

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700358

研究課題名(和文)新規神経系細胞分化・発達調節因子としてのhnRNPA1 - 精神疾患治療を目指して -

研究課題名(英文)hnRNPA1 as a new neural cell differentiation development regulator -Aim at psychiatric disorder medical treatment-

研究代表者

眞部 孝幸 (Manabe, Takayuki)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・准教授

研究者番号：90382283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの遺伝子は2万2千個程であるが、選択的スプライシングにより十数万種以上の蛋白質を作る。選択的スプライシング調節の破綻は発達異常・疾患病態に関与し、各種脳疾患で多くの選択的スプライシング異常が知られている。統合失調症患者でも、ごく近年多くの関連遺伝子の選択的スプライシング異常が報告されている。我々は当疾患の多岐に渡る病態と、広範な選択的スプライシング抑制因子hnRNPA1の機能異常に相関性があり、脳構築に異常を呈する事を示してきた。本研究では、hnRNPA1による選択的スプライシング異常が、統合失調症患者で見られる脳構築関連因子群の機能異常を来す事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Alternative pre-mRNA splicing is a fundamental strategy for eukaryotes to provide a substantial complexity in proteome from the limited genome size. It must be precisely controlled to ensure their proper physiological functions, and thus disorders in this process often end up in serious diseases. There have been accumulating reports of aberrant splicing in the related genes in Schizophrenia (SZ), however, not much study has been carried out with regard to a splicing abnormality implicated in this disease. We have postulated that the aberrant expression of hnRNPA1, as a global splicing silencer, is involved in the pathology of SZ. Remarkably, we have obtained evidence supporting that the disturbed expression of the hnRNPA1 causes maturation defects of oligodendrocytes through aberrant splicing of SZ-related genes. These results are the first to demonstrate the role of hnRNPA1 in the development of glial cells via control of the related alternative splicing.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学神経病理学

キーワード：神経発生・分化・異常 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノムプロジェクトの成果は、ヒトの遺伝子数とその蛋白質数から予想された数を大きく下回る高々2万数千個であることを明らかにした。同時にこれは、ヒトの10数万個にもおよぶ蛋白質発現において、選択的スプライシングの重要性を我々に再認識させるものであった。この精巧かつ巧妙に制御された選択的スプライシング調節機構は、発達段階・時期特異的あるいは組織・細胞特異的にその多彩なバリエーションを発揮し、我々の高度な生命現象を支えている。したがって、選択的スプライシング制御機構の破綻は、様々な生命現象に異常を来し、時に重篤な疾病発現の引き金となる。選択的スプライシングの異常には、大きく分けて2つの原因が挙げられる。一つは、ゲノム遺伝子上レベルでスプライシングに必須あるいは重要な部位に変異が起こる場合(遺伝性)と、もう一つは、遺伝的になんら問題が無いにも関わらず、酸化ストレスなどの外的環境要因などによって起こるスプライシング調節因子群の攪乱あるいは阻害因子の出現などに起因する場合(孤発性)である。中枢神経系組織においても例外ではなく、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や、統合失調症や双極性障害などの精神疾患において、種々の各疾患関連遺伝子の選択的スプライシング異常がそれぞれ報告されている。

(2) 統合失調症は、妄想や幻聴などを主症状とする慢性精神疾患で、罹患率は約1%にも及ぶとされている。当疾患の発症には多くの遺伝的要因と環境要因が複雑に関与しており³⁾、明瞭な原因解明も根本的治療法の開発も未だなされていない。興味深いことに、ごく最近、多くの統合失調症関連遺伝子のスプライシング異常が相次いで報告されている。

(3) 統合失調症は、神経およびグリア前駆細胞の増殖、細胞移動、神経突起伸長、シナプスの成熟、希突起膠細胞(オリゴデンドロサ

イト)の分化や髄鞘化(ミエリネーション)など、幅広く脳発達に異常をきたすという多くの証拠が蓄積している。面白いことに、統合失調症で既に関連が指摘されている遺伝子で、なお且つ患者サンプルにおいて実際に異常が確認されているものみに絞っても、これら脳発達に関与する遺伝子のスプライシング異常が10遺伝子21種類報告されている。しかしながら、これら異常選択的スプライシングに積極的に焦点を当てた研究は殆どなされていないのが実情である。

(4) 統合失調症モデルや研究材料としては様々存在しているが、近年、インフルエンザウイルス感染妊娠マウスの仔が統合失調症様の行動を呈するという報告がなされ、感染・炎症に応じる免疫反応と脳分化・発達・発育が統合失調症発症に関与することが示唆され、更に申請者らは、このマウスが統合失調症発症原因候補の1つに挙げられるオリゴデンドロサイトの分化・発達、機能異常をきたすことも明らかにした。

2. 研究の目的

我々は当疾患の多岐に渡る病態と、広範な選択的スプライシング抑制因子 hnRNPA1の機能異常に相関性があり、脳構築に異常を呈する可能性を示してきた。本研究では、hnRNPA1の発現異常が本疾患および脳構築で関連が指摘されている遺伝子群の選択的スプライシングを攪乱し、結果的に多くの関連遺伝子の発現を変化させること、またオリゴデンドロサイトの分化成熟異常を来すことを示す。

3. 研究の方法

ヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞株 MO3.13 およびヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH細胞をそれぞれオリゴデンドロサイト、神経細胞へ分化させ、その時 hnRNPA1の発現を強制発現あるいはノックダウンにより増減

させたときの細胞の分化、統合失調症関連遺伝子のスプライシング、遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

(1)hnRNP A1 の過剰発現が、オリゴデンドロサイト分化（ミエリン化）に与える影響を検討するために、ヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞のセルラインMO3.13 株を用いて検討した結果、分化開始地点での過剰発現で、有意なオリゴデンドロサイトへの分化抑制が観察された。しかしながら、おもしろいことに、この分化抑制は細胞密度に依存的で、高密度による分化過程では、全く逆の有意な分化増強が見られた。同様に、神経分化への影響を検討するために、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH 細胞を用いて検討した結果、hnRNP A 1 過剰発現は、細胞密度にあまり依存せず、神経分化を抑制することが明らかになった。

(2)上記の細胞密度による逆転現象は、マイクロアレイ法を用いたその後のパスウェイ解析により、細胞MatrixMetaroprotease 群が関与していることが明らかとなった。

(3)前述のhnRNP A1 の過剰発現が引き起こすオリゴデンドロサイト分化異常時に、統合失調症関連遺伝子で且つ脳構築に関する遺伝子の異常スプライシングを解析した結果、少なくとも ErbB4 とそのリガンド Neureglin-1(NRG1：統合失調症患者でスプライシングアイソフォームI, II, III の発現比においてII の減少とI, III の上昇が報告されているが、hnRNPA1 によって同様に発現パターンが変化する)、NCAM1、およびestrogen receptor 1 遺伝子の異常スプライシングが観察された。

(4)逆に、hnRNP A1 のノックダウンによる影響を同様に検討した結果、様式は異なるものの、オリゴデンドロサイト分化を攪乱することが明らかになった。従って、hnRNP A1 の発現は、過剰でも過少でもグローバルなス

プライシング異常を起こし、神経系細胞分化を攪乱させた。

(5)hnRNP A1 が引き起こすスプライシング異常は、現在のところ前述のNRG1, ErbB4, ESR1, NCAM1 遺伝子であるが、それらを含めた異常の結果、どのような遺伝子群の発現異常が起きているのかを確認する為に、hnRNP A1過剰発現によるオリゴデンドロサイト分化時の遺伝子発現を、マイクロアレイにより一斉に解析した。面白いことに、現在まで当疾患で指摘されている原因仮説に關与する多くの遺伝子がヒットした。

これら結果は、まだブラックボックスな部分が多いことは確かであるにせよ、hnRNP A1 発現の攪乱が結果的に統合失調症様の遺伝子発現の攪乱を引き起こしていることを示している。ここまで挙げてきた、グローバルな選択的スプライシング抑制因子の一つ hnRNP A1 が、選択的スプライシングの調節を介して、神経系（神経細胞とグリアの両方）細胞分化・成熟において重要な役割を果たしているという多くの予備結果は、これまで全く新規の知見である。更に本研究課題の結果により、近年注目されてきた「RNA 病（狭義にスプライシング病）」なる概念をより広く提唱・創造できるかもしれない。

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 7 件)

Terada K, Izumo N, Suzuki B, Karube Y, Morikawa T, Ishibashi Y, Kameyama T, Chiba K, Sasaki N, Iwata K, Matsuzaki H, Manabe T., Fluvoxamine moderates reduced voluntary activity following chronic dexamethasone infusion in mice via recovery of BDNF signal cascades, *Neurochemistry International*, 査読有、69 巻、2014、9-13

doi: 10.1016/j.neuint.2014.02.002.

Iwata K, Café-Mendes CC, Schmitt A, Steiner J, Manabe T, Matsuzaki H, Falkai P, Turck CW, Martins-de-Souza D.、The human oligodendrocyte proteome、Proteomis、査読有、13 巻、2013、3548-3553

doi: 10.1002/pmic.201300201.

眞部孝幸、森川智美、統合失調症における選択的スプライシング調節の破綻、藤田学園医学会誌、査読無 37 巻、2013、15-20.

Nishiyama C, Uesaka T, Manabe T, Yonekura Y, Nagasawa T, Newgreen DF, Young HM, Enomoto H.、Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source for the colonic enteric nervous system、Nature Neuroscience、査読有、15 巻、2012、1211-1218

doi: 10.1038/nn.3184.

Iwata K, Izumo N, Matsuzaki H, Manabe T, Ishibashi Y, Ichitani Y, Yamada K, Thanseem I, Anitha A, Mundalil Vasu M, Shimmura C, Wakuda T, Kamenno Y, Takahashi T, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Mori N.、Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats、Molecular Autism、査読有、3 巻、2012、11

doi: 10.1186/2040-2392-3-11

Matsuzaki H, Iwata K, Manabe T, Mori N.、Triggers for Autism: genetic and environmental factors、Journal of Central Nervous System Disease、査読有、4 巻、2012、27-36

doi: 10.4137/JCNSD.S9058.

Izumo N, Ishibashi Y, Ohba M, Morikawa T and Manabe T.、Decreased voluntary activity and

amygdala levels of serotonin and dopamine in ovariectomized rats、Behavioural Brain Research、査読有 227 巻、2012、1-6

doi: 10.1016/j.bbr.2011.10.031.

〔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

眞部 孝幸 (MANEBE, Takayuki)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・准教授
研究者番号：90382283

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：