

論文の内容の要旨

論文題目 統合失調症の病態生理とキネシンスーパーファミリー蛋白 **KIF3** の分子細胞生物学的研究

氏名 吉原 壮悟

統合失調症は生涯有病率が世界で 0.3~0.7%の主要な精神疾患であり、発達中の神経細胞の障害が発症に中心的な役割を果たしていると考えられているが、その病因・病態にはいまだ不明な点が多い。病因の一つとして酸化ストレスの影響により、タンパク質のアミノ酸残基が非酵素的に修飾され、終末糖化産物が蓄積した状態であるカルボニルストレスが上昇することが報告されている。ベタインは抗カルボニルストレス剤であり、その血漿および脳内の発現レベルは統合失調症患者において低下傾向にある。

CRMP2 は、中枢神経系で高い発現量を示しており、培養神経細胞や発達期の脳組織において、神経細胞の様々の構造に重要な機能を果たすことにより神経発達に不可欠な制御因子と考えられている。我々の先行研究では、**CRMP2** がカルボニル化修飾を受けて多量体化し、その機能が失われてしまうことを報告しているため、**CRMP2** のカルボニル化は統合失調症の発症経路における重要な分子の 1 つである可能性がある。

神経細胞の形態形成にはアクチン細胞骨格と微小管細胞骨格の密接な連関ならびに微小管上を膜小器官やタンパク質複合体などのカーゴを輸送するキネシン分子モーターも大きな役割を果たしており、これらの制御破綻も統合失調症の発症に深く関与していると考えられている。我々は以前にキネシン分子モーター**KIF3B** 遺伝子をヘテロノックアウトしたマウス(*Kif3b*^{+/−})が社会性の低下やプレパルス抑制の低下などの統合失調症様の行動異常を呈することを明らかにしている。そこで本研究では、ベタインを補充することが統合失調症の治療に繋がるのではないかと考え、統合失調症モデル動物である *Kif3b*^{+/−}マウスを用いた研究により、統合失調症の新規発症メカニズム及びそれに対するベタインの作用機序を検証した。

ベタインが *Kif3b*^{+/−}マウスの統合失調症様表現型を回復するかを検証するため、高ベタイン餌を離乳後 6~7 週間にわたり自由摂食させたところ、統合失調症様の行動異常のうち、社会性ならびにプレパルス抑制の低下が回復した。これらの回復の細胞生物学的基盤として、*in vivo* および *in vitro* における神経細胞の形態を調べたところ、*Kif3b*^{+/−}神経細胞では、一部の統合失調症モデルマウスでも報告されている神経突起の過剰形成が観察され、さらにこれが高ベタイン餌摂食や培地へのベタイン添加により回復することが明らかとなった。また、この表現型はカルボニルストレスの減少に必須の役割を果たす **GLO1** 遺伝子を欠損させたヒト iPS 細胞から誘導した神経細胞においても観察されたことに加え、抗カルボニルストレス剤として知られているピリドキサミン処理及び **KIF3B** の強制発現のいずれによっても回復された。これらのデータから、**KIF3** の欠損とカルボニルストレスの双方により

神経突起の過剰形成が誘導され、この過剰形成はベタイン等の抗カルボニルストレス剤によって回復することが示唆された。

神経突起過剰形成の分子基盤を調べるため、幼若期の *Kif3b*^{+/+}海馬神経細胞をセミ超解像タイムラプス蛍光顕微鏡、STED 超解像顕微鏡、走査型電子顕微鏡等を用いて形態学的に観察した。その結果、*Kif3b*^{+/+}海馬神経細胞周縁部において、アクチン束の欠損に伴いラメリポディアの動態が著しく低下していた。次にアクチンと微小管+末端を蛍光標識し、タイムラプス解析を行ったところ、F-アクチン束の形成不全によりラメリポディアの動態が減少し、微小管のラメリポディア周縁部への侵入頻度が増加することにより、神経細胞突起の過剰形成を誘導することが示唆された。これらの細胞骨格異常も、培地へのベタイン添加によって有意に回復した。

ベタインの投与によりアクチン束形成に関わる KIF3 の欠損が補われることから、この表現型の原因となる KIF3 分子モーターのカーゴについて探索した。その結果、CRMP2 が KIF3B の共免疫沈降法を用いたスクリーニングより候補に挙がり、また CRMP2 は、先行研究によってヒト統合失調症患者由来の iPS 細胞におけるカルボニルストレスの主要標的であることや、細胞骨格を制御する活性を有することが明らかになっている。そこで、これらの知見に基づき、共免疫沈降や近接ライゲーションアッセイ、酵母ツーハイブリッド解析などの生化学的手法により KIF3 分子モーターが CRMP2 と有意に結合していることを同定した。次に CRMP2 とラメリポディア内アクチン束との関係性を探索するため免疫染色を行ったところ、CRMP2 は野生型海馬神経細胞のラメリポディア最周縁部に蓄積する傾向が見られた。しかし、*Kif3b*^{+/+}海馬神経細胞では、この領域における蓄積が著しく低下していた。そこで CRMP2 とアクチン間の近接ライゲーションアッセイを行ったところ *Kif3b*^{+/+}海馬神経細胞のラメリポディア上における結合点数の有意な減少が明らかとなった。これらの結果から、KIF3 分子モーターの機能低下によってラメリポディア周縁部への CRMP2 輸送が不足し、CRMP2 とアクチンの相互作用が減少し、アクチンの動態に変化が生じているものと考えられた。

CRMP2 が神経突起形成に作用しているかを明らかにするため、海馬神経細胞を用いて CRMP2 の発現量を双方向に変化させた。野生型海馬神経細胞において miRNA により CRMP2 をノックダウンすると樹状突起が過剰に形成された一方で、*Kif3b*^{+/+}海馬神経細胞に CRMP2 を強制発現すると神経突起の過剰形成が有意に回復したため、CRMP2 が KIF3 分子モーターのエフェクターとして機能し、神経発生初期段階において、過剰形成を抑制する分子経路に主要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、ベタイン投与によるマウス脳内の CRMP2 への影響を生化学的に評価した。CRMP2 はカルボニル化修飾を強く受けると有害な多量体を形成する性質を利用し、サイズ排除クロマトグラフィーにより *Kif3b*^{+/+}マウス脳ライセートの上清における CRMP2 の分画を行った。その結果、多量体化した CRMP2 量が高ベタイン餌の摂取により著しく低下しており、生体においてもベタインが脱カルボニル化に起因した CRMP2 の脱抑制に有効であること

が示唆された。

最後に、CRMP2 のアクチン細胞骨格に対する *in vitro* における活性を生化学的に調べた。精製アクチンに対して精製 CRMP2 あるいはカルボニル化修飾を加えた CRMP2 を作用させた結果、CRMP2 は F-アクチン束化能を有しており、この活性はカルボニル修飾により喪失することが示唆された。

これらの実験に加え、ヒト統合失調症の病因における KIF3 分子モーターの意義を評価するため、福島・新潟の脳バンクから供与いただいた統合失調症患者の死後脳サンプルを ELISA 法により解析したところ、特に前頭前野において KIF3 タンパク質のレベルが低下する傾向にあったため、本研究において *Kif3b*^{+/−}マウス脳で明らかにした分子メカニズムが、ヒト脳においても同様に働いている可能性が示唆された。

以上の結果から、ベタインによる統合失調症の回復の分子メカニズムは以下のように推測される。KIF3 分子モータータンパク質の遺伝的またはエピジェネティックな発現・機能低下により、CRMP2 の神経細胞ラメリポディアへの輸送が阻害される。さらに、カルボニルストレスが上昇すると CRMP2 のカルボニル化が増強され、その活性が低下する。これら 2 つの量的・質的欠損は、相乗的にラメリポディアにおける CRMP2 活性を低下させ、F-アクチンの束化障害、ラメリポディアの異常安定化、ラメリポディア外縁への微小管の過剰な侵入、神経突起の過剰形成を引き起こし、脳の神経回路形成やシナプスの興奮・抑制バランスを乱すものと考えられる。ベタインを投与すると、CRMP2 の脱カルボニル化によりアクチン束化活性を有した CRMP2 量が増加し、KIF3 による CRMP2 輸送を補うことにより、これらの症状が回復されることが示唆された。本研究により、統合失調症を惹起する新しい複合要因が分子レベルから個体レベルを通じて解明され、今後の疾患病態の理解ならびに新規治療法の開発に大きく寄与することが期待される。