

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25年 8月 29日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380078

研究課題名（和文）発達期低アミノ酸栄養による統合失調症関連機能異常リスクのモデルマウスによる解析

研究課題名（英文）Comparative studies on the risk of sensorimotor gating deficits in animal models of early amino acid/protein malnutrition.

研究代表者

古屋 茂樹（FURUYA SHIGEKI）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：0022274

研究成果の概要（和文）：

本研究は、遺伝性セリン合成不全マウスおよび発達期にタンパク質/アミノ酸制限に曝されたマウスの2種を、「初期低アミノ酸栄養ストレス」モデルとし、アミノ酸栄養不足や不均衡による統合失調症関連神経障害のリスク増加を評価することを目的とした。本課題遂行の結果、各モデルはヒト及びマウスに共通な統合失調症の行動エンドフェノタイプである感覚情報フィルター機能の障害を雌性特異的に呈した。脳内遊離代謝物含量も正常対象に比べ有意に変化しており、発達期の低アミノ酸栄養ストレスが成熟期統合失調症のリスク因子となることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Epidemiological studies provide evidence showing that early malnutrition may increase the risk of schizophrenia. The goal of the present study is to clarify effects of early amino acid/protein malnutrition on sensorimotor gating deficits, which have relevance to schizophrenia. We examined prepulse inhibition (PPI) of two different mouse models of early nutritional deficiencies, which recapture genetic serine deficiency and prenatal protein malnutrition. PPI is an operational measure of sensorimotor gating that is impaired in both human patients and rodent models of schizophrenia. We observed that in adulthood the serine deficiency model and the protein malnutrition model exhibited reduced levels of PPI in a gender specific manner. These results suggest that both serine deficiency and protein malnutrition during early developmental stages increase the risk of sex-dependent sensorimotor gating deficits.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2012年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：栄養学、脳神経疾患、食品

1. 研究開始当初の背景

本研究は、発達期のアミノ酸欠乏・不均衡による統合失調症関連高次機能障害発症のリスクを、動物モデルを用いて実験的に検証することを目的とした。統合失調症の発症リスクは性差や民族に関係なく約1%と高値

であり、発症後の完治が困難な精神疾患である。統合失調症の病因は、複数の疾患感受性遺伝子と環境要因との相互作用が推定されている。過去の大規模な飢饉の疫学的研究から、胎児期から幼年期に低栄養を経験することにより成人期の統合失調症発症リスクが

約 2 倍高まることが報告されている (Brown and Susser, *Schizophr. Bull.*, 2008)。これまでに多様な栄養素の中で、葉酸、必須脂肪酸、レチノイド、ビタミン D などの微量栄養素の欠乏が発症リスクに寄与している可能性が指摘されている。これら微量栄養素に加え、主要栄養素、特にタンパク質/アミノ酸栄養の不足が影響する可能性も動物実験での結果を含めて指摘されている (Butler et al., *Prenatal Exposures in Schizophrenia*, *American Psychiatric Association Press*, 1999; Palmer et al., *Brain Res.*, 2008)。しかし、いずれの場合もリスク増加の分子的な基盤は全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、発達期の全般的なアミノ酸不足や特定のアミノ酸のみが欠乏している不均衡状態による発症リスクの検証に焦点を絞った。特にアミノ酸および代謝的に関連する神経伝達物質のネットワーク機能と統合失調症行動エンドフェノタイプを中心に発達期低アミノ酸栄養の影響を統合的に評価し、その分子的基盤の解明を目的とした。我々は Cre/loxP による組織特異的遺伝子破壊法によってセリン合成酵素遺伝子 (*Phgdh*) を脳特異的にノックアウトしたマウス (BKO) を既に作成しており、脳内各領域で遊離 L-および D-セリンの顕著な含量低下を報告した (Yang et al., *J. Biol. Chem.*, 2010)。この BKO マウスを D,L-セリンのみが激減しているアミノ酸不均衡モデルとした。さらに妊娠雌マウスにタンパク質制限食を妊娠中から出産後離乳時まで給餌することにより、発達期に低アミノ酸栄養に曝された低アミノ酸栄養 (Early Protein Restriction: EPR) マウスを作製した。これら 2 種類の「初期低アミノ酸栄養ストレス」モデルマウスの生化学および分子生物学的解析に、神経行動学的解析を組み合わせることにより、従来明解ではなかった発達期アミノ酸栄養不足・不均衡による統合失調症に関連する行動異常リスクとの関連を、包括的に分子レベルで理解することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) マウスの作製

BKO マウス (*hGFAP-Cre::Phgdh^{lox/lox}*) は以前発表した論文に従って作製し (Yang et al., *J. Biol. Chem.*, 2010)、同腹の *Phgdh^{lox/lox}* 個体を正常対照とした。EPR マウスは妊娠確定後の雌個体に AIN-93G に準拠して糖質、脂質、ビタミン等の微量栄養素を含むが、タンパク質カゼインの含量を半量に減らしたタンパク質制限食を妊娠期と授乳期に給餌した。新生児マウスは生後 4 週で離乳し、雄雌分離後カゼインを正常量含む AIN-93G 準拠食を X

週間給餌して成長させた。妊娠期から授乳期を通じて AIN-93G 準拠した飼料を給餌された雌個体から生まれた個体を正常対照個体群とした。

(2) 行動解析

BKO マウスの行動解析は生理学研究所・行動様式解析室で開発された網羅的行動解析テストバッテリーに雄個体を供した。この行動解析バッテリーには感覚情報フィルター機能を評価するプレパルス阻害 (PPI) を含み、その他に自発行動、不安、うつ、社会性、運動学習、作業記憶、空間記憶等を評価する行動試験を実施した。なお、BKO および Floxed マウスの網羅的行動解析は宮川 剛教授 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所) および高雄 啓三准教授 (生理学研究所) との共同研究である。EPR マウスについては、雌雄それぞれについて PPI のみを測定した。

(3) 生化学分析

BKO および Floxed マウスについては脳内アミノ酸含量を測定済みであるため、主要領域の遺伝子およびタンパク質の発現解析を行った。EPR マウスと正常対照マウスは PPI 測定後に脳を取り出し、主要領域のアミノ酸、遺伝子及びタンパク質の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) アミノ酸不均衡モデル (BKO マウス)

D,L-セリンの遊離含量低下を呈す BKO マウスはヒト遺伝性セリン合成不全疾患の動物モデルに相当する。このマウスをアミノ酸不均衡モデルとした。アミノ酸分析より、BKO マウスは成熟期だけでなく生後ほ乳期においても海馬や大脳皮質などの領域において既に D-体および L-セリンの含量が顕著に低下していることを確認した。すなわち BKO も発達期にアミノ酸栄養不均衡に陥っていることが明らかとなった。BKO マウスをテストバッテリーによる網羅的行動解析に供した結果、正常対照個体に比べ、感覚フィルター機能を評価するプレパルス阻害 (PPI) の有意な低下を見いだした (図 1)。

(図 1 PPI) 掲載予定

さらに BKO マウスでは社会性行動の有意な変化も観察された。これらの変化はヒト統合失調症患者においても共通に認められる行動エンドフェノタイプであることから、脳内の L-セリン合成不全が統合失調症のリスク要因であることが初めて示された。さらに不安行動、驚愕反応、小脳運動学習等の多様な行動異常が認められた。我々は成熟期 BKO マウス脳において神経細胞の活動によって速やかに誘導される最初期応答遺伝子 *Arc* の発現を指標として NMDA 型グルタミン酸受容体の機能減弱を見いだした (Yang et al., *J.*

Biol. Chem., 2010)。さらに今回の解析により、発達期からの L-セリン合成不全が神経回路網の統合的高次機能である行動の表出に対し広範な負の影響を及ぼすことを初めて実証した。これらの高次神経機能変調の分子的基盤を明らかにするために、大脳皮質と海馬における遺伝子発現変化について NMDA 受容体機能減弱との対応を念頭に詳細な解析を進めている。現段階において、神経細胞の情報伝達に重要な役割を果たす複数の遺伝子について mRNA 量の有意な変化を認めている。これらの遺伝子には統合失調症に強く関連するものが含まれている。

(2) アミノ酸不足モデル (EPR マウス)

発達期低タンパク質/アミノ酸栄養に曝されたモデルである EPR マウスについてはその作出に困難を極めた。Palmer らのラットでの報告を参考に (*Brain Res.*, 2004), 正常食の 1/4 量のタンパク質制限食給餌で作出を試みたが, C57BL/6J マウスでは新生児の高死亡率に加え, 母親♀マウスの死亡が頻発した。安定した作出が困難であったため, 雌マウスの系統を変更し, より穏やかな 1/2 量の制限条件を用いることで母親マウスと F1 世代の死亡を回避できた。EPR および正常対照の間には雌雄ともに成熟期体重と脳重量に有意差は見いだされなかった。そこで上記アミノ酸制限モデルの統合失調症関連行動異常を検討した結果, 雄は群間に差は無いが, 雌 EPR 群のプレパルス阻害は正常対照群に比べ有意に損なわれていることを見いだした。さらに雌個体の脳内成分の生化学分析を行ない, 正常対照に対して EPR マウスでは複数の代謝成分について顕著な変化を確認した。

(表 1) : 掲載予定

これらの結果より, 発達期低タンパク質/アミノ酸栄養曝露は, 雌性特異的に成年期の統合失調症関連行動エンドフェノタイプ発症リスクを高める要因であることが示された。今回マウスで得られた結果はラットでの報告と概ね一致するが, マウスではタンパク質/アミノ酸栄養制限のより穏やかな条件でもリスク要因となった。また, 発達期のタンパク質/アミノ酸栄養曝露は成熟期においても物質レベルで影響が残る可能性も示唆された。現在これらの脳内物質変化と PPI 障害との関連やその分子機序の解明を目指し解析を進めている。

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 12 件)

1. Ehmsen, J.T., Ma, T.M., Sason, H., Rosenberg,

D., Ogo, T., Furuya, S., Snyder, S.H., Wolosker, H. D-Serine in glia and neurons derives from 3-phosphoglycerate dehydrogenase. *J. Neurosci.* **33**, 12464-12469 (2013).

2. Sayano, T., Kawakami, Y., Kusada, W., Suzuki, T., Kawano, Y., Watanabe, A., Takashima, K., Arimoto, Y., Esaki, K., Wada, A., Yoshizawa, F., Watanabe, M., Okamoto, M., Hirabayashi, Y., Furuya, S. Serine deficiency caused by genetic *Phgdh* deletion leads to robust induction of 4E-BP1 and subsequent repression of translation initiation in the central nervous system. *FEBS J.* **280**, 1502-1517 (2013).
3. Takao, K., Kobayashi, K., Hagihara, H., Ohira, K., Shoji, H., Hattori, S., Koshimizu, H., Umemori, J., Toyama, K., Nakamura, H.K., Kuroiwa, M., Maeda, J., Atsuzawa, K., Esaki, K., Yamaguchi, S., Furuya, S., Takagi, T., Walton, N.M., Hayashi, N., Suzuki, H., Higuchi, M., Usuda, N., Sahara, T., Nishi, A., Matsumoto, M., Ishii, S., Miyakawa, T. Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* doi: 10.1038/npp.2013.38 (2013).
4. Esaki, K., Ohmori, T., Maebuchi, M., Nakamori, T., Ohshima, T., Furuya, S. Increased tyrosine in the brain and serum of mice by orally administering dipeptide SY. *Biosci. Biotech. Biochem.* **77**, 847-849 (2013).
5. Suzuki, M., Sasabe, J., Furuya, S., Hamase, K., Aiso, S. Type 1 diabetes mellitus in mice increases hippocampal D-serine in the acute phase after streptozotocin injection. *Brain Res.* **1466**, 167-176 (2012).
6. 江崎 加代子, 古屋 茂樹, 大豆タンパク質由来ジペプチドが中枢神経系に及ぼす作用の神経化学的評価, *大豆タンパク質研究*, **15**, 印刷中 (2012).
7. Esaki, K., Kokido, T., Ohmori, T., Tsukino, M., Ohshima, T., Furuya, S. Soy peptide ingestion increases neuroactive amino acids in the adult brain of wild-type and genetically engineered serine-deficient mice. *J. Nutr. Food Sci.* **1**, 109. doi: 10.4172/2155-9600.100010 (2011).
8. Maebuchi, M., Yamaguchi, N., and Furuya, S. Soy peptide as functional food component. *Medicine and Biology*, **155**, 566-576 (2011).
9. 古屋 茂樹, セリン合成不全によるスフィンゴ脂質恒常性破綻と末梢神経障害・糖尿病関連病態. *アミノ酸研究*, **5**, 15-20 (2011).
10. 古屋 茂樹, 遺伝性セリン合成不全疾患モデルマウスの脳内遊離アミノ酸組成に及ぼす大豆ペプチド摂取効果の定量的検討, 大

- 豆タンパク質研究, 13, 109-115 (2010).
11. Yang, JH., Wada, A., Yoshida, K., Miyoshi, Y., Sayano, T., Esaki, K., Kinoshita, O.M., Tomonaga, S., Azuma, N., Watanabe, M., Hamase, K., Zaitso, K., Machida, T., Messing, A., Itoharu, S., Hirabayashi, Y., Furuya, S. Brain-specific *Phgdh* deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an NMDA receptor co-agonist, in adult brain. *J. Biol. Chem.* **285**, 41380-41390 (2010).
 12. 古屋 茂樹, アミノ酸研究の最前線 I. 外科と代謝・栄養, **44**, 65-71 (2010).
- [学会発表] (計 21 件)
1. 市瀬 嵩志, 小河 匡, 安尾 しのぶ, 古屋 茂樹, 統合失調症関連エンドフェノタイプ発症に及ぼす妊娠期及び授乳期低タンパク質栄養の影響, 2013 年度農芸化学学会大会, (2013) 3 月 26 日, 仙台市 (東北大学).
 2. 古屋 茂樹: L-セリン生合成系による生体機能制御, 第 85 回日本生化学会大会 シンポジウム 1S04 「アミノ酸の新規機能と病態連関のニューフロンティア」, (2012) 12 月 14 日, 福岡市 (福岡国際会議場).
 3. Tadashi Ogo, Akihiro Watanabe, Shozo Tomonaga, Yoshio Hirabayashi, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Shigeki Furuya: “Deficits in sensorimotor gating and social behavior in brain-specific *Phgdh* knockout mice”, The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry/The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, September 30 – Oct 2nd, 2012, Kobe Convention Center, Kobe, Japan.
 4. 江崎 加代子, 佐矢野 智子, 平林 義雄, 古屋 茂樹: セリン欠乏による細胞毒性新奇スフィンゴ脂質の蓄積: *in vivo* 及び *in vitro* における解析, 第 6 回日本アミノ酸学会学術大会, (2012) 9 月 28 日, 松戸市 (千葉大学). (優秀ポスター賞受賞)
 5. 佐矢野 智子, 江崎 加代子, 濱野 桃子, 鶴殿 美弥子, 片倉 喜範, 加藤 久典, 平林 義雄, 古屋 茂樹: セリン欠乏が惹起する異常スフィンゴ脂質産生による遺伝子発現並びに細胞形態変化, 第 6 回日本アミノ酸学会学術大会, (2012) 9 月 28 日, 松戸市 (千葉大学).
 6. Tadashi Ogo, Akihiro Watanabe, Shozo Tomonaga, Yoshio Hirabayashi, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Shigeki Furuya: “Deficits in sensorimotor gating and social behavior in brain-specific *Phgdh* knockout mice”, The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, September 18 – 21st, 2012, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan.
 7. Keizo Takao, Katsunori Kobayashi, Kayoko Esaki, Shigeki Furuya, Tsuyoshi Takagi, Noah Walton, Nobuhiro Hayashi, Hidenori Suzuki, Mitsuyuki Matsumoto, Shunsuke Ishii, Tsuyoshi Miyakawa: “Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces a mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal and behavioral phenotypes related to schizophrenia”, 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, June 5th, 2012, Vancouver, Canada.
 8. 江崎 加代子, 佐矢野 智子, 平林 義雄, 古屋 茂樹: セリン欠乏による神経毒性異常スフィンゴ脂質の蓄積: *in vivo* 及び *in vitro* における解析, 第 66 回日本栄養・食糧学会大会, (2012) 5 月 19 日, 仙台市.
 9. Keizo Takao, Katsunori Kobayashi, Hideo Hagihara, Koji Ohira, Keiko Toyama, Hirota Shoji, Hironori K Nakamura, Kayoko Esaki, Shigeki Furuya, Tsuyoshi Takagi, Noah Walton, Nobuhiro Hayashi, Hidenori Suzuki, Mitsuyuki Matsumoto, Shunsuke Ishii, Tsuyoshi Miyakawa: “Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia”, Genes, Brain, and Behavior 2012 (14th Annual Meeting of the International Behavioural and Neural Genetics Society), May 18, Boulder, CO, USA.
 10. Tomoko Sayano, Kayoko Esaki, Alfred H. Merrill, Jr., Yoshio Hirabayashi, Shigeki Furuya: “Possible link between altered gene expression profiles and unusual sphingolipid production in *Phgdh*-deficient mouse embryonic fibroblast”, The Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology, April 22-27th, 2012, Lucca, Italy.
 11. Shigeki Furuya, Tomoko Sayano, Kayoko Esaki, Alfred H. Merrill, Jr., Yoshio Hirabayashi: “Targeted deletion of 3-phosphoglycerate dehydrogenase disturbed serine and sphingolipid metabolisms of mouse tissues and fibroblast cells.” The Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology, April 22-27th, 2012, Lucca, Italy.
 12. Shigeki Furuya: “Soy peptide ingestion increases neuroactive amino acids in the adult brain of genetically induced serine-deficient mice and wild-type mice”, ICoFF2011 - International Conference on Food Factors for Health Promotion, Symposium Session-42: Bioactive amino acids and peptides, November 22th, 2011, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan R.O.C.

13. Kayoko Esaki, Tomoko Sayano, Yoshio Hirabayashi, Shigeki Furuya: “Reduced L-serine availability modulates the expression of schizophrenia-associated genes”, ICoFF2011 - International Conference on Food Factors for Health Promotion, November 22nd, 2011, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan R.O.C.
14. 渡邊 彰大, 小河 匡, 高雄 啓三, 友永 省三, 平林 義雄, 宮川 剛, 古屋 茂樹: 脳内 L-Ser 合成不全が惹起する不安関連情動行動障害, 日本アミノ酸学会第 5 回学術大会, (2011) 11 月 4 日, 名古屋市.
15. Keizo Takao, Katsunori Kobayashi, Hideo Hagihara, Koji Ohira, Keiko Toyama, Hirota Shoji, Hironori K Nakamura, Shigeki Furuya, Tsuyoshi Takagi, Shunsuke Ishii, Tsuyoshi Miyakawa: “Deficiency of Schnurri-2 confers schizophrenia-related phenotypes and inflammatory-like phenomenon in the brain”, 2011 The Molecular and Cellular Cognition Society-Asia Meeting, Seoul, Korea, September 19th, 2011
16. 古屋 茂樹: セリン合成不全によるスフィンゴ脂質恒常性破綻と末梢神経障害・糖尿病関連病態, 日本アミノ酸学会 第 4 回夏のシンポジウム, (2011) 9 月 9 日, 新発田市.
17. 渡邊 彰大, 和田 晃, 江崎 加代子, 友永 省三, 大島 敏久, 平林 義雄, 古屋 茂樹: 生後発達期におけるセリン合成不全疾患モデルマウスの脳内アミノ酸・遺伝子発現解析, 2011 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会, (2011) 9 月 4 日, 佐賀市.
18. 古屋 茂樹: グリア細胞による L-セリン合成の生理機能を組織特異的 KO マウスから探る, 北海道大学・脳科学研究教育センターシンポジウム「グリアの生理と病態」, 2010 年 12 月 3 日, 札幌市.
19. 古屋 茂樹: マイクロアレイ解析から捉え直すセリン合成の栄養生理学的意義, 第 4 回日本アミノ酸学会学術集会ワークショップ, (2010) 9 月 17 日, 日光市
20. 友永 省三, 江崎 加代子, 和田 晃, 佐野智子, 梁 廷訓, 大島 敏久, 古瀬 充宏, 平林 義雄, 古屋 茂樹: 脳特異的 *Phgdh* ノックアウトマウスの生後発達期における脳内アミノ酸およびモノアミン含量解析, 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会, (2010) 9 月 2 日, 名古屋市.
21. 和田 晃, 梁 廷訓, 佐野智子, 友永 省三, 田代 康介, 久原 哲, 三次 百合香, 濱瀬 健司, 吉田 一之, 平林 義雄, 古屋 茂樹: 脳内 L-セリン合成能の低下は海馬 NMDA 受容体機能減弱を導く, 第 64 回日本栄養・食糧学会大会, (2010) 5 月 22 日, 徳島市.

[図書] (計 4 件)

1. 古屋 茂樹, 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素欠損症. 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.19 「先天代謝異常症候群 (第 2 版) 一病因・病態研究, 診断・治療の進歩」, pp327-331 (2012).
2. 古屋 茂樹, ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ欠損症. 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.19 「先天代謝異常症候群 (第 2 版) 一病因・病態研究, 診断・治療の進歩」, pp332-334 (2012).
3. 古屋 茂樹, ホスホセリンホスファターゼ欠損症. 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.19 「先天代謝異常症候群 (第 2 版) 一病因・病態研究, 診断・治療の進歩」, pp335-337 (2012).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002>

[756/index.html](http://www.brs.kyushu-u.ac.jp/~kinou/)

<http://www.brs.kyushu-u.ac.jp/~kinou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古屋 茂樹 (FURUYA SHIGEKI)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号: 00222274

(2) 研究分担者 (平成 23 年度まで)

友永 省三 (TOMONAGA SHOZO)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号: 00552324