

博士論文

神経発達異常仮説に基づく精神疾患モデルを用いた
遺伝子発現解析による中枢神経異常の解明

木内 拓

博士論文

論文題目 神経発達異常仮説に基づく精神疾患モデルを用いた
遺伝子発現解析による中枢神経異常の解明

所属 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻

指導教員名 笠井 清登

申請者名 木内 拓

目次

1	要旨	8
2	序文	9
2.1	統合失調症の疫学と病態	9
2.2	統合失調症の病態生理についての仮説	10
2.2.1	遺伝学的要因と遺伝-環境相互作用仮説	11
2.2.2	ドーパミン仮説	12
2.2.3	Hypofrontality（低前頭葉機能）仮説	12
2.2.4	神経発達仮説	13
2.3	動物モデルによる精神疾患病態の研究	14
2.3.1	薬物誘発モデル	15
2.3.2	遺伝モデル	16
2.3.3	母体免疫賦活による神経発達モデル	17
2.4	本研究の目的と方針	18
3	方法	20

3.1	母体免疫賦活モデルマウスの作成	20
3.1.1	ポリイノシン酸-ポリシチジル酸 (Poly I:C) による免疫賦活の検定	20
3.1.2	母体マウスへのポリイノシン酸 - シチジル酸投与モデル作成方法	22
	モデルマウス前頭前野の遺伝子発現解析	23
3.2		23
3.2.1	動物の解剖及び前頭前野の摘出	23
3.2.2	RNA の抽出	23
3.2.3	RNA サンプルの評価及びシーケンス	24
3.2.4	データ解析	25
3.2.5	発現変動遺伝子のリアルタイム PCR による評価手法	28
3.3	免疫組織化学染色	30
3.3.1	組織標本の撮影および定量的解析	32
3.4	統計解析	34
4	結果	35
4.1	母体免疫賦活モデルマウスの評価	35

4.1.1	Poly I:C による免疫賦活の評価.....	35
4.1.2	母体免疫賦活モデルマウスの作成.....	35
4.2	RNA-seq による発現解析.....	36
4.2.1	サンプルのクオリティチェック	36
4.2.2	カウントデータを用いた解析妥当性の検討.....	36
4.2.1	階層的クラスタリング	37
4.2.2	発現変動遺伝子	37
4.2.3	Gene Ontology Enrichment 解析.....	37
4.2.4	Gene set enrichment Analysis による Pathway 解析.....	38
4.3	リアルタイム PCR による発現変動遺伝子の相対定量	45
4.4	発現変動遺伝子についての組織学的検討	47
4.4.1	前頭前野における Drd2 陽性細胞の密度	47
4.4.2	Drd2 陽性細胞の前頭前野における CaMKII α と GAD67 の共発現.....	47
5	考察.....	51
5.1	MIA モデルマウスの表現型と本実験でのモデルの妥当性.....	51

5.2	RNA-seq による発現変動遺伝子およびパスウェイの検出	52
5.2.1	組織学的解析の結果の検討	56
5.3	前頭前野におけるドーパミン D2 受容体と抑制性神経細胞との関係	57
5.4	母体免疫賦活による神経発達異常へのメカニズム	58
5.5	本研究の限界と今後の課題	60
6	結語	61
7	参考文献	62
8	謝辞	76

【略称一覧】

Poly I:C (Polyinosinic : Polycytidylic acid) : ポリイノシン酸-ポリシチジル酸

MIA (Maternal Immune Activation) : 母体免疫賦活

BSA (Bovine serum albumin) : ウシ血清アルブミン

CRP (C reactive protaine): C 反応性蛋白

DALYs (Disability-adjusted Life Year) : 障害調整生存年

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay): 酵素免疫吸着測定法

fMRI (functional Magnetic resonance imaging): 核磁気共鳴機能画像法

HSV-2 (Herpes simplex virus type2): ヒト単純ヘルペスウイルスタイプ2

GABA (4-aminobutanoic acid): ガンマアミノ酪酸

GO (Gene ontology): 遺伝子オントロジー

GSEA (Gene set enrichment analysis): 遺伝子セットエンリッチメント解析

IL6 (Inter leukin 6): インターロイキン6

NMDA (N-Methyl-D-aspartate): N メチル D アスパラギン酸

RNA-seq (RNA sequencing): RNA シーケンシング

TBS (Tris Buffered Saline): トリス緩衝生理食塩水

TLR3 (Toll like receptor 3): トール様受容体 3

TNF-alpha (Tumor necrosis factor Alpha): 腫瘍壊死因子 α

1 要旨

疫学的研究より統合失調症の発症と胎生期母体感染による免疫賦活の関連が示唆されているが現在までその機構は不明である。本研究ではその解明のため母体免疫賦活による統合失調症モデルマウスを作成し前頭前野の遺伝子発現変動を RNA-seq により解析した。その結果母体免疫賦活モデルマウスの前頭前野でドーパミン神経伝達に関わる遺伝子発現の減少を認めた。また組織学的解析によりドーパミン D2 受容体を発現する GABA 作動性神経細胞の減少が確認された。先行研究では統合失調症の前頭前野で GABA 作動性神経細胞の異常が報告されており本研究結果は母体免疫賦活による統合失調症発症に至る経路に前頭前野での GABA 作動性神経細胞が関与する可能性を示唆している。

2 序文

2.1 統合失調症の疫学と病態

統合失調症は、その症状や経過の多様さからいくつかの病態による疾患群と考えられており¹、特徴的な症状として陽性症状（妄想、幻覚、思考障害等）、陰性症状（無気力、社会的引きこもり、思考の貧困等）、認知機能障害（判断力や記憶力の低下等）の3つが知られている²。統合失調症の生涯有病率は約0.5-1%と報告されており^{2,3}、決して稀な疾患ではない。これまでの疫学的研究により、発症の危険因子として周産期合併症によるリスクに加え、移民や都市部での居住、小児期の逆境的体験、薬物使用等が知られている⁴。

統合失調症の治療としては、抗精神病薬を中心とした薬物治療や精神療法、リハビリテーションを中心とした心理社会的治療が主である。これらの治療により、現在では初発患者では80%程度の寛解を得ることが可能となっている。しかしその後再発を繰り返す症例も多くみられ、最終的に完全な回復に至る患者は8-20%と推測されている³。

統合失調症は若年での発症がその特徴であり、上記の生涯有病率と合わせて、その後の人生の長期にわたりこの疾患を抱えることの損失が重大である。早死により失われた年数や障害によって失われた健康寿命の年数をもとに算出した障害調整生命年(Disability-Adjusted Life Years: DALYs)を用いた研究によると、統合失調症は非感染

性疾患の DALYs の 2%に寄与することが報告され⁵、中でも急性期統合失調症は全疾病のなかで最も疾患負荷が高いと報告されるなど⁶、当事者・家族の負担だけでなく、医療・福祉のコストや労働力の損失による経済への影響など社会全体に及ぼす影響も大きいことが問題となっている。しかしながら統合失調症の原因は現在も不明なままで、その治療はいわゆる対症療法で根治が難しく、生涯にわたる治療継続を要することが多いことに加えて、陰性症状および認知機能障害の有効な治療法が存在しない⁷といった現状を鑑みると、統合失調症のより効果的な治療法開発に向けて病態解明が強く求められている。

2.2 統合失調症の病態生理についての仮説

古くから統合失調症の発症の原因について様々な仮説が提唱されてきたが、決定的なものはいまだに確立されておらず、その病態生理のほとんどが解明されていない。しかしながら 1970 年代より報告されてきた生化学的研究に加えて 1990 年代から広がった脳機能画像研究やゲノム解析といった研究結果から統合失調症の病態生理についてその概略が少しずつ明らかとなってきた。以下に統合失調症の病態生理について現在における仮説を簡単に述べる。

2.2.1 遺伝学的要因と遺伝-環境相互作用仮説

もともと、双生児の研究⁸から統合失調症の一卵性双生児の一致率が約 50%であることが知られ、統合失調症の発症にはなんらかの遺伝的素因があることが示唆されていた。1990 年にスコットランドの精神疾患多発家系研究から見出された Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1) 遺伝子は実際に統合失調症に関連した遺伝子が存在する可能性として注目された⁹。また 2000 年代から報告されたゲノムワイド関連解析の結果からは、決定的な遺伝子群は見出されなかったものの、108 の遺伝子座が有意に統合失調症発症リスクと関連していることが明らかとなった¹⁰。これらの遺伝子座にはシナプス形成にかかわる遺伝子やグルタミン酸受容体を介した情報伝達にかかわる遺伝子が含まれていた。これらの結果から、統合失調症の病態生理として遺伝的素因にもとづく神経系の異常が考えられた。しかしこれまでの研究で得られた候補遺伝子についてはいずれも再現性が低く、単一の遺伝学的な要因のみで発症に至ることを説明することは困難であったことから、現在では遺伝的要因による脆弱性の形成と、上に述べたような環境的にリスクの大きい要因の複雑な相互関係によって統合失調症の発症に至ると考えられている⁴。この遺伝-環境の相互作用に基づき、さらに下記のようないくつかの仮説が提唱されている。

2.2.2 ドーパミン仮説

統合失調症の病態仮説として従前より提唱されているのがドーパミン仮説である。これは、現在広く用いられている抗精神病薬のほぼすべてがドーパミン拮抗作用を持つことから考案された。実際に統合失調症患者の脳内でのドーパミン過剰が観測されていることから、ドーパミン神経系の過剰な働きが想定されている¹¹。その一方で、前頭前野でのドーパミンの機能不全についても報告されており現在では単純なドーパミン欠乏だけではなく、その調節不全が仮定されている¹²。

2.2.3 Hypofrontality（低前頭葉機能）仮説

1974年にIngvarらによって統合失調症患者の前頭部における安静時血流量の低下が報告され、統合失調症の病態生理として前頭葉機能の低下が提唱された¹³。近年の脳画像解析手法にともない。統合失調症患者における前頭前野を含む脳構造の変化について数々の研究から報告されてきている。脳室の拡大といった全脳の容積減少を示唆する所見は比較的早期から一貫して報告されている¹⁴。大規模な国際共同研究（ENIGMA コンソーシアム）により、海馬・扁桃核・視床・側坐核などの皮質下体積の広範な減少が報告されている¹⁵。また皮質体積についても前頭前野とくに眼窩前頭皮質の減少が報告されている。前頭前野の菲薄化は統合失調症の陰性症状と関係しているという報告があり¹⁶、また前頭前野の皮質減少については、fMRIを利用した脳機能画像研究から皮質下との接続の変化も報告されており¹⁷、単純な体積減少だけで

はなく機能的な異常も示唆されている。特筆すべきことにこれらの前頭前野における異常は初回の統合失調症による精神病エピソードにおいて既に確認されており¹⁸、さらに発症前のハイリスクとされる対象者でも確認されていることである¹⁹。つまり、統合失調症の発症機序自体による一次的な変化として前頭前野の異常も想定されうることを示唆している。

2.2.4 神経発達仮説

古くから胎生期から発達期にかけての神経発達における何らかの障害と統合失調症の発症との関連が注目されてきた。なかでも、疫学的研究から妊娠中の母体の免疫活性化が子の統合失調症発症リスクに関連しているという可能性が示唆され、感染による免疫反応によって生じた胎生期からの神経発達異常が統合失調症の原因となるという仮説が提唱されている。

1988 年に初めて出生前のインフルエンザへの暴露と統合失調症発症リスクの関連が報告²⁰されて以降、数多くの疫学研究で同様の知見が得られている²¹。初期の研究では単純にインフルエンザ流行期での妊娠という暴露との関連にとどまっていたが、近年では血清学的データからの解析やコホートによる研究報告も行われている²²。興味深いのは、これらがインフルエンザなど特定の疾病によらないことである。インフルエンザだけでなく HSV-2 や細菌感染 トキソプラズマでも同様の報告がある²³。

さらには、TNF- α や CRP の上昇が子孫の精神疾患発症リスクと関連しているという報告もある²⁴。また、これらの免疫活性化が妊娠中の特定の時期、具体的には第1三半期にのみ影響を与えるという多くの報告がある²⁵。これらの結果を考え合わせると特定の感染症ではなく、妊娠中のある特定の時期の免疫活性化そのものが子孫の統合失調症発症リスクを高めることが示唆される。母胎内での感染がどの程度、統合失調症発症リスクを高めるのかという点については現在のところ定説はない。しかしながらブラウンらによる研究では複数のコホート調査に基づく推定から、統合失調症における感染源を問わない母胎内感染の寄与危険割合を30%と見積もっている²⁶。すなわち、理想的な条件として母胎感染を完全に防ぐことができれば統合失調症の発症を30%低下させる可能性が示唆されている。

これらの知見を総合すると、細胞のミクロレベルから脳全体のマクロレベルまで、また胎生期から成熟期までの間で、何らかの神経システムの異常が存在し、それが統合失調症に深くかかわると考えられる。また、その中で、とくに前頭前野の機能と構造の異常が陰性症状の発現を中心に関与していると考えられる。統合失調症の病態形成に果たす前頭前野の役割を明らかにすることは、陰性症状や認知機能障害といったこれまで治療が困難だった症状への有効なアプローチである。

2.3 動物モデルによる精神疾患病態の研究

統合失調症の病態研究において、画像研究・遺伝子研究と並び動物モデルによる基

礎研究は重要な役割を担っている。特に新しい薬理学的治療の確立と評価には必須のアプローチ方法となっている。しかしながら精神疾患の動物モデルは原理的な困難が存在している。なぜなら、現在に至るまで精神疾患の臨床症状は幻覚妄想・不安焦燥などの主観的な体験であり、動物においてその再現と妥当性の担保は非常に難しい²⁷。現時点では、直接統合失調症の症状や病態のモデル化を目指すのではなく、現在までに考えられる仮説的な病因を再現しモデル化するというアプローチが主流となっている²⁸。統合失調症が単一疾患ではないと想定されていることから考えると、現在までに提唱されている統合失調症の病態仮説は、それぞれが独立したものではなく、統合失調症について多面的に描出したものといえる。そのため、複数の仮説に基づいた動物モデルの知見を集積することは統合失調症の病態解明に有意義と考えられる。現在までに統合失調症の病態生理についての仮説からいくつかのモデル動物が作成され、それぞれの仮説に基づくモデル動物の知見を集積し、統合失調症の病態解明に迫ることが期待されている。

2.3.1 薬物誘発モデル

メタンフェタミンなどの精神刺激薬は、ドーパミン作動性神経の過剰な興奮を引き起こすことから、これらの精神刺激薬を動物に投与することで統合失調症モデル動物が作成された²⁹。マウスに投与した場合には多動性および常同行動の増加を引き起こ

し、ドーパミン神経系の過活動をマウスで再現することが可能となった。フェンサイクリジンなどの NMDA 受容体拮抗薬は、同様にドーパミン神経系の過活動を引き起こすとともにグルタミン酸を介した神経伝達の低下を来し、慢性使用により統合失調症の陽性症状に類似した幻覚・妄想や陰性症状・認知機能障害等を呈する。そのモデルとして NMDA 受容体拮抗薬を投与した統合失調症モデルマウスも作出されている³⁰。しかし、これらの薬物誘発モデルでは、統合失調症の症状の一部しか再現することができていない問題がある。とくにアンフェタミン投与モデルでは、統合失調症の陽性症状に比定されうる過活動や反応の亢進がみられるものの、活動性自発性の低下や社会性の異常といった陰性症状の再現は不十分である³¹。

2.3.2 遺伝モデル

ゲノムワイド関連解析を含めた多くの研究で、統合失調症に関連すると考える数多くの候補遺伝子が発見されている。これらの多くは神経系にかかわる遺伝子で、しかもげっ歯類を含めた動物種全体で高度に保存され相同性が認められている³²。これらの候補遺伝子を操作することで、統合失調症の遺伝モデル動物が作成されている。またゲノムコピー数変異研究の知見を基に、染色体の微細欠失による 22q11.2 欠失症候群は統合失調症の発症リスクが高いことで知られており、ヒトの 22 番染色体に相同なマウスの 16 番染色体で遺伝子欠失を再現したモデルが作成され、統合失調症の病

態解明に利用されている³³。このモデルでは、感覚ゲーティング障害としてのプレパルスインヒビションの低下や認知機能の障害といった症状が再現されるだけでなく、灰白質の縮小や脳室の拡大などの解剖学的な異常も同様に再現されることに特徴がある³⁴。

統合失調症が完全な遺伝疾患ではない以上、遺伝モデルに基づく統合失調症モデル動物も統合失調症を完全に再現しているとはいいがたい。しかし、統合失調症に関連する遺伝学的要因に基づく発症の脆弱性を明らかにするという概念は重要である。

2.3.3 母体免疫賦活による神経発達モデル

上述の通り統合失調症の発症には胎生期に生じたリスク要因が大きな影響を持つ。

統合失調症モデル動物の作成においては妊娠中の母体感染を再現した母体免疫賦活が広く用いられている³⁵。何らかの免疫賦活物質により妊娠母体の免疫活性化を誘導し、出生仔を統合失調症の神経発達モデルとして用いることができる。母体免疫活性化を受けた出生仔が示す行動変化は、統合失調症の陽性症状に比定される感覚ゲーティングの障害や、不安の増加、記憶力の低下といった陰性症状に比定される表現型を示す³⁶。このモデルで特徴的なのは、出生後早期から母体との愛着行動の異常など統合失調症にとどまらないより広範な精神疾患が想定されるような行動表現型の異常を示すことである³⁷。統合失調症を含む精神疾患のほとんどは、厳密に弁別される

単一疾患ではなく、幅広いスペクトラムをもつ症候群であることが想定されている³⁸。

その点から考えると母体免疫賦活による神経発達動物モデルはより広範囲におよぶ病態生理をモデル化している可能性が考えられる。

母体免疫賦活モデルがどのような機序で出生仔の神経異常を誘発しているのかというメカニズムは十分な解明は行われていない。しかしながら、その過程においては Toll 様受容体 3 (TLR3) を介したインターロイキン 6 (IL-6) による免疫反応が必須と考えられている³⁹。動物実験では IL-6 は胎盤透過性を持たないものの、胎盤に影響し胎児の脳での免疫反応を惹起するという知見が得られている⁴⁰。統合失調症患者の脳内でも同様の炎症反応にかかわる遺伝子発現変動が報告されている⁴¹。このようにこれまで十分な解明が行われてこなかった統合失調症の仮説的機序をモデル化しているという点においても、母体免疫賦活モデル動物は有用と考えられる。

2.4 本研究の目的と方針

上述のように統合失調症の病態はいまだに解明されていないが、統合失調症の病態形成においては、陰性症状および認知機能低下の側面において前頭前野が重要な役割を果たす可能性や、周産期の感染による母体免疫活性化が胎生期から発達期にかけての神経発達に影響しその後の発症に関与する可能性が示唆されている。しかし、周産期の母体免疫活性化による統合失調症に関連した前頭前野の神経系への影響はあま

り明らかにされていない。

そこで本研究では周産期の感染を模した母体免疫賦活モデルマウスを用いて、前頭前野における遺伝子発現の探索的な解析を行った。さらに、その結果として見いだされた発現変動遺伝子について組織学的な解析を行い、統合失調症の前頭前野における病態解明につながる所見を得ることを目的とした。

3 方法

3.1 母体免疫賦活モデルマウスの作成

母体免疫賦活モデルマウスの作成は Chow らの方法に準拠した⁴²。動物実験に当たっては事前に東京大学医学部・医学系研究科動物実験委員会に実験計画書を提出し審査と承認を得た（承認番号：医-P18-070）。また実際に実験を行うに当たっては東京大学動物実験実施規則に基づき動物倫理に配慮した。使用したマウスは C57B6N 系統で、(株)オリエンタル酵母工業より導入した。東京大学医学部附属病院臨床研究棟発生工学センターSPF 環境下で飼育した。飼育環境は8時から20時までを明期 12 20時から8時までを暗期とする 12 時間日長とした。飼育室の気温は 21 °Cとし、エサ・水については自由に摂取できるようにした。

3.1.1 ポリイノシン酸-ポリシチジル酸 (Poly I:C) による免疫賦活の検定

今回の実験では、母体免疫賦活モデルマウスを作成するにあたっての免疫賦活物質としてポリイノシン酸 - ポリシチジル酸 (Poly I:C) を利用した。Poly I:C は、イノシン酸とシチジル酸によって構成されるリボヌクレオチドで、ウイルス RNA アナログである⁴³。Toll 様受容体 3 (TLR-3) とインターロイキン 6 (IL-6) を介した免疫応答を誘発することができる⁴⁴。その分子長によって免疫賦活能が変動することが知られている⁴⁴。そのため予備実験として以下のプロトコルにより Poly I:C の免疫賦活能力

を検定した。免疫賦活物質として利用したポリイノシン酸 - ポリシチジル酸 (Poly I:C) はシグマアルドリッチ社(P9582 Lot:059M4167V)を利用した。滅菌した精製水に 20 mg/ml の濃度で溶解し -80 °C で凍結保存した。

C57B6N マウス・メス 8 週齢を 6 匹用意し 3 匹ずつ 2 群に分けた。一方の群 (Poly I:C 群) には Poly I:C 20mg/kg を投与した。もう一方の群 (対照群) には同容量の 0.9% 整理食塩水を投与した。投与 3 時間後にセボフルランを吸入させた上で頸椎脱臼により安楽死させた。腹部から胸郭にかけて正中切開し心室より採血した。血液は 1000g で 5 分間遠心分離し血清のみを取り出した。Mouse IL-6 ELISA Kit (Proteintech Group, Inc. KE10007) により血清中の IL-6 濃度を測定した。まず、IL-6 スタンダード溶液を希釈し 1000 pg/l から 15.6 pg/l までの 7 段階の希釈系列によるスタンダードを作成した。次に、サンプルの血清をキット付属の PTI-eC 溶液で 10 倍に希釈した。サンプルは、テクニカルレプリケートを 3 とした。それぞれのサンプルを 100 μ l ずつウェルに注入し 37 °C で 2 時間反応させた。その後 Wash buffer で 4 回洗浄した。次に溶解した Detection 抗体を 100 μ l ずつ入れ、37 °C で 1 時間反応させた。その後 Wash buffer で 4 回洗浄した。溶解した HRP 溶液を 100 μ l ずつ入れ、37°C で 40 分間反応させた。その後 Wash buffer で 4 回洗浄した。TMB 液を 100 μ l ずつ入れて 37 °C で 20 分間反応させた。反応後 Stop Solution を 100 μ l 追加し、Multiskan FC 吸光マイクロプレートリーダー (Thermo fisher) で吸光度を測定した。スタンダードサンプルの希釈系列から作成した検量線により、各サンプルの濃度を定量した。

3.1.2 母体マウスへのポリイノシン酸 - シチジル酸投与モデル作成方法

まず、時限交配により妊娠日の確定した妊娠マウスを作成した。暗期開始の 2～3 時間前に 8～12 週令の雄マウス 1 匹と雌マウス 2 匹を同じケージに入れ交配を行った。暗期終了後 2 から 4 時間以内に雌マウスのケージを分け単独で飼育した。交配を行った翌日を胚性 0.5 日 (E 0.5) とした。

次に、E 12.5 に免疫賦活物質である Poly I:C を投与した。妊娠したマウスを Poly I:C 投与群 (Poly I:C 群) と対照群に分けた。Poly I:C 投与群の妊娠マウスには Poly I:C 溶液を体重 1 kg あたり 20 mg となるように腹腔内注射により投与した。対照群の妊娠マウスには Poly I:C 溶液と同量になるように体重 1 g あたり 10 μ l の生理食塩水を投与した。出産した後 4 週で離乳し雄マウスと雌マウスにケージを分離した。Poly I:C 投与群の妊娠マウスから出生した雄マウスは母体免疫賦活群 (MIA 群)、対照群の母親から生まれた雄マウスは対照群として以下の実験で用いた。雌マウスでは性周期により脳内での遺伝子発現変動が変動する可能性が示唆されている⁴⁵。そのため本研究においては、性周期による影響を避けるため雄マウスのみを実験にもちいた。

3.2 モデルマウス前頭前野の遺伝子発現解析

3.2.1 動物の解剖及び前頭前野の摘出

上記の方法で作成したマウスのうち MIA 群 4 匹 対照群 4 匹を用いて RNA-seq による前頭前野の遺伝子発現解析を行った。まずマウスをセボフルラン吸入し麻酔した。頸椎脱臼により直ちに安楽死した後、すみやかに断頭したうえで全脳を摘出した。摘出した脳のうち、付着部から嗅球を切除した後、左右に分割し脳梁の前部で切断し Bregma から前方に 1.2 mm-3 mm の部分を切り出し、前頭前野として実験に用いた。採取部位については図 1 サンプル採取部位 に示した。

3.2.2 RNA の抽出

前頭前野より Rneasy mini plus kit (Qiagen 74134) を利用し全 RNA を抽出した。まず、摘出した組織を 1.5 ml チューブに入れ、 β メルカプトエタノール 1 %/v を添加した Lysis バッファー 600 μ l を添加した。次にチューブ内に滅菌洗浄したシリカボールを入れ、ビーズ式破砕機 (PS-SMN06) で 3600 rpm 2 分間ホモジナイズした。20000 g で 5 分間遠心分離し上清のみを採取した。サンプル及び Rneasy mini plus kit に付属する RNeasy mini elute column および gDNA Eliminator column を QIAcube にセットし、RNeasy plus mini プロトコルで RNA の抽出を行った。

3.2.3 RNA サンプルの評価及びシーケンス

以下 RNA サンプルの定量からシーケンス及び FASTQ データの取得までの工程は日本ジーンウィズ株式会社に委託した。

抽出した RNA は、Qubit RNA Assay (Thermo fisher) および TapeStation RNA ScreenTape (Agilent) によって定量および品質の評価を行った。RNA Integrity Number 8 以上を満たす 500 ng のトータル RNA をサンプルとして用いた。NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB) により poly-A mRNA を濃縮し、rRNA 分子を除去した。cDNA 合成とそれに続くライブラリー調整は、NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB) によって実施した。ここでは、2 次鎖テンプレートに対する PCR 増幅をブロックするため dTTP の代わりに dUTP を cDNA 合成のプロセスに組み込んだ。ライブラリーの収量の増加およびサンプルインデックスの組み込みのために、10 サイクルの PCR 増幅を行った。得られたトランスクリプトームシーケンシングライブラリーは Qubit DNA Assay (Thermofisher) で定量し、フラグメントサイズの分布は TapeStation D1000 ScreenTape (Agilent) で確認した。確立されたトランスクリプトームライブラリーは、NovaSeq 6000 (illumina) を用いてシーケンスを行った。シーケンスは、150 bp ペアエンド (PE) 構成で実行され、サンプルあたり約 2000 万 ペアエンドのリードを取得した。画像解析とベースコールは、NovaSeq 機器のソフトウェアによって実行し FASTQ データを得た。

3.2.4 データ解析

出力された FASTQ データについて、解析を行った。解析パイプラインの概略について図 2 に示した。まず Web ベースの統合解析サービス Rana-seq (バージョン 1.0、<http://ranaseq.usal.es/home>)⁴⁶ を介して以下の解析を行った。まず Fastp を利用し⁴⁷、低クオリティリードおよびアダプター配列を排除した。次に Salmon を利用し⁴⁸、リファレンスゲノム上でのカウントデータを作成した。リファレンスゲノムには GRCm38 を用いた。最後に DEseq2 をもちいて発現変動遺伝子の解析を行った⁴⁹。Salmon により得られた TPM 補正後のリードカウントデータより階層的クラスタリングによるヒートマップの作成を行った。作成には idep(バージョン 0.94、<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>)を介して R パッケージ heatmap.2 を利用した⁵⁰。

DEseq2 により得られた発現変動遺伝子より、Gene Ontology Enrichment 解析 (Go 解析) を行った。解析には Goseq を用いた⁵¹。さらに Gene Set Enrichment 解析 (GSEA 解析) によりパスウェイ解析を行った。解析には KEGG パスウェイデータベース⁵²⁻⁵⁴ および R パッケージ fGSEA を用いた⁵⁵。

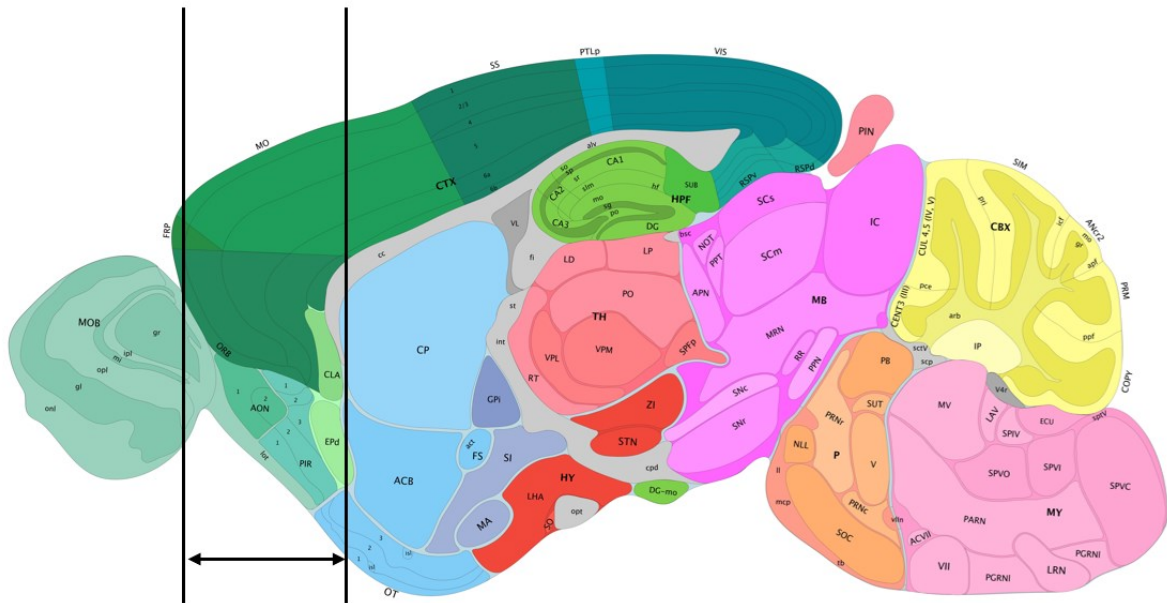


図 1 サンプル採取部位

前頭前野サンプルの採取部位について示す。上図の黒線及び矢印で示した範囲のうち CTX (Cerebral Cortex: 大脳皮質) についてサンプルとして採取した。上図は Allen Reference Atlas - Mouse Brain (<http://atlas.brain-map.org>) より引用した⁵⁷。

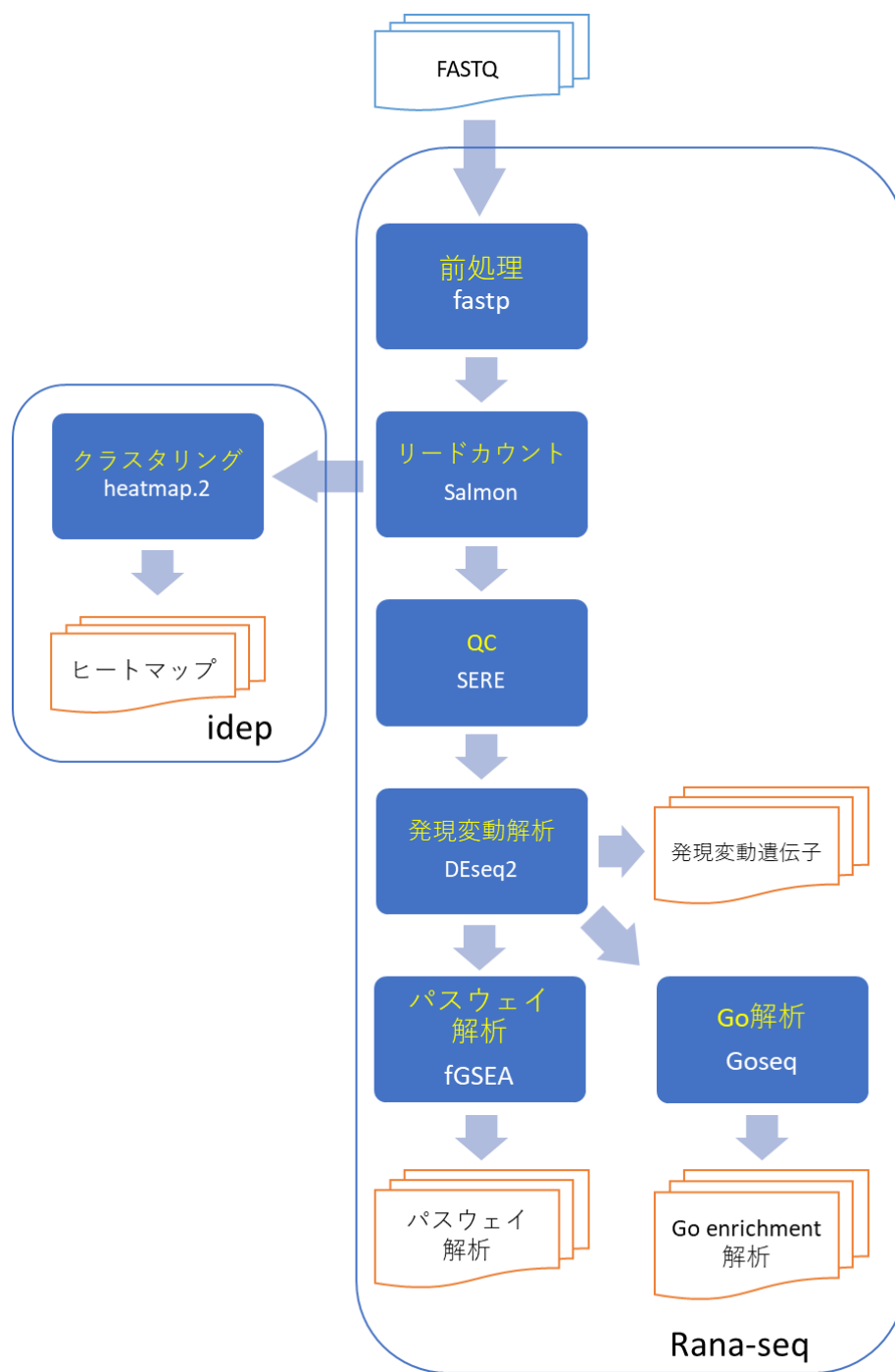


図 2 RNA-seq データ解析パイプライン

3.2.5 発現変動遺伝子のリアルタイム PCR による評価手法

RNA-seq により確認された発現変動遺伝子 *Drd2* および *Adora2A* について、リアルタイム PCR による相対定量を行った。別サンプルセットを用いて再現性を確認するため、RNA-seq と同様の方法で、あらたに対照群 4 匹 MIA 群 4 匹の前頭前野より RNA を抽出した。抽出された RNA サンプルより Transcriptor FirstStrand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) を利用し cDNA を作成した。具体的な工程は以下の通りに行った。

100ng の total RNA に、キットより Transcriptor Reverse Transcriptase 1 μ l、Reaction Buffer 4 μ l、Protector RNase Inhibitor 0.5 μ l、Deoxynucleotide Mix 2 μ l、Anchored-oligo(dT)18 Primer 1 μ l、Random Hexamer Primer 2 μ l および合計で 20 μ l になるよう RNase フリー水を混合した。42°C で 60 分間インキュベートし反応させた後に、85°C、5 分間で逆転写酵素を失活させた。

つぎにリアルタイム PCR により発現変動遺伝子の相対定量を行った。実験に供したプライマーのリストを表 1 に示す。KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS) を用いてマスターミックスを調整した。反応液 9 μ l (KAPA SYBR®FAST qPCR Master Mix (2X) 5 μ l、sense Primer(5 μ M) 0.4 μ l、antisense primer(5 μ M) 0.4 μ l、RNase フリー水 3.2 μ l) に cDNA を 1 μ l 加え混合した。384 プレートに 10 μ l ずつマスターミックスを分注し LightCycler480

(RocheDiagnostics) にて計測を行った。各サンプルはテクニカルレプリケートを 3 とした。PCR 反応は、変性 94℃,3 分 1 サイクル、増幅 94℃10 秒の後に 60℃30 秒、40 サイクルにより行った。得られた Ct 値よりサンプルごとの相対定量を行った。相対定量に当たっては *Gapdh* の発現量を内因性コントロールとして用い、 $\Delta\Delta CT$ 法で比較定量した。

Gene		Primer Sequence
<i>Gapdh</i>	sense	ACAATGAATACGGCTACA
	antisense	GTCCAGGGTTTCTTACTC
<i>Adora2A</i>	sense	TGCTAATACACTACTCTC
	antisense	CATTGTTATCTTCTTGGA
<i>Drd2</i>	sense	AACAACCTCTAATCCTCAAG
	antisense	TGTCCAATGTATGTCAAG

表 1 リアルタイム PCR に使用したプライマー配列

3.3 免疫組織化学染色

上記実験結果より得られた発現変動遺伝子 *Drd2* の転写産物であるドーパミン D2 受容体の組織内での発現と分布を測定するため、蛍光標識抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。またドーパミン D2 受容体発現細胞のプロファイルを同定するため、抑制性神経細胞マーカーとして GAD67、興奮性神経細胞のマーカーとして CaMKII α に対する抗体を用いた二重蛍光免疫染色を行った。MIA 群および対照群それぞれ 4 匹ずつより同様に全脳サンプルを摘出しすみやかにドライアイス上で急速凍結した。その後、 -16°C まで昇温しクライオトーム (Leica Microsystems) で薄切した。嗅球尾端から脳梁にあたる Bregma から前方に 1.2 mm-3 mm の部分までを 15 μm 冠状断に薄切した。300 μm ごとに採取した 6 スライスを 1 枚のスライドグラス上に貼付し風乾したうえで -80°C で凍結保存した。蛍光抗体による免疫組織化学染色は以下の手順で行った。使用した抗体は表 2 に示した。

1. スライドを氷冷メタノール 99.8 %v に 10 分間浸漬し組織の固定を行った。
2. 0.05 %v Tween20 添加トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) で 2 分間の洗浄を 3 回繰り返した。5 %w ウシ血清アルブミン (BSA) を添加した TBS に 15 分間浸漬しブロッキングした。
3. TBS-T で 2 分間の洗浄を 3 回繰り返した。
4. 1 %wBSA 添加 TBS で蛍光標識された抗ドーパミン D2 受容体抗体(Santa Cruz,

sc-5303 AF488)を 10 倍に希釈し、スライド上で 4°C下 48 時間反応させた。

5. TBS-T で 2 分間の洗浄を 3 回繰り返した。

2 重染色を行う場合はさらに以下の工程を行った。

6. 1 %wBSA 添加 TBS で 2 種類目の 1 次抗体を希釈し、スライド上で 4°C下 24 時間反応させた。

7. TBS-T で 2 分間の洗浄を 3 回繰り返した。

8. 1 %wBSA 添加 TBS で 2 次抗体を希釈しスライド上で室温下 1 時間反応させた。

9. TBS-T で 2 分間の洗浄を 3 回繰り返した。

10. DAPI Fluoromount G (Southern Biotech) を 50 μ l 滴下しスライドグラスに封入した。

1 次抗体

標的	抗体名	動物種	製造	希釈倍率
Drd2	Dopamine D2 Receptor Antibody (B-10) Alexa Fluor® 488 (sc-5303 AF488)	Mouse	Santa Cruz	1 : 10
GAD67	Anti-GAD67 抗体 [EPR20578] (ab213508)	Rabbit	Abcam	1 : 500
CaMKII α	Anti-CaMKII 抗体 [EP1829Y] (ab52476)	Rabbit	Abcam	1 : 500

2 次抗体

抗体名	製造	希釈倍率
A32790 Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488	Invitrogen	1 : 500

表 2 蛍光免疫組織化学染色に使用した抗体

3.3.1 組織標本の撮影および定量的解析

3.3 で作成した組織標本については、以下の要領で撮影と解析を行った。撮影はオリンパス社製 FV1000 レーザー走査共焦点顕微鏡により行った。解析は ImageJ により行った。877 μm $\times$ 660 μm の任意の野領域を 1 スライス当たり 4 か所撮影した。これを 6 スライスに繰り返し、1 サンプル当たり 24 枚の画像を撮影した。これらの画像を撮影した波長ごとに分割し、各波長ごとに二値化した。二値化にあたっては Otsu の手法を使用し閾値を決定した⁵⁶。二値化された画像から、細胞数をカウントし画像当たりの陽性細胞数とした。共発現の解析にあたっては、二値化した画像間で画素ご

とに AND 演算を行い、残存した部分を共発現した細胞としてカウントした。陽性細胞数・共発現細胞数ともに全スライス間で平均し、その値をサンプルの密度とした。解析手順の概略を図 3 に示した。

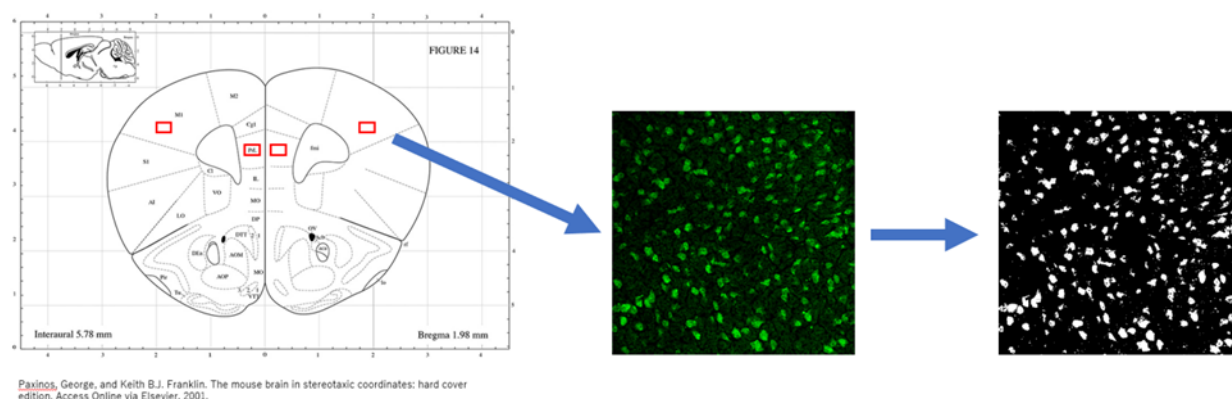


図 3 組織標本の撮影および定量的解析

前頭前野冠状断スライスより 4 か所を選択し撮影した。撮影箇所を赤枠で示す。共焦点顕微鏡により取得した画像を二値化し、陽性細胞数のカウントを行った。

3.4 統計解析

統計解析については以下のとおり行った。3.1.1 ポリイノシン酸-ポリシチジル酸 (Poly I:C) による免疫賦活の検定、3.2.5 発現変動遺伝子のリアルタイム PCR による評価手法、3.3.1 組織標本の撮影および定量的解析の実験では、得られた MIA 群・対照群それぞれの値に対して 2 群間の差の検定に対応のない両側 student-t 検定を行った。得られた p 値が 0.05 未満である場合に有意差があると判定した。また、4 結果の項目で示した各結果の数値については標準誤差を付した。グラフ上ではエラーバーで標準誤差を示した。

4 結果

4.1 母体免疫賦活モデルマウスの評価

4.1.1 Poly I:C による免疫賦活の評価

本研究で使用した Poly I:C (SigmaP9582) による免疫賦活について評価した。

Poly I:C 投与 3 時間後の血清中 IL-6 濃度は MIA 群では $7055 \pm 664 \text{ pg/l}$ 、対照群では $224 \pm 82 \text{ pg/l}$ であり、有意な差を認めた ($p=0.0005$)。これは先行研究で示されている濃度とほぼ同等であった⁴²。以上より本研究で使用した Poly I:C の免疫賦活能力を確認した。

4.1.2 母体免疫賦活モデルマウスの作成

延べ 228 匹の雌マウスを交配し 26 匹のマウスが出産に至った。出産したマウスのうち Poly I:C 溶液を投与したものが 11 匹、生理食塩水を投与したものが 15 匹であった。生理食塩水投与したマウスより 45 匹が成長し、そのうちオス 25 匹を対照群として用いた。Poly I:C を投与したマウスより 18 匹が成長し、そのうちオス 12 匹を MIA 群として用いた。

4.2 RNA-seq による発現解析

4.2.1 サンプルのクオリティチェック

Qubit RNA Assay (Thermo fisher) により、サンプル濃度および RNA の純度を検定した。吸光度比 260nm/280nm はすべてのサンプルで 2.0 以上であった。また TapeStation RNA ScreenTape で RNA の分解について計測した。すべてのサンプルで RIN 値 8 以上であった。以上より、すべてのサンプルは RNA-seq に使用可能な品質であることを確認した。

4.2.2 カウントデータを用いた解析妥当性の検討

前頭前野の RNA-seq のため対照群 4 サンプル MIA 群 4 サンプルのシーケンスを施行し FASTQ データを得た。fatp により低品位リードおよびアダプター配列を取り除いたのち、Salmon により遺伝子発現の定量を行いカウントデータを取得した。さらに、カウントデータを TPM 法により正規化した。TPM 正規化後の発現遺伝子数と発現量について各サンプル間に発現遺伝子数の有意な差は認めなかった。またサンプル間で相対的発現量の偏りを認めなかった。以上よりこれらのサンプルの取得およびシーケンスデータの取得において実験手法上の誤操作や偏りはなかったと考えられる。

4.2.1 階層的クラスタリング

Salmon より出力された TPM 補正カウントデータのうち、発現量が上位 1000 の遺伝子発現データより、R パッケージ hclust2 をもちいて階層的クラスタリングを行った。クラスタリングには群平均法を用いた。hclust2 より出力された樹状図を図 4 に示す。MIA 群および対照群にそれぞれクラスタリングされる傾向が示された。

4.2.2 発現変動遺伝子

TPM 正規化したカウントデータをもちいて DEseq2 により発現変動遺伝子の検出を行った。多重検定の補正のため Benjamini & Hochberg 法により補正した補正 p 値を用いた。補正 p 値が 0.05 以下の場合に有意と判定した。表 3 および表 4 に発現変動遺伝子の一覧を示す。表 3 には対照群に比べて MIA 群で低下した発現変動遺伝子を、表 4 には対照群に比べて MIA 群で増加した発現変動遺伝子を示した。MIA 群で発現が低下した遺伝子は 56、上昇した遺伝子は 43 にとめた。このうち変動量が 2 倍以上もしくは 0.5 倍以下になるものは低下した遺伝子では 6、上昇した遺伝子では 2 であった。MIA 群では相対的に遺伝子発現量が低下した遺伝子を多く認めた。

4.2.3 Gene Ontology Enrichment 解析

発現変動遺伝子のうち、どのような機能を持つものが濃縮されているのかを解析するために Gene Ontology Enrichment 解析を行った。各遺伝子に付与されている機能等を表す Go term を用いて、発現変動遺伝子の中にどの程度特定の機能を持つ遺伝子

が濃縮されているのかを解析した。表 5-1 および表 5-2 に、有意に濃縮されている ($p < 0.01$) と判定された Go term のうち生物学的プロセスに分類されるものを示した。

4.2.4 Gene set enrichment Analysis による Pathway 解析

DEseq により得られた遺伝子発現データより R パッケージ fGSEA を用いて、Gene set enrichment Analysis による Pathway 解析を行った。データベースに登録されたパスウェイに含まれる遺伝子が、どの程度発現が確認された全遺伝子の中で偏在しているかを検定した。解析には KEGG パスウェイデータベースを用いた⁵²⁻⁵⁴。結果を表 6 に示す。

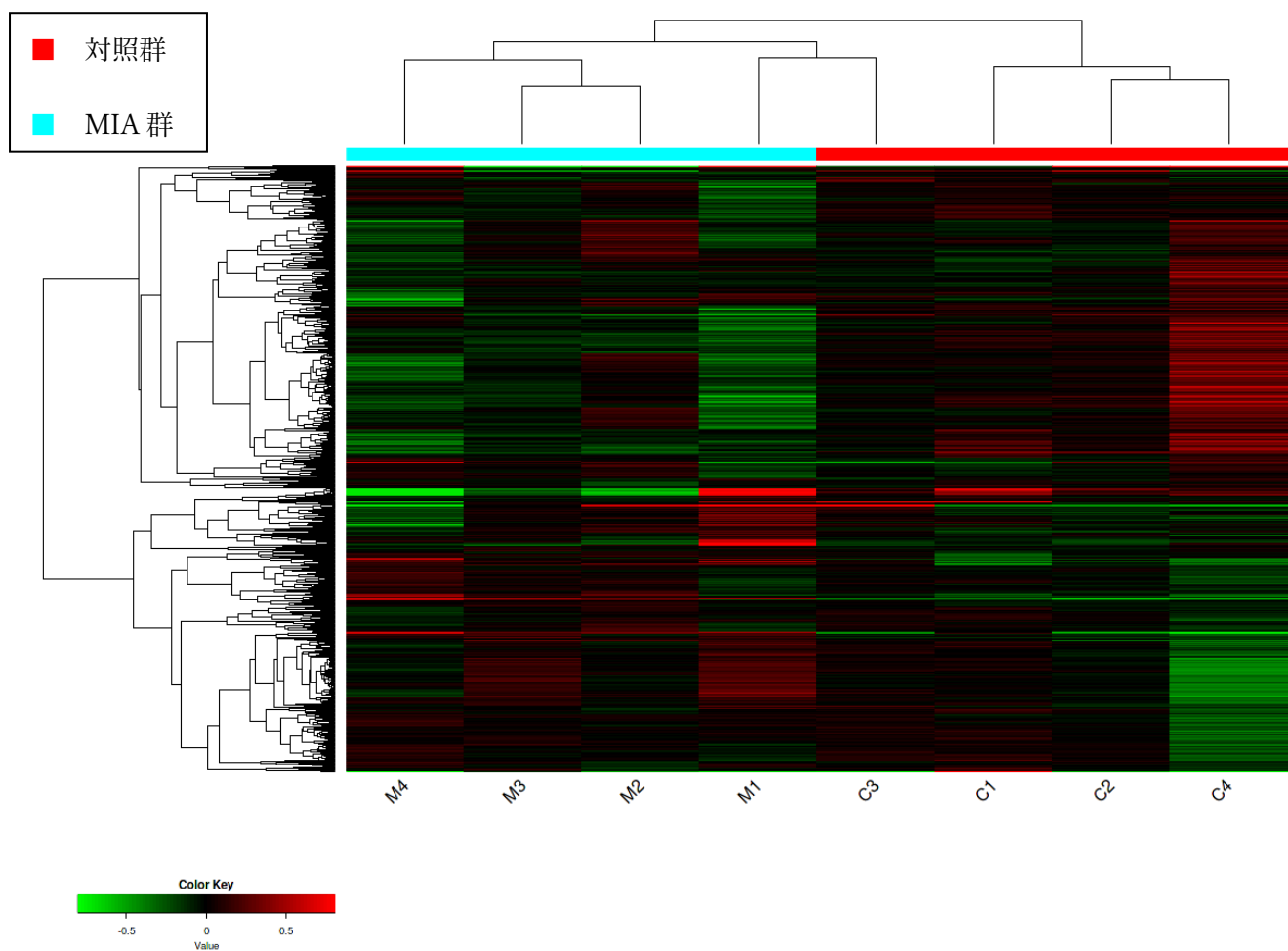


図 4 階層的クラスタリングによるサンプルのクラスタリング

hclust2 より出力されたヒートマップおよび樹状図を示す。相対的な遺伝子発現量について、緑から赤の濃淡で示した。縦軸は遺伝子ごとのクラスタリングによる樹状図をしめす。横軸はサンプルごとのクラスタリングによる樹状図を示す。MIA 群と対照群でクラスタリングされた。

Gene_Symbol	対照群発現量	MIA群発現量	変化量	補正p値
Bhlhe41	11.4	15.1	1.29	<0.001
Fzd2	6.18	8.60	1.34	<0.001
Cirbp	58.0	78.1	1.34	<0.001
Coq10b	24.6	33.5	1.35	<0.001
Usp2	32.1	45.8	1.41	<0.001
Fos	38.8	57.1	1.46	<0.001
Dusp1	31.6	51.8	1.62	<0.001
Junb	88.8	160	1.79	<0.001
Egr2	8.15	15.4	1.79	<0.001
Btg2	6.68	12.9	1.81	<0.001
Dbp	60.8	111	1.82	<0.001
Tagln	10.7	22.2	1.97	<0.001
Cyr61	4.96	12.6	2.28	<0.001
Ciart	10.2	26.4	2.46	<0.001
Acta2	9.87	17.0	1.65	0.00133
Tiparp	6.41	8.85	1.33	0.00152
Sik1	5.43	8.08	1.41	0.00169
Pim3	26.3	36.2	1.36	0.00180
Gm3033	0.00	0.854	1.85	0.00180
Nr1d1	50.8	70.1	1.37	0.00244
Egr4	65.3	89.7	1.37	0.00409
Dusp5	7.52	10.9	1.40	0.00470
Rbm3	103	138	1.34	0.00479
Noct	46.9	51.6	1.10	0.00503
Nr1d2	24.3	30.2	1.23	0.00577
Hes1	21.0	26.6	1.25	0.00637
Camk2d	34.4	42.3	1.22	0.00847
C1ql3	124	148	1.19	0.00947
Klhl40	5.07	7.36	1.38	0.0124
Tsc22d3	54.6	75.1	1.37	0.0141
Fzd4	2.96	4.10	1.29	0.0146
Myl9	18.6	26.6	1.41	0.0196
Casp3	9.77	12.8	1.28	0.0217
Pter	71.4	92.2	1.29	0.0218
Mt2	402	529	1.31	0.0241
Errfi1	14.5	17.3	1.18	0.0289
Inmt	0.87	2.58	1.91	0.0315
Mfge8	234	259	1.11	0.0357
Limd2	89.2	102	1.15	0.0400
Fzd1	5.02	6.54	1.25	0.0400
Pcsk9	1.45	2.40	1.39	0.0413
Csrnp1	10.3	15.0	1.42	0.0445
Grhl1	5.91	8.45	1.37	0.0455

表 3 発現変動遺伝子

対照群に対して MIA 群の前頭前野で発現が減少していた遺伝子を示す。(補正 p 値<0.05)

Gene_Symbol	対照群発現量	MIA群発現量	変化量	補正p値
Gm47283	25.5	1.14	0.081	<0.001
Syndig1l	6.92	2.01	0.380	<0.001
Drd2	2.98	0.644	0.413	<0.001
Alb	1.05	0.00974	0.492	<0.001
Scn4b	23.1	11.1	0.502	<0.001
Uap1	38.6	19.0	0.505	<0.001
Ptpu	15.5	8.55	0.577	<0.001
Akap12	6.48	3.87	0.651	<0.001
Nefm	121	78.4	0.652	<0.001
Inf2	69.5	46.6	0.675	<0.001
Mical2	307	208	0.680	<0.001
Rasd2	49.3	33.3	0.682	<0.001
Nptx1	145	99.3	0.689	<0.001
Syt12	30.3	22.1	0.736	<0.001
Sptbn4	41.8	31.0	0.748	<0.001
Atp2b2	141	94.0	0.671	0.00180
Nefh	23.5	15.8	0.684	0.00237
Tmem178	87.1	65.3	0.753	0.00308
Kazn	25.7	17.8	0.705	0.00409
Ppp1r1b	132	90.1	0.687	0.00470
Rims4	53.1	39.9	0.756	0.00499
Ttbk1	40.2	27.2	0.685	0.00581
Adora2a	6.48	2.63	0.486	0.00622
Six3	0.800	0.0315	0.573	0.00637
Arntl	18.8	12.2	0.667	0.00676
Hsph1	219	176	0.806	0.00848
Rph3a	220	167	0.761	0.00855
Hivep1	18.8	11.6	0.638	0.0113
Tmem151b	70.2	53.5	0.766	0.0117
Slc36a1	25.8	18.8	0.741	0.0120
Hr	12.1	6.82	0.595	0.0122
Limk1	30.8	23.6	0.772	0.0131
Shank1	143	99.5	0.697	0.0176
Olfm3	16.9	10.7	0.654	0.0192
Csmd2	11.1	8.54	0.786	0.0192
Kcnb1	38.0	25.8	0.688	0.0196
Shank2	32.3	21.8	0.685	0.0204
Cldn5	75.9	52.2	0.691	0.0216
Dst	36.5	23.0	0.638	0.0217
Baiap2	159	125	0.791	0.0221
Rgs9	8.50	4.83	0.614	0.0221
Sptbn2	316	231	0.731	0.0243
Homer1	124	87.4	0.707	0.0289
Ddx17	45.3	34.5	0.767	0.0313
Kif21b	9.20	5.98	0.684	0.0371
Gm45623	4.61	1.69	0.480	0.0391
Enox1	16.0	10.7	0.689	0.0391
R3hdm2	156	129	0.827	0.0391
Myo18a	59.1	46.2	0.786	0.0399
Cntn2	18.8	12.2	0.665	0.0400
Fmn1l	67.2	50.0	0.747	0.0400
Prrt3	32.8	25.1	0.773	0.0400
Prss35	3.53	1.87	0.634	0.0413
Hs3st2	53.9	39.8	0.743	0.0413
Dscam	10.4	7.57	0.753	0.0413
Gm12394	2.57	1.30	0.645	0.0427
Mmp17	78.2	64.3	0.825	0.0458
Cacna1a	58.5	51.0	0.874	0.0458

表 4 発現変動遺伝子

対照群に対して MIA 群の前頭前野で発現が減少していた遺伝子を示す。(補正 p 値<0.05)

GO_ID	GO_TERM	p-value	含まれる発現変動遺伝子
GO:0048511	rhythmic process	<0.001	Arntl, Noct, Dbp, Sik1, Usp2, Bhlhe41, Nr1d1, Ciart, Enox1, Nr1d2
GO:0032922	circadian regulation of gene expression	<0.001	Arntl, Noct, Drd2, Usp2, Bhlhe41, Nr1d1, Ciart
GO:0007623	circadian rhythm	<0.001	Arntl, Noct, Dbp, Bhlhe41, Hs3st2, Nr1d1
GO:0030534	adult behavior	<0.001	Drd2, Sptbn2, Sptbn4, Shank2, Shank1
GO:0002028	regulation of sodium ion transport	<0.001	Drd2, Sik1, Sptbn4, Camk2d
GO:0007626	locomotory behavior	<0.001	Adora2a, Atp2b2, Drd2, Dscam, Ppp1r1b, Rasd2
GO:0001963	synaptic transmission, dopaminergic	<0.001	Adora2a, Drd2, Rasd2
GO:0007628	adult walking behavior	<0.001	Cacna1a, Drd2, Cntn2, Sptbn4
GO:0035418	protein localization to synapse	<0.001	Homer1, Baiap2, Shank1
GO:0051705	multi-organism behavior	<0.001	Shank2, Shank1
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated	<0.001	Arntl, Fzd1, Hes1, Hr, Six3, Bhlhe41, Hivep1, Nr1d1, Ciart, Dusp5
GO:0007416	synapse assembly	<0.001	Cacna1a, Sptbn2, Shank2, Shank1
GO:0021692	cerebellar Purkinje cell layer morphogenesis	<0.001	Atp2b2, Sptbn2
GO:0001975	response to amphetamine	<0.001	Adora2a, Drd2, Ppp1r1b
GO:0048148	behavioral response to cocaine	<0.001	Drd2, Ppp1r1b, Homer1
GO:0045944	positive regulation of transcription by RNA polymerase II	<0.001	Arntl, Dbp, Drd2, Egr2, Egr4, Fos, Hes1, Hsph1, Cyr61, Junb, Six3
GO:0033693	neurofilament bundle assembly	<0.001	Nefm, Nefh
GO:0045104	intermediate filament cytoskeleton organization	<0.001	Dst, Nefm, Nefh
GO:0051124	synaptic growth at neuromuscular junction	<0.001	Shank2, Shank1
GO:0097107	postsynaptic density assembly	<0.001	Shank2, Shank1
GO:0060716	labyrinthine layer blood vessel development	<0.001	Hes1, Cyr61, Junb
GO:0048642	negative regulation of skeletal muscle tissue development	<0.001	Tsc22d3, Usp2
GO:0021853	cerebral cortex GABAergic interneuron migration	<0.001	Drd2, Cntn2
GO:0007223	Wnt signaling pathway, calcium modulating pathway	<0.001	Fzd4, Fzd2
GO:2001014	regulation of skeletal muscle cell differentiation	<0.001	Ddx17, Nr1d2
GO:0061469	regulation of type B pancreatic cell proliferation	<0.001	Errfi1, Nr1d1
GO:0003150	muscular septum morphogenesis	<0.001	Fzd1, Fzd2
GO:0035567	non-canonical Wnt signaling pathway	<0.001	Fzd1, Fzd4, Fzd2
GO:0031133	regulation of axon diameter	<0.001	Nefm, Cntn2
GO:0060022	hard palate development	<0.001	Fzd1, Fzd2
GO:2000463	positive regulation of excitatory postsynaptic potential	<0.001	Baiap2, Shank2, Shank1
GO:2000650	negative regulation of sodium ion transmembrane transporter activity	<0.001	Pcsk9, Camk2d
GO:0051968	positive regulation of synaptic transmission, glutamatergic	<0.001	Adora2a, Shank2, Shank1
GO:0048512	circadian behavior	<0.001	Six3, Usp2
GO:0060412	ventricular septum morphogenesis	0.0010	Fzd1, Hes1, Fzd2
GO:0045616	regulation of keratinocyte differentiation	0.0011	Errfi1, Grhl1
GO:0016043	cellular component organization	0.0011	Fmn1, Inf2
GO:0021984	adenohypophysis development	0.0011	Drd2, Hes1
GO:0042753	positive regulation of circadian rhythm	0.0012	Arntl, Nr1d1
GO:0050767	regulation of neurogenesis	0.0013	Arntl, Hes1, Bhlhe41
GO:0045110	intermediate filament bundle assembly	0.0013	Nefm, Nefh
GO:0008306	associative learning	0.0014	Btg2, Drd2, Shank1
GO:0061564	axon development	0.0015	Nefm, Nefh
GO:0030855	epithelial cell differentiation	0.0016	Fzd1, Tagln, Fzd2
GO:0003149	membranous septum morphogenesis	0.0016	Fzd1, Fzd2
GO:0060052	neurofilament cytoskeleton organization	0.0017	Nefm, Nefh
GO:0071625	vocalization behavior	0.0018	Shank2, Shank1

表 5-1 Gene Ontology Enrichment 解析

Gene Ontology Enrichment 解析により、発現変動遺伝子が有意に濃縮されていた GO タームのうち、生物学的プロセスに分類されるものを示す。(p<0.01)

GO_ID	GO_TERM	p-value	含まれる発現変動遺伝子
GO:0007270	neuron-neuron synaptic transmission	0.0019	Cacna1a,Drd2
GO:0035810	positive regulation of urine volume	0.0020	Adora2a,Drd2
GO:0007409	axonogenesis	0.0020	Drd2,Dst,Cntn2,Sptbn4
GO:0021702	cerebellar Purkinje cell differentiation	0.0021	Atp2b2,Cacna1a
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	0.0022	Adora2a,Arntl,Btg2,Dbp,Egr2,Egr4,Fos,Tsc22d3,Hes1,Hr,Junb
GO:0060070	canonical Wnt signaling pathway	0.0025	Fzd1,Fzd4,Ptpru,Fzd2
GO:0045475	locomotor rhythm	0.0027	Usp2,Ciart
GO:0035914	skeletal muscle cell differentiation	0.0028	Btg2,Egr2,Fos
GO:0048167	regulation of synaptic plasticity	0.0029	Atp2b2,Baiap2,Rims4
GO:0035815	positive regulation of renal sodium excretion	0.0029	Adora2a,Drd2
GO:0042752	regulation of circadian rhythm	0.0030	Noct,Nr1d1,Nr1d2
GO:0007212	dopamine receptor signaling pathway	0.0030	Drd2,Rgs9
GO:0060134	prepulse inhibition	0.0031	Adora2a,Drd2
GO:0090179	planar cell polarity pathway involved in neural tube closure	0.0032	Fzd1,Fzd2
GO:0042756	drinking behavior	0.0033	Drd2,Mmp17
GO:0060291	long-term synaptic potentiation	0.0034	Syt12,Shank2,Shank1
GO:0043278	response to morphine	0.0035	Drd2,Ppp1r1b
GO:0003151	outflow tract morphogenesis	0.0039	Fzd1,Hes1,Fzd2
GO:0050885	neuromuscular process controlling balance	0.0041	Atp2b2,Cacna1a,Shank1
GO:0000188	inactivation of MAPK activity	0.0042	Dusp1,Dusp5
GO:0045598	regulation of fat cell differentiation	0.0044	Hes1,Nr1d1
GO:0033993	response to lipid	0.0044	Nr1d1,Nr1d2
GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II	0.0045	Dbp,Egr2,Egr4,Fos,Hes1,Junb,Ddx17,Grhl1
GO:0000060	protein import into nucleus, translocation	0.0046	Arntl,Six3
GO:0060997	dendritic spine morphogenesis	0.0052	Shank2,Shank1
GO:0042493	response to drug	0.0052	Drd2,Fos,Fzd1,Junb
GO:0071276	cellular response to cadmium ion	0.0052	Fos,Mt2
GO:0043153	entrainment of circadian clock by photoperiod	0.0054	Sik1,Usp2
GO:0048026	positive regulation of mRNA splicing, via spliceosome	0.0056	Cirbp,Rbm3
GO:0048255	mRNA stabilization	0.0060	Noct,Cirbp
GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated	0.0061	Arntl,Egr2,Fos,Fzd1,Fzd4,Hes1,Fzd2,Nr1d1,Nr1d2
GO:0019226	transmission of nerve impulse	0.0063	Cacna1a,Sptbn4
GO:0001570	vasculogenesis	0.0064	Fzd4,Junb,Tiparp
GO:0030182	neuron differentiation	0.0065	Atp2b2,Btg2,Casp3,Pcsk9
GO:1900273	positive regulation of long-term synaptic potentiation	0.0067	Adora2a,Drd2
GO:0042220	response to cocaine	0.0069	Drd2,Ppp1r1b
GO:0021983	pituitary gland development	0.0071	Hes1,Six3
GO:0006351	transcription, DNA-templated	0.0072	Arntl,Btg2,Dbp,Egr2,Egr4,Hes1,Hr,Junb,Ppp1r1b,Six3,Ddx17
GO:0051899	membrane depolarization	0.0073	Adora2a,Cacna1a
GO:0021537	telencephalon development	0.0076	Hes1,Six3
GO:0090102	cochlea development	0.0078	Atp2b2,Hes1
GO:0009987	cellular process	0.0080	Junb,Fmn1
GO:0045665	negative regulation of neuron differentiation	0.0081	Hes1,Six3,Cntn2
GO:2000311	regulation of AMPA receptor activity	0.0084	Shank2,Shank1
GO:0048854	brain morphogenesis	0.0088	Shank2,Shank1
GO:0007605	sensory perception of sound	0.0088	Atp2b2,Casp3,Fzd4,Sptbn4
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	0.0090	Cirbp,Rbm3
GO:0035335	peptidyl-tyrosine dephosphorylation	0.0092	Dusp1,Dusp5
GO:0048741	skeletal muscle fiber development	0.0094	Homer1,Klhl40

表 5-2 Gene Ontology Enrichment 解析

Gene Ontology Enrichment 解析により、発現変動遺伝子が有意に濃縮されていた GO タームのうち、生物学的プロセスに分類されるものを示す。(p<0.01)

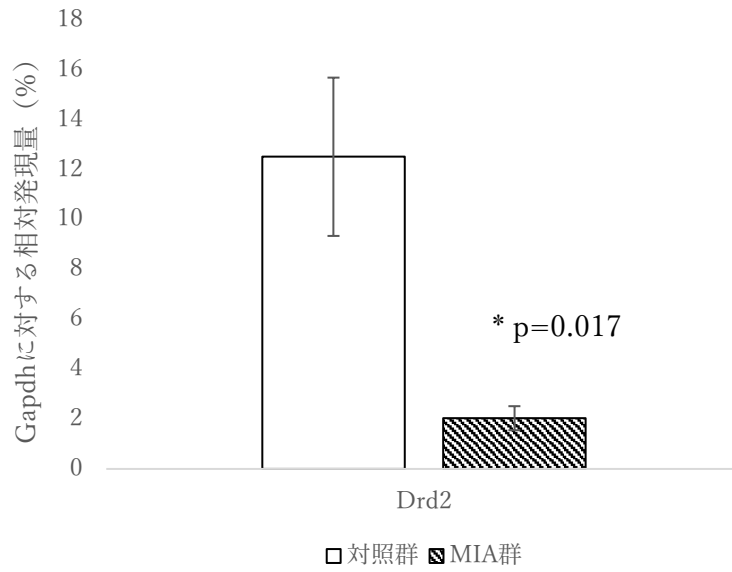
Pathway_ID	パスウェイ名	補正エンリッチメントスコア	補正 p 値
mmu04070	Phosphatidylinositol signaling system	-2.29	0.00542
mmu04360	Axon guidance	-2.08	0.00542
mmu00562	Inositol phosphate metabolism	-2.02	0.00542
mmu05032	Morphine addiction	-1.98	0.00542
mmu04724	Glutamatergic synapse	-1.94	0.00542
mmu04020	Calcium signaling pathway	-1.93	0.00542
mmu04728	Dopaminergic synapse	-1.89	0.00542
mmu04024	cAMP signaling pathway	-1.88	0.00542
mmu04015	Rap2 signaling pathway	-1.77	0.00542
mmu04915	Estrogen signaling pathway	-1.77	0.00542
mmu04510	Focal adhesion	-1.65	0.00542
mmu04810	Regulation of actin cytoskeleton	-1.58	0.00746
mmu05016	Huntington's disease	1.84	0.00549
mmu05012	Parkinson's disease	2.00	0.00542
mmu_M00340	Proteasome, 21S core particle	2.09	0.00542
mmu00982	Drug metabolism - cytochrome P451	2.12	0.00542
mmu00480	Glutathione metabolism	2.14	0.00542
mmu00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P451	2.21	0.00542
mmu00190	Oxidative phosphorylation	2.54	0.00542
mmu03010	Ribosome	3.21	0.00542
mmu_M00177	Ribosome, eukaryotes	3.46	0.00542

表 6 Gene Set Enrichment Analysis によるパスウェイ解析

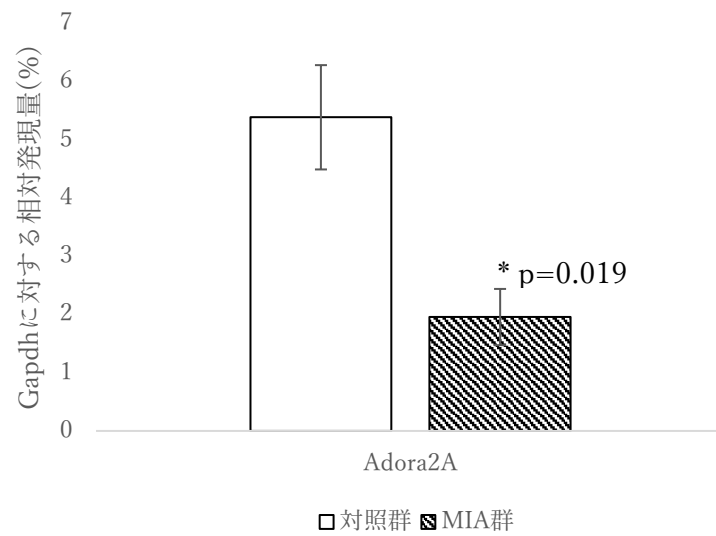
Gene Set Enrichment Analysis によるパスウェイ解析の結果を示す。補正エンリッチメントスコアは、対照群に比べて MIA 群でどの程度偏在しているのかを相対で示す。上記表では対照群と比較し MIA 群で相対的に少ないものから昇順に記載した。

4.3 リアルタイム PCR による発現変動遺伝子の相対定量

RNA-seq の結果、確認された発現変動遺伝子のうち *Drd2* および *Adora2A* についてリアルタイム PCR による相対定量を行った。結果を図 3 に示す。*Drd2* は MIA 群では対照群と比較し 0.16 倍 ($p=0.017$) に有意に減少していた。*Adora2A* も MIA 群では対照群と比較し 0.36 倍 ($p=0.019$) に有意に減少していた。



(a)



(b)

図 5 リアルタイム PCR による *Drd2* および *Adora2A* の相対定量

リアルタイム PCR による (a) *Drd2* および (b) *Adora2A* の相対定量結果を示す。数値は内在性コントロールである *Gapdh* に対する発現量 (%) を示す。MIA 群 4 サンプルおよび対照群 4 サンプルでの比較を行った。MIA 群で対照群と比較し有意な低下を認めた。

4.4 発現変動遺伝子についての組織学的検討

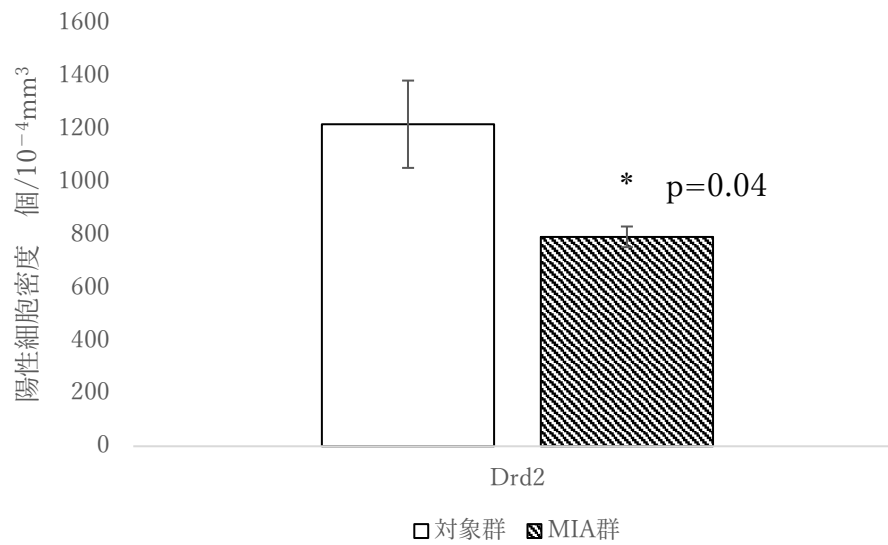
4.4.1 前頭前野における Drd2 陽性細胞の密度

蛍光免疫染色により、前頭前野における Drd2 陽性細胞の密度を計測した。計測結果および代表的な蛍光免疫組織化学染色画像を図 6 に示す。対照群における前頭前野での Drd2 陽性細胞密度は 1218 ± 165 個/ 10^{-4}mm^3 であった。MIA 群における前頭前野での Drd2 陽性細胞密度は 792 ± 39 個/ 10^{-4}mm^3 であった。対照群と比較し、MIA 群では有意に Drd2 陽性細胞密度が低下していた ($p=0.04$)。

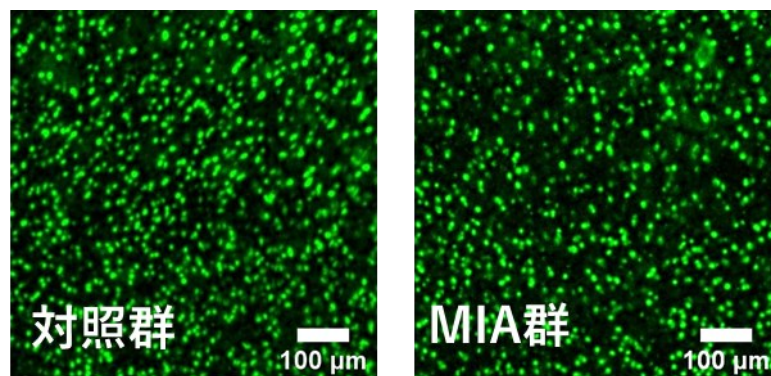
4.4.2 Drd2 陽性細胞の前頭前野における CaMKII α と GAD67 の共発現

前頭前野における Drd2 陽性細胞がどのような種類の細胞であるかを検証するため、抗 CaMKII α 抗体および抗 GAD67 抗体を用いて二重蛍光免疫染色を行った。結果を図 7 および図 8 に示す。CaMKII α 陽性細胞の密度は、対照群および MIA 群において有意差は認めなかった。GAD67 陽性細胞の密度も対照群および MIA 群において有意差は認めなかった。

次に Drd2 陽性細胞における CaMKII α および GAD67 の発現について検証した。Drd2 および CaMKII α を共発現する細胞密度は対照群と MIA 群の間で有意差を認めなかった。一方 Drd2 および GAD67 を共発現する細胞密度は対照群と比較し MIA 群で有意に低下していた ($p<0.01$)。代表的な蛍光免疫組織化学画像をエラー! 参照元が見つかりません。に示す。



(a)



(b)

図 6 前頭前野における Drd2 陽性細胞の分布

(a) 前頭前野における Drd2 陽性細胞の密度 (個/ 10^{-4}mm^3) を示す。MIA 群では対照群に対して有意な低下がみられた ($p=0.04$)。 (b) 代表的な蛍光免疫組織化学染色画像を示す。

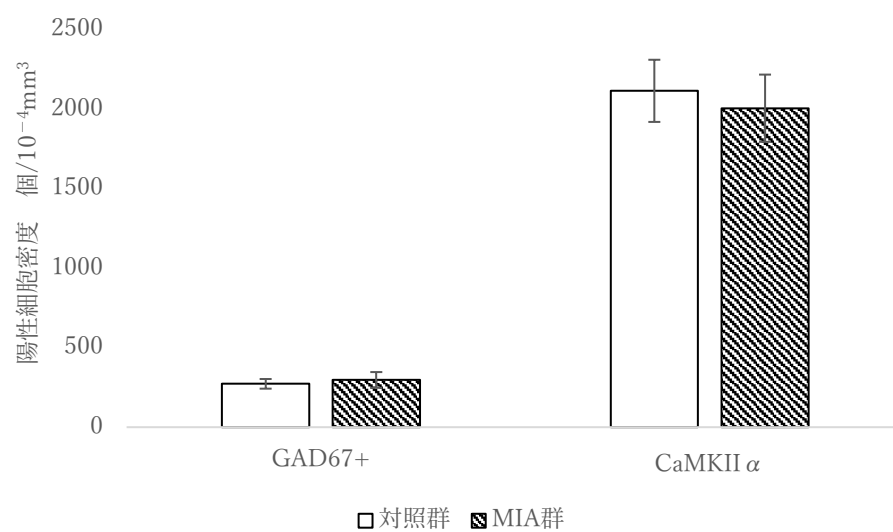
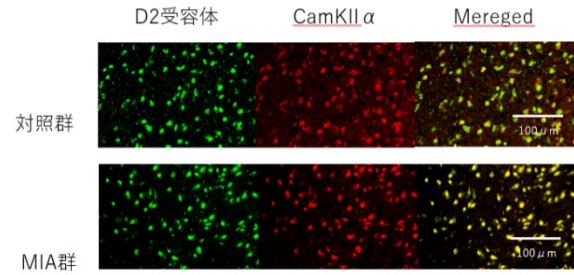
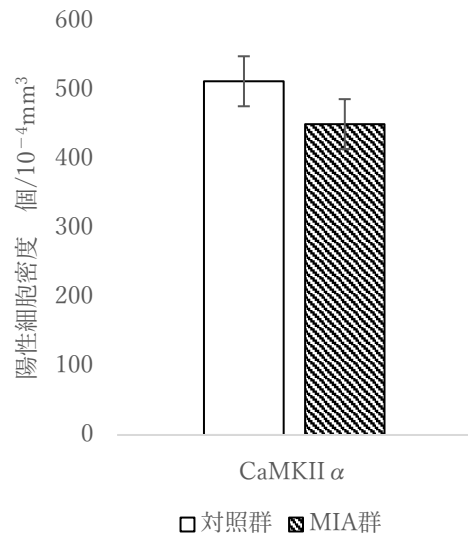
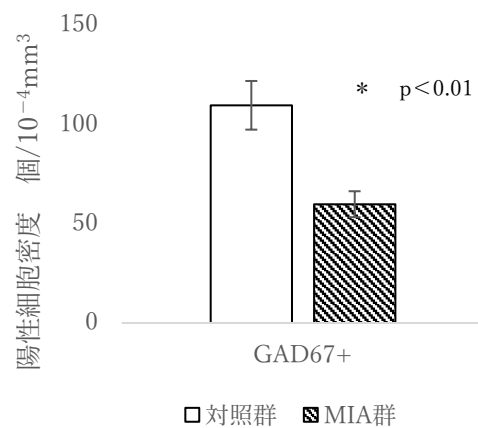


図 7 前頭前野における GAD67 陽性細胞および CaMKII α 陽性細胞の分布

前頭前野における GAD67 陽性細胞および CaMKII α 陽性細胞密度 (個/ 10^{-4}mm^3) を示す。両者とも対照群と MIA 群の間に有意差を認めなかった。



(a)



(b)

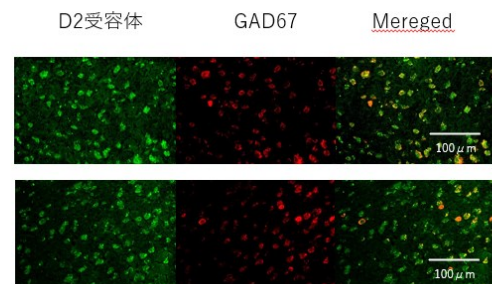


図 8 Drd2 陽性細胞の前頭前野における CaMKII α および GAD67 共発現

前頭前野で Drd2 陽性細胞のうち (a) CaMKII α および (b) GAD67 を共発現する細胞数及び代表的な蛍光免疫組織化学画像を示す。対照群と MIA 群の間で CaMKII α と Drd2 を共発現する細胞数に変化はなかった。一方 GAD67 と Drd2 を共発現する細胞は対照群と比較して MIA 群で有意に減少していた。

5 考察

本研究では、MIA モデルマウスの前頭前野で RNA-seq による発現変動解析を行い、MIA モデルマウスにおいてドーパミン神経系にかかわる遺伝子発現の低下を認めた。発現変動遺伝子のうち、統合失調症との関連が広く指摘されているドーパミン D2 受容体について、免疫組織化学による検討を行った。その結果、MIA モデルマウスの前頭前野においてドーパミン D2 受容体を発現する GABA 作動性神経細胞の減少を認めた。GABA 作動性神経細胞全体の減少は認められなかったことから MIA モデルマウスの前頭前野において、ドーパミン作動性神経の入力を受ける GABA 作動性神経細胞のみに何らかの異常が生起されることが示唆された。

5.1 MIA モデルマウスの表現型と本実験でのモデルの妥当性

MIA モデルマウスは、妊娠中の母体免疫反応により神経発達異常を模倣したモデル動物である。MIA モデルマウスが神経発達異常に至るプロセスでは免疫応答としての IL-6 分泌が重要と考えられている⁵⁸。Poly I:C はウイルス RNA を認識する TLR3 に対するリガンドであり TLR3 を介した経路により IL-6 分泌を促進する。この IL-6 分泌の阻害により、MIA マウスにおいて異常な行動表現型の発現が予防されることが示されており IL-6 を介した経路は MIA モデルマウスの作成において非常に重要である³⁹。本研究においては、母マウスへ 20mg/kg の Poly I:C 腹腔内投与後に

血漿中 IL-6 の顕著な増加を認めており、免疫反応が十分に賦活されたことが確認できた。先行研究では同水準の血漿中 IL-6 濃度で MIA モデルマウスが作成されており本研究でも妥当な手続きにより MIA モデルマウスが作成されたと考えられる⁴²。

ヒトにおける母体免疫賦活と本研究で用いた MIA モデルマウスの免疫賦活レベルがどの程度近似しているかという点については評価が困難であった。前向き疫学調査において感染急性期の血清学的データを得ることが方法論的に難しいため、ヒトにおける母体免疫賦活レベルを特定した先行研究が無いためである。しかしながら妊娠第 1 三半期での血中 IL-6 濃度の上昇と出生子の統合失調症発症リスクの関連が報告されており、本研究において免疫賦活の評価に血漿中 IL-6 濃度を用いたことは妥当であったと考えられる⁵⁹。

5.2 RNA-seq による発現変動遺伝子およびパスウェイの検出

MIA モデルマウスにおいて、脳内トランスクリプトームの変化については様々な報告がある。とくに前頭前野のトランスクリプトームについては評価が一定していない⁶⁰。Connor らおよび Stephen らの 2 つの先行研究では、MIA モデルマウスの前頭前野では遺伝子発現変動が非常にわずかかもしくは全くないと報告している^{39,60}。一方で本研究では 99 の発現変動遺伝子を認めた。このような差異が生じたのには 2 つの要因が考えられる。まず、上述の先行研究では 1 2 週でサンプル採取及び解析を行

っている点である。MIA モデルマウスの前頭前野での遺伝子発現変動はその発達過程で大きく変化することが指摘されており⁶³、本研究での8週時点と結果に差異が生じたと考えられる。もう1点は、実験手法の違いである。上述の2つの研究では遺伝子発現解析としてマイクロアレイを用いている一方、本研究ではRNA-seqを用いた。マイクロアレイとRNA-seqを比較した場合、RNA-seqは遺伝子発現変動を検出できるレンジが広く、より低発現の遺伝子でも発現変動を検出することができる⁶⁴。本研究において発現変動を認めたドーパミン系にかかわる遺伝子は皮質においては比較的発現量が少なく、マイクロアレイを利用した従前の研究では検出できなかった可能性が高い。その点でRNA-seqを利用した本研究はより詳細な遺伝子発現を検出しており意義があると考えられる。

本研究のGO enrichment解析の結果を参照すると、サーカディアンリズムおよびドーパミンによる神経伝達にかかわるGo termに発現変動遺伝子が有意に濃縮されていることが示された。Gene Set Enrichment Analysisでは上記の結果に加えて、小胞体輸送やイオンチャネルなどの神経伝達に関わるパスウェイの変動が認められた。さらに軸索誘導や細胞骨格といった軸索の形成に関わるパスウェイの変動も認められた。

サーカディアンリズムにかかわる遺伝子発現変動が多く見出されたことは、統合失調症患者の前頭前野でも同様の結果が報告されていることも併せて考えると大変興

味深い結果である⁶⁵。しかしながら、サーカディアンリズムにかかわる遺伝子の多くは概日リズムに同期して発現変動を示す。本研究は全てのサンプルが午前9時から12時の間の一時点のみで採取されたものであり、経時的なサンプル採取等のサーカディアンリズムについて十分に考慮したデザインになっておらず、サーカディアンリズムにかかわる遺伝子発現変動を評価することは困難であった。

一方本研究で明らかになった発現変動遺伝子 *Drd2* は統合失調症のドーパミン仮説において中核的な役割が想定されるドーパミン D2 受容体をコードしている。また図9に示すように *Adora2A* のコードするアデノシン A2a 受容体はドーパミン D2 受容体とヘテロマーを形成し、ドーパミン D2 受容体の機能と密接にかかわっている⁶⁶。これらの発現変動遺伝子は MIA モデルマウスを統合失調症の外挿として考慮するうえで重要な所見と考えられる。

また、近年の先行研究においても MIA モデルマウスの前頭前野での *Drd2* mRNA 発現や線条体での D2 受容体結合の低下が報告されている^{67,68}。先行研究では、GABA 作動性神経系にかかわる遺伝子発現変動とドーパミン作動性神経にかかわる遺伝子発現変動が比較的多く報告されているが、これらの変動について組織学的に検討した報告は少ない^{61,62}。

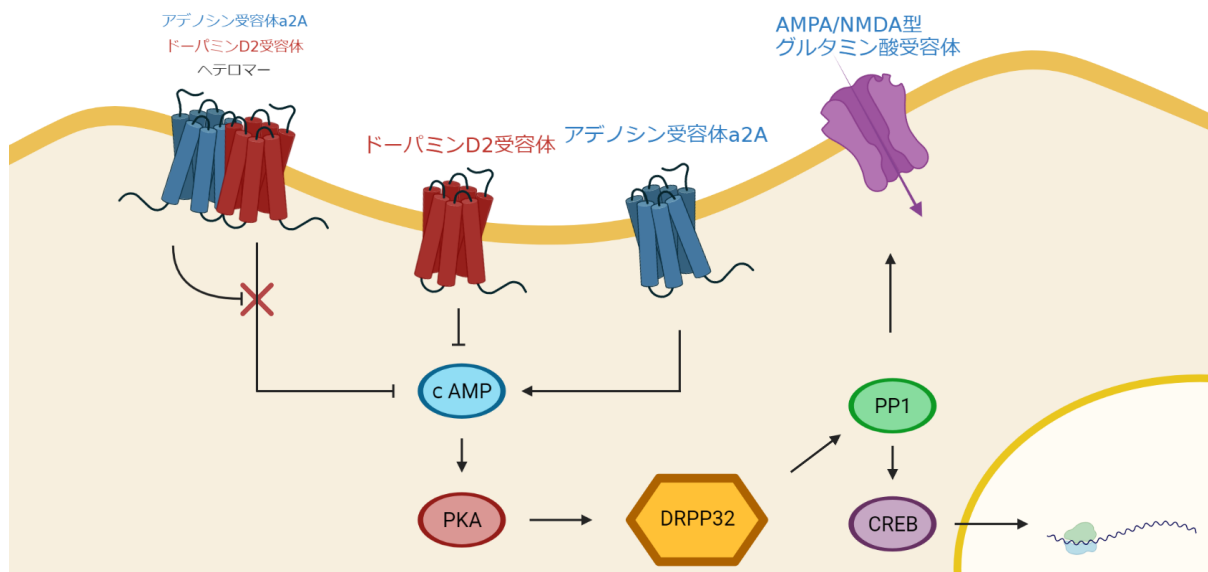


図 9 ドーパミン D2 受容体とアデノシン a2A 受容体の相互作用についてのシナプス後膜模式図

ドーパミン D2 受容体は cAMP および DRPP32 を介してシナプス伝達に対して抑制的に働くとされる。アデノシン受容体 a2A はドーパミン D2 受容体とヘテロマーを形成することでドーパミン D2 受容体に対してのアロステリックインヒビターとして振る舞う。cAMP：サイクリック AMP, PKA：プロテインキナーゼ A, DRPP32:ドーパミンサイクリック AMP 調節性リン酸化タンパク質 32, PP1：プロテインフォスファターゼ 1。(Ferré らの文献⁶⁶をもとに BioRender (<https://app.biorender.com/>) により描出。)

5.2.1 組織学的解析の結果の検討

本研究では RNA-seq を利用し、細胞種・部位にかかわらず前頭前野全域の遺伝子発現変動を検出した。次の段階として、RNA-seq により明らかになったドーパミン D2 受容体について、組織学的検討によりその分布と変動を調査した。MIA モデルマウスでは前頭前野においてドーパミン D2 受容体陽性細胞密度が減少していたが、図 6 のとおり MIA モデルマウス前頭前野における細胞数そのものは減少していないことから、ドーパミン D2 受容体陽性細胞が特異的に減少していたと考えられる。次に、減少したドーパミン D2 受容体陽性細胞がどのようなプロファイルの細胞であるかを調べるために、抑制性神経細胞の特異的マーカーである GAD67 および興奮性神経細胞の特異的マーカーである CaMKII α との 2 重染色を行った。その結果、MIA モデルマウスにおいては GAD67 と Drd2 を共発現する細胞が特異的に減少していることが明らかとなった。

脳内において主に Drd2 を発現する GABA 作動性神経細胞は線条体の中型有棘細胞である。線条体に存在し、皮質線条体ループにおける間接路の役割を担っている⁶⁹⁷⁰。一方で大脳皮質にも Drd2 を発現する GABA 作動性神経細胞が存在しており、次章にて概説する。

5.3 前頭前野におけるドーパミン D2 受容体と抑制性神経細胞との関係

前頭前野におけるドーパミン入力の中脳腹側被蓋野に存在するドーパミン作動性神経細胞より投射されている。ドーパミンの受容体はすべて G タンパク共役型受容体で、その伝達速度はイオンチャネル型受容体よりも遅い。また、シナプスだけでなく神経細胞の樹状突起や細胞体にも発現しているという特徴がある。ドーパミン神経の末端は明確なシナプスを形成せず細胞間隙に直接ドーパミンを放出することも確認されている。これらの特徴からドーパミンはそのものが情報伝達を担うというよりも、神経細胞の情報伝達を修飾する神経伝達“修飾”物質としての役割が想定されている⁷¹。

前頭前野に分布するドーパミン受容体はその多くが D1 受容体で、D2 受容体は少ない⁷²。D1/2 どちらの受容体ともに錐体細胞・介在ニューロンに分布するが、D2 受容体は比較的介在ニューロンに多く発現している⁷³。D2 受容体は介在ニューロンを介して錐体細胞の発火を制御し、前頭前野機能に影響を与えていると考えられている⁷⁴。統合失調症患者の死後脳研究では、前頭前野での GABA 作動性介在ニューロン特異的な遺伝子の発現低下が報告されている⁷⁵。マウスでは前頭前野でパルブアルブミン陽性介在ニューロンの D2 受容体発現を低下させることで、統合失調症様の行動異常が起きることが報告されている⁷⁶。

これらの先行研究から考察すると、統合失調症では前頭前野の介在ニューロンに何

らかの異常があり、なおかつそれにドーパミン D2 受容体が関連している可能性が考えられる。本研究で作成した MIA モデルマウスでも同様に、前頭前野の介在ニューロンでドーパミン D2 受容体の発現が低下しており、統合失調症における上記の異常が再現されたと考えられる。

5.4 母体免疫賦活による神経発達異常へのメカニズム

1929 年に精神障害患者において冬の出生が有意に多いことが報告された^{77,78}。当初は冬季の栄養問題等が考慮されたが、後に冬季に流行する感染症の母体感染とのかかわりが報告されるようになった⁷⁹。本研究では序論にて述べた通り母体免疫賦活という疫学的所見に基づいて作成した MIA モデルマウスの前頭前野において介在ニューロンの異常という所見を得た。このことは MIA モデルマウスが、母胎内感染により発症に至った統合失調症の病態生理を再現する可能性を示唆するものの、なぜ母体免疫賦活が神経系の異常を引き起こすのか、という点については本研究では不明のままである。母体免疫賦活による神経発達異常に至るメカニズムは様々な報告があるが現在まで一致した見解は得られていない。IL-6 および IL-6 の刺激を受けてヘルパー T17 細胞より分泌される IL-17 が主要な役割を果たすことが報告されているものの⁸⁰、それらの炎症性サイトカインが実際にどのような機序で胎児の神経系に影響を及ぼすのかというところは未解明である。IL-6 は胎盤通過性がないが、母体の免疫反応に応じて胎盤でも分泌されていることが明らかとなっている⁸¹。IL-6 は炎症性サイトカイ

ンとして多種の神経細胞に影響を及ぼすが、とくに GABA 作動性神経細胞およびドーパミン作動性神経細胞に強い影響を及ぼすことが示されている⁸²⁸³。GABA 作動性の抑制性神経細胞は胎生期に大脳基底核原基で発生し成長とともに大脳野に移動するが、IL-6 はこの過程に阻害的に作用することが報告されている⁵⁸。また、IL-6 はドーパミン作動性神経細胞の生存に影響を与えている⁸⁴。なお興味深いことにドーパミン作動性神経細胞の前頭前野への投射においては軸索誘導因子であるネトリン 1 が重要な役割を持つが⁸⁵、本研究で施行した RNA-seq では MIA 群でネトリン 1 の受容体である *DSCAM* の有意な発現低下を認めた (表 3)。またその後の GSEA 解析では Axon Guidance にかかわる遺伝子発現変動が有意に濃縮されていた。今後はこの分野の研究により母胎免疫活性化とドーパミン神経系異常との関わりが解明される可能性がある。

以上から、母体免疫賦活により惹起された IL-6 がドーパミン作動性神経細胞の発達を阻害する。次にドーパミン作動性神経細胞の前頭前野への投射および GABA 作動性介在ニューロンへのドーパミン入力が阻害される。結果として前頭前野の GABA 作動性介在ニューロンの機能低下により行動表現型に異常が生じる、というメカニズムが統合失調症の前頭前野機能に関連する症状に影響している可能性が推測される。

5.5 本研究の限界と今後の課題

これらの仮説を本研究の結果から検証するには以下の限界がある。

本研究では、MIA モデルマウスの 8 週齢個体のみでの解析を行った。神経発達異常を解明する点では MIA モデルマウスの発現変動解析ならびにドーパミン作動性神経細胞の投射についての組織学的解析を、胎生期から成体まで時系列で解析することが必要と考えられる。

さらに本研究では発現解析の結果に基づき、組織学的研究による神経系の構成異常を解析した。本研究においては発現変動が確認された *Drd2* の転写産物であるドーパミン D2 受容体について蛍光免疫組織化学的解析を行った。*Adora2A* も発現変動を認めていたものの、大脳皮質での発現量の少なさから解析が困難であった。またドーパミン D2 受容体陽性細胞の密度から考えると、抑制性/興奮性神経細胞以外にもドーパミン D2 受容体を発現している細胞が存在することが示唆された。先行研究ではアストロサイトやミクログリアにもドーパミン D2 受容体が発現している可能性が示唆されているがその役割については明確ではない。本研究で認めた *Drd2* 以外の発現変動遺伝子および神経細胞以外についても組織学的解析を行う必要がある。

また、本研究で認められた異常が実際に行動表現型の異常として表現されるのかという点も含めて、GABA 作動性介在ニューロンへのドーパミン入力 of 低下による行動表現型の異常について、機能的な解析を行うことで母体免疫賦活による神経発達異常

メカニズムの解明が可能と考えられる。

MIA モデルマウスが、統合失調症の病態のみをモデル化した動物モデルではないという点である。MIA モデルマウスはその表現型から統合失調症モデル動物としてだけでなく自閉スペクトラム症の動物モデルとしても使用されている。そのため、本研究で得られた結果は、単純に統合失調症の病態に比定されるものではなく、自閉スペクトラム症なども含めた共通する神経発達病態を反映している可能性がある。

6 結語

本研究では母体免疫賦活による精神疾患モデルマウスを作成し、その前頭前野において、ドーパミン神経伝達にかかわる遺伝子発現の低下およびドーパミン D2 受容体を発現する GABA 作動性神経細胞の減少を認めたことから、母体免疫賦活によりドーパミン作動性神経の入力を受ける GABA 作動性神経細胞に何らかの異常が生起されることが示された。これらの結果は、母体感染と統合失調症の発症およびその病態生理の関係を解明する上で重要な所見と考えられた。

7 参考文献

1. Alnæs, D. *et al.* Brain Heterogeneity in Schizophrenia and Its Association With Polygenic Risk. *JAMA Psychiatry* **76**, 739–748 (2019).
2. McCutcheon, R. A., Reis Marques, T. & Howes, O. D. Schizophrenia—An Overview. *JAMA Psychiatry* **77**, 201–210 (2020).
3. Jääskeläinen, E. *et al.* A Systematic Review and Meta-Analysis of Recovery in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* **39**, 1296–1306 (2013).
4. Kahn, R. S. *et al.* Schizophrenia. *Nature Reviews Disease Primers* **2015 1:1** **1**, 1–23 (2015).
5. Prince, M. *et al.* No health without mental health. *The Lancet* **370**, 859–877 (2007).
6. Salomon, J. A. *et al.* Common values in assessing health outcomes from disease and injury: Disability weights measurement study for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* **380**, 2129–2143 (2012).
7. Correll, C. U. & Schooler, N. R. Negative Symptoms in Schizophrenia: A Review and Clinical Guide for Recognition, Assessment, and Treatment. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **16**, 519 (2020).

8. Nishioka, M. *et al.* Identification of somatic mutations in monozygotic twins discordant for psychiatric disorders. *npj Schizophrenia* **4**, 7 (2018).
9. D, S. C. *et al.* Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet (London, England)* **336**, 13–16 (1990).
10. Ripke, S. *et al.* Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**, 421–427 (2014).
11. Lindström, L. H. *et al.* Increased dopamine synthesis rate in medial prefrontal cortex and striatum in schizophrenia indicated by L-(β -11C) DOPA and PET. *Biological Psychiatry* **46**, 681–688 (1999).
12. Howes, O. D. & Kapur, S. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway. *Schizophrenia Bulletin* **35**, 549–562 (2009).
13. DH, I. & G, F. Abnormalities of cerebral blood flow distribution in patients with chronic schizophrenia. *Acta psychiatrica Scandinavica* **50**, 425–462 (1974).
14. Shenton, M. E., Dickey, C. C., Frumin, M. & McCarley, R. W. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophrenia research* **49**, 1 (2001).
15. van Erp, T. G. M. *et al.* Subcortical brain volume abnormalities in 2028 individuals with schizophrenia and 2540 healthy controls via the ENIGMA

- consortium. *Molecular Psychiatry* **21**, 547–553 (2016).
16. Rimol, L. M. *et al.* Cortical Thickness and Subcortical Volumes in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Biological Psychiatry* **68**, 41–50 (2010).
 17. Salvador, R. *et al.* Overall brain connectivity maps show cortico-subcortical abnormalities in schizophrenia. *Human Brain Mapping* **31**, 2003–2014 (2010).
 18. Vita, A., de Peri, L., Deste, G. & Sacchetti, E. Progressive loss of cortical gray matter in schizophrenia: a meta-analysis and meta-regression of longitudinal MRI studies. *Translational psychiatry* **2**, e190 (2012).
 19. Nakamura, M. *et al.* Surface morphology of the orbitofrontal cortex in individuals at risk of psychosis: a multicenter study. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* **269**, 397–406 (2019).
 20. Mednick, S. A., Machon, R. A., Huttunen, M. O. & Bonett, D. Adult Schizophrenia Following Prenatal Exposure to an Influenza Epidemic. *Archives of General Psychiatry* **45**, 189–192 (1988).
 21. Kentner, A. C. *et al.* Maternal immune activation: reporting guidelines to improve the rigor, reproducibility, and transparency of the model. *Neuropsychopharmacology* **44**, 245–258 (2019).

22. Selten, J.-P. & Termorshuizen, F. The serological evidence for maternal influenza as risk factor for psychosis in offspring is insufficient: critical review and meta-analysis. *Schizophrenia Research* **183**, 2–9 (2017).
23. Khandaker, G. M., Zimbron, J., Lewis, G. & Jones, P. B. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: A systematic review of population-based studies. *Psychological Medicine* **43**, 239–257 (2013).
24. Severance, E. G. *et al.* Discordant patterns of bacterial translocation markers and implications for innate immune imbalances in schizophrenia. *Schizophrenia Research* **148**, 130–137 (2013).
25. Atladóttir, H. Ó. *et al.* Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders* **40**, 1423–1430 (2010).
26. Brown, A. S. & Patterson, P. H. Maternal infection and schizophrenia: Implications for prevention. *Schizophrenia Bulletin* **37**, 284–290 (2011).
27. Winship, I. R. *et al.* An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *The Canadian Journal of Psychiatry* **64**, 5–17 (2019).
28. Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W. & Patterson, P. H. Maternal Influenza

- Infection Causes Marked Behavioral and Pharmacological Changes in the Offspring. *The Journal of Neuroscience* **23**, 297–302 (2003).
29. Gambill, J. D. & Kornetsky, C. Effects of chronic d-amphetamine on social behavior of the rat: Implications for an animal model of paranoid schizophrenia. *Psychopharmacology* 1976 50:3 **50**, 215–223 (1976).
 30. NABESHIMA, T., MOURI, A., MURAI, R. & NODA, Y. Animal Model of Schizophrenia: Dysfunction of NMDA Receptor-Signaling in Mice following Withdrawal from Repeated Administration of Phencyclidine. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1086**, 160–168 (2006).
 31. Featherstone, R. E., Kapur, S. & Fletcher, P. J. The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **31**, 1556–1571 (2007).
 32. Nagai, T., Ibi, D. & Yamada, K. Animal Model for Schizophrenia That Reflects Gene-Environment Interactions. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **34**, 1364–1368 (2011).
 33. Mukai, J. *et al.* Palmitoylation-dependent neurodevelopmental deficits in a mouse model of 22q11 microdeletion. *Nature Neuroscience* **11**, 1302–1310 (2008).

34. Ellegood, J. *et al.* Neuroanatomical phenotypes in a mouse model of the 22q11.2 microdeletion. *Molecular Psychiatry* **19**, 99–107 (2014).
35. Zuckerman, L., Rehavi, M., Nachman, R. & Weiner, I. Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: A novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **28**, 1778–1789 (2003).
36. Ozawa, K. *et al.* Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: A neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biological Psychiatry* **59**, 546–554 (2006).
37. Malkova, N. V., Yu, C. Z., Hsiao, E. Y., Moore, M. J. & Patterson, P. H. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior, and Immunity* **26**, 607–616 (2012).
38. King, B. H. & Lord, C. Is schizophrenia on the autism spectrum? *Brain Research* **1380**, 34–41 (2011).
39. Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K. & Patterson, P. H. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *Journal*

- of Neuroscience* **27**, 10695–10702 (2007).
40. Mandal, M., Marzouk, A. C., Donnelly, R. & Ponzio, N. M. Maternal immune stimulation during pregnancy affects adaptive immunity in offspring to promote development of TH17 cells. *Brain, Behavior, and Immunity* **25**, 863–871 (2011).
 41. Hwang, Y. *et al.* Gene expression profiling by mRNA sequencing reveals increased expression of immune/inflammation-related genes in the hippocampus of individuals with schizophrenia. *Translational Psychiatry* **2013 3:10 3**, e321–e321 (2013).
 42. Chow, K.-H., Yan, Z. & Wu, W.-L. Induction of Maternal Immune Activation in Mice at Mid-gestation Stage with Viral Mimic Poly(I:C). *Journal of Visualized Experiments* e53643–e53643 (2016) doi:10.3791/53643.
 43. JJ, G. *et al.* Interferon induction and its dependence on the primary and secondary structure of poly(inosinic acid).poly(cytidylic acid). *Biochemistry* **17**, 4214–4220 (1978).
 44. Martins, K. A., Bavari, S. & Salazar, A. M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.966085> **14**, 447–459 (2015).

45. Lovick, T. A. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **45**, 314–320 (2012).
46. Prieto, C. & Barrios, D. RaNA-Seq: interactive RNA-Seq analysis from FASTQ files to functional analysis. *Bioinformatics* **36**, 1955–1956 (2020).
47. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**, i884–i890 (2018).
48. Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A. & Kingsford, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods* **14**, 417–419 (2017).
49. Love, M., Anders, S. & Huber, W. Differential analysis of count data-the DESeq2 package. (2014) doi:10.1101/002832.
50. Ge, S. X., Son, E. W. & Yao, R. iDEP: An integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* **19**, 1–24 (2018).
51. Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K. & Oshlack, A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology* **11**, 1–12 (2010).

52. Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M. & Tanabe, M. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic acids research* **49**, D545–D551 (2021).
53. Kanehisa, M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society* **28**, 1947–1951 (2019).
54. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* **28**, 27–30 (2000).
55. Korotkevich, G. *et al.* Fast gene set enrichment analysis. *bioRxiv* 060012 (2021) doi:10.1101/060012.
56. Otsu, N. THRESHOLD SELECTION METHOD FROM GRAY-LEVEL HISTOGRAMS. *IEEE Trans Syst Man Cybern* **SMC-9**, 62–66 (1979).
57. Allen Institute for Brain Science. Allen Reference Atlas – Mouse Brain [brain atlas] (2011). Available from atlas.brain-map.org.
58. Gumusoglu, S. B., Fine, R. S., Murray, S. J., Bittle, J. L. & Stevens, H. E. The role of IL-6 in neurodevelopment after prenatal stress. *Brain, Behavior, and Immunity* **65**, 274–283 (2017).

59. Allswede, D. M., Yolken, R. H., Buka, S. L. & Cannon, T. D. Cytokine concentrations throughout pregnancy and risk for psychosis in adult offspring: a longitudinal case-control study. *The Lancet Psychiatry* **7**, 254–261 (2020).
60. Connor, C. M. *et al.* Maternal immune activation alters behavior in adult offspring, with subtle changes in the cortical transcriptome and epigenome. *Schizophrenia Research* **140**, 175–184 (2012).
61. Meyer, U., Engler, A., Weber, L., Schedlowski, M. & Feldon, J. Preliminary evidence for a modulation of fetal dopaminergic development by maternal immune activation during pregnancy. *Neuroscience* **154**, 701–709 (2008).
62. Labouesse, M. A., Dong, E., Grayson, D. R., Guidotti, A. & Meyer, U. Maternal immune activation induces GAD1 and GAD2 promoter remodeling in the offspring prefrontal cortex. *Epigenetics* **10**, 1143–1155 (2015).
63. Meyer, U. Prenatal Poly(I:C) Exposure and Other Developmental Immune Activation Models in Rodent Systems. *Biological Psychiatry* **75**, 307–315 (2014).
64. Wang, C. *et al.* The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. *Nature Biotechnology* **32**, 926–932 (2014).

65. Seney, M. L. *et al.* Diurnal rhythms in gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Nature Communications* **10**, 1–11 (2019).
66. Ferré, S. *et al.* Adenosine A2A-dopamine D2 receptor–receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism & Related Disorders* **10**, 265–271 (2004).
67. Singh, B. *et al.* Early life exposure to poly I:C impairs striatal DA-D2 receptor binding, myelination and associated behavioural abilities in rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **118**, 102035 (2021).
68. Mundorf, A. *et al.* Maternal immune activation leads to atypical turning asymmetry and reduced DRD2 mRNA expression in a rat model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research* **414**, 113504 (2021).
69. MR, D. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences* **13**, 281–285 (1990).
70. Cazorla, M. *et al.* Dopamine D2 Receptors Regulate the Anatomical and Functional Balance of Basal Ganglia Circuitry. *Neuron* **81**, 153–164 (2014).
71. Quintana, C. & Beaulieu, J. M. A fresh look at cortical dopamine D2 receptor expressing neurons. *Pharmacological Research* vol. 139 440–445 (2019).

72. Hurd, Y. L., Suzuki, M. & Sedvall, G. C. D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **22**, 127–137 (2001).
73. Khilghatyan, J., Quintana, C., Parent, M. & Beaulieu, J. M. High Sensitivity Mapping of Cortical Dopamine D2 Receptor Expressing Neurons. *Cerebral Cortex* **29**, 3813–3827 (2019).
74. Estes, M. L. & McAllister, A. K. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science (New York, N.Y.)* **353**, 772–7 (2016).
75. Taylor, S. F. & Tso, I. F. GABA abnormalities in schizophrenia: A methodological review of in vivo studies. *Schizophrenia Research* **167**, 84–90 (2015).
76. Tomasella, E. *et al.* Deletion of dopamine D2 receptors from parvalbumin interneurons in mouse causes schizophrenia-like phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 3476–3481 (2018).
77. Tochigi, M., Okazaki, Y., Kato, N. & Sasaki, T. What causes seasonality of birth in schizophrenia? *Neuroscience Research* **48**, 1–11 (2004).
78. Tramer M. Über die biologische bedeutung des geburtsmonates, insbesondere für die psychoseerkrankung. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* **24**, 17–24 (1929).

79. Selten, J.-P. & Termorshuizen, F. The serological evidence for maternal influenza as risk factor for psychosis in offspring is insufficient: critical review and meta-analysis. *Schizophrenia Research* **183**, 2–9 (2017).
80. Choi, G. B. *et al.* The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science* **351**, 933–939 (2016).
81. Hsiao, E. Y. & Patterson, P. H. Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development. *Developmental Neurobiology* **72**, 1317–1326 (2012).
82. Corradini, I. *et al.* Maternal Immune Activation Delays Excitatory-to-Inhibitory Gamma-Aminobutyric Acid Switch in Offspring. *Biological Psychiatry* **83**, 680–691 (2018).
83. Meyer, U. & Feldon, J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology* **62**, 1308–1321 (2012).
84. Aguilar-Valles, A., Rodrigue, B. & Matta-Camacho, E. Maternal Immune Activation and the Development of Dopaminergic Neurotransmission of the Offspring: Relevance for Schizophrenia and Other Psychoses. *Frontiers in psychiatry* **11**, 852 (2020).

85. Reynolds, L. M. *et al.* DCC receptors drive prefrontal cortex maturation by determining dopamine axon targeting in adolescence. *Biological psychiatry* **83**, 181 (2018).

8 謝辞

本研究を進めるにあたって、研究室入室以来、熱心なご指導ご鞭撻を賜わりました東京大学精神医学教室神出誠一郎先生、笠井清登先生、東京大学国際高等研究所ニューロインテリジェンス国際研究機構趙治磊先生に深く感謝いたします。

また、本研究において多大なるご指導・ご協力をいただいた、東京大学医学部附属病院精神神経科スタッフの皆様に厚く御礼申し上げます。