

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659539

研究課題名(和文)統合失調症における大脳基底核出力ニューロンの死後脳を用いた解析

研究課題名(英文)Gene Expression in the Substantia Nigra of Subjects with Schizophrenia

研究代表者

橋本 隆紀 (HASHIMOTO, TAKANORI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：40249959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の症状出現に関わる神経回路を解明するため、黒質網状層の抑制性ニューロンと、それにより抑制される黒質緻密層のドーパミンニューロンで、統合失調症での遺伝子発現の変化を、14対の性別と年齢がマッチした健常例および統合失調症例から得られた脳切片を用いて調べた。網状層では、抑制性伝達物質GABAの合成酵素であるGAD67のmRNA発現には有意な変化は認めなかった。緻密層では、ドーパミン合成を行うチロシン水酸化酵素およびKCNS3カリウムチャネルサブユニットのmRNA発現が有意に低下していた。膜興奮性を抑制するKCNS3の発現低下がドーパミンの放出過剰と陽性症状に関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We tested our hypothesis that GABA neurotransmission by projection neurons in the substantia nigra pars reticulata (SNR) is reduced and dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta (SNC) are hyperactive as the result. We analyzed gene expression for GAD67, an enzyme for GABA synthesis, tyrosine hydroxylase (TH), an enzyme for dopamine synthesis, and KCNS3 voltage-gated potassium channel subunit in the SNR and SNC of 14 pairs of control and sex- and age-matched schizophrenia subjects, using in situ hybridization. In the SNR, GAD67 mRNA levels did not differ between control and schizophrenia subjects. In contrast, TH and KCNS3 mRNA levels were significantly lower in the SNC of schizophrenia subjects. Our results did not support altered GABA neurotransmission by SNR neurons. However, decreased KCNS3 expression could enhance excitability of SNC dopamine neurons, contributing to positive symptoms. Lower TH level might reflect a compensatory mechanism.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経医学

キーワード：脳神経疾患 死後脳研究

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、幻覚・妄想などの陽性症状をはじめとして、感情や意欲などの情動の障害である陰性症状や、作業記憶障害に代表される認知機能低下をもたらす。さらに、統合失調症の患者やその血縁者に認められる生物学的特徴として、眼球運動異常が、繰り返し報告されている。

このような多彩な症状に関与すると考えられるのが、大脳基底核からの出力を担う黒質網状層である。黒質網状層には GABA 作動性ニューロンが存在し、抑制性の投射をドーパミン神経核、視床、上丘などの諸核へ送り、それぞれの領域の機能を調節する。例えば黒質網状層ドーパミン神経核への投射は、線条体におけるドーパミン放出を抑制している (Tepper and Lee 2007)。また、視床への投射は、視床と辺縁系皮質や前頭前野との連絡を調節することで情動や認知機能に関与する (Middleton and Strick 2000)。さらに、上丘への投射は、眼球運動を制御している (Hikosaka and Wurtz 1985)。すなわち、黒質網状層における GABA 作動性ニューロンの機能低下は、中脳辺縁系のドーパミン放出過剰 (陽性症状)、情動障害 (陰性症状)、認知機能低下、眼球運動障害などの多彩な症状を引き起こし得る。

一方で統合失調症では、大脳皮質、線条体、小脳などの多くの脳内領域で抑制性伝達物質 GABA の合成酵素である GAD67 の発現低下が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、「黒質網状層の GABA 作動性ニューロンでも伝達物質 GABA の合成の低下が存在し、このニューロンによる黒質緻密層への抑制が低下することで、ドーパミンニューロンが過活動となり、線条体におけるドーパミンの過剰放出が生じ、陽性症状に結びついている」との仮説を、ヒト死後脳組織の解析を行うことで検証した。

網状層の GABA 作動性ニューロンによる GABA 伝達の指標としては、GABA 合成酵素である GAD67 の mRNA の発現解析を行った。緻密層のドーパミンニューロンの活動性の指標としては、ドーパミン合成酵素である tyrosine hydroxylase (TH) の mRNA の解析を行った。また、膜電位を調節することでニューロンの興奮性を抑制していると考えられる KCNS3 カリウムチャネルサブユニットの mRNA の発現パターンおよび発現量の評価も行った。

3. 研究の方法

死後脳組織：性別および年齢がマッチした健常例と統合失調症例のペア 14 組 (表 1 参照) から、遺族の同意に基づいて提供された脳組

織を用いた。RNA の保存状態はすべての症例で良好であり (RIN>7.0)、健常対照例と疾患例の群間で差はなかった。

表 1：症例

	健常者	患者
数	14	14
男/女	13/1	13/1
年齢	50.7 ± 14.2	49.2 ± 13.8
RIN*	8.1 ± 0.5	7.8 ± 0.5

平均 ± 標準偏差,

*RIN: RNA integrity number by Bioanalyzer

黒質を含む中脳を、大脳および小脳から切り離した後、正中面で左右に分断し、右側を凍結した。

この凍結中脳ブロックの上丘のレベルにて、脳幹の長軸に垂直の面で、黒質を含む中脳の凍結切片を、クリオスタットにより作成し、スライドグラスに添付した。各症例から 5 枚の連続切片を作成し、スライドグラスに添付した。このうち 1 枚は細胞構築の確認のために cresyl violet 液で Nissl 染色を施し、別の 1 枚は、黒質の輪郭を定義するために acetyl choline esterase (AChE) 染色を施した。AChE 染色には、基質分解によって生じる色素沈着を利用した MBL 社のキットを用いた。

遺伝子発現：GAD67 mRNA, TH mRNA, KCNS3 mRNA のそれぞれについて、黒質における検出と定量には、各症例から 1 枚のスライドグラスを用い、in situ hybridization 法を用いた。それぞれの mRNA のタンパク質をコードしている領域に対して相補的な DNA 断片を PCR で単離し、その塩基配列がそれぞれの mRNA に完全に対応していることを確認した。この DNA 断片をもとに、放射性同位元素 ³⁵S でラベルされた CTP の存在下で、相補的 RNA プローブを合成した。合成された RNA プローブを hybridization buffer と共に切片に反応させた後、過熱したホルムアミドを含む緩衝溶液で、組織中の mRNA に hybridize していない RNA プローブを洗い落とし、さらに RNaseA 処理を施して余分なプローブを取り除いた。切片はエタノール系列を通し乾燥させた後、オートラジオグラフ用の放射線感受性フィルムに露光した。フィルムには、複数段階の放射活性を有する基準スライドグラスも同時に露光した。GAD67 は 5 日、TH は 3 日、KCNS3 は 10 日間、室温にて露光した後、フィルムの現像と定着を行った。それぞれの mRNA の発現を検出したフィルム画像は、症例ごとに Microcomputer Imaging Device (MCID) により取り込みデジタル化した。

遺伝子発現定量：各症例の AChE 染色を施した切片を MCID によりデジタル化し、AChE 陽性の構造として黒質の輪郭を決定した。この輪郭を TH mRNA のフィルム画像に重ね、その

中で TH mRNA の発現が認められる領域の輪郭を加え、TH mRNA 陽性の部位を緻密層、それ以外の領域を網状層として定義した。各症例において、黒質と緻密層の輪郭を GAD67 mRNA のフィルム画像に重ね合わせ、網状層におけるフィルム濃度を、同時に露光した基準スライドにより放射活性に転換して決定した。

次に緻密層の輪郭のなかで同様に TH mRNA の発現量をフィルム濃度として定量した。KCNS3 mRNA の黒質における発現パターンは、TH mRNA と完全に同じであり、網状層には認められなかった。そこで KCNS3 mRNA についても緻密層内で濃度を測定した。

すべてのフィルム画像で、大脳脚（白質）に相当する部位においてバックグラウンドのフィルム濃度を測定し、それぞれの mRNA のフィルム濃度から差し引いて、切片ごとの補正を行い最終的な発現量とした。

統計解析： mRNA 発現量の 14 例の健常例と 14 例の統合失調症例との間での統計学的比較は、健常 1 例と統合失調症 11 例が、性別と年齢のマッチしたペアを形成していることを反映させて、paired t-test により行った。

それぞれの mRNA の発現と年齢および RNA の保存状態(RIN)との関係を調べるために、健常例と統合失調症例を合わせたグループで mRNA 発現量とこれらの因子との相関解析を行った。

4. 研究成果

(1) GAD67 mRNA の発現細胞は、黒質網層に散在していた。GAD67 mRNA 発現レベルの平均値(±標準偏差)は、統合失調症例で 15.7 ± 15.4 nCi/g、健常対照例で 22.6 ± 13.7 nCi/g であり、統合失調症で約 30%低かったが、統計学的には有意性は認めなかった($p=0.19$) (図 1)。

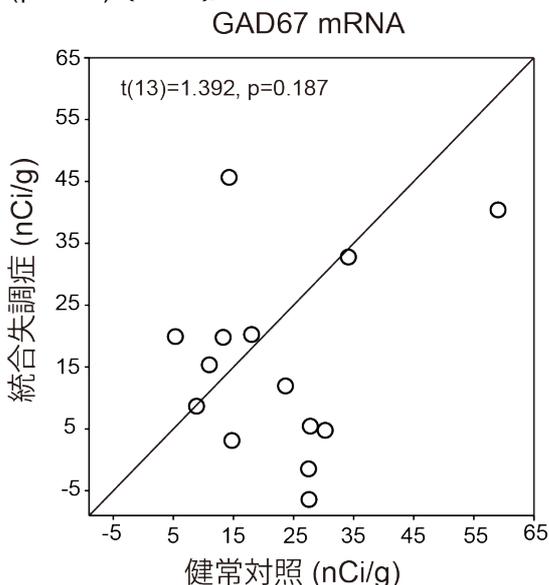


図 1 GAD67 mRNA 発現をペアごとにプロット (斜線下のペアに統合失調症での低下あり)

(2) TH mRNA の発現は、黒質緻密層に高い密度で検出された、ドーパミン細胞の集積に対応していた。TH mRNA 発現レベルの平均値(±標準偏差)は、統合失調症例で 855 ± 445 nCi/g、健常対照例で 1054 ± 333 nCi/g であり、統合失調症で約 19%の低下を認め、この差は統計学的に有意であった($p=0.03$) (図 2)。

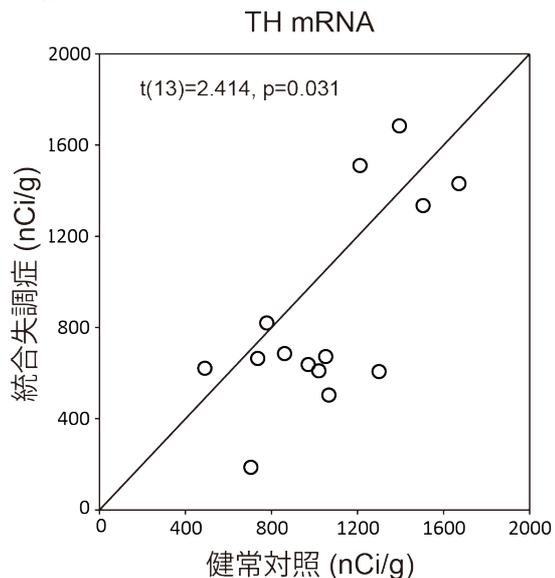


図 2 TH mRNA 発現をペアごとにプロット (斜線下のペアに統合失調症での低下あり)

(3) KCNS3 mRNA の黒質における発現は、緻密層に高い密度で検出され、TH mRNA の発現パターンと同じであった。これは KCNS3 がドーパミン細胞に選択的に発現していることを示している。KCNS3 mRNA 発現レベルの平均値(±標準偏差)は、統合失調症で 39.2 ± 33.5 nCi/g、健常対照例で 61.4 ± 24.9 nCi/g であり、統合失調症では約 36%低く、この差は統計学的に有意であった($p=0.003$) (図 3)。

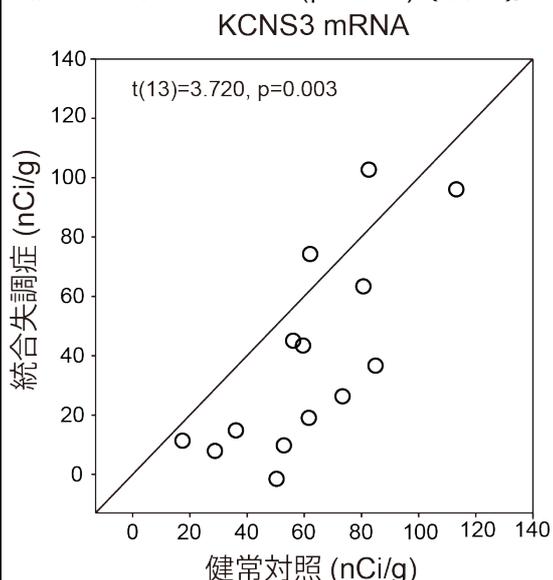


図 3 KCNS3 mRNA 発現をペアごとにプロット (斜線下のペアに統合失調症での低下あり)

(4) GAD67 mRNA, TH mRNA, KCNS3 mRNA の

発現レベルと年齢の間には有意な相関は認めなかった。一方、GAD67 mRNA および TH mRNA の発現レベルは RIN と有意な相関を示した (表 2)。

表 2

		年齢	RIN
GAD67	相関係数 R	0.36	0.51
	P	0.06	0.006
TH	相関係数 R	-0.006	0.45
	P	0.98	0.02
KCNS3	相関係数 R	0.08	0.36
	P	0.71	0.06

(5) 考察: 本研究では、黒質網状層における GAD67 mRNA の発現レベルには、統合失調症群と健常対照群の間に有意な差は認めなかった。すなわち、統合失調症において、大脳基底核からの出力を担う GABA ニューロンの変化を支持する所見は得られなかった。しかし、測定値の分散が健常対照者群および統合失調症群とも大きかったことより、14 ペアというサンプルサイズが有意な変化を検出するには不十分である可能性は否定できない。また、黒質は中脳の長軸に沿って上丘から橋の吻側まで続く構造物であり、両群間での比較には、解析を行うレベルを厳密に統一する必要がある。本研究では上丘が存在するレベルで切片を作成したが、Nissl 染色された切片における黒質の形態は、症例間で異なっていた。今後は、より多くの症例からレベルを厳密に統一した黒質切片を作成し、GABA 伝達に関連した遺伝子の発現を調べる必要がある。

一方、黒質緻密層におけるドーパミン合成酵素 TH mRNA およびカリウムチャンネルサブユニット KCNS3 mRNA の発現は、統合失調症において有意に低下していた。KCNS3 はニューロンの興奮性を抑制するカリウムチャンネルを構成しているため、その発現低下がドーパミン細胞の過剰興奮につながり、ドーパミンの放出の増加と陽性症状につながっている可能性が考えられた。TH の発現低下は、ドーパミン過剰に対する代償性の変化を示していると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 隆紀 (HASHIMOTO TAKANORI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 40249959

(2) 研究分担者

戸田 重誠 (TODA SHIGENOBU)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号: 00323006

(3) 連携研究者

()

研究者番号: