

脳疾患とスプライシング異常、脳発達、神経分化、神経再生

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所
遺伝子発現機構学研究部門
眞部 孝幸

1. 目的

ヒトの遺伝子は高々2万2千個であるが、発達段階・組織特異的に選択的Splicingを行うことで20万種類以上の蛋白質分子が機能している。このSplicing調節機構の破綻は、発達段階や多くの疾患病態に関与しており、実際に精神・神経変性疾患等の患者脳内で、種々の遺伝子のSplicing異常が報告されている。一方近年の脳研究が、めざましい進歩を遂げているが、統合失調症研究は未だ萌芽状態にあると言わざるを得ない。当疾患の1%という高い有病率や10%にもおよぶ自殺率等、多岐にわたる精神症状が社会に及ぼす深刻な影響に鑑みれば発症機構解明と有効な治療法開発は焦眉の急である。我々は、統合失調症の病態が多岐にわたることと、グローバルなSplicing抑制因子であるhnRNPA1の機能異常に相関性があり、それがオリゴデンドロサイト(ODC)の分化・髄鞘形成に異常を呈する可能性を示唆してきた。その結果、統合失調症患者のリンパ球でhnRNPA1が有意に上昇していること、およびこの発現上昇はODCの分化・発達異常に関連するErbB4の異常転写産物を産生するという予備データを得た。またこの異常産物が、実際に患者リンパ球内でも確認できた。従って本研究課題では、脳高次機能形成や神経系細胞の分化・脳構築などの過程における、hnRNPA1過剰発現による選択的Splicingの異常が、統合失調症患者で見られるODC分化・髄鞘形成に重要な因子群(ErbB4など)の機能異常を来すことを明らかにすること、さらにはそのメカニズムの解明を大きな目的とする。

2. 方法

- ・ヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞株にhnRNPA1を強制発現させ、オリゴデンドロサイト分化能の変化を解析した。
- ・hnRNPA1強制発現ヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞株をオリゴデンドロサイトに分化させた時の、ODC分化・髄鞘形成関連因子(ErbB4, Neuregulin1, Fyn, QKI, MBP, PLPなど)のSplicingパターンを、様々なプライマーセットを用いたRT-PCR法により解明した。
- ・hnRNPA1ノックダウンヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞株をオリゴデンドロサイトに分化させた時の、ODC分化・髄鞘形成関連因子(ErbB4, Neuregulin1, Fyn, QKI, MBP, PLPなど)のSplicingパターンを、様々なプライマーセットを用いたRT-PCR法により解明した。
- ・hnRNPA1強制発現ヒトオリゴデンドロサイト前駆細胞株をオリゴデンドロサイトに分化させた時の、統合失調症関連遺伝子の発現パターンをマイクロアレイにより一斉に解析した。
- ・上記マイクロアレイの結果を用いてパスウェイ解析を行った。

3. 結果

・A1の過剰発現が、ODC分化（ミエリン化）に与える影響を、ヒトODC前駆細胞(OPC)MO3.13株を用いて検討した結果、有意なODCへの分化抑制が見られた。この分化抑制は細胞密度に依存的で、高密度による分化過程では、全く逆の有意な分化増強が見られた。また、この細胞密度による逆転現象は細胞基質 Metaroprotease群が関与していた。同様に、神経分化時では、ヒト神経細胞を用いて検討した結果、A1過剰発現は、細胞密度非依存的に神経分化を抑制した。

・A1過剰発現が引き起こすODC分化異常時に、SZ関連遺伝子で且つ脳構築に関する遺伝子の異常ASを解析した結果、少なくともErbB4とそのリガンドNeureglin-1 (NRG1)、NCAM1、およびestrogen receptor 1遺伝子の異常ASが観察された。

・逆に、A1の発現抑制による影響を同様に検討した結果、様式は異なるものの、ODC分化を攪乱することが解った。従って、A1発現は過剰でも過少でも広範なAS異常を起こし、神経系細胞分化を攪乱する。

・A1が引き起こすAS異常は、現在のところ前述のNRG1, ErbB4, ESR1, NCAM1遺伝子であるが、それらを含めた異常の結果、どのような遺伝子群の発現異常が起きるのかを確認する為に、A1過剰発現によるODC分化時の遺伝子発現を、micro arrayにより一斉に解析した。その結果、現在まで当疾患で指摘されている原因仮説に関与する多くの遺伝子がヒットした。

・上記の細胞密度による逆転現象は、マイクロアレイ法を用いたその後のパスウェイ解析により、細胞Matrix Metaroprotease群が関与していることが明らかとなった（特にMMP3, MMP10）。さらに、これらMMP群のスプライシング異常が起きていることも確認できた。

4. 考察 まとめ

これら結果は、まだブラックボックスな部分が多いが、hnRNPA1発現の攪乱が結果的に統合失調症様の遺伝子発現の攪乱を引き起こしていることを示している。従って、現在までほとんど当該領域で着目されてこなかったhnRNPA1が、脳構築において重要な一端を担い、さらには酸化ストレスなどのなんらかの脳内環境変化・異常などによってそれらスプライシング制御が破綻し、脳発達異常に起因する精神疾患に関与する可能性が示唆される。またこの異常は、マトリックスメタロプロテアーゼ群（MMP）が関与する、オリゴデンドロサイト間あるいは神経-オリゴデンドロサイト間の細胞内シグナル伝達経路の破綻に起因していることが示唆されたので、今後その詳細メカニズムを解明することは、治療・予防の足がかりとなるかもしれない。

5. 発表論文、参考文献

- Ishibashi Y., Izumo N., Morikawa T., and Manabe T. (2012). Voluntary activities and serotonin releases in rat amygdale by ovary ectomyzed rats. *Behav. Brain Res.* 227(1):1-6.
- 眞部孝幸. (2011). 統合失調症における選択的スプライシング制御の異常. *医学のあゆみ*, 238(5), 491-497.
- 眞部孝幸, 前田明. (2011). スプライシング異常から解析する統合失調症. *臨床検査*, 55(9), 893-899.
- Morikawa T. and Manabe T. (2010). Aberrant regulation of alternative pre-mRNA splicing in Schizophrenia. *Neurochem Int.*, 57, 691-704.
- Morikawa T/Manabe T., Ito Y., Yamada S., Yoshimi A., Nagai T., Ozaki N. and Mayeda A. (2010). The expression of HMGAla is increased in lymphoblastoid cell lines from Schizophrenia patients. *Neurochem. Int.*, 56, 736-739.