

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791332

研究課題名(和文)統合失調症関連分子DBZの脳可塑性における役割の解明

研究課題名(英文)The role of the schizophrenia-related molecule, DBZ, in brain plasticity

研究代表者

高村 明孝(Takamura, Hironori)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：80514398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では統合失調症発症メカニズムの解明を目指し、我々の研究グループが統合失調症関連分子として報告したDBZと、近年注目されつつある脳可塑性の異常に注目し、その関連について検討を行った。その結果、脳可塑性制御に重要な役割を果たしていると考えられている抑制性神経細胞の発達にDBZが関与しており、抑制性神経伝達物質GABA合成酵素の1つであるGAD67の発現制御へのDBZの関与が明らかとなった。

以上の結果から、DBZの異常は抑制性神経細胞の発達異常を介して脳の可塑性に影響を与え、統合失調症の発症につながる可能性が考えられ、その解明は統合失調症発症メカニズムの解明に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We observed the role of DBZ (DISC1-binding zinc finger protein), a schizophrenia related molecule, in the development of inhibitory neurons. DBZ has been reported to be an important factor in brain plasticity and also in the development of schizophrenia. We found that DBZ regulated the development of basket cells, a morphologically defined class of parvalbumin (PV)-containing interneurons. We also found that DBZ regulated the level of mRNAs for the gamma-aminobutyric acid (GABA)-synthesizing enzyme GAD67.

These findings suggest that DBZ regulates the development of inhibitory neurons and brain plasticity, which may play an important role in schizophrenia.

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 DBZ 脳可塑性

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は全人口のおよそ1%という高い有病率を示す精神疾患である。統合失調症治療として使用されているドーパミンやセロトニンをターゲットとした抗精神病薬は一部において治療効果が低く、重大な副作用を引き起こすことがある。よって神経伝達物質を対象としたこのような治療薬に代わる、有効性が高い治療薬の開発が待ち望まれている。

統合失調症発症の仕組みのひとつとして、神経系の発達障害によって脆弱性が形成され、思春期前後の環境からの刺激によって統合失調症が発症するという神経発達障害仮説が考えられている。このことから統合失調症発症には遺伝要因・環境要因の両方が関与すると考えられる。よって、思春期前後が環境からの刺激によって統合失調症を発症しやすい臨界期であり、この時期の可塑性の異常は環境からの刺激に正常に応答できず、神経回路網形成に異常をきたし、統合失調症発症につながると考えられる。実際に統合失調症発症において、脳可塑性メカニズムの異常が報告されている。統合失調症と脳可塑性との関わりを解明することは、統合失調症発症メカニズムの解明、さらには新たな統合失調症治療法の開発につながる可能性が考えられる。しかしながら、そのような研究はほとんど進んでおらず、その関わりについては不明な点が多い。

これまでに統合失調症の脆弱性遺伝子として様々な遺伝子が報告されており、様々な研究が進められている。このような中、我々はDBZ(DISC1-binding zinc finger protein)と呼ばれる分子に注目した。DBZは同じく統合失調症の脆弱性因子であるDISC1結合因子として同定された分子である。DBZの詳細な機能は不明であるものの、これまでに我々のグループの研究により、神経の発達に関与し、脳可塑性において重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究課題ではDBZの機能解析、特にDBZ機能、統合失調症発症および脳可塑性のそれぞれとの関与が示唆されている抑制性介在神経細胞の発達における解析を行い、統合失調症発症と脳可塑性異常の関連の解明を目的として研究を行った。本研究をもとに、新たな作用機序による新規治療薬開発につなげることを将来的な目標としている。

3. 研究の方法

我々の研究グループはDBZ機能の詳細な検討を目的としてDBZノックアウトマウスを作製した。そこで本研究課題では生後12週から20週のオスマウスを用いて以下の実験を行った。

(1) ゴルジ染色法による神経細胞の可視化
FD Rapid GolgiStain™ Kit (FD

NeuroTechnologies)を用いて染色を行った。神経細胞形態の解析にはcamera lucidaによって得られた画像を用いた。細胞体と神経突起が完全に染まっていて周囲のほかの細胞から完全に独立しており、細胞体が体性感覚野のIV層に存在するchandelier細胞またはV層に存在するbasket細胞に注目して観察を行った。

(2) In situ hybridizationによるGAD67発現量の観察

5'-TGT GCC CAA ACT GGT CCT-3' (sense) and 5'-TGG CCG ATG ATT CTG GTT-3' (antisense)のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてreverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)によってGAD67 cDNAの増幅を行い、増幅したcDNA断片をプローブ合成に用いた。³⁵SラベルされたRNAプローブを14μmのマウス未固定凍結矢状断脳切片のin situ hybridizationに用いた。

(3) 免疫組織化学染色法によるGABAとParvalbuminの観察

ミクロトームで30μmの4%パラホルムアルデヒド固定凍結前額断切片(前頭部)を作成し、一次抗体に抗GABA抗体(Sigma-Aldrich)と抗parvalbumin抗体(Sigma-Aldrich)、二次抗体としてAlexa 568またはAlexa 488蛍光標識された抗体を用いて染色を行った。観察にはLSM-510 laser scanning microscope(Carl Zeiss)を用いた。

4. 研究成果

抑制性介在神経細胞には様々な種類が存在するが、DBZが胎生期において腹側の内側基底核原基(MGE)に高発現することから、まずその領域に由来するparvalbumin陽性の抑制性介在神経細胞に注目して研究を進めた。免疫組織化学染色法、in situ hybridization法によってマウス脳におけるparvalbuminの発現を観察した。その結果、DBZノックアウトマウスにおける発現細胞数の異常は観察されず、DBZが皮質の介在神経細胞のparvalbumin発現に影響を与えないことがわかった。

次に、介在神経細胞の形態異常についてゴルジ染色法を用いて観察を行った。前述のとおりDBZが腹側のMGEに強く発現することから、その領域に由来する介在神経細胞に注目して観察を行った。その結果、basket細胞の突起の長さの減少と突起の分岐数の減少が観察された(図1)。一方でchandelier細胞には異常は見られなかった。この結果はDBZがbasket細胞の形態変化に関与していることを示唆している。

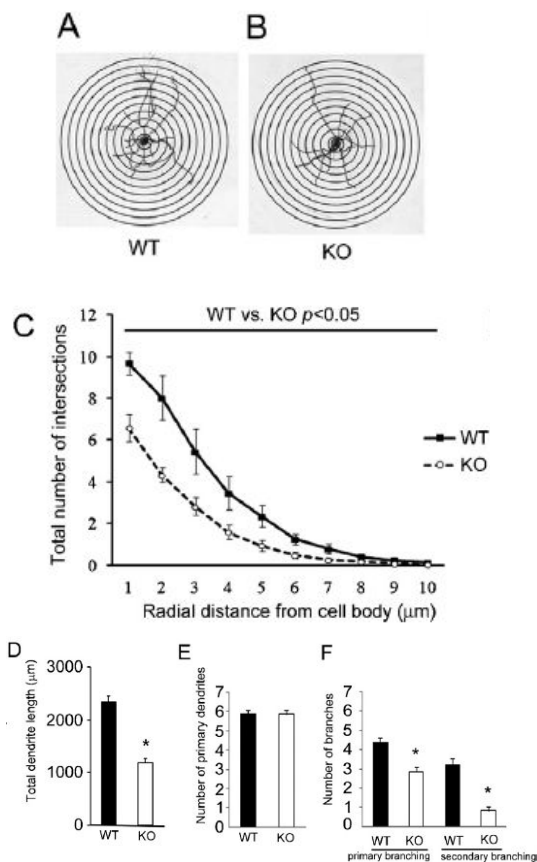


図1 抑制性介在神経細胞(basket細胞)の形態

さらに、抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素の1つである GAD67 の発現量(mRNA)を in situ hybridization 法を用いて観察したところ、DBZ ノックアウトマウスで発現の低下が見られた(図2)。

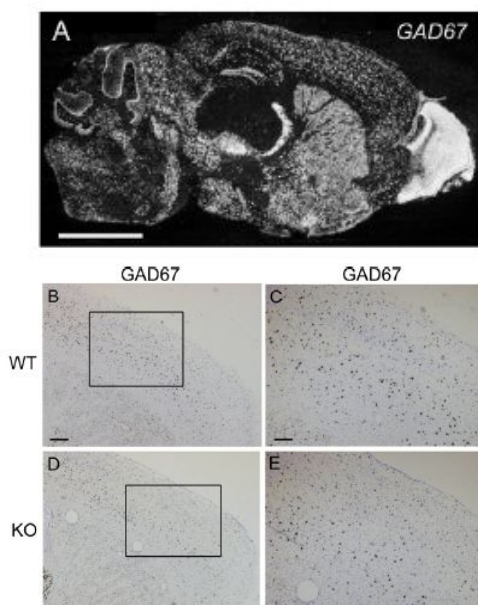


図2 GABA 合成酵素 GAD67 の発現変化

以上の結果から、DBZ は抑制性介在細胞の発達、GABA 合成酵素のひとつである GAD67 の発現量に関与することが明らかとなった。抑制性神経回路の異常は脳の可塑性に関与する可能性が報告されていること、また DBZ は統合失調症関連因子であることから、統合失調症の発症に脳可塑性の異常に関与する可能性が示唆された。今後、さらに詳細なメカニズムを検討することで、統合失調症発症メカニズムの解明、さらには新規治療薬の開発につながると考えられる。

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6件)

DISC1 (disrupted-in-schizophrenia-1) regulates differentiation of oligodendrocytes. Hattori T, Shimizu S, Koyama Y, Emoto H, Matsumoto Y, Kumamoto N, Yamada K, Takamura H, Matsuzaki S, Katayama T, Tohyama M, Ito A. PLoS One. 2014 Feb 7;9(2):e88506.

Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid-accumulation modifier. Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silverman MA, Kimura N, Sato M, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K, Kodama TS, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Kazui H, Kudo T, Hashimoto R, Itoh N, Nishitomi K, Yamaguchi-Kabata Y, Tsunoda T, Takamura H, Katayama T, Kimura R, Kamino K, Hashizume Y, Takeda M. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Feb 18;111(7):2638-43.

XLMR protein related to neurite extension (Xpn/KIAA2022) regulates cell-cell and cell-matrix adhesion and migration. Magome T, Hattori T, Taniguchi M, Ishikawa T, Miyata S, Yamada K, Takamura H, Matsuzaki S, Ito A, Tohyama M, Katayama T. Neurochem Int. 2013 Sep 24;63(6):561-569.

DBZ (DISC1-binding zinc finger protein)-deficient mice display abnormalities in basket cells in the somatosensory cortices. Koyama Y, Hattori T, Shimizu S, Taniguchi M, Yamada K, Takamura H, Kumamoto N, Matsuzaki S, Ito A, Katayama T, Tohyama M. J Chem Neuroanat. 2013 Nov;53:1-10.

TRAP1 controls mitochondrial fusion/fission balance through Drp1 and Mff expression. Takamura H, Koyama Y, Matsuzaki S, Yamada K, Hattori T, Miyata S, Takemoto K, Tohyama M, Katayama T. PLoS One. 2012;7(12):

e51912.

Mitochondrial TRAP1 regulates the unfolded protein response in the endoplasmic reticulum. Takemoto K, Miyata S, Takamura H, Katayama T, Tohyama M. *Neurochem Int.* 2011 Jul;58(8):880-7.

[学会発表](計 20 件)

プレセニリンキメラ体を用いたガンマセクレターゼ機能制御に対する検討 松崎伸介、高村明孝、三好 耕、遠山正彌、Paul Fraser、片山泰一 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014 年 3 月 27 日～29 日 栃木県下野市

Presenilin 1/2 キメラ体を用いた セクレターゼ機能制御領域の検討. 松崎伸介、高村明孝、三好 耕、石川淑子、馬込卓弥、宮武祐樹、遠山正彌、Paul Fraser、片山泰一 日本解剖学会第 89 回近畿支部学術集会 2013 年 11 月 30 日 奈良県生駒市

精神遅滞関連因子 Xpn/KIAA2022 は PC12 細胞において細胞間・細胞 基質接着に影響し細胞移動を制御する. 馬込卓弥、服部剛志、谷口 学、石川淑子、山田浩平、高村明孝、三好 耕、松崎伸介、遠山正彌、片山泰一 日本解剖学会第 89 回近畿支部学術集会 2013 年 11 月 30 日 奈良県生駒市

抑肝散による小胞体ストレス細胞死抑制における SUMO 化の役割. 松崎 伸介、渡部 音哉、岡村 麻美、高村 明孝、山田 浩平、遠山 正彌、片山 泰一. 抑肝散の基礎薬理研究会 第 9 回研究報告会 平成 25 年 11 月 27 日(水) 大阪府吹田市

TRAP1 controls mitochondrial morphology through Drp1 and Mff expression. Takamura H, Koyama Y, Matsuzaki S, Yamada K, Hattori T, Miyata S, Takemoto K, Tohyama M, Katayama T. *Neuro2013* (Joint conference of: The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 56th Annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry, The 23rd Annual Meeting Conference of the Japanese Neural Network Society), Kyoto, Japan, June 20-23(22) P3-1-245 (2013)

Mental retardation- related molecule, Xpn regulates cell-cell and cell-matrix adhesion and migration in PC12 cells. Magome T, Hattori T, Taniguchi M, Matsuzaki S, Yamada K, Takamura H, Ishikawa T, Tohyama M, Katayama T. *Neuro2013* (Joint conference of: The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 56th Annual Meeting of Japanese

Society for Neurochemistry, The 23rd Annual Meeting Conference of the Japanese Neural Network Society), Kyoto, Japan, June 20-23(21) P2-1-186 (2013)

Involvement of SUMOylation in cell death under ER stress. Matsuzaki S, Watanabe O, Okamura A, Takamura H, Yamada K, Tohyama M, Katayama T. *Neuro2013* (Joint conference of: The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 56th Annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry, The 23rd Annual Meeting Conference of the Japanese Neural Network Society), Kyoto, Japan, June 20-23(21) P2-2-73 (2013)

Phosphorylated stathmin1 regulates neurite elongation. Yamada K, Taniguchi M, Matsuzaki S, Takamura H, Hattori T, Tohyama M, Katayama T. *Neuro2013* (Joint conference of: The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 56th Annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry, The 23rd Annual Meeting Conference of the Japanese Neural Network Society), Kyoto, Japan, June 20-23(22) P3-1-80 (2013)

TRAP1 による分裂因子 Drp1、Mff 発現制御とミトコンドリア形態変化, 高村明孝, 小山佳久、松崎伸介、山田浩平、服部剛志、宮田信吾、遠山正彌、片山泰一, 第 118 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 香川県高松市、2013/3/28-30(30)

小胞体ストレス性細胞死における SUMO 化の関与, 松崎伸介, 渡部音哉, 岡村麻美, 高村明孝, 山田浩平, 遠山正彌, 片山泰一, 第 118 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 香川県高松市、2013/3/28-30(28)

Involvement of TRAP1 in morphological changes of mitochondria through the regulation of mitochondrial fission proteins. Takamura H, Koyama Y, Matsuzaki S, Yamada K, Hattori T, Miyata S, Takemoto K, Tohyama M, Katayama T. *Neuroscience2012* (Society for neuroscience 42nd Annual Meeting), New Orleans, USA, Oct 13-17(13), (2012)

TRAP1 regulates expression of mitochondrial fission proteins and morphology of mitochondria. Takamura H, Koyama Y, Matsuzaki S, Yamada K, Hattori T, Miyata S, Takemoto K, Tohyama M, Katayama T. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry/The 55th Annual Meeting of the Japanese Society

for Neurochemistry joint meeting, Kobe, Japan, Sep 30-Oct 2(Oct1), (2012)
KIAA2022 is expressed transiently and regulates neurite outgrowth. Ishikawa T, Miyata S, Koyama Y, Matsuzaki S, Yamada K, Takamura H, Magome T, Katayama T, Tohyama M, The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry/The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry joint meeting, Kobe, Japan, Sep 30-Oct 2, (2012)

Involvement of SUMOylation in ER stress pathway, Watanabe O, Matsuzaki S, Takamura H, Yamada K, Fraser P, Tohyama M, Katayama T, The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry/The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry joint meeting, Kobe, Japan, Sep 30-Oct 2, (2012)

Involvement of SUMOylation in Plaque and Tangle Pathology. Matsuzaki S, Yamada K, St George-Hyslop N, Takamura H, Katayama T, Tohyama M, Raught B, Fraser P, The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry/The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry joint meeting, Kobe, Japan, Sep 30-Oct 2, (2012)

SUMOylation Connections to Plaque and Tangle Pathology. Matsuzaki S, Yamada K, Takamura H, Tohyama M, Katayama T, Raught B, Fraser P The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Nagoya, Japan, Sep 18-21(18), (2012)

Transient expression of KIAA2022 during brain development and participation in neurite outgrowth. Ishikawa T, Miyata S, Koyama Y, Matsuzaki S, Yamada K, Takamura H, Magome T, Katayama T, Tohyama M, The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Nagoya, Japan, Sep 18-21(18), (2012)

Involvement of TRAP1 in regulation of mitochondrial morphology. Takamura H, Miyata S, Takemoto K, Koyama Y, Matsuzaki S, Tohyama M, Katayama T. The 54th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Ishikawa, Japan, Sep26-28(26) P1-28 (2011)

C57/BL6 J マウスにおける Disrupted-in-Schizophrenia 1(DISC1) の新規 isoform の同定とその mRNA 発現解析、宮武祐樹、山田浩平、高村明孝、服部剛志、小山佳久、谷口学、片山泰一、遠山正彌第 84 回日本生化学会 9 月 21 日

- 24 日(22 日)、京都市左京区、2P-0588 (2011)

TRAP1 regulates mitochondrial dynamics through the fission proteins in neuronal cells. Takamura H, Miyata S, Takemoto K, Koyama Y, Matsuzaki S, Tohyama M, Katayama T. The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Yokohama, Japan, Sep 14-17(15) P2-t09 (2011)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高村 明孝 (Takamura Hironori)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教
研究者番号：80514398