

「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21年度採択研究代表者

内匠 透

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

精神の表出系としての行動異常の統合的研究

## §1. 研究実施の概要

本研究は、発達障害モデル、リズム障害モデルを基盤として、研究代表者のグループ(内匠:神経科学)を中心に、共同研究者の山本(数理学)グループ及び鈴木(薬理学)グループとの共同研究を通して、1)自閉症をはじめとする脳の発達障害及びリズム障害等の行動異常の分子病態解明を多面的に進めるとともに、2)数理モデル解析等による新規診断法の開発、さらには、3)環境因子を含む新規治療法の基盤開発を目標とする統合的な研究である。

これまでに発達障害モデルの解析に関しては、網羅的行動解析により、父性重複(patDp/+)マウスにおいて社会性相互作用の障害、超音波啼鳴数の発達異常、固執的常同様行動、不安等自閉症様行動を示すことを明らかにした。本年度は神経化学的な解析により脳内のセロトニン異常を見出した。特に発達期における脳内セロトニンの減少が patDp/+マウスの行動異常をもたらす可能性が示唆された。これらの成果は、新規治療法として、セロトニン系薬剤の可能性をもたらすものである。また、発達障害モデルの多面的な網羅的解析を行いデータを収集した。分子病態理解のための解析を行っている。数理モデル解析に必要な身体活動のデータ収集も開始した。

## §2. 研究実施体制

(1)「内匠」グループ(広島大学)

①研究分担グループ長:内匠 透 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科、教授)

②研究項目

- ・発達障害モデルの統合的解析
- ・リズム障害モデルの統合的解析

(2)「山本」グループ(東京大学)

① 研究分担グループ長:山本 義春 (東京大学大学院教育学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ 数理モデリングの研究、データ解析やその手法開発

(3)「鈴木」グループ(日本医科大学)

① 研究分担グループ長:鈴木 秀典 (日本医科大学大学院医学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ 電気生理学的解析、行動薬理実験、分子生物学的実験

### §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) 分子病態解明

(内匠グループ)

発達障害モデルマウスの形態学的解析では、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの比をみるために、前頭皮質におけるそれぞれ vGlut1, vGAT の定量的免疫組織化学を行った。また、電子顕微鏡によるシナプス形態の定量化とともに EPSP, IPSP 記録による電気生理学的解析を行っている。細胞生物学的解析では、銀染色を用いてスパインレベルの異常の有無を検討した。また、別途細胞生物学解析の中では、筋萎縮性側索硬化症の新規原因遺伝子であるオプチニューリンの変異体の解析を行った<sup>1)</sup>。

これまでの行動解析では発達障害モデルマウスの 129 系統を用いていたが、あらたに C57BL 系統にバッククロスしたラインを用いて再び網羅的行動解析を行った。オープンフィールド、Y 迷路、ホームケージ、fear conditioning、marble burying、Novelty suppressed テストで、探索行動の減少、新規環境での活動の減少、不安の上昇がみられた<sup>2)</sup>。

リズムモデルに関しては、二つのコア時計遺伝子 Per2, Bmal1 を同時にそれぞれ2色で発現するマウスを作製し、その行動解析を行った<sup>3)</sup>。さらに、コアの時計転写因子 Bmal1 の特異的抗体を作製し、ChIP-chip および ChIP-seq 法により、ヒトおよびマウスの線維芽細胞から標的分子をゲノムワイドで網羅的に同定した。その中には新規時計(関連)遺伝子 Gm129 を含むこれまで知られている時計遺伝子を同定した<sup>4)</sup>。また標的分子のバイオインフォマティクス解析の結果、代謝に関与する遺伝子群が多く含まれることを明らかにした。

#### 2) 新規診断法の開発

(山本グループ)

行動異常の評価手法の確立を目的に、不安や緊張を伴うことの多い心身症(緊張型頭痛等)や不安障害患者のデータ解析を行った。行動組織化解析の結果、大うつ病性障害患者で確認された日内身体活動の特徴変化は、これらの疾患患者では確認されず、むしろ不安・緊張の高まりにより逆の変化を示すことを確認した。このことは、日内行動リズムの解析により、抑うつ気分のみでなく、不安・緊張が評価可能なことを示唆する。また、時計関連遺伝子(BMAL1, Per2, Clock) KO マウスの活動データを多角的に解析することにより、ヒうつ病患者と同様な行動変化は Per2 KO マウスに特異的であることを示し、日内行動リズムの変化に、概日リズム生成システムにおける遺伝子発現調節に関わるフィードバック要素が関連することを示唆した。

一方、時間解像度の高い診断手法の確立を目的に、経時的に記録した主観的な抑うつ気分の変化と、記録前の身体活動度の統計量との共変性を検討し、重回帰モデルの構築を行った(健常人対象)。抑うつ気分と局所統計量(平均, 分散, 歪度)との間には強い相関が存在し、その相関関係は上記の気分障害患者での行動解析で見られた行動変調パターンと同様なものであった。

以上は、英文原著論文として報告した<sup>5)</sup>。さらに、個人内変動を考慮した統計解析(マルチレベル解析)においても同様な結果を得ている。

また、診断法の疾患・病態特異性および感受性のより詳細な検討を目的として、大うつ病性障害患者を対象とした mECT 治療過程における行動と症状の経時的データの計測を開始した。さらに、広汎性発達障害患者の試験的データ収集も開始した。

### 3) 治療法の基盤開発

(内匠グループ)

発達障害モデルマウスの HPLC を用いたモノアミンの解析を脳各部位とともに、発達時期をおって解析した。小脳、中脳及び嗅球において、発達障害モデルマウス(patDp/+)は野生型に比べてセロトニン 5-HT 及び 5-HIAA が減少していた。一方、ドーパミン及びノルエピネフリンは変化がなかった。さらに、生後1~3週の発達段階をおって調べたものでは、小脳、大脳皮質、海馬、視床下部、中脳、橋と各部位で、発達障害モデルマウス(patDp/+)は野生型に比べてセロトニン 5-HT が減少していた<sup>2)</sup>。本マウスにみられる行動学的及び神経化学的表現型は、セロトニントランスポーターノックアウトマウスとも似通っており、セロトニン系の異常が発達障害モデルマウス(patDp/+)における社会的行動異常の原因と考えられる。

(鈴木グループ)

中枢神経系においてセロトニンはシナプス伝達効率を調節することが知られており、いくつかの発達障害においてもセロトニン神経系の機能異常が示唆されている。小脳は縫線核からのセロトニン入力を受けているが、小脳神経回路の最終出力系である深部小脳核(DCN)においては、その修飾効果は明らかにされていない。今年度は苔状線維とDCN神経細胞間の興奮性シナプスに焦点を当て、興奮性シナプス伝達と可塑性に対するセロトニンの役割を電気生理学的に検討した。幼若ラット小脳スライス標本において、セロトニンの灌流投与により、電気刺激で誘発された興奮性シナプス後電流の振幅は、苔状線維のシナプス前終末の 5-HT<sub>1B</sub> 受容体の活性化を介して、可逆的に抑制された<sup>6)</sup>。さらに、苔状線維の高頻度刺激により、グループ I 代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)依存性の緩徐な興奮性シナプス後電流が誘発され、この振幅もセロトニン投与により減少した。苔状線維の高頻度刺激により、苔状線維と DCN 神経細胞間のシナプスでは mGluR の活性化を介すると考えられる興奮性シナプス後電流の長期抑圧が誘発される。セロトニン存在下では、高頻度刺激により誘発された長期抑圧の程度は著しく抑制された。一方、mGluR 作動薬で化学的に惹起された長期抑圧はセロトニンの影響を受けなかった<sup>6)</sup>。すなわち、セロトニンはシナプス前終末に作用し、グルタミン酸の放出確率を減少させ、長期抑圧を抑制している可能性が示唆された。以上の結果から、セロトニンは苔状線維の興奮性シナプス後電流に対する一過性の抑制効果だけでなく、長期的なシナプス伝達の調節にも重要な役割を果たしていると考えられた。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., Komure, O., Matsuura, S., Kobatake, K., Morimoto, N., Abe, K., Suzuki, N., Aoki, M., Kawata, A., Hirai, T., Kato, T., Ogasawara, K., Hirano, A., Takumi, T., Kusaka, H., Hagiwara, K., Kaji, R. and Kawakami, H, “Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis” *Nature*, vol. 465, No.7295, pp223-226, 2010. (DOI:10.1038/nature08971)
2. Kota Tamada, Shozo Tomonaga, Fumiyuki Hatanaka, Nobihiko Nakai, Keizp Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Jin Nakatani and Toru Takumi, “Decreased exploratory activity in a mouse model of 15q duplication syndrome; implications for disturbance of serotonin signaling”, *PLoS ONE*, vol. 5, No 12, e15126, 2010. (DOI:10.1371/journal.pone.0015126)
3. Takako Noguchi, tomoko Michihata, Wataru Nakamura, Toru Takumi, Ritsuko Shimizu, Masayuki Yamamoto, Masaaki Ikeda, Yoshihiro Ohmiya and Yoshihiro Nakajima. “Dual-color luciferase mouse directly demonstrates coupled expression of two clock genes”, *Biochemistry*, vol. 49, No. 37, pp8053-8061, 2010. (DOI:10.1021/bi100545h)
4. Fumiyuki Hatanaka, Chiaki Matsubara, Jihwan Myung, Takashi Yoritaka, Naoko Kamimura, Shuichi Tsustumi, Akinori Kanai, Yutaka Suzuki, Paolo Sassone-Corsi, Hiroyuki Aburatani, Suimio Sugano and Toru Takumi, “Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals strict relationship with metabolism” *Molecular and Cellular Biology*, vol.30, No 24, pp5636-5648, 2010. (DOI:10.1128/MCB.00781-10)
5. Nakamura, T., M. Sone, N. Aoyagi, Z. R. Struzik, and Y. Yamamoto. Association of local statistics of locomotor activity with momentary depressive mood. *International Journal of Bioelectromagnetism* 12: 121-126, 2010.
6. Mitsumasa Murano, Fumihito Saitow and Hidenori Suzuki. Modulatory effects of serotonin on glutamatergic synaptic transmission and long-term depression in the deep cerebellar nuclei. *Neuroscience*, vol. 172, pp 118-128, 2011 (DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.037)

(4-2) 知財出願

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