

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく
診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 19 年度採択研究代表者

平成 21 年度
実績報告

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) へテロノックアウト (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、CaMKII α HKO マウスと Schnurri-2 KO マウス以外に、行動異常を示す複数系統の遺伝子改変マウス、薬物の連続投与を行ったマウスにおいて未成熟な海馬歯状回を同定した。また、CaMKII α HKO マウスや Schnurri-2 KO マウスについて組織化学的解析を行った結果、海馬歯状回においてアストロサイトが活性化していることを見出した。さらに CaMKII α HKO マウスや Schnurri-2 KO マウスの歯状回について、高性能プロテオミクスと遺伝子発現解析結果から構築した「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)「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
 1. Schnurri-2 マウスの FK-801 投与によるドーパミン量変化の *in vivo* micro-dialysis による解析
 2. DPR ノックアウトマウスへの SSRI 投与による効果の解析
 3. ドーパミンニューロンにおけるドーパミン生合成量調節機構の解析

(3)「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

(4)「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

(5)「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
 1. 神経細胞の in vivo 形態観察
 2. AMPA 受容体のシナプス移行観察

(6)「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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(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網羅的行動解析システムのセットアップを終え、網羅的行動解析を開始した(池中グループ)。また、統合失調症モデルマウスについての解析結果を報告した(Tanaka et al., *Journal of Neuroscience*, 2009)⁴。
- 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い、自閉症モデルマウス(Nakatani et al., *Cell*, 2009)¹、統合失調症モデルマウス(Tanaka et al., *Journal of Neuroscience*, 2009)⁴、滑脳症モデルマウス(Yamada et al., *Nature Medicine*, 2009)⁶、多発性硬化症モデルマウス(Ohno et al., *Nature Neuroscience*, 2009)⁷などの行動解析結果を報告した(宮川グループ)¹⁻⁹。
- 1-4) マウス体外受精技術を基盤とし、マウスの SPF 化、受精卵の凍結、実験に用いるマウスの繁殖時期の制御、受精卵や精子を輸送可能としたことによるマウス輸送のコストダウンなどをはじめとする効率的なマウスの飼育管理を行うため、日本科学未来館において大規模飼育施設のセットアップを行い、運営を始めた(宮川グループ)。

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。Schnurri (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。Shn-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) 研究協力者の神谷は、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) Shn-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) Shn-2 KO マウスに MK-801 を投与した時のモノアミンの変化を、一瀬グループと共同して脳内微量透析法により解析している(高橋グループ)。

これまでの解析から脳内セロトニンが低下している DPR-KO マウスが、電気ショックの後で PTSD 様の不安亢進を示すことを明らかとしている。この PTSD 様表現型が、ヒトの場合と同様に SSRI 投与により改善するかどうかを調べるため、SSRI の連続投与と投与後の行動解

析を行っている(一瀬グループ)。

- 3-3) Shn-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している(Hara et al., J Neurochem, in press)¹⁶。線条体スライスを用いたリン酸化解析システムに加え、大脳皮質、海馬歯状回スライスを用いたリン酸化解析システムを構築している。これを用いて、SSRI などの抗うつ薬作用機序の解析や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) CaMKII HKO、Shn-2 KO マウスで観察された海馬歯状回の成熟異常と類似の変化が、正常成体マウスに抗うつ薬を慢性投与することによって生じることが示された(Kobayashi et al., PNAS, in press)¹⁷。この結果は、神経細胞の成熟状態が成体においても可変であることを示しており、また、異常な成熟状態も薬物投与等によってコントロール可能であることを示唆している。さらに、新たに見出された精神疾患様行動異常を示す遺伝子改変マウスの解析を行った。現在も解析中であり、上記の系統のマウスと類似の行動異常を示すマウスにおいて、歯状回の成熟異常とは異なる生理学的変化が明らかになりつつある(小林グループ)。
- 3-5) Shn-2 KO マウスの脳についてモノアミン類の定量を行うために、マイクロダイアリスのセットアップを行い、解析を始めた(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、ワーキングメモリー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)。
- 3-7) GFP を発現するレトロウイルスベクターを用いることによって、成熟期ラット大脳新皮質1層に虚血依存的に抑制性神経細胞を産生する神経前駆細胞(L1-INP 細胞)を同定した¹⁰。統合失調症などの精神疾患患者の死後脳では、大脳皮質において抑制性神経細胞が減少することが知られており、今後、薬剤などで L1-INP 細胞の増殖、分化、生存を制御することができれば、精神疾患の新しい治療法に結びつく可能性がある(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 Shn-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)。
- 4-2) CaMKII α HKO マウスおよび Shn-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、Shn-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)。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Nakatani, J., Tamada, K., Hatanaka, F., Ise, S., Ohta, H., Inoue, K., Tomonaga, S., Watanabe, Y., Chung, YJ., Banerjee, R., Iwamoto, K., Kato, T., Okazawa, M., Yamauchi, K., Tanda, K., Takao, K., Miyakawa, T., Bradley, A., Takumi, T., Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell*, 137(7): 1235-46 (2009). Doi: 10.1016/j.cell.2009.04.024
2. Matsuo, N., Tanda, K., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Toyama, K., Takao, K., Takeshima, H., Miyakawa, T., Comprehensive behavioral phenotyping of ryanodine receptor type3 (RyR3) knockout mice: decreased social contact duration in two social interaction tests. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3:3 (2009). Doi: 0.3389/neuro.08.003.2009
3. Tanda, K., Nishi, A., Matsuo, N., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Sugimoto, T., Toyama, K., Takao, K., Miyakawa, T., Abnormal social behavior, hyperactivity, impaired remote spatial memory, and increased D1-mediated dopaminergic signaling in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *Molecular Brain*, 2:19 (2009). Doi: 10.1186/1756-6606-2-19
4. Tanaka, H., Ma, J., Tanaka, KF., Takao, K., Komada, M., Tanda, K., Suzuki, A., Ishibashi, T., Baba, H., Isa, T., Shigemoto, R., Ono, K., Miyakawa, T., Ikenaka, K., Mice with altered myelin proteolipid protein gene expression display cognitive deficits accompanied by abnormal neuron–glia interactions and decreased conduction velocities. *Journal of Neuroscience*, 29 (26): 8363-71 (2009). Doi: 10.1523/JNEUROSCI.3216-08.2009
5. Matsuo, N., Yamasaki, N., Ohira, K., Takao, K., Toyama, K., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Miyakawa, T., Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3:20 (2009). Doi: 0.3389/neuro.08.020.2009
6. Yamada, M., Yoshida, Y., Mori, D., Takitoh, T., Kengaku, M., Umeshima, H., Takao, K., Miyakawa, T., Sato, M., Sorimachi, H., Wynshaw- Boris A., Hirotsune, S., Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly. *Nature Medicine*, 15 (10): 1202-7 (2009).

Doi: 10.1038/nm.2023

7. Ohno, M., Hiraoka, Y., Matsuoka, T., Tomimoto, T., Takao, K., Miyakawa, T., Oshima, N., Kiyonari, H., Kimura, T., Kita, T., Nishi, E., Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. *Nature Neuroscience*, 12, 1506-13 (2009). Doi: 10.1038/nm.2438
8. Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, TV., Takao, K., Eede M, Hattori, S., Laliberte C., Khan, M., Okamoto, K., Chambers, JW., Fletcher, PJ., MacAulay, K., Doble, BW., Henkelman, M., Miyakawa, T., Roder, J., Woodgett, JR., Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3 α mutant mice. *Molecular Brain*, 2 (1): 35 (2009).
Dio: 10.1186/1756-6606-2-35
9. Hagihara, H., Toyama, K., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Dissection of hippocampal dentate gyrus from adult mice. *Journal of Visualized Experiments*, 2009 Nov 17; (33). pii: 1543. Doi: 10.3791/1543.
10. Ohira, K., Furuta, T., Hioki, H., Nakamura, KC., Kuramoto, E., Tanaka, Y., Funatsu, N., Shimizu, K., Oishi, T., Hayashi, M., Miyakawa, T., Kaneko, T., Nakamura, S., Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nature Neuroscience*, 13: 173-179 (2010). Doi: 10.1038/ nm.2473
11. Kawahata, I., Tokuoka, H., Parvez, H., Ichinose, H., Accumulation of phosphorylated tyrosine hydroxylase into insoluble protein aggregates by inhibition of an ubiquitin-proteasome system in PC12D cells. *J. Neural Transm*, 116: 1571-1578 (2009). Doi: 10.1007/s00702-009-0304-z
12. Kadkhodaei, B., Ito, T., Joodmardi, E., Mattsson, E., Rouillard, C., Carta, M., Muramatsu, S., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Metzger, D., Chambon, P., Lindqvist, L., Larsson, N., Olson, L., Björklund, A., Ichinose, H., Perlmann, T., Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*, 29, 15923-15932 (2009). Doi: 10.1523/JNEUROSCI.3910-09.2009
13. Rebholz, H., Nishi, A., Liebscher, S., Nairn, AC., Flajolet, M., Greengard, P., CK2 negatively regulates G α s signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14096-14101 (2009). Doi: 10.1073/pnas.0906857106.
14. Tanaka, N., Waki, K., Kaneda, H., Suzuki, T., Yamada, I., Furuse, T., Kobayashi, K., Motegi, H., Toki, H., Inoue, M., Minowa, O., Noda, T., Takao, K., Miyakawa, T., Takahashi, A., Koide, T., Wakana, S., Masuya, H., SDOP-DB: A comparative standardised-protocol database for mouse phenotypic analyses. *Bioinformatics*, Mar 1 (2010). Doi: 10.1093/bioinformatics/btq095
15. Takao, K., Tanda, K., Nakamura, K., Kasahara, J., Nakao, K., Katsuki, M., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Toyama, K., Adachi, M., Umeda, M., Araki, T., Fukunaga, K., Kondo, H.,

- Sakagami, H., Miyakawa, T., Comprehensive Behavioral Analysis of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV Knockout Mice. *PloS One* 5(3): e9460 (2010). Doi: 10.1371/journal.pone.0009460
16. Hara, M., Fukui, R., Hieda, E., Kuroiwa, M., Bateup, HS., Kano, T., Greengard, P., Nishi, A., Role of adrenoceptors in the regulation of dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons. *J Neurochem* (in press). Doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06668.x
17. Kobayashi, K., Ikeda, Y., Sakai, A., Yamasaki, N., Haneda, E., Miyakawa, T., Suzuki, H., Reversal of hippocampal neuronal maturation by serotonergic antidepressants. *Proc Natl Acad Sci USA* (in press)