

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K17628

研究課題名（和文）GABA神経系と免疫系の相互作用解析に基づく統合失調症の病態解明

研究課題名（英文）Pathophysiology of schizophrenia based on analysis of the interaction between the GABAergic system and the neuroimmune system

研究代表者

藤原 和之（Kazuyuki, Fujihara）

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20735154

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：統合失調症の死後脳ではGABA合成酵素GAD67の発現低下が見られる。本研究ではゲノム編集法を用いてモデル動物（ラット）において人工的にGAD67を欠損させた（GAD67KO）。GAD67KOラットの33%程度は成獣まで発育することができ、その後の死亡率は野生型のラットと変化がない。そこでこのラットの行動を解析したところ、認知機能障害や活動量の変化など、統合失調症と関連のある表現型が認められた。この新規モデル動物の脳内を調べたところ、大脳皮質の免疫担当細胞の形状が変化していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症はその原因・病態が完全には明らかになっていない。その解明は新たな治療法の開発にも繋がると考えられ、社会的な意義も大きい。本研究では統合失調症の新たなモデル動物（GAD67KOラット）を作製することに成功した。このモデル動物はGABA神経系に注目して作られたものであるが、その他の神経システムなど（神経免疫系）にどのような影響があるかなど、ヒトでは立証困難な因果関係を解析できるツールとなることが期待できる。学術的には、精神疾患のモデル動物としてだけでなく、GABA神経系の機能を解明する上でも利用できると思われる。

研究成果の概要（英文）：GAD67, one of the GABA synthetic enzymes, is downregulated in the postmortem brains of patients with schizophrenia. In the present study, GAD67 was artificially deleted in model animals (rats) using a genome editing method (GAD67KO rats). 33% of GAD67KO rats were able to develop to adulthood, and the subsequent mortality rate was not different from that of wild-type rats. Therefore, we analyzed the behavior of these rats and found phenotypes associated with schizophrenia, including cognitive impairments and altered activity levels. Histological examination revealed morphological changes of the microglia in GAD67 KO rats.

研究分野：精神神経科学

キーワード：ゲノム編集 GABA ノックアウトラット

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は幻覚、妄想、まとまりのない言動、陰性症状、認知機能障害といった症状を示す精神疾患である。臨床的には既知の器質的疾患や薬物の影響が除外された場合に診断され、その病態生理には不明な点が多い。近年、統合失調症の患者死後脳では、抑制性神経伝達物質である GABA の合成酵素 (グルタミン酸脱炭酸酵素 67 kDa アイソフォーム: GAD67) の発現が低下していることが注目されるようになった (Hashimoto et al., 2003)。特に統合失調症の認知機能障害との関連が仮説として提案されてはいたが、因果関係については不明であった。

一方、GABA は、神経伝達物質のみならず免疫調節因子としても働くことが明らかになりつつある (Kuhn et al., 2004; Barragan et al., 2015)。統合失調症では前述の通り GABA 合成酵素 (GAD67) の減少が報告されているが、GABA の生合成低下は神経活動に直接影響するだけでなく、神経免疫系を介してその病態に関与している可能性がある。

本研究課題ではこれらの問題について新規モデル動物を用いて取り組んだ。

## 2. 研究の目的

GAD67 の発現低下があるからといって、それが実際に疾患を引き起こしているのか否かは、観察研究である死後脳研究では検証が難しい。ヒトで因果関係を立証することは現在の科学水準では困難を極めるが、次善の策としてモデル動物を用いることが考えられる。このような場合に頻用されるのが、当該遺伝子のノックアウト動物を作製し、その表現型を解析することである。従来、遺伝子改変動物の作製は主にマウスが使用されてきた。しかし、GAD67 ノックアウトマウスは口蓋裂や呼吸不全を示し、誕生日に死亡してしまう (Asada et al., 1999)。成獣まで成長できない以上、行動学的表現型の解析 (つまり精神疾患のモデルとなり得るか否かの検討) は不可能であった。しかし最近、ゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) の進歩により、マウス以外でもノックアウト動物の作製が簡便にできるようになった。我々は、2 種類存在する GABA 合成酵素 (GAD67 と GAD65) の発現比率がマウスとラットで異なることに注目し、GAD67 ノックアウトラットを新たに作製し、新規統合失調症モデル動物として確立することを目指した。このモデル動物が作製できたなら、その脳組織を調べ、GAD67 欠損による神経免疫系への影響を解析することも可能となる。

## 3. 研究の方法

Gad1(-/-)ラットの作製 (GAD67KO ラットとも呼称されるがここでは Gad1(-/-)ラットと統一する): CRISPR/Cas9 法を用いて、Long-Evans ラットの Gad1 遺伝子 (GAD67 遺伝子) の第 6 エクソンを破壊した。まずヘテロ接合体 Gad1(+/-)ラットを取得し、その雌雄を交配させ、対照群の野生型 Gad1(+/+)と変異型 Gad1(-/-)を得た。既存の Gad1(-/-)マウス (Asada et al., 1997) と異なり、Gad1(-/-)ラットは口蓋裂を示さず、33% は成獣まで生存できた。抗 GAD67 抗体を用いたウェスタンブロット解析によって大脳 GAD67 タンパク質が消えていることを確かめるとともに、高速液体クロマトグラフィーで GABA 含有量が Gad1(+/+)のおよそ半分に減少していることを確認した。Gad1(-/-)ラットに対して、行動テストバッテリーを課し、統合失調症モデル動物として適しているか否かを検討した (Fujihara et al., 2020; Fujihara et al., 2021a; Fujihara et al., 2021b)。また、灌流固定後の脳切片を Iba-1 抗体で免疫染色し、ミクログリアの形態を解析した。

## 4. 研究成果

### 4.1 基本的な行動特性

ラットの自発活動量を調べるオープンフィールド試験では、Gad1(-/-)の移動距離は Gad1(+/+)よりも短縮しており、低活動性であることが示された。一方、NMDA 受容体遮断薬 (MK-801, 0.2mg/kg) を投与すると、逆に Gad1(-/-)の方が過活動になるという逆転現象を示した。高架式十字路試験における不安様行動、音響驚愕反射、プレパルス抑制は変化が見られなかった。一方、強制水泳試験では無動時間が有意に短縮しており (試験時間中泳ぎ続ける) 活動性の変化 (上昇か低下か) は、課題依存性にどちらの方向にも変化するという特徴があった。

### 4.2 空間記憶障害の同定

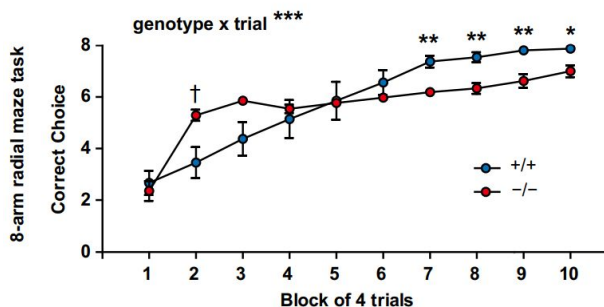
空間作業記憶障害を評価するために、我々は 8 方向放射状迷路課題を、空間参照記憶障害を評価するためにモリス水迷路試験を行った。対象は 3 ヶ月齢以降の雄とした。

#### 4.2.1 方向放射状迷路課題 8-arm radial maze task の方法

8 方向放射状迷路課題では、ラットに対し食餌制限を課しベースラインの 85 ~ 90% 程度の体重まで減量を行った。8 方向放射状迷路課題は、空腹下のラットに対して、実験装置上に置かれたペレットを効率よく採餌させる。すなわち、中央で交差し等角度で交わる 8 つのアームを持った実験用迷路を用意し、その先端にペレットを 1 つだけ置く。ラットが効率よく限られた時間の中でペレットを食べるためには、すでにペレットを食べ終わったアームの位置を記憶しておき、他のアームを選んで進入していく必要がある。本研究では制限時間を 5 分とし、1 日 2 回のセッションを設け、合計 40 セッションに渡ってトレーニングを行い、学習曲線と最終的な誤進入数（既にペレットを食べ終わったアームに再進入してしまった回数）を記録し、2 つの遺伝子型間で比較を行った。

#### 4.2.2 方向放射状迷路課題の結果

Gad1(-/-)と Gad1(+/-)の学習曲線は統計学的に有意に異なっており、前者の学習曲線は 40 セッション経過後の時点において後者よりも低い位置にあり、誤進入数が多かった。したがって、Gad1(-/-)ラットは、Gad1(+/-)と比較して、空間作業記憶が障害されていることが示唆された。（右図の折れ線グラフの右端において、Gad1(-/-)[赤]が Gad1(+/-)[青]よりも下に位置している。Fujihara et al., Translational Psychiatry, 2020）

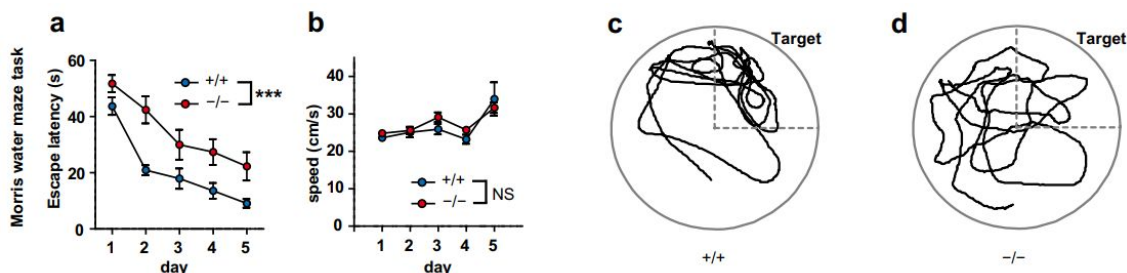


#### 4.2.3 モリス水迷路試験 Morris water maze test の方法

円形の水槽に水を張り、ラットにその中を遊泳させる課題である。水槽内には一カ所だけ浅瀬（プラットフォーム）を設ける。ラットはプラットフォームを求めて水槽内を遊泳するが、目視で位置を確認できないように水を濁らせてあるため、トレーニングを重ねながら位置を記憶する必要がある。ラット空間内の位置を同定出来るように、水槽の周りには様々な図形を方角特異的に設置した。1 日 4 回（1 回 1 分）のトレーニングを 5 日間実施し、6 日目にプラットフォームの位置を覚えたかテストする（probe test）。

#### 4.2.4 モリス水迷路試験の結果

Gad1(+/-)は日を追う毎に短時間でプラットフォームへ到達できるようになり、プラットフォームへの逃避潜時は経時的に右肩下がりに学習曲線を示した（図 a：青）。移動速度は 2 群間で差はなく、遊泳能力そのものに障害はないと考えられた（図 b）Probe test においてもプラットフォームのあった位置近傍に長く滞留した（図 c）。一方、Gad1(-/-)は Gad1(+/-)よりも学習曲線が上方に位置し（図 a：赤）なおかつプロブテストでもプラットフォーム位置に他の場所よりも長く滞留することはなかった（図 d）。以上の結果から、空間作業記憶だけでなく、空間参照記憶も障害されている可能性が示唆された（Fujihara et al., Translational Psychiatry, 2020）。



#### 4.3.1 脳組織学的な解析

成獣の大脳皮質のミクログリアを蛍光免疫染色法で観察した。細胞数は Gad1(-/-)ラットと Gad1(+/-)ラットとで明らかな変化が見られなかった。また、Gad1(-/-)ラットにおけるミクログリアが、Ameboid microglia 化している様子もなかった。ただ、突起の分枝数の増加が一部の個体で観察された（unpublished data）。

以上の結果から、GAD67 の欠損が、空間作業記憶や空間参照記憶といった統合失調症で観察される認知機能障害を引き起こすことが証明された。また、特徴的な低活動と過活動のスイッチングなど、統合失調症の臨床症状を一部模倣するような表現型も見られた。我々はこの動物を、統

合失調症の新規モデル動物として提唱し (Fujihara et al., 2020; 藤原, 2021a ; 藤原, 2021b) 現在は治療モデルの確立を目指している。今後は、このモデル動物の脳のマクログリアや他の細胞種を解析することにより、GABA 神経系と神経免疫系の相互作用の全貌を明らかにすることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujihara Kazuyuki, Yamada Kazuo, Ichitani Yukio, Kakizaki Toshikazu, Jiang Weiru, Miyata Shigeo, Suto Takashi, Kato Daiki, Saito Shigeru, Watanabe Masahiko, Kajita Yuki, Ohshiro Tomokazu, Mushiake Hajime, Miyasaka Yoshiaki, Mashimo Tomoji, Yasuda Hiroki, Yanagawa Yuchio	4. 巻 10
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-engineered Gad1 elimination in rats leads to complex behavioral changes: implications for schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-01108-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujihara Kazuyuki, Sato Takumi, Miyasaka Yoshiaki, Mashimo Tomoji, Yanagawa Yuchio	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic deletion of the 67 kDa isoform of glutamate decarboxylase alters conditioned fear behavior in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 340~353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujihara Kazuyuki, Sato Takumi, Higeta Kazuya, Miyasaka Yoshiaki, Mashimo Tomoji, Yanagawa Yuchio	4. 巻 12
2. 論文標題 Behavioral Consequences of a Combination of Gad1 Haplodeficiency and Adolescent Exposure to an NMDA Receptor Antagonist in Long-Evans Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.646088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 藤原和之	4. 巻 36(10)
2. 論文標題 抑制性神経伝達障害に着目した統合失調症のモデル動物研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 60~64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤原和之、柿崎利和、Weiru Jiang、宮田茂雄、柳川右千夫	4. 巻 53(7)
2. 論文標題 ノックアウトラットによる2種類のGABA合成酵素アイソフォームの機能的役割の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 47~51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤原和之
2. 発表標題 精神神経疾患モデルとしてのグルタミン酸脱炭酸酵素GAD67ノックアウトラット (招待講演)
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会2020 (東京国際フォーラム) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原和之、佐藤匠、宮坂佳樹、真下知士、柳川右千夫
2. 発表標題 グルタミン酸脱炭酸酵素67ヘテロ欠損とNMDA型グルタミン酸受容体遮断の組み合わせ によって生ずる行動学的表現型 (口頭発表)
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム若手技術講習会2020 (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原 和之
2. 発表標題 GAD67ノックアウトラットの認知機能障害
3. 学会等名 第41回生物学的精神医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 和之
2. 発表標題 統合失調症モデル動物としてのGAD67ノックアウトラット
3. 学会等名 第22回群馬大学バイオフィォラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原和之
2. 発表標題 グルタミン酸脱炭酸酵素67ノックアウトラットの行動学的表現型
3. 学会等名 2019年度文部科学省先端モデル動物支援プラットフォーム若手技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原和之 柳川右千夫
2. 発表標題 GAD knockout rats for a model of psychiatric disorders
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会（シンポジウム「Current topics in GABA synthetic enzyme and psychiatric disorder」）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原和之
2. 発表標題 精神疾患の認知機能障害モデルとしてのGAD67ノックアウトラット
3. 学会等名 第12回ラットリソースリサーチ研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原和之、柿崎利和、宮田茂雄、渡辺雅彦、大城朝一、虫明元、宮坂佳樹、真下知士、柳川右千夫
2. 発表標題 グルタミン酸脱炭酸酵素ノックアウトラットの作製と解析
3. 学会等名 第95回日本生理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	柳川 右千夫  (Yanagawa Yucnio)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授    (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------