

主論文の要旨

Immunohistochemical evaluation of the GABAergic neuronal system in the prefrontal cortex of a DISC1 knockout mouse model of schizophrenia

統合失調症モデルマウス前頭前野における
GABA 神経ネットワークの免疫組織学的検討

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座 精神医学分野

(指導：尾崎 紀夫 教授)

梅田 健太郎

【緒言】

統合失調症は人口の約 1%に発症する主要な精神疾患である。その病因・病態を解明すべく死後脳を用いた神経病理学的な研究がなされたが、再現性を持った結果が長く得られなかった。近年、神経発達障害仮説を支持する知見が集積されている。ゲノム研究により有力な候補遺伝子が同定され、その中には GABA 神経系のネットワークに関連する機能を有しているものが含まれていることが明らかとなってきた。その上で、再度、神経系の病態を組織病理学的に捉える重要性が指摘されている。

DISC1 はスコットランドの統合失調症の大家系から同定された候補遺伝子であり、死後脳研究においても、DISC1 蛋白の発現レベルが統合失調症患者の脳と健常者のものとの間に差があることが示されている。また、DISC1 のノックアウトマウスは行動解析によって、情報統合機能の低下、不安低下あるいは衝動性の亢進という統合失調症との類似性が指摘され、統合失調症の有用なモデル動物と考えられている。

一方 GABA 神経系はワーキングメモリを含む認知機能に大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた。統合失調症における認知機能障害の病態生理として前頭葉機能不全が従来から指摘されており、近年では前頭前野の GABA 神経系機能不全が注目されている。GABA 神経細胞はパーバルビン (PV)、カルビンディン D28Kd (CB) などのカルシウム結合タンパク質の発現によってグルーピングされるが、統合失調症の死後脳研究において PV、CB の発現が低下していることが繰り返し報告されている。

今回、DISC1 の欠損による神経ネットワーク構築の組織学的変化を明らかにするため、DISC1 ノックアウトマウスの前頭前野における GABA 含有神経系の免疫組織学的発現を指標として検討した。GABA 神経細胞のマーカーとして知見の集積している PV、CB を使用し、陽性細胞の密度を比較、ニューロン成熟の指標としてサイズ、形状を比較した。

【対象及び方法】

12 週齢の、DISC1 のエクソン 2,3 を欠損した DISC1 ノックアウトマウス 11 匹とワイルドマウス 11 匹を使用した。深麻酔科にてパラホルムアルデヒド液で還流固定し、脳を取り出し 20 マイクロメートル厚の凍結薄切切片を作成。それら切片に、一次抗体として、PV、CB を用い、ABC 法にて免疫染色を行った。前頭前野の前部帯状回 (ACC)、内側前頭前野 (m-PFC)、眼窩皮質 (OFC) の 3 領域を対象領域とし、深層、浅層に分けて、次の 3 点について比較検討した (Fig.1)。1. 単位面積当たりの PV、CB 陽性細胞数、2. 陽性細胞のサイズと形状、3. 単位面積当たりの HE 染色陽性細胞数。計測には Image J を用い、検定には Mann-Whitney U test を用いた。

【結果】

1. 細胞密度

PV、CB 陽性細胞が ACC、M-PFC、および OFC 含む前頭皮質全体に認められた。

各領域の単位面積当たりの PV、CB 陽性細胞数と平均±標準偏差を Table 1 示す。DISC1 ノックアウトマウスでは、ワイルドマウスと比較して、OFC の II/III 層を除くすべての領域で PV 陽性細胞密度、CB 陽性細胞密度の著しい減少を認めた (Fig.4 Table 1)。減少率ではそれぞれの領域、層において統計的な有意差を認めなかった。

2. 細胞の大きさと形状

PV、CB 陽性細胞の形状として、多極性細胞と双極性細胞 2 種類の細胞が観察された (Fig.2)。多極性細胞 (Fig.3A) と双極性細胞 (Fig.3B) の割合は各層において同様の分布を示した。また、ACC においてノックアウトマウス、ワイルドマウス間で、PV、CB 陽性細胞の面積に有意差は認めず、それぞれの細胞型に分けた解析でも有意差は認めなかった (Table 2)。m-PFC、OFC においても同様の結果であった。

3. 他を含む神経細胞総数

HE 染色陽性細胞数は、両群でいずれの領域においても有意差は認めなかった (Fig.5)。

【考察】

今回の研究では、DISC1 KO マウス前頭前野における PV, CB 陽性細胞密度の減少を認めた。細胞の大きさや形状に変化は認めず、他の神経細胞数の変化も認めなかった。この結果は、DISC1 KO マウス前頭前野において GABA 作動性システムが機能不全に陥っていることを神経病理学的に支持する結果といえる。

最近の分子生物学的研究では、DISC1 が神経発達過程において Kinesin-1 と結合し 14-3-3 ϵ ・NUDEL・LIS1 と蛋白複合体を形成し、軸索伸長と神経細胞の移行に深く関連し (Wong and Josselyn, *Biol Psychiatry*, 2016)、GABA 神経系において重要な役割を果たしていることが示されている (Kim et al., *Cell*, 2012)。一方、統合失調症患者で GABA 神経系の機能不全は数多く報告されている。死後脳の研究では、Parvalbumin 含有細胞が統合失調症の患者では減少することが一貫して示され、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 67 や GABA トランスポーター (GAT) 1 が統合失調症患者では減少することも一貫して報告されている (Curley AA, *Am J Psychiatry*, 2011)。統合失調症患者では、注意力や記憶力、実行機能などの認知機能障害が病初期から出現していることが明らかとなっているが、GABA 神経細胞が、錐体細胞の活動をコントロールすることによって神経可塑性の調整やワーキングメモリを含む認知機能に重要な役割を果たしており (Benes FM, Berretta S, *Neuropsychopharmacology*, 2001)、その関連が指摘されている。

今回、私たちの研究結果により、DISC1 N.O.マウスでは GABA 神経系の機能不全が起こっている可能性が示された。近年の分子生物学的及び画像研究の知見の集積により、統合失調症患者の脳組織における病態生理が明らかになりつつある。しかしながら神経病理学的背景は依然不明のままであり、脳組織学的な研究とマッチアップし明確化していく必要がある。人間の脳組織学的研究では様々な交絡因子が影響し、また死後の脳組織となるため、純粋な変化を捉えることが極めて困難である。そのため

まずはモデル動物における脳組織学的な変化を明確にしていくことが必要と考える。

【結語】

神経発達過程の軸索伸長や細胞移動に重要な役割を果たしている DISC1 の欠損により、前頭前野の複数の領域で GABA 神経細胞が減少していることが神経病理学的に明らかとなった。今回の結果は統合失調症における神経発達障害仮説を支持していると考えられ、DISC1 が GABA 神経系ネットワークを介し統合失調症の病態生理に重要な役割を持つことが示唆された。