

主論文の要旨

Analysis of Reelin signaling and neurodevelopmental trajectory in primary cultured cortical neurons with *RELN* deletion identified in schizophrenia

統合失調症で同定された *RELN* 欠失を有する
大脳皮質初代培養神経細胞における
Reelin シグナルと神経発達軌跡の解析

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
臨床医薬学講座 医療薬学分野
(指導：山田 清文 教授)
常浦 祐未

【緒言】

Reelin は巨大な分泌タンパク質であり、正常な脳構造や機能発現に必須の分子である。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ているが、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* 遺伝子の新奇欠失が同定された。この欠失を模倣した遺伝子改変マウス (*Reln-del*) では、脳構造の異常や社会性低下が認められた。一方、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ため、Reelin 補充は脳神経機能障害を改善すると期待されている。

Reelin の分解酵素である、a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3 (ADAMTS-3) は Reelin を切断し不活化する。したがって、ADAMTS-3 の阻害を介した Reelin 機能の増強は、新しい作用機序の統合失調症の治療法となる可能性がある。

本研究では、統合失調症に対する Reelin 補充療法の開発を目的として、*Reln-del* マウスの大脳皮質由来初代培養神経細胞を用いた生化学的・神経科学的解析ならびに ADAMTS-3 阻害が Reelin シグナルに与える影響について検討した。

【方法】

野生型 (WT)、ヘテロ欠損 (*Reln-del*^{+/−}) およびホモ欠損 (*Reln-del*^{−/−}) の胎生 15 日目のマウス胎児から大脳皮質を摘出し、初代培養神経細胞を得た。Reelin 発現量と Reelin シグナルの強度を調べるため、ウエスタンブロッティング法 (WB) によって培養上清中 Reelin、細胞内 Reelin および Dab1 発現量を解析した。成体 (8-17 週齢) の WT および *Reln-del*^{+/−} マウス内側前頭前皮質 (mPFC) より RNA を抽出し、リアルタイム PCR によって Reelin mRNA 発現量を測定した。WT と *Reln-del*^{+/−} の初代培養神経細胞における Reelin 発現細胞は、免疫細胞化学的手法 (ICC) によって解析した。初代培養神経細胞の神経突起伸長を評価するため、生細胞イメージングシステム IncuCyte を用いて培養 3 日目から 7 日目における神経突起の長さと同数数を測定した。スパイン形成の変化を調べるため、培養 20 日目の初代培養神経細胞を樹状突起マーカー MAP2 とスパインの存在を示す postsynaptic density protein 95 (PSD95) を ICC によって標識し、ADAMTS-3 阻害が Reelin シグナルに及ぼす効果を調べるため、ADAMTS-3 に対する short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを培養 10 日目の WT と *Reln-del*^{+/−} の初代培養神経細胞にレンチウイルス法で導入した。培養 20 日目に細胞と培養上清を回収し、培養上清中 Reelin および細胞内 Dab1 発現量を WB によって解析した。

【結果】

WT と比較して *Reln-del*^{+/−} の初代培養神経細胞では、細胞内および培養上清中の Reelin が減少し、*Reln-del*^{−/−} ではほぼ検出できなかった (Fig. 1 and Fig. 2)。一方、*Reln-del*^{+/−} および *Reln-del*^{−/−} は WT と比較して Dab1 が有意に増加した (Fig. 3)。*Reln-del*^{+/−} の mPFC では Reelin mRNA が WT と比較して有意に減少した (Fig. 4)。

初代培養神経細胞において 60%以上の GABA 陽性抑制性神経細胞に Reelin が発現

していたが (WT: $68.3 \pm 9.0\%$, *Reln-del*^{+/-}: $66.7 \pm 8.3\%$)、Parvalbumin 陽性抑制性神経細胞には発現は認められなかった。CaMKII α 陽性興奮性神経細胞ではわずかに Reelin が発現していた (WT: $3.7 \pm 3.7\%$, *Reln-del*^{+/-}: $2.8 \pm 2.8\%$)。WT と *Reln-del*^{+/-}の間で、Reelin 発現細胞の割合に有意な差は認められなかった (Fig. 5)。

初代培養神経細胞の神経突起の長さと同数数は、*Reln-del*^{+/-}では培養 6 日目から、*Reln-del*^{-/-}では培養 5 日目から WT と比較して減少した (Fig. 6A-D)。*Reln-del*^{+/-}および *Reln-del*^{-/-}では WT と比較してスパイン密度が減少した (Fig. 6E-F)。

WT と *Reln-del*^{+/-}の初代培養神経細胞の ADAMTS-3 をノックダウンすると、培養上清中の Reelin 分解が抑制され、活性型 Reelin の割合が増加した (Fig. 7)。また、細胞内 Dab1 が ADAMTS-3 ノックダウン群で減少した (Fig. 8)。

【考察】

Reln-del の初代培養神経細胞では Reelin が減少しており、この結果は *Reln-del* マウスの脳内 Reelin 発現量に関する過去の研究と一致していた。*Reln-del*^{+/-}マウスの mPFC における Reelin mRNA が WT と比較して減少しており、Reelin タンパク質の発現量低下は *Reln-del* の mRNA 発現量が低下することが原因であると示唆された。一方で、*Reln-del*^{+/-}および *Reln-del*^{-/-}では Dab1 が増加した。Reelin が受容体に結合すると Dab1 はリン酸化を受け、ユビキチンプロテアソーム系によって速やかに分解されるため、*Reln-del*^{+/-}および *Reln-del*^{-/-}における Dab1 増加は Reelin シグナル減弱を示すと考えられる。今後、Dab1 の下流シグナル分子のリン酸化レベルについても解析する必要がある。

成体脳において、Reelin は大部分が抑制性神経細胞で発現するが Parvalbumin 陽性抑制性神経細胞では発現しないことや、わずかに興奮性神経細胞でも Reelin が発現することが報告されている。本実験で用いた培養細胞においても同様の発現パターンが認められた。GABA、Parvalbumin、CaMKII α 陽性細胞における Reelin 発現細胞の割合は遺伝子型の間で差がなかった。一方、WT と比較して *Reln-del*^{+/-}および *Reln-del*^{-/-}では神経突起伸長とスパイン形成の障害が示唆された。*Reln-del* の神経細胞では Reelin シグナルの減弱に伴い神経形態異常が現れたと考えられる。

初代培養神経細胞の ADAMTS-3 をノックダウンすると、培養上清中の Reelin 分解が抑制され細胞内 Dab1 が減少し、Reelin シグナルの増強が示された。統合失調症における Reelin 補充療法としての ADAMTS-3 阻害薬の有効性を予測するために、脳内 ADAMTS-3 をノックダウンして *Reln-del* マウスの行動障害や病理学的変化が改善するかどうかを検討する必要がある。

【結論】

Reln-del マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞において、Reelin 発現量減少、Reelin 受容体の下流シグナルの活性低下、神経形態異常が認められた。また ADAMTS-3 をノックダウンすると、Reelin 分解が抑制され Reelin シグナルが増強することが示された。