

統合失調症における Reelin シグナルの機能回復に向けた新たな治療戦略の開発

溝口博之

名古屋大学医学部附属病院 薬剤部

【研究の背景】

Reelin は巨大分泌性タンパク質であり、正常な脳構造や機能発現に必須の分子である (Tissir and Goffinet, 2003)。Reelin 発現量低下と統合失調症などの精神神経疾患との関連が多く報告される中、日本人統合失調症患者を対象としたゲノム解析によって、Reelin をコードする *RELN* 遺伝子の欠失を同定した (Kushima et al., 2017)。実際、我々はこの欠失を再現した遺伝子改変マウス (*Reln*-del) を作製し解析したところ、脳構造の異常や社会性異常が認められた (Sawahata et al., 2020)。また、polyI:C 処置することで作製した神経発達障害モデルマウス (Ibi et al., 2020) や *Reln*-del マウス (Sawahata et al., Phamacol Res, 2021) の脳内に Reelin を補充すると、認知機能の低下や社会性行動異常が改善された。すなわち、Reelin は神経突起伸長やスパイン形成を正に制御し認知機能を向上させることと合わせて考えると、Reelin 補充は脳神経機能障害を改善すると期待される。

【目 的】

本研究は、統合失調症の病態解明と Reelin 補充療法のメカニズムの解明を目的とした。特に、Reelin を切断し不活化させる分解酵素である、a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs3 (ADAMTS-3) に注目し、ADAMTS-3 の阻害を介した Reelin 機能の増強が、新しい作用機序に基づく統合失調症の治療法となる可能性があるかと仮説を立て、立証する。そして、Reelin シグナルの役割と機能回復に向けた新たな治療戦略の開発を提案する。

【方 法】

Reln-del マウスの前頭皮質に pLLX-GFP を感染させ、スパインの形態学的変化について、Imaris ソフトを用いて解析した。また、*Reln*-del マウスと PV-Cre マウスを交配させ、仔マウスの前頭皮質に AAV-hSyn-FLEX-mCherry を感染させ、PV 陽性細胞特異的な形態学的変化について、同様に解析した。*Reln*-del マウスの社会性行動について、social interaction 試験を行った (Sawahata et al., 2020)。

【結 果】

1-1. *Reln*-del マウスの前頭皮質では、錐体細胞の形態的異常があった

Reln-del マウスで脳構造の異常が認められることや、初代培養神経細胞の神経突起の長さや分岐数が減少する (Sawahata et al., 2020; Tsuneura et al., 2021)。*Reln*-del マウスの前頭皮質において、樹状突起のスパイン密度が減少していた。また、スパインの形態変化が観察された。

1-2. *Reln*-del マウスの前頭皮質では、抑制性神経の形態的異常があった

統合失調症の病態には、パルブアルブミン (PV) 陽性抑制性ニューロンの機能低下が関与する (Glausier et al., 2014)。*Reln*-del マウスの前頭皮質では、PV 陽性細胞数、GABA 陽性細胞数が低下していた。また、*Reln*-del マウスの前頭皮質では、PV 陽性細胞の神経突起の長さは短く、en passant boutons 数が減少していた。

1-3. *Reln*-del マウスの前頭皮質における免疫組織学的 E/I バランス解析

興奮性神経のマーカーを VGluT2、抑制性神経のマーカーを VGAT として免疫反応性を行い、VGluT2/VGAT 比から E/I バランスを検討した。しかし、野生型マウスと比較し有意な変化は観察されなかった。

1-4. *Reln*-del マウスの表現型解析と ADAMTS-3 阻害の効果

Reln-del マウスの社会性行動を検討したところ、野生型マウスと比較して、social preference には異常がないが、social novelty が有意に低下することが分かった。このことから、Reelin は社会性行動の構築に影響する可能性が示唆された。また、Reelin 発現に対する ADAMTS-3 ノックダウン用のレンチウイルスベクター (pLLX-shADAMTS-3) の効果について、*in vitro* 実験の再現性の確認を行った。現在、pLLX-shADAMTS-3 や Reelin を発現する AAV を用いた Reelin 補充療法の社会性行動異常に対する緩解作用について、生化学的実験も含め、検討を行っている。

【考 察】

Reln-del マウスの前頭皮質における興奮性神経と抑制性神経の形態的異常を証明することができた。残念ながら、E/I バランス解析では有意な結果を得られなかった。この点については電気生理学的手法など、違う手法を用いた検討が必要だと考える。また、*Reln*-del マウスは社会性行動異常を示すことを証明した。この結果は以前の研究成果と同じであり、再現性の高い結果である。今回観察された興奮性と抑制性神経の形態的異常は、回路機能的低下を招き、その結果、社会性行動の異常を引き起こしたと考える。しかし、表現型異常とこれら形態的異常との因果関係を証明するところまでは至っていない。今後は、この表現型に対して、Reelin の補充 (pLLX-shADAMTS-3 や Reelin 発現を増加させる AAV) が緩解させるかどうか検討する。さらに補充により、抑制性神経や興奮性神経の機能そのものが緩解されるのか、あるいは形態的異常が緩解されるのか検討する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、日本人患者から見つかったコピー数変異をマウス研究に落とし込んだリバーストランスクリプション研究である。実際に、ヒトから見つかった遺伝的、分子的発現異常が神経の形態異常を導くことを *in vivo* 実験において証明できたことは、意義深い。本研究成果は精神疾患病態の理解と新規治療法の開発に向けた基礎と臨床とを繋ぐ橋渡し研究として貢献できた。

【参考・引用文献】

1. Glausier JR, Fish KN, Lewis DA. Altered parvalbumin basket cell inputs in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia subjects. *Mol Psychiatry*. 2014; 19(1): 30-6.
2. Ibi D, Nakasai G, Koide N, Sawahata M, Kohno T, Takaba R, Nagai T, Hattori M, Nabeshima T, Yamada K, Hiramatsu M. Reelin Supplementation Into the Hippocampus Rescues Abnormal Behavior in a Mouse Model of Neurodevelopmental Disorders. *Front Cell Neurosci*. 2020; 2;14:285.
3. Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, Shimamura T, Shiino T, Yoshimi A, Kimura H, Takasaki Y, Wang C, Xing J, Ishizuka K, Oya-Ito T, Nakamura Y, Arioka Y, Maeda T, Yamamoto M, Yoshida M, Noma H, Hamada S, Morikawa M, Uno Y, Okada T, Iidaka T, Iritani S, Yamamoto T, Miyashita M, Kobori A, Arai M, Itokawa M, Cheng MC, Chuang YA, Chen CH, Suzuki M, Takahashi T, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Watanabe Y, Nunokawa A, Someya T, Ikeda M, Toyota T, Yoshikawa T, Numata S, Ohmori T, Kunimoto S, Mori D, Iwata N, Ozaki N. High-resolution copy number variation analysis of schizophrenia in Japan. *Mol Psychiatry*. 2017 Mar;22(3):430-440.
4. Sawahata M, Asano H, Nagai T, Ito N, Kohno T, Nabeshima T, Hattori M, Yamada K. Microinjection of Reelin into the mPFC prevents MK-801-induced recognition memory impairment in mice. *Pharmacol Res*. 2021; 173:105832.
5. Sawahata M, Mori D, Arioka Y, Kubo H, Kushima I, Kitagawa K, Sobue A, Shishido E, Sekiguchi M, Kodama A, Ikeda R, Aleksic B, Kimura H, Ishizuka K, Nagai T, Kaibuchi K, Nabeshima T, Yamada K, Ozaki N. Generation and analysis

- of novel Reln-deleted mouse model corresponding to exonic Reln deletion in schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2020; 74(5): 318-327.
6. Tissir F, Goffinet AM. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(6): 496-505.
 7. Tsuneura Y, Sawahata M, Itoh N, Miyajima R, Mori D, Kohno T, Hattori M, Sobue A, Nagai T, Mizoguchi H, Nabeshima T, Ozaki N, Yamada K. Analysis of Reelin signaling and neurodevelopmental trajectory in primary cultured cortical neurons with RELN deletion identified in schizophrenia. *Neurochemistry International*, 2021; 144:104954.