

「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」

H23 年度
実績報告

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. 研究実施体制

(1)「宮川」グループ

① 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）

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 主たる共同研究者：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

- ・脳内セロトニンが著明に低下している **Dpr** マウスにおける、脳内セロトニン減少メカニズムの解析および海馬歯状回ニューロン幼若化の解析
- ・注意欠陥多動性障害 (ADHD) のモデルとなることが報告されている **Nurr1** ヘテロノックアウトマウスにおける海馬歯状回ニューロン幼若化の解析
- ・神経終末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 主たる共同研究者：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。
- ・大脳皮質、海馬歯状回スライスのリン酸化解析システムの構築
- ・**in vivo** 条件でのマウス脳リン酸化シグナルの解析

・抗うつ薬慢性投与モデルでのドーパミン D1 受容体機能の解析

(4)「小林」グループ

- ① 主たる共同研究者：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 主たる共同研究者：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* マイクロダイアリシス法を用いて行う。

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

【研究の狙いと概要】

本研究は、網羅的行動テストバッテリーを用いてスクリーニングした精神疾患様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、分子生物学的、組織化学的手法をはじめとした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、精神疾患様の行動異常を示す 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) ヘテロノックアウト (HKO) マウス、Schnurri-2 (Shn2) KO マウスなどの 5 系統の遺伝子改変マウス、および抗うつ薬を慢性投与したマウスにおいて、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)を分子生物学的、電気生理学的、組織学的な解析により見出している。さらに、精神疾患患者の死後脳の遺伝子発現が、 α CaMKII HKO マウスの海馬の遺伝子発現と共通のパターンを示すことを明らかとし、これらは iDG が精神疾患の中間表現型である可能性が高いことを示唆している。このような解析結果をもとに、本年度は、遺伝子・タンパク発現解析、電気生理学的解析などを用いて、iDG に関与するメカニズムの解析を進めたほか、iDG をレスキューできる薬剤や遺伝子を新たに同定し解析を行っている。さらに iDG を示す Shn2 KO マウスの解析を進めた結果、前頭前皮質において統合失調症と共通した遺伝子発現パターンが見られることなどを新たに見出した。これは、iDG 以外の新たな精神疾患の中間表現型の存在を示唆するものであり、さらなる解析を進めている。

【進展状況と研究成果、今後の見通し】

1. 遺伝子改変マウスの網羅的行動解析:

- ・網羅的行動テストバッテリーを用いて、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、統合失調症様の行動異常を示す M4 アセチルコリン受容体(M₄R) KO マウスをはじめ、6 系統の遺伝子改変マウスの行動解析結果を報告した^{2,9-13}(宮川グループ;研究協力者、生理研、高雄)。
- ・セットアップを進めてきたマウス体外受精技術を基盤とした大規模飼育施設(日本科学未来館)にて、マウスの受精卵の凍結や繁殖時期の制御を行い、実験に必要な多系統の遺伝子改変マウスの飼育管理を効率的に行えるように改善を進めている(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:

- ・これまでの解析から iDG を生じていることが明らかとなっている遺伝子改変マウス(カルシニューリン(CN) KO マウス、 α CaMKII HKO マウス、Shn2 KO マウス、SNAP-25 ノックイン(KI) マウス)、抗うつ薬フルオキセチン慢性投与マウスを対象として、すでに実施しているゲノミクス解析、プロテオミクス解析に加え、新たにエピゲノミクス解析、メタボロミクス解析によるバイオマーカーの探索を進めている。エピゲノミクス解析では、海馬や前頭前皮質などにおける、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化を解析する予定である。未成熟歯状回を持つ複数系統の遺伝子改変マウスとヒト精神疾患患者の血漿に対してメタボローム解析を行い、両者の代謝産物(メタボライト)のプロフィールの分析を行っている。神戸大学・吉田優准教授(病因病態解析学・疾患メタボロミクス分野)らのグループとの共同研究によりこれを行う。同グループは各種質量分析計を用いた代謝産物の高感度の網羅的解析システムを有しており、血漿のメタボローム解析系も立ち上がっている。
- ・ジーンチップ解析で得られた歯状回の遺伝子発現量データから、機械学習アルゴリズムを用いて、活動量に長日周期的な変化をもつ α CaMKII HKO マウス、Shn2 KO マウスの過去(サンプリング前)の活動量変化の予測を試みた。本年度は、 α CaMKII HKO マウスにおいて歯状回の遺伝子発現パターンから、過去の一定期間における活動量の変化の定量的な予測を行うことに成功した。たいへん意外なことに予測式に含まれる歯状回の遺伝子の大半が時計遺伝子(Bmal1、Per2、Tef など)であった。これは、時計遺伝子が、既日リズムに関わる他に、長日周期と共に発現量が変化することを世界で初めて示す発見である。現在、これらの遺伝子発現制御に関わることを推測される cAMP にも着目して解析を進めている(研究協力者、ATR、神谷;宮川グループ)。また、血漿メタボローム解析を用いて、同様の予測を行うことが可能かについても解析を進めている(研究協力者、神戸大学、吉田;宮川グループ)。
- ・DNA アレイ解析およびプロテオミクス解析により Shn-2 KO マウスの前頭前皮質においてヒト 統合失調症患者の死後脳の前頭極と共通した遺伝子(100 種類)・タンパク発現パターンや、統合失調症と共通した脳波パターン(θ 波の増加と γ 波の低下)が見られること、さらに皮質の厚さが薄くなることなどが明らかとなってきた。精神疾患の新たな中間表現型の存在を示唆するものであり、解析をさらに進める(論文投稿中、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:

iDG を生じている精神疾患モデルマウスを対象として、電気生理、シグナル伝達の解析、各種組

組織学的・形態学的解析などにより、脳の生理学的、生化学的、形態学的特徴を解析した。また、各種の遺伝子導入や薬理学的手法を用いた表現型のレスキューの評価、新規モデルマウスや新しい中間表現系の探索を行った。

1) 表現型のレスキューの検討

- SNAP-25 KI 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 (Arc-Venus transgenic マウス) との掛け合わせで得られたマウスを用いて神経活動マッピングを行った結果、ワーキングメモリー課題の実施後、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。また同マウスで認められた未成熟歯状回及びワーキングメモリーの異常が、抗てんかん薬・バルプロ酸投与によってレスキューされることを明らかにした。バルプロ酸がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であることは、歯状回の成熟度変化にはエピジェネティックな制御が関与している可能性を示唆している (論文投稿中; 宮川グループ)。
- 抗うつ作用があることが報告されている麻酔薬ケタミンの急性・慢性投与により、野生型マウスにおいて iDG が誘導されるかも検討する。iDG をレスキューする遺伝子候補としては、CREB のドミナントネガティブ体や構成的活性体、Calb1 を *in vivo* で遺伝子導入し、表現型の再現やレスキューについて解析する (宮川グループ)。

2) 各精神疾患モデルマウスの解析

- これまでに、抗うつ薬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が脱成熟することを示したが、本年度は、同じ投与条件で歯状回-CA3 間のシナプス伝達に対するドパミンの修飾作用が顕著に亢進することを明らかにした⁷。その際ドパミン D₁ 様受容体の発現が歯状回と CA3 領域で選択的に上昇していた。この D₁ 様受容体発現変化は iDG を示す CaMKII α HKO マウスに見られた変化と酷似しており、D₁ 様受容体の発現変化が歯状回の成熟変化のマーカーとなる可能性を示唆している (小林グループ)。
- これまでに抗うつ薬フルオキセチンの慢性投与が、iDG 化を促進し、脳室下帯の神経新生を低下させるなど、成体神経新生に影響を与えることを報告した。本年度は、大脳新皮質1層抑制性神経前駆細胞 (L1-INP 細胞) の神経新生もフルオキセチン投与により調節されていることを明らかにした (論文投稿中、宮川グループ)。
- Shn-2 KO マウスの海馬では、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た。本年度は、Shn2 KO マウスに NMDA 受容体阻害剤・MK-801 を投与した時のモノアミンの変化を、脳内微量透析法により解析した。特に統計的な有意差は見られなかった (高橋、一瀬グループ)。

3) 新規 iDG 化マウスの探索

- ヒトで統合失調症の治療に用いられている電気けいれん刺激 (ECS) により、マウス海馬歯状回の成熟度が変化することを示唆する結果を得た。現在、詳細な電気生理学的解析を進めている (小林グループ)。宮川グループにおいても ECS 装置を導入し、遺伝子・タンパク発現解析、組織学的解析などを進める予定である。ECS による iDG のレスキューも検討を行う。
- 慢性拘束ストレスによっても野生型マウスにおいて、iDG が誘導されることを示唆する結果を得

た。遺伝子・タンパク発現解析、組織学的解析などを進める予定である(宮川グループ)。

- AMPA 受容体サブユニット(GluR1 と GluR2)が、成熟した歯状回顆粒細胞に発現すること、そして α CaMKII HKO マウスの歯状回でそれらの発現が顕著に減少していることを明らかにした¹(宮川グループ)。
- 脳内セロトニンが野生型の約 4 分の 1 に低下している Dpr-KO マウスと、多動を示すことが知られている Nurr1 ヘテロノックアウトマウスにおいて、iDG 化の有無を組織化学的に解析したが、野生型マウスと比べて大きな変化は観察されなかった(宮川、一瀬グループ)。

4) 新しい評価系の開発

- 精神疾患様の行動異常を示すマウスに慢性電極(Neurologger)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を解析する系を立ちあげている。本年度は、Shn2 KO マウスで、統合失調症と共通した脳波パターン(θ 波の増加と γ 波の低下)が見られることを明らかにした(論文投稿中、研究協力者:大阪バイオ、林;生理研、高雄;宮川グループ)。
- 未成熟歯状回ニューロン(顆粒細胞)の初代培養系の確立を進めている。共同研究者であるアステラス・アメリカの松本らは、マウスにおいて初代培養した神経前駆細胞を Calb1 陽性の成熟した神経細胞へと分化させる方法を確立しつつある。この方法を用い、iDG をもつ遺伝子改変マウスから神経前駆細胞を培養し、神経細胞へと分化させ、生細胞動態観察システムにより解析予定である(宮川グループ)。
- 精神疾患様の行動異常を示すマウスの脳サンプルを用いて、CN 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を解析するシステムの構築を進めている。本年度は、特に、ドーパミン D1 受容体を介する海馬歯状回機能調節の解析に重点的に取り組み、ドーパミン情報伝達のメカニズムを、ドーパミンシグナルの異常を示す遺伝子改変マウスを用いて解析した^{4,5}(西グループ)。
- 精神疾患と深い関わりを持つドーパミンニューロンにおいて、神経終末におけるドーパミン量の調節がどのようなメカニズムにより調節されているかを、ドーパミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)を黒質で選択的に遺伝子破壊することにより解析した。その結果、黒質で TH 遺伝子を破壊した後でも、神経終末の存在する線条体のドーパミン量は約 2 週間後までほとんど減少しないことがわかった。これは、神経終末におけるドーパミン量の高度な調節機構の存在を示唆している⁶(一瀬グループ)。

4. ヒト精神疾患での中間表現型探索:

精神疾患モデルマウスの脳における遺伝子・タンパク発現解析データを活用し、ヒト死後脳データベースと比較することにより、中間表現型に影響を与える分子の候補を探索した。また、ヒトと同じ霊長類であるマーモセットでの iDG 化解析や、ヒトでの解析を視野に入れた分子イメージング分野への応用を検討した。

- ヒトモデルである霊長類のマーモセットにおいて、抗うつ剤慢性投与や発達期のウイルス感染モデルを用いて、マーモセットでも iDG 化が起こるかどうかの検討を進めている。Calb1、

GluR1 の発現低下など、未成熟歯状回と共通した成熟度マーカー遺伝子の発現パターンを Poly I:C を用いた発達期ウイルス感染モデルのマーマセットにおいて確認した(研究協力者、京大霊長類研、中村;放医研、須原;宮川グループ)。

•ヒトの PET 解析により、行動異常・認知機能異常などを呈する疾患との関連を検討するため、探索したバイオマーカーと結合する放射性プローブの作成を検討している(研究協力者、放医研、須原;宮川グループ)。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Hideo Hagihara, Koji Ohira, Keiko Toyama, Tsuyoshi Miyakawa, “Expression of the AMPA Receptor Subunits GluR1 and GluR2 is Associated with Granule Cell Maturation in the Dentate Gyrus”, *Front Neurogenesis*, Vol. 5, 100, 2011 (DOI: 10.3389/fnins.2011.00100)
2. Hisatsugu Koshimizu, Yasuyuki Fukui, Keizo Takao, Koji Ohira, Koichi Tanda, Kazuo Nakanishi, Keiko Toyama, Masanobu Oshima, Makoto Mark Taketo, Tsuyoshi Miyakawa, “Adenomatous polyposis coli heterozygous knockout mice display hypoactivity and age-dependent working memory deficits”, *Front Behav Neurosci*, Vol. 5, 85, 2011 (DOI: 10.3389/fnbeh.2011.00085)
3. Hirotaka Shoji, Hideo Hagihara, Keizo Takao, Satoko Hattori, Tsuyoshi Miyakawa, “T-maze Forced Alternation and Left-right Discrimination Tasks for Assessing Working and Reference Memory in Mice”, *J Vis Exp*, 60, e3300, 2011, (DOI: 10.3791/3300.)
4. Tomoyuki Mitsumori, Tomoyuki Furuyashiki, Toshihiko Momiyama T, Akinori Nishi, Takahide Shuto, Takashi Hayakawa, Fumitaka Ushikubi, Shiho Kitaoka, Tomohiro Aoki, Haruhisa Inoue H, Toshiyuki Matsuoka T, Shuh Narumiya, “Thromboxane receptor activation enhances striatal dopamine release, leading to suppression of GABAergic transmission and enhanced sugar intake”, *Eur J Neurosci*, Vol. 34, 4, pp.594-604, 2011 (DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07774.x)
5. Mahomi Kuroiwa, Gretchen L. Snyder, Takahide Shuto, Atsuo Fukuda, Yuchio Yanagawa, David R. Benavides, Angus C. Nairn, James A. Bibb, Paul Greengard, Akinori Nishi, “Phosphodiesterase 4 inhibition enhances the dopamine D1 receptor/PKA/DARPP-32 signaling cascade in frontal cortex.” *Psychopharmacology*, Vol. 291, 4, pp. 1065-1074, 2011 (DOI: 10.1007/s00213-011-2436-8)

6. Hirofumi Tokuoka, Shin-ichi Muramatsu, Chiho Sumi-Ichinose, Hiroaki Sakane, Masayo Kojima, Yoshinori Aso, Takahide Nomura, Daniel Metzger, and Hiroshi Ichinose, “Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection”, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, pp.43549-43558, 2011 (DOI: 10.1074/jbc.M111.284729)
7. Katsunori Kobayashi, Eisuke Haneda, Makoto Higuchi, Tetsuya Suhara, Hidenori Suzuki, “Chronic fluoxetine selectively upregulates dopamine D₁-like receptors in the hippocampus”, *Neuropsychopharmacology*, (in press) (DOI:10.1038/npp.2011.335)
8. Huxing Cui, Brittany L. Mason, Charlotte Lee, Akinori Nishi, Joel K. Elmquist, Michael Lutter. “Melanocortin 4 receptor signaling in dopamine 1 receptor neurons is required for procedural memory learning”, *Physiol Behav.* Vol.106. No. 1, pp. 201-210, 2012 (DOI:10.1016/j.physbeh.2012.01.025)
9. Hirotaka Shoji , Keiko Toyama, Yoshihiro Takamiya, Shigeharu Wakana, Yoichi Gondo, Tsuyoshi Miyakawa. “Comprehensive behavioral analysis of ENU-induced Disc1-Q31L and -L100P mutant mice”, *BMC Res Notes.* Vol.5. No. 1, Article 108, 2012 (DOI:10.1186/1756-0500-5-108)
10. Hisatsugu Koshimizu, Lorene M Leiter, Tsuyoshi Miyakawa, “M4 muscarinic receptor knockout mice display abnormal social behavior and decreased prepulse inhibition”, *Mol Brain*, (in press) (DOI: 10.1186/1756-6606-5-10)
11. Taku Kaitsuka, Sheng-Tian Li, Kenji Nakamura, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Masayuki Matsushita, “Forebrain-specific constitutively active CaMKKα transgenic mice show deficits in hippocampus-dependent long-term memory”, *Neurobiol Learn Mem*, Vol. 96, 2, pp.238-247, 2011 (DOI: 10.1016/j.nlm.2011.04.017)
12. Hiroki Takeuchi, Mishiyo Iba, Haruhisa Inoue, Makoto Higuchi, Keizo Takao, Kayoko Tsukita, Yoshiko Karatsu, Yumiko Iwamoto, Tsuyoshi Miyakawa, Tetsuya Suhara, John Q. Trojanowski, Virginia M.-Y. Lee, Ryosuke Takahashi, “P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating”, *PLoS One*, Vol. 6, 6, e21050, 2011 (DOI: 10.1371/journal.pone.0021050)
13. Yoshihisa Watanabe, Atushi Tsujimura, Keizo Takao, Kazunori Nishi, Yasuaki Ito, Yoshitaka Yasuhara, Yasuhito Nakatomi, Chihiro Yokoyama, Kenji Fukui, Tsuyoshi Miyakawa, Masaki Tanaka, “Relaxin-3-deficient mice showed slight alteration in anxiety-related behavior”, *Front Behav Neurosci*, Vol. 5, 50, 2011 (DOI: 10.3389/fnbeh.2011.00050)
14. Suhail Asrar, Keiko Kaneko, Keizo Takao, Jaina Negandhi, Makoto Matsui, Koji

Shibasaki, Tsuyoshi Miyakawa, Robert V Harrison, Zhengping Jia, Michael W Salter, Makoto Tominaga M, Tomoko Fukumi-Tominaga, “DIP/WISH deficiency enhances synaptic function and performance in the Barnes maze”, *Mol Brain*, Vol. 4, Article 39, 2011 (DOI: 10.1186/1756-6606-4-39)