

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：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390069

研究課題名（和文） 統合失調症脆弱因子としての PACAP 遺伝子の分子基盤解析

研究課題名（英文） Molecular basis study on PACAP gene as a risk factor for schizophrenia

研究代表者

馬場 明道（BABA AKEMICHI）

大阪大学・大学院薬学研究科・名誉教授

研究者番号：70107100

研究成果の概要（和文）：

多くの精神疾患は、遺伝的要因に環境要因が加わり発症する。本研究では、神経ペプチド PACAP の遺伝子欠損マウスが示す統合失調症関連の表現型が、様々な環境因子の負荷により可塑的に変化することを明らかにした。また同マウスの分子病態として、統合失調症患者でも認められる、セロトニン 2A 受容体の機能異常や神経突起スパインの形成異常を同定し、PACAP 遺伝子の統合失調症脆弱因子としての意義を確立した。

研究成果の概要（英文）：

Clinical studies suggest that environmental factors, besides genetic factors, play a key role in etiology of many psychiatric disorders. This study demonstrated that schizophrenia-related behaviors in mice lacking PACAP are highly influenced by the environmental factors during the early stages of development. In this mutant, we also found abnormalities in the 5-HT_{2A} receptor function and the hippocampal neuron maturation, suggesting possible involvement of these dysfunctions in the development of schizophrenia-related behaviors in mice lacking PACAP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：精神疾患・障害、統合失調症、神経ペプチド PACAP、遺伝子改変マウス、環境因子、疾患モデル、セロトニン、スパイン

1. 研究開始当初の背景

精神疾患や代謝性疾患などの多因子性疾患は、遺伝的要因に加え、発達過程における環境要因など、多因子が長期的かつ複雑に相互作用して発症する。精神疾患においては、特に遺伝的要因の研究が飛躍的に進展し、DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) を

筆頭とする種々の精神疾患脆弱因子の同定とその分子基盤研究が、本疾患の病態解明と新規創薬標的候補の提示に繋がるとされ注目されている。また環境因子の分子基盤研究に関しても、種々の脳機能、神経構築に対して発育時の環境要因が多大な影響を及ぼすことが明らかにされつつある。さらに、新世

代の抗統合失調症薬として、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)2/3のアゴニストが有効であること、その分子基盤として、mGluR2/3とセロトニン 2A 受容体(5-HT2AR)とのヘテロ 2 量体の存在が明らかにされている。

一方で申請者は、これまでの神経ペプチド PACAP の包括的機能解析において、PACAP の遺伝子欠損(PACAP-KO)マウスでは抗精神病薬リスペリドンに感受性を示す種々の精神行動異常が認められることや、ヒト PACAP 遺伝子の変異が統合失調症の海馬機能異常の脆弱因子となることを示し、本シグナル系の精神疾患病態への関与を実証するとともに、PACAP-KO マウスが統合失調症など精神疾患の分子病態を解析する上で有用な新しい動物モデルとなることを示した。またその関与様式について、海馬や 5-HT 神経系(特に 5-HT2AR)の機能異常を示唆する種々の知見を得るほか、上述の DISC1 との関連について、PACAP が DISC1 とその会合蛋白 DBZ との会合を制御することで、神経突起伸展に寄与することを見出した。

2. 研究の目的

以上より PACAP-KO マウスの分子病態には、海馬、5-HT2AR、神経発達の関与が示された。また本マウスの表現型が、環境要因によりどのように変化するかを明らかにすることは、統合失調症の分子基盤解明に大きく資すると考えられた。そこで本研究では、申請者が得た成果を引き継ぎ、統合失調症の脆弱因子としての PACAP 遺伝子の分子基盤について、*in vivo* および *in vitro* の解析を通じて、その全体像を確定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝的要因と環境要因の相互作用

PACAP-KO マウスが示す、多動やジャンプ行動、認知機能障害、抑うつ様行動など、統合失調症の特徴とされる表現型異常が、発達期の隔離飼育や豊かな環境飼育、または交雑様式により、どのように変化するかを行動薬理学的に評価した。また分子生物学的手法によりその分子基盤の同定を試みた。

(2) PACAP と 5-HT2R, mGluR2/3 との機能連関

5-HT2R や mGluR2/3 の作動薬が PACAP-KO マウスに及ぼす影響を行動薬理学的に解析するとともに、神経活性化マーカー c-Fos を指標とした組織化学的解析から、本マウスの 5-HT2AR 機能異常に関わる神経基盤を同定した。さらに受容体レベルでの相互作用解析のため、細胞膜非透過性のリガンドを有する Halo-tag を付加した受容体コンストラクトを作製し、*in vitro* で細胞内動態を解析した。

(3) 海馬神経発達における PACAP の役割

初代海馬神経細胞の培養系を確立し、培養初期の突起形成や、培養後期の樹状突起スパ

イン発達における PACAP の役割を解析した。またゴルジ染色により PACAP-KO マウスの海馬神経スパインの変化を解析した。

4. 研究成果

(1) PACAP-KO マウスが示す精神行動異常の環境因子による可塑的变化

生後 4-6 週の隔離飼育により、PACAP-KO の多動はより早期から顕在化した。また本マウスの表現型異常の多く(感覚運動情報処理障害以外)は、生後 4-8 週の幼若期の豊かな環境飼育で改善される一方、8-12 週の成熟期における飼育では改善されず、臨界期の存在が示唆された(論文③)。また精神運動異常の改善が一過性であるのに対し、海馬依存性認知機能の障害に対する改善作用は持続的であること、豊かな環境飼育により、海馬における BDNF 発現の増加、CaMK II シグナルの活性化、新生神経細胞の生存数増加が野生型マウスとほぼ同様に認められた(論文④、学会発表⑨⑩)。また以前までの検討では、PACAP ヘテロ欠損マウスは野生型マウスと同様の表現型を示すとされていたが、種々の異なる遺伝的背景/交雑様式で得られたマウス行動を比較したところ、c57BL/6 系の PACAP ヘテロ欠損マウスから産まれた産仔では、同腹の野生型マウスと比較してヘテロ接合型マウスが明らかな多動を示した。

以上、遺伝的要因が原因となって発現する精神行動異常が、母体内環境を含む、発達期の環境要因負荷により大きく修飾されることを実験動物レベルで実証した。本成果は、遺伝的要因に環境要因が加わり初めて発症する統合失調症に関して、PACAP-KO マウスが疾患モデルとしての構成概念的妥当性を持つことを示唆し、また同疾患の脆弱因子としての PACAP の意義を支持する結果である。

(2) PACAP シグナルと 5-HT2R 並びに mGluR2/3 との機能的連関に関する研究

PACAP-KO マウスの認知機能障害は、定型抗精神病薬に抵抗性を示す一方非定型薬で著明に改善される。今回、新世代の抗統合失調症薬として期待されている mGluR2/3 作動薬が、本マウスの認知機能障害を改善することを見出し(学会発表⑦)、PACAP-KO マウスがこれら新規治療薬の評価が可能な有用な統合失調症の疾患モデルであることを示唆した。

また 5-HT2R 作動薬を PACAP ヘテロ欠損マウスに投与すると、野生型マウスでは認められない感覚情報処理機能障害が惹起されることを見出し、本ヘテロ欠損マウスもまた、精神疾患の分子基盤としての遺伝的脆弱性と環境要因の相互作用を解析する上で有用な動物モデルとなる可能性を示した。またこの際、特に大脳皮質体性感覚野(SSCx)における神経活性化がヘテロマウスで有意に亢進

しており、この神経活性化の亢進 (c-Fos 発現) は、SSC_x の 5-HT_{2A}R 非発現神経選択的に起きていた。以上、PACAP-KO マウスの分子病態としての 5-HT_{2A}R 機能異常に関して、神経解剖学的な側面からの知見を得た。

また、Halo-tag 付加受容体を用いた解析では、HEK293T 細胞において、PACAP で 5-HT_{2A}R の細胞内在化が促進されることを見出し、PACAP が特異的受容体 PAC1 を介して 5-HT_{2A}R の機能制御に関与することを示唆した。

(3) 初代神経細胞系を用いた神経発達過程における PACAP シグナルの役割

マウス海馬由来の初代神経細胞培養系を確立し、神経発達における PACAP の役割を解析した。PACAP は培養初期において神経突起の数や突起長、細胞体の増加作用を示し、この作用は BDNF に匹敵していた(学会発表⑤)。また培養後期においても、BDNF と同程度の樹状突起スパイン数の増加作用を示した(学会発表②)。一方で PACAP-KO マウス由来の神経ではスパイン数が減少すること、PACAP-KO マウスの海馬 CA1 領域では、スパイン数の減少や異常な形態を示すスパインの割合が増加することも見出した(学会発表④⑤)。

以上の結果から、PACAP が海馬神経細胞の成熟や神経回路形成に関与することが初めて示され、これらの不全が PACAP-KO マウスの異常表現型や、ヒト統合失調症の分子基盤となる可能性が示された。

PACAP-KO マウスで明らかとした SSC_x における 5-HT_{2A}R の機能異常や海馬神経突起/スパイン形成の異常は、いずれも統合失調症の分子病態として示唆されている異常である。本マウスの異常表現型発現に対する種々環境要因の影響に関する知見と併せ、本研究によって、PACAP 遺伝子の統合失調症脆弱因子としての意義が確立されたと言える。

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 19 件)

① Hashihimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R and Baba A. PACAP is Implicated in the Stress Axes. *Current Pharmaceutical Design* 17: 985-989 (2011) 査読有

② Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, Morita Y, Tanida M, Tajiri M, Hazama K, Ogata K, Hashimoto H, Baba A PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses

in mice. *Stress* 14(4):368-375 (2011) 査読有

③ Ago Y, Yoneyama M, Ishihama T, Kataoka S, Kawada K, Tanaka T, Ogita K, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Takuma K, Matsuda T. Role of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 172:554-561 (2011) 査読有

④ Ishihama T, Ago Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Takuma K, Matsuda T. Environmental factors during early developmental period influence psychobehavioral abnormalities in adult PACAP-deficient mice. *Behav Brain Res.* 209(2):274-280 (2010) 査読有

⑤ Hashimoto R, Hashimoto H, Shintani N, Ohi K, Hori H, Saitoh O, Kosuga A, Tatsumi M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Baba A, Takeda M, Kunugi H. Possible association between the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene and major depressive disorder. *Neurosci Lett.* 14:468(3):300-302 (2010) 査読有

⑥ Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, Guo X, Morita Y, Tanida M, Nagai K, Takeda M, Baba A. Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem.* 110(2):595-602 (2009)

[学会発表] (計 52 件)

① Shintani N, et al. The neuropeptide PACAP centrally mediates emotional stress response. The 32nd Naito Conference、2011.10.18、山梨県

② 尾形 勝弥、他. PACAP による樹状突起スパインの形態調節、第 54 回日本神経化学会、2011.09.27、石川県

③ 早田 敦子、他. セロトニン 7 受容体を介した精神機能調節: PACAP 欠損マウスの精神行動変化および培養神経細胞への作用、第 48 回日本生化学会、2011.09.23、京都国際会館

④ 勢力 薫、他. 樹状突起スパインの形成・成熟における PACAP の作用、次世代を担う創

薬・医療薬理シンポジウム 2011、2011. 08. 31、
北里大学

⑤ 早田 敦子、他. 神経細胞の発達・形成に
おける PACAP の役割、BMB2010、2010. 12. 07、
神戸国際会議場

⑥ Hashimoto H, et al. Possible
Implication of Pituitary Adenylate
Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in
Schizophrenia: Regulation of Spine
Formation and Genetic Association、The
ACNP 49th Annual Meeting、2010. 12. 07、
Florida, USA

⑦ 狭間 啓佑、他. 新規統合失調症治療薬
mGluR 2/3 作動薬による PACAP 欠損マウスの
精神行動変化への改善作用、第 118 回日本薬
理学会近畿部会、2010. 11. 19、大阪ライフサ
イエンスセンター

⑧ 橋本 均、他. PACAP シグナルと精神疾患、
生体機能と創薬シンポジウム 2010、
2010. 09. 09、京都

⑨ 吾郷 由希夫、他、豊かな環境による海馬
神経新生、栄養因子産生における神経ペプチ
ド PACAP の役割、Neuro2010、2010. 09. 04、
神戸国際会議場

⑩ 馬場 明道、神経ペプチド P A C A P の
生理と病態；遺伝子改変マウス研究から、日
本薬学会第 1 3 0 年会シンポジウム、
2010. 03. 28、岡山コンベンションセンター

⑪ 片岡 駿介、他、幼若期環境強化の PACAP
遺伝子欠損マウス異常行動に与える影響、第
39 回日本神経精神薬理学会、2009. 11. 14、京
都国際会館

⑫ 馬場 明道、他、PACAP 遺伝子異常と統合
失調症の関連性、第 37 回薬物活性シンポジ
ウム、2009. 10. 09、東北薬科大学

⑬ Shintani N., et al. Altered emotional
and cognitive function in PACAP-deficient
mice: a novel animal model for psychiatric
disorder、The 9th International Symposium
on VIP, PACAP and Related Peptides、
2009. 10. 04、鹿児島県

⑭ 馬場 明道、他. 神経ペプチド PACAP の中
枢機能 - 基礎から臨床へ、第 11 回応用薬理
シンポジウム、2009. 09. 18、静岡県立大学

[その他]

ホームページ等

<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 明道 (BABA AKEMICHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・名誉教授

研究者番号：70107100

(2) 研究分担者

新谷 紀人 (SHINTANI NORIHITO)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：10335367

早田 敦子 (HAYATA ATSUKO)

大阪大学・連合小児発達学研究所・助教

研究者番号：70390812

橋本 均 (HASHIMOTO HITOSHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：30240849

(H22 まで研究分担者として参画)