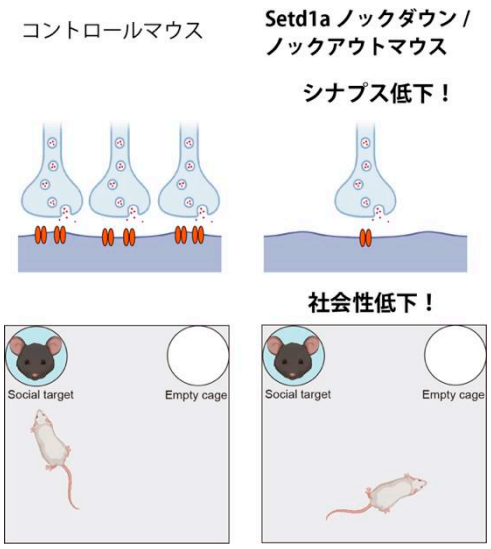
21　シナプス刈り込みの破綻による疾患発症の機構解明	上阪　直史

【目的】本研究では、遺伝性が強いとされている自閉スペクトラム症や統合失調症に着目し、それらの病態の解明や発症関連遺伝子の同定を目指した。これまでに、自閉スペクトラム症や統合失調症のヒト患者の組織を用いた大規模な遺伝子解析で、多数の遺伝子が病態に関与することが示唆されている。しかし、それらの遺伝子変異が神経細胞においてどのような機能的な異常を引き起こし、自閉スペクトラム症や統合失調症の発症にどれだけ影響を及ぼすのかよくわかっていない。これまでのモデル動物を用いた研究は自閉スペクトラム症や統合失調症の病態や発症原因として、神経細胞のシナプス機能異常がある可能性を示している。そこで本研究では、シナプス異常と行動異常を指標にそれらの精神疾患関連遺伝子の機能を解析することで遺伝子—シナプス—行動の関係を明らかにし、自閉スペクトラム症や統合失調症の病態や発症メカニズムの解明に貢献することを目指した。

【方法】この目的を達成するために、神経回路やシナプスの分子メカニズムが比較的良く調べられており、筆者が研究してきた小脳の登上線維—プルキンエ細胞シナプスと大脳皮質前頭前野シナプスを研究対象とした。小脳や大脳皮質前頭前野は精神疾患との関連が多く報告されており、遺伝子—シナプス刈り込み—精神疾患の三つの関連を調べるために最も適した神経系である。

【結果】本研究では、遺伝子—シナプス—精神疾患の関係を明らかにし、遺伝子異常によるシナプスの破綻が精神疾患様行動を引き起こすか検証するために、以下二つの研究開発項目に分けて進めた。1. シナプス異常を引き起こす精神疾患リスク遺伝子の同定：本研究では、精神疾患への関与が示唆されているエピジェネティック遺伝子群とレトロトランスポゾン LINE1 に着目し、それらの遺伝子をノックダウンした時のシナプス異常を解析した。その結果、ヒトで統合失調症のリスク遺伝子として知られている遺伝子 *SETD1A* をノックダウンしたときに神経細胞同士の機能的な結合を反映する興奮性のシナプス伝達が低下することを見出した。2. 精神疾患様行動に関わる遺伝子の同定：遺伝子 *SETD1A* の変異マウスを作製し、行動を調べた結果、統合失調症の陽性症状に関連する活動量の上昇、陰性症状の一部を反映する社会性行動の低下、認知機能障害の一つである作業記憶障害、意欲の低下に関連した回避行動の異常など、統合失調症の臨床的特徴をより幅広く再現することを見出した。統合失調症を含む精神疾患の発症原因の一つと考えられているヒストン修飾と、脳内遺伝子発現、シナプス機能、行動との関係を解明したことで、統合失調症の病態解明や治療戦略の開発に貢献することが期待される。

Setd1a 変異マウスにおけるシナプスと社会性の低下



21. シナプス刈り込みの破綻による疾患発症の機構解明

上阪　直史

東京大学 大学院医学系研究科 神経生理学分野

Key words：自閉スペクトラム症，統合失調症，シナプス刈り込み，小脳，大脳皮質前頭前野

緒　言

精神疾患は社会的コミュニケーション障害などの中核症状を特徴とした脳疾患である。近年の精神疾患である自閉スペクトラム症や統合失調症のゲノム解析により、100 以上の関連遺伝子が同定されてきた。最近、自閉スペクトラム症や統合失調症の病態の原因のひとつとして、神経細胞のシナプス機能の異常が注目されている［1］。しかし、多くの精神疾患関連遺伝子はシナプスにどのような機能的影響を及ぼすのか、どれだけ精神疾患で見られる行動異常と関連しているのか、はよくわかっていない。さらにシナプス機能異常と行動異常の因果関係もほとんど明らかにされていない。本研究では、精神疾患の病態や発症原因として注目されているシナプスに着目し（図 1）、精神疾患関連遺伝子がシナプス異常に関わるかと精神疾患様行動に関わるかを調べた。

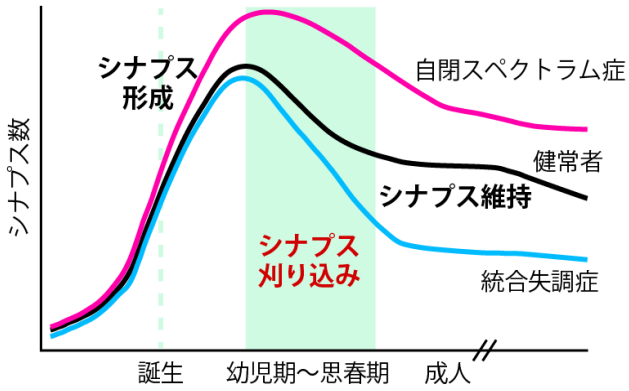


図 1.　シナプスと精神疾患の相関グラフ

黒ラインで示された健常人では、1，2 歳までに急激にシナプス数が増加し、その後にシナプス刈り込みがおこる。このシナプスが発達期に過剰に存在する場合、社会性やコミュニケーションに異常をきたす自閉スペクトラム症が発症し、逆にシナプスが低下すると認知機能障害である統合失調症が発症する可能性が報告されている。このようにシナプス発達のメカニズム解明は神経回路形成の基本原理解明と精神疾患の病態解明にも繋がることが期待できる。

方　法

1. Setd1a 変異マウスの作製

統合失調症の分子機構・神経回路における SETD1A のデ・ノボ変異の役割を解析するために、患者で同定されたデ・ノボ変異を再現した遺伝子変異を持つマウス（Setd1a 変異マウス）をゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法を用いて作製した。

2. *In utero* electroporation（IUE）による脳領域特異的 Setd1a ノックダウンマウスの作製

マウス子宮内胎仔脳へ遺伝子導入を可能とする手法。マウス胎児脳（胎生 14 日齢あるいは 15 日齢）に RNA 干渉配列と EGFP が発現するプラスミドを導入し電気パルスを与えた。その後マウスを成長させ、任意の細胞に RNA 干渉配列と EGFP を発現させた。これらにより任意の細胞で Setd1a の発現を抑制した（図 2）。

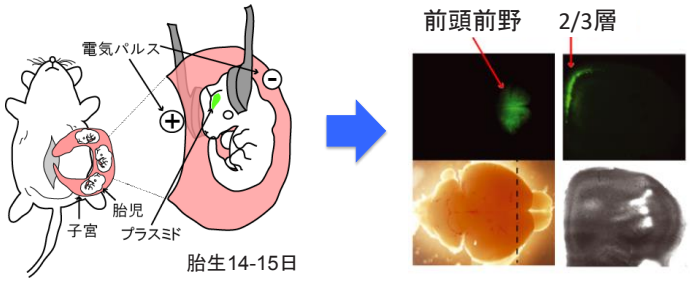


図 2. IUE による脳領域特異的ノックダウンマウスの作製
RNAi ノックダウン配列（miRNA）と EGFP とを共発現させるベクターを用い、胎生 14～15 日目のマウスの脳室にそのベクターを注入し、電気パルスを与えた。GFP 陽性細胞は前頭前野の 2／3 層に観察された。

3. 電気生理学によるシナプス解析

マウスから脳を取り出し、coronal 方向（300 μm）や sagittal 方向（250 μm）で急性脳スライスを作製した。ホールセルパッチクランプ法を用いて、GFP 陽性（ノックダウン）あるいは GFP 陰性（コントロール）の細胞から電気記録を行った。電気記録している細胞の周囲に刺激電極を設置し、電流を与えることで記録している細胞にシナプス結合している軸索を刺激した。シナプス機能を解析するために、1. 興奮性シナプス伝達では、刺激強度－EPSC 振幅関係、微小電流の振幅及び頻度、ペアードパルス比、そして AMPA と NMDA 電流比を解析した。2. 抑制性シナプス伝達では、刺激強度-EPSC 振幅関係と微小電流の振幅及び頻度を解析した。

4. マウスの行動解析

1. 社会的相互作用を調べるために、3 チャンバー試験で見知らぬマウスを別のマウスがにおいを嗅ぐ時間とその滞在時間を測定した。2. 反復・ステレオタイプ行動を調べるために、モリスの水迷路で記憶の課題を行った後にその習慣を逆転させる困難さを測定した。これら以外にも毛づくろいの繰り返し行動試験、Y 迷路試験、プレパルス抑制試験、オープンフィールド試験、テールサスペンション試験、明暗箱試験、強制水泳試験など統合失調症、自閉スペクトラム症の症状を反映する項目を含めた行動実験を行った。

結果および考察

本研究では、モデル生物としてマウスを用い、遺伝子―シナプス―精神疾患の関係を明らかにすることを目指した。このために、精神疾患リスク遺伝子の異常がシナプスの破綻や精神疾患様行動を引き起こすか検証した。以下 2 つの研究開発項目に分けて遂行した。1. シナプス異常を引き起こす精神疾患リスク遺伝子の同定、2. 患様行動に関わる遺伝子の同定。

1. シナプス異常を引き起こす精神疾患リスク遺伝子の同定

本研究では、精神疾患への関与が示唆されているエピジェネティック遺伝子群［2］とレトロトランスポゾン LINE1［3］に着目し、それらの遺伝子をノックダウンした時のシナプス異常を電気生理学の方法により解析した。複数の候補遺伝子を解析した結果、ヒトで統合失調症のリスク遺伝子として知られている遺伝子 *SETD1A* をノックダウンした

ときに神経細胞同士の機能的な結合を反映する興奮性のシナプス伝達が低下することを見出した（図 3）。統合失調症に関与していると考えられている脳領域の一つである大脳皮質前頭前野の錐体細胞のシナプス伝達を解析したところ、*Setd1a* ノックダウンマウスではシナプス前とシナプス後の両方の興奮性シナプス伝達が障害されていた。さらに細胞の形態を解析した結果、樹状突起に存在するスパインの密度が低下していることが明らかになった。スパインは興奮性のシナプスを受け取る構造として知られているため、形態学解析の結果は電気生理学的解析の結果と一致する。さらに *Setd1a* のヘテロノックアウトマウスを作製し、シナプスを解析した。その結果、ノックダウンマウスと同様に *Setd1a* ヘテロノックアウトマウスにおいても興奮性のシナプス伝達が障害されていた。

さらに *Setd1a* ヘテロノックアウトマウスを用い、シナプスの分子変化を解析した。*Setd1a* ヘテロノックアウトマウスから RNA を抽出し、RNA-Seq 解析したところ、*Homer1* や *Ptpro* を含むシナプス後機能に関連する遺伝子がダウンレギュレーションされ、*Unc13c* を含むシナプス前機能に関連する遺伝子がアップレギュレーションされていた。

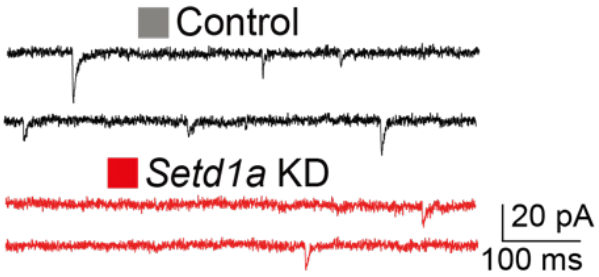


図3. Setd1aの大脳皮質前頭前野特異的ノックダウンマウスは興奮性シナプス伝達の低下を示す
コントロールマウス（上）と比べ Setd1a ノックダウンマウス（Setd1a KD）（下）は微小興奮性シナプス後電流の頻度や振幅が低下していた。

2. 精神疾患様行動に関わる遺伝子の同定

次に、*Setd1a* ヘテロノックアウトマウスの行動を解析した。その結果、統合失調症の陽性症状に関連する活動量の上昇、陰性症状の一部を反映する社会性行動の低下、認知機能障害のひとつである作業記憶障害、意欲の低下に関連した回避行動の異常など、統合失調症の臨床的特徴をより幅広く再現することを見出した。さらに大脳皮質前頭前野の興奮性細胞のみで *Setd1a* をノックダウンしたマウスを作製し、行動を解析した。その結果、*Setd1a* ノックダウンマウスでは社会性行動のみが障害されていた。*Setd1a* ヘテロノックアウトマウスと *Setd1a* ノックダウンマウスでは共通して大脳皮質前頭前野の興奮性細胞への興奮性シナプス伝達が減弱し、社会性行動が障害されていた（図 4）。このことは脳皮質前頭前野の興奮性細胞への興奮性シナプス伝達の減弱が社会性行動の異常を引き起こす可能性を示している。

統合失調症は、多くの原因候補遺伝子が報告されるとともにその病態の基盤としてシナプス異常の重要さが考えられている。その中で SETD1A は統合失調症の発症リスクの上昇に強く関与するヒストン修飾酵素である［4〜7］。今回の研究により分子・シナプス・神経回路における SETD1A の詳細な役割を明らかにした。SETD1A の一部細胞での発現低下が、興奮性シナプスを減弱させ、統合失調症の中核症状である社会性障害へ関与することが明らかになった。最近、同じ *Setd1a* 遺伝子についての別の遺伝子改変マウスで、社会性が障害されることが報告されるとともに、治療抵抗性の作業記憶異常に対する新規治療薬候補の報告がされている。今後、*Setd1a* 遺伝子変異マウスを用いて個々の行動学的異常のメカニズムを解明することにより、従来困難だった統合失調症の病態の全容解明や統合失調症の各症状に対する新規治療法の開発が促進することが期待される。

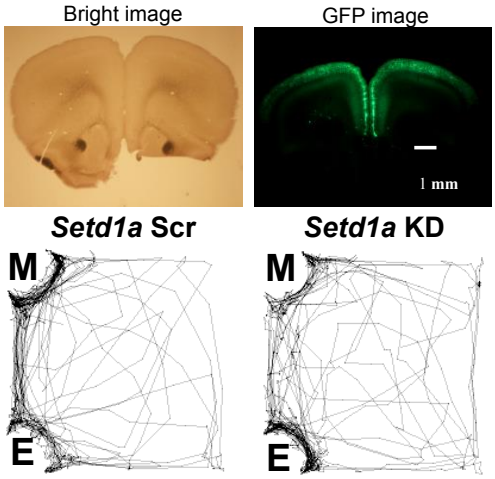


図4. Setd1aの大脳皮質前頭前野特異的ノックダウンマウスは社会性行動に異常を示す
上）大脳皮質の冠状平面のスライスの明視野像（左）と蛍光像（右）。
下）コントロールマウス（左）では何も入っていないケージ（E）に比べてマウスがいるケージ（M）に近づく時間が長かったが、Setd1a ノックダウンマウス（右）はマウスのいるケージにあまり近づかなかった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科神経生理学研究室の狩野方伸先生と現在ジョン・ホプキンス大学 The Solomon H Snyder Department of Neuroscience の長濱健一郎先生である。

文　献

1） Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. Nat Neurosci. 2011 Mar;14(3):285-93. doi: 10.1038/nn.2741. PMID: 21346746; PMCID: PMC3530413.

2） Akbarian S, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in psychiatry. Neuropsychopharmacology. 2013 Jan;38(1):1-2. doi: 10.1038/npp.2012.185. PMID: 23147478; PMCID: PMC3521986.

3） Terry DM, Devine SE. Aberrantly High Levels of Somatic LINE-1 Expression and Retrotransposition in Human Neurological Disorders. Front Genet. 2020 Jan 8;10:1244. doi: 10.3389/fgene.2019.01244. PMID: 31969897; PMCID: PMC6960195.

4） Takata A, Ionita-Laza I, Gogos JA, Xu B, Karayiorgou M. De Novo Synonymous Mutations in Regulatory Elements Contribute to the Genetic Etiology of Autism and Schizophrenia. Neuron. 2016 Mar 2;89(5):940-7. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.024. PMID: 26938441; PMCID: PMC4793939.

5） Takata A, Xu B, Ionita-Laza I, Roos JL, Gogos JA, Karayiorgou M. Loss-of-function variants in schizophrenia risk and SETD1A as a candidate susceptibility gene. Neuron. 2014 May 21;82(4):773-80. doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.043. PMID: 24853937; PMCID: PMC4387883.

6） Mukai J, Cannavò E, Crabtree GW, Sun Z, Diamantopoulou A, Thakur P, Chang CY, Cai Y, Lomvardas S, Takata A, Xu B, Gogos JA. Recapitulation and Reversal of Schizophrenia-Related Phenotypes in Setd1a-Deficient Mice. Neuron. 2019 Nov 6;104(3):471-487.e12. doi: 10.1016/j.neuron.2019.09.014. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31606247; PMCID: PMC7010348.

7) Nagahama K, Sakoori K, Watanabe T, Kishi Y, Kawaji K, Koebis M, Nakao K, Gotoh Y, Aiba A, Uesaka N, Kano M. Setd1a Insufficiency in Mice Attenuates Excitatory Synaptic Function and Recapitulates Schizophrenia-Related Behavioral Abnormalities. Cell Rep. 2020 Sep 15;32(11):108126. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108126. PMID: 32937141.