

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870494

研究課題名(和文) レクチンタンパクは精神疾患の病態メカニズムに関与するか？

研究課題名(英文) Implication of lectin proteins for pathogenesis of mental disorders.

研究代表者

梶谷 康介 (Kajitani, Kosuke)

九州大学・基幹教育院・准教授

研究者番号：10597272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は多機能分子であるレクチンタンパクの一種、ガレクチンの中枢神経における発現・機能に注目し、ガレクチンと精神疾患との関係を明らかにすることである。我々は本研究で以下の4つのことを明らかにした。1. マウス海馬において、ガレクチン-1が海馬の介在神経に発現する(ガレクチン-1陽性細胞の77%が介在神経マーカーであるソマトスタチン陽性)、2. マウス海馬における介在神経数はガレクチン-1欠損マウスと野生型マウスに差を認めない、3. 統合失調症患者における血清ガレクチン-3濃度は健常者より優位に上昇している、4. 統合失調症の一部の精神症状とガレクチン-3濃度は正の相関を示す。

研究成果の概要(英文)：Galectin (gal) is one of several well-studied proteins among the lectin families which are involved in various biological processes. The purpose of this project is to clarify the relationship between gal and mental disorders. In this study, we reported several new findings as follows: 1) 77% of gal-1-positive cells expressed somatostatin and 79% of gal-1-positive cells expressed GAD67 in the mouse hippocampus, 2) We counted the number of somatostatin-, parvalbumin-, and GAD67-positive cells in the hippocampi of both gal-1 knockout and wild-type mice. However, no significant differences were found, 3) The serum galectin-3 levels were significantly higher in patients with schizophrenia than they were in controls, 4) A significant positive correlation was found between the serum galectin-3 level and the positive symptoms score of the Brief Psychiatry Rating Scale.

研究分野：精神医学

キーワード：ガレクチン-1 ガレクチン-3 統合失調症 マウス 海馬 介在神経

1. 研究開始当初の背景

レクチンタンパクは糖鎖と結合するタンパク質と定義され、生体内において様々な役割を担っている。レクチンタンパクの内、ガラクトシダーゼと結合する群はガレクチンと呼ばれている。ガレクチンファミリーの中で最も研究されているのがガレクチン-1であり、細胞接着、細胞分裂、プログラムされた細胞死などの生命現象において重要な役割を担っている。近年特にガレクチン-1の神経系における機能(軸索伸長、神経新生など)が注目されている。申請者は以前、カイン酸による興奮毒性下の海馬のアストロサイトにおいてガレクチン-1が高発現することを見出した。さらに興奮毒性下に海馬歯状回で起こる神経新生の亢進が、ガレクチン-1によって促進されることを見出した。この発見はガレクチン-1が脳への侵襲に対して保護的に働くことを意味し、ガレクチン-1が中枢神経疾患の病態メカニズムに関与する可能性を示唆している。他の先行研究からも、ガレクチンをはじめとするレクチンタンパクが中枢神経において重要な役割を担っているのは明白であるが、その意義は十分検討されているとは言えない。ましてはレクチンタンパクと精神疾患との関係を明らかにした先行研究はほとんどない。本研究は、今までに関連性が不明であったレクチンタンパクと精神疾患との関係を類推する斬新な仮説に基づく研究である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、レクチンタンパクの一種であるガレクチン-1の中枢神経における発現・機能に注目し、ガレクチン-1と統合失調症の関係を明らかにすることである。具体的には、(1)ガレクチン-1の Maus 海馬における分布の検討、(2)多重蛍光免疫染色によるガレクチン-1陽性細胞の特徴の検討、(3)ガレクチン-1欠損 Maus と野生型 Maus における介在神経細胞数の比較、(4)統合失調症患者における血清ガレクチン濃度の測定、を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 野生型 Maus (WT Maus) の海馬におけるガレクチン-1陽性細胞の特徴を更に詳細に検討する。「野生型」とは遺伝子欠損・異常のない正常な状態を示す。WT Maus 脳を用い、抗ガレクチン-1抗体により免疫染色を行い、海馬におけるガレクチン-1陽性細胞の分布を光学顕微鏡にて観察した。3匹の Maus の両側海馬のガレクチン-1陽性細胞数を、海馬の小区域(subregion)毎にカウントした。

(2) WT Maus の脳切片を用い、多重蛍光免疫染色によりガレクチン-1陽性細胞と、一般的な神経マーカーである NeuN, β -Tubulin III (Tuj1), そして介在神経マーカーである GAD67, parvalbumin, somatostatin, calretinin, calbindin, neuropeptide Y

(NPY) の発現を検討した。蛍光染色のシグナルは、共焦点顕微鏡により観察された。3匹の Maus の両側海馬のガレクチン-1陽性細胞数を、海馬の小区域(subregion)毎にカウントした。

(3) ガレクチン-1欠損(KO) Maus および WT Maus における介在神経数をステレオロジー解析で比較検討した。KO Maus は遺伝子改変技術によってガレクチン-1遺伝子のみを欠損した Maus を示す。ステレオロジー解析とは3次元構造に関する情報を2次元の断面から抽出し、定量化する技術である。比較する介在神経のマーカーとして、somatostatin, parvalbumin, GAD67 を選択した。

(4) 統合失調症患者の血中ガレクチンの濃度測定を行なった。九州大学病院精神科の関連病院へ研究協力を依頼し、研究に参加する被験者を募集した。その結果、統合失調症群36名、健常者群36名が本研究に参加した。尚、血液サンプルの収集においては、各施設の倫理委員会の承認後、サンプル提供者の同意の元で行われた。ヒトガレクチン濃度の測定は既に販売されている ELISA kit (ガレクチン-1およびガレクチン-3) を用いた。

4. 研究成果

(Maus 海馬におけるガレクチン-1陽性細胞の分布)

免疫染色により WT Maus 海馬におけるガレクチン-1陽性細胞の分布を観察した。その結果、ガレクチン-1陽性細胞は oriens layer (ori; $28.5 \pm 1.77\%$), pyramidal cell layer (pyr; 18.2 ± 0.28), hilus ($14.2 \pm 0.38\%$), and subiculum (sub; $34.5 \pm 2.00\%$) に発現していた。一方、ガレクチン-1陽性細胞は radiatum (rad; $4.3 \pm 0.93\%$) and molecular layer (mol; $0.40 \pm 0.21\%$) にはほとんど観察されなかった。またガレクチン-1陽性細胞は長い神経軸索を持っていることが分かった。(図1参照)

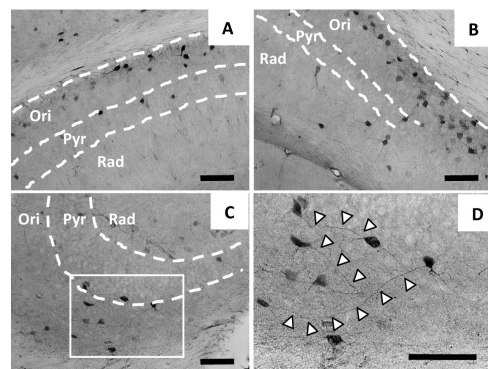


図1 Maus海馬におけるガレクチン-1陽性細胞の分布。A: CA1領域におけるガレクチン-1陽性細胞。B: Subiculumにおけるガレクチン-1陽性細胞。C: CA3領域におけるガレクチン-1陽性細胞の分布。D: ガレクチン-1陽性細胞の拡大図。ガレクチン-1陽性細胞は長い突起・軸索にも発現していることがわかる。

(多重蛍光免疫染色によるガレクチン-1 陽性細胞の特徴の検討)

多重蛍光免疫染色法により、ガレクチン-1 陽性細胞の特性を検討した。その結果、ほとんどのガレクチン-1 陽性細胞が神経マーカーである NeuN 陽性 (93%)、 β -Tubulin III (Tuj1)陽性(88%)であった。次に介在神経マーカーによる免疫染色を行なったところ、ガレクチン-1 陽性細胞のうち、77%が somatostatin 陽性、79%が GAD67 陽性であった。これらの結果は、ガレクチン-1 が介在神経に発現することを示しており、ガレクチン-1 が海馬における新しい介在神経マーカーになりうることを示している。(図 2)(表 1)

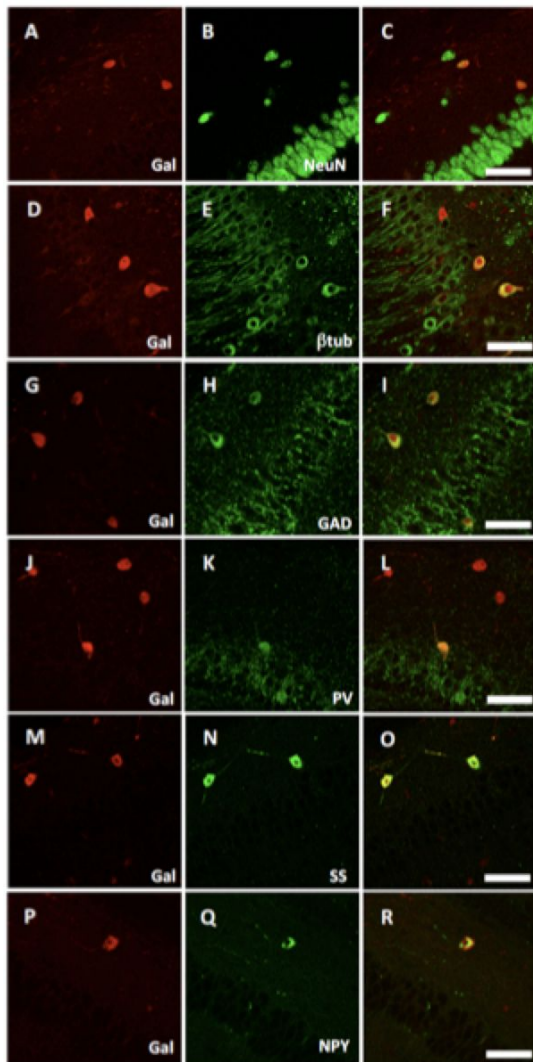


図 2: 多重蛍光免疫染色によるガレクチン-1 の特徴の検討。(A-C) ガレクチン-1(赤)と NeuN(緑)の関係。(D-F) ガレクチン-1(赤)と β -tubulin III(緑)の関係。(G-I) ガレクチン-1(赤)と GAD(緑)の関係。(J-L) ガレクチン-1(赤)と parvalbumin(緑)の関係。(M-O) ガレクチン-1(赤)と somatostatin(緑)の関係。(P-R) ガレクチン-1(赤)と neuro peptide Y(緑)の関係。Scale bars: 50 μ m. Gal-1, Galectin-1; β tub, β -tubulin III; GAD, GAD67; PV, parvalbumin; SS, somatostatin; NPY; neuro peptide Y.

Percentage of cells expressing markers for interneurons in gal-1-positive cells.

Region	GAD67	Parvalbumin	Somatostatin	Calretinin	Calbindin	NPY
Hilus	79.1 \pm 2.86	3.03 \pm 3.03 ^b	76.1 \pm 0.58	1.67 \pm 1.67 ^b	1.45 \pm 1.45 ^b	74.1 \pm 3.72
Pyr	73.5 \pm 5.60	50.2 \pm 4.11 ^a	69.6 \pm 5.07	9.59 \pm 2.30 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b	50.5 \pm 9.09 ^a
Ori	83.6 \pm 3.36	29.7 \pm 3.52 ^a	83.1 \pm 1.34	4.23 \pm 2.41 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b	33.7 \pm 3.93 ^b
Sub	76.2 \pm 0.67	46.7 \pm 10.9	76.7 \pm 7.73	4.81 \pm 2.78 ^b	5.13 \pm 0.82 ^b	17.8 \pm 4.68 ^b
wHP	78.6 \pm 2.46	33.8 \pm 3.43 ^a	76.9 \pm 1.78	5.15 \pm 0.35 ^b	2.56 \pm 0.77 ^b	38.1 \pm 4.40 ^b

表 1: ガレクチン-1 陽性細胞の特徴。Hilus, hippocampal hilus; Pyr, pyramidal cell layer; Ori, stratum oriens; Sub, subiculum; wHP, whole hippocampus, NPY; neuro peptide Y
^ap<0.05, ^bp<0.001, one-way ANOVA with Newman-Keuls test, N=3 per group, Mean \pm SEM.

(ガレクチン-1 欠損が介在神経に及ぼす影響)

次に我々は、ガレクチン-1 欠損(KO)マウスと野生型マウス(WT)海馬における介在神経細胞数をステレオロジー解析で比較検討した。介在神経のマーカーとして、table1の結果を参考に、抗 somatostatin 抗体、抗 parvalbumin 抗体、抗 GAD67 抗体により免疫染色を行なった。ステレオロジー解析により、KO および WT マウスの各マーカー陽性細胞数を比較したところ、両群(KO vs WT)において有意な差を認めなかった。(図 3)

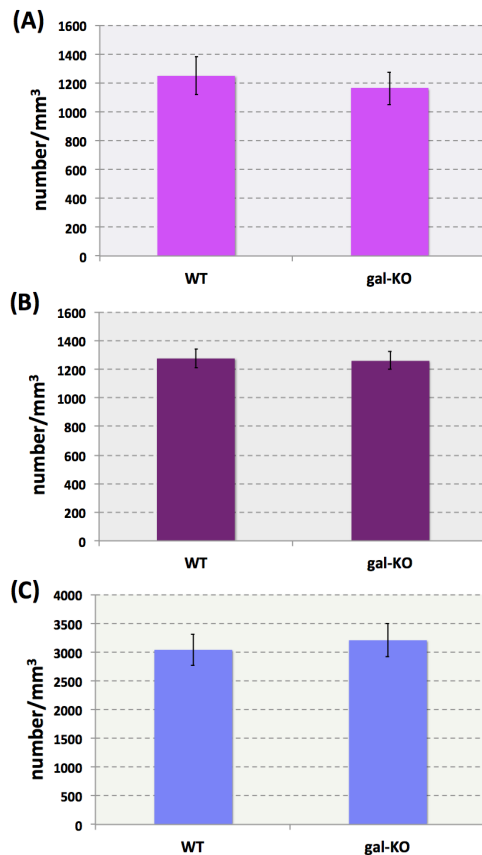


図 3 WT および KO マウスにける介在神経マーカー陽性細胞数の比較。(A) Somatostatin 陽性細胞数の比較。(B) Parvalbumin 陽性細胞数の比較。(C) GAD67 陽性細胞数の比較。一グループあたり 4 匹のマウスの両側海馬を比較した。いずれも両群に有意な差を認めなかった。

(統合失調症患者におけるガレクチン-1 およびガレクチン-3 濃度)

次に我々は統合失調症患者および健常者から血清を採取し、ガレクチン-1 およびガレクチン-3 の濃度を比較した(図 4: 未発表データ)。その結果、予想外にもガレクチン-1 においては統合失調症群、健常者群の間で優位な差を認めず、一方、ガレクチン-3 については統合失調症群で上昇を認めた。しかも、ガレクチン-3 の濃度は統合失調症の陽性症状と正の相関を認めた(未発表データ)。この結果は、ガレクチン-1 が統合失調症の介在神経障害を反映するマーカーではないことを示し、更にガレクチン-3 が統合失調症の病態メカニズムに何らかの形で関与していることを示唆している。

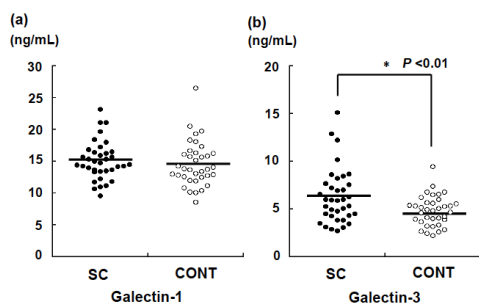


図4: 血清ガレクチン-1 およびガレクチン-3 の散佈図
黒丸は統合失調症患者(SC)を、白丸(CONT)は健常者を示す。(a) 血清ガレクチン-1 の濃度比較。両群に有意な差を認めなかった。(b) 血清ガレクチン-3 濃度の比較。統合失調症群は健常者に比べて、ガレクチン濃度は有意に上昇していた($p = 0.009$)。

(今後の方針)

ガレクチンと統合失調症の関係を明らかにするために本研究を始めた。当初はガレクチン-1 と統合失調症の関係を検討していたが、ヒト血清サンプルを用いた研究では、ガレクチン-3 が統合失調症と関係が示唆された。ガレクチン-3 と統合失調症との関係については現在海外の学術雑誌に投稿中である。今後は、ガレクチン-3 の上昇が統合失調症特異的な現象なのかを明らかにするために、他疾患(うつ病、双極性障害、自閉症スペクトラム障害、ADHD、社交不安障害)においても同様の研究を行う予定である。

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 2 件)

(1) Yuko Kobayakawa, Kunihiro Sakumi, Kosuke Kajitani, Françoise Poirier, Toshihiko Kadoya, Hidenori Horie, Jun-ichi Kira, Yusaku Nakabeppu. Galectin-1 deficiency improves axonal swelling of motor neurons

in SOD1G93A transgenic mice, *NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY*, 41, 227-244, 2015 (査読あり)

doi: 10.1111/nan.12123.

(2) Kosuke Kajitani, Yuko

Kobayakawa, Hiroko Nomaru, Toshihiko Kadoya, Hidenori Horie, Yusaku Nakabeppu, Characterization of galectin-1-positive cells in the mouse hippocampus. *NEUROREPORT*, 25, 171-176, 2014 (査読あり)

doi: 10.1097/WNR.000000000000068.

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 梶谷 康介, 門屋 俊彦, 堀江 秀典, 中別府 雄作, Characterization of galectin-1-positive cells in the mouse hippocampus: the relevance of galectin-1 to interneurons. 第 38 回日本神経科学大会, 2015.07.30. 「神戸国際会議場(神戸市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶谷 康介 (Kajitani, Kosuke)
九州大学・基幹教育院・准教授
研究者番号: 10597272

(2) 研究協力者

中別府 雄作 (Nakabeppu Yusaku)