

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K03136

研究課題名（和文）ヒストン修飾異常がげっ歯類の統合失調症様行動異常を生じるメカニズムの解明

研究課題名（英文）The involvement of abnormal histone modification in schizophrenia-related behaviors in rodent models

研究代表者

古家 宏樹（Furuie, Hiroki）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長

研究者番号：90639105

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）：本研究では、統合失調症様行動異常とGAD減少によるGABA機能低下、そしてヒストン修飾異常との関連を明らかにすることを目的とした。結果、統合失調症モデルである新生仔期NMDA受容体遮断ラットの脳において、GAD67陽性細胞とGad1 mRNA発現の減少が観察された。またヒストン脱アセチル化酵素の阻害はGad1 mRNA発現に影響しなかったが、新生仔期NMDA受容体遮断による記憶障害を改善した。本研究では統合失調症様行動とGABA機能低下、ヒストン修飾異常との直接的な関連は明らかにされなかったが、ヒストン脱アセチル化酵素阻害による遺伝子発現の促進は統合失調症の症状を改善する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症の生物学的メカニズムについて現状では不明な点が多く、有効な治療法も確立されていない。本研究の結果は、前頭前皮質や海馬におけるGABA機能低下が統合失調症様行動をもたらすという仮説を支持している。また本研究において、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害が統合失調症モデル動物の記憶障害を改善したことから、従来の抗精神病薬が効果を示さない統合失調症の認知機能障害に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の有効性が示唆される。本研究の成果は、統合失調症の生物学的背景の理解に重要な示唆を与えるとともに、新規治療薬の研究開発に貢献できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the involvement of abnormal histone modification in schizophrenia-like behaviors and hypofunction of GABAergic transmission induced by decrease in glutamate decarboxylase (GAD) expression. As a result, we found that the number of GAD67-positive neurons and Gad1 mRNA expressions were decreased in the brain of rats subjected to neonatal NMDA receptor blockade, a rodent model of schizophrenia. On the other hand, repeated administration of histone deacetylase inhibitor ameliorated the memory impairment induced by neonatal NMDA receptor blockade without affecting the expression of Gad1 mRNA. Unfortunately, this study could not demonstrate the involvement of alterations in histone modification in both schizophrenia-like behaviors and GABAergic hypofunction. However, the results suggest that histone deacetylase inhibitors may be a novel therapeutic strategy for schizophrenia.

研究分野：実験心理学

キーワード：統合失調症 エピジェネティクス ヒストン脱アセチル化酵素 グルタミン酸脱炭酸酵素

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、陽性症状(幻覚、妄想)、陰性症状(社会性低下、感情平板化)、認知機能障害(記憶障害、遂行機能障害)を特徴とする精神疾患である。一卵性双生児の片方が統合失調症だった場合、もう片方が罹患する割合は約 50%であり、遺伝的素因だけでなく環境要因もまた統合失調症の発症に深く関与している。ヒストン修飾は、DNA 配列変化に依存せずに遺伝子発現を調節するエピジェネティック機構の一つであり、環境要因が精神疾患の引き金となる可塑的变化を生じさせるメカニズムの候補として注目されている。統合失調症患者の死後脳ではヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が増加し、アセチル化ヒストンが低下している。このことから、ヒストン脱アセチル化による脳内の遺伝子発現異常が統合失調症の病態生理に関わっている可能性が示唆される。しかし、HDAC 増加と統合失調症発症の因果関係は明らかとなっていない。一方、統合失調症患者の死後脳では、GABA 合成酵素である GAD67 の発現レベル低下、GABA 含量の減少がみられ、GABA 神経伝達の障害が統合失調症の病因・病態と関連していると考えられる。一方、統合失調症で増加がみられる HDAC1 の過剰発現は GAD67 mRNA を減少させる。また、HDAC1 の阻害作用のある HDAC 阻害剤は、GAD67 遺伝子プロモーター領域のヒストンのアセチル化を促進し、GAD67 の mRNA を増加させる。そのため、HDAC1 の増加は GABA の合成を減少させ、GABA 機能の低下をもたらす可能性が示唆される。しかし、HDAC の増加によって実際に統合失調症の精神症状が発現するのか、それは GABA 機能の低下によるものなのか、そして HDAC の阻害は統合失調症の精神症状を改善するのかといった点については明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

統合失調症死後脳では、HDAC が増加しアセチル化ヒストンが低下していることが報告され、同疾患において遺伝子発現が低下しているものと推測される。また統合失調症の脳では、GABA 合成酵素 GAD67 の発現レベルが低下し GABA 含量が減少しており、GABA 神経伝達の異常が示唆されている。このことから、GABA 機能低下が統合失調症にみられる様々な症状の基礎にあるものと考えられている。一方、HDAC の一部は GAD67 遺伝子プロモーター領域のヒストンのアセチル化を低下させることが知られている。そのため、HDAC 増加は GABA 合成を阻害し、GABA 機能を低下させる可能性がある。以上のことからすると、統合失調症において、HDAC の増加は、GAD67 遺伝子(Gad1)の発現を低下させることにより GABA 機能低下をもたらす、陽性症状や陰性症状などの症状を引き起こしていることが示唆される。本研究では、モデル動物を用いて、統合失調症の様々な症状を模した行動異常と、HDAC 増加によるヒストン修飾異常、そして GAD67 発現低下による GABA 機能低下との関連を明らかにすることを目的とした。そのため、新生仔期にグルタミン酸 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬 MK-801 を投与した統合失調症モデルラットを作成し、各種の行動テストにおいて統合失調症様行動異常の発現の有無を調べるとともに、脳内の HDAC 増加によるアセチル化ヒストンや GAD67 の発現量を調べることで、これらの関連について検討を行った。さらに、HDAC の阻害が上記の統合失調症モデルラットにおける GAD67 発現と行動異常に及ぼす効果についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

統合失調症モデルとして、新生仔期グルタミン酸 NMDA 受容体遮断ラットを作成した。動物ブリーダーより妊娠ラットを購入し、生まれた雄ラットを実験に使用した。生後 7 日から 20 日まで 14 日間にわたり、NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 (0.4 mg/kg) あるいは生理食塩水 (SAL) を 1 日 2 回、8 時間以上の間隔をあけて頸部皮下に投与した。

新生仔期薬物投与後、ラットが成体に達したのちに各種行動試験を実施した。統合失調症でみられる認知機能障害、感覚運動ゲーティング障害、社会性障害、薬物に対する過感受性の有無を調べるため、Y 字型迷路試験、プレパルス抑制試験、社会的相互作用試験、MK-801 感受性試験を行った。

新生仔期 MK-801 投与によるヒストン修飾への影響について調べるため、前頭前皮質および海馬のアセチル化ヒストンの定量を試みた。ラットにイソフルランを吸入させ深麻酔し、断頭の後に脳を採取し前頭前皮質と海馬を分画した。採取した脳サンプルを冷凍保存し、市販の測定キットを用いて、マニュアルに従ってヒストンを抽出し、アセチル化ヒストンの測定を行った。

新生仔期 MK-801 投与による GABA 神経伝達への影響を調べるため、上記方法で作成したラットの脳を灌流固定したのちに薄切した脳切片を免疫組織化学染色し、前頭前皮質および海馬におけるパルプアルブミンおよび GAD67 陽性細胞数を計測した。またアセチル化ヒストン H3 タンパク質 9 番目リジン (H3K9ac) と GAD67 の二重染色を行い、局在を調べた。さらに、断頭採取後に分画した海馬を用いて RT-PCR を行い Gad1 の発現量を測定した。

HDAC 阻害が統合失調症様行動異常と GAD67 発現に及ぼす効果を調べるため、上記方法で作成したラットに 14 日間にわたり HDAC 阻害剤である酪酸ナトリウム (300 mg/kg, ip) を投与し、

Y字型迷路試験およびプレパルス抑制試験を行った。また採取した脳を用いて海馬における Gad1 の発現量を測定した。

#### 4. 研究成果

行動試験の結果、新生仔期 MK-801 投与ラットは、Y字型迷路試験における自発的交替反応の減少、プレパルス抑制試験における抑制率の低下、社会的相互作用試験における社会的行動の減少、MK-801 への感受性の亢進を示した。これらの行動異常は、統合失調症における認知機能障害、感覚ゲーティング障害、陰性症状、陽性症状に類似することから、新生仔期 MK-801 投与ラットの統合失調症モデルとしての妥当性が確認された。

新生仔期 MK-801 投与によるヒストン修飾への影響について調べるため、市販のキットを用いて前頭前皮質および海馬のアセチル化ヒストンの定量を試みたもののいずれの部位においてもアセチル化ヒストン量がキットの検出限界を下回り、定量が困難であった。キットに同梱された試薬を用いたヒストン抽出方法に問題があった可能性が考えられた。このため、新生仔期 MK-801 投与ラットの脳においてヒストン修飾の異常生じているという確証は得られなかった。

一方、免疫組織化学染色の結果、新生仔期 MK-801 投与ラットの前頭前皮質において GAD67 陽性細胞の数が減少していた。なお GAD67 陽性細胞には H3K9ac の局在が確認された。また RT-PCR の結果より、新生仔期 MK-801 投与によって海馬の Gad1 発現量が減少していた。これらのことから、新生仔期 MK-801 投与ラットの前頭前皮質や海馬において、GABA 神経伝達の機能低下が生じている可能性が示唆される。

また HDAC 阻害剤酪酸ナトリウムの反復投与が新生仔期 MK-801 投与ラットの行動異常に及ぼす影響を調べた結果、酪酸ナトリウムの反復投与は同ラットの示すプレパルス抑制試験における抑制率の低下には影響しなかったものの、Y字型迷路試験において自発的交替反応率の減少を抑制し、空間作業記憶の障害に対する改善効果を示した。一方、酪酸ナトリウムの反復投与は、新生仔期 MK-801 投与による海馬の Gad1 発現量の低下には影響を及ぼさなかった。以上のことから、HDAC の阻害には統合失調症における認知機能障害を改善する効果があるものの、この効果は GAD67 発現の増加による GABA 機能の亢進を介したものではない可能性が示唆された。

本研究において、新生仔期 MK-801 投与ラットは統合失調症の症状と類似した多様な行動異常を示すとともに、前頭前皮質および海馬において GAD67 陽性細胞、Gad1 の減少を示し、GABA 機能の低下がこれらの行動異常の原因となっている可能性が示唆された。この結果は、GABA 機能の低下が統合失調症の精神症状の背景にあるとする従来の仮説を支持するものである。一方、本研究においてヒストン修飾の異常と GABA 機能低下との直接的な関連は明らかとならなかったものの、HDAC の阻害は統合失調症において既存の抗精神病薬や効果を示しにくい認知機能障害を改善する可能性のあることが示唆された。本研究の成果は、統合失調症の生物学的メカニズムの理解に重要な示唆を与えるとともに、同疾患の認知機能障害を標的とした新規治療薬の研究開発に貢献できるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Tanabe-Kobayashi, Furuie, Misa Yamada, Mitsuhiro Yamada.	4. 巻 1800
2. 論文標題 Characterization of a WD-repeat family protein WDR3 in the brain of WDR3 hetero knockout mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2022.148188	査読の有無 有
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 中武優子、古家宏樹、山田光彦.	4. 巻 158
2. 論文標題 マウスの社会的敗北場面を利用した心理的ストレス負荷モデル.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 39-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.22104	査読の有無 有
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 Furuie Hiroki, Yamada Mitsuhiro	4. 巻 176
2. 論文標題 Neonatal blockade of NR2A-containing but not NR2B-containing NMDA receptor induces spatial working memory deficits in adult rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 57～65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.10.005	査読の有無 有
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9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Furuie H, Yamada M.
2. 発表標題 Developmental stage-specific involvement of NMDA receptor hypofunction in risk formation for psychiatric disorders.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中武優子、古家宏樹、請園正敏、山田美佐、吉澤一巳、山田光彦.
2. 発表標題 視覚情報を利用したマウスの新規ストレスモデル.
3. 学会等名 BPCNP NPPP
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古家宏樹、請園正敏、岡田俊、山田光彦.
2. 発表標題 新生仔期NMDA 受容体慢性遮断はラットの食餌行動の社会的促進を障害する.
3. 学会等名 第40回日本生理心理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺尾真実、古家宏樹、山田光彦、澤幸祐.
2. 発表標題 NMDA型グルタミン酸受容体遮断はラットのSense of Agencyを減衰させる.
3. 学会等名 日本心理学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田光彦、古家宏樹.
2. 発表標題 NMDA受容体NR2Aサブユニットのラット新生仔期における機能阻害は空間作業記憶の発達を障害する.
3. 学会等名 第118回日本精神神経学会学術総会、第118回日本精神神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakatake Y, Furuie H, Inoue-Ueno Y, Inoue T, Yosizawa K, Hosino M, Yamada M
2. 発表標題 A psychosocial stress model using witnessing social defeat scenes.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Furuie H, Yamada M
2. 発表標題 Neonatal blockade of NR2A-containing NMDA receptor induces schizophrenia-related behaviors in adult rats.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中武優子, 古家宏樹, 吉澤一巳, 山田光彦
2. 発表標題 The oxytocin signaling in the anterior insular cortex mediates the emotional contagion in mice.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田光彦, 川島義高, 山田美佐, 古家宏樹, 國石洋, 立花良之, 野田隆政
2. 発表標題 不安を主症状とする精神疾患に対するRiluzoleの効果：システマティックレビューによる検討.
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	山田 光彦 (Yamada Mitsuhiko)  (60240040)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・客員研究員  (82611)	
研究分担者	三輪 秀樹 (Miwa Hideki)  (80468488)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長  (82611)	
研究分担者	國石 洋 (Kuniishi Hiroshi)  (60805034)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・特別研究員  (82611)	

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
---------	---------