

「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

H23 年度 実績報告

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. 研究実施体制

(1)「内匠」グループ(広島大学)

① 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)

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 主たる共同研究者: 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

(2)「鈴木」グループ(日本医科大学)

① 主たる共同研究者: 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

§ 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)

(内匠グループ)

ヒト染色体15q11-13相同領域であるマウス染色体7番の重複マウスを作製した。本マウスは社会的相互作用の障害、超音波啼鳴数の発達異常、固執的常同様行動等の自閉症様行動を示し、表現型妥当性をみたすだけでなく、自閉症の原因となる染色体異常をヒトと同じ型で有するという構成的妥当性をもみたすヒト型モデルマウスである¹⁾。

エピジェネティック関連解析では、1)ChIP-seqによる小脳におけるH3K4me3の解析:H3サブユニットの4番目リジンのトリメチル化(H3K4me3)は発生期より遺伝子発現活性化に関与し、脳機能に関与する遺伝子や自閉症への関連が示唆されている。これまでに小脳におけるセロトニンの関与が示唆されたため、10週齢マウスにおいてH3K4me3に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、次世代シーケンサーにより解析を行った(ChIP-seq)。Refseq上の転写開始領域周囲1Kbおよび、その他のenrichされた領域の周囲2Kbについて比較を行った。patDp/+マウスにおいて染色体7c重複領域上の遺伝子の転写開始領域近傍のH3K4me3修飾は2倍程度の明確な差が認められた。他の領域は明確な差が認められなかった。2)ウエスタンブロッティングによるヒストンH3修飾解析:PatDp/+マウスと野生型マウスにおけるヒストン修飾の違いを明らかにするため、ヒストンH3修飾に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。遺伝子発現活性化に関与するH3K4me3およびH3のアセチル化(H3Ac)、遺伝子発現抑制に関与するH3の27番目リジンのトリメチル化(H3K27me3)を認識する抗体を用い、10週齢マウスの小脳、中脳、橋/延髄および海馬について4サンプルずつを用いて解析を行った。patDp/+マウスと野生型マウスに明確な差は認められなかった。3)軽微なストレス負荷後における免疫組織化学によるヒストンH3修飾解析:オープンフィールド試験後のマウスにおけるヒストン修飾状態の解析を行った。10週齢マウスを用いて30分間の試験を行った。過去の報告と同様に、patDp/+においてオープンフィールド装置の中央付近に滞在する時間が優位に低く、新規環境下における不安度が高いことが示された。試験後のマウスを一定時間後にかん流固定を行い、海馬周辺の30um厚の切片を作成し、H3K4me3、H3K27me3およびH3Acに対する抗体で一次抗体処理を行い、DAB染色にて検出を行った。1サンプルにつき2-3枚程、各群3サンプルずつ染色を行い、染色像の相対濃度定量を行った。patDp/+マウスの海馬CA1領域の顆粒細胞層においてH3Acが濃く染色され、有意差が認められた。4)MBII-52ノックダウン細胞のトランスクリプトーム解析:patDp/+マウスの染色体重複領域内に存在する核小体内RNAは自閉症様行動に重要な役割を担っていると考えられているがその機能は完全に解明されていない。snoRNAの一つであるMBII-52のノックダウンを行い、影響を受ける遺伝子を明らかにし、標的分子の同定を試みた。胎生16.5日齢の胎児マウス由来の海馬初代培養細胞にMBII-52に対する修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドをヌクレオフェクションにより導入し、効率的なMBII-52発現抑制が可能な実験系を確立した。アンチセンスオリゴ導入後48時間培養した細胞より抽出したtotal RNAよりmRNAを精製し、mRNA-seqを行った。ノックダウ

ンおよびコントロール群各 4 サンプルを用いて行った。97 遺伝子について変動がみられた。また、MBII-52 は RNA editing への関与が示唆されている。未知の標的の探索を試み、MBII-52 と相補的な配列を持つ領域について塩基置換が認められる部位を検索し、18 か所の候補を絞り込んだ。

(山本グループ)

身体活動時系列による精神疾患の客観的評価手法の開発と数理モデル化

精神行動異常の客観的評価方法の確立を目的に、陰性症状を持つ統合失調症患者の身体活動データの解析を行った。行動組織化解析の結果、大うつ病性障害患者と同様な低活動期間の系統的な増加を確認した。一方、うつ病患者とは違い、高身体活動の継続性の増加を確認した。これらのことは、両疾患で低活動・不活動期間の増加という日内身体活動の特徴変化は共有されているものの、活動の継続性が病態の違いを反映していること、さらに、日内行動リズムの解析が精神行動異常を伴う様々な疾患へ適用可能であることを示唆する。

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、記録前後の身体活動度の統計量との共変性を検討し、回帰モデルの構築とその妥当性の評価を行った。健常成人を対象に、個人内・個人間変動を考慮した統計モデル(マルチレベルモデル)を検討した結果、局所平均値と歪度を予測子としたモデルが最適モデルであることを確認した(平均値とは負の相関、歪度とは正の相関)。このモデルは、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(間欠性の増大)を反映するモデルであった。さらに、中高生とうつ病患者を対象に同定したモデルの交差妥当性を検討し、構築モデルの妥当性・有用性を確認した。

また、昨年度同様、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治療もしくは薬剤治療過程における行動と症状の経時的データの計測および広汎性発達障害患者のデータ収集を行った。さらに、急速交代型の双極性障害患者について長期間(6ヶ月程度)の連続データ計測を開始した。

(鈴木グループ)

1) 電気生理学的検討

patDp/+マウスを用いた生化学的な先行研究では、脳内セロトニン濃度の低下が示されている。そこで、セロトニン神経細胞が多く分布しており、小脳、間脳、大脳皮質や辺縁系など広く中枢神経系に軸索を投射している中脳背側縫線核(DRN)を電気生理学的研究の関心領域とした。この領域における神経細胞あるいはシナプス修飾作用などを野生型と比較検討することにより、自閉症モデルマウスに見られる「低セロトニン状態」のメカニズムを解明して、薬物治療の方針を明確にすることを目的にした。低セロトニン状態を引き起こす可能性は、これまでの DRN およびシナプスの先行研究から以下の項目を調べることにした。

- ① セロトニン神経細胞の興奮性減少
- ② 自己受容体によるセロトニン神経細胞の興奮性減少

①: 5~6 週齢のマウスを用いて DRN における神経細胞の膜特性(静止膜電位、膜入力抵抗)や活動電位発生に関わる因子(閾値、活動電位幅、入力-出力関係)を電流固定法により調べた。セロトニン神経細胞と非セロトニン作動性神経細胞は記録終了後に tryptophan hydroxylase の免疫染色により判別した。活動電位の半値幅、静止膜電位、膜入力抵抗や活動電位の発射頻度で、これまでの先行研究と同様に細胞の種類による差異が見られた。しかし、それぞれの遺伝子型では有意な差を認めなかった。

②: セロトニン神経は自らが放出するセロトニンにより、セロトニン放出量を調整するために自己受容体(5-HT_{1A} 受容体)を細胞体および近位の樹状突起に発現している。そこで、この自己受容体の発現量あるいは性質が異なることによりセロトニン神経細胞の興奮性に差がないかを検討した。膜電流固定下に 5 μM セロトニンを灌流投与することにより、多くのセロトニン神経細胞で外向き電流を見ることが出来た。この反応を遺伝子型で比較すると、これまでの実験例から有意な差を認めないまでも、傾向として patDp/+マウスの方が自己受容体を介する応答が大きいことが分かった。しかし、実際、セロトニン受容体は細胞間で不均一に発現していると考えられ、セロトニンで仲介される膜電流応答は自己受容体を介する応答だけでなく、反対の応答を引き起こす受容体も活性化させてしまうことも確認した。そこで、自己受容体の 5-HT_{1A} 受容体特異的アゴニストを用いて検討したところ、セロトニン投与と同様に patDp/+マウスの方が反応性が高い傾向がみられ、現在さらに解析を進めている。

更に、小脳においてもセロトニンの入力を強力に受けていることから、アミン系の修飾を受ける新たな細胞群について他の細胞群と比較検討した。Globular cell はこれまで生理学的に検討されてこなかったが、この細胞群を形態的に同定し、顕著な抑制性入力を受け、セロトニンやノルアドレナリンの適用で発火頻度が上昇することを明らかにした。Globular cell はプルキンエ細胞から単シナプス入力を受けており、プルキンエ細胞間の活動調整に関与している可能性が示唆された⁽²⁾。自閉症モデルマウスにおいて今後解析を進める予定である。

2) 行動薬理的検討

自閉症の発症機構仮説の一つに胎生期におけるウイルス感染やストレスがあるが、遺伝的素因がこうした外的因子によって影響を受け、その精神表出系としての行動が増悪あるいは修飾される可能性については明らかにされていない。この外的要因と内的要因の相互作用は発達障害疾患を理解する上で重要と考えられる。従って patDp/+マウスを用いて、感染を擬似する薬物処置を母体に行い、出生した仔の行動解析を行った。リポ多糖(LPS)を胎生 17 日に母体に投与し、母胎内細菌感染を擬似した。出生した patDp/+仔マウスを生後 7~10 週の時点において、複数の行動学的検討を行った。LPS 処置によって高架十字迷路における不安様行動の増加および恐怖条件付け試験における音条件刺激に対するすくみ行動の増加が、patDp/+および野生型マウスにおいて観察されたが、その程度は同等であった。社会性行動試験でも明らかな LPS の効果は見られなかった。続いて、ウイルス感染を擬似する polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C))を胎生 12.5 日に母体に投与し、同様に生後 7~10 週の時点において、複数の行動学的検討を行った。社会性行動試験において poly(I:C)は patDp/+マウスに明らかな行動変化の修飾を引き起こさな

った。以上の結果より、本実験系では胎生期の感染が遺伝的素因をもつ個体に対し相乗的に行動異常を増悪しなかった。しかしながら、薬物処理の時期および量等に関しては今後の検討事項である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Toru Takumi, “ The neurobiology of mouse models syntenic to human chromosome 15q”, *Journal of Neurodevelopmental Disorder*, Vol. 3, pp270-281, 2011
(DOI: 10.1007/s11689-011-9088-1)
2. Hirono M, Saitow F, Kudo M, Suzuki H, Yanagawa Y, Yamada M, Nagao S, Konishi S, Obata K. Cerebellar Globular Cells Receive Monoaminergic Excitation and Monosynaptic Inhibition from Purkinje Cells. *PLoS ONE*, 7: e 29663. (2012)
(DOI:10.1371/journal.pone.0029663)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)