

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21300121

研究課題名（和文）時期および部位特異的な CaMKII α 欠損が引き起こす行動学的・心理学異常の解析

研究課題名（英文）Dysregulated behaviors caused by temporally and brain

region-specific knockout of CaMKII α

研究代表者：宮川 剛（Miyakawa Tsuyoshi）

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：10301780

研究成果の概要（和文）：(200 文字程度)

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α サブユニット (CaMKII α) ヘテロノックアウトマウスは、作業記憶の異常や過活動などの精神疾患様の行動学的異常を示す。また、海馬歯状回の神経細胞のほとんどが疑似的な未成熟状態にとどまる「未成熟歯状回」という現象を示すことから、有用な精神疾患モデル動物であると考えられる。本研究では、CaMKII α の floxed マウスと、歯状回や CA3 に特異的に cre を発現するマウスを交配し、脳領域特異的欠損マウスを得るための最適化の検討を行った。今後は、網羅的行動解析を行い、各種の行動学的異常が脳のどの時期、どの部位の CaMKII α 欠損に対応しているのかを明らかにする。

研究成果の概要（英文）：

Heterozygous calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha subunit knockout mice (CaMKII α HKO mice) have profoundly dysregulated behaviors and impaired neuronal development in the dentate gyrus (DG), which might serve as a promising candidate endophenotype of schizophrenia and other human psychiatric disorders. In the present research project, we established conditional knockout strains of mice, in which CaMKII α is deleted in specific brain regions, such as dentate gyrus and CA3 in hippocampus. We will subject the conditional KO mice to our comprehensive behavioral test battery to clarify which brain area is responsible for which behavioral abnormalities seen in the CaMKII α HKO mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：網羅的行動テストバッテリー、未成熟歯状回、精神疾患、コンディショナルノックアウト、行動異常

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の研究室では2003年の発足以来、国内外の研究室との共同研究で、150以上の異なる系統のマウスに対して「網羅的行動テストバッテリー」を行うことによって、多数の精神・神経疾患モデルマウスを同定してきた。これらのマウスのうち、最も顕著な行動学的・心理学的異常を示しているものの1つがCaMKII α HK0 (ヘテロノックアウト)マウスである。このマウスは、作業記憶の顕著な障害、不安様行動の低下、活動量の亢進、うつ様行動の低下、周期的な活動性の波など、顕著かつ多様な行動学的・心理学的な異常を示す。また海馬の歯状回において、神経細胞のほぼすべてが未成熟なままに留まる「未成熟歯状回」を示すことも明らかにした。この「未成熟歯状回」様の遺伝子・分子発現パターンは、ヒトの統合失調症患者の死後脳においても見られる。従って、CaMKII α HK0マウスは、統合失調症や双極性気分障害などの精神疾患の発症機序を解明するために、有用なモデル動物であると考えられる。

2. 研究の目的

CaMKII α HK0マウスでは脳全体で遺伝子がノックアウトされているため、各種の行動異常が脳のどの部位のどの時期のCaMKII α の低下に対応するのかわかっていない。そこで本研究では、時期特異的・部位特異的CaMKII α 欠損マウスを作成し、行動解析を網羅的に行うことで、脳のどの部位のどの時期のCaMKII α の低下がどの行動異常に対応するのかわかるとする。

3. 研究の方法

(1) 時期特異的・部位特異的CaMKII α 欠損マウスの作製:

Cre-loxPシステム、Cre-ER loxPシステムなどの遺伝子改変技術を用いた時期特異的・部位特異的CaMKII α マウスを作製する。

(2) 時期・部位特異的CaMKII α 欠損マウスの行動解析:

(1)で得られたマウスについて網羅的行動テストバッテリーを用いて行動を解析を行う。これにより、脳のどの部位のどの時期のCaMKII α の低下が、どの行動異常に対応するのかわかるとする。

4. 研究成果

歯状回特異的な発現を示すProopiomelanocortin (Pomc)、海馬CA3領域特異的な発現を示すGlutamate receptor 1 gamma subunit (GluR1 γ)、およびコントロールとして、CaMKII α のプロモーターにより発現がドライブされるCreマウスを入手後、数世代C57BL/6にバッククロスを行い、バックグラウンドを統制したマウス系統を樹立し

た。その後、CaMKII α -floxedマウスと交配を行い、各種のCre遺伝子座とCaMKII-floxed遺伝子座をヘテロで持つマウスを得ることができた。しかし、PomcおよびGluR1 γ でドライブされるCreマウスと交配した α CaMKII α -floxedマウスの中には、脳領域特異的なCaMKII α の欠損を示さないものがあった。検討の結果、これらの非特異的な欠損は、Cre遺伝子座が雄雌どちらの親に由来するか、また親の週齢が影響している可能性が示唆された。現在は、交配方法を検討しながら、これらのマウスの各脳領域や臓器のDNAを精製して、領域特異的なCaMKII α 遺伝子領域の欠損を確認している。また同時に、海馬・歯状回におけるCaMKII α 発現の低下と成熟度の変化を、リアルタイムPCRおよび免疫染色により確認している。floxedマウスと領域特異的にCreを発現するマウスとの交配では、このような非特異的な欠損が生じることが知られてきており、これらの検討結果は、今後他の遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作成する上で、貴重なデータになると考えられる。

各種CaMKII α コンディショナルノックアウトマウスが、安定して脳領域特異的な欠損を示すことを確認した後、十分な個体数が確保でき次第、行動解析を行う予定である。

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 21件)

- (1) Walton NM, Zhou Y, Kogan JH, Shin R, Webster M, Gross AK, Heusner CL, Chen Q, Miyake S, Tajinda K, Tamura K, Miyakawa T, Matsumoto M, Detection of an Immature Dentate Gyrus Feature In Human Schizophrenia/Bipolar Patients. *Transl Psychiatry*, (in press)
- (2) Koshimizu H, Leiter LM, Miyakawa T, M4 muscarinic receptor knockout mice display abnormal social behavior and decreased prepulse inhibition. *Mol Brain*, Volume 5, 10, 2012 (DOI: 10.1186/1756-6606-5-10)
- (3) Shoji H, Toyama K, Takamiya Y, Wakana S, Gondo Y, Miyakawa T, 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)
- (4) Koshimizu H, Fukui Y, Takao K, Ohira K, Tanda K, Nakanishi K, Toyama K, Oshima M, Taketo MM, Miyakawa T,

- 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)
- (5) Hagihara H, Ohira K, Toyama K, Miyakawa T, 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)
- (6) Ohira K, Miyakawa T, Chronic treatment with fluoxetine for more than 6 weeks decreases neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. *Mol Brain*, Vol. 4, 10, 2011 (doi: 10.1186/1756-6606-4-10)
- (7) Shoji H, Hagihara H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, T-maze Forced Alternation and Left-right Discrimination Tasks for Assessing Working and Reference Memory in Mice. *J Vis Exp*, Vol. 60, e3300, 2011 (DOI: 10.3791/3300.)
- (8) Kaitsuka T, Li ST, Nakamura K, Takao K, Miyakawa T, Masayuki Matsushita, Forebrain-specific constitutively active CaMKK α transgenic mice show deficits in hippocampus-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*, Vol. 96, No. 2, (238-247), 2011 (DOI: 10.1016/j.nlm.2011.04.017)
- (9) Takeuchi H, Iba M, Inoue H, Higuchi M, Takao K, Tsukita K, Karatsu Y, Iwamoto Y, Miyakawa T, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM, Takahashi R, P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. *PLoS One*, Vol. 6, No. 6, e21050, 2011 (DOI: 10.1371/journal.pone.0021050)
- (10) Watanabe Y, Tsujimura A, Takao K, Nishi K, Ito Y, Yasuhara Y, Nakatomi Y, Yokoyama C, Fukui K, Miyakawa T, Tanaka M, Relaxin-3-deficient mice showed slight alteration in anxiety-related behavior. *Front Behav Neurosci*, Vol. 5, 50, 2011 (DOI: 10.3389/fnbeh.2011.00050)
- (11) Asrar S, Kaneko K, Takao K, Negandhi J, Matsui M, Shibasaki K, Miyakawa T, Harrison RV, Jia Z, Salter MW, Tominaga M, Fukumi-Tominaga T, DIP/WISH deficiency enhances synaptic function and performance in the Barnes maze. *Mol Brain*, Vol. 4, 39, 2011 (DOI: 10.1186/1756-6606-4-39)
- (12) Takao K, Tanda K, Nakamura K, Kasahara J, Nakao K, Katsuki M, Nakanishi K, Yamasaki N, Toyama K, Adachi M, Umeda M, Araki T, Fukunaga K, Kondo H, Sakagami H, Miyakawa T, Comprehensive behavioral analysis of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV knockout mice. *PLoS ONE*, Vol. 5, No. 3, e9460, 2010 (doi:10.1371/journal.pone.0009460)
- (13) Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S, Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer I progenitor cells. *Nature Neurosci*, Vol. 13, No. 2, (173-179), 2010 (doi: 10.1038/nn.2473)
- (14) Hagihara H, Toyama K, Yamasaki N, Miyakawa T, Dissection of hippocampal dentate gyrus from adult mice. *J Vis Exp*, Vol. 33, e1543, 2009 (doi: 10.3791/1543)
- (15) Yamada M, Yoshida Y, Mori D, Takitoh T, Kengaku M, Umeshima H, Takao K, Miyakawa T, Sato M, Sorimachi H, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S, Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly. *Nature Med*, Vol. 15, No. 10, (1202-1207), 2009 (doi:10.1038/nm.2023)
- (16) Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Tomimoto T, Takao K, Miyakawa T, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, Nishi E, Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. *Nature Neurosci*, Vol. 12, No. 12, (1506-1513), 2009 (doi: 10.1038/nn.2438)
- (17) Matsuo N, Yamasaki N, Ohira K, Takao K, Toyama K, Eguchi M, Yamaguchi S, Miyakawa T, Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. *Front Behav Neurosci*, Vol. 3, 20, 2009 (doi:10.3389/neuro.08.020.2009)
- (18) Tanaka H, Ma J, Tanaka KF, Takao K, Komada M, Tanda K, Suzuki A, Ishibashi T, Baba H, Isa T, Shigemoto R, Ono K, Miyakawa T, Ikenaka K, Mice with altered

myelin proteolipid protein gene expression display cognitive deficits accompanied by abnormal neuron-glia interactions and decreased conduction velocities. *J Neurosci*, Vol. 29, No. 26, (8363-71), 2009

(doi: 10.1523/JNEUROSCI.3216-08.2009)

- (19) Tanda K, Nishi A, Matsuo N, Nakanishi K, Yamasaki N, Sugimoto T, Toyama K, Takao K, Miyakawa T, Abnormal social behavior, hyperactivity, impaired remote spatial memory, and increased D1-mediated dopaminergic signaling in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *Mol Brain*, Vol. 2, 19, 2009, (doi: 10.1186/1756-6606-2-19)
- (20) Matsuo N, Tanda K, Nakanishi K, Yamasaki N, Toyama K, Takao K, Takeshima H, Miyakawa T, Comprehensive behavioral phenotyping of ryanodine receptor type3 (RyR3) knockout mice: decreased social contact duration in two social interaction tests. *Front Behav Neurosci*, Vol. 3, 3, 2009 (doi: 10.3389/neuro.08.003.2009)
- (21) Nakatani J, Tamada K, Hatanaka F, Ise S, Ohta H, Inoue K, Tomonaga S, Watanabe Y, Chung YJ, Banerjee R, Iwamoto K, Kato T, Okazawa M, Yamauchi K, Tanda K, Takao K, Miyakawa T, Bradley A, Takumi T, Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell*, Vol. 137, No. 7, (1235-1246), 2009 (doi: 10.1016/j.cell.2009.04.024)

(以上、全て査読有)

〔学会発表〕 (計 34 件)

- (1) 宮川剛、Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of psychiatric disorders, International Neuroscience Frontier symposium (招待講演)、2012年3月22-25日、西安 (中国)
- (2) 宮川剛、Bidirectional change of maturation status of dentate gyrus neurons: Relevance to neuropsychiatric disorders, 14th Mind Brain Science Symposium (招待講演)、2012年2月14-15日、浜松
- (3) 宮川剛、神経機能と精神疾患の関わり～精神疾患の中間表現型候補としての未成熟歯状回～、第27回 Wako ワークショップ (招待講演)、2011年11月22日、東京

- (4) 高雄啓三、Mice lacking Schnurri-2 displayed cortical abnormalities related to schizophrenia, Neuroscience 2011、2011年11月12-16日、ワシントンDC (アメリカ)
- (5) 萩原英雄、Forebrain-specific calcineurin deficiency causes immaturity of the dentate granule cells in adult mice, Neuroscience 2011、2011年11月12-16日、ワシントンDC (アメリカ)
- (6) 大平耕司、The SNAP-25-PKC site mutation causes immaturity of the dentate granule cells in adult mice, Neuroscience 2011、2011年11月12-16日、ワシントンDC (アメリカ)
- (7) 宮川剛、Retrospective prediction of behavioral state by transcriptome pattern in the dentate gyrus, 10th Annual MCCS meeting、2011年11月10-11日、ワシントンDC (アメリカ)
- (8) 宮川剛、Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of psychiatric disorders、第32回内藤コンファレンス (招待講演)、2011年10月18-21日、北杜
- (9) 宮川剛、Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of psychiatric disorders、神戸大学学術講演 第46回シグナル伝達医学グローバルCOE学術講演会 (招待講演)、2011年8月8日、神戸
- (10) 宮川剛、Bioinformatics analyses of immature dentate gyrus, an endophenotype shared by behaviorally abnormal mice, The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases、2011年8月3-5日、プラハ (チェコ)
- (11) 宮川剛、Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of psychiatric disorders, 10th World Congress of the Biological Psychiatry、2011年5月29-6月2日、プラハ (チェコ)
- (12) 宮川剛、 α CaMKII, “immature dentate gyrus” and memory, 13th Annual Meeting International Behavioural and Neural Genetics Society、2011年5月10-15日、ローマ (イタリア)
- (13) 宮川剛、Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of psychiatric disorders, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting、2011年4月12-16日、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク (アメリカ)
- (14) 宮川剛、Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of

- psychiatric disorders, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2011年1月9-14日、タオス、ニューメキシコ (アメリカ)
- (15) 高雄啓三、Deletion of Schnurri-2 causes abnormal behaviors related to schizophrenia and failure in the maturation of the dentate granule cells in mice, Neuroscience 2010, 2010年11月13-17日、サンディエゴ、カルフォルニア (アメリカ)
- (16) 宮川剛、Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of psychiatric disorders, 2010 Molecular Cellular Cognition Society, 2010年11月11-12日、サンディエゴ、カルフォルニア (アメリカ)
- (17) 宮川剛、精神疾患の中間表現型としての未成熟歯状回、第57回中部日本生理学会 (招待講演)、2010年10月15日、藤田保健衛生大学、名古屋
- (18) 高雄啓三、C57BL/6 亜系統マウスの行動特性、第33回日本神経科学大会 第53回日本神経化学学会大会 第20回日本神経回路学会大会、2010年9月2-4日、神戸コンベンションセンター、神戸
- (19) 大平耕司、海馬歯状回の顆粒細胞における TD02 の発現、第33回日本神経科学大会 第53回日本神経化学学会大会 第20回日本神経回路学会大会、2010年9月2-4日、神戸コンベンションセンター、神戸
- (20) 萩原英雄、精神疾患モデルマウスの海馬のプロテオーム解析、第33回日本神経科学大会 第53回日本神経化学学会大会 第20回日本神経回路学会大会、2010年9月2-4日、神戸コンベンションセンター、神戸
- (21) 宮川剛、精神疾患の中間表現型としての未成熟歯状回、第33回日本神経科学大会 第53回日本神経化学学会大会 第20回日本神経回路学会大会、2010年9月2-4日、神戸コンベンションセンター、神戸
- (22) 高雄啓三、Immature dentate gyrus as a candidate endophenotype of psychiatric disorders, 4th European Molecular and Cellular Cognition Society (EMCCS) Satellite Meeting at FENS, 2010年7月1-2日、アムステルダム (オランダ)
- (23) 宮川剛、Immature dentate gyrus is a common endophenotype among five different mouse models of psychiatric disorders, From Molecules To Neuronal Disease, 2010年6月29日-7月1日、ブリストル (イギリス)
- (24) 高雄啓三、Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains, 12th Annual Meeting International Behavioural and Neural Genetics Society, 2010年5月12-16日、ハリファックス、ブリティッシュコロンビア (カナダ)
- (25) 宮川剛、Immature dentate gyrus as a potential endophenotype for psychiatric disorders, 12th Annual Meeting International Behavioural and Neural Genetics Society, 2010年5月12-16日、ハリファックス、ブリティッシュコロンビア (カナダ)
- (26) 宮川剛、精神疾患の中間表現型としての未成熟歯状回、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9-12日、横浜
- (27) 宮川剛、精神疾患の中間表現型としての未成熟歯状回、第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会 合同年会、2009年11月13-15日、京都
- (28) 高雄啓三、Abnormal social behavior, hyperactivity, impaired remote spatial memory, and increased D1-mediated dopaminergic signaling in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. Neuroscience 2009, 2009年10月17-21日、シカゴ、イリノイ (アメリカ)
- (29) 遠山桂子、カルシニューリン抑制因子 Zaki-4 Tg マウスの行動解析、第32回日本神経科学大会、2009年9月16-18日、名古屋
- (30) 高雄啓三、 α -CaMKII ヘテロ欠損マウスの海馬遺伝子発現パターン解析、第32回日本神経科学大会、2009年9月16-18日、名古屋
- (31) 萩原英雄、 α -CaMKII ヘテロ欠損マウスと Shn2 欠損マウスの海馬のプロテオミクス解析、第32回日本神経科学大会、2009年9月16-18日、名古屋
- (32) 宮川剛、精神疾患の中間表現型としての未成熟歯状回、第32回日本神経科学大会、2009年9月16-18日、名古屋
- (33) 高雄啓三、Deletion of Schnurri-2 causes abnormal behaviors related to psychiatric disorders and failure in the maturation of the dentate granule cells in mice, 第36回国際生理学会世界大会、2009年7月28日-8月1日、京都
- (34) 宮川剛、Omics analysis of immature dentate gyrus: Possible mechanisms

underlying maturation failure of granule cells, 4th International Conference of Neurons and Brain Disease, 2009年7月21-23日、トロント、オンタリオ (カナダ)

〔図書〕(計1件)

宮川 剛、NHK 出版「こころ」は遺伝子でどこまで決まるのか、2011年、254ページ

〔産業財産権〕

○出願状況 (計3件)

名称: Gm1 遺伝子産物欠損非ヒト動物及びその利用法

発明者: 高橋 康彦、片岡正樹、宮川剛、高 雄啓三

権利者: 住友化学株式会社

種類: 特許権

番号: 特願 2010-87562

出願年月日: 2010年4月6日

国内外の別: 国内

名称: 精神病モデル動物の作成方法

発明者: 大西新、南本敬史、永井裕司、須原 哲也、宮川剛、萩原英雄

権利者: 独立行政法人放射線医学総合研究所、学校法人藤田学園

種類: 特許権

番号: 特願 PCT/JP2011/50757

出願年月日: 2011年1月18日

国内外の別: 国内

名称: うつ病治療のための併用剤

発明者: 西昭徳、外角直樹、首藤隆秀、黒岩 真帆美、宮川剛、小林克典、Paul Greengard

権利者: 学校法人久留米大学、学校法人日本医科大学、学校法人藤田学園、The Rockfeller University

種類: 特許権

番号: 特願 61/466,157

出願年月日: 2011年3月22日

国内外の別: 国外(米国)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/ICMS/res06.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 剛 (Miyakawa Tsuyoshi)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・システム
医科学研究部門・教授

生理学研究所・行動・代謝分子解析センター

行動様式解析室・客員教授

研究者番号: 10301780

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松尾 直毅 (Matsuo Naoki)

京都大学・白眉センター・特定准教授
研究者番号: 10508956

高雄 啓三 (Takao Keizo)

自然科学研究機構・生理学研究所・行動学・
心理学的解析・特任准教授

研究者番号: 80420397

遠山 桂子 (Toyama Keiko)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教
研究者番号: 20378722

大平 耕司 (Ohira Koji)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師
研究者番号: 80402832