

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18379

研究課題名(和文) 時期特異的カルシニューリン活性制御による統合失調症様表現型の探索

研究課題名(英文) Investigation of schizophrenia-like behavioral phenotypes in mice with temporal regulation of calcineurin activity

研究代表者

中尾 章人(Nakao, Akito)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：30748926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：前脳特異的なカルシニューリン欠損マウスは、顕著な作業記憶の障害、活動量の亢進などの統合失調症様の表現型異常を示すことから、妥当性の高い統合失調症モデルマウスであると考えられる。本研究では、カルシニューリン機能の低下がどの時期にどの程度の期間続くことが種々の統合失調症様の表現型異常を引き起こすのかを明らかにするため、カルシニューリン活性を発達期まで低下させ、その後活性を変化させ行動解析を行った。検討の結果、活動量の変化は、発達期後のカルシニューリン活性と関連がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Forebrain-specific calcineurin knockout mice show schizophrenia-like behavioral phenotypes such as impaired working memory and increased locomotor activity. In the present study, we examined the effects of the change of calcineurin activity during the developmental stage using tetracycline-regulated gene expression system. Behavioral analyses suggest that calcineurin activity after the developmental stage may be involved in increased locomotor activity.

研究分野：神経科学

キーワード：精神疾患 モデルマウス 行動解析

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、遺伝的・環境的要因が関与する多因子疾患と考えられているが、その病因・病態は未だに明らかにされていない。現在、統合失調症の病因解明のため、世界中で遺伝子改変マウスを用いた各種の解析が進められている。申請者の所属研究室では、国内外の研究室との共同研究により、190 系統以上のマウスに対して網羅的行動テストバッテリーを行い、複数系統のマウスが共通して顕著な作業記憶の障害、活動量の亢進などの統合失調症様の表現型異常を示すことを明らかにしてきた (Takao et al., 2013; Yamasaki et al., 2008)。同時に、それらのマウスに共通して成体の脳であるにも関わらず、海馬歯状回の神経細胞の大多数が擬似的な未成熟状態にある「未成熟歯状回」という現象を見出している (Takao et al., 2013; Yamasaki et al., 2008)。上記の統合失調症様の行動異常を示す遺伝子改変マウスとして、前脳特異的なカルシニューリン欠損マウスが報告されている (Miyakawa et al., 2003; Zeng et al., 2001)。ヒトのサンプルを用いた疾患研究においても、カルシニューリン遺伝子は統合失調症との関連が示唆されており (Gerber et al., 2003; Liu et al., 2007; Yamada et al., 2007)、統合失調症患者の死後脳ではカルシニューリンの発現が mRNA、タンパクレベルで減少していることが報告されている (Eastwood et al., 2005)。これらのことから、前脳特異的なカルシニューリン欠損マウスは、妥当性の高い統合失調症モデルマウスであると考えられる。

### 2. 研究の目的

カルシニューリンは、神経の発達 (Graef et al., 2003) や長期抑圧など成体のリアルタイムの神経機能 (Jurado et al., 2010; Mulkey et al., 1994) にも重要な役割を果たしているが、これまでの研究で用いられたカルシニューリン欠損マウスは、生後からカルシニューリンの機能が欠損しており、どの時期のカルシニューリン機能の低下がこれらの行動異常や脳内異常をもたらしているのかは不明であった。そこで本研究では、時期特異的に前脳におけるカルシニューリンの機能を低下させることが可能なマウスを用いることにより、カルシニューリン機能の低下がいつ、どのくらいの期間持続することが、作業記憶の障害や活動量の亢進等の統合失調症様の行動異常に関与するのかを探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 時期特異的なカルシニューリン機能低下マウスの作製：本研究では、カルシニューリンの触媒サブユニットに結合することで、カルシニューリンを不活性化することが知られている Zaki4 (Mizuno et al., 2004) の発現を tetracycline OFF システムにより調節

することで、前脳のカルシニューリン機能を時期特異的に調整可能なマウスを用いた。Tetracycline 発現誘導システムでは、tetracycline 誘導体の doxycycline (Dox) 投与/除去により、転写活性因子 tTA を不活性化/活性化することで、標的遺伝子の発現の可逆的に制御が可能である。同システムを用いて、カルシニューリンの機能を時期特異的に制御するため、tetOFF-Zaki4 マウスを作製し、CamkIIa 遺伝子のプロモーターにより tTA を前脳特異的に発現する CamkIIa-tTA マウスとかけあわせることにより、時期特異的にカルシニューリン機能を低下させることが可能な tTA/Zaki4 ダブルトランスジェニックマウスを得た。

(2) 網羅的行動テストバッテリーを用いた時期特異的なカルシニューリン機能低下マウスの行動解析：本研究では、どの時期のカルシニューリン機能低下が、統合失調症様行動異常に関与しているのかを調べるため、上記の tTA/Zaki4 ダブルトランスジェニックマウスを用いた。統合失調症が思春期から青年期に発症することが多いことに着目し、発達期のカルシニューリン機能低下に付随して起こる行動異常を同定するため、胎生期から発達期まで薬剤投与せず、発達期以降(生後 9 週齢頃～)に doxycycline を投与/除去することにより、時期特異的にカルシニューリン機能を制御したマウスを用いて網羅的行動解析を行った。この解析は、感覚、運動、情動、学習・記憶、社会的行動など、様々な行動の領域で用いられている代表的なテストを組み合わせた行動試験であり、効率よく行動異常の検出を行うことを意図した。

### 4. 研究成果

Doxycycline 投与によりカルシニューリン活性を時期特異的にコントロールできるマウス (tTA/Zaki4 ダブルトランスジェニックマウス) を使用するため、大量の掛け合わせを行った。目的のマウスは、tTA-Zaki マウスと CamkIIa-tTA マウスの掛け合わせで得られるために 2 種類の遺伝子改変マウスの掛け合わせが必要であり、使用するマウスの繁殖過程において産仔数の確保に想定外の時間を要したが、最終的には実験に必要な匹数を確保することができた。

tTA/Zaki4 ダブルトランスジェニックマウスは、doxycycline を与えない限り Zaki4 が発現するため、カルシニューリン活性が抑制された状態にある。このマウスを用いて以下の行動テストを行った。8 方向放射状迷路テストでは作業記憶の減弱傾向が観察され、高架式十字迷路テストやポーソルト強制水泳テストでは活動量の増加傾向が観察された。これらの結果は、前脳特異的なカルシニューリン欠損マウスの表現型と整合性の高いものであった。聴覚性驚愕反応・プレパルス抑制テストでは、驚愕反応の減弱が観察され、

プレパルス抑制に差はなかった。

繁殖させた tTA/Zaki4 ダブルトランスジェニックマウスを用いて、カルシニューリン活性を発達期（約8週齢）まで低下させた後に、doxycycline の投与の有無によりカルシニューリン活性を変化させ網羅的行動解析を行った。オープンフィールドテストや高架式十字迷路テストにおける活動量の増加は、発達期後のカルシニューリン活性と関連がある可能性が示唆された。しかしながら、今回の実験ではカルシニューリンの活性変化に以外に性差や doxycycline の有無等に起因すると考えらるデータのバラツキにより作業記憶等については明確な傾向を得る事は出来なかった。

#### <引用文献>

- Eastwood, S.L., Burnet, P.W.J., and Harrison, P.J. (2005). Decreased hippocampal expression of the susceptibility gene PPP3CC and other calcineurin subunits in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* *57*, 702-710.
- Gerber, D.J., Hall, D., Miyakawa, T., Demars, S., Gogos, J.A., Karayiorgou, M., and Tonegawa, S. (2003). Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8993-8998.
- Graef, I.A., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M., and Crabtree, G.R. (2003). Neurotrophins and Netrins Require Calcineurin/NFAT Signaling to Stimulate Outgrowth of Embryonic Axons. *Cell* *113*, 657-670.
- Jurado, S., Biou, V., and Malenka, R.C. (2010). A calcineurin/AKAP complex is required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Nat. Neurosci.* *13*, 1053-1055.
- Liu, Y.L., Fann, C.S.J., Liu, C.M., Chang, C.C., Yang, W.C., Hung, S.I., Yu, S.L., Hwang, T.J., Hsieh, M.H., Liu, C.C., et al. (2007). More evidence supports the association of PPP3CC with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* *12*, 966-974.
- Miyakawa, T., Leiter, L.M., Gerber, D.J., Gainetdinov, R.R., Sotnikova, T.D., Zeng, H., Caron, M.G., and Tonegawa, S. (2003). Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8987-8992.
- Mizuno, Y., Kanou, Y., Rogatcheva, M., Imai, T., Refetoff, S., Seo, H., and Murata, Y. (2004). Genomic organization of mouse ZAKI-4 gene that encodes ZAKI-4 alpha and beta isoforms, endogenous calcineurin inhibitors, and changes in the expression of these isoforms by thyroid hormone in adult mouse brain and heart. *Eur. J. Endocrinol.* *150*, 371-380.
- Mulkey, R.M., Endo, S., Shenolikar, S., and Malenka, R.C. (1994). Involvement of a calcineurin/ inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* *369*, 486-488.
- Takao, K., Kobayashi, K., Hagihara, H., Ohira, K., Shoji, H., Hattori, S., Koshimizu, H., Umemori, J., Toyama, K., Nakamura, H.K., et al. (2013). Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* *38*, 1409-1425.
- Yamada, K., Gerber, D.J., Iwayama, Y., Ohnishi, T., Ohba, H., Toyota, T., Aruga, J., Minabe, Y., Tonegawa, S., and Yoshikawa, T. (2007). Genetic analysis of the calcineurin pathway identifies members of the EGR gene family, specifically EGR3, as potential susceptibility candidates in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 2815-2820.
- Yamasaki, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kajii, Y., Maeda, J., Soma, M., Takao, K., Tanda, K., Ohira, K., Toyama, K., et al. (2008). Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders. *Mol. Brain* *1*, 6.
- Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M., Rondi-Reig, L., Philpot, B.D., Miyakawa, T., Bear, M.F., and Tonegawa, S. (2001). Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* *107*, 617-629.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

- (1) Decreased Brain pH as a Shared Endophenotype of Psychiatric Disorders. Hideo Hagihara, Vibeke S Catts, Yuta Katayama, Hirotaka Shoji, Tsuyoshi Takagi, Freesia L Huang, Akito Nakao, Yasuo Mori, Kuo-Ping Huang, Shunsuke Ishii, Isabella A Graef, Keiichi I Nakayama, Cynthia Shannon Weickert and Tsuyoshi Miyakawa *Neuropsychopharmacology*, 43, 459-468 (2018). 査読有 doi: 10.1038/npp.2017.167.
- (2) Immature morphological properties in subcellular-scale structures in the dentate gyrus of Schnurri-2 knockout mice: a model for schizophrenia and intellectual disability. Akito Nakao, Naoyuki Miyazaki, Koji Ohira, Hideo Hagihara, Tsuyoshi Takagi, Nobuteru Usuda, Shunsuke Ishii, Kazuyoshi Murata and Tsuyoshi Miyakawa *Mol. Brain*, 10, 60 (2017). 査読有 doi: 10.1186/s13041-017-0339-2.
- (3) Screening of TRPC Channel Activators Identifies Novel Neurotrophic Piperazine Compounds. Seishiro Sawamura, Masahiko Hatano, Yoshinori Takada, Kyosuke Hino, Tetsuya Kawamura, Jun Tanikawa, Hiroshi Nakagawa, Hideharu Hase, Akito Nakao, Mitsuru Hirano, Rachapun Rotrattanadumrong, Shigeki Kiyonaka, Masayuki X. Mori, Motohiro Nishida, Yaopeng Hu, Ryuji Inoue, Ryu Nagata, and Yasuo Mori *Mol. Pharmacol.*, 89, 348-363 (2016). 査読有 doi: 10.1124/mol.115.102863.
- (4) Comprehensive behavioral analysis of voltage-gated calcium channel beta-anchoring and -regulatory protein knockout mice. Akito Nakao, Takafumi Miki, Hirotaka Shoji, Miyuki Nishi, Hiroshi Takeshima, Tsuyoshi Miyakawa, and Yasuo Mori *Front. Behav. Neurosci.* 9, 141 (2015). 査読有 doi: 10.3389/fnbeh.2015.00141.
- (5) Compromised maturation of GABAergic inhibition underlies abnormal network activity in the hippocampus of epileptic Ca<sup>2+</sup> channel mutant mice, *tottering*. Akito Nakao, Takafumi Miki, Hiroo Ogura, Ken Shimono, Hiroaki Oka, Tomohiro Numata, Shigeki Kiyonaka, Kaori Matsushita, Tetsuhiro Niidome, Jeffrey L. Noebels, Minoru Wakamori, Keiji Imoto, and Yasuo Mori *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 467, 737-752 (2015). 査読有 doi: 10.1007/s00424-014-1555-6.
- 〔学会発表〕(計 10 件)
- (1) 中尾章人、高雄啓三、大平耕司、宮崎直幸、村田和義、宮川剛 統合失調症モデル Schnurri-2 ノックアウトマウスの歯状回顆粒細胞における三次元電子顕微鏡解析 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年
- (2) Akito Nakao, Keizo Takao, Koji Ohira, Naoyuki Miyazaki, Kazuyoshi Murata, Tsuyoshi Miyakawa Three-dimensional analysis of dendritic spines and mitochondria in dentate gyrus granule cells in Schnurri-2 knockout mice, an animal model for schizophrenia Society for Neuroscience's 46th annual meeting, 2016
- (3) Akito Nakao, Keizo Takao, Koji Ohira, Naoyuki Miyazaki, Kazuyoshi Murata, Tsuyoshi Miyakawa Three-dimensional analysis of dendritic spines and mitochondria in dentate gyrus granule cells in Schnurri-2 knockout mice, an animal model for schizophrenia 15th Annual Molecular and Cellular Cognition Society Meeting, 2016
- (4) Akito Nakao, Keizo Takao, Koji Ohira, Naoyuki Miyazaki, Kazuyoshi Murata, Tsuyoshi Miyakawa Three-dimensional analysis of morphological changes in dendritic spines and mitochondria in dentate gyrus granule cells in Schnurri-2 knockout mice, an animal model for schizophrenia 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, 2016
- (5) 中尾章人、高雄啓三、大平耕司、宮崎直幸、村田和義、宮川剛 Three-dimensional analysis of morphological changes in dendritic spines and mitochondria in dentate gyrus granule cells in Schnurri-2 knockout mice, an animal model for schizophrenia 46th Annual Meeting of Japanese Society of Neuropsychopharmacology, 2016 年
- (6) 中尾章人、昌子浩孝、森泰生、宮川剛 BARP ノックアウトマウスの網羅的行動解析 BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会), 2015 年
- (7) Akito Nakao, Takafumi Miki, Hirotaka Shoji, Yasuo Mori, Tsuyoshi Miyakawa Comprehensive behavioral analysis of voltage-gated calcium channel beta-anchoring and -regulatory protein (BARP) knockout mice The Society for Neuroscience 45th Annual Meeting, 2015
- (8) Akito Nakao, Takafumi Miki, Hirotaka Shoji, Yasuo Mori, Tsuyoshi Miyakawa

Comprehensive behavioral analysis of voltage-gated calcium channel beta-anchoring and -regulatory protein (BARP) knockout mice 14th Annual Molecular and Cellular Cognition Society Meeting, 2015

- (9) 中尾章人、昌子浩孝、森泰生、宮川剛 新規カルシウムチャネル結合分子 BARP は精神疾患様の行動異常に關与する 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年
- (10) 中尾章人 電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルの脳高次機能における役割の解明 生理学研究所研究会「シナプスの構造構築と機能発現の分子基盤」, 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中尾 章人 (NAKAO, Akito)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号: 30748926