

## 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5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590292

研究課題名（和文） 遺伝子改変動物を用いたD-セリン関連遺伝子の同定と統合失調症の病因解明

研究課題名（英文） Identification of D-serine-related gene and elucidation of etiology of schizophrenia using genetically modified animals

研究代表者

橋本 篤司（HASHIMOTO ATSUSHI）

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：80271592

研究成果の概要（和文）：本研究では統合失調症との関連生が示唆されている酵素の遺伝子改変動物を用いて、統合失調症関連遺伝子の検索と統合失調症モデル動物としての評価を行った。マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、遺伝子改変動物では種々の遺伝子の増減が観られた。また、遺伝子改変動物に覚醒剤を投与したところ、正常マウスと比べて異常行動が悪化した。以上の結果から、この遺伝子改変動物が新規統合失調症のモデル動物である可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the identification of schizophrenia-related genes and the elucidation of genetically modified animals as schizophrenia-model animals using genetically modified animals. Using DNA microarrays, a variety of genes was increased and decreased. A stimulant exposure resulted in the increase of abnormal behaviors in the genetically modified animals compared to the wild mice. These data indicated that the genetically modified animals could be the model animals of schizophrenia

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：中枢・末梢神経

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）型グルタミン酸受容体機能が低下しているセリンラセマーゼノックアウト（SRR-KO）マウスを用いて、SRRの機能解析及

び統合失調症の病因解明、及び新規治療薬開発のための標的分子の同定を目指す。本研究によって、SRR-KOマウスの新規統合失調症モデル動物としての確立及びSRRの病態生理学的意義の解明がなされれば、統合失調症の難

治性症状に対する新規治療薬開発の基盤研究となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

統合失調症は、陽性症状(幻覚・妄想)、陰性症状(感情鈍麻・意欲の低下)及び認知障害が認められる疾患である。生涯罹患率は約1%と発症頻度は高く、50%の患者が1度は自殺を試み、15%の患者が自殺で亡くなる。遺伝と環境の両方の要因によって統合失調症が発症すると考えられているが、発症機序が複雑であるため病因は未だ解明されていない。さらに、現在の治療薬では統合失調症の難治性症状(陰性症状・認知障害)を完全に抑えることはできないことから、適切な病態モデル動物を用いた基礎的研究や新規治療薬の開発が切望されている。ヒトに統合失調症様症状を引き起こすフェンシクリジン(PCP)及びケタミンがN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型グルタミン酸受容体を強力に遮断することから、統合失調症の病態仮説として「NMDA受容体機能低下仮説」が提唱されている。申請者らは、哺乳類脳内に遊離型D-セリンが多量存在することを初めて明らかにした。また、D-セリンがNMDA受容体グリシン結合部位の選択的アゴニストであることから、D-セリンがNMDA受容体グリシン結合部位の内在性調節物質であることを提唱した(Hashimoto & Oka, *Prog. Neurobiol.*, 1997)。また、本疾患患者の血清中D-セリン濃度が低下していること、D-セリン及びD-アラニン投与によって本疾患患者の難治性症状が改善すること、及びD-セリンの生合成酵素であるセリンラセマーゼ(SRR)と代謝酵素であるD-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)が疾患感受性遺伝子であること等の知見は、本疾患におけるD-セリンの代謝異常を示唆するとともに、統合失調症の「NMDA受容体機能低下仮説」を強く支持している。最近、富山大学・分子神経科学講座の森寿教授は世界に先駆けてSRR-KOマウスの作出に成功した。このマウスの脳内D-セリン含量は野生型マウスの約10%に減少しており、SRRがD-セリンを生合成していることを明らかにした。本研究では、SRR-KOマウスを用いてD-セリン関連遺伝子の同定及び統合失調症の発症原因の解明を目指す。本研究によって、SRR-KOマウスの新規統合失調症モデル動物としての確立及びSRRの病態生理学的意義の解明がな

されれば、難治性統合失調症の陰性・認知症状に対して有効な新規治療薬開発の基盤研究となる可能性がある。

### (1) 研究の学術的背景

申請者は「哺乳類組織中のアミノ酸はすべてL-体で構成されている」という定説を覆し、哺乳類脳内に遊離型D-セリンが多量存在すること及びD-セリンがNMDA型グルタミン酸受容体を介する神経伝達の重要な内在性調節物質であることを初めて明らかにした(Hashimoto et al., 1992)。これら所見は、D-体の不斉アミノ酸分子が新たな神経情報伝達システムを構築するという概念を提唱するものであり、学術的にも重要な意義を持つ(Hashimoto and Oka, 1997)。また、Wolosker and Snyder (Johns Hopkins 大学)及び金野(国際医療福祉大学)はL-セリンをD-セリンにラセミ化するSRRをクローニングした。WoloskerらはこれまでSRRとD-セリンが主にアストロサイトに存在し、ニューロンにはほとんど存在しないと報告してきたが、最近申請者らはSRRがニューロンに多く存在することを明らかにした(Yoshikawa et al., 2006)。一方、Chumakovら(Genset・フランス)はゲノム解析によって、DAOが統合失調症の疾患感受性遺伝子であることを報告したが、この報告以外にDAOと統合失調症との関連を示唆する知見はなかった。最近、申請者らはMK-801、ケタミン及びモルヒネ投与によってSRR及びDAO mRNAの発現量が一過性に増加すること及びMK-801及びメタンフェタミン投与による異常行動の発現量が正常マウスと比較してDAO欠損マウスで有意に少ないことを報告し、SRR及びDAOが統合失調症の病因と関連している可能性を個体レベルで初めて示唆した。

### (2) 学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

SRR-KOマウスは、脳内D-セリン含量が野生型マウスの約10%に減少しており、D-セリン含量が減少することによってNMDA受容体機能が低下し、新規統合失調症モデル動物になる可能性がある。特に、D-セリン投与によって統合失調症患者の難治性症状である陰性症状・認知障害が改善することから、難治性症状を改善する新規治療薬開発のモデル動物になる可能性がある。また、DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析は、新規統合失調症(D-セリン)関連遺伝子の探索に

きわめて有用である。SRR-KO マウスの遺伝子発現解析を行うことで、発現変動する遺伝子を同定することができ、これら遺伝子産物を機能解析することで新規治療薬開発のための標的分子の同定が可能になる。同定した標的分子に対する新規治療薬を開発し、トランスレーショナルリサーチに発展させる。さらに、SRR-KO マウスは NMDA 受容体機能の低下が知られている認知症モデル動物になる可能性があり、高齢化社会に直面している我が国にとって極めて緊急性を持った研究である。

### 3. 研究の方法

本研究では、SRR-KO マウスを用いて DNA マイクロアレイを用いた SRR-KO マウスにおける遺伝子発現の網羅的解析、RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析、薬物の遺伝子発現に対する影響、及び行動解析等を行い、D-セリン関連遺伝子の同定及び統合失調症の発症原因の解析、及び新規治療薬開発のための標的分子の同定を目指す。

#### (1) DNA マイクロアレイを用いた SRR-KO マウスにおける遺伝子発現の網羅的解析

野生型マウス及び SRR-KO マウスの大脳皮質を用いて、Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarray (one-color) を行い、発現変動している遺伝子群を探索する RT-PCR 法を用いてこれら遺伝子群の定量的解析を行い、新規統合失調症 (D-セリン) 関連遺伝子を同定する。同定した統合失調症 (D-セリン) 関連遺伝子を RT-PCR 法、Northern 法、ISH 法、及び免疫組織化学法を用いて解析する。さらに、RNA 干渉や *in vitro* primary culture 等によって遺伝子機能解析を行い、統合失調症との関連性を解析する。

#### (2) SRR-KO マウスにおける D-セリン関連遺伝子 (SRR, DAO, NMDA 受容体, ドパミン受容体など) の発現変化解析

野生型及び SRR-KO マウスにおける D-セリン関連遺伝子 (SRR, DAO, NMDA 受容体, ドパミン受容体など) mRNA 及び蛋白質の発現変化を RT-PCR 法、ISH 法、及び免疫組織化学法を用いて解析する。また、本実験では野生型及び SRR-KO マウスに MK-801 (NMDA 受容体アンタゴニスト)、メタンフェタミン (覚せい剤)、あるいは抗精神病薬 (ハロペリドール、リスペリドン、クロザピンなど) を腹腔内投与し、RT-PCR 法によって遺伝子発現の変化を解析

する。

#### (3) 統合失調症の新規モデル動物としての評価

SRR-KO マウスの自発運動量、薬物誘発性異常行動 (MK-801, メタンフェタミン)、脳内透析法を用いた抗精神病薬 (ハロペリドール、リスペリドン、クロザピンなど) の影響、prepulse inhibition、及び D-セリン濃度測定などの解析を行い、新規統合失調症モデル動物としての評価を行う。MK-801 (PCP モデル) をマウスに投与すると、移所運動量の増加・回転運動・転倒などの異常行動が発現し、メタンフェタミン (覚せい剤モデル) をマウスに投与すると、首振り・床舐め・一カ所にとどまるなどの異常行動が発現する。これら異常行動の発現量を SRR-KO マウスとコントロールマウスで比較する。また、脳内透析法を用いてメタンフェタミンや抗精神病薬によるドパミン量の変化を SRR-KO マウスを用いて検討していく予定である。

### 4. 研究成果

#### (1) SRR-KO マウスの D-セリン濃度測定

SRR-KO マウスの脳内 D-セリン濃度を野生型マウスと比較した。D-セリンは野生型マウスの大脳皮質、海馬及び線条体に多く存在していたが、SRR-KO マウスでは野生型マウスの約 10% 程度に減少していた。一方、SRR-KO マウスの L-セリン濃度は野生型マウスの海馬及び線条体で有意に増加していた。以上の結果から、SRR-KO マウスは統合失調症との関連が知られている大脳皮質や海馬などの D-セリン濃度が激減したマウスであり、NMDA 受容体機能が低下している可能性が示唆された。

#### (2) 統合失調症の新規モデル動物としての評価

野生型マウスと SRR-KO マウスにメタンフェタミンを投与し、移所運動量及び常同行動 (首振り・床舐め・一カ所にとどまる) に対する影響を検討した。メタンフェタミン (9 mg/kg) を投与したところ、SRR-KO マウスの常同行動スコアが野生型マウスと比較して有意に増加した。また、メタンフェタミン投与によって SRR-KO マウスの移所運動量が野生型マウスと比較して有意に減少した。以上の結果から、SRR-KO マウスの D-セリン濃度の減少、すなわち大脳皮質や海馬の NMDA 受容体機能の低下によって、メタンフェタミンに

よる常同行動が悪化した可能性がある。以上の結果から SRR-KO マウスが統合失調症の新規モデル動物である可能性が示唆された。

(3) SRR-KOマウスに対するN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)投与の影響

野生型マウスと SRR-KO マウスに痙攣薬である NMDA を投与し、行動に対する影響を検討した。NMDA (300mg/kg, s. c.)を野生型マウスに投与したところ、87.5% (7/8)のマウスが痙攣を起こし死亡した。一方、SRR-KO マウスに NMDA を投与したところ、12.5% (1/8)のマウスしか死亡しなかった。以上の結果から、SRR-KO マウスの D-セリン濃度の減少、NMDA 受容体機能の低下によって痙攣の発現率が低下した可能性がある。

(4)野生型マウス及び SRR-KO マウスの大脳皮質を用いて、Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarray を行った。野生型マウスと比較して SRR-KO マウスで、potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5, cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 4, angiotensin I converting enzyme 3, olfactory receptor 474 などの遺伝子発現が有意に増加していた。一方、olfactory receptor 137, collagen alpha3, olfactory receptor 1458, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII delta), serine racemase などの遺伝子発現は有意に減少していた。現在は、発現変化が見られた遺伝子の中から統合失調症と関連性がある遺伝子を選択し、RT-PCR やウエスタンブロット等を用いて再現性を確認している。また、マイクロアレイ法において CaMKII delta の発現量が SRR-KO マウスで減少していた。CaMKII a, b, d は NMDA 受容体の下流に存在し、LTP の形成過程に関係していることから、NMDA 受容体機能が低下している SRR-KO マウスで CaMKII a, b, d などの酵素が減少している可能性がある。現在、CaMKII a, b, d の RT-PCR とウエスタンブロットを行っている。

## 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 1 件)

① Watamabe M., Yoshikawa M., Takeyama

K., Hashimoto A., Kobayashi H. and Suzuki T. Subchronic administration of Ketamine decreases the mRNA expression of serine racemase in rat brain. Tokai J. Exp. Clin. Med. 査読有, 35, 137-143, 2010

[学会発表] (計 2 件)

- ① 齋藤啓一郎、井上蘭、森寿、小林広幸、鈴木利保、橋本篤司、セリンラセマーゼノックアウトマウスでは覚醒剤により誘発された常同行動は増加する、第 83 回日本薬理学会年会、2010. 3. 18. 大阪国際会議場(大阪)
- ② 渡邊真理子、吉川正信、竹山和秀、村田智彦、金幸禄、小林智美、橋本篤司、小林広幸、鈴木利保、ケタミン長期投与による D-セリン代謝関連酵素遺伝子発現の変化、第 82 回日本薬理学会年会、2009. 3. 16. パシフィコ横浜(横浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 篤司 (HASHIMOTO ATSUSHI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：80271592