70　核移行因子の機能解析による精神神経疾患への治療戦略	山田　雅己

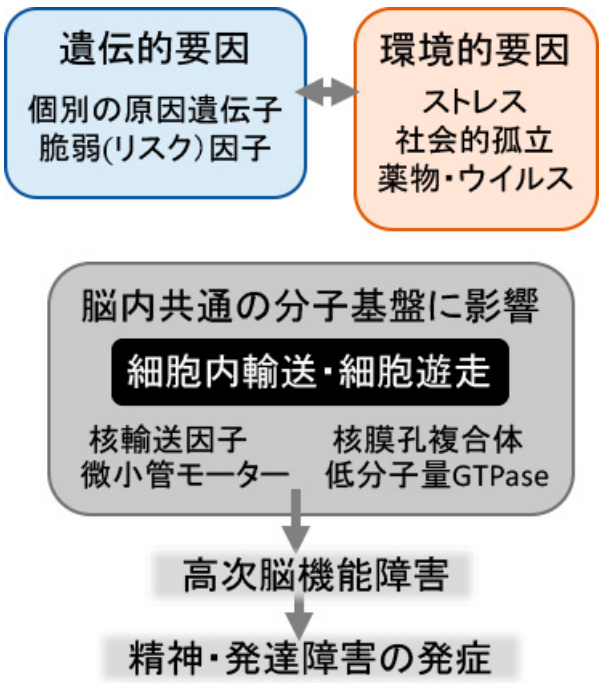
【目的】精神・発達障害に共通する社会性行動の脳基盤を探索することは、病態解明に向けての有力な指針となり得る。私たちは、神経細胞内にその分子基盤があるのではないかと考えた（図参照）。近年、統合失調症、ASD、ADHD 等の複数の精神・発達障害に核移行因子が関与していることが相次いで報告されている。しかしながら、当該障害における核移行因子の関与は、記憶、学習、情動など高次脳機能に関わる個々の情報を核内に伝達する従来の核移行活性だけでは、その機能的役割を説明することはできない。核移行因子の神経細胞内における新たな機能的役割を明らかにすることは、当該疾患の発症に至る分子メカニズムを解明する為に重要である。

本研究課題は、脳内での発現量がもっとも高く、統合失調症の発症との関連が示唆されている核輸送因子 KPNA1 に着目し、細胞内輸送および神経遊走活性を指標した神経細胞内における新たな機能的役割を明らかにすることを目的とする。さらに、精神・発達障害に共通する分子基盤を標的とした創薬探索を行い、汎用性の高い診断法、根本的治療法の確立を目指す。

【方法】*KPNA1* 遺伝子欠損マウス由来の脳部位（前頭前皮質および側坐核）から抽出、精製した RNA を用いた DNA マイクロアレイにより、遺伝子発現変動を野生型マウス由来のものと網羅的に比較した。また、薬物ストレスとして、NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬のひとつであるフェンシクリジン（PCP）を皮下投与し、その影響を調べた。

【結果】今回、前述の各試料の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現レベルを網羅的に測定した。各群の散布図をもとに主成分分析を行ったところ、前頭前皮質および側坐核共に、*KPNA1* 欠損と野生型間で顕著な差異はみられなかった。但し、PCP 投与の有無による差異は、両マウス群の前頭前皮質および側坐核で共に顕著にみられた。さらに興味深いことに、側坐核においては、PCP 投与群においてのみ、*KPNA1* 欠損と野生型間での差異が顕著にみられた。次に、*KPNA1* 欠損の側坐核において、微小管モーターの細胞質ダイニンの構成因子の遺伝子発現レベルが顕著に低下していた。また、PCP による薬物ストレス負荷の影響を調べたところ、*KPNA1* 欠損マウスにおいて、細胞質ダイニン構成遺伝子のさらなる発現低下がみられた。

高次脳機能障害の分子基盤



70. 核移行因子の機能解析による精神神経疾患への治療戦略

山田　雅巳

福井大学 学術研究院 医学系部門 分子生体情報学分野

Key words：核移行因子，微小管関連因子，細胞質ダイニン，細胞内物質輸送，神経細胞遊走

緒　言

精神障害のひとつである統合失調症、発達障害に分類される自閉症スペクトラム障害（ASD）や注意欠如多動性障害（ADHD）は、相互間の併発率が高く、統合失調症の発症に先行して ASD や ADHD の症状が認められる場合も少なくない。当該障害は、疾病分類上は異なるものとして各々細分化されているが、中核症状である社会性行動の類似性や認知機能、脳画像、脳機能画像（fMRI）における共通の所見も指摘されている。一方で、ASD、ADHD、および統合失調症者の脳には、各々特徴的な発達傾向がみられるが、その機能を最適化できないという点においては共通性がある。また、当該障害に関連する可能性のあるリスク（脆弱）因子として、複数の共通因子が報告されている。これまでに、当該障害の要因としては、遺伝、環境、脳機能の異常が指摘されているものの、根本的な治療法を生み出す為の研究の方向性は未だ共有できていない。前述の類似性より、当該障害に共通する社会性行動の脳基盤を探索することは、病態解明に向けての有力な指針となり得ることを示唆する。今回私たちは、神経細胞内にその分子基盤があるのではないかと考えた。

近年、統合失調症、ASD、ADHD 等の複数の精神・発達障害に核移行因子が関与していることが相次いで報告されている。KPNA（importin α）や IPO（importin β）は、代表的な核移行因子であり、細胞質から核内へと基質を輸送することで、外部からの多種多様なシグナルを核内へと伝える。しかしながら、当該障害における核移行因子の関与は、記憶、学習、情動など高次脳機能に関わる個々の情報を核内に伝達する従来の核移行活性だけでは、その機能的役割を説明することはできない。従って、核移行因子の神経細胞内における新たな機能的役割を明らかにすることは、当該疾患の発症に至る分子メカニズムを解明する為に重要である。

本研究課題は、脳内での発現量がもっとも高く、統合失調症の発症との関連が示唆されている核輸送因子 KPNA1（importin α5）に着目し、細胞内輸送および神経遊走活性を指標した神経細胞内における新たな機能的役割を明らかにすることを目的とする。さらに、精神・発達障害に共通する分子基盤を標的とした創薬探索を行い、汎用性の高い診断法、根本的治療法の確立を目指す。

方　法

1.　各脳組織部位からの総 RNA の抽出および精製

まず、*KPNA1*遺伝子欠損マウスを作製し、以下のように実験を行った。*KPNA1*欠損および野生型マウス（C57BL/6J）に対して、生後 5 週齢より、薬物ストレスとしてフェンシクリジン（以下、PCP と省略）10 mg/kg の皮下投与を開始した。PCP は、NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬のひとつであり、統合失調症と区別し難い陽性、陰性症状および認知機能障害を惹起する。この PCP を 1 日 1 回 7 日間連続で同様の方法で各マウス群に投与した後、生後 9～10 週齢で各脳組織部位を摘出、採集した。対照実験として、同様の方法で生理的食塩水を各マウスに投与したものを用いた。摘出した *KPNA1* 欠損および野生型由来の各脳組織部位（前頭前皮質および側坐核）は、ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System（Promega）を用いて総 RNA を抽出、精製した。これら RNA 試料の品質が保持されていることは、RIN（RNA integrity number）値が 7.0 以上であることを指標に確認した（Agilent Technologies, Inc.）。

2. DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変動解析

1.で抽出、精製した各々の総 RNA を用いて、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析において、前頭前皮質由来の総 RNA（濃度を 66.5 ng/μl に調製）は、Clariom S Assay キット（Thermo Fisher Scientific）を用い、側坐核由来の総 RNA（濃度を 10.5 ng/μl に調製）は、Clariom S Pico Assay キット（同上）を用いた。*KPNA1* 欠損と野生型、前頭前皮質と側坐核、および PCP 投与の有無を合わせて計 8 群（各群、n＝4）について、其々十分にアノテーションされた 20,000 以上の遺伝子発現レベルを網羅的に測定した。このデータ解析には、Trancsriptome Analysis Console（TAC）Software と Subio Software を併用した比較解析にて詳細な検討を行った。また、遺伝子オントロジー（GO）・エンリッチメント解析およびパスウェイ解析は、DAVID Bioinformatic database（DAVID Bioinformatic Resources 6.8）を用いて行った。

3. 蛍光分子イメージング

生後 3～5 日目の幼若マウス（C57BL/6J）から採取した後根神経節細胞内（以下、DRG と省略）に、EGFP-KPNA1 および mCherry-細胞質ダイニン中鎖（DIC1）をピペットチップ型電極―電気穿孔法（Neon Transfection System,、Thermo Fisher Scientific）を用いて発現させた。約 24～36 時間後、神経細胞内における各因子の挙動を共焦点レーザー顕微鏡（FV-1200、Olympus）にてライブ観察した［1，2］。また、KPNA1 の細胞内局在は、同様に HeLa 細胞内に EGFP-KPNA1 を発現させて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を取得した。このとき、Hoechst33342 を用いて、同時に核染色を行った［3～6］。

結果および考察

1. *KPNA1* 遺伝子欠損マウスに見られる行動異常

これまでに私たちは、前述と同様の方法で処理した *KPNA1* 欠損および野生型マウスに対して、生後 8 週齢で行動解析実験を行った。その結果、*KPNA1* 欠損マウスにおいては、新規物体認知機能の低下、社会孤立ストレス負荷条件下での感覚運動統合の障害、うつ傾向の PCP 依存的な感受性の増大が顕著にみられた。

2. 主成分分析

まず今回、各試料の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現レベルを網羅的に測定したところ、*KPNA1* 欠損由来の前頭前皮質および側坐核に於いて、野生型と比較して *KPNA1* 遺伝子の著しい発現低下がみられたことから、本アッセイ系が有効であることを確認した。次に、各群の散布図をもとに主成分分析を行ったところ、前頭前皮質および側坐核共に、*KPNA1* 欠損と野生型間で顕著な差異はみられなかった。但し、PCP 投与の有無による差異は、両マウス群の前頭前皮質および側坐核で共に顕著にみられた（第 1 主成分）。さらに興味深いことに、側坐核においては、PCP 投与群においてのみ、*KPNA1* 欠損と野生型間での差異が顕著にみられた（第 2 主成分）。

3. GO 解析およびパスウェイ解析

次に、GO 解析およびパスウェイ解析の結果、*KPNA1* 欠損の側坐核において、微小管モータータンパク質の一つである細胞質ダイニンの構成因子、細胞質ダイニン重鎖（DHC）および中鎖（DIC）の遺伝子発現レベルが顕著に低下していた。また、PCP による薬物ストレス負荷の影響を調べたところ、*KPNA1* 遺伝子欠損マウスにおいて、*DHC* および *DIC* 遺伝子のさらなる発現低下がみられた。さらに、*KPNA1* 遺伝子欠損、野生型マウスにかかわらず、細胞質ダイニンのアクセサリー蛋白質であるダイナクチン、神経特異的なクラスⅢ―β チューブリンといった微小管関連因子においても顕著なる発現の低下がみられた（表 1）。

表 1. *KPNA1* 欠損マウス由来の側坐核における遺伝子発現変動と PCP の影響

・KPNA1KO(Cont.) vs WT(Cont.)				
KO Avg	**WT Avg**	**Fold Change**	**P-value(Welch's t test)**	**Gene**
7.25	11.04	-13.83	1.32E-09	KPNA1
7.28	10.5	-9.35	0.0015	Cytoplasmic dynein heavy chain
8.15	9.31	-2.24	0.0007	Cytoplasmic dynein intermediate chain
・KPNA1KO(PCP) vs WT(PCP)				
KO Avg	**WT Avg**	**Fold Change**	**P-value(Welch's t test)**	**Gene**
7.4	11.52	-17.38	2.18E-08	KPNA1
6.61	10.96	-20.42	0.0005	Cytoplasmic dynein heavy chain
7.01	9.5	-5.63	0.0002	Cytoplasmic dynein intermediate chain
11.04	12.9	-3.62	0.0067	doublecortin
・WT(PCP) vs WT(Cont.)				
KO Avg	**WT Avg**	**Fold Change**	**P-value(Welch's t test)**	**Gene**
10.95	13.32	-5.18	2.55E-07	dynactin(p22)
9.69	11.58	-3.72	0.0002	tubulin, beta 3 class III
10.35	11.88	-2.88	0.0001	dynactin(p50)/dynamitin
10.02	11.18	-2.25	0.0002	Cytoplasmic dynein light chain (LC8)
12.9	11.34	2.94	0.0387	doublecortin
・KO(PCP) vs KO(Cont.)				
KO Avg	**WT Avg**	**Fold Change**	**P-value(Welch's t test)**	**Gene**
10.49	13.01	-5.71	4.24E-07	dynactin(p22)
8.91	10.98	-4.21	6.20E-05	tubulin, beta 3 class III
9.71	11.61	-3.74	3.95E-05	dynactin(p50)/dynamitin
7.01	8.81	-3.49	0.0046	Cytoplasmic dynein intermediate chain
10.23	11.39	-2.23	1.15E-06	dynactin(p150Glued)

4. KPNA1 の細胞内機能の解析

これら遺伝子発現変動の解析データをもとに、KPNA1 の神経細胞内での新たな機能的役割を明らかにするために、細胞内での分子挙動を観察した。具体的には、微小管上での細胞質ダイニンとの挙動を共にしているかを蛍光分子イメージングにより調べた。これまでに私たちは、細胞質ダイニンが微小管上で、順行性および逆行性の両方向に輸送されることを報告している（図 1a、文献 1.改訂）［1］。今回私たちは、KPNA1 が微小管上を細胞質ダイニンによって逆行性（神経終末から細胞体側へ）に輸送されていることを、ライブセルイメ-ジングの結果より明らかにした（図 1b）。また、興味深いことに、HeLa 細胞における KPNA1 の細胞内局在は、中心体近傍に強い集積がみられた（図 1c）。これらの実験結果より、KPNA1 の微小管上での物質輸送における機能的役割の解明が大いに期待できる。

前述のように、*KPNA1* 遺伝子欠損マウス由来の側坐核において、細胞質ダイニン、ダイナクチン、細胞質ダイニンと協調的に働き、微小管による核の牽引移動に重要な役割を果たすことが報告されているダブルコルチン X の薬物（PCP）依存的な遺伝子発現レベルでの低下がみられたことは、KPNA1 が細胞質ダイニンあるいは微小管関連因子と協調的に神経細胞遊走の律速段階となる微小管による核の牽引移動に関わっているのかもしれない。統合失調症、ASD、ADHD 患者の脳は、神経遊走障害によって惹起されるとの報告があり、微小管モーターをはじめとする微小管関連因子が注目されはじめていることと矛盾しない。

今後は、細胞内輸送および神経遊走活性を指標に、核移行因子 KPNA1（importin α5）の神経細胞内における新たなる機能的役割を明らかにすることで、精神・発達障害に共通する分子基盤を解明したい。さらには、これらを標的とした創薬探索を行い、汎用性の高い診断法、根本的治療法の確立を目指す。

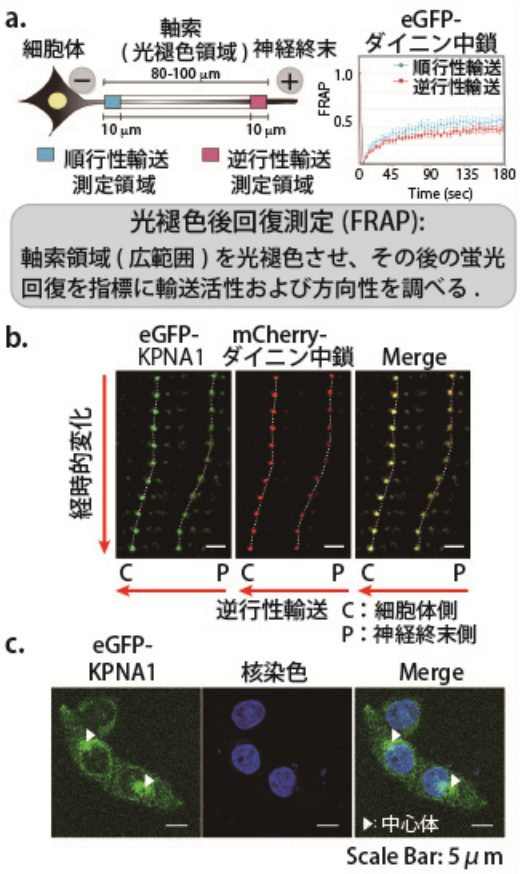


図 1. KPNA1 の細胞内分子動態と局在.

a）細胞質ダイニンは、後根神経節細胞の軸索領域において両方向に輸送された（[1] より改訂）。

b）KPNA1 は、後根神経節細胞の軸索領域の逆行性輸送において細胞質ダイニンと挙動を共にした。

c）KPNA1 は、HeLa 細胞において中心体近傍に集積がみられた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学蛋白質研究所高次脳機能学研究室の疋田貴俊教授、医薬基盤・健康・栄養研究所細胞核輸送ダイナミクスプロジェクトの岡正啓プロジェクトリーダーと宮本洋一サブプロジェクトリーダーである。

文　献

1) Yamada M, Toba S, Yoshida Y, Haratani K, Mori D, Yano Y, Mimori-Kiyosue Y, Nakamura T, Itoh K, Fushiki S, Setou M, Wynshaw-Boris A, Torisawa T, Toyoshima YY, Hirotsune S.LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein.EMBO J. 2008 Oct 8;27（19):2471-83.
doi: 10.1038/emboj.2008.182. Epub 2008 Sep 11. PMID: 18784752

2) Yamada M, Toba S, Takitoh T, Yoshida Y, Mori D, Nakamura T, Iwane AH, Yanagida T, Imai H, Yu-Lee LY, Schroer T, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1.EMBO J. 2010 Feb 3;29（3):517-31. doi:10.1038/emboj.2009.378. Epub 2009 Dec 17. PMID: 20019668

3) Yamada M, Yoshida Y, Mori D, Takitoh T, Kengaku M, Umeshima H, Takao K, Miyakawa T, Sato M, Sorimachi H, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly. Nat Med. 2009 Oct;15（10):1202-7. doi: 10.1038/nm.2023. Epub 2009 Sep 6. PMID:19734909

4) Yamada M, Kumamoto K, Mikuni S, Arai Y, Kinjo M, Nagai T, Tsukasaki Y, Watanabe TM, Fukui M, Jin M, Toba S, Hirotsune S. Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement. Nat Commun. 2013;4:2033. doi: 10.1038/ncomms3033.PMID:23783758

5) Jin M, Yamada M, Arai Y, Nagai T, Hirotsune S. Arl3 and LC8 regulate dissociation of dynactin from dynein. Nat Commun. 2014 Oct 24;5:5295. doi: 10.1038/ncomms6295. PMID:25342295

6) Toba S, Jin M, Yamada M, Kumamoto K, Matsumoto S, Yasunaga T, Fukunaga Y, Miyazawa A, Fujita S, Itoh K, Fushiki S, Kojima H, Wanibuchi H, Arai Y, Nagai T, Hirotsune S. Alpha-synuclein facilitates to form short unconventional microtubules that have a unique function in the axonal transport. Sci Rep. 2017 Nov 27;7（1):16386. doi: 10.1038/s41598-017-15575-3. PMID:29180624