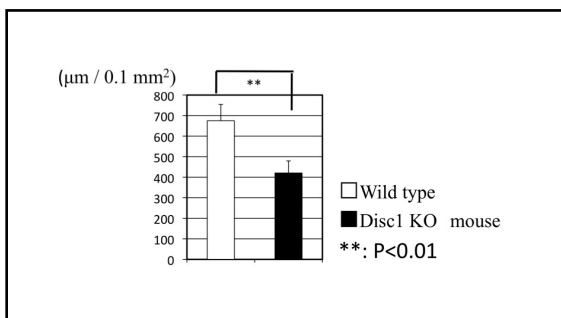


Fig. 2

このことは、統合失調症の前頭葉におけるドーパミン神経ネットワークの発達が障害されていることが推量された。

##### ② GABA 神経系の検討

①と同様にモデル動物の前頭葉皮質において、CalbindinD28Kd, Parvalbumin を指標にして GABAergic 神経細胞の発現を免疫組織学的に検討した (Fig. 3)。

ドーパミン神経系の検討と同様に、前頭葉の一定の面積における、免疫陽性細胞の数を

計測し、Wild type と比較した。

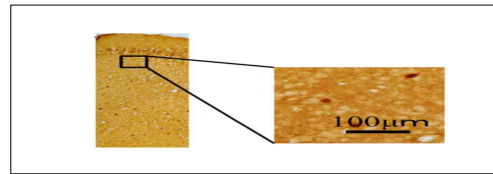


Fig. 3 DISC1KO マウス前頭葉皮質でのカルbindin陽性細胞

その結果、モデル動物の皮質において、GABA 神経の発現は有意に減少していた (Fig. 4)。

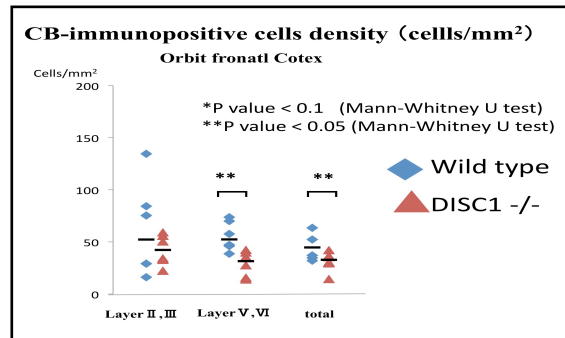


Fig. 4

##### (2) ヒト死後脳の病理組織検討

##### ① マクロ所見からの形態計測

統合失調症脳および正常対象脳の病理標本において、若年グループ (死亡時 30-54 歳) と高齢グループ (同 65-84 歳) にわけて、関心領域 (Heschl 回: 灰白質、上側頭回: 灰白質、白質) の断面積 (absolute area) をスキャナーで画像を PC に取り込み計測した (Fig. 5)。

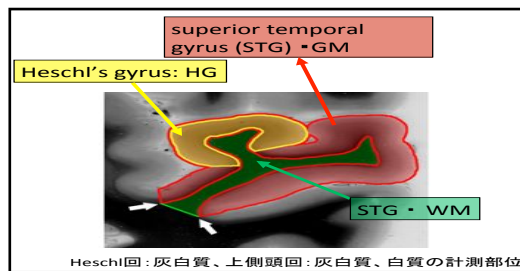


Fig. 5

その結果、Heschl 回、上側頭回の灰白質の断面積は、統合失調症例、正常対照例とも、younger group に比べ older group において有意に小さかった (Fig. 6)。

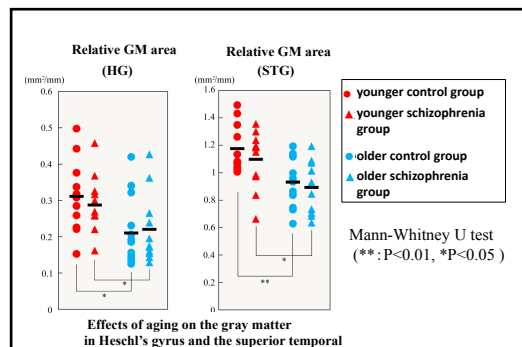


Fig. 6

今回の成果は、既報研究の縦断的画像研究で同部位の進行性の灰白質体積減少は病初期に大きく、慢性期では比較的緩徐となることが示唆されていることなどの報告と考え合わせて、今回の結果、すなわち、Heschl 回、上側頭回の灰白質断面積に関し、統合失調症と正常対照例で加齢の影響に差は認められなかったということと考え合わせると、同部位の体積の変化は、加齢の影響より、病初期の病態の変化と関連している可能性が示唆された。また、カルテかららさかのぼって調査した疾患の重症度と灰白質の断面積との相関は、younger group において、より強く認められた。このことは、灰白質では統合失調症による影響が、加齢に伴い、より捉え難くなることが示唆された。

## ②ミクロからの上側頭回の検討

すでに、神経画像研究から再現性をもって、統合失調症の上側頭回などの部位においての Volume の減少が報告されている。また、今回の成果の 3) からそれが示唆された。この部位における Volume の変化について組織学的な検証は未だされていない。一方で近年、この疾患におけるグリア細胞の機能に関心がもたれて、認知機能の関連性が報告されている。そこで、この部位におけるミエリンの発現について統合失調症死後脳において MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) を指標にして検討した。予備的実験段階であるが、統合失調症の上側頭回におけるミエリンの発現が低下している傾向がみられた (Fig. 7)。

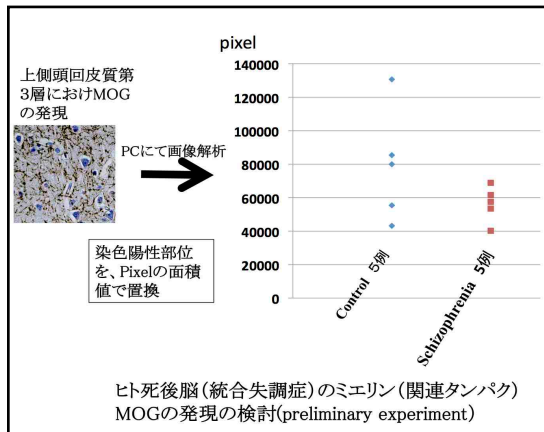


Fig. 7

しかしながら、現時点では検討数が少なく、さらに症例数を増やして検討する必要がある。しかし、統合失調症においては、個体差が大きいのが特徴的であり、この事実は、統合失調症がネットワークの障害を持っているが、それは個体差があり、多因子の疾患であることも示していると考えられた。

以上 (1) -①, ②, (2) -①, ②, の成果から統合失調症の脳には、従来考えられている以上に、神経ネットワークの障害があると考えられた。

## 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 9 件)

- ① Aleksic B, Kushima I, Ohye T, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Koide T, Iritani S, Kurahashi H, Iwata N, Ozaki N, Definition and refinement of the 7q36.3 duplication region associated with schizophrenia. Sci Rep. 査読有 3, 2013, 2587, doi: 10.1038/srep02587
- ② Ukai K, Kimura H, Arao M, Aleksic B, Yamauchi A, Ishihara R, Iritani S, Kurita K, Ozaki N, Effectiveness of low-dose milnacipran for a patient suffering from pain disorder with delusional disorder (somatic type) in the orofacial region. Psychogeriatrics. 査読有 13, 2013, 99-102, doi: 10.1111/j.1479-8301.2012.00430.x.
- ③ Iritani S, What happens in the brain of schizophrenia patients?: an investigation from the viewpoint of neuropathology. Nagoya J Med Sci. 査読有、75, 2013, 11-28, [http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya\\_j\\_med\\_sci/7612/7612.html](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/7612/7612.html)
- ④ Horiuchi Y, Iida S, Koga M, Ishiguro H, Iijima Y, Inada T, Watanabe Y, Someya T, Ujiike H, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Tochigi M, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 査読有、2012、159B、30-7、doi: 10.1002/ajmg.b.31249.
- ⑤ Torii Y, Iritani S, Sekiguchi H, Habuchi C, Hagikura M, Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Ozaki N, Effects of aging on the morphologies of Heschl's gyrus and the superior temporal gyrus in schizophrenia: a postmortem study. Schizophr Res. 査読有、134, 2012, 137-42 doi: 10.1016/j.schres.2011.10.024
- ⑥ 入谷 修司、脳を見(診・観)ること、精神科、査読無、2012、21巻、609-615、<http://www.kahyo.com/item/SE201211-215>
- ⑦ 羽瀨 知可子、入谷 修司、タウオパチーと精神症状DNTCの臨床病態を中心に、老年期認知症研究会誌、査読無2012、19巻、101-103、[http://www.rouninken.jp/member/pdf/19\\_pdf/vol.19\\_07-19-02.pdf](http://www.rouninken.jp/member/pdf/19_pdf/vol.19_07-19-02.pdf)
- ⑧ 入谷 修司、池田 研二、老年期の幻覚妄想と認知症、老年期認知症研究会誌、査読無、2011、17巻、125-127、[http://www.rouninken.jp/member/pdf/17\\_pdf/vol.22\\_08-22-05.pdf](http://www.rouninken.jp/member/pdf/17_pdf/vol.22_08-22-05.pdf)
- ⑨ 木村 大樹、梅田 健太郎、入谷 修司、尾崎 紀夫、未治療アルコール依存症患者に合併した振戦に、本態性振戦の診断のもと

脳深部刺激療法が施行された後、過量服薬を契機に精神科へ受診した1症例、臨床精神医学、査読有、2011、40巻、1379-1386、<http://arcmidium.co.jp/publication01.php?a=201110>

[学会発表] (計6件)

- ① S. Iritani, M. Miyata, H. Sekiguchi, C. Habuchi, Y. Torii, K. Umeda, H. Fujishiro, M. Yoshida, N. Ozaki. Immunohistochemical Study Of Alfa-Synuclein and Tau Pathology In The GABAergic Neurons In Brains Of Patients With Dementia With Lewy Bodies、Immunohistochemical Study Of Alfa-Synuclein and Tau Pathology In The GABAergic Neurons In Brains Of Patients With Dementia With Lewy Bodies, The XX World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Palexpo Geneva Congress Center, 2013年12月10日、Geneva (Switzerland)
- ② S. Iritani, H. Sekiguchi, C. Habuchi, K. Umeda, Y. Torii, M. Miyata, K. Fujita, N. Ozaki, Neuropathological finding of frontal cortex of animal model and postmortem human brain of schizophrenia, 4<sup>th</sup> European Conference on Schizophrenia Research, Urania Center, 2013年9月26-28日、Berlin (Germany)
- ③ Shuji Iritani, Twenty first century brain banking: Management and research application, 11<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry, 2013年6月27日、京都国際会館(京都市)
- ④ H. Sekiguchi, S. Matsunaga, C. Habuchi, Y. Torii, K. Umeda, M. Yoshida, K. Fujita, S. Iritani, A Case of Dementia with Lewy Body Disease Diagnosed Frontotemporal Degeneration Clinically, The 8<sup>th</sup> International Conference on Frontotemporal Dementias, 2012年9月6日、Manchester Central Convention Complex, Manchester (England)
- ⑤ S. Iritani, H. Sekiguchi, C. Habuchi, N. Ozaki, Histological investigation in the brain of genetically-modified mouse of schizophrenia, neruro2011 第34回日本神経科学大会, 2011年9月17日、パシフィコ横浜(横浜市)
- ⑥ Iritani S, Sekiguchi H, Habuchi C, Ozaki N Immunohistochemical study of VMAT 2 in the hippocampal formation of animal models of schizophrenia, 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 2011年、7月16日、Fortezza da Basso, Florence (Italy)

[図書] (計2件)

- ① 池田 研二、入谷 修司 (共著分担) 医学書院 誤診症例から学ぶ 認知症とその他

の疾患の鑑別 2013、総ページ184(48-76)  
② 入谷 修司 (分担) 統合失調症 医学書院 2013、総ページ753(187-196)

[[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/seisin/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

入谷 修司 (IRITANI, Shuji)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：60191904

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

尾崎 紀夫 (OZAKI, Norio)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40281480