

第 102 回日本精神神経学会総会

精神医学奨励賞受賞講演

## 統合失調症の認知機能障害と前シナプスタンパク complexin

澤田 健 (高知大学医学部神経精神科学教室)

### はじめに

1995年、前シナプスに局在する complexin というタンパクが、日本の2グループを含んだ3グループで同時に発見されました<sup>7,9,13</sup>。日本の研究者の一人は高知医科大学(現高知大学医学部)の免疫学教室の高橋聖一先生でした。高橋先生はパワフルな研究者で、ほとんど自分の力で、免疫細胞のcDNAライブラリーから complexin 遺伝子を単離し、抗体を作り、ノックアウトマウスを作製しました。私は、その発見から一年後の1996年より高知医科大学医学部大学院に入り、生物学教室で、神経細胞の分化を促進させ血液の発生を抑制する goosecoid というホメオボックス遺伝子の研究をしておりました。当時は、自分自身の研究に手一杯で、近くで行われていた complexin の研究を全く知らないまま過ごしていました。ある時、高橋先生が complexin II ノックアウトマウスの作製を行い表現型に変化がないため、電気生理実験を行う必要がありましたが、高知県には電気生理を行う人がいないと嘆いていることを聞きました。その時に当教室で電気生理を行っていた氏原久充先生を紹介する事になりました。こうして、complexin の研究が高知において進んでいきました。しかし、このときは紹介したというだけで、complexin が精神疾患と関連することは考えていなかったため、自分の研究になるとは全く思っていませんでした。その後、当大学と姉妹校であるカナダのプリティッシュコロンビア大学の精神科、Honer 教授の下で1999年から2001年までの2年間、留学することになりました。

Honer 教授の研究室を選んだ理由は死後脳研究をやりたいからですが、その研究室において前シナプスタンパクを用いて、統合失調症の死後脳研究をしていることを知らずにいたので、留学する前に Honer 教授が complexin をテーマとするよう言われた時は驚きました。今から考えると complexin を研究対象としたのは必然のようですが、その時は全く念頭になかった研究対象でした。留学して直ぐに、統合失調症の患者さんの死後脳の 前頭前野と前帯状回を用いて、ELISA にて定量を行ったところ、幸運なことに、complexin タンパクの変化が確認されました。その時は、留学は大変であると聞いていたのに、結果があまりに簡単にでたので、拍子抜けしました。しかし、それから2年間はめぼしい結果は出せずに過ごしました。ところが帰る直前の1, 2ヶ月になって、統合失調症の海馬サンプルでの先行研究の追試を行うと興味深い結果が得られました。この結果に加え、日本に戻ってきてから、何度かカナダに実験旅行に行った成果を足し合わせたものがこれから述べる研究です<sup>10</sup>。また、当教室で complexin ノックアウトマウスを用いて、当教室の大学院生であった山内祥豪先生が行った遺伝要因と環境要因の相互作用に焦点を当てた研究<sup>14</sup>を紹介したいと思います。

### 1. 統合失調症と complexin

機能的神経画像研究は、統合失調症の病態生理に脳領域間の結合性の異常と神経接続の異常があることを示唆している。最近の死後脳研究の所見

から、その神経結合性と神経伝達の異常はシナプスレベルに病理があると考えられている。シナプスに注目すると、シナプスの神経伝達物質放出に関係する SNARE 複合体を形成する3つのタンパク、syntaxin, SNAP-25, VAMP と前シナプス特異的タンパクである synaptophysin が、統合失調症の死後脳研究で発現の減少を示すという所見が多い。complexin は、前シナプス部に存在しており、syntaxin に結合し、神経伝達物質の放出を調整していると考えられ、complexin I と complexin II の二つのアイソフォームが存在する。complexin I が軸索細胞体シナプス前終末（抑制性ニューロン）に主に存在し、complexin II は軸索樹状突起シナプス前終末（興奮性ニューロン）に主に存在することを一連の解剖学的研究は示している<sup>6,13)</sup>。この解剖学的分布の違いを考慮に入れて、統合失調症の死後脳を用いた Harrison と Eastwood の予備的研究は、側頭葉内側部において、complexin II mRNA とタンパクレベルは、complexin I mRNA とタンパクレベルに対するより有意に減少していることを示した<sup>6)</sup>。この変化は、海馬領域の興奮性ニューロンの脱落が統合失調症の病態生理に大きく関与していると考察した。以降、Harrison のグループや我々のグループの報告で、complexin の変化が存在することは、前頭前野などさまざまな領域で明らかにされている。

われわれの研究は12人の統合失調症患者（男性8人、女性4人 平均年齢56.8±9.4歳）と12人の統合失調症のない対象（男性9人、女性3人 平均年齢54.4±16.8歳）の死後脳を用いた。パラフィンに包埋された脳切片を3μmに薄切し、脱パラフィンをした後、抗complexin I抗体と抗complexin II抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った（図1）。その後、その免疫反応強度を半定量した。complexin I, IIの免疫反応強度の減少とともに、complexin II/complexin Iの比率は統計学的に有意に海馬全体で統合失調症において減少していた。これは以前の報告と一致したもので、海馬における興奮性ニューロンの減少が統

合失調症の病態生理に関係している可能性が示唆された。この所見を確かめるため、前シナプスに特異的に発現し、興奮性ニューロンに発現しているvGLUT1（小胞性グルタミン酸トランスポーター1）と抑制性ニューロンに存在するvGAT（小胞性GABAトランスポーター）を同じサンプルで染色したところ、双方のタンパクともに統合失調症での減少を示したが、complexinと比べると免疫組織反応強度の減少量の有意差は小さかった。また、complexin II/complexin Iの比率の変化が、vGLUT1/vGATの比率の変化より実質的に大きかった。統合失調症の病態生理へのcomplexinの関与は、興奮性ニューロンの脱落というだけでなく、もっと異なる病態があることが示唆された。なお、死後脳には抗精神病薬の影響があるため、この効果を調べるために、ラットにハロペリドールを投与して海馬でのcomplexinの免疫反応強度の変化を測定したが、有意な変化は認められなかった。

Alzheimer病における前シナプスタンパクの減少は、死前の認知機能障害と相関しているが、統合失調症では、死前の認知機能と神経病理との間の関連を示した研究はほとんどない。このため、統合失調症患者の中で死前の認知機能（Clinical Dementia Rating scale (CDR) にて測定）を用いて、認知機能障害（+）群と認知機能障害（-）群の二つのサブグループに分けた。認知機能障害（+）群は認知機能障害（-）群と比べるとcomplexin II/complexin Iの比率が低くなり、この比率は認知機能との関与がある事が示唆された。次に、8方向迷路を用いて、ワーキングメモリーとリファレンスメモリータスクを行ったラットの海馬でのcomplexinの変化を同様に免疫組織化学法にて調べた。ラットに記憶のタスクをかけた場合には、complexin II/complexin Iは大きくなり、これは統合失調症での変化とは逆であった。さらに、ラットにアンフェタミン、ケタミンなどの薬物を投与してcomplexinの変化を測定したがcomplexinの比率には有意な変化はなかった。これを総合して考えるとcomplexin II/

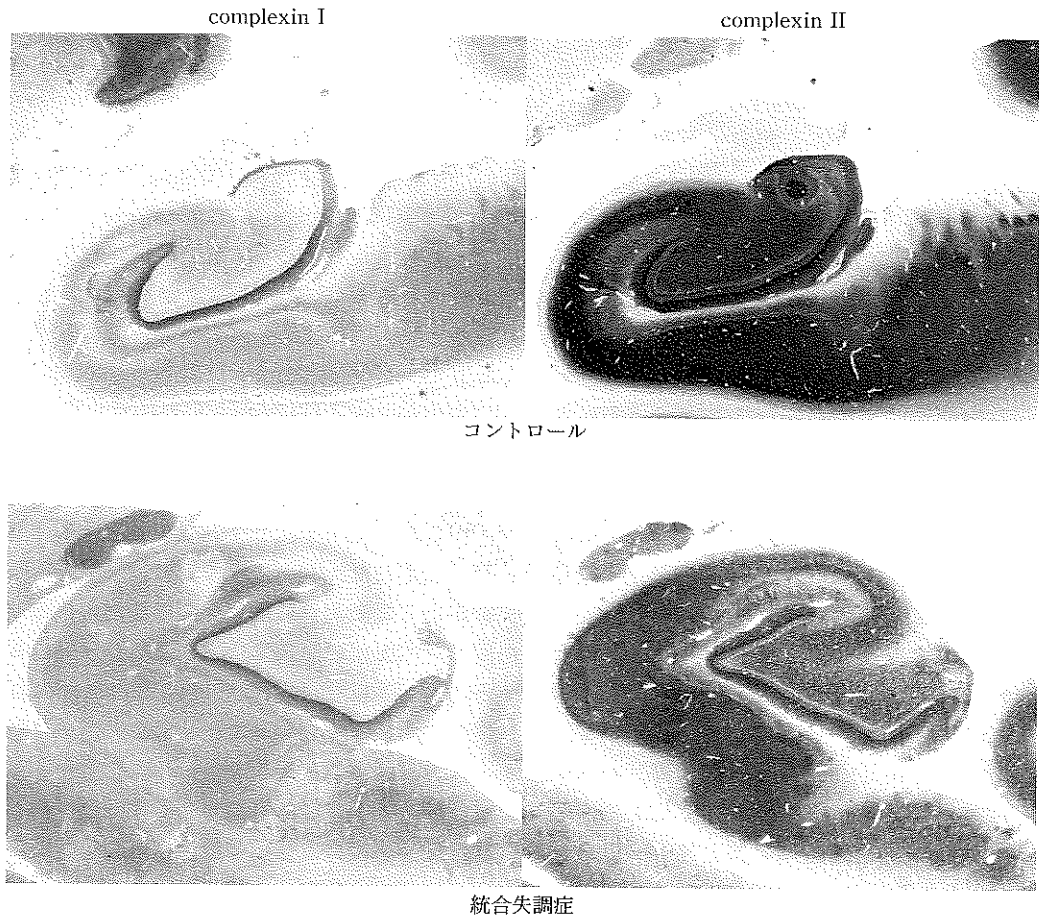


図1 代表的サンプルの海馬における抗 complexin I, II 抗体を用いた免疫組織化学染色  
統合失調症は、統合失調症のないコントロールと比べると、complexin I, II 共に免疫反応強度の低下が認められる。

complexin I の比率の変化は統合失調症において起こり、認知機能障害と相関があることが示唆された。

complexin の変化が統合失調症患者の脆弱性のマーカーであるのかも調べられている。日本からの論文で、complexin の SNP の変化が認められないとの報告がある<sup>9)</sup>。また、著者もトロントの統合失調症患者とその家族の 400 例の DNA サンプルを用いて、complexin I, complexin II の非翻訳領域の SNP の連鎖解析を行ったが、相関は認められなかった (未発表のデータ)。

## II. complexin II ノックアウトマウスと行動学的変化

現時点では、complexin の生理的機能はまだ明らかではなく、神経伝達物質放出に対し促進的または抑制的に働くという相反するデータが報告されている。complexin の生理的機能を考える際に、ノックアウトマウスを利用した研究は重要である。ノックアウトマウス研究を紹介すると、complexin I と complexin II のダブルノックアウトマウスは、周産期において致死性であるが、片側のノックアウトでは、思春期までは生存できる。complexin II がなくても表現型に問題なく

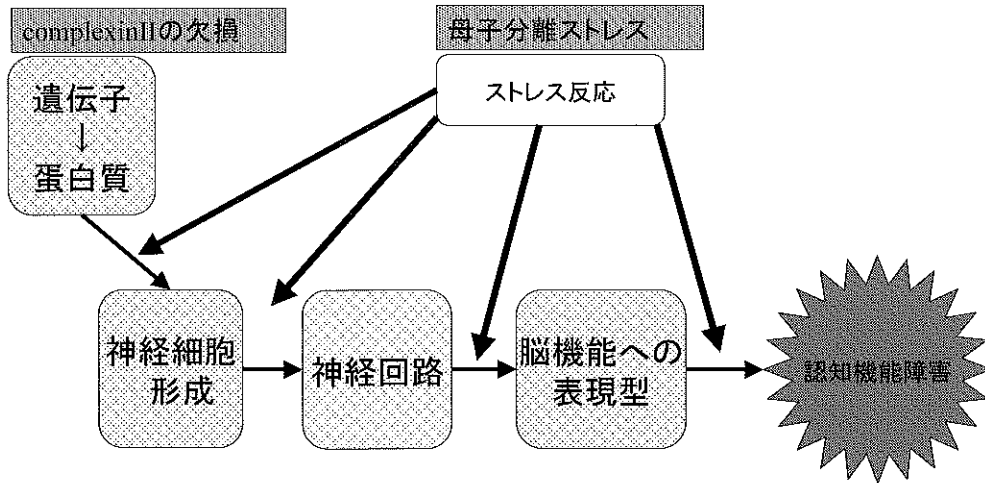


図2 統合失調症発症に関する遺伝的要因と環境要因の相関の仮説  
 遺伝的要因（この研究での complexin II の欠損）は人生早期におけるストレス反応（母子分離ストレス）により発達に従って多様な修飾を受けて認知機能障害を示すと考えられる。

成長し、行動学的変化も乏しい<sup>4,12)</sup>。complexin I ノックアウトマウスは注意深く育てれば運動障害、失調、振戦などを起こしながらも成長は可能である<sup>5)</sup>。これらのノックアウトマウスは共に電気生理学的異常を示している。

死後脳研究での神経変性像の欠如とニューロン数の減少が認められないことは、神経発達障害仮説を支持している。また、統合失調症において遺伝環境相互作用があることはよく指摘されている。統合失調症の発症に関して遺伝的要因とともに人生早期の環境要因の影響も大きな役割を果たし、神経発達障害を起こしていると考えられる。ここでは、ストレスの影響を確認するために、母子分離ストレスを行った。母子分離は生後2日目から15日目まで1日1時間、母親から引き離れた。この実験では、complexin II ノックアウトマウスに母子分離ストレスを加えていない場合には、表現型の変化は乏しいが、complexin II ノックアウトマウスに母子分離ストレスを加えた場合、CA1 錐体ニューロンでの LTP の形成が抑制されており、さらに水迷路実験でも記憶機能の低下があるという結果を得た。つまり母子分離ストレスは complexin II ノックアウトマウスの LTP と空

間学習を障害させていることを示している。すなわち、complexin II 遺伝子が欠損している場合、環境ストレスに対する弱さが増加すると考えられた。complexin II 遺伝子の欠損は、人生早期のストレスが加わることによって、神経発達過程に異常を来し認知機能に変化を引き起こす可能性がある（図2）。

ここまでの死後脳研究、動物モデル研究は、いずれもカナダプリティッシュコロンビア大学倫理委員会もしくは高知大学医学部倫理委員会での承認を受けて行った。

#### 謝 辞

当教室の井上新平先生、加藤邦夫先生には貴重な助言、指導をして頂いた。また、当教職員全ての方の支えにより研究を進めることができた事を感謝したい。高橋聖一先生には、快く抗 complexin II 抗体、complexin II ノックアウトマウスの提供をして頂いた。プリティッシュコロンビア大学精神科の W.G. Honer 教授には留学時から現在まで、温かく指導をして頂いた。

#### 文 献

1) Eastwood, S. L., Cotter, D., Harrison, P. J.: Cerebellar synaptic protein expression in schizophrenia.

Neuroscience, 105 ; 219-229, 2001

2) Eastwood, S. L., Harrison, P. J.: Hippocampal synaptic pathology in schizophrenia, bipolar disorder and major depression: a study of complexin mRNAs. *Mol Psychiatry*, 5 ; 425-432, 2000

3) Eastwood, S. L., Harrison, P. J.: Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexins. *Brain Res Bull*, 55 ; 569-578, 2001

4) Glynn, D., Bortnick, R. A., Morton, A. J.: Complexin II is essential for normal neurological function in mice. *Hum Mol Genet*, 12 ; 2431-2448, 2003

5) Glynn, D., Drew, C. J., Reim, K., et al.: Profound ataxia in complexin I knockout mice masks a complex phenotype that includes exploratory and habituation deficits. *Hum Mol Genet*, 14 ; 2369-2385, 2005

6) Harrison, P. J., Eastwood, S. L.: Preferential involvement of excitatory neurons in medial temporal lobe in schizophrenia. *Lancet*, 352 ; 1669-1673, 1998

7) Ishizuka, T., Saisu, H., Odani, S., et al.: Synaphin: a protein associated with the docking/fusion complex in presynaptic terminals. *Biochem Biophys Res Commun*, 213 ; 1107-1114, 1995

8) Kishi, T., Ikeda, M., Suzuki, T., et al.: No

association of complexin 1 and complexin 2 genes with schizophrenia in a Japanese population. *Schizophr Res*, 82 ; 185-189, 2006

9) McMahon, H. T., Missler, M., Li, C., et al.: Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell*, 83 ; 111-119, 1995

10) Sawada, K., Barr, A. M., Nakamura, M., et al.: Hippocampal complexin proteins and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 62 ; 263-272, 2005

11) Sawada, K., Young, C. E., Barr, A. M., et al.: Altered immunoreactivity of complexin protein in prefrontal cortex in severe mental illness. *Mol Psychiatry*, 7 ; 484-492, 2002

12) Takahashi, S., Ujihara, H., Huang, G. Z., et al.: Reduced hippocampal LTP in mice lacking a presynaptic protein: complexin II. *Eur J Neurosci*, 11 ; 2359-2366, 1999

13) Takahashi, S., Yamamoto, H., Matsuda, Z., et al.: Identification of two highly homologous presynaptic proteins distinctly localized at the dendritic and somatic synapses. *FEBS Lett*, 368 ; 455-460, 1995

14) Yamauchi, Y., Qin, L. H., Nishihara, M., et al.: Vulnerability of synaptic plasticity in the complexin II knockout mouse to maternal deprivation stress. *Brain Res*, 1056 ; 59-67, 2005