

特集 2 精神疾患と早期ライフステージイベントの関連

3. 核内受容体 PPAR α に着目した統合失調症病態メカニズムの解明

前川 素子*, 和田 唯奈*

抄録：統合失調症の発症メカニズムについては、脳の発達期におけるさまざまな侵襲が発症脆弱性形成の基盤になる「神経発達障害仮説」が知られている。筆者らは特に、「妊娠中の母親が飢餓にさらされると、子どもの将来の統合失調症発症率が約 2 倍に高まる」という大規模疫学事象に着目し、脳発達期の栄養欠乏が成長後の統合失調症発症リスクに影響する可能性について解析を進めてきた。筆者らが、脳発達期栄養欠乏を模倣するモデルマウスを作製して解析したところ、脳発達期栄養欠乏マウスは、統合失調症様の表現型を示すこと、その上流には多価不飽和脂肪酸をリガンドとする核内受容体 RXR α , PPAR α が働いている可能性を見いだした。さらに、ヒトおよびマウスを対象に解析を行い、核内受容体 PPAR α の機能不全が統合失調症の発症リスクに関わる可能性、核内受容体 PPAR α が統合失調症の新しい治療ターゲットになる可能性を見いだした。

日本生物学的精神医学会誌 32 (3) : 144-148, 2021

Key words : neurodevelopmental hypothesis, polyunsaturated fatty acid, PPAR α , spine, fenofibrate

はじめに

統合失調症の有力な病因仮説として、「脳発達期の微細な神経発達障害が、将来的に統合失調症の脆弱性基盤を形成する」という神経発達障害仮説が知られている²⁾。また、妊娠中の母親が飢餓にさらされると、子どもの将来の統合失調症発症率が約 2 倍に高まるという 2 つの大規模疫学的事象から^{3, 4)}、脳発達期の低栄養が神経発達障害を引き起こす要因の一つと考えられている。さらに、多価不飽和脂肪酸の経口摂取が脳の発達や統合失調症の症状改善に一定の効果があるという報告がある。これらの事実から、筆者らは、栄養素の中でも特に「多価不飽和脂肪酸」に注目して、発達期の低栄養と成長後の精神疾患関連行動の関係性について研究を開始した。筆者らは、妊娠中の母親の飢餓を模倣するモデルとして、脳発達期に多価不飽和脂肪酸欠乏状態を経験させた動物「栄養学的統合失調症モデル動物」を作製して検討した。その結果、この動物は、統合失調症様の行動表現型を示すこと、脳内において統合失調症と同様の神経活性変化が起きること、統合失調

症の死後脳でみられるのと同様の遺伝子発現変化が起きること、上流因子として核内受容体遺伝子 *Rxra*, *Ppara* の産物であるレチノイド X 受容体 (retinoid X receptor alpha : RXR α)、ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター (peroxisome proliferator activated receptor : PPAR) α が働いている可能性があることを見いだした¹⁾。

これらの知見をもとに、筆者らは「核内受容体 RXR/PPAR の機能不全が、統合失調症病態メカニズムに関わる」という仮説を立てた。実際にヒトでこのような可能性があるか検討するため、統合失調症患者 1,200 人のゲノムデオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid : DNA) を用いて、PPAR, RXR 遺伝子の機能喪失型変異を探索した。その結果、23 の非同義置換を伴う一塩基置換変異と 1 つのスプライスアクセプターサイト変異 (PPARA c.209-2delA) を同定した。比較対照として、東北メディカル・メガバンク機構 (Tohoku Medical Megabank organization : ToMMo ; <https://ijgvd.megabank.tohoku.ac.jp/>) で公開している一般人口 3,554 人の全ゲノム解析の情報 (ToMMo 3.5KJPN) を利用し

Potential roles of PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) in the pathogenesis of schizophrenia

* 国立研究開発法人理化学研究所脳神経科学研究センター 分子精神遺伝研究チーム (〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1) Motoko Maekawa, Yuina Wada : Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Center for Brain Science, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

【前川 素子 E-mail : motoko.maekawa@riken.jp】

で同様の解析を実施し、49 のミスセンス変異を検出した。検出した変異については、①統合失調症群と対照群の両者で検出される変異 (4 変異)、②統合失調症群でのみ検出される変異 (20 変異)、③対照群でのみ検出される変異 (45 変異)、に分類した。①の 4 変異は、マイナーアリル頻度 (minor allele frequency : MAF) が 0.1% 以上の common variants で、統合失調症群と対照群の間で出現頻度の偏りはみられなかった。②、③の変異はすべて MAF < 0.1% の rare variants であった。これらの変異についてタンパク質機能予測を行い、遺伝子ごとに統合失調症群と対照群の間での有害な対立遺伝子の出現頻度を比較した結果、PPARA 遺伝子で有害な対立遺伝子の出現頻度が高いことを見いだした。そこで、筆者らは特に統合失調症で同定した PPARA 遺伝子の 4 変異 (c.209-2delA, His117Gln, Arg141Cys, Arg226Trp) に着目して、表現型への影響を調べることにした。

PPARA c.209-2delA 変異は、intron 3 のスプライスアクセプターサイトのコンセンサス配列中に位置するため、スプライシングが正常に行われず、exon 4 スキップが起きるのではないかと予測した。そこで、c.209-2delA 変異をもつ該当統合失調症患者 1 名の毛根細胞から RNA を抽出し、reverse transcription RCR (RT-PCR) により exon 3 から exon 5 までの領域を増幅し、対照被験者 3 名の結果と比較したところ、当該患者のサンプルでのみ正常 mRNA から予測されるものより短い増幅産物を認めた。この産物を直接シーケンシングし、この変異をもつ患者では exon 4 がスキップすることを確認した。exon 4 スキップによる影響として、mRNA に未成熟終止コドン (premature termination codon : PTC) が形成されることにより DNA binding domain (DBD) と ligand binding domain (LBD) を欠く機能不全型のタンパク質が生成される、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay : NMD) により変異転写産物の分解が起きる、などのメカニズムにより PPAR α の機能低下につながる可能性が考えられた。

次に、ミスセンス変異 PPAR α His117Gln, Arg141Cys, Arg226Trp の影響を調べた。まず、生物種間の保存状況について調べたところ、PPAR α His117, Arg141, Arg226 は脊椎動物間で高度に保存されていた。また、タンパク質構造中での位置について調べたところ、His117 および Arg141 は、DBD の zinc finger モチーフ上に位置しているため、これらの変異は

PPAR α と DNA との結合に影響を与えると予測された。Arg226 は、RXR α の Glu203 との間に塩橋を形成しているため、変異によって Arg226 の正電荷が失われることにより、PPAR α /RXR ヘテロダイマーの構造的不安定化に影響する可能性が考えられた。実際に、転写因子としての機能を評価するため、CV-1 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、野生型と比較して、His117Gln 変異体で約 3 割、Arg141Cys 変異体で約 4 割、Arg226Trp 変異体で約 5 割、レポーター活性が低下していた。上記より、PPAR α His117Gln, Arg141Cys, Arg226Trp の 3 変異は、転写因子としての活性低下をもたらすことが明らかになった。これらの結果から、統合失調症で同定した PPARA 遺伝子の 4 変異は PPAR α の機能を減弱させる変異であり、統合失調症の病態と関連している可能性が考えられた。

次に、PPAR α の機能不全が統合失調症病態形成につながる可能性について、個体レベルで明らかにするため、近交系 B6J マウスを用いて *Ppara* 全身性ノックアウトマウス (knockout mouse : KO マウス) を作製して表現型の解析を行った。統合失調症患者において感覚運動ゲーティング機能が減弱することに着目し、プレパルス抑制 (prepulse inhibition : PPI) 試験を実施したところ、*Ppara* KO マウスで PPI の低下を認めた。また、不安様行動の有無を評価するためマーブル埋め試験を実施したところ、KO マウスでは wide-type (WT) マウスよりも埋められたマーブルの数が有意に多いことが明らかになった。これらの変化は、統合失調症類似の行動表現型といえる。統合失調症死後脳では大脳皮質におけるスパイン密度の低下が報告されている。そこで、KO マウスの大脳皮質の錐体細胞のスパイン解析を行ったところ、KO マウスでは、WT マウスに比べてスパイン密度が有意に低かった。この結果から、KO マウスは組織学的にも統合失調症類似の表現型を示すと考えられた。

ここまでの解析で、PPAR α の機能不全が統合失調症病態形成につながる可能性が示された (表 1)。これらの結果を踏まえ、筆者らは、PPAR α を活性化することができれば統合失調症の予防や治療に役立つ可能性があるのではないかと考えた。この可能性について検討するため、筆者らはまず、薬理的な統合失調症モデルマウスとして、phencyclidine (PCP) 投与マウスを作製し、内側前頭前野 (medial prefrontal cortex : mDFC) のスパイン密度が有意に減少すること、成熟スパイン (特に Mushroom 型スパイン) の減少と未成熟スパイン (特に

表1 PPAR α の機能不全と統合失調症病態との関連に関する解析

解析内容	解析結果	
PPARA遺伝子変異	c.209-2delA	・ exon 4スキッピング
	His117Gln	・ 転写活性化能の低下
	Arg141Cys	
	Arg226Trp	
Ppara KOマウス	行動試験	・ PPI*の低下 ・ マーブル埋め数の増加
	スパイン形態の解析 (内側前頭前野)	・ スパイン密度の低下 ・ 成熟スパイン割合の低下 (特にMushroom型)

*PPI : prepulse inhibition
(文献5をもとに作成)

表2 薬理的な統合失調症モデルマウスに対するフェノフィブラートの効果の検討

モデル動物	薬剤投与期間 投与期間	フェノフィブラート	解析内容	解析結果
PCP* 投与マウス	2週間 (6週齢~8週齢)	4週間 (8週齢~12週齢)	スパイン形態の解析 (内側前頭前野)	成熟スパイン (特にMushroom型)の 割合の低下を抑制
MK-801 投与マウス	単回投与	単回投与前2週間 (7週齢~9週齢)	MK-801に対する感受性を 調べるための活動性試験	MK-801投与による 自発活動量の亢進を抑制

*PCP : phenacyclidine
(文献5をもとに作成)

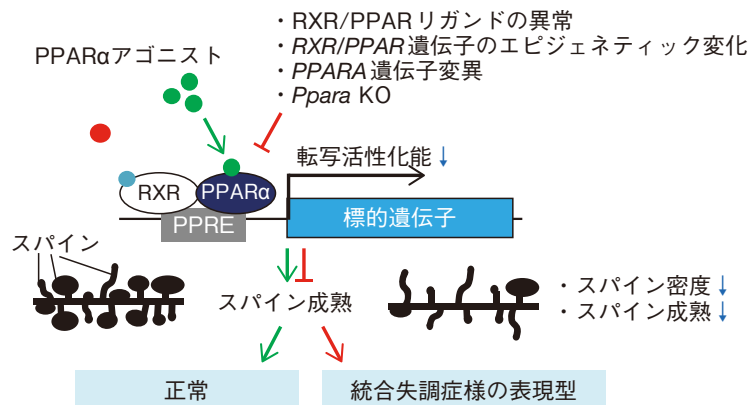


図1 PPAR α の機能不全と統合失調症病態形成に関する仮説
遺伝子変異や環境要因によるエピジェネティックな影響、リガンドの変動などによりPPAR α の機能不全が起こりうる。PPAR α の機能不全は、スパイン密度、スパイン成熟の低下を引き起こすことにより、マウスにおける統合失調症様の表現型と関連する可能性がある。(文献5をもとに作成)

Filopodia型)の増加が認められることを確認した。PCP投与マウスに対してPPAR α アゴニストのフェノフィブラートを慢性投与したところ、成熟スパイン(特にMushroom型スパイン)の割合の減少が抑えられた。ただし、PCPによるスパイン密度の減少は阻止できなかった。次に、N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体阻害薬ジゾシルピン(dizocilpine : MK-801)の急性単回投与による自発

運動の誘発に対するフェノフィブラートの効果を検討した。B6Jマウスに対してフェノフィブラートを経口で2週間投与し、フェノフィブラート最終投与の24時間後、MK-801(0.15 mg/kg)を皮下注射した結果、フェノフィブラートの事前投与群では、MK-801による自発活動量の亢進反応が有意に抑制された。これらの結果は、PPAR α が統合失調症の治療標的分子になり得ることを示している⁵⁾(表2)。

おわりに

本研究は、これまで栄養学の域を出なかった統合失調症病態メカニズムと低栄養の関連について、核内受容体 PPAR α という分子が介在する可能性を示した (図 1)。また、統合失調症の治療薬開発において、これまではドパミン受容体遮断薬しか候補が存在しなかったが、今回新たに PPAR α アゴニストが治療薬になり得る可能性を提示した (図 1)。一方で、本研究にはいくつかの課題が残されている。まず、PPAR α アゴニストを実際に治療薬として用いる場合、副作用の影響が懸念される。本研究でマウスに投与したフェノフィブラートの用量は、体重により標準化すると、ヒトに投与される用量 (高脂血症の患者には、通常 106.6-160 mg/day のフェノフィブラートが投与される) の約 20 倍に相当する。そのため、長期投与が想定される精神疾患への臨床応用を検討する際には、より慎重な検討が必要となる。もう 1 点は、PPAR α アゴニストの直接標的がどの組織であるかが不明な点である。PPAR α は脳で発現していることから脳が直接の標的になる可能性を想定しているが、発現量は肝臓や骨格筋、消化管などでより高い。そのため、PPAR α アゴニストが脳以外の組織に作用し、間接的に脳が影響を受けた可能性も否定できない。今後、組織特異的 (脳や肝細胞など) *Ppara* conditional KO マウスの解析などを行い、薬剤の標的組織や PPAR α が介在する統合失調症の病態形成メカニズムの一端を明らかにし

たいと考えている。

開示すべき利益相反は存在しない。

本論文に記載した筆者らの研究は、理化学研究所和光研究所の研究倫理第一委員会および第三委員会 (和光第一 15-3 47, Wako3 2020-09)、動物実験委員会 (W2019-2-044)、遺伝子組み換え委員会 (承 2019-030 2)、で承認されている。

文 献

- 1) Maekawa M, Watanabe A, Iwayama Y, et al (2017) Polyunsaturated fatty acid deficiency during neurodevelopment in mice models the prodromal state of schizophrenia through epigenetic changes in nuclear receptor genes. *Transl Psychiatry*, 7 : e1229.
- 2) Rapoport JL, Giedd JN and Gogtay N (2012) Neurodevelopmental model of schizophrenia : update 2012. *Mol Psychiatry*, 17 : 1228-1238.
- 3) St Clair D, Xu M, Wang P, et al (2005) Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961. *JAMA*, 294 : 557-562.
- 4) Susser E, Neugebauer R, Hoek HW, et al (1996) Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch Gen Psychiatry*, 53 : 25-31.
- 5) Wada Y, Maekawa M, Ohnishi T, et al (2020) Peroxisome proliferator-activated receptor α as a novel therapeutic target for schizophrenia. *EBioMedicine*, 62 : 103130.

■ ABSTRACT

Potential roles of PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) in the pathogenesis of schizophrenia

Motoko Maekawa, Yuina Wada

Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Center for Brain Science

We have previously reported that dietary deprivation of polyunsaturated fatty acid (PUFA) during neurodevelopmental stages in mice elicited schizophrenia-like phenotypes in its offspring at adulthood, and that the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) /retinoid X receptor (RXR) system may act as an underlying mechanism linking PUFA deficiency and the behavioral phenotypes. In this study, we further examined whether the PPAR/RXR system is associated with the pathophysiology of schizophrenia. Firstly, we screened for mutations in all the *PPAR/RXR* genes using the samples of 1,200 Japanese patients with schizophrenia. Based on *in silico* analyses, we focused on the *PPARA* gene and its variants (c.209-2delA, His117Gln, Arg141Cys, and Arg226Trp) that were found exclusively in schizophrenia, but not in control population. The c.209-2delA variant caused skipping of exon 4, generating a premature termination codon. All the three missense variants decreased the activity of PPAR α as a transcription factor *in vitro*. Next, we examined a *Ppara* KO mouse model to evaluate the biological consequences evoked by a functional deficiency of this gene *in vivo*. The *Ppara* KO mice exhibited behavioral and histological phenotypes that are reminiscent of schizophrenia. In conclusion, these findings reinforce the idea that PPAR α can be involved in the pathophysiology of schizophrenia.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 32 (3) : 144-148, 2021)
