

[課程－2]

審査の結果の要旨

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、生涯にわたって生活の質が損なわれる可能性が高い疾患である。ベタインは統合失調症発症要因の一つであるカルボニルストレスの軽減剤であり、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。そこで、ベタインを補充することが統合失調症の治療に繋がると考え、統合失調症モデル動物であるキネシン分子モーターKIF3 遺伝子ヘテロ欠損 (*Kif3b*^{+/−}) マウスを用いた研究を行い、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の解明に迫った。具体的に下記の結果を得た。

1. 継続的な高ベタイン餌の摂食により *Kif3b*^{+/−}マウスの統合失調症様表現型の一部である社会性の低下の回復及びプレパルス抑制の回復傾向が確認された。
2. 高ベタイン餌摂食による行動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*^{+/−}マウス神経細胞では神経突起の過剰形成が生じており、この異常がベタインによって回復していることが明らかになった。過剰形成表現型は、一部の統合失調症モデルマウスでも報告されているため行動変化の要因であることが示唆された。また、過剰形成の表現型は、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または KIF3B の強制発現により回復した。これらのデータより KIF3 の欠損とカルボニルストレスの双方が、神経突起の過剰形成を引き起こす可能性があり、抗カルボニルストレス剤によって回復されることが示唆された。
3. 神経突起過剰形成の上流探索のため、幼若期の神経細胞に着目したところ、*Kif3b*^{+/−}海馬神経細胞では、アクチン束の欠損を伴うラメリポディア動態の低下が観察された。この低下によって、神経突起形成に重要な役割を担っている微小管がラメリポディア先端部に過剰侵入し、過剰形成を生じていることが示唆された。これらの異常もベタインによって回復した。
4. *Kif3b*^{+/−}海馬神経細胞の表現型の原因となりうる KIF3 分子モーターのカーゴについて、生化学的に探索を行い、カルボニルストレスの主要な標的である CRMP2 が結合している

ことを同定した。また、CRMP2 が KIF3 による神経突起形成の制御エフェクターであるかを検証するため、海馬神経細胞を用いて CRMP2 の発現量を双方向的に変化させたところ、野生型海馬神経細胞への CRMP2 ノックダウンにより *Kif3b*^{+/+}海馬神経細胞と同様の神経突起過剰形成が生じたことに加え、*Kif3b*^{+/+}海馬神経細胞への CRMP2 強制発現により過剰形成を回復できたため、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、神経突起の過剰形成防止の分子経路に重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. CRMP2 はカルボニル化修飾を受けると有害な多量体を形成する性質を利用し、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。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 CRMP2 の脱カルボニル化に有効であることが示唆された。

6. CRMP2 のアクチン細胞骨格に対する活性を生化学的に調べるため、組換え CRMP2 タンパク質、カルボニル化 CRMP2 及びアクチンを精製し、結合実験を行った。その結果、一定の濃度以上の CRMP2 タンパク質は、F-アクチンに結合してその束化能を有し、この活性は CRMP2 のカルボニル化によって喪失することが示唆された。

7. 本研究の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、患者死後脳サンプルにおける KIF3A/B タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。統合失調症患者において神経細胞の形態異常が観察される前頭前野の皮質領域ライセートの上清の KIF3A レベルは、対照被験者よりも有意に低く、KIF3B レベルもこの領域において減少する傾向にあった。従って、*Kif3b*^{+/+}マウス脳を用いて解明した分子メカニズムが、ヒト患者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、本論文ではアミノ酸残基のカルボニル化および KIF3 分子モーターによる細胞内輸送という CRMP2 の 2 つの制御メカニズムの破綻が、統合失調症の病因の一つであることに加え、ベタインによる脱カルボニル化が、アクチン束化活性を有した CRMP2 の量を増やし、KIF3 分子モーターによる CRMP2 輸送を補うことにより *Kif3b*^{+/+}マウス神経細胞の形態異常を回復することを示した。本論文で明らかになった知見は、今後ヒト統合失調症の新規治療法の確立に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。