

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791325

研究課題名（和文）

より臨床知見を反映した新しい統合失調症動物モデルの作製

研究課題名（英文）

The development of novel schizophrenia animal models based on the clinical findings

研究代表者

毛利 彰宏 (MOURI AKIHIRO)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：20597851

研究成果の概要（和文）：統合失調症の発症仮説として注目されている発達段階における要因の複合化は、タンパク質発現変化を伴い、単独要因よりも行動障害を悪化させる。また、教育的に恵まれた環境を模した飼育は、エピジェネティック変化を伴い、要因による行動障害の発現を抑制する。このように要因の組合せにより、より臨床知見を反映した包括的な統合失調症モデルの構築をすることができた。

研究成果の概要（英文）：According to schizophrenia hypothesis, the combined factors in the pathogenesis/pathophysiology of schizophrenia leads to behavioral abnormalities, which are associated with protein expression in the brain. Environmental enrichment prevents behavioral abnormalities induced by the pathogenesis factor of schizophrenia, which are associated with epigenetic changes in the brain. Appropriate behavioral approaches with such models would be invaluable for providing new insights into the pathogenesis/pathophysiology of schizophrenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：精神神経科学

科研費の分科・細目：精神薬理学

キーワード：統合失調症、グルタミン酸作動性神経系低下仮説、Two-hit 仮説、発症機序解明、動物モデル、精神疾患

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は成人の有病率が約 1%とされる普遍的な精神疾患の一つである。思春期以降に発症する慢性・進行性の精神疾患であり、陽性症状、陰性症状および認知障害を主訴とするため症状は複雑であり、その発症機序は不明である。新たな治療戦略を考えるためには臨床研究に加え、基礎研究において適切な発症要因による統合失調症動物モデルを作製し、統合失調症の発症機序の解明および、それに基づいた予防法および治療法の開発が必要である。周産期において何らかの要因（遺伝子変異、冬季出産、ウイルス感染等）による脳発達障害により脆弱性が形成され、思春期以降における社会的なストレスや薬物乱用等により統合失調症を発症するとい

う two-hit 仮説が提案されている。一方、統合失調症の発症に関連したリスク遺伝子の変異が多く見出され、そのリスク遺伝子の遺伝子改変マウスが統合失調症モデルとして提唱されている。しかし、遺伝要因だけでなく環境要因もその発症には関与すると考えられているため、単一の遺伝子を改変させたマウスでは統合失調症のモデル動物として限界があると思われる。

2. 研究の目的

本研究は臨床知見に基づく統合失調症動物モデルを作製し、統合失調症の発症機序の解明および、それに基づいた予防法および治療法の開発を目的とする。統合失調症の発症仮説として注目されている two-hit 仮説は周産期における何らかの要因による脳発達障害

が統合失調症に対する脆弱性を形成し、思春期以降における社会的なストレスなどが統合失調症を発症させるというものである。本研究は two-hit 仮説に基づき、統合失調症に対する周産期での脆弱性形成および思春期における発症に関わると考えられている遺伝要因および環境要因の単独ならびに複合化による相乗作用を検討し、より臨床知見を反映した包括的な統合失調症モデルの構築を目指す。また、遺伝・環境要因を持っているにもかかわらず、統合失調症が発症しない例があり、教育的に恵まれた環境下で成長すると統合失調症の発症が抑制される可能性が高い。これら臨床知見を基にした統合失調症の発症機序の研究によって統合失調症の治療薬ばかりでなく予防薬の開発が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

ICR 系雄性マウス, C57BL/6J 系雄性マウス。

(2) エンリッチ環境

透明なアクリル製の特製ケージ内に木製のソフトチップを敷き、トンネル、シーソー、ランニングホイールなどの様々なオブジェクトを加え、エンリッチ環境とした。新奇な環境を保つため、毎日オブジェクトの種類・配置を変えた。

(5) 社会性行動試験

灰色のアクリル製ボックス (25×25×30 cm) を使用した。マウスを装置に馴化させるため、最初の2日間はマウスを1匹ずつ装置に入れ、10分間自由に探索させた。3日目にテストするマウスと、異なるケージ内で飼育した同系統のマウスを同時に装置に入れ、テストするマウスの未知マウスに対して行う匂いを嗅ぐ、追いかける、上に乗りかかる、下に潜るなどの行動を社会性行動とし、10分間測定した。

(6) 新奇物体認知試験

黒いビニールで被われたプラスチック製の箱 (30×30×35 cm) に木製のソフトチップを敷いて使用した。マウスを装置に馴化させるため、最初の3日間はマウスを装置に入れ、10分間自由に探索させた。訓練試行では、2つの異なる形をした物体を装置内に設置し、マウスを装置内に入れて各物体に対する探索時間を10分間測定した。訓練試行24時間後の保持試行では、片方の物体を形の異なる新奇な物体と置換し、マウスを装置内に入れて各物体に対する探索時間を10分間測定した。

(7) ウェスタンブロッティング解析

核および細胞質画分の粗蛋白量をタンパク定量し、サンプルバッファーを加え調製した。電気泳動は15%ポリアクリルアミドゲルで行い、PVDF膜へ蛋白を転写した後、膜をDetector Block Kitまたは3%BSAを用いて

ブロッキングし、一次抗体と反応させた。二次抗体と反応させた後、PVDF膜と化学発光液に反応させ、ChemiDoc XRSを用いて検出した。

(8) 免疫組織化学的解析

抱水クロラルを投与してマウスを麻酔し、左心室よりSalineを還流し、その後水冷した4%パラホルムアルデヒドを還流して脳を固定した。脳を摘出し、固定液に浸して固定したのち、PBSで調製した30%スクロース液に浸した。凍結切片は、脳組織を包埋し、クリオスタットを用いて薄切した。切片に1次抗体を添加して4°Cで一晩インキュベートした。PBSで洗浄後、ビオチンを付加した2次抗体を添加して室温でインキュベートした。PBSで洗浄後、ビオチン付加2次抗体を用いたサンプルに対してはVECTASTAIN ABC reagentを用いて可視化した。

4. 研究成果

(1) フェンサイクリジンにより誘発される行動障害に対する幼若期におけるエンリッチ環境下での飼育による予防効果

①フェンサイクリジンにより誘発される社会性行動障害に対する幼若期にエンリッチ環境下で飼育による予防効果

幼若期にエンリッチ環境下で飼育されたマウスの社会性行動がPCP連続投与によりどのような影響を受けるか検討するため、社会性行動試験を行った。標準的な環境下で飼育されPCPを連続投与されたマウスでは、生理食塩水を投与されたマウスに比べ、社会性行動を行う時間の有意な短縮が認められた(図1)。

しかし、エンリッチ環境下で飼育されPCPを連続投与されたマウスでは、標準的な環境下で飼育されPCPを連続投与されたマウスに比べ、社会性行動を行う時間が有意に延長した(図1)。

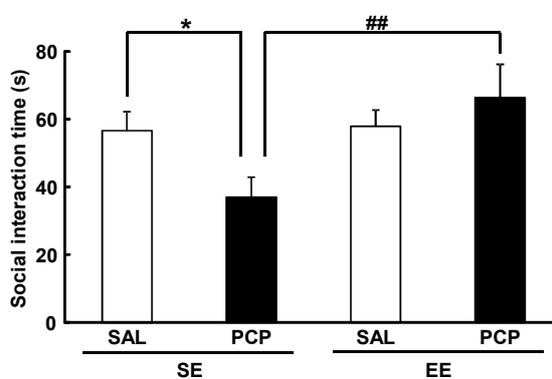


図1. フェンサイクリジンにより誘発される社会性行動障害に対する幼若期にエンリッチ環境下で飼育による予防効果

* $p < 0.05$ vs 標準的な環境下で飼育された生理食塩水連続投与マウス. ## $p < 0.01$ vs 通常飼育されたPCP連続投与マウス. SE: 標準的な環境下での飼育, EE: エンリッチ環境下での飼育, SAL: 生理食塩水, PCP: フェンサイクリジン.

②フェンサイクリジンにより誘発されるアセチル化ヒストン H3K9 陽性細胞数の減少に対する幼若期におけるエンリッチ環境下での飼育による予防効果

動物実験において、エンリッチ環境下で飼育すると、ヒストンのアセチル化が生じて学習記憶機能が亢進することが報告されている。そこで、PCP 連続投与および幼若期におけるエンリッチ環境下飼育がヒストンのアセチル化にどのような影響を与えるかについて検討するため、マウスの脳をサンプル化し、前頭皮質におけるアセチル化ヒストン H3K9 陽性細胞を免疫染色法により PCP 連続投与の最終投与 24 時間後にサンプル化し、前頭皮質切片におけるアセチル化ヒストン H3K9 陽性細胞を測定した。標準的な環境下で飼育され PCP を連続投与されたマウスは、生理食塩水を投与されたマウスに比べ、前頭前皮質におけるアセチル化ヒストン H3K9 陽性細胞数の有意な減少が認められた (図 2)。また、エンリッチ環境下で飼育され PCP を連続投与されたマウスでは、標準的な環境下で飼育され PCP を連続投与されたマウスに比べ、前頭前皮質におけるアセチル化ヒストン H3K9 陽性細胞数の有意な増加が認められた (図 2)。

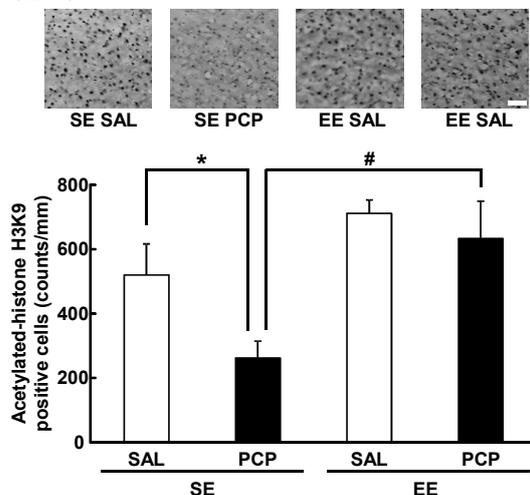


図 2. フェンサイクリジンにより誘発されるアセチル化ヒストン H3K9 陽性細胞数の減少に対する幼若期にエンリッチ環境下で飼育による予防効果
* $p < 0.05$ vs 標準的な環境下で飼育された生理食塩水連続投与マウス. ## $p < 0.01$ vs 通常飼育された PCP 連続投与マウス. SE: 標準的な環境下での飼育, EE: エンリッチ環境下での飼育, SAL: 生理食塩水, PCP: フェンサイクリジン.

③フェンサイクリジンにより誘発される社会性行動障害に対する幼若期における酪酸ナトリウム投与による予防効果

PCP を連続投与されたマウスの前頭前皮質では、ヒストンアセチル化陽性細胞数が減少し、そのような減少はエンリッチ環境下飼育されたマウスでは認められなかった。そこで、幼若期のヒストンアセチル化の変化が PCP 連続投与による行動異常の惹起にどのよう

な影響を与えるかについて検討を行った。HDAC 阻害剤である酪酸ナトリウム (Sodium butyrate: SB) を幼若期に連続投与したマウスの社会性行動が PCP 連続投与によりどのような影響を受けるか検討した。生理食塩水を連続投与され、その後 PCP を連続投与されたマウスでは、生理食塩水を連続投与され、その後生理食塩水を投与されたマウスに比べ、社会性行動を行う時間の有意な短縮が認められた (図 3)。また、SB を連続投与され、その後 PCP を連続投与されたマウスでは、生理食塩水を投与され、PCP を連続投与されたマウスに比べ、社会性行動を行う時間が有意に延長した (図 3)。

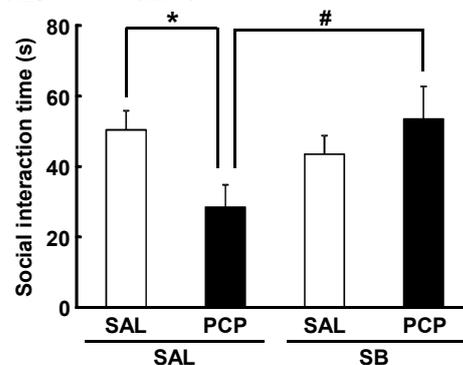


図 3. フェンサイクリジンにより誘発される社会性行動障害に対する幼若期における酪酸ナトリウム投与による予防効果。

* $p < 0.05$ vs 生理食塩水, 生理食塩水-連続投与マウス. # $p < 0.05$ vs 生理食塩水, PCP-連続投与マウス. SB: 酪酸ナトリウム, SAL: 生理食塩水, PCP: フェンサイクリジン.

本研究では、PCP を連続投与されたマウスの前頭前皮質において、アセチル化ヒストン H3K9 陽性細胞数の減少がみられた。しかし、幼若期にエンリッチ環境下で飼育され、その後 PCP を連続投与されたマウスではそのような変化はみられなかった。また、ヒストンアセチル化を促進する作用をもつ HDAC 阻害剤である酪酸ナトリウムを幼若期に連続投与すると、PCP 連続投与による社会性行動や認知機能障害は認められなかった。エンリッチ環境下での飼育によるヒストンのアセチル化の亢進によるエピジェネティック制御は、神経機能に関連した遺伝子の発現増加をもたらす。PCP 連続投与により惹起される行動異常の抑制、緩解作用に関わっている可能性が考えられる。本成果により発達期における養育環境の強化が統合失調症の予防・治療法の開発に応用されることが期待される。

(2) 新生仔期 PolyI:C 処置マウスへの PCP 連続投与による行動変化に対する脆弱性

①フェンサイクリジン連続投与による物体認知記憶の障害への新生仔期 PolyI:C 処置が与える影響

PCP 連続投与による物体認知記憶の障害に対する新生仔期における PolyI:C 処置の影響に

ついて、新奇物体認知試験を行った。7日間のPCP連続投与では物体認知記憶の障害が認められないが、14日間のPCP連続投与により視覚的認知記憶の障害が認められた(図4A, B)。PolyI:C処置マウスではPCP連続投与による物体認知記憶の障害は増強された(図4C, D)。

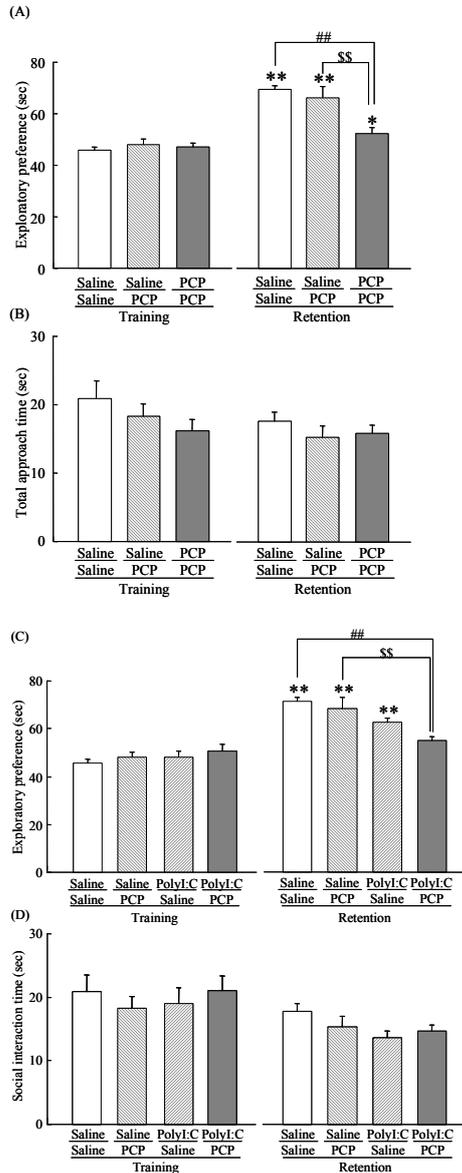


図4. フェンサイクリジン連続投与による物体認知記憶の障害への新生仔期PolyI:C処置と与える影響。14日間のPCP連続投与により物体認知記憶は障害される(A)。## $p < 0.05$ vs 保持施行における生理食塩水-, 生理食塩水-連続投与マウス。\$\$ $p < 0.01$ vs 保持施行における生理食塩水-, PCP-連続投与マウス。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 訓練施行における各マウス。全て群において総探索時間に差が認められなかった(B)。新生児期のPoly I:Cと若年期のPCP連続投与の組合せにより社会性行動は障害される(C)。## $p < 0.05$ vs 保持施行における生理食塩水-, 生理食塩水-連続投与マウス。\$\$ $p < 0.01$ vs 保持施行における生理食塩水-, PCP-連続投与マウス。** $p < 0.01$ vs 訓練施行における各マウス。て群において総探索時間に差が認められなかった(D)。Saline: 生理食塩水, PCP: フェンサイクリジン。

②新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンサイクリジン連続投与によるグルタミン酸作働性神経系関連タンパク質発現への影響。PCP 休薬7日後に前頭前皮質を摘出し、脳サンプルを調製した。新生仔期 Poly I:C 単独処置および7日間のPCP連続投与単独では有意な発現変化が認められなかったが、新生仔期 Poly I:C 処置群に7日間PCPを連続投与するとグルタミン酸トランスポーター (GLAST) は前頭前皮質において有意な増加が認められた(図5A)。一方、グルタミン酸トランスポーター (GLT-1), グルタミン酸合成酵素 (GLS), 小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1), セリンラセマーゼ (SR), グリア繊維性酸性タンパク (GFAP) の発現にはいずれの群間においても有意な差は認められなかった(図5B-F)。

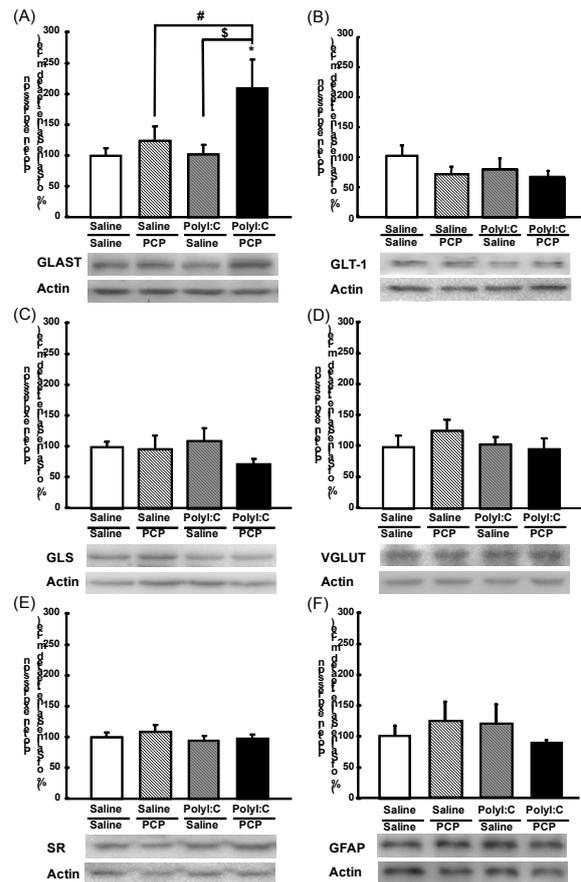


図5. 新生仔期PolyI:C処置マウスにおけるフェンサイクリジン連続投与によるグルタミン酸作働性神経系関連タンパク質発現への影響。PCP 最終投与 15 日後における前頭前皮質におけるタンパク質発現変化についてウエスタンブロッティング法により検討した。* $p < 0.05$ vs 生理食塩水-, 生理食塩水-連続投与マウス。# $p < 0.05$ vs 生理食塩水-, PCP-連続投与マウス。\$ $p < 0.05$ vs PolyI:C-, 生理食塩水-連続投与マウス。Saline: 生理食塩水, PCP: フェンサイクリジン。

③新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンサイクリジン連続投与による物体認知障害に対するグルタミン酸トランスポーター阻

害薬の効果

新奇物体認知試験において、新生仔期 PolyI:C 処置マウスへの PCP 連続投与による新奇物体に対する探索嗜好率の低下（物体認知記憶の障害）は、グルタミン酸トランスポーター阻害薬 dl-threo-β-Benzyloxyaspartate (TBOA) の前頭前皮質内投与によって有意に改善された（図 6）。一方、対照マウスの前頭前皮質内に TBOA を投与しても物体認知記憶に影響を及ぼさなかった（図 6）。TBOA は、訓練試行および保持試行における総探索時間に影響を及ぼさなかった（図 6）。

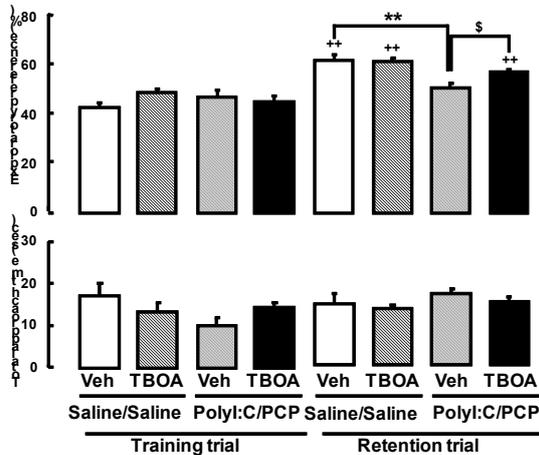


図 6. 新生仔期 PolyI:C 処置マウスにおけるフェンシクリジン連続投与による物体認知障害に対するグルタミン酸トランスポーター阻害薬の効果。訓練試行 30 分前に dl-threo-β-Benzyloxyaspartate (TBOA) あるいは vehicle (Veh) を前頭前皮質内に投与した。
**p<0.01 vs 生理食塩水-, 生理食塩水-, 溶媒-投与マウス。 #p<0.05 vs PolyI:C-, PCP-, 溶媒-投与マウス。 Saline: 生理食塩水, PCP: フェンサイクリジン。

本研究では、two-hit 仮説に基づき新生仔期の PolyI:C 投与が若年期の PCP 連続投与による精神障害の発症脆弱性を高めるかどうかについて検討を行った。PCP 連続投与による運動量増加/行動感作、衝動性の増加、社会性行動の低下および物体認知記憶の障害は PCP 投与期間に依存して認められた。一方、新生仔期 PolyI:C 処置は若年期の PCP 連続投与によるこれら行動変化を増強した。以上の結果から発達期における免疫異常も成体期まで遷延することが示唆された。PolyI:C 処置マウスに 7 日間 PCP を連続投与したマウスにおける前頭前皮質の GLAST の発現は、有意に増加しており、認知障害は GLAST 阻害薬の前頭前皮質への注入により改善した。以上のことから、新生仔期 PolyI:C 処置による若年期 PCP 連続投与による行動異常の増強において、GLAST の発現増加が関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 8 件)

- (1) Miyazaki M, Noda Y, Mouri A, Kobayashi K, Mishina M, Nabeshima T, Yamada K. Role of convergent activation of glutamatergic and dopaminergic systems in the nucleus accumbens in the development of methamphetamine psychosis and dependence. *Int J Neuropsychopharmacol*. In press, 査読有, 2013. URL: <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=8930223>
- (2) Koseki T, Mouri A, Suzuki S, Nakajima A, Mamiya T, Yan Y, Nabeshima T. Galantamine attenuates reinstatement of cue-induced methamphetamine-seeking behavior in mice. *Addict Biol*. In press, 査読有, 2013, doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00425.x.
- (3) Hida H, Mouri A, Noda Y. Behavioral phenotypes in schizophrenic animal models with multiple combinations of genetic and environmental factors. *J Pharmacol Sci*. 査読有, 121, 2013, 185-91. URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/121/3/121_12R15CP/_article
- (4) Mouri A, Noda Y, Watanabe K, Nabeshima T. The roles of MAGE-D1 in the neuronal functions and pathology of the central nervous system. *Rev Neurosci*. 査読有, 24, 2013, 61-70. doi: 10.1515/revneuro-2012-0069.
- (5) Toriumi K, Mouri A, Narusawa S, Aoyama Y, Ikawa N, Lu L, Nagai T, Mamiya T, Kim HC, Nabeshima T. Prenatal NMDA receptor antagonism impaired proliferation of neuronal progenitor, leading to fewer glutamatergic neurons in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 査読有, 37, 2012, 1387-96. doi: 10.1038/npp.2011.324.
- (6) Mouri A, Sasaki A, Watanabe K, Sogawa C, Kitayama S, Mamiya T, Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Nabeshima T. MAGE-D1 regulates expression of depression-like behavior through serotonin transporter ubiquitylation. *J Neurosci*. 査読有, 32, 2012, 4562-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6458-11.
- (7) Koseki T, Mouri A, Mamiya T, Aoyama Y, Toriumi K, Suzuki S, Nakajima A, Yamada T, Nagai T, Nabeshima T. Exposure to enriched environments during adolescence prevents abnormal behaviours associated with histone deacetylation in phencyclidine-treated mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 査読有, 15, 2012, 1489-1501. doi:

10.1017/S1461145711001672.

(8) Mouri A, Koseki T, Narusawa S, Niwa M, Mamiya T, Kano S, Sawa A, Nabeshima T. Mouse strain differences in phencyclidine-induced behavioural changes. Int J Neuropsychopharmacol. 査読有, 15, 2012, 767-79. doi: 10.1017/S146114571100085X.

[学会発表] (計 17 件)

(1) 毛利彰宏、3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) による精神毒性発現における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の役割、日本薬理学会年会、平成 25 年 3 月、福岡

(2) 毛利彰宏、3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) による精神毒性発現における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の関与、フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成 24 年 10 月、名古屋

(3) 毛利彰宏、スタディグループ 6：中枢薬理の研究者の立場から「処方はどう考えるか？」ドパミンとグルタミン酸作動性神経系の相互作用、日本臨床精神神経薬理学会・日本神経精神薬理学会 合同年会、平成 24 年 10 月、栃木

(4) 毛利彰宏、MAGE-D1 はセロトニントランスポーターのユビキチン化を介したうつ様行動に関与する、日本神経科学大会、平成 24 年 9 月、名古屋

(5) Mouri A, MAGE-D1 regulates expression of depressive endophenotypes through serotonin transporter ubiquitylation, 内藤コンファレンス、平成 23 年 10 月、山梨

(6) 毛利彰宏、モルヒネ指針依存形成におけるシクロフィリン D の関与、アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、平成 23 年 10 月、名古屋

(7) Mouri A, Mouse strain differences in phencyclidine-induced behavioral changes, 2nd congress of the Asian College of Neuropsychopharmacology, 平成 23 年 9 月、ソウル 韓国

(8) 毛利彰宏、発達期における隔離飼育ストレスによる行動変化と海馬における MAGE-D1 発現変化、第 2 回生理学研究所・名古屋大学医学部合同シンポジウム、平成 23 年 8 月、名古屋

[図書] (計 5 件)

(1) 毛利彰宏、野田幸裕、医学書院、10 章 筋骨格および関節疾患 トワイクロス先生のがん緩和ケア処方薬：薬効・薬理と薬の使い方集、平成 25 年、513-523

(2) 野田幸裕、毛利彰宏、南山堂、III 章 疾患と薬物治療 76 アルコール依存症 薬物治療学 第 2 版、平成 25 年、626-627

(3) 野田幸裕、毛利彰宏、南山堂、III 章 疾患と薬物治療 75 薬物依存 薬物治療学 第 2 版、平成 25 年、620-625

(4) 鍋島俊隆、毛利彰宏、建帛社、食と健康のための免疫学入門、平成 23 年、199-215

(5) 毛利彰宏、石川和宏、野田幸裕、南山堂、病気と薬パーフェクト BOOK2011 図解 薬理作用 解熱・鎮痛・抗炎症薬、平成 23 年、45-49

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

(1) 名称：うつ病決定方法、セロトニントランスポーター分析キット及び血中ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キット

発明者：鍋島俊隆、毛利彰宏

権利者：同上

種類：WO

番号：2013/012038 A1

出願年月日：2013 年 1 月 24 日

国内外の別：国外

(2) 名称：うつ病マーカー、アッセイ方法、うつ病決定方法、うつ病薬のスクリーニング方法及びキット

発明者：鍋島俊隆、毛利彰宏、野田幸裕

権利者：同上

種類：特願

番号：2013-005911

出願年月日：2013 年 1 月 17 日

国内外の別：国内

(3) 名称：うつ病決定方法及び血中ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キット

発明者：鍋島俊隆、毛利彰宏

権利者：同上

種類：特願

番号：2011-228055

出願年月日：2011 年 10 月 17 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

毛利 彰宏 (MOURI AKIHIRO)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：20597851