

Reelin 欠失統合失調症患者型モデルマウスによる分子病態解明

森 大輔

名古屋大学 脳とこころの研究センター

【研究の背景】

統合失調症や自閉スペクトラム症は、遺伝要因が発症に強く関与するとされる。近年、森らは全ゲノムにわたりゲノムコピー数変異 (CNV) や一塩基置換 (SNV) を探索し、頻度は稀ではあるが発症に大きく寄与するゲノム変異を多数同定し、発症関連遺伝子を特定しつつある。森らは、日本人統合失調症を対象としたゲノム解析で、リーリン遺伝子 (リーリン) を欠失している患者親子を同定した。また研究協力者の尾崎は、自閉スペクトラム症のエクソーム解析により、リーリンの機能喪失変異 (SNV) が本疾患に関与することも報告している (Nature, 2014)。リーリンはげっ歯類の脳の発生期において、神経細胞の移動や大脳皮質の層構造形成、小脳の正常な構築に必須の分泌性因子であること、成体期においてシナプス可塑性など神経細胞の活動に重要な役割を果たしていることが判明しつつあり、発症メカニズムの解明につながる可能性がある。

【目 的】

本研究の目的は、「統合失調症ゲノム解析によって同定したリーリン欠失患者のリーリン変異を模倣した新規リーリン欠失モデルマウスを用いて、統合失調症の発症メカニズムを明らかにすること」である。

【方 法】

①リーリン欠失マウスの組織病理学的解析

ホモ変異マウスにおいて、脳採取前には歩行時によるめく典型的な「リーラー」マウスの表現型を確認し、このマウスの脳において、Reelin タンパク質の発現が null であることを確認している。本研究項目では、発生期、成体期の脳を対象として Reelin 欠失の組織病理学的解析を実施し、多くの Reelin に携わる研究者が着目している大脳皮質や基底核の構造異常の有無を明らかにする。

②リーリン欠失マウスの行動薬理解析

リーリンヘテロ欠失マウスを用いて、Openfield test: 不安様行動、Y-maze test: 短期記憶、Elevated plus maze: 不安様行動、Locomotor activity test: 自発運動量、Social interaction test: 社会性行動、Novel object recognition test: 新規物体認知記憶、Prepulse inhibition test: 感覚情報処理能力、Rotarod test: 協調運動・運動学習、Marble burying test: 不合理行動、Fear conditioning test: 恐怖条件付け記憶、Pain threshold test: 痛覚感受性、Locomotor (メタンフェタミン): 薬物感受性の一連の試験を実施する。

③リーリン欠失モデルマウスの細胞表現型解析 (神経細胞遊走・リーリンシグナル伝達)

リーリンは神経細胞遊走の制御に関与する分子であり、類似する表現型異常を示す滑脳症原因遺伝子 Lis1, Ndel1 の小脳顆粒細胞 migration assay 法が解析方法として有効である可能性が高い。細胞突起を伸ばしながら移動する様子をタイムラプス観察し、継時的な神経突起の伸長および細胞の移動を定量化する。野生型およびリーリン欠失 (ヘテロ欠失、ホモ欠失) で比較し、リーリン量による形態および動態の表現型異常の有無を明らかにする。

【結 果】

①リーリン欠失マウスの組織病理学的解析

リーリン欠失成体マウスを灌流固定したのち、全脳をパラフィン包埋処理し、病理切片を作成した。HE 染色を実施し、大脳皮質、海馬の形状を観察したところ、リーリンホモ欠失マウスにおいて、大脳皮質領域、海馬領域ともに大きく縮小しており、滑脳症モデル様の病理表現型異常を見出した。

②リーリン欠失マウスの行動薬理解析

リーリン欠失モデルマウスヘテロ欠失後 10 週齢以降、一連の行動解析を実施したところ、Locomotor activity test:自発運動量試験での上昇(メスのみ)、Social interaction test:社会性行動試験において行動変化:social novelty の変化が認められた。

③リーリン欠失モデルマウスの細胞表現型解析(神経細胞遊走・リーリンシグナル伝達)

リーリン欠失マウスの生後 4 日の小脳を無菌的に採取し、顆粒細胞の凝集塊を形成させ、in vitro で neurite migration アッセイを実施した。リーリンヘテロ欠失マウス由来の神経細胞の遊走は野生型と比較してとくに大きな異常は見られなかった。リーリンホモ欠失マウス由来の神経細胞の遊走は野生型と比較して顕著な遊走異常が認められた。

【考 察】

本研究課題において、新規自作したリーリン欠失患者型モデルマウスの表現型解析を実施し、ホモ欠失マウスにおいては滑脳症様の大脳皮質、海馬構造異常を認め、ヘテロ欠失マウスでは一般的な行動解析から統合失調症様症状の一部を認めたことから本マウスはモデルマウスになり得ることを見出した。in vitro neurite migration assay から、リーリン欠失患者由来 iPS 細胞から分化した神経細胞遊走と同様の表現型を得たことから、ヒトとマウスで進化的に保存された分子メカニズムから統合失調症の発症につながることを強く示唆した。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

統合失調症ゲノム解析によって患者に見出したリーリン遺伝子の変異が、統合失調症と関連があることを生物学的に検証し、それをモデルとした創薬開発の可能性を示した。

【参考・引用文献】

Arioka Y, Kushima I, ***Mori D**, and Ozaki N. (他 10 人) 2018. Single-cell trajectory analysis of human homogenous neurons carrying a rare RELN variant. **Translational Psychiatry** 8:129

リーリン欠失統合失調症患者の末梢血から iPS 細胞を樹立し、健常者 iPS 細胞と表現型を比較した。マウス研究から示唆されたように、神経細胞の移動に関与する表現型を認めたが、距離ではなく方向性の異常所見が強く認められ、ヒト脳の構築においてはより厳密なリーリンの制御が求められることを強く示唆した。

Sobue A, Kushima I, Nagai T, Shan W, Kohno T, Aleksic B, Aoyama Y, **Mori D**, Arioka Y, Kawano N, Yamamoto M, Hattori M, Nabeshima T, Yamada K, *Ozaki N. 2018. Genetic and animal model analyses reveal the pathogenic role of a novel deletion of RELN in schizophrenia. **Sci Rep** 8 (1):13046,

統合失調症患者において同定したリーリン遺伝子の新規欠失に関して、本欠失がエキソン 52 から 58 を含むことを明らかにし、当該患者の臨床症状を詳細に評価したうえで、血清中リーリン量の低下も確認した。本リーリン遺伝子欠失に類似するオルレアン・リーラーマウスの行動学的・神経化学的な解析により、本マウスは不安、社会性、運動学習の障害を示し、運動学習の障害は抗精神病薬で改善を確認した。さらに本マウスにおいて、メタンフェタミン誘導性の過活動やドパミン遊離量の有意な減少といった脳内ドパミン系の変化に加え、GABA 関連遺伝子の発現低下も確認した。以上の結果から SCZ 患者で同定した RELN 欠失は脳内のドパミン及び GABA 系の機能的障害をもたらし、SCZ 病態に関与する可能性が示唆された。