

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月18日現在

機関番号：23903
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23700380
研究課題名（和文） 統合失調症関連遺伝子ディスク1のプライマリーシリアを介した神経新生調節機構の解明
研究課題名（英文） Role of DISC1 in primary cilia-mediated adult neurogenesis
研究代表者 熊本 奈都子 （KUMAMOTO NATSUKO） 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師 研究者番号：30467584

研究成果の概要（和文）：レトロウイルスを用いた選択的遺伝子導入を用いてマウス成体脳海馬神経幹細胞の DISC1 をノックダウンし、プライマリーシリア形成不全が起こることを *in vivo* レベルで見いだした。また、プライマリーシリア形成不全新生神経細胞では Wnt 活性が亢進していることより、DISC1 ノックダウン新生神経細胞で機能喪失型 β カテニンを用いて Wnt 活性の亢進を抑えたところ、細胞遊走異常や樹状突起の発達異常が回復傾向を示すことがわかった。

研究成果の概要（英文）：DISC1 knockdown using onco-retrovirus-mediated approach to genetically label and manipulate neural stem cells in adult mouse hippocampus resulted in defective primary cilia formation *in vivo*. Loss-of-function mutations of β -catenin in newborn neurons reversed the accelerated neuronal migration and dendritic development caused by the DISC1 knockdown.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学一般

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：DISC1、統合失調症、神経新生、プライマリーシリア

1. 研究開始当初の背景

統合失調症関連遺伝子 DISC1 を海馬神経幹細胞で発現抑制すると樹状突起の発達異常や細胞遊走異常がおこることが知られているがその作用機序は明らかになっていない。申請者は予備的な研究結果として、DISC1 をマウス海馬神経幹細胞で発現抑制するとプライマリーシリア形成不全がおこること、また、プライマリーシリア欠損新生神経細胞では Wnt 活性が亢進していること、Wnt 活性を亢進させた新生神経細胞では細胞遊走異常が起こることを見いだしていた。これらのデータをもとに、DISC1 がプライマリーシリアを介した Wnt 活性調節によって海馬神経新生調節機構に関与する可能性を検討することに

した。

2. 研究の目的

本研究は前述の仮説（DISC1 がプライマリーシリアを介した Wnt 活性調節によって海馬神経新生調節機構に関与する）の検証をさらに進めるとともに、DISC1 による神経新生異常と統合失調症発症の関連に焦点をあて、統合失調症の病態解明と新たな治療法の確立への基盤となる研究を目指した。研究期間内に以下のことを明らかにしようとした。

（1）DISC1 ノックダウン新生神経細胞、プライマリーシリア形成不全新生神経細胞での Wnt 活性亢進を抑制すると、樹状突起の発

達や細胞遊走が正常の状態に回復するか否かを調べる。

(2) ドミナントネガティブ DISC1 強制発現新生神経細胞でもプライマリーシリア形成不全、Wnt 活性亢進、樹状突起発達異常、細胞遊走異常がおきるか否かを調べる。

(3) 海馬新生神経細胞の DISC1 ノックダウン、ドミナントネガティブ DISC1 強制発現、プライマリーシリア形成不全をおこしたマウスが、統合失調症の中間表現系を有するか否かを調べる。

(4) (1) で回復が認められた場合、行動学的解析の結果にも変化が見られるか否かを調べる。

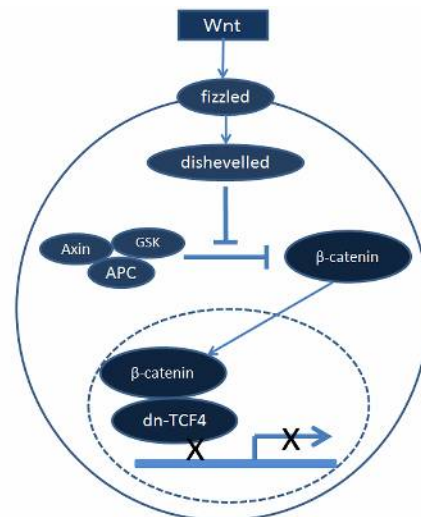
3. 研究の方法

新生神経細胞の DISC1 ノックダウンには DISC1-shRNA と EGFP が同時に発現するレトロウイルス (Duan et al. Cell 2008) を、プライマリーシリア形成不全にはプライマリーシリアの繊毛内蛋白質複合体輸送を担う Kif3A のモーター部位を欠損したドミナントネガティブ Kif3A と EGFP を同時に発現するレトロウイルス (Kumamoto et al. Nature Neurosci 2012) を使用した。レトロウイルスを用いた選択的遺伝子導入は具体的には、まず目的の遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを 293 細胞にトランスフェクトし、細胞から放出されたウイルスを含む培養液を回収、濃縮し成獣マウス海馬歯状回に定位脳固定装置を用いてシリンジで注入する。注入 3~4 週間後にマウスを還流固定し、脳切片を作製、共焦点レーザー顕微鏡で観察して蛍光蛋白質 (EGFP や dTomato) でラベルされた樹状突起の形状と細胞体の顆粒細胞層での位置を測定する。

(1) Wnt 活性抑制の海馬新生神経細胞への影響の解析 (回復実験)

ドミナントネガティブ TCF4 (β カテニンには結合するが、DNA 結合サイトは欠損している TCF4) と赤色蛍光蛋白質 dTomato を同時に発現するレトロウイルス、又は機能喪失型 β カテニンと赤色蛍光蛋白質 dTomato を同時に発現するレトロウイルスを、上述の DISC1-shRNA 発現レトロウイルスやドミナントネガティブ Kif3A 発現レトロウイルスと共に成獣マウス海馬歯状回に同時注入した。DISC1 ノックダウンやプライマリーシリア形成不全がおきている新生神経細胞は EGFP で緑色に、ドミナントネガティブ TCF4 や機能喪失型 β カテニンにより Wnt 活性抑制おこっ

ている新生神経細胞は dTomato で赤色にラベルされているため、緑色のみでラベルされている新生神経細胞と、緑色と赤色で二重にラベルされている新生神経細胞を比較し、Wnt 活性抑制が DISC1 ノックダウンやプライマリーシリア形成不全による新生神経細胞の遊走異常や樹状突起形成異常に与える影響を調べた。



ドミナントネガティブ TCF4 (dn-TCF4) による Wnt シグナル抑制

(2) 海馬新生神経細胞へのドミナントネガティブ DISC1 強制発現の影響の解析

CAMKII プロモーターにより、前脳 (海馬を含む) でドミナントネガティブ DISC1 が発現するように作成されたトランスジェニックマウスは PPI の低下など統合失調症様症状を呈することが報告されている (Hikida et al. PNAS 2007)。このドミナントネガティブ DISC1 をレトロウイルスにより海馬神経幹細胞特異的に発現させる。ドミナントネガティブ DISC1 発現細胞が同定できるように、EGFP をつけたドミナントネガティブ DISC1 を pEGFP ベクターを使って作成し、レトロウイルスベクターにサブクローニングする。(1) と同様、EGFP によりラベルされた樹状突起の形態の解析、細胞遊走の計測は、ドミナントネガティブ DISC1 ウイルスを注入した脳で切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡で撮影して行う。

(3) 海馬新生神経細胞にて DISC1 ノックダウン、ドミナントネガティブ DISC1 強制発現、プライマリーシリア形成不全マウスの行動学的解析

統合失調症の中間表現形である PPI や空間学習テストなどの行動学的解析を上述のマウスでおこない、統合失調症の中間表現形を有するか否かを調べる。

(4) Wnt 活性抑制の DISC1 ノックダウン、ドミナントネガティブ DISC1 強制発現、プライマリーシリア形成不全マウスにおける行動異常への影響

(1) で用いたドミナントネガティブ TCF4、あるいは機能喪失型 β カテニン DISC1-shRNA やドミナントネガティブ Kif3A 発現レトロウイルスを海馬歯状回に同時注入した成獣マウスにて、(3) と同様の行動解析を行う。

4. 研究成果

1) Wnt 活性抑制の海馬新生神経細胞への影響の解析 (回復実験)

まず、DISC1-shRNA とドミナントネガティブ TCF4 をレトロウイルスを用いてマウス海馬新生神経細胞に共発現させたところ、ドミナントネガティブ TCF4 陽性細胞 (dTomato でラベル) は細胞死が引き起こされてしまい、解析が不可能であった。恐らく、Wnt 活性の抑制が強すぎたためと考えられ、次に Wnt 活性抑制が比較的穏やかな、機能喪失型 β カテニンを強制発現させて検討したところ、DISC1-shRNA によるノックダウンでみられる細胞遊走異常 (顆粒細胞層の外側まで細胞が遊走してしまう) や樹状突起の発達異常 (総樹状突起長が長くなり、樹状突起数も増える) が回復傾向を示すことが明らかになった。ドミナントネガティブ Kif3A と機能喪失型 β カテニンの共発現による、プライマリーシリア形成不全への Wnt 活性抑制の直接の影響は、現在検討中である。

(2) 海馬新生神経細胞へのドミナントネガティブ DISC1 強制発現の影響の解析

ドミナントネガティブ DISC1 に EGFP を融合したドミナントネガティブ DISC1-EGFP を pEGFP ベクターを使って作成し、レトロウイルスベクターにサブクローニングした。このレトロウイルスを用いてマウス海馬新生神経細胞にドミナントネガティブ DISC1 を強制発現し、脳切片を作製、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、ImageJ や Imaris の解析ソフトを用いて解析した結果、DISC1 ノックダウンと同様の傾向 (細胞遊走異常や樹状突起の発達異常) が認められた。今後、n 数を増やし有意差をつける必要がある。

(3) 海馬新生神経細胞にて DISC1 ノックダウン、ドミナントネガティブ DISC1 強制発現、プライマリーシリア形成不全マウスの行動学的解析

上記のマウスで統合失調症の中間表現形が認められるか否か行動解析で検討する予定

であったが、レトロウイルスを用いているため、動物実験施設の手続き上の問題により、現在のところ実現していない。(研究期間中に申請者の所属が移動し、動物実験施設の使用申請を再度行う必要があった。) よって、研究方法 (4) で挙げた Wnt 活性抑制が行動解析に与える影響も現在のところ確認できていない。

Wnt シグナル異常が統合失調症患者で報告されており、申請者の予備的な研究結果 (統合失調症関連遺伝子 DISC1 をマウス海馬神経幹細胞で発現抑制するとプライマリーシリア形成不全がおこること、また、プライマリーシリア欠損新生神経細胞では Wnt 活性が亢進していること、Wnt 活性を亢進させた新生神経細胞では細胞遊走異常が起こること) を合わせると DISC1 がプライマリーシリアを介した Wnt 活性調節によって海馬神経新生調節機構に関与する可能性が考えられた。今回、DISC1 ノックダウン新生神経細胞で Wnt 活性を抑制させると新生神経異常 (樹状突起の過剰な発達、細胞遊走) が回復傾向を示したことは、統合失調症関連遺伝子 DISC1 が一次繊毛の形成に関与することより、DISC1 と一次繊毛、Wnt シグナルを結びつけるデータであり、未だ明らかになっていない統合失調症発症メカニズムの解明にブレークスルーをもたらす可能性を秘めている。また、神経新生のメカニズムの一端を明らかにすることで、統合失調症の病態解明と新たな治療法の確立だけでなく、幅広い神経疾患を対象とした再生医療の開発にも大いに役立つと考えられる。引き続き実験を遂行し、DISC1、Wnt 活性異常と統合失調症の関連をより深く検討するためにマウスの行動解析を実現させるべく、環境を整える予定である。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

① A role for primary cilia in glutamatergic synaptic integration of adult-born neurons. Kumamoto N, Gu Y, Wang J, Janoschka S, Takemaru K, Levine J, Ge S. Nature Neuroscience. 15:399-405 (2012) (査読あり)
DOI: 10.1038/nn.3042.

[学会発表] (計 1 件)

① Kumamoto N, Gu Y, Wang J, Janoschka S, Takemaru K, Levine J, Tohyama M, Ge S. The role of primary cilia in adult neurogenesis. 第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 15 日 (横浜) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊本 奈都子 (KUMAMOTO NATSUKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30467584