

福島県立医科大学 学術機関リポジトリ



Title	統合失調症前頭前野における血液脳関門構成分子クロロ デン-5の発現異常とPKAシグナルの活性化(本文)
Author(s)	西浦, 継介
Citation	
Issue Date	2016-03-24
URL	http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/558
Rights	This is the pre-peer reviewed Japanese version of "Oncotarget. 2017 Oct 16;8(55):93382-93391. doi: 10.18632/oncotarget.21850. © 2017 Nishiura et al.", used under CC BY 3.0
DOI	
Text Version	ETD

This document is downloaded at: 2024-04-17T01:53:33Z

統合失調症前頭前野における血液脳関門構成分子
クロロゲン-5 の発現異常と PKA シグナルの活性化

分子細胞病理学分野

西浦 継介

要旨

【背景と目的】

統合失調症は頻度の高い代表的な精神障害であるが、その病因や病態の分子機序の多くが不明である。統合失調症では脳の複数の部位が障害されるが、なかでも前頭前野 (PFC) は陰性症状や認知機能に関連する重要な領域である。血液脳関門 (BBB) はタイト結合を有する血管内皮細胞とその周囲の細胞外マトリックス・周皮細胞・アストロサイトにより形成され、血液と脳実質間の分子の移動を厳密に制御している。多くの神経疾患で BBB の破綻がみられることが知られているが、統合失調症でも BBB 構成分子であるクローディン-5 (Cldn5) や laminin α 1 (LAMA1) 及び α 2 (LAMA2) の遺伝子変異が報告されている。しかしながら、統合失調症脳におけるこうした BBB 関連分子の挙動についてはわかっていない。本研究では、ヒト剖検脳組織を用いて BBB の異常が統合失調症の病態に関与する可能性について検証することを目的とした。

【方法】

統合失調症と対照群の PFC 及び視覚野 (VC) 組織を用いて、Cldn5, LAMA1, LAMA2, von Willebrand factor (VWF) mRNA の発現を real-time PCR 法により解析した。さらに免疫組織学的検討により、これらの分子のタンパク質レベルでの発現や局在・分布を定量的に解析した。また、統合失調症脳における血管径と血管密度の変化も評価した。

【結果と考察】

統合失調症 PFC において、脳内微小血管における Cldn5 の発現は mRNA レベルでは増加したがタンパク質レベルでは減少していた。LAMA1 と LAMA2 の発現には変化はみられなかった。申請者らはこれまでに、血管内皮細胞で cAMP の上昇が protein kinase A (PKA) 非依存的に Cldn5 mRNA を誘導する一方で、PKA 依存的に Cldn5 のリン酸化と分解を促進することを見出している。そこで、活性型 PKA 特異的抗体を用いて検討したところ、統合失調症 PFC の微小血管において PKA の活性化が Cldn5 の局所的な消失に一致して観察された。また Cldn5 の発現制御に関わる VWF の発現は mRNA・タンパク質いずれのレベルでも減少していた。血管密度・血管径には変化はみられなかった。以上から、統合失調症 PFC の BBB では Cldn5 タンパク質の部分的な消失がみられることが明らかとなり、cAMP-PKA 経路の過剰な活性化が Cldn5 の選択的な減少を引き起こしている可能性が示唆された。

【結論】

本研究では、統合失調症 PFC の微小血管における Cldn5 の選択的消失を明らかとし、その機序として cAMP-PKA 経路の関与が強く示唆された。Cldn5 の減少は BBB の部分的な破綻を招くことで統合失調症の病態に関与している可能性が示唆され、その分子機序の解明は新規治療標的の創出につながることを期待される。

序論

統合失調症は、約 1%という高い罹患率を示す代表的な精神障害である¹。統合失調症では脳の複数の部位が機能的・構造的に障害されることが想定されているが、なかでも背外側前頭前野は慢性期に強い萎縮を示し、統合失調症の病態に重要な役割を果たしていると考えられる^{2,3}。一方、統合失調症の最も強い遺伝要因として 22q11.2 の微小欠失が知られている⁴⁻⁶。Velocardiofacial 症候群や DiGeorge 症候群としても知られる 22q11.2 欠失症候群では、統合失調症罹患のリスクが 20 倍にも増加する⁷。このことから、22q11.2 に存在する約 90 個の遺伝子群の中に統合失調症の感受性遺伝子が存在していることが強く示唆される^{8,9}。また、統合失調症の発症には遺伝要因だけでなく、環境要因が複合的に関与すると考えられているが、その病態の分子生物学的背景の多くは未だ不明である¹⁰⁻¹²。

血液脳関門 (blood-brain barrier ; BBB) は、中枢神経組織と循環血液を隔て、細胞・分子・イオン等の移動を厳密に制御することによって脳を保護している。BBB の形成と維持には、よく発達したタイト結合を有する脳微小血管内皮細胞が最も重要であるが、周囲に存在する周皮細胞、アストロサイト足突起や血管基底膜も寄与している¹³⁻¹⁶。また、脳卒中や脳浮腫、てんかん、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病等多くの神経疾患で BBB の破綻がみられることが報告されている^{14,16-18}。

統合失調症においても近年、BBB 機能不全との関連が示唆されている^{19,20}。興味深いことに、血管内皮バリアを形成しているタイト結合の主要分子であるクローディン-5 (Claudin-5; Cldn5)^{21,22} の遺伝子座は、22q11.2 欠失領域に存在している^{8,9}。実際、Cldn5 は元々 Velocardiofacial 症候群で欠損している膜タンパク質として同定されたものである²³。さらに、Cldn5 遺伝子の 3'末端側非翻訳領域の一塩基多型が統合失調症に関連しているという報告もある^{24,25}。一方、アストロサイトが産生する血管基底膜構成分子 laminin $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ の遺伝子 (*LAMA1*, *LAMA2*)²⁶ にも、統合失調症において de novo 変異の存在が見いだされている^{27,28}。

Cldn はタイト結合ストランドを形成する能力を有し²⁹、タイト結合の構造・機能にとって必須の膜貫通分子である。Cldn ファミリーは 27 種類のメンバーからなり、このうち Cldn5 は BBB にとって必要不可欠である。事実、*Cldn5* 欠損マウスでは BBB における低分子物質 (800 Da 以下) の漏出がみられ、生後 10 時間以内に死亡する²²。申請者らのグループは以前、cAMP が protein kinase A (PKA) 非依存的に脳微小血管内皮細胞における Cldn5 の遺伝子発現を誘導することを報告した³⁰。また、Cldn5 の細胞質内 C 末端領域に位置する Thr207 が PKA によるリン酸化部位であること、この Thr207 リン酸化が低分子選択的な血管内皮バリアの破綻を惹起することも見いだしている³¹。

本研究では、1) ヒト脳組織における Cldn5, LAMA1, LAMA2 mRNA の発現量、2) 脳微小血管におけるこれらのタンパク質の免疫反応陽性領域、3) 脳微小血管の径と密度、4) 脳微小血管における PKA の活性領域と Cldn5 陽性シグナルとの関連に着目した。こ

れら 4 項目について、対照群と統合失調症群の前頭前野及び視覚野において比較した。また、BBB の透過性や統合失調症との関連が示唆されている von Willibrand factor (VWF)³²⁻³⁴ の mRNA とタンパク質の発現についても検討した。今回、統合失調症前頭前野の脳微小血管において Cldn5 の mRNA の誘導とタンパク質の発現減少が顕著にみられることを明らかにした。また、同部の脳微小血管における Cldn5 の限局した消失は、PKA シグナルの活性化と密接に関連していることを発見した。さらに、統合失調症前頭前野における Cldn5 制御のメカニズムについて考察する。

材料と方法

症例と脳組織

本研究で使用したヒト死後脳組織は、福島県立医科大学神経精神医学講座の福島ブレインバンク（対照群 2 例，統合失調症群 20 例）と新潟大学脳研究所（対照群 12 例，統合失調症群 1 例）から入手した。統合失調症群では，アメリカ精神医学会による診断基準（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV）を満たし，且つ他の神経疾患や薬物乱用の既往歴はないものを選定した。対照群としては，精神疾患や薬物乱用の既往歴のないものを選定し，年齢・性別・死後時間を統合失調症群と可能な限り一致させた（表 1）。全ての実験は，福島県立医科大学倫理委員会と新潟大学脳研究所の承認を受け，ヘルシンキ宣言を遵守して行なった。

試料は，ブロードマンの脳地図に従って BA10（前頭前野・前頭極）と BA17（一次視覚野）の 2 カ所から採取した。

表 1. 各実験で使用した症例情報

実験方法	症例	年齢 (歳)	性別		死後時間 (時間)
			男	女	
Real-time PCR	対照群 (n=12)	65.08±14.31	8	4	10.76±14.59
	統合失調症群 (n=20)	68.90±11.48	12	8	18.73±12.33
免疫組織化学染色	対照群 (n=12)	64.90±15.00	7	5	11.61±15.00
	統合失調症群 (n=7)	72.00±11.80	3	4	18.42±11.81
蛍光免疫染色	対照群 (n=4)	71.25±15.15	2	2	21.21±21.33
	統合失調症群 (n=5)	68.80±10.23	2	3	17.84±17.01

Real-time PCR

TRizol Reagent (インビトロジェン) を用いて凍結脳組織から全 RNA の抽出を行い，次いでメーカープロトコールに従い，RNA 1 µg からランダムプライマーを用いて cDNA の合成を行った (タカラ)。目的遺伝子の定量は，メーカープロトコールに従い SYBR Green 法 (Fast SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) を用いた real-time PCR (StepOne, Applied Biosystems) により行った。各群 3 回 Standard-curve 法での相対定量を行い，ハウスキーピング遺伝子 (GAPDH) の発現量により標準化した。本研究に用いた PCR プライマーの配列は以下の通りである。

Cldn5: product size 302 bp, Refseq; NM_001130861.1

Forward; 5'-CTGTTTCCATAGGCAGAGCG-3'

Reverse; 5'-AAGCAGATTCTTAGCCTTCC-3'

LAMA1: product size 71 bp, Refseq; NM_005559.3

Forward; 5'-CCCAGAGAACGCCATCCAAT-3'

Reverse; 5'-TGAATGCTGGGACTTTGCCA-3'

LAMA2: product size 236 bp, Refseq; NM_000426.3

Forward; 5'-TTTGACGGAACCGGTTTTGC-3'

Reverse; 5'-TCACACAAATGCCCTGGAAC-3'

VWF: product size 222 bp, Refseq; NM_000552.3

Forward; 5'-TTACGTGGGTGGGAACATGG-3'

Reverse; 5'-TCTGTGGTGA CTGTGCCATC-3'

GAPDH: product size 117 bp, Refseq; NM_002046.5

Forward; 5'-TTGTTGCCATCAATGACCCC-3'

Reverse; 5'-TGACAAGCTTCCCGTTCTCA-3'

免疫組織化学染色

パラフィンに包埋したホルマリン固定脳組織から切片 (3 μm 厚) を作製し, 脱パラフィン後, 0.3%過酸化水素水加メタノールで室温 20 分間処理し, 内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った. 抗原賦活化 (10 mM クエン酸塩緩衝液, pH6.0; VWF のみ 0.5%トリプシン/PBS (phosphate buffered saline) としてマイクロ・ウェーブ処理を 10 分間行った後, 5%スキムミルク (森永乳業) を溶解した PBS 溶液で室温 30 分間ブロッキングを行った. 次に 2%BSA (bovine serum albumin)/PBS に希釈した 1 次抗体と 4°C で一晩反応させた. 1 次抗体としては, ラビット抗 Cldn5 抗体 (1:200, 免疫生物研究所)³⁰, マウス抗 CD34 抗体 (1:100, ニチレイ), ラビット抗 VWF 抗体 (1:500, アブカム) を使用した. 次いで, ビオチン標識 2 次抗体 (ニチレイ) を室温 20 分間反応させ, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと室温 10 分間反応させた後, diaminobenzidine (和光純薬) により検出を行った. 対比染色としてはヘマトキシリン染色を行い, 封入した.

蛍光免疫染色

未固定凍結脳組織から切片 (20 μm 厚) を作製し, メタノール固定 (-20 °C, 10 分間) 後, 5%ロバ血清/2%BSA/PBS で室温 30 分ブロッキングした. 次に 2%BSA/PBS に希釈した 1 次抗体を 4°C で一晩反応させた. 1 次抗体としては, ラビット抗 laminin α 1 抗体 (1:1000, 大分大学 佐々木隆子先生より供与), ラビット抗 laminin α 2 抗体 (1:200, 大分大学 佐々木隆子先生より供与), マウス抗 CD34 抗体 (1:100, ニチレイ), ヤギ抗リン酸化 PKA 抗体 (1:500, サンタクルズ), マウス抗 Cldn5 抗体 (1:200, インビトロジェン) を使用した. 2 次抗体としては, ロバ抗ラビット IgG-Alexa fluor 488, ロバ抗ヤギ IgG-Alexa fluor 488, ロバ抗マウス IgG-Cy3 (インビトロジェン) を使用し, 室温で 1 時間反応させた. 最後に対比染色として DAPI による核染色を行い, 封入した.

染色像の定量解析

免疫組織化学染色像は光学顕微鏡 (OLYMPUS BX61) にて観察し, DP controller ソフトウェア (OLYMPUS) を用いて画像を取得した. CD34 と Cldn5 の染色像は, 連続切片を用いて可能な限り同じ箇所を撮影した. CD34 と Cldn5 の定量解析は BA10 及び BA17 領域の灰白質・白質から, VWF の解析は同領域の灰白質から, それぞれ 5 カ所の領域をランダムに選択して行なった (倍率 200 倍, 各 $440 \times 330 \mu\text{m}^2$). これらの画像について, DAB 染色像とヘマトキシリン染色像の分別を行った後に, DAB 染色領域の解析を行った. その後, ImageJ (ver. 1.49) を用いて画像の二値化を行い, それぞれの染色領域の占有率を算出した. また, CD34 染色像を用いた血管径の解析では, 各領域からランダムに 25 カ所を選択した.

蛍光免疫染色像は, 共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, オリンパス) を用いて観察と撮影を行った. 定量解析には, 各症例について BA10 及び BA17 領域の灰白質から, それぞれ 5 カ所の領域をランダムに選択した (倍率 200 倍, 各 $145,200 \mu\text{m}^2$). 次に免疫組織化学組織染色と同様に, ImageJ (ver. 1.49) を用いて画像の二値化を行い, それぞれの染色領域の占有率を算出した.

統計解析

本研究で用いた有意差検定は, ノンパラメトリックな統計学的検定のひとつである Mann-Whitney U 検定を各領域における対照群と統合失調症群間の 2 群間比較に用いた. また, $P < 0.05$ を有意差ありとした. 統計ソフトは IBM SPSS (ver. 21) を使用した.

結果

統合失調症前頭前野では Cldn5 mRNA の発現が増加している

はじめに、統合失調症において遺伝子変異が報告されている 3 種類の BBB 構成分子、すなわち Cldn5, LAMA1, LAMA2 について、mRNA 発現に変化がみられるかを real-time PCR 法により検討した (図 1). 解析領域としては、統合失調症病態に重要と考えられる前頭前野 (PFC), 対照部位となる後頭葉視覚野 (VC) を用いた. その結果、対照群と比べて統合失調症群 PFC では、Cldn5 mRNA の発現が平均値 2.09 倍・中央値 2.36 倍と有意に増加していた ($P < 0.05$). Cldn5 mRNA の発現は、VC では両群間に有意差は認められず、また PFC と VC 間の領域による差は両群ともにみられなかった. 一方 LAMA1 mRNA の発現は、統合失調症群 PFC で対照群に比べて平均値 3.75 倍・中央値は 2.2 倍であったが、両群間に統計学的有意差は認めなかった. それ以外は、LAMA1, LAMA2 とともに両群間・領域間で差はみられなかった.

統合失調症の前頭前野灰白質では Cldn5 タンパク質の発現が減少している

Cldn5 mRNA の発現が統合失調症の前頭前野で増加していたことから、次にタンパク質レベルでの発現についてパラフィン切片を用いた免疫組織化学染色により検討した (図 2a). 対照群 PFC 及び VC において、Cldn5 は脳内の微小血管に発現していることが確認された. 統合失調症群においても Cldn5 は微小血管に局限しており、局在や分布の変化はみられなかったが、PFC 灰白質において血管の染色性の低下や連続性の途絶が観察された (図 2a, 矢頭). そこで、Cldn5 発現を定量的に評価するため、各領域における Cldn5 陽性面積率を計測した (図 2b). 興味深いことに統合失調症 PFC 灰白質においては、Cldn5 陽性面積率が対照群に比して平均値で 31%, 中央値で 34%有意に減少していた ($P < 0.05$). 一方 VC 灰白質における Cldn5 陽性面積率は両群間で有意な変化を示さず、両群白質間ではいずれの領域でも差はみられなかった. また両群の PFC, VC のいずれにおいても、Cldn5 陽性面積率は灰白質で白質よりも有意に高い値を示したが、これは生理的な血管密度の違いを反映していると考えられた.

Laminin $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ タンパク質の発現は統合失調症において変化していない

次に laminin $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ タンパク質の発現について、凍結切片を用いた蛍光免疫染色により解析を行った. これらの laminin はいずれも脳内微小血管周囲に発現しており、その局在・分布・染色強度には統合失調症群・対照群間で違いを認めなかった (図 3a, c). 陽性面積率による検討でも、PFC, VZ のいずれにおいても両群間で有意差はみられなかった (図 3b, d). 以上の結果から、laminin $\alpha 1$ と laminin $\alpha 2$ の発現は mRNA レベルでもタンパク質レベルでも、統合失調症群と対照群の間に有意な違いがみられないことが示された.

脳微小血管の密度及び径は統合失調症で変化していない

統合失調症 PFC における Cldn5 陽性面積率の減少については、①統合失調症 PFC で血管量自体が減少している ② 血管量は変わらず Cldn5 の発現が選択的に減少している、の 2 つの可能性が考えられる。そこで、Cldn5 陽性面積率を計測した連続切片を用いて、血管内皮細胞マーカー CD34 免疫組織化学染色により血管密度と血管径の解析を行った (図 4a)。Cldn5 陽性面積率の結果と同様に、血管密度は両群の PFC、VC のいずれにおいても白質よりも灰白質で有意に高い値を示し ($P < 0.05$)、生理的な血管密度の違いを反映していると考えられた。一方、PFC 灰白質での血管密度には統合失調症群と対照群の間で有意な違いはみられなかった (図 4b)。また血管径は、両群いずれの領域間でも差はみられなかった (図 4c)。以上から、統合失調症 PFC における Cldn5 陽性面積率の減少は分子特異的な変化であることが示された。

統合失調症前頭前野の微小血管では PKA が活性化している

これまでの結果から、統合失調症 PFC における Cldn5 の発現については「mRNA 増加とタンパク質減少」という乖離がみられることが明らかとなった。申請者らは以前 血管内皮細胞における細胞内 cAMP の上昇が PKA 非依存的に Cldn5 mRNA 発現を誘導する一方で、PKA 依存的に Cldn5 タンパク質のリン酸化と分解を促進することを報告している³¹。そこで次に、PKA 触媒サブユニットのリン酸化特異抗体 (pPKA)³⁵ と Cldn5 の蛍光二重免疫染色により、統合失調症 PFC の微小血管において PKA の活性化が起こっていないかについて検討した。その結果、統合失調症 PFC では pPKA 陽性領域の増加が観察され、その多くが微小血管領域に一致することが分かった (図 5a)。興味深いことには、こうした pPKA 陽性微小血管では Cldn5 染色性の途絶・不連続化がみられ、しばしば両者の発現が逆相関するような像が観察された (図 5a, b)。統合失調症 VC ではこうした pPKA の増加は認められなかった (data not shown)。一方対照群 PFC では、pPKA 陽性領域はごく僅かに認められるのみで、その染色性も弱かった。

VWF の発現は統合失調症前頭前野で減少している

血管内皮で産生される VWF の分泌には cAMP/PKA シグナルが関わる事が知られ³⁶、統合失調症では血清中の VWF 濃度が上昇していることが報告されている³³。そこで、統合失調症脳における VWF の発現について real-time PCR 法及びパラフィン切片を用いた免疫組織化学染色により検討した。その結果、統合失調症 PFC において対照群に比して VWF mRNA の発現は平均値で 55%、中央値で 53%の有意な減少を示していた (図 6a)。VWF タンパク質は両群ともに、血管に局在していたが、統合失調群 PFC 灰白質において染色性の低下が観察された (図 6b)。陽性面積率の計測では、統合失調群 PFC 灰白質で対照群に比して平均値で 38%、中央値で 51%有意に減少していた (図 6c)。一方 VC では、VWF の mRNA 量や陽性面積率は両群間で有意な差を認めなかった。

考察

Cldn5 は BBB の形成と維持に必須であり、*Cldn5* 欠損マウスでは 800 Da 以下の小さな分子に対するバリア機能が著しく障害される²²。また、マウス微小血管内皮における Cldn5 の部分消失も BBB の機能不全と関連している³⁷。さらに様々なヒト神経疾患でも、脳微小血管における Cldn5 の発現減少と BBB 破綻が密接に関連していることが報告されている^{14,16-18}。このように、Cldn5 の発現は BBB の強固さを反映するものと考えられる。本研究では、脳微小血管における Cldn5 のタンパク発現が、対照群に比べ統合失調症群の PFC で有意かつ選択的に減少していることを見出した。Cldn5 陽性領域の減少は白質ではみられず、灰白質のみに認められた。対照的に VC では、両群の灰白質及び白質ともに Cldn5 の発現には差がみられなかった。以上のことから、統合失調症の PFC 灰白質では BBB の局所的な破綻が生じていることが強く示唆された。

興味深いことに、統合失調症 PFC の微小血管において pPKA 陽性領域の顕著な増加がみられ、この pPKA 陽性シグナルはしばしば Cldn5 染色性の消失に一致して観察された。申請者らはこれまでに、Cldn5 の C 末細胞内ドメインの Thr207 が PKA のリン酸化部位であることを見出した³⁰。次いで、野生型 Cldn5 または Thr207 を Ala に置換した変異 Cldn5 の発現を誘導できるラット肺血管内皮細胞株を樹立し、PKA による Thr207 のリン酸化が内皮細胞バリアのサイズ選択的な破綻を引き起こすことも明らかとした³¹。さらにその後、BBB 破綻における Cldn5 の Thr207 リン酸化の重要性は、ヒト免疫不全ウイルス脳炎でも報告された³⁸。こうしたことから、統合失調症 PFC の微小血管では PKA 活性の増強が Cldn5 の Thr207 リン酸化を介して Cldn5 の分解を惹起すると考えられた。

次に考察すべき点として、統合失調症 PFC における Cldn5 の mRNA とタンパク質の発現に乖離がみられたことが挙げられる。申請者らは以前に、脳微小血管内皮細胞において cAMP が PKA 依存的に Thr207 をリン酸化する一方、PKA 非依存的に Cldn5 mRNA の発現を誘導することを明らかにしている³⁰。上述したように、統合失調症 PFC の微小血管では cAMP-PKA 経路が活性化されているため、このシグナルによって mRNA とタンパク質の発現乖離が引き起こされていると考えられる。また申請者らは今回、統合失調症 PFC における VWF の発現が mRNA・タンパク質レベルで顕著に減少していることを明らかにした。様々な刺激によって活性化した血管内皮細胞は、アピカル（血管腔）側優位に VWF を分泌する³⁹。また cAMP/PKA シグナルは、活性化血管内皮細胞からの VWF 分泌を促進する経路の代表例として知られている³⁶。これらのことから、VWF mRNA の発現減少に加えて、基底膜側への分泌低下が血管内皮下の VWF 減少に関わっているかもしれない。血管内皮下の VWF は Cldn5 の発現を抑制することが知られていることから、統合失調症 PFC での VWF 発現の減少も Cldn5 mRNA の増加に関与している可能性がある。いずれにせよ、Cldn5 のリン酸化と分解が Cldn5 mRNA の発現亢進に勝ることで、両者が乖離し結果的に Cldn5 タンパク質の減少が引き起こされているのではないかと考えている。

統合失調症脳におけるドーパミン合成は、領域特異的に変化していることが示唆されて

いる⁴⁰⁻⁴²。統合失調症の皮質下領域ではドーパミン産生が過剰で、これがいわゆる陽性症状に関与すると考えられている。一方統合失調症 PFC 領域では、ドーパミン放出の低下がみられ、陰性症状や認知障害にとの関連が示唆されている。また強調すべき点として、脳皮質微小血管の近傍にはドーパミン作動性ニューロンの終末が豊富に存在していることが挙げられる⁴³。ドーパミン受容体には D1 タイプ (D1 と D5)、D2 タイプ (D2, D3, D4) があり、前者は cAMP-PKA 経路を促進し後者は抑制する^{44,45}。興味深いことに、D2 レセプターは種々の臓器の血管内皮細胞で発現しており⁴⁶⁻⁴⁸、ドーパミンは D2 レセプターを介して内皮細胞の透過性を抑制していると考えられる^{47,49}。一方、D1 タイプのレセプターは血管中膜には発現するが、内皮細胞にはないとされている⁵⁰。以上のことから、統合失調症 PFC におけるドーパミン放出の低下により、微小血管内皮細胞における「D2 系レセプターを介した cAMP-PKA 経路の抑制」が解除される結果、Cldn5 のリン酸化と分解が惹起されるのではないかと推測している。この仮説は今後の研究で証明すべきであるが、もしドーパミンが微小血管内皮細胞の D2 系レセプターを介して BBB の維持に寄与しているならば、D2 レセプターをターゲットとした抗精神病薬の BBB への影響についても考慮していく必要がある。また、ドーパミンをはじめとする様々な神経伝達物質による BBB 制御や、その破綻と神経障害との関わりについて検討することも興味深いであろう。

統合失調症脳の前帯状皮質 (PFC) と視床 (VC) では内皮下基底膜の肥厚と形態異常がみられることから^{51,52}、ECM タンパク質はこれらの部位において量的・質的に変化していると考えられる。本研究では laminin $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ に着目したが、統合失調症脳において mRNA レベルでもタンパク質レベルでも有意な変化はみられなかった。したがって統合失調症脳における基底膜の変化には、他の ECM タンパク質が関与しているのかもしれない。また、統合失調症 PFC と VC の両方で血管の密度や径には変化がみられなかった。この結果はこれまでの報告^{52,53} に合致したものであり、統合失調症脳の血管構築自体には光学顕微鏡レベルで大きな変化はないという考えを更に支持するものであった。

統合失調症では PFC 灰白質の微小血管選択的に、Cldn5 の部分消失すなわち BBB の局所破綻が生じていることを明らかにした。その分子メカニズムとして、脳領域特異的な PKA 活性の異常亢進が Cldn5 の翻訳後修飾 (リン酸化) と分解を引き起こすものと考えられた。これらの知見は統合失調症の病態に従来の視点を加えるものであり、新たな治療法の開発に寄与することが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官として終始懇篤な御指導、御助言を賜りました福島県立医科大学基礎病理学講座、千葉英樹教授に深厚なる誠意を表します。また、実験計画から実験方法に至るまで懇切丁寧に御指導、御助言頂きました、井村徹也准教授、富川直樹講師、柏木維人助教、田中瑞子助教、杉本幸太郎先生、穂積あゆみ主任医療技師、三浦富子主任医療技師に深く感謝いたします。さらに、本研究遂行のために共同研究として様々なご指導、試料提供を頂きました本学医学部神経精神科の矢部博興教授をはじめ諸先生方、新潟大学脳研究所の高橋均教授、柿田明美教授に深く感謝いたします。また、統合失調症の病態解明のため貴重な組織の提供に同意して下さいました患者様およびご遺族に深く感謝すると共に、心よりご冥福をお祈りいたします。最後に、日々共に実験し楽しく励まし合い大学院生活を支えてくれた大学院生、MD-PhD の学生の皆様に感謝いたします。

追記

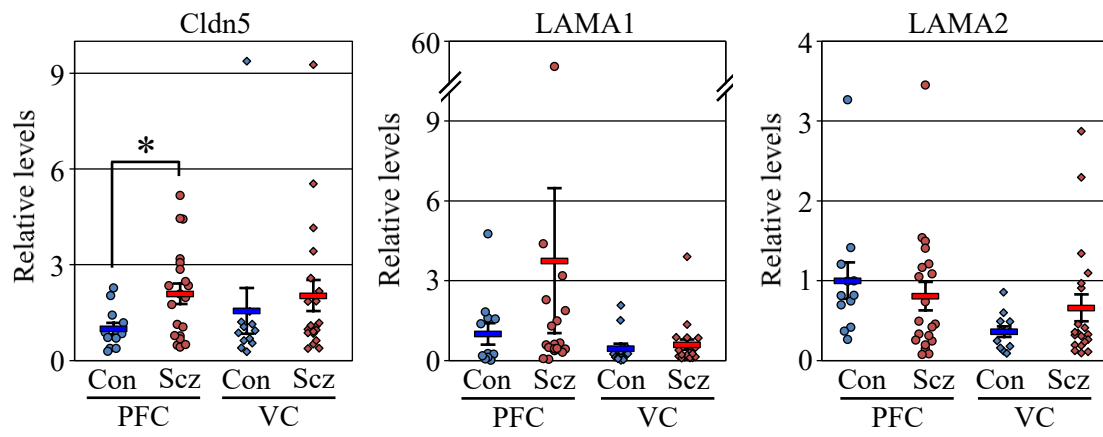
本学位論文は修正の上、2017年10月16日付で *Oncotarget* 誌に原著論文として発表した。
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.21850>

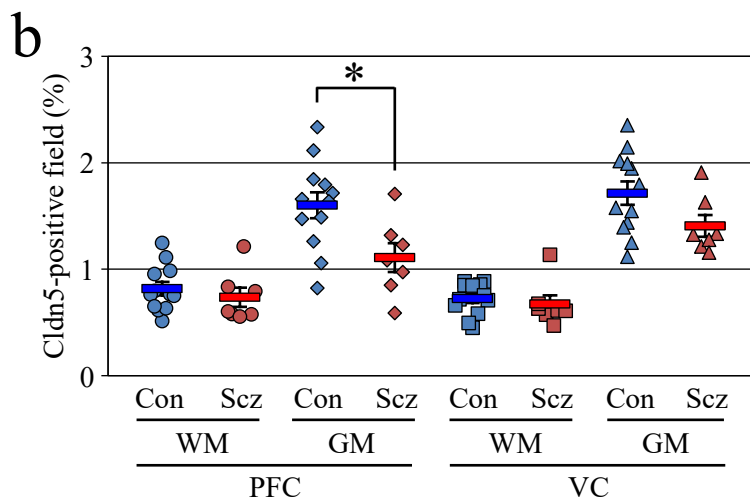
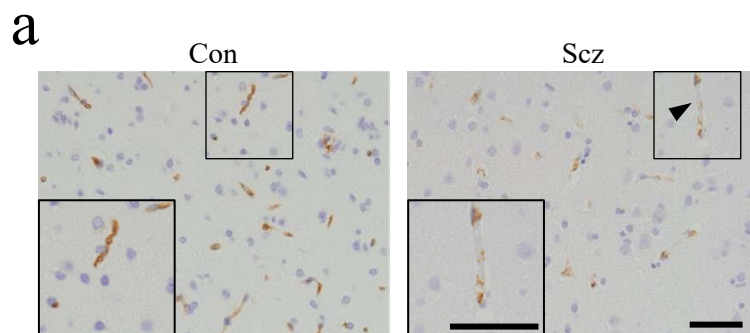
参考文献

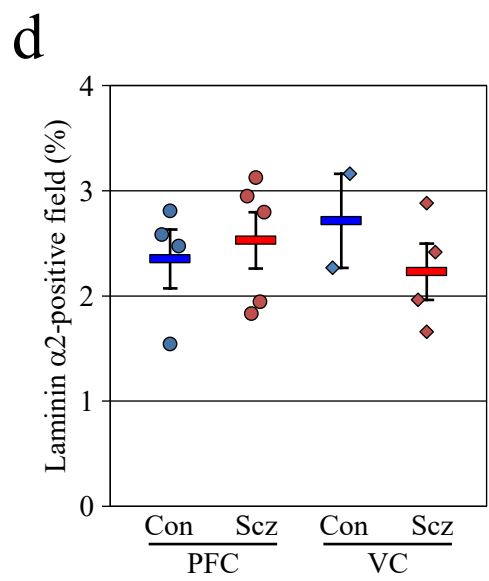
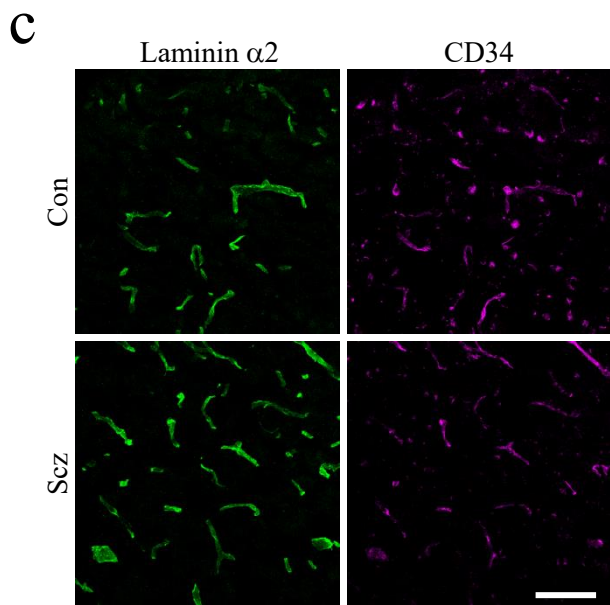
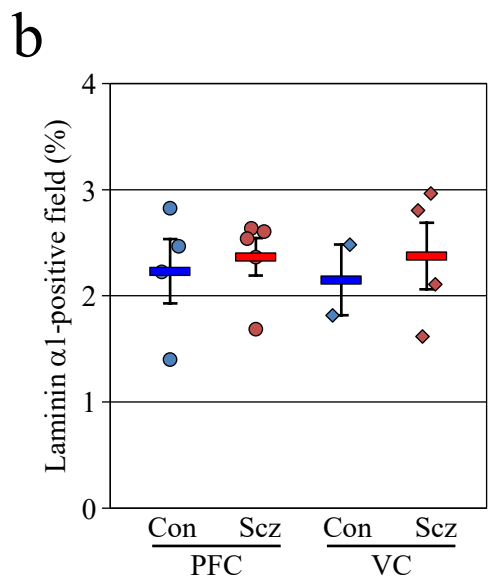
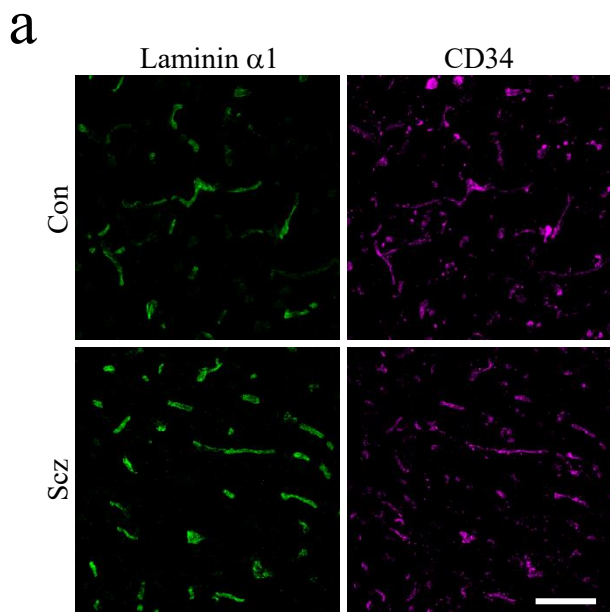
1. Gottesman II. Schizophrenia, the epigenetic puzzle: Cambridge University Press; 1982.
2. Ellison-Wright I, Glahn DC, Laird AR, Thelen SM, Bullmore E. The anatomy of first-episode and chronic schizophrenia: an anatomical likelihood estimation meta-analysis. *The American journal of psychiatry* 2008;165:1015-23.
3. Meyer-Lindenberg A. From maps to mechanisms through neuroimaging of schizophrenia. *Nature* 2010;468:194-202.
4. Karayiorgou M, Morris MA, Morrow B, et al. Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:7612-6.
5. Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Archives of general psychiatry* 1999;56:940-5.
6. Xu J, Fan YS, Siu VM. A child with features of Goldenhar syndrome and a novel 1.12 Mb deletion in 22q11.2 by cytogenetics and oligonucleotide array CGH: is this a candidate region for the syndrome? *Am J Med Genet A* 2008;146A:1886-9.
7. Bassett AS, Costain G, Fung WL, et al. Clinically detectable copy number variations in a Canadian catchment population of schizophrenia. *Journal of psychiatric research* 2010;44:1005-9.
8. Karayiorgou M, Simon TJ, Gogos JA. 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nature reviews Neuroscience* 2010;11:402-16.
9. Guna A, Butcher NJ, Bassett AS. Comparative mapping of the 22q11.2 deletion region and the potential of simple model organisms. *J Neurodev Disord* 2015;7:18.
10. Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature* 2010;468:187-93.
11. van Os J, Kenis G, Rutten BP. The environment and schizophrenia. *Nature* 2010;468:203-12.
12. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics C. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 2014;511:421-7.
13. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature neuroscience* 2011;14:1398-405.
14. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Annals of neurology* 2012;72:648-72.
15. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 2013;61:1939-58.
16. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine* 2013;19:1584-96.
17. Schoknecht K, DY, Heinemann U. The blood-brain barrier-gatekeeper to neuronal homeostasis: clinical implications in the setting of stroke. *Semin Cell Dev Biol* 2015;38:35-42.
18. Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E. Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. *Epilepsy & behavior : E&B* 2015;49:13-6.
19. Hanson DR, Gottesman, II. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC Med Genet* 2005;6:7.
20. Schoknecht K, David Y, Heinemann U. The blood-brain barrier-gatekeeper to neuronal homeostasis: clinical implications in the setting of stroke. *Seminars in cell & developmental biology* 2015;38:35-42.
21. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:511-6.
22. Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology* 2003;161:653-60.
23. Sirotkin H, O'Donnell H, DasGupta R, et al. Identification of a new human catenin gene family member (ARVCF) from the region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics* 1997;41:75-83.
24. Omidinia E, Mashayekhi Mazar F, Shahamati P, Kianmehr A, Shahbaz Mohammadi H. Polymorphism of the CLDN5 gene and Schizophrenia in an Iranian Population. *Iran J Public Health* 2014;43:79-83.
25. Sun ZY, Wei J, Xie L, et al. The CLDN5 locus may be involved in the vulnerability to schizophrenia. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 2004;19:354-7.
26. Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in

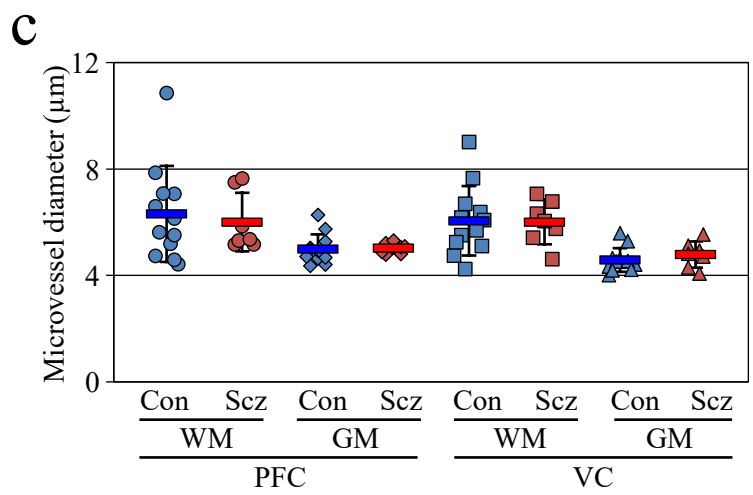
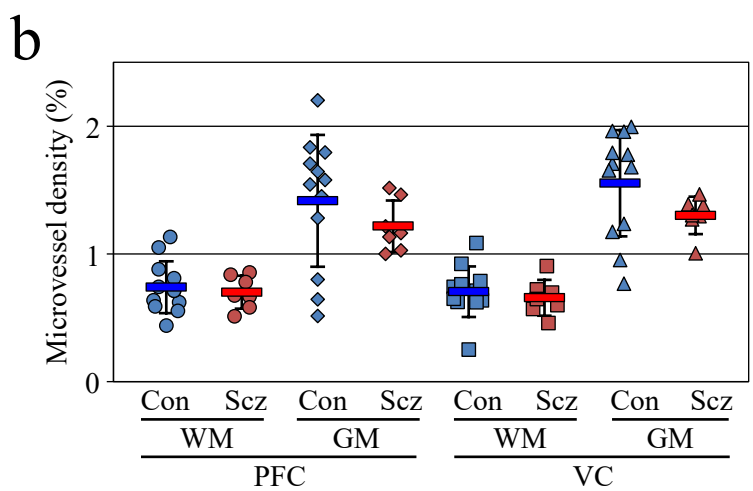
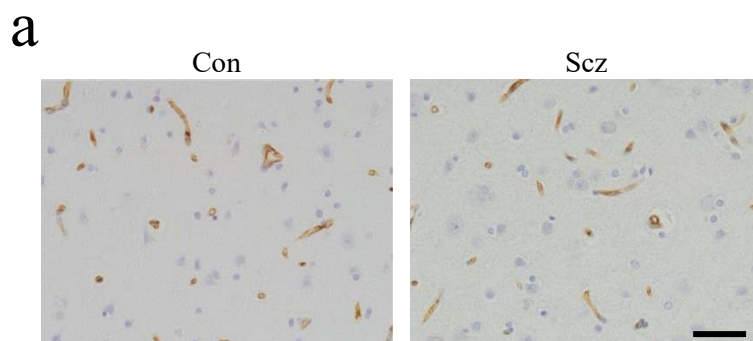
- experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of cell biology* 2001;153:933-46.
27. Girard SL, Gauthier J, Noreau A, et al. Increased exonic de novo mutation rate in individuals with schizophrenia. *Nature genetics* 2011;43:860-3.
 28. Xu B, Ionita-Laza I, Roos JL, et al. De novo gene mutations highlight patterns of genetic and neural complexity in schizophrenia. *Nature genetics* 2012;44:1365-9.
 29. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of cell biology* 1998;141:1539-50.
 30. Ishizaki T, Chiba H, Kojima T, et al. Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Experimental cell research* 2003;290:275-88.
 31. Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, et al. Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Experimental cell research* 2004;300:202-12.
 32. Noubade R, del Rio R, McElvany B, et al. von-Willebrand factor influences blood brain barrier permeability and brain inflammation in experimental allergic encephalomyelitis. *The American journal of pathology* 2008;173:892-900.
 33. Hope S, Melle I, Aukrust P, et al. Similar immune profile in bipolar disorder and schizophrenia: selective increase in soluble tumor necrosis factor receptor I and von Willebrand factor. *Bipolar disorders* 2009;11:726-34.
 34. Suidan GL, Brill A, De Meyer SF, et al. Endothelial Von Willebrand factor promotes blood-brain barrier flexibility and provides protection from hypoxia and seizures in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013;33:2112-20.
 35. Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012;13:646-58.
 36. Brandherm I, Disse J, Zeuschner D, Gerke V. cAMP-induced secretion of endothelial von Willebrand factor is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation switch in annexin A2. *Blood* 2013;122:1042-51.
 37. Zhou Y, Wang Y, Tischfield M, et al. Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *The Journal of clinical investigation* 2014;124:3825-46.
 38. Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, et al. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *The American journal of pathology* 2008;172:521-33.
 39. van Buul-Wortelboer MF, Brinkman HJ, Reinders JH, van Aken WG, van Mourik JA. Polar secretion of von Willebrand factor by endothelial cells. *Biochimica et biophysica acta* 1989;1011:129-33.
 40. Thaker GK, Carpenter WT, Jr. Advances in schizophrenia. *Nature medicine* 2001;7:667-71.
 41. Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nature medicine* 2006;12:1016-22.
 42. Slifstein M, van de Giessen E, Van Snellenberg J, et al. Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia: a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. *JAMA psychiatry* 2015;72:316-24.
 43. Krimer LS, Muly EC, 3rd, Williams GV, Goldman-Rakic PS. Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation. *Nature neuroscience* 1998;1:286-9.
 44. Bonci A, Hopf FW. The dopamine D2 receptor: new surprises from an old friend. *Neuron* 2005;47:335-8.
 45. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 2011;63:182-217.
 46. Ricci A, Collier WL, Amenta F. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the portal vein. *Journal of autonomic pharmacology* 1994;14:61-8.
 47. Basu S, Nagy JA, Pal S, et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nature medicine* 2001;7:569-74.
 48. Chakroborty D, Sarkar C, Yu H, et al. Dopamine stabilizes tumor blood vessels by up-regulating angiopoietin 1 expression in pericytes and Kruppel-like factor-2 expression in tumor endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:20730-5.
 49. Vohra PK, Hoepfner LH, Sagar G, et al. Dopamine inhibits pulmonary edema through the VEGF-VEGFR2 axis in a murine model of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302:L185-92.
 50. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* 1998;78:189-225.

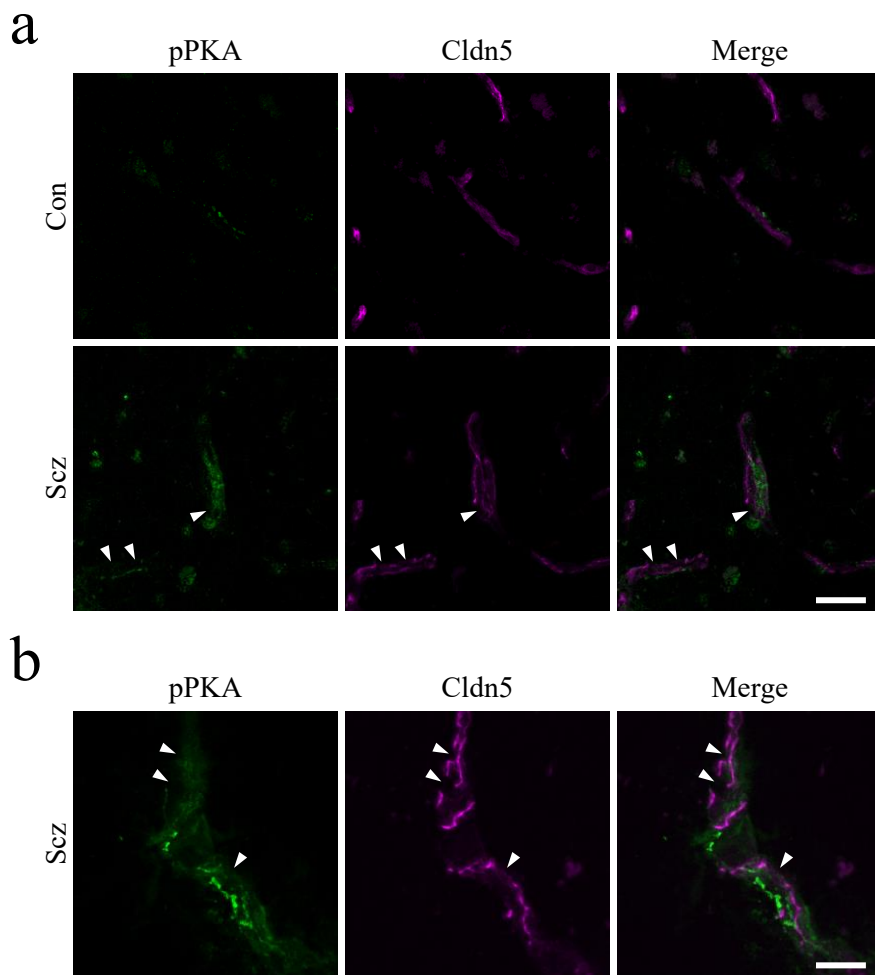
51. Kim MO, Koh PO, Kim JH, et al. Localization of dopamine D1 and D2 receptor mRNAs in the rat systemic and pulmonary vasculatures. *Molecules and cells* 1999;9:417-21.
52. Uranova NA, Zimina IS, Vikhrevva OV, Krukov NO, Rachmanova VI, Orlovskaya DD. Ultrastructural damage of capillaries in the neocortex in schizophrenia. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 2010;11:567-78.
53. Kreczmanski P, Schmidt-Kastner R, Heinsen H, Steinbusch HW, Hof PR, Schmitz C. Stereological studies of capillary length density in the frontal cortex of schizophrenics. *Acta neuropathologica* 2005;109:510-8.

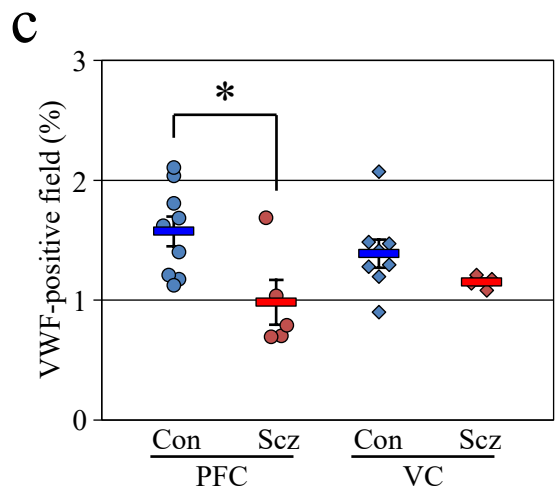
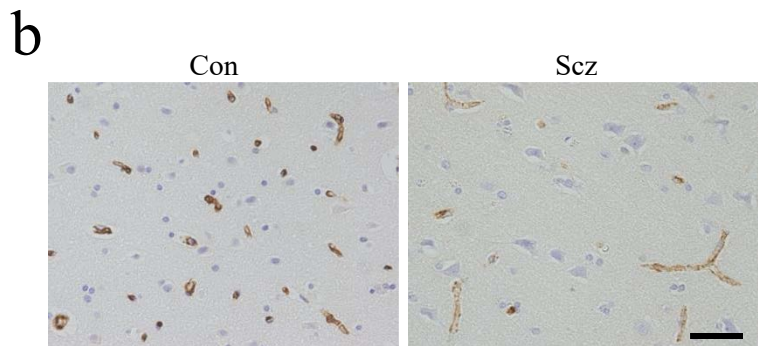
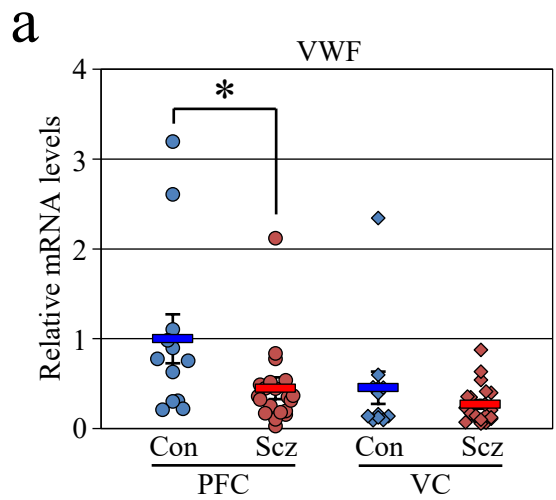












図の説明

図 1. 統合失調症前頭前野における Cldn5 mRNA の発現亢進

Cldn5, LAMA1, LAMA2 mRNA 発現は, real-time PCR 法によって解析した. データは個別値のプロット及び平均±標準誤差 (対照群 n=12, 統合失調症群 n=20) を表し, 各プロットは対照群前頭前野の平均値を 1 とした相対値を示している. Con; 対照群, Scz; 統合失調症群, PFC; 前頭前野, VC; 視角野. * $P < 0.05$.

図 2. 統合失調症前頭前野における Cldn5 タンパク質の発現低下

(a) 対照群及び統合失調症群の PFC 灰白質における Cldn5 免疫組織化学染色像. Cldn5 は両群で微小血管に局在するが, 統合失調症で染色性の低下が明らかであり, 連続性の途絶 (矢頭) が観察された. インセットは黒線で囲った拡大図.

(b) Cldn5 免疫組織化学染色の陽性面積率. PFC 灰白質における Cldn5 陽性面積率は統合失調症群で対照群に比して有意の減少がみられる. データは個別値のプロット及び平均±標準誤差 (対照群 n=10, 統合失調症群 n=7) を表している. バーの長さ; 50 μm . GM; 灰白質, WM; 白質. * $P < 0.05$.

図 3. 統合失調症脳における laminin $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ タンパク質の発現に変化はみられない

(a) 対照群と統合失調症群の PFC 灰白質における laminin $\alpha 1$ (緑) と CD34 (マゼンタ) の蛍光免疫染色像. laminin $\alpha 1$ 発現は CD34 陽性血管に一致してみられる.

(b) PFC 及び VC 灰白質における laminin $\alpha 1$ 蛍光免疫染色の陽性面積率.

(c) 対照群と統合失調症群の PFC 灰白質における laminin $\alpha 2$ (緑) と CD34 (マゼンタ) の蛍光免疫染色像. laminin $\alpha 2$ 発現は CD34 陽性血管に一致してみられる.

(d) PFC 及び VC 灰白質における laminin $\alpha 2$ 蛍光免疫染色の陽性面積率.

データは個別値のプロット及び平均±標準誤差 (対照群: PFC n=4, VC n=2; 統合失調症群: PFC n=5, VC n=4) を表している. バーの長さ (a, c); 100 μm .

図 4. 統合失調症脳における血管密度と血管径に変化はみられない

(a) 対照群と統合失調症群の PFC 灰白質における CD34 の免疫組織化学染色像.

(b) CD34 陽性面積率 (血管密度) の解析.

(c) CD34 陽性血管径の解析.

データは個別値のプロット及び平均±標準誤差 (対照群 n=10, 統合失調症群 n=7) を表す. バーの長さ(a); 50 μm .

図 5. 統合失調症前頭前野の微小血管における PKA の活性化

対照群と統合失調症群の PFC 灰白質における pPKA (緑) と Cldn5 (マゼンタ) の蛍光免疫

染色像.

(a) 統合失調症群では微小血管に一致して pPKA 染色性の顕著な増加がみられ, pPKA 陽性血管では Cldn5 の連続性が途絶している (矢頭). バーの長さ; 30 μm .

(b) pPKA 陽性血管では Cldn5 の発現が不連続化している (矢頭). バーの長さ; 10 μm .

図 6. 統合失調症前頭前野における VWF の発現低下

(a) 統合失調症及び対照群における VWF mRNA 発現は real-time PCR 法によって解析した. データは個別値のプロット及び平均 \pm 標準誤差 (対照群 n=12, 統合失調症群 n=20) を表し, 各プロットは対照群前頭前野の平均値を 1 とした相対値を示している.

(b) 対照群, 統合失調症群 PFC 灰白質における VWF 免疫組織化学染色像. いずれの群においても VWF は微小血管に局在するが, 統合失調症で染色性の低下がみられる.

(c) VWF 免疫組織化学染色の陽性面積率.

データは個別値のプロット及び平均 \pm 標準誤差 (対照群 n=10, 統合失調症群 n=7) を表している. バーの長さ; (b) 50 μm . * $P < 0.05$.