

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791226

研究課題名(和文) 時間的・空間的遺伝子発現システムと環境要因操作による統合失調症モデルマウスの開発

研究課題名(英文) Establishment of an animal model for schizophrenia based on neurodevelopmental hypothesis.

研究代表者

深見 伸一 (Fukami, Shin-ichi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90424150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：より妥当性の高い疾患モデル動物の作製は、病因・病態の理解から治療法の開発まで大きく貢献すると考えられる。統合失調症の発症には、遺伝的要因と環境要因の両者が関わっていると考えられているが、実際の患者の状況に合致するモデル動物の作製には至っていない。本研究では、環境要因をそれ単独では表現型が検出できないほど軽微な負荷とし、遺伝的要因と組み合わせた場合に増悪されるのか、特に死後脳研究で異常が報告されている前頭前野や海馬に着目して研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Schizophrenia is a severe disabling disorder of unknown etiology. The neurodevelopmental model postulates that the illness is caused by a combination of genetic factors and environmental disturbances, including prenatal infection, perinatal complication, and so on.

Animal models are indispensable tools to gain insights into mechanisms underlying this illness and to assess potential therapeutic actions of new treatments. In this study, we attempt to generate an animal model that reflects the characteristics of patients with schizophrenia using in utero electroporation. Furthermore, we examine the relationship between histological disturbance and environmental insults such as polyI:C administration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、人口の約 1%が罹患し、その多くが青年期に発症する根本的治癒が困難な精神疾患である。発症機序は未だ不明であるが、複数の脆弱性遺伝子が関与する遺伝的基盤に環境要因が加わることによって発病に至ると考えられている。

疾患研究において妥当性の高いモデル動物の作製は、発症機序の解明や治療法の開発のための非常に有効なツールとなり得る。これまで作製されたモデル動物は、我々の報告も含め、実際の患者の遺伝的背景や妥当な環境要因負荷を満たしているものは少数であった。そのため、より実際の発症要因を満たしたモデルを作製することが、重要な課題となっている。

2. 研究の目的

(1)統合失調症は、様々なアプローチから発症機序の解明が試みられているが、死後脳研究などから、一部の患者脳では、ニューロンの異所的形成や配置の乱れなどが報告されている。この所見が、本疾患の原因であるのか不明であり、これまでのモデルで同様の所見が得られているものもあるが、遺伝子ノックアウトなどで作製されており実際の患者の遺伝的背景とは異なるため発症への関与は不確定である。本研究では、より患者背景に近いモデル動物の作製のため、遺伝子改変によらず時間的・空間的に一過的な遺伝子発現によりニューロンの配列異常等を引き起こしたマウスを作製する。

(2)また、ウイルス感染を模倣した操作によるモデル動物の作製も我々も含め一般に行われているが、大量の核酸の導入により作製されている。この量を低減し、統合失調症様行動異常を示すか解析する、最も感度の高い解析を用いても有意差の出ない濃度を割り出し閾値の設定を行う。

(3)近年、中間表現型という概念が統合失調症の理解のために導入されている。これは、精神疾患の素因と関連する生物学的なパラメーターである。このパラメーターを用い、(1)(2)において作製したマウスの表現型解析を行う。(1)のマウスが検出感度以下の場合、低用量化したウイルス感染モデルを組み合わせた場合に増悪しうるのはか解析する。その他、行動解析や電気生理学的解析も適時行う。

3. 研究の方法

(1)ウイルス感染モデルとして妊娠マウスの腹腔内に核酸である polyI:C の投与を行う。この母親から産まれた仔マウスの行動解析を行い(Open field test, Elevated plus maze, T maze, Social interaction, Prepulse inhibition [PPI])、最も感度の高い PPI で検出限界以下になる polyI:C の濃度を設定する。

(2)子宮内エレクトロポレーション法による遺伝子導入実験を行う。大脳皮質、海馬原基へ遺伝子導入を行い、胎生期のステージと成体におけるニューロンの位置関係を免疫組織学的に解析する。

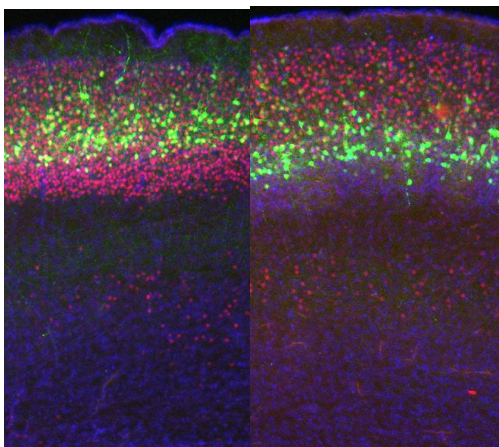
(3)Reelin シグナル伝達分子の cloning と発現ベクターの作製を行う。作製したベクターの導入ステージによるニューロン配置への影響と細胞運命への影響を免疫組織学的に解析する。また、ヘマトキシリン・エオシン染色により配列異常等が一見して確認できるか検討する。遺伝子導入したマウスの行動解析を行い(Open field test, Elevated plus maze, T maze, Social interaction, Prepulse inhibition [PPI]) 統合失調症様行動異常の有無を調べる。

(4)行動解析後のマウスから培養スライス兵法を作製し field EPSP, paired-pulse facilitation, theta burst stimulation により誘導される long-term potentiation 等、電気生理学的解析を行う。

4. 研究成果

(1)ウイルス感染モデルとして妊娠マウスの腹腔内に核酸であるpolyI:Cを20 mg/kgから段階的に希釈し妊娠9.5日目のC57BL/6マウスに投与し、産まれた仔マウスの行動解析を Open field test, Elevated plus maze, T maze, Social interaction, PPIにより行った。PPI で有意差の出ないpolyI:C の濃度を決定した。

(2)恒常発現型のEGFP発現ベクターを子宮内エレクトロポレーション法により妊娠胎児の大脳皮質、海馬原基へ導入した。導入ステージを妊娠12.5日目から15.5日目にて行い、ニューロンの移動が終了する出生7日目の脳を回収し免疫染色を行った。II-III層マーカーとしてBrn2、II-IV層マーカーとしてCux1、IV層マーカーとしてROR、V層マーカーとしてER81、V-VI層マーカーとしてFoxP2を用い導入細胞の位置と細胞運命を調べた。主に胎生12.5日目ではV層、13.5日目ではIV層、14.5日目ではIII層、15.5日目ではII層というように分布した。例として胎生13.5日目に遺伝子導入を行い(導入細胞は緑)、Cux1(左図赤)、Brn2(右図赤)を示す。



海馬においては胎生15.5日目の導入が主にCA1領域に分布することを確認した。viabilityや死後脳研究の所見から浅層に分布する時期(主に胎生15.5日)に遺伝子導入を行っていくこととした。

(3)Reelinシグナル伝達分子としてレセプター分子であるApoER2 ex19とアダプタータンパク質であるDab1.7bcのcloningと発現ベクターの作製を行った。ベクターは恒常発現型とTet ONにより発現するものを作製した。Dab1.7bcを発現させたものが顕著な配列異常を示し細胞運命の変化は観察されなかったが、本来移動すべき位置よりも広がりをもって分布した。これは、ヘマトキシリン・エオシン染色により一見して異常確認出来なかったため、死後脳研究で所見とも一致すると考えられた。遺伝子導入したマウスの行動解析を行いOpen field testやPPIで統合失調症様行動異常の傾向が観察された。

(4)行動解析後のマウスから培養スライス兵法を作製し field EPSP により全体的なコネクティビティを調べたところ顕著な差は検出出来なかった。また、NMDA成分の変化も解析したが、有意差は得られなかった。その他の電気生理学的解析は機械のセッティングが遅れたため今後解析を行う。DNAマイクロアレイ用の解析組織として特に前頭前野を回収してRNAの精製を行った。

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)

Tomohiko Takeda, Manabu Makinodan, Shin-ichi Fukami, Michihiro Toritsuka, Daisuke Ikawa, Yasunori Yamashita and Toshifumi Kishimoto

Primary cerebral and cerebellar astrocytes display differential sensitivity to extracellular sodium with significant effects on apoptosis

CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION

査読有、Volume 32, Issue 4, 2014, 395-400

DOI: 10.1002/cbf.3030

〔学会発表〕(計 1件)

Makinodan M, Okuda-Yamamoto, A, Ikawa D, Toritsuka M, Tatsumi K, Okuda H, Fukami S, Yoshino H, Yamamuro K, Okumura K, Yamashita Y, Nakamura Y, Wanaka A, Kishimoto T

Oligodendrocyte plasticity with an intact cell body in vitro

The FENS Featured Regional Meeting 2013

2013年9月11日～14日, Prague, Czech Republic