

宮川 剛

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 システム医科学研究部門・教授

マウスを活用した精神疾患の中間表現型の解明

1. 研究実施の概要

本研究は、ヒトの精神疾患様の行動異常を示す遺伝子改変マウスを共通のプラットフォームとして、網羅的行動テストバッテリーをはじめとする様々な手法により多面的に解析し、精神疾患の中間表現型を解明することを目的としている。これまでに、我々は、 α カルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素 II (CaMKII α) ヘテロノックアウト (HKO) マウスが、精神疾患様の異常な行動を示すことを見出している。さらに興味深いことに、CaMKII α HKO マウスの海馬歯状回が、未成熟な性質を示すことを、分子生物学的、電気生理学的、組織学的な手法により明らかにしている。

この「未成熟な歯状回」という現象は精神疾患様の行動異常を示している別の遺伝子改変マウスである Schnurri-2 KO マウスで同様に見出されていることや、ヒト精神疾患患者の死後脳を用いた遺伝子発現解析でも CaMKII α HKO マウスの海馬の遺伝子発現解析の結果を反映するデータが得られていることから、「未成熟な歯状回」は CaMKII α HKO マウスに特異的なものではなく精神疾患様の行動異常に伴う一般的な現象である可能性が示唆される。

本年度は、高性能プロテオミクスを用いて、CaMKII α HKO マウスや Schnurri-2 KO マウスの歯状回で発現が変化しているタンパク質の同定を行った。得られたデータとこれまでに行った遺伝子発現解析結果と照合することにより、「なぜ歯状回の神経細胞が成熟できないのか」についての機構モデルの構築を試みた。さらに、そのモデルを検証するために、遺伝子導入や薬理学的手法を組み合わせた表現型のレスキューを行っており、今後も解析を推進していく予定である。その他の中間表現型についても、多種の行動課題に関連させた脳の機能的マッピングを行い、様々な手法を統合して新たな中間表現型を同定していく予定である。また、その他の行動異常を示すマウスの系統を同定するために、多系統の遺伝子改変マウスの網羅的行動解析を継続して行っていく予定である。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

1. 遺伝子改変マウスの網羅的行動解析:

- 1-1) 藤田保健衛生大学内に網羅的行動解析システム、ならびに脳の機能解析に向けた実験室のセットアップを継続中である(宮川グループ)。
- 1-2) 本年度より、自然科学研究機構生理学研究所内にも網羅的行動解析システムのセットアップを開始した(池中グループ)。
- 1-3) 研究代表者は京都大学医学研究科の先端技術センターの生体遺伝子機能解析グループのグループリーダーを兼任しており、京都大学では引き続き網羅的行動テストバッテリーを用いて、新たな精神疾患様の行動異常を示す遺伝子改変マウスの探索を行った(宮川グループ)^{1,2,4,5,7,9-12}。網羅的行動テストバッテリーによる解析については今後、池中グループに移行する予定である。

2. 網羅的解析技術によるバイオマーカーの探索:

バイオマーカーの探索について、主に対象とするマウスは、既に網羅的行動解析の結果、精神疾患様の行動異常を示すことが明らかになっている CaMKII α HKO マウス⁶と Shn-2 KO マウスである。

- 2-1) 精神疾患様の行動異常を示す遺伝子改変マウスについて行動実験後に神経活動マッピングを行うことにより、各行動異常の責任部位を推定することが出来る。本年度は CaMKII α HKO マウスと神経活動が生じた細胞に蛍光タンパク質が発現するマウス(入手済み)との掛け合わせによって得られたマウスを用いて CaMKII α HKO マウスの神経活動マッピングを行った。ワーキングメモリー課題を行わせた後での神経活動マッピングを比較したところ前頭葉と海馬歯状回に異常があることが明らかとなった。これらの領域は、ワーキングメモリーと深い関係があることがわかっており、CaMKII α HKO マウスでワーキングメモリー課題が顕著に障害されていることを反映している結果であった。Shn-2 KO マウスでも蛍光タンパク質が発現するマウスとの掛け合わせが進んでおり、今後は Shn-2 KO マウスも同様の解析を行う(宮川グループ)。
- 2-2) 精神疾患様の行動異常を示すマウスの脳では遺伝子だけではなく様々なタンパク質の発現変化が予想される。本年度は CaMKII α HKO マウスの脳をプロテオミクス解析し、多くのタンパク質の発現が変化していることを明らかにした。Schnurri-2 KO マウスについても同様にプロテオミクス解析を行ったところ、その発現変化が、CaMKII α HKO マウスと酷似していることを見出した。また、それらの結果をもとに中間表現型である未成熟な歯状回が生み出されるメカニズムのモデルを構築しつつある(宮川グループ)。
- 2-3) 共同研究者の神谷は、fMRI のデータから、「脳を読む」神経デコーディングの世界的な第一人者であり、ジーンチップによって得られた 40,000 以上のプローブの発現量データから、機械学習アルゴリズムを用いて、マウスの生前の行動パターンの定量的な予測を試みる。この予測のためには多数のジーンチップ解析によるデータが必要であり、本年度はそのための遺伝子の発現データの取得をとくに CaMKII α HKO マウスについて行った(宮川グループ)。

3. 精神疾患モデルマウスの脳の生理学的・生化学的・形態学的特徴の抽出:

スライス電気生理、in vivo 電気生理、モノアミンの定量、シグナル伝達の解析、各種組織学的・形態学的解析などにより、モデル動物の脳の生理学的、生化学的、形態学的特徴を抽出する。

3-1) Schnurri-2 KO マウスなどの精神疾患様の行動異常を示す遺伝子変異マウスの脳組織の系統的な組織学的解析および形態学的解析を行った(宮川グループ)。

3-2) ビオプテリン代謝に関わる遺伝子の KO マウスにおいて、脳内ドーパミン量の減少ばかりでなく線条体でのチロシン水酸化酵素 (TH) タンパク質量の低下が観察された^{13,18}。神経終末における TH タンパク質量の低下は、ドーパミン生合成能力の低下を意味しており生理学的に重要な機構と考えられる。モノアミン定量およびマウス脳部位別サンプリングの標準プロトコルの作成を行った(一瀬グループ)。

3-3) Schnurri-2 KO マウスなどの精神疾患様の行動異常を示す遺伝子変異マウスの脳について、カルシニューリンのターゲットである DARPP-32 などを含むリン酸化・脱リン酸化のシグナル伝達系について、生化学的手法を用いて解析する。線条体スライスを用いたリン酸化解析システムと in vivo 条件でのマウス脳でのリン酸化シグナル解析システムの構築が完了した¹⁴⁻¹⁶。これを用いて精神疾患モデルマウスの解析を行っている(西グループ)。

3-4) Schnurri-2 KO マウスの海馬ニューロン膜特性及びシナプス伝達の電気生理解析の結果、CaMKII HKO マウスと同様に海馬歯状回顆粒細胞の顕著な機能障害が生じていることが明らかになったため、同様の変化が他の系統の KO マウスでも生じている可能性を検討した¹⁷。また、これらのマウスにおける海馬神経回路活動の変化を解析するため、電気生理実験と並行して、神経回路活動の光学的解析装置のセットアップを行った(小林グループ)。

3-5) 精神疾患様の行動異常を示すマウスの脳で、AMPA 受容体のシナプス移行について、in vivo、in vitro での電気生理学および生化学・形態学的手法を用いて評価する。本年度は海馬依存的な学習により海馬の CA1 領域において AMPA 受容体がシナプスに移行することを明らかにした。また、2光子顕微鏡における in vivo イメージング系の立ち上げを完了させた。(高橋グループ)。

3-6) 精神疾患様の行動異常を示すマウスの中で、作業記憶障害が見られるマウスについて、慢性電極を埋め込み、海馬神経細胞からの記録をとりながら高次認知機能テストを遂行させることにより認知機能障害の発生メカニズムについて解析を行った(研究協力者:大阪バイオ:林・宮川グループ)。

4. ヒト精神疾患での中間表現型探索:

マウスで得られたデータを活用し、ヒト死後脳データベースの解析、脳内イメージングを組み合わせてゲノム解析を行うことにより、中間表現型に影響を与えるゲノムでの変異を探索する。

4-1) CaMKII や Schnurri-2 分子、その他のバイオマーカー候補遺伝子とその分子が関係するシグナル伝達経路や神経機能で重要な役割を果たす分子の遺伝子について、統合失調症や双極性気分障害などの精神疾患患者に機能的なゲノム変異があるかどうか、SNPs チップを用いた探索を行っている(研究協力者:藤田保健衛生大:岩田・遠山)^{3,8}。

4-2) CaMKII α HKO マウスおよび Schnurri-2 KO マウスで得られたそれぞれのバイオマーカー候補遺伝子を用いて、各種精神疾患患者を含む GeneLogic 社の大規模ヒト死後脳遺伝子発現データベースのデータについて、統計学的手法を用いてクラスタリングを行えば、精神疾患の再分類ができるのではないかと考えられる。今年度に関しては、Schnurri-2 KO マウスについてバイオマーカー探索の実験を行った(宮川グループ)。

3. 研究実施体制

(1)「宮川」グループ

①研究分担グループ長:宮川 剛 (藤田保健衛生大学、教授)

②研究項目

1. 行動実験設備のセットアップ
2. 網羅的解析技術によるバイオマーカーの探索
3. 精神疾患モデルマウスの脳の生理学的・生化学的・形態学的特徴の抽出
4. ヒト精神疾患での中間表現型探索

(2)「神谷」グループ

①研究分担グループ長:神谷 之康((株)国際電気通信基礎技術研究所、室長)

②研究項目

1. 遺伝子発現データの解析
2. 遺伝子発現データ解析アルゴリズムの開発

(3)「一瀬」グループ

①研究分担グループ長:一瀬 宏 (東京工業大学、教授)

②研究項目

- ・モデルマウス脳部位別モノアミンおよび代謝産物の定量
- ・モノアミン定量用脳部位別サンプリング標準手法の開発

(4)「西」グループ

①研究分担グループ長:西 昭徳(久留米大学、教授)

②研究項目

1. 行動異常を示す遺伝子改変マウスの線条体スライスを用いた脳リン酸化解析を行った。遺伝子改変マウスとして、mGluR5 欠損マウス、Mecp2 変異マウス、DARPP-32 変異マウスを用いた解析を行う。
2. *in vivo* 条件でのマウス脳リン酸化シグナル解析システムを確立する。

(5)「小林」グループ

①研究分担グループ長:小林 克典(日本医科大学、講師)

②研究項目

1. 精神疾患モデルマウスの脳におけるシナプス伝達及び神経細胞の興奮性の解析
2. 異なるモデルマウス間に共通する神経機能障害の抽出

(6)「高橋」グループ

①研究分担グループ長:高橋 琢哉(横浜市立大学、教授)

②研究項目

- 神経細胞の in vivo 形態観察
- AMPA 受容体のシナプス移行観察

(7)「池中」グループ

①研究分担グループ長:池中 一裕(自然科学研究機構 生理学研究所、教授)

②研究項目

1. 行動実験設備のセットアップ
2. 網羅的行動解析による精神疾患モデルマウスの探索

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Fukuda, E., Hamada, S., Hasegawa, S., Katori, S., Sanbo, M., Miyakawa, T., Yamamoto, T., Yamamoto, H., Hirabayashi, T., Yagi, T., Down-regulation of protocadherin- α , A isoforms in mice changes contextual fear conditioning and spatial working memory. *European Journal of Neuroscience* 28, 1362-1376 (2008).
2. Sakae, N., Yamasaki, N., Kitaichi, K., Fukuda, T., Yamada, M., Yoshikawa, H., Hiranita, T., Tatsumi, Y., Kira, J., Yamamoto, T., Miyakawa, T., Nakayama, KI., Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Human Molecular Genetics* 17(20): 3191-203 (2008).
3. Ikeda, M., Hikita, T., Taya, S., Uraguchi-Asaki, J., Toyo-oka, K., Wynshaw-Boris, A., Ujike, H., Inada, T., Takao, K., Miyakawa, T., Ozaki, N., Kaibuchi, K., Iwata, N., Identification of YWHA ϵ , a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Human Molecular Genetics* 17(20): 3212-22 (2008).
4. Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., Kageyama, R., Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 11(10): 1153-61 (2008).
5. Tsujimura, A., Matsuki, M., Takao, K., Yamanishi, K., Miyakawa, T. and Hashimoto-Gotoh, T., Mice lacking the kf-1 gene exhibit increased anxiety- but not despair-like behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2:4 (2008).
6. Yamasaki, N*, Maekawa, M*, Kobayashi, K*, Kajii, Y*, Maeda, J*, Soma, M*, Takao, K*, Tanda, K., Ohira, K., Toyama, K., Kanzaki, K., Fukunaga, K., Sudo, Y., Ichinose, H.,

- Ikeda, M., Iwata, N., Ozaki, N., Suzuki, H., Higuchi, M., Suhara, T., Yuasa, S., Miyakawa, T. (*These authors are contributed equally to this work.), Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders. *Molecular Brain*, 1:6 (2008).
7. Nakajima, R., Takao, K., Huang, SM., Takano, J., Iwata, N., Miyakawa, T., Saido, TC., Comprehensive behavioral phenotyping of calpastatin-knockout mice. *Molecular Brain*, 1: 7 (2008).
 8. Ikeda, M., Hikita, T., Taya, S., Uruguchi-Asaki, J., Toyo-oka, K., Wynshaw-Boris, A., Hiroshi Ujike, H., Inada, T., Takao, K., Miyakawa, T., Ozaki, N., Kaibuchi, K., and Nakao Iwata., Identification of YWHAЕ, a gene encoding 14-3-3 epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, 17(20): 3212-3222 (2008).
 9. Takao, K., Toyama, K., Nakanishi, K., Hattori, S., Takamura, H., Takeda, M., Miyakawa, T., and Hashimoto, R., Impaired long-term memory retention and working memory in sdy mutant mice with a deletion in Dtnbp1, a susceptibility gene for schizophrenia. *Molecular Brain*, 1:11 (2008).
 10. Komada, M., Takao, K., Miyakawa, T., Elevated plus maze for mice. *Journal of Visualized Experiments*, 22:1088 (2008).
 11. Tanaka, D., Nakada, K., Takao, K., Ogasawara, E., Kasahara, A., Sato, A., Yonekawa, H., Miyakawa, T., Hayashi, J., Normal mitochondrial respiratory function is essential for spatial remote memory in mice, *Molecular Brain*, 1:21 (2008).
 12. Hashimoto-Gotoh, T., Iwabe, N., Tsujimura, A., Takao, K., Miyakawa, T., KF-1 ubiquitin ligase: an anxiety suppressor. *Frontiers in Neurosciene*, (in press)
 13. Takazawa, C., Fujimoto, K., Homma, D., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Ichinose, H., Katoh, S., A brain-specific decrease of the tyrosine hydroxylase protein in sepiapterin reductase-null mice –As a mouse model for Parkinson’s disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 367, 787-792 (2008).
 14. Bateup, H., Svenningsson, P., Kuroiwa, M., Gong, S., Nishi, A., Heintz, N., Greengard, P., Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci* 11:932-939 (2008).
 15. Nishi, A., Kuroiwa, M., Miller, DB., O’Callaghan, JP., Bateup, HS., Shuto, T., Sotogaku, N., Fukuda, T., Heintz, N., Greengard, P., Snyder, GL., Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. *J Neurosci* 28:10460-10471 (2008).
 16. Kuroiwa, M., Bateup, HS., Shuto, T., Higashi, H., Tanaka, M., Nishi, A., Regulation of DARPP-32 phosphorylation by three distinct dopamine D1-like receptor signaling pathways in the neostriatum. *J Neurochem* 107:1014-1026 (2008).
 17. Kobayashi, K., Ikeda, Y., Haneda, H., Suzuki, H. Chronic fluoxetine bidirectionally modulates potentiating effects of serotonin on the hippocampal mossy fiber synaptic

transmission. *J Neurosci*, 28, 6272-6280 (2008).

18. Ichinose, H., Nomura, T., Sumi-Ichinose, C., Metabolism of tetrahydrobiopterin: its relevance in monoaminergic neurons and neurological disorders. *The Chemical Record*, 8, 378-385 (2008)

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)