

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06790

研究課題名(和文) アストロサイトに高発現するDISC1の機能解析～統合失調症との関連を中心に～

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the DISC1 functions in astrocyte-a study that is focused on the relationship with schizophrenia-

研究代表者

遠山 正彌 (TOHYAMA, Masaya)

近畿大学・東洋医学研究所・教授

研究者番号：40028593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アストロサイトに豊富に存在するDISC1がアストロサイトの増殖、移動、分化、オリゴデンドロサイトとのクロストークあるいは脳傷害時の反応性アストロサイトへの分化などに関与するか否かを明らかにすることで、DISC1機能障害を基盤とする統合失調症の発症機構を確立し、ニューロン-アストロサイト-オリゴデンドロサイトの発達ネットワークの破綻としての統合失調症の病態解明に多大な寄与を果たすことを目的とした。機能解析結果からは明確な役割を同定するには至らなかったが、免疫組織化学的な検討から、線維型アストロサイトおよび放射状アストロサイトでのDISC1の十分な発現を見出すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：The major psychiatric disorders such as schizophrenia are thought to be multifactorial diseases related to both genetic and environmental factors. However, the genes responsible and the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of schizophrenia remain unclear. We previously reported that abnormalities of disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) might cause major psychiatric disorders such as schizophrenia. In our previous study, we observed that DISC1 expression detected in primary astrocytes cultures. In this study, we further identified that DISC1 expressions were observed in both fibrillary astrocyte and radial astrocyte in the mice brain. Our data suggest that DISC1 in astrocyte might be possibly related to schizophrenia.

研究分野：神経化学

キーワード：DISC1 アストロサイト 統合失調症

1. 研究開始当初の背景

(1) DISC1 遺伝子はスコットランドの精神疾患多発家系(統合失調症、双極性障害など)を対象とした遺伝学的研究により発見された転座の部位にコードされる遺伝子である。この遺伝子が転座により分断されることが DISC1 タンパク質の異常を引き起こし、統合失調症などの精神疾患発症のリスクを高めると考えられている。我々は神経細胞に存在する DISC1 が DISC1 に結合するタンパク質と連携し神経細胞の成熟に関与していることを報告し (Miyoshi *et al.*, *Mol Psychiatry* 2003, BBRC 2004; Hattori T. *et al.*, *Mol Psychiatry*, 2007, 2010; Shimizu *et al.*, BBRC 2008)、統合失調症などの精神疾患が Neurodevelopmental Disease であることの科学的証左を見出してきた。

(2) さらに DISC1 や我々が見出した DISC1 結合タンパク質のうち DISC1 binding Zinc Finger Protein (DBZ) と名付けた新規因子は神経細胞のみならずオリゴデンドロサイトにも豊富に存在する。そこでこの両者のオリゴデンドロサイトにおける機能を解析したところ、DISC1 はオリゴデンドロサイトの分化を抑制し、DBZ は逆に促進すること、並びにその分子機序を明らかとした (Hattori *et al.*, *PLoS One* 2014; Shimizu *et al.*, *Glia* 2014)。しかもこの両者の発現時期が異なる (DISC1 は胎児期を、DBZ は出生後 2 週をピークとして発現することから、胎児では DISC1 がオリゴデンドロサイトの分化を抑制し、出生後発現を減少させる DISC1 に代わるように発現上昇する DBZ がその分化を促進し、成熟したミエリン形成へとつながることが明らかとされた。

(3) 一方 DISC1 はニューロンやオリゴデンドロサイトのみならずアストロサイトにも豊富に存在することを我々は認めている。しかしながら、その機能は全く不明である。また統合失調症患者脳ではアストロサイトの減少も認められている。このような事実はアストロサイトにおける DISC1 の機能障害が統合失調症などの病態発現にも大きなかわりを持っていることを示唆する。そこで本研究はアストロサイトに発現する DISC1 の機能を解明することをゴールとする。さらに、髄鞘形成に関与する LIF のアストロサイトからの放出に対して DISC1 の関与及びオリゴデンドロサイトとのクロストーク機構の可能性についても検討を加える。

2. 研究の目的

本研究ではアストロサイトに豊富に存在する DISC1 がアストロサイトの増殖、移動、分化、オリゴデンドロサイトとのクロストークあるいは脳傷害時の反応性アストロサイトへの分化などに関与するか否かを明らかにする。アストロサイトはニューロンの機能に多彩に関与している。従ってとりわけ DISC1 がアストロサイトの増殖、移動、分化

に関与すれば、アストロサイトにおける DISC1 機能の破綻でニューロン機能にも多大な影響を及ぼすと考えられる。これまでの神経細胞、オリゴデンドロサイトの結果と併せ考えれば DISC1 機能障害を基盤とする統合失調症の発症は、ニューロン-アストロサイト-オリゴデンドロサイトの発達ネットワークの破綻であることが確立でき、統合失調症の病態解明に多大な寄与を果たすと確信している。そこで研究期間内には以下のことを明らかにする。

(1) DISC1 を発現するアストロサイトのタイプを GFAP などのマーカータンパク質を用いた免疫組織化学法および *in situ* hybridization 法などにより同定する。

(2) DISC1 がアストロサイトの増殖・分化に関与するか否かを明らかにするために、DISC1 の RNAi や強制発現による変化を RT-PCR 法や Western blotting 法、免疫染色法などで検討する。DISC1 がアストロサイトの増殖や分化に関与するか否かについて、免疫染色法等で検討する。

(3) 中枢神経障害モデルマウスを用いて、アストロサイトの DISC1 発現変化を免疫染色法等で検討する。

(4) 初代培養系を用いて、アストロサイトでの DISC1 発現抑制あるいは強制発現がオリゴデンドロサイトの髄鞘形成に影響をもたらすかについて、Western blotting 法や形態学的手法等で検討する。

3. 研究の方法

我々は、DISC1 は神経細胞のみならずグリア細胞(オリゴデンドロサイトやアストロサイト)にも豊富に発現することを見出し、オリゴデンドロサイトについては DISC1 がその結合タンパク質(DBZ)と協調しながらその髄鞘形成に関与することを見出した。しかし、アストロサイトにおける DISC1 の機能については依然不明のままである。そこで本研究課題では、アストロサイトにおける DISC1 の機能について検討するためにまず、アストロサイトにおける DISC1 発現の時期特異性および形態学的検討を行う。さらにアストロサイトの分化・増殖・移動への DISC1 の関与、神経細胞との関連やオリゴデンドロサイトとの関連性を検討することにより、神経損傷や脱髄性疾患における DISC1 の役割について明らかとするために、以下の方法を用いた。

(1) DISC1 を発現するアストロサイトのタイプを同定する。

脳梁(線維型アストロサイトの同定)、大脳皮質(原形質型アストロサイトの同定)、軟膜周囲(放射状アストロサイトの同定)を標的に GFAP(成熟アストロサイトのマーカー)の染色を行うことにより、どの型のアストロサイトに発現するか否かを決定する。

(2) DISC1 の発達過程による発現様式を解析する。

胎生期 14 日以降から成熟マウスまで発達段階を追いながら DISC1 発現を大脳皮質、脳梁など DISC1 陽性アストロサイトが観察された部位で検討する。

我々の予備検討から、DISC1 は胎生期において既に高い発現を示すことをすでに認めているが、アストロサイトのマーカーと共染色を行うことによりアストロサイトが胎生期にすでに DISC1 を発現しているか否かを検討する。

(3) DISC1 がアストロサイトの増殖・移動・分化に關与するか明らかにする。

培養アストロサイトを用い、RNAi により DISC1 発現抑制したアストロサイト等を用いて増殖レベルの検討を行うと共に ICR や 129 といった機能的 DISC1 未発現マウスでのアストロサイトの移動や分化レベルを免疫染色法などで B6 マウスと比較検討する。

(4) アストロサイトの DISC1 発現は中枢神経障害で増強するか

中枢神経障害モデルマウスを用いて、アストロサイトの DISC1 発現変化を免疫染色法などで検討する。

(5) アストロサイトでの DISC1 発現抑制がオリゴデンドロサイトの髓鞘形成に影響をもたらすかの検討

ICR や 129 といった機能的 DISC1 未発現マウスでの髓鞘形成レベルについて免疫染色法などで B6 マウスと比較検討する。

4. 研究成果

(1) まずアストロサイトにおける DISC1 発現の時期特異性および形態学的検討を行った。In situ hybridization 法により、Adult マウスの脳内の各領域に存在するアストロサイトでの発現の有無について検討を行った。その結果、脳梁の線維型アストロサイト、大脳皮質の原形質型アストロサイトでは DISC1 mRNA は強く発現していないのではないかと考えられた。軟膜周囲の放射状アストロサイトでは、比較的多くの細胞で DISC1 mRNA の発現を確認した。さらに、免疫組織化学的な検討をアストロサイトマーカーの GFAP や EAAT1 を用いて実施し、in situ hybridization の検討と同様の結果を得た。

(2) 次に発達過程による DISC1 の発現様式の検討を進めた。まず、生後 7 日のマウス脳における DISC1 発現について免疫組織化学的な検討を行ったところ、線維型アストロサイトおよび放射状アストロサイトでの DISC1 の十分な発現を見出した。

(3) アストロサイトにおける DISC1 の機能解析のため、まずはアストロサイトの初代培養系を構築した。この初代培養アストロサイトを用いて GFAP 陽性の成熟型アストロサイトへの分化過程において DISC1 発現との関連性が弱い可能性を免疫組織化学的な検討により見出した。次に初代培養や full length DISC1 発現がないと考えられるマウ

ス等を用いてアストロサイトの移動への DISC1 の関与について免疫組織化学的な解析等により検討したが、DISC1 の発現の有無とアストロサイトの移動との間には関連性が弱い可能性が示唆された。更に DISC1 発現変化とアストロサイトの増殖について初代培養細胞などを用いて同様な検討を行ったが、アストロサイトの増殖活性と DISC1 発現の間の関連性は非常に弱い可能性が示唆された。

(4) マウス脳における中枢神経障害時の DISC1 発現について検討を加えた。中枢神経の虚血、外傷、炎症などの際にはアストロサイトの細胞体は肥大し、突起も伸長し反応性アストロサイトと呼ばれる細胞へと変化する事が知られているが、この反応性アストロサイトでの DISC1 発現について免疫組織化学などの検討を行った結果、DISC1 発現増加は観察できず、マウス脳における検討でも DISC1 とアストロサイトの分化過程との関連性が弱い可能性が示唆された。

(5) 機能型の full length DISC1 発現がないと考えられるマウスの脳梁などの線維束の形態学的な観察や行動観察等から髓鞘化への影響についても非常に弱い可能性が示唆された。

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 10 件)

Shimizu S*, Ishino Y, Tohyama M, Miyata S. NDE1 positively regulates oligodendrocyte morphological differentiation. Sci Rep. 2018 In press. 査読有

清水尚子、遠山正彌、宮田信吾*「抑肝散の抗ストレス作用」The Autonomic Nervous System 自律神経, 2017. 54:21-25. <http://mol.medicalonline.jp/library/archive/select?jo=cj3jirit&UserID=163.51.165.5> 査読有

Miyata S*, Taniguchi M, Koyama Y, Shimizu S, Tanaka T, Yasuno F, Yamamoto A, Iida H, Kudo T, Katayama T, Tohyama M. Association between chronic stress-induced structural abnormalities in Ranvier nodes and reduced oligodendrocyte activity in major depression. Sci Rep. 2016 Mar 15;6:23084. doi: 10.1038/srep23084. 査読有

Tohyama M*, Miyata S, Hattori T, Shimizu S, Matsuzaki S. Molecular basis of major psychiatric diseases such as schizophrenia and depression. Anat Sci Int. 2015 Jun;90(3):137-43. doi:

10.1007/s12565-014-0269-3. Epub 2015 Jan 17. Review. 査読有

Shimizu S, Tanaka T, Takeda T, Tohyama M, Miyata S*. The Kampo Medicine Yokukansan Decreases MicroRNA-18 Expression and Recovers Glucocorticoid Receptors Protein Expression in the Hypothalamus of Stressed Mice. *Biomed Res Int*. 2015;2015:797280. doi: 10.1155/2015/797280. Epub 2015 May 14. 査読有

Miyata S*, Yoshikawa K, Taniguchi M, Ishikawa T, Tanaka T, Shimizu S, Tohyama M. Sgk1 regulates desmoglein 1 expression levels in oligodendrocytes in the mouse corpus callosum after chronic stress exposure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 14;464(1):76-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.109. Epub 2015 Jun 1. 査読有

Koyama Y*, Hattori T, Nishida T, Hori O, Tohyama M. Alterations in dendrite and spine morphology of cortical pyramidal neurons in DISC1-binding zinc finger protein (DBZ) knockout mice. *Front Neuroanat*. 2015 Apr 30;9:52. doi: 10.3389/fnana.2015.00052. eCollection 2015. 査読有

Matsuzaki S*, Hiratsuka T, Taniguchi M, Shingaki K, Kubo T, Kiya K, Fujiwara T, Kanazawa S, Kanematsu R, Maeda T, Takamura H, Yamada K, Miyoshi K, Hosokawa K, Tohyama M, Katayama T. Physiological ER Stress Mediates the Differentiation of Fibroblasts. *PLoS One*. 2015 Apr 30;10(4):e0123578. doi: 10.1371/journal.pone.0123578. eCollection 2015. 査読有

Shimizu S, Tanaka T, Tohyama M, Miyata S*. Yokukansan normalizes glucocorticoid receptor protein expression in oligodendrocytes of the corpus callosum by regulating microRNA-124a expression after stress exposure. *Brain Res Bull*. 2015 May;114:49-55. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.03.007. Epub 2015 Apr 7. 査読有

宮田信吾*、遠山正彌「漢方薬の薬理作用-抑肝散-」*脳* 21, 18(4):297-304, 2015. <http://www.kinpodo-pub.co.jp/category/list-o01.html> 査読無

〔学会発表〕(計 9 件)

*宮田信吾、清水尚子、石野雄吾、山本彬世、川上あゆみ、遠山正彌、うつ病発症における脳白質構造変化とオリゴデンドロサイト機能変化の関連、2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ComBio2017)、第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会、2017/12/06-09、神戸ポートアイランド(神戸)

*Shingo Miyata, Shoko Shimizu, Yugo Ishino, Masaya Tohyama. Molecular mechanisms of the onset of neuropsychiatric disorders by the changes in glial functions. The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. 2017/09/07-09、仙台国際センター(仙台)

Shoko Shimizu*, Masaya Tohyama, Shingo Miyata. Functional analysis of DISC1 binding protein DBZ in oligodendrocyte differentiation. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2017/07/20-23、幕張メッセ(千葉)

Shingo Miyata*, Shoko Shimizu, Akiyo Yamamoto, Ayumi Kawakami, Masaya Tohyama. The cadherin superfamily proteins in oligodendrocytes in the mouse corpus callosum were changed after chronic stress exposure. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2017/07/22、幕張メッセ(千葉)

宮田信吾*、清水尚子、山本彬世、川上あゆみ、遠山正彌、慢性ストレスによる脳白質機能変化と大うつ病性障害の関連、第 17 回日本抗加齢医学会総会、2017/06/02-04、東京国際フォーラム(東京)

S. Miyata*, S. Shimizu, T. Tanaka, M. Tohyama. Association between stress-induced Ranvier nodes structural abnormalities and reduced oligodendrocyte activity in major depressive disorder. *Neuroscience 2016*, SfN's 46th annual meeting, 2016/11/12-16, San Diego, USA.

S. Miyata*, S. Shimizu, T. Tanaka, M. Tohyama. The Kampo medicine Yokukansan normalizes glucocorticoid receptor protein expression in the mice brain by regulating microRNA expressions after stress exposure. *RNA 2016*, The RNA Society of Japan 18th Annual Meeting AND The 21st Annual Meeting of the RNA Society, 2016/6/28-7/2, Kyoto, Japan.

宮田信吾*、清水尚子、服部剛志、遠山正彌、精神疾患関連分子によるオリゴデンドロ

サイト発達制御、第 38 回日本生物学的精神
医学会・第 59 回日本神経化学会大会 合同年
会 2016/9/8-10、福岡国際会議場（福岡）

Y Mori*, T Iguchi, S Miyata, M Tohyama,
M Sato. PRMT1-dependent arginine
methylation on hnRNP K regulates
dendritic transport of alpha CaMKII
mRNA. 第 39 回日本神経科学大会
2016/07/20-22、パシフィコ横浜（横浜）

〔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

近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究
部門(基礎研究部門)

[http://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/
index.html](http://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/index.html)

近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究
部門(基礎研究部門)研究成果

[http://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/
results.html](http://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/results.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠山 正彌 (TOHYAMA, Masaya)

近畿大学・東洋医学研究所・教授

研究者番号：40028593

(2)研究分担者

田中 貴士 (TANAKA, Takashi)

近畿大学・付置研究所・助教

研究者番号：30734694

平成 29 年 3 月 21 日削除

清水 尚子 (SHIMIZU, Shoko)

近畿大学・東洋医学研究所・助教

研究者番号：50572731

宮田 信吾 (MIYATA, Shingo)

近畿大学・東洋医学研究所・教授

研究者番号：70403194

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし