

「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、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、alpha 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。

本年度は、1) CaMKII α HKO マウスにおける各行動異常に対する責任部位を同定するために、脳の機能的マッピングを行い、前頭連合野と海馬に異常が起きていることを明らかにした、2) 行動異常を示す Schnurri-2 (Shn-2) ノックアウト (KO) マウスの海馬をジーンチップ解析にかけ、発現変化している遺伝子の種類や量的変動までが CaMKII α HKO マウスと酷似していることを明らかにした、3) Shn-2 KO マウスの海馬歯状回が、電気生理学的、組織学的に未成熟な性質を有していることを示した。

今後、未成熟な海馬歯状回が精神疾患の中間表現型であるのかどうかを明らかにするために、ヒトの死後脳を含めて、他の行動異常を示す遺伝子改変マウスにおいても解析を進めていく。また、その他の中間表現型についても、CaMKII α HKO マウスですでに成果を得ている、行動課題に関連させた脳の機能的マッピングを行うことによって、異常行動に対する脳の責任領域を特定し、様々な手法を統合して新たな中間表現型の同定を試みていく予定である。

2. 研究実施内容

1. 遺伝子改変マウスの網羅的行動解析:

- 1-1) 本年度より、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に着手した。
- 1-2) 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。

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 CaMKII α HKO マウス、Schnurri-2 KO マウスについて、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)と掛け合わせを行った。さらに CaMKII α HKO マウスの神経活動マッピングを行った結果、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。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様々な遺伝子の発現変化が予想される。本年度は Schnurri-2 KO マウスについて網羅的行動テストバッテリーを行った後に脳を摘出し、ジーンチップによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、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(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、(イ)のようにして得られた 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

系統的な形態学的解析を行った(湯浅グループ)。

- 3-2) 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、ドーパミンやセロトニンなどのモノアミン類および関連化合物を各脳部位に分けて定量するためのセットアップを行った。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作成に向けて方法の検討を行った(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は確立しており、本年度は *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を行った(西グループ)。
- 3-4) Schnurri-2 KO マウスから作製した脳スライス標本に電気生理学的手法を適用し、シナプス伝達及び細胞の膜特性の解析を行った。このマウスでは海馬の遺伝子発現に顕著な異常が見られているため、海馬歯状回から CA3 領域に投射する苔状線維シナプスの解析と歯状回顆粒細胞の膜特性の解析を行った。その結果、シナプス伝達とその可塑性及び活動電位発火特性に顕著な異常があることが明らかになった。また、その変化は先だつて解析を行った CaMKII α HKO と多くの点で類似しており、海馬の機能障害が、これらのマウスにおける行動異常の共通の神経基盤となっている可能性が示された(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 *in vivo* マイクロダイアレスのシステム立ち上げを行い、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進行中である。(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に着手した。(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 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に着手した(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、主任研究員)

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)「湯浅」グループ

① 研究分担グループ長:湯浅 茂樹(国立精神・神経センター神経研究所、部長)

② 研究項目

1. 行動障害を示す遺伝子変異マウスの脳組織の系統的な形態学的解析
2. 特に、CaMKII α HKO マウスで明らかになった異常な成体海馬の神経新生に関する、神経前駆細胞、神経幹細胞の増殖並びに分化の動態解析。

(4)「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. 行動解析により行動異常が認められたマウスについて、脳各部位におけるモノアミンおよび代謝産物の定量を行う。
2. 脳部位別サンプリング標準手法の開発のために、脳を部位別にパンチアウトする方法や器具について検討する。

(5)「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
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の確立

(6)「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

(7)「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. 精神疾患モデル動物における AMPA 受容体シナプス移行の観察
2. 2光子顕微鏡を用いた精神疾患モデル動物の神経細胞形態観察