

「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

宮川 剛

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所・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 (α CaMKII) へテロノックアウト (HKO) マウス、Schnurri-2 KO マウス、抗うつ薬の慢性的投与マウスにおいて、精神疾患様の異常な行動を示すこと、分子生物学的、電気生理学的、組織学的な解析により、海馬歯状回が未成熟な状態になっていること(未成熟歯状回: immature Dentate Gyrus, iDG)を見出している。さらに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、網羅的行動テストバッテリー等によって同定した過活動や作業記憶障害などの精神疾患様の行動異常を示すマウスについて iDG 様の中間表現型を有するか否かを、リアルタイム PCR 法などを用いて検討したところ、SNAP-25 ノックインマウスや野生由来マウス3系統で iDG 様の表現型を見出した。さらに、iDG が起こっているマウス系統について、GABA ニューロン数の低下やアストロサイトの活性化など、iDG と共起して生ずる別の中間表現型も多数

同定することにも成功しており、iDG をサブグループに分類する試みを進めている。iDG を生じさせるメカニズムについては、生化学的・薬理的な解析を行った結果、ドーパミン D1 受容体シグナル経路 (DARPP-32 および ERK のリン酸化) と BDNF のシグナリング経路の亢進が共通した原因になっていることを示唆する結果を得た。

現在、上記の知見をもとに、iDG を正常化させるために、別遺伝子改変マウスを掛け合わせたり、各種の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。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 総合医科学研究所、教授)

② 研究項目

- ・行動実験設備のセットアップ
- ・網羅的解析技術によるバイオマーカーの探索
- ・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
- ・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 (東京工業大学大学院生命理工学研究科、教授)

② 研究項目

- ・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 による解析および脳内モノアミン量の測定
- ・セロトニン欠乏モデルマウスへの SSRI 投与による効果の解析
- ・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 (久留米大学医学部、教授)

② 研究項目

- ・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、CaMKII α HKO マウス、Schnurri-2 KO マウス、dominant negative DISC1 マウス、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

- ・大脳皮質、海馬歯状回スライスのリン酸化解析システムを構築する
- ・in vivo 条件でのマウス脳リン酸化シグナルの解析

(4)「小林」グループ

① 研究分担グループ長:

小林 克典 (日本医科大学薬理学講座、講師)

② 研究項目

- ・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
- ・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 (横浜市立大学大学院医学研究科、教授)

② 研究項目

- ・遺伝子改変マウスの脳内神経伝達物質測定を in vivo マイクロダイアリス法を用いて行う。

§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)³。
- 1-2) 研究代表者は自然科学研究機構生理学研究所行動様式解析室の客員教授を兼任しており、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^{5, 11}、恐怖記憶に異常のあるマウスの行動解析結果を報告した¹¹(宮川グループ)。
- 1-3) 日本科学未来館において、マウス体外受精技術を基盤とした大規模飼育施設のセットアップを行い、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の運営をすすめている(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、**Shn2KO** マウス、**SNAP-25** ノックインマウス、抗うつ剤投与マウスのそれぞれを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、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。今後、精神疾患様の行動異常を示すマウスでも同様の解析を行っていく予定である(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 **Shn-2 KO** マウスについて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特に **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、**SNAP-25** ノックインマウス、抗うつ剤投与マウスなどの精神疾患様の行動異常を示す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)。

3-3) **Shn-2 KO** マウスの脳内モノアミンを分析した結果、線条体では変化が見られなかったにもかかわらず、海馬においてドーパミンの代謝物である **DOPAC** が大きく減少していた。また、ノルアドレナリンの代謝物である **MHPG** や、セロトニンの代謝物である **5HIAA** も減少していた。ドーパミンやセロトニンなどの量はほとんど変化せず、モノアミンに対する代謝物の量が減少していたので、**Shn-2 KO** マウスの海馬において、モノアミン放出の低下によると考えられるモノアミンの代謝回転の低下が起きていることが示された(一瀬グループ)。

3-4) これまでの解析から脳内セロトニン欠乏モデルマウスが、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にしている。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** の投与条件の検討を行い、行動実験のためのマウスの交配準備を進めた(一瀬グループ)。

3-5) **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する。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)。

3-6) 抗うつ薬・抗不安薬として用いられるフルオキセチンを成体マウスに慢性投与することによって、海馬歯状回の成熟顆粒細胞が成熟前の状態に戻る(脱成熟)を発見し、その効果にセロトニン **5-HT₄** 受容体が関与することを明らかにした¹。また、フルオキセチンの投与によってマウスが過活動と抵活動を繰り返す等の行動の不安定化を示すこと、さらに、その効果も **5-HT₄** 受容体依存性であり、脱成熟に伴う細胞レベルの機能変化と有意に相関することを明らかにした¹⁴。過去に報告した **CaMKII HKO** を含む、未成熟歯状回を示す遺伝子改変マウスでも不安定な行動が見られており、これらの結果は歯状回の成熟異常と行

動の安定性の低下との関連を強く示唆している。

- 3-7) 統合失調症候補遺伝子 *dysbindin-1* を欠損したマウスの海馬の電気生理解析を行った結果、歯状回-CA3 シナプス伝達のドパミン、セロトニンによる修飾が亢進していることを見出した¹⁵。この結果は、歯状回の機能異常と精神疾患の関連を示唆しており、これまでの主張を支持するものである(小林グループ)。
- 3-8) *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)。
- 3-9) 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)。
- 3-10) 抗うつ薬であるフルオキセチンが *iDG* 化を促進することを見出しているが、成体マウスにフルオキセチンを6週間以上投与すると脳室下帯の神経新生が有意に低下することを明らかにした¹²。この結果から抗うつ薬が成体神経新生に影響を与えることが明らかとなり、大脳皮質の GABA ニューロン数の低下が *iDG* と共起する現象であることから、抗うつ薬による大脳新皮質1層抑制性神経前駆細胞(L1-INP 細胞)の神経新生についても解析を開始した(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) *CaMKIIα* 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 Kobayashi K, Ikeda Y, Sakai A, Yamasaki N, Haneda E, Miyakawa T, Suzuki H. Reversal of hippocampal neuronal maturation by serotonergic antidepressants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18): 8434-9 (2010). (DOI: 10.1073/pnas.0912690107)
- 2 Nishio K, Ihara M, Yamasaki N, Kalaria RN, Maki T, Fujita Y, Ito, H, Oishi N, Fukuyama H, Miyakawa T, Takahashi R, Tomimoto H. A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy supplemental methods. *Stroke*, 41(6): 1278-84 (2010). (DOI: V10.1161/STROKEAHA.110.581686)
- 3 Matsuo N, Takao K, Nakanishi K, Yamasaki N, Tanda K, Miyakawa T, Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4, 29 (2010). (DOI: 10.3389/fnbeh.2010.00029)
- 4 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*, 113:1046-59, (2010). (DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06668.x)
- 5 Ohnishi H, Murata T, Kusakari S, Hayashi Y, Takao K, Maruyama T, Ago Y, Koda K, Jin FJ, Okawa K, Oldenborg PA, Okazawa H, Murata Y, Furuya N, Matsuda T, Miyakawa T, Matozaki T, Stress-evoked tyrosine phosphorylation of signal regulatory protein α regulates behavioral immobility in the forced swim test. *The Journal of Neuroscience*, 30 (31): 10472-83 (2010). (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0257-10.2010)
- 6 Ohira K, Hagihara, H, Toyama K, Takao K, Kanai M, Funakoshi H, Nakamura T, Miyakawa T, Expression of tryptophan 2,3-dioxygenase in mature granule cells of the adult mouse dentate gyrus. *Molecular brain*, 3: 26 (2010). (DOI: 10.1186/1756-6606-3-26)
- 7 Tamada K, Tomonaga S, Hatanaka F, Nakai N, Takao K, Miyakawa T, Nakatani J, Takumi T, Decreased exploratory activity in a mouse model of 15q duplication syndrome; implications for disturbance of serotonin signaling. *PloS one*, 5 (12): e15126 (2010). (DOI: 10.1371/journal.pone.0015126)
- 8 Shinohara Y, Hosoya A, Yamasaki N, Ahmed H, Hattori S, Eguchi M, Yamaguchi S, Miyakawa T, Hirase H, Shigemoto R, Right-hemispheric dominance of spatial memory in split-brain mice. *Hippocampus*, 2010 年 11 月 (DOI: 10.1002/hipo.20886) [Epub ahead of print]
- 9 Yamanaka Y, Kitano A, Takao K, Prasansuklab A, Mushiroda T, Yamazaki K,

- Kumada T, Shibata M, Takaoka Y, Awaya T, Kato T, Abe T, Iwata N, Miyakawa T, Nakamura Y, Nakahata T, Heike T, Inactivation of fibroblast growth factor binding protein 3 causes anxiety-related behaviors. *Molecular and cellular neurosciences*, 46(1): 200-12 (2011). (DOI: 10.1016/j.mcn.2010.09.003)
- 10 Yamada M, Ihara M, Okamoto Y, Maki T, Washida K, Kitamura A, Hase Y, Ito H, Takao K, Miyakawa T, Kalaria RN, Tomimoto H, Takahashi R, The Influence of Chronic Cerebral Hypoperfusion on Cognitive Function and Amyloid β Metabolism in APP Overexpressing Mice. *PLoS one*, 6 (1): e16567 (2011). (DOI: 10.1371/journal.pone.0016567)
- 11 Yao I, Takao K, Miyakawa T, Ito S, Setou M, Synaptic E3 Ligase SCRAPER in Contextual Fear Conditioning: Extensive Behavioral Phenotyping of Scrapper Heterozygote and Overexpressing Mutant Mice. *PLoS one*, 6(2): e17317 (2011). (DOI: 10.1371/journal.pone.0017317)
- 12 Ohira K, Miyakawa T, Chronic treatment with fluoxetine for more than 6 weeks decreases neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. *Molecular brain*, 4 (1): 10 (2011). (DOI: 10.1186/1756-6606-4-10)
- 13 Homma D, Sumi-Ichinose C, Tokuoka H, Ikemoto K, Nomura T, Kondo K, Katoh S, Ichinose H, Partial bipterin deficiency disturbs postnatal development of the dopaminergic system in the brain, *Journal of Biological Chemistry*, 286, 1445-1452 (2011). (DOI: 10.1074/jbc.M110. 159426)
- 14 Kobayashi K, Ikeda Y, Suzuki H, Behavioral destabilization induced by the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Molecular Brain*, 4:12 (2011). (DOI: 10.1186/1756-6606-4-12)
- 15 Kobayashi, K., Umeda-Yano, S., Yamamori, H., Takeda, M., Suzuki, H., Hashimoto, R, Correlated alterations in serotonergic and dopaminergic modulations at the hippocampal mossy fiber synapse in mice lacking dysbindin. *PLoS ONE*, 6(3): e18113 (2011). (DOI: 10.1371/journal.pone.0018113)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0件)