

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18381

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイトにおける統合失調症関連因子DBZの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the schizophrenia-associated factor DBZ in oligodendrocytes

研究代表者

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

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):近年の研究により、統合失調症とオリゴデンドロサイト(OLs)の機能異常との相関が報告されている。本研究は、OLsの分化における統合失調症関連因子DISC1の結合因子DBZの分子機構を解明することで統合失調症発症の分子機序の解明を目的とした。OLsにおけるDBZ結合因子としてモータータンパク質、dyneinの補助因子であるNDE1に着目した。NDE1は髄鞘形成時期にマウス脳梁OLsに発現し、OLsにおけるNDE1発現抑制やdyneinとの結合阻害によってOLsの分化レベルが低下した。以上よりDBZ-NDE1-dyneinの複合体がOLs分化に重要な働きをしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):Recent studies have implicated oligodendrocyte (OL) abnormalities in schizophrenia. To better elucidate the molecular mechanisms underlying the pathophysiology of schizophrenia, we investigated the function of DISC1-Binding Zinc finger protein (DBZ) in OL differentiation as DISC1 is a risk gene of schizophrenia. We examined the dynein cofactor, nuclear distribution E homolog 1 (NDE1), which binds to DBZ in OLs. Postnatally, when myelin formation is active, NDE1 mRNA is expressed in OL lineage cells in the mouse corpus callosum. An in vitro analysis revealed that NDE1 knockdown impaired OL differentiation. In addition, overexpression of the dynein-binding region of NDE1 resulted in impairments in OL differentiation like those observed following NDE1 knockdown. These results suggested that the DBZ-NDE1-dynein complex regulates OL differentiation.

研究分野：神経科学

キーワード：オリゴデンドロサイト 統合失調症 DISC1 DBZ ミエリン

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの統合失調症患者死後脳研究から、軸索を覆う髄鞘（ミエリン）を形成するオリゴデンドロサイト（OLs）の機能異常と病態に相関性があることが示唆されている。すなわち、統合失調症患者死後脳では OLs に特異的に発現する因子群の発現低下だけでなく、OLs の細胞数の減少や配置異常、髄鞘の形成異常に関する報告が多数なされている (Edgar N, Sibille E. *Transl Psychiatry*. 2012; 2:e109. )

Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) 遺伝子はスコットランドの精神疾患多発家系を対象とした遺伝学的研究により染色体転座の部位にコードされる遺伝子として発見された統合失調症関連因子のひとつであり、転座による分断で DISC1 タンパク質の機能異常が起こり、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。申請者らのグループは DISC1 の転座により分断される部位での相互作用因子の機能喪失あるいは異常機能獲得により、脳の発達障害が引き起こされ、統合失調症の脆弱性につながるのではないかと仮定し、転座部位特異的な相互作用因子の網羅的探索を行った。その結果、DISC1 の結合タンパク質として DBZ (DISC1-binding Zinc finger protein) と名付けた新規因子が同定された (Hattori T, Shimizu S et al. *Mol Psychiatry*. 2007; 12, 398-407.) (図 1 )

これまでに申請者は、OLs の分化異常やミエリン形成不全が観察される Olig1 KO マウスにおいて OLs の分化に関わる遺伝子と

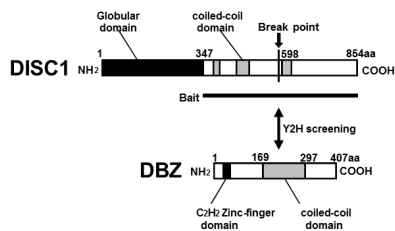


図1 DBZ(DISC1-Binding Zinc finger protein) の構造

もに DBZ 遺伝子の発現も低下していることが報告されていることから (Chen et al. *Nat Neurosci*. 2009; 12, 1398-1406)、DBZ が OLs 分化に関与するか否かについて検討を行った。

申請者の研究結果として、髄鞘形成が盛んな生後 14 日のマウス脳梁 OLs に DBZ の発現が高く、その時期の DBZ KO マウスでは OLs 分化レベルが低下し、電子顕微鏡による微細構造の検討からも髄鞘形成不全がみられる OLs 初代培養でも DBZ 発現抑制により分化レベルが低下することを見出している (Shimizu S et al. *Glia* 2014; 62, 709-724. )。以上より DBZ が OLs 分化を正に制御する機能をもつことが明らかとなった。しかしながら、DBZ が OLs 分化を促進する詳細な分子機序をはじめ、DBZ の発現異常が統合失調症発症と関与するのかどうかは不明のままである。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、発達障害仮説を元にした統合失調症発症の分子機序の検討において、髄鞘形成を行う OLs の発達障害異常を起源とする統合失調症発症の分子機序の解明を目的とする。申請者によるこれまでの研究成果および上記の背景をもとに、本研究は (1) OLs 成熟化における DBZ の詳細な機能解析、(2) DBZ 発現異常と統合失調症発症との関連性についての基礎研究を行うことによって、統合失調症発症機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、(1) OLs 成熟化における DBZ の機能解析として、DBZ KO マウスで発現変動している遺伝子の検討、OLs 特異的な DBZ 結合タンパク質の探索、機能解析を行った。また、(2) DBZ 発現異常と統合失調症発症との関連性について調べるため、幼若期における長期隔離飼育ストレス負荷

が与える影響について DBZ KO マウスを用いた行動試験を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) OLS 成熟化における DBZ の機能解析

DBZ KO マウスで変動している遺伝子の検討

DBZ 発現異常により影響を受ける遺伝子群を検討するため、マイクロアレイ解析によって生後 3 日、10 日における野生型マウスと DBZ KO マウス脊髄の遺伝子の発現を比較した。その結果、OLS・ミエリン関連因子と細胞骨格系因子の発現が低下している可能性が示唆されたため、定量的リアルタイム PCR 法によって実際に発現変動する因子の検討を行った。その結果、DBZ KO マウスにおいて MAG と Nkx6.2 の発現が低下していることが明らかとなった。

OLS 特異的な DBZ 結合タンパク質の探索、機能解析

OLS における DBZ 結合タンパク質を同定するため、これまでに DBZ と結合することが報告されている Nuclear Distribution E Homolog 1 (NDE1) に着目した。in situ hybridization 法により、ミエリン形成が盛んな生後 14 日マウス脳梁において NDE1 は OLS に発現していることが明らかとなった。さらに、脳梁タンパク質を用いた免疫沈降法によって DBZ と NDE1 の相互作用が認められた。以上から DBZ は NDE1 と結合して OLS 分化に関与していることが示唆された。

次に OLS 成熟化における NDE1 の機能解析を行った。ラット OLS 初代培養を用いた検討では、siRNA

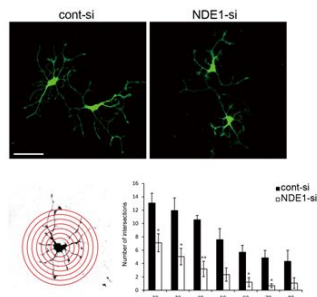


図2 NDE1 発現抑制によってOLSの突起形成が低下する

による NDE1 の発現抑制によって分化後の OLS の突起形成が低下した (図2)。さらに分化マーカーである MBP や CNPase タンパク質の発現低下が認められた。OLS とマウス後根神経節 (DRG) ニューロンとの共培養においても、NDE1 発現抑制によって、ミエリンを形成した MBP 陽性細胞数の割合が低下することが明らかとなった (図3)。NDE1 はモータータンパク質 dynein の活性制御因子として知られ、OLS においても NDE1 は dynein の intermediate chain と結合することを免疫沈降法によって確認した。さらに、NDE1 の N 端に存在する dynein 結合領域 (1 - 100aa) の強制発現によって、NDE1 の発現抑制と同様に OLS 形態形成が低下することが認められた。以上の検討から、DBZ と同様に NDE1 は OLS の分化を正に制御する機能を持ち、その機能は dynein の活性が関与している可能性が示唆された。

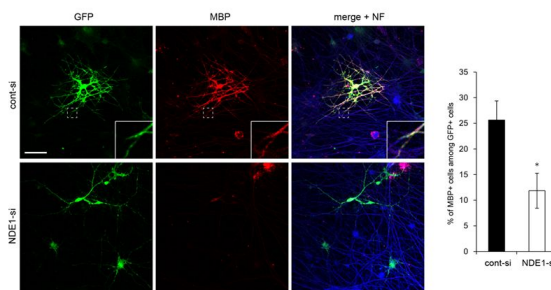


図3 NDE1 発現抑制によって OLS-DRG 共培養時のミエリン形成が低下する

##### (2) DBZ 発現異常と統合失調症発症との関連性

DBZ 発現異常と疾患との関連性を評価するため、幼若期 (生後 4 週から 12 週の期間) における長期隔離飼育ストレスを野生型マウス・DBZ KO マウスに負荷し、尾懸垂試験による DBZ の発現と抑うつ行動との関連について検討を行った。その結果、野生型マウスと DBZ KO マウスの無動時間に有意な差は観察されなかった。

以上の結果から、DBZ は OLS の分化を正に

制御しており、DBZ KO マウスにおいてOLs 分化関連因子の発現減少が確認された。さらに、in vitro の解析から DBZ は NDE1 と結合して dynein の活性に関与している可能性が示唆された。今後の課題は in vivo の系で DBZ-NDE1-dynein の OLs 分化における詳細な分子機構を解析することである。

## 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 4 件)

NDE1 positively regulates oligodendrocyte morphological differentiation.

Shimizu S, Ishino Y, Tohyama M, Miyata S. Sci Rep. 8: 7644. (2018) 査読有  
doi:10.1038/s41598-018-25898-4

Association between chronic stress-induced structural abnormalities in Ranvier nodes and reduced oligodendrocyte activity in major depression.

Miyata S, Taniguchi M, Koyama Y, Shimizu S, Tanaka T, Yasuno F, Yamamoto A, Iida H, Kudo T, Katayama T, Tohyama M.

Sci Rep. 6: 23084. (2016) 査読有  
doi: 10.1038/srep23084.

Sgk1 regulates desmoglein 1 expression levels in oligodendrocytes in the mouse corpus callosum after chronic stress exposure.

Miyata S, Yoshikawa K, Taniguchi M, Ishikawa T, Tanaka T, Shimizu S, Tohyama M.

Biochem Biophys Res Commun. 464(1): 76-82. (2015) 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.109.

Molecular basis of major psychiatric diseases such as schizophrenia and depression.

Tohyama M, Miyata S, Hattori T, Shimizu S, Matsuzaki S.

Anat Sci Int. 90(3):137-43. (2015) 査読有  
doi: 10.1007/s12565-014-0269-3.

[学会発表](計 5 件)

清水 尚子 他 「オリゴデンドロサイト分化における DBZ の機能解析」第 40 回日本神経科学大会 2017 年 7 月 20 日 (千葉県千葉市)

清水 尚子 他 「Functional analysis of DISC1-binding zinc finger protein (DBZ) during oligodendrocyte differentiation」第 21 回グリア研究会 2016 年 12 月 3 日 (大阪府 豊中市)

清水 尚子 他 「オリゴデンドロサイトにおける統合失調症関連因子の機能解析」第 92 回日本解剖学会近畿支部学術集会 2016 年 11 月 27 日 (大阪府 東大阪市)

清水 尚子 他 「Functional analysis of DISC1 binding protein DBZ in oligodendrocyte differentiation」第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会 合同年会 2016 年 9 月 9 日 (福岡県 福岡市)

清水 尚子 他 「DBZ, a CNS-specific DISC1 binding protein, positively regulates oligodendrocyte differentiation」第 58 回日本神経化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

大会 2015年9月12日(埼玉県 大宮市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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