

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293249

研究課題名(和文)統合失調症の遅発性神経炎症仮説の証明と予防法の開発

研究課題名(英文) Latent neuroinflammation hypothesis on schizophrenia

研究代表者

岩田 泰秀 (IWATA, YASUHIDE)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10285025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、fractalkine(FKN)から可溶性FKNを産生する病態プロテアーゼ活性を、in vivoにてMRIで画像化するためのMRIスイッチング・プローブを創製した。そして、ニューロン・ミクログリア共培養系における可溶性FKNの産生を、paramagnetic relaxationの原理に基づくMRIスイッチング・プローブを設計・合成し、NMRにてリアルタイムで定量的に解析することに成功した。また、ここでは、統合失調症の培養脳スライスモデルを調製し、そこでの炎症反応の生起に伴うミクログリアでの遺伝子発現変化を解析することによって、ミクログリアの活性化に關与する脳内因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：In the present study magnetic resonance imaging (MRI) switching probe was newly developed to visualize in vivo under MRI the activity pathological proteinase, which generates soluble fractalkine (FKN) from membrane bound form of FKN. The production of soluble FKN in the co-culture system of neuron and microglia was quantitatively analyzed according to the principle of paramagnetic relaxation, where MRI switching probe was originally designed and synthesized. And here the brain slice culture system derived from rodent model of schizophrenia was used to comprehensively analyze gene expression pattern in microglia at the onset of inflammation. As the results a series of molecules associated with the activation of microglia were identified.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 ミクログリア NMR MRI

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、思春期前後に発症し、幻覚妄想、自発性欠如や感情鈍磨、認知機能障害を呈し社会機能の障害を残す進行性の精神疾患である。ドパミン拮抗薬が有効であることを根拠にドパミン仮説が提唱されてきたが、これを証明する証拠は得られていない。一方、統合失調症では免疫系の異常があることは以前から知られている。

最近、我々は頭部専用ポジトロン断層撮影 (PET) を用いて、世界で初めて、初発で未治療の統合失調症患者の脳では広汎な部位でミクログリアが活性化していることを明らかにした。これは統合失調症患者の脳では発症初期よりミクログリア活性化を伴う炎症反応が惹起していることを示唆するものである。一方、既に服薬している統合失調症患者の脳では活性化ミクログリアのわずかな上昇しか見られない (van Berckelら、Biol Psychiatry 2008; Doorduïnら、J Nucl Med 2009; Takanoら、2010)。この相違については、in vitro 実験において、抗精神病薬がミクログリアの活性化を抑制するという研究結果から理解できる (Bianら、Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2007)。すなわち、統合失調症の病態にはミクログリア活性化が関与しており、抗精神病薬の効果は抗ミクログリア活性化作用を介している可能性が示唆される。事実、ミクログリアの活性化を抑制する作用をもつミノサイクリンは統合失調症の症状を緩和させる (Miyaoakaら、J Clin Neuropharmacol 2008)。

一方、統合失調症ではその発症リスクの多くが胎生期にあるにもかかわらず、症状が明らかになるのは思春期以降である。すなわち、20年以上の無症候期がある。これまで、この遅延を動物モデルで再現しようと試みられてきた。例えば、胎生期のウイルス感染仮説に基づいた polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) モデルがある。Poly I:Cはウイ

ルス2本鎖RNA と同様の免疫活性を持つ。妊娠中期に母体にpoly I:Cを投与して生まれたマウスは、成獣になって初めて統合失調症の障害と近似した異常を示した (Ozawaら、Biol Psychiatry, 2006)。最近、我々はラットの poly I:Cモデルを作成したところ、脳内のミクログリアは4週齢では生食群と差が無かったが、8週齢になると顕著に増加していることを見出した。すなわち、poly I:Cマウスで見られた、成獣になってから生じる統合失調症類似の異常所見の背景には、ミクログリアの遅発性の活性化が関わっていることが示唆される。

これらのことから我々は、統合失調症の病態には活性化ミクログリアが関与しており、この活性化は遅発性に生じるとする、「統合失調症の遅発性神経炎症仮説」を提唱する。統合失調症の危険因子として、ウイルス感染、産科合併症、遺伝子因子など多様であるが、いずれも最終的には遅発性にミクログリアを活性化するという点で共通の生物学的基盤を有すると考える。

2. 研究の目的

本研究ではこの仮説を検証するために、ミクログリアの活性化にかかわる分子群の探索を行うと同時に、遅発性に神経炎症を生じる統合失調症動物モデル (ラットおよびマーマセット) を用いて、脳内のミクログリアの活性化を阻止する予防薬を作成する。

3. 研究の方法

・ミクログリアの活性化の仕組みの探究

統合失調症の発症初期に、ミクログリアが休止状態から活性化し、さらに慢性的に炎症を持続している仕組みを探究するため、統合失調症モデル動物として poly I:C ラットを用い、ミクログリアの活性化を惹起する脳内分子群を探究する。

ニューロン膜上のリガンド様タンパク質

である CX3CR1 と CD200R は、ミクログリア上にあるフラクタルカイン(fractalkine : FKN)、CD200 それぞれとの結合により、ミクログリアを休止状態に留めている。膜結合 FKN は、統合失調症脆弱因子 DISC1 の機能調節に与る ADAM10 によりプロセシングされ、可溶性 FKN リガンドを生じる (Hundhausen ら、Blood 2003)。ミクログリアの自律的活性化には ITAM-Syk 情報伝達系が機能し、その抑制には ITIM 情報伝達系が機能することが明らかになっているが、統合失調症では単球における ITAM-Syk 情報伝達系を賦活する TREM1 と DAP12 の発現が増加していることが報告されている(Weiqelt ら、Brain Behav Immun 2011)。これらの所見から、統合失調症の脳で認められているミクログリア活性化は、ニューロン・ミクログリア相関の破綻による、FKN-CX3CR1 情報伝達系、CD200-CD200R 情報伝達系の抑制に加え、ITAM-Syk 情報伝達系の賦活もしくは ITIM 情報伝達系の抑制により生じていることが示唆される。本研究では、poly I:C マウスにて、ミクログリアの過剰な活性化が惹起される過程を、申請者ら独自の脳内分子動態解析技術を組合せ解析する。各情報伝達系を制御している分子群の探索統合失調症の脳で、ミクログリアの活性化を抑制している FKN-CX3CR1・CD200-CD200R 情報伝達系がいかんして阻害されるか、あるいはミクログリア活性化シグナルを担う ITAM-Syk 情報伝達系がいかんして賦活されるか、を探究するため、病態モデル動物 poly I:C マウスより採取したニューロンとミクログリアにおいて、各情報伝達系を制御している分子群を探索する。

caspase-3/-7 等のプロテアーゼ様酵素の活性を培養細胞にて蛍光イメージングもしくは NMR で定量解析することができる申請者ら独自の分子動態解析技術を基に、タンパク質プロセシングを *in vivo* で観察できる MRI を創出する(Inomata ら、Nature 2009)。

これにより、モデルマウスの脳内で FKN 産生の変化を経時的に追うことが可能となる。すなわち、動物を殺すことなく、ミクログリア活性化のタイミングを知ることができるようになるということである。

病態脳における可溶性 FKN 産生の低下は、ミクログリア活性化に先だって生じることが報告されているので(Cook ら、J Biol Chem 2010)、poly I:C マウスにて、精神症状の行動学的解析を行いつつ、上記 MRI による可溶性 FKN 産生 *in vivo* イメージングとを併せて行い、発症超早期のマウス脳スライスを調製する。

その超早期 poly I:C マウスの脳組織から、レーザーマイクロダイセクション法(LMD 法)によりニューロンとミクログリアを採取し、それら細胞での遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析する。

また、FKN-CX3CR1 情報伝達系、CD200-CD200R 情報伝達系の阻害は、ニューロンにおける FKN と CD200、ミクログリアにおける CX3CR1 と CD200R の発現減少もしくは機能低下等に起因するので、それら遺伝子の転写調節因子、及び、受容体結合タンパク質の探索を、免疫沈降、プルダウンアッセイ、蛍光相関分光法(FCS)等によって行い、それを上記 DNA マイクロアレイの解析結果と照合する。

加えて、採取したニューロンとミクログリアから核画分を調製し、FKN、CD200、CX3CR1、CD200R に関連するトランスクリプトーム・メチローム解析を行うことにより、関連分子を検索する。

ITAM-Syk 情報伝達系(賦活系)の内因性リガンドの検索・同定。ITAM-Syk 情報伝達系は ITIM 情報伝達系と拮抗的に機能し、TREM2 や SIRPβ1 等の膜受容体にリガンドが結合することで賦活するが、病態脳にてミクログリア活性化を惹起する内因性リガンドはまだ分かっていない。また、ITAM-Syk 情報伝達系の

持続的な賦活は、統合失調症の病態生理にかかわる慢性炎症の分子基盤をなすと考えられる。

そこで本研究では、polyI:C マウスより発症超早期の脳組織を調製し(上記) TREM2 と SIRPβ1 に結合する内因性リガンドをアフィニティークロマトグラフィ/質量分析等で探索する。さらに LMD 法にて 100μm² 程度の隣接する微小な領域を脳スライスから採取し、それを質量分析計に掛けプロテオーム解析することにより、活性化ミクログリア膜受容体に結合しているリガンド分子を同定する。

・ 予防薬の開発

すでに、FKN-CX3CR1 情報伝達系、CD200-CD200R 情報伝達系の抑制により病態脳炎症反応、すなわちミクログリア活性化を惹起させる過程の解析を終えている。次年度では、病態モデル動物を用いて、遅発性ミクログリア活性化の予防薬の開発に着手する。前述の通り、統合失調症ではミクログリア活性化を抑制する FKN-CX3CR1 情報伝達系、CD200-CD200R 情報伝達系の機能障害が示唆されるため、CX3CR1 や CD200R に対するアゴニストには神経炎症抑制効果が期待される。よって本研究では、FKN と CD200 の受容体結合部位の配列を基にペプチドを合成し、これが予防薬としての効果を持つかどうかを検証する。当該ペプチドには、狂犬病ウイルス糖タンパク質(RVG)を結合することにより、血液脳関門透過性を持たせる(Kumar ら, Nature, 2007)。また、安定同位体標識した CX3CR1 及び CD200R に結合するアゴニスト低分子化合物を、既に申請者らが構築済の膜受容体結合低分子化合物ライブラリーから個体 NMR により探索する。そして、それら受容体アゴニストの生理活性を、LPS で活性化を誘導した初代培養ミクログリアで解析する。

・ ラットモデルによる、予防薬(FKN-RVP、CD200-RVP)の効果判定

妊娠 7 日のウィスターラットを 4 匹購入。

1 週間の安静の後、妊娠 E15、16 に poly I:C (1mg/kg) を腹腔内投与する。

4 グループに分けて、それぞれ polyI:C・予防薬(+)、polyI:C・予防薬(-)、生食・予防薬(+)、生食・予防薬(-)とする。

生後 4 週間で離乳。離乳後から毎週 1 回 FKN プロセッシング MRI を行う。

FKN プロセッシングが見られた時点で予防薬(FKN-RVG、CD200-RVG 混合)を腹腔内投与する。

10 週齢から以下の行動評価を行う。

(1) 社会的行動(social interaction)の評価

(2) 空間認知・学習の評価

(3) 驚愕反応の先行刺激に寄る抑制(プレパルスインヒビション:PPI)

(4) メタンフェタミン感受性(運動量の亢進)

脳の組織学的検討: IBA-1(+)細胞の定量

結果の統計解析

4 . 研究成果

自閉症患者脳内ミクログリアの PET イメージングにより、その病態生理との関連が確認された活性化ミクログリアの脳内動態解析技術の創出に関する取り組みでは、fractalkine(FKN)から可溶性 FKN を産生する病態プロテアーゼ活性を、in vivo にて MRI で画像化するための MRI スイッチング・プローブを創製した。そして、ニューロン・ミクログリア共培養系における可溶性 FKN の産生を、paramagnetic relaxation の原理に基づく MRI スイッチング・プローブを設計・合成し、NMR にてリアルタイムで定量的に解析することに成功した。

また、統合失調症の培養脳スライスモデルを調製し、そこでの炎症反応の生起に伴うミクログリアでの遺伝子発現変化を解析することによって、ミクログリアの活性化に関与

する脳内因子を同定した。ここでは、ミクログリア特異的に緑色蛍光タンパク質(EGFP)を発現する遺伝子改変マウスの胎仔を、polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (poly(I:C))に感染させた作製した統合失調症マウスモデル(EGFP-Schi マウス)の若年個体脳にて、申請者ら独自の蛍光機能プローブにより、IL-1 前駆体から IL-1 を生成するカスペーゼ 1 の酵素活性を、生組織中でリアルタイムにイメージングし、ミクログリア活性化に先立つ炎症反応の惹起を検出することに成功した。さらに、炎症反応の初段階におけるカスペーゼ 1 の賦活と、それに続く IL-1 産生に伴う蛍光機能プローブからの蛍光生成直後に、laser capture microdissection (LCM)によりミクログリアを分離し、ミクログリアにおける遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイを用い解析することで、ミクログリアの活性化を誘引する炎症性因子を同定した。そして、申請者らの統合失調症患者での PET によるミクログリアの脳内動態解析の結果、顕著なミクログリアの活性化を認められた内側前頭前野等の脳領域について、EGFP-Schi マウスの脳スライスで、電子顕微鏡による形態学的解析とパッチクランプ法による神経回路解析を行った結果、活性化ミクログリアの生理的機能調節に働く傍ミクログリア神経回路の形態学的所見を取得するとともに、ミクログリア活性化抑制に作動するニューロン・グリア相関の分子基盤を同定した。

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2件)

1. Inoue K, Leng T, Yang T, Zeng Z, Ueki I, Xiong ZG. Role of serum- and glucocorticoid- inducible kinases in

stroke. J Neurochem. 2016. doi: 10.1111/jnc.13650.

2. Murakami G, Nakamura M, Takita M, Ishida Y, Ueki I, Nakahara D. Brain rewarding stimulation reduces extracellular glutamate through glial modulation in medial prefrontal cortex of rats. Neuropsychopharmacology 40, 2686-2695, 2015.

[学会発表](計5件)

1. 井上浩一, 佐久間英輔, 森本浩之, 和田郁雄, 植木孝俊. リン酸化酵素 SGK によるモクログリア活性の調節. 第121回日本解剖学会総会全国学術集会, 2016年3月28日, 福島県郡山市
2. Yasuhide Iwata, Katsuaki Suzuki, Norio Mori, Microglial activation in first-episode and drug-naïve schizophrenia. The 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology. 2014/6/22-26. Vancouver, British Columbia, Canada
3. 植木孝俊, ミクログリアを治療標的とした神経変性疾患治療戦略の構築, 第119回日本解剖学会総会全国学術集会シンポジウム「グリア細胞研究の最前線」(招待講演), 2014年3月29日, 栃木県下野市
4. Takatoshi Ueki, Saki Ide, Moeko Murano, Kumiko Shibasaki, Saori Morikawa, Yasuomi Ouchi. Function of CD44 in NG2 progenitor cell differentiation and the potential of CD44 as the therapeutic target for multiple sclerosis. 米国神経科学会年会, 2014/11/17, Washington DC Conference Center.
5. 岩田泰秀, 脳内活性型ミクログリアを

指標とした統合失調症の発症前診断システムの構築，第12回統合失調症研究会（招待講演），2016年2月13日，東京品川

研究者番号：30402358

(3)連携研究者
なし

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

{その他}

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩田 泰秀 (Yasuhide, Iwata)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10285025

(2)研究分担者

森 則夫 (Norio, Mori)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00174376

植木 孝俊 (Takatoshi, Ueki)

名古屋市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：60317328

和久田 智靖 (Tomoyasu, Wakuda)

浜松科大学・医学部・助教

研究者番号：80444355

横倉 正倫 (Masamichi, Yokokura)

浜松科大学・医学部・助教

研究者番号：00529399

高橋 太郎 (Taro, Takahashi)

浜松科大学・医学部・助教