

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350987

研究課題名(和文) ヒトゲノム解析結果に基づいたマウスモデルによる統合失調症の病態の解析

研究課題名(英文) Analysis of schizophrenia pathogenesis using mouse models based on human genetics data

研究代表者

櫻井 武 (Sakurai, Takeshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90615717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒトゲノム解析の結果に基づいて作製される統合失調症のマウスモデルでのヒトの統合失調症で重要とされる認知機能の解析方法の検討を行った。また、認知機能を司る前頭前野のマウスの発達の過程を明らかにした。これらの結果は、今後こういったマウスモデルを利用した統合失調症の病態の解明にむけた研究の中で、遺伝及び環境因子の相互作用で前頭前野の発達がどのように影響され認知機能を中心とした行動表現型につながるかを解析していく上での基礎的知見となる。

研究成果の概要(英文)：We have characterized several behavioral paradigm focusing on cognitive functions which prefrontal cortex is responsible for by using mouse models developed based on the human genetics data of schizophrenia. Moreover, we have also characterized the developmental processes of mouse prefrontal cortex by using gene expression profiles for several different biological processes taken place during development. These results should help us to establish basis for further characterization of mouse models for schizophrenia in order to understand the pathogenesis and pathophysiology of schizophrenia.

研究分野：分子神経科学、発達精神障害、トランスレーショナルリサーチ

キーワード：統合失調症 マウスモデル ヒトゲノム解析 認知機能 社会性行動 前頭前野

1. 研究開始当初の背景

(1) 統合失調症の治療法は偶然発見されたドーパミン経路を調節する薬が現在の主流であるが、患者さんの1/3は治療後の再発、また1/3は薬が全く無効という現状があり、今後の新しい治療法の開発には統合失調症の病態の理解が必須である(1)。

(2) 統合失調症の発症には遺伝的変異の関与が知られている。ヒトゲノム解析の結果から統合失調症の発症に関与しているゲノム変化が明らかになり、それを再現したマウスモデルを利用した病態の解析への道が可能となる。ヒトゲノム解析の結果から、染色体上の微小欠損あるいは重複による遺伝子のコピー数の変化(CNV)が統合失調症のような発達精神障害の発症に関わっていることが示された(2)。また、こういったCNVを持つマウスモデル、例えば22q11の欠損のモデルの作成がなされ、病態の解明に寄与していくことが期待されている(3)。しかしながら、統合失調症はヘテロな疾患群である可能性が高く、先の22q11欠損以外にも統合失調症に関与しているCNVはいくつか存在し、それらを再現したマウスモデルを作成し、それらの相互比較により、さらに新たな病態の解明が進むことが期待される。そのCNVの中の一つである1q21 CNVは統合失調症、発達障害に関与している遺伝子変異であるが(4)、それに相当するマウスモデルは未だ作成されていない。

(3) 現在の統合失調症の治療はその症状の一つである幻覚、妄想といったものには比較的有効であるが、昨今の解析により、統合失調症の根幹には前頭前野を中心とした認知機能の異常が存在することが示唆されている(5)。統合失調症の予後は認知機能がどれくらい保たれているかによって大きく影響されることも知られており、認知機能は統合失調症を考える上で非常に重要な行動ドメインの一つである。したがって、統合失調症の症状を脳の神経回路ごとに整理された行動ドメインとして整理して、それぞれの行動ドメインをマウスとヒトの間で相互に比較しながら研究を進めていくことが今後の病態の理解に基づいた統合失調症の治療法の確立には重要と考えられる。上記の様に作成されたマウスモデルを統合失調症の治療につなげるべくこういったドメインごとに体系的に解析する方法の確立が急務である(5)。特に前頭前野を中心とした認知機能にいかにかマウスでアプローチするかを考える必要がある。

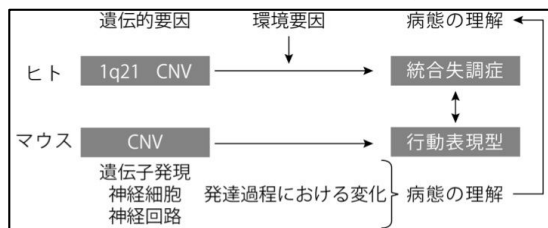
(4) 現在の統合失調症の発症のモデルの一つに発達障害仮説というのがあり、それによると発達期に遺伝あるいは環境要因によって発達の過程に異常が導入され、その結果機能破綻が思春期に顕在化して統合失調症特有の症状として発症するとされている(6)。統合失調症の根幹に認知機能の異常があることから認知機能を司る前頭前野の発達になんらかの異常が導入されていると考えられるが、マウスの前頭前野の発達過程がどういったタイミングでどういう順序で起こるかというものは明らかではない。

2. 研究の目的

(1) ヒトゲノム解析から統合失調症をはじめとする発達精神障害に関与すると考えられる1q21に相同な染色体領域を欠損したマウスモデルを作成する。

(2) 上記のような病因に基づいたマウスモデルを最終的に人の統合失調症の治療に結びつけるために、それらの統合失調症の病態に意味のある体系的な解析方法を確立する。特に統合失調症の根幹にあってその予後に相関することが知られている前頭前野を中心とした認知機能に注目して行う。

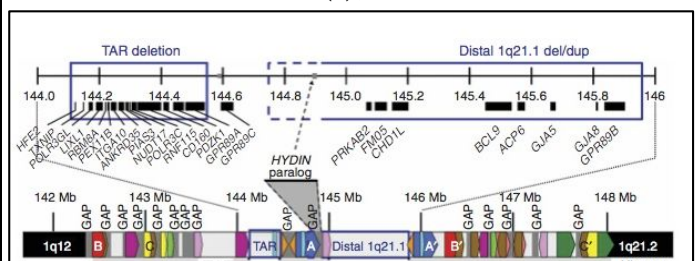
(3) マウスの前頭前野の発達過程を分子レベルで時系列で明らかにし、マウスモデルで起こっている前頭前野の発達過程の異常をスクリーニングできる簡便で標準となる解析のプラットフォームを確立する。



本研究のめざすもの

3. 研究の方法

(1) 染色体修飾の方法を検討し、ヒトの1q21に相当するマウスの染色体領域3qを欠損した胚幹細胞を作成し、それを用いてこの領域を欠損したマウスを作成することを試みた。当初はブラッドレーのグループの作成したマイサークローンを利用して(7)ターゲティングすることを試みた。染色体領域1.1Mbの領域を挟む2つのクローンを入手して薬剤による選択でこの領域で相同組み替えの起こったクローンをスクリーニングしたが、成功しなかった。この辺りの塩基配列による構造上の特徴に起因することが考えられたため、最近主流になってきたゲノムエディティングの手法であるCRISPRを使った染色体改変を試みた(8)。



染色体1q21領域の構造と遺伝子

(2) 統合失調症に意味のある行動表現系で前頭前野を介する認知機能を必要とする行動タスクの妥当性を検討した。1つ目はタッチパネルを利用した視覚識別タスク(短期記憶およびフレキシビリティ)、5チョイスタスク(注意)(9)。2つ目は3チェンバーを利用した社会性行動タスク(10)。3つ目はインテリケージを利用した集団飼育による学習記憶および社会性行動タスク(11)。これらを野生型マウスと統合失調症様の症状を示すいくつかのマウスモデルで比較検討した。

(3) 前頭前野の発達過程で起こる様々な生物学的過程で発現する遺伝子の代表的なも

のを選び出し、それらの発現のパターンを前頭前野の発達の時系列でqPCRの手法を用いて定量的に検討した(12)。また、マイクロダイアリシスの手法を用いて神経伝達物質のグルタミン酸の放出の具合を発達の時系列の中で測定し、前頭前野の機能的な成熟のタイミングを検討した。

4. 研究成果

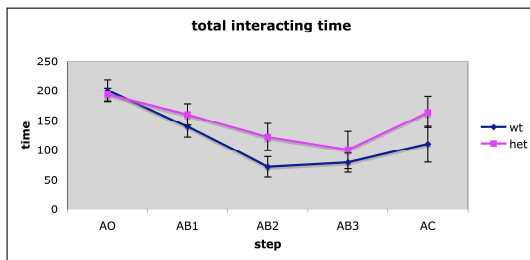
(1) マウス作成について

染色体改変によってヒトの1q21に相同のCNVの作成をマウスで試みたが、マイサークロンによる相同組換えの方法、またゲノムエディティングの方法のどちらにてもこの研究期間中では成功することができなかった。マウスゲノムのこの領域のもつ構造的特徴によると考えられる。もう一つの期間中に明らかになったのはヒトの1q21にはマウスには存在しないヒト特異的な遺伝子が存在することで、これはもしかすると作成後のマウスの表現系に影響を与えたかもしれない。今後マウスの作成を継続するがこの点に留意しておく必要がある。

(2) 行動解析について

タッチパネルスクリーンは認知機能の検出に使われており、我々の持っている幾つかの統合失調症マウスモデルで異常が見られた。例えば学習の障害、注意の障害、フレキシビリティの障害などが見られたが、作業記憶を検討するタスクはマウスでは難しいことが判明した。

社会性行動は当初下記のインテリケージにて検討することを考えていたが、それが難しいことが判明したため、3チェンバーを利用した社会性行動の解析法を利用した。従来のタスクを少し改変して反復した社会性刺激に対する順応とその切り替えに視床を介した前頭前野からのフィードバックがあることを確認したため、そのパラダイムを使用し、実用可能であることを確認した。



反復した社会性刺激に対する反応の解析例

インテリケージは集団でホームケージ内で飼育しながら学習記憶、ワーキングメモリー、社会性行動を検討するので、より自然な環境下でのこういった認知機能を計測出来るという点はその長所とされていた(13)。我々のマウスモデルで検討したところ、確かに学習記憶のシステムとしては有用であるが、他の様々な変数は複雑で、その解釈についてはまだ先行研究が少なく、まだまだその実用は難しいという結論となった。

(3) 前頭前野について

マウスの前頭前野とヒトの前頭前野文献を詳細に調べることにより、マウスとヒトの前頭前野の比較を行い、そのつながりおよび担う機能で相同と考えられる領域を包

括的にまとめた(5)。これは前頭前野に起因する認知機能の機能発達とともにどうその領域が発達していくかを今後明らかにしていくための基礎的知見となる。

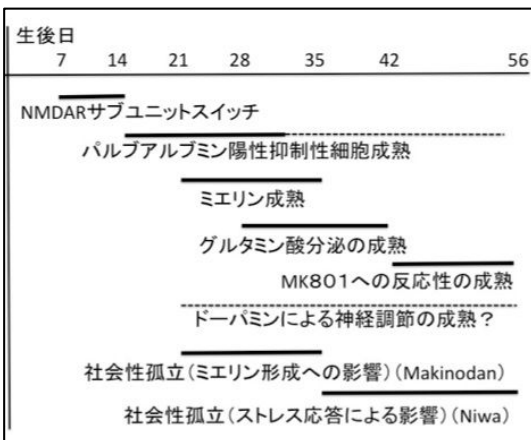
Human/primates	BA47, 11, 12, 13, 14, 10 Orbitofrontal	BA14, 10, 8, 9 Medial ^a	BA32, 33, 24, 25, 26 Cingulate ^b
Functions	<ul style="list-style-type: none"> Decision making Reward/punishment Flexibility Reversal learning Solving conflict Emotional motivation Social behavior 	<ul style="list-style-type: none"> Fear conditioning 	<ul style="list-style-type: none"> Solving conflicts Reward based learning Set shifting Attention Error detection Decision making (cost-benefit analysis) Mood Emotional regulation Social behavior Fear conditioning
Rodents ^c	Orbitofrontal	Medial PFC (IL, PL)	Anterior cingulate
Functions	<ul style="list-style-type: none"> Reward association Flexibility Reversal learning Social behavior 	<ul style="list-style-type: none"> Fear conditioning 	<ul style="list-style-type: none"> Solving conflicts Set shifting Attention Decision making (cost-benefit analysis) Emotional regulation Social behavior Fear conditioning

^a These are contiguous structures that spread over the DLPFC and OFC.

ヒトとマウスの前頭前野領域の機能的比較 (文献5より)

マウスの前頭前野の発達過程

マウスの前頭前野の発達は神経伝達物質のグルタミン酸受容体やドーパミン受容体の発現がまず起こり、その後マウスの離乳期に阻害性の介在ニューロンであるパーブアルブミンの発現が顕著に上昇することから、このニューロンはこの時期に成熟することが考えられる。さらにそれに引き続きミエリン形成に関与する遺伝子群の発現が上昇することからミエリン形成による回路の成熟は離乳期から思春期の前あたりで起こると考えられる。しかしながら MK-801 投与に対するグルタミン酸の放出の程度を見てみると、思春期には成人型と異なり、過剰な分泌が見られ、これは思春期後期の時期に成人型の反応に収束する。したがって思春期後半に神経回路の機能的成熟が起こることが示唆された。これは前頭前野に特徴的で、前頭前野は他の脳領域よりも成熟の時期が遅く、思春期から青年期に成熟が起こることを示す。これはヒトで報告されている前頭前野の成熟と同様である。



マウスの前頭前野の発達過程 (文献 13 より)

今後ヒトゲノム解析の結果に基づく統合失

調症のマウスモデルがどんどん作成されると考えられるが、統合失調症の根幹にあるとされる認知機能の異常を引き起こす前頭前野の成熟の異常の病態をこういったマウスで調べていく上で、このマウスの前頭前野の発達過程の知見は有用であると考えられる。

参考文献

- (1) Millan, M.J., et al. Nature Rev Drug Discovery, 2016, in press
- (2) Kirov, G. Expert Rev Neurother, 2010, 10, 25-32
- (3) Meechan, D.W., et al. Prog Neurobiol, 2015, 130, 1-28
- (4) Brunetti-Pierri, N., et al. Nat Genet, 2008, 40, 1466-1471
- (5) Sakurai, T., et al. Prog Neurobiol., 2015, 134, 178-201
- (6) Insel, T. Nature, 2010, 468, 187-193
- (7) Adams, D.J., et al. Nat Genet, 2004, 36, 867-871
- (8) Heidenreich, M. and Zhang, F. Nat Rev Neurosci, 2016, 17, 36-44
- (9) Bussey, T.J., et al, Neuropharmacology, 2012, 62, 1191-1203
- (10) Sakurai, T., et al. Autism Res, 2011, 4, 28-39
- (11) Krackow, S., et al. Genes Brain Behav, 2010, 9, 722-731
- (12) Takahashi, N., et al. Transl Psychiatry, 1, e8
- (13) Ueda, S., et al. Mol Neuropsych, 2015, 1, 94-101

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2件)

Takeshi Sakurai, Nao J Gamo, Takatoshi Hikida, Sun-Hong Kim, Toshiya Murai, Toshifumi Tomoda and Akira Sawa. Converging models of schizophrenia – Network alterations of prefrontal cortex underlying cognitive impairments. Progress in Neurobiology. 査読あり 134, 2015, 178-201. DOI: 10.1016/j.neurobio.2015.09.010

Shuhe Ueda, Minae Niwa, Hiroyuki Hioki, Jaerin Sohn, Takeshi Kaneko, Akira Sawa, and Takeshi Sakurai. Sequence of molecular events during the maturation of the developing mouse prefrontal cortex. Molecular Neuropsychiatry. 査読あり 1, 2015, 94-101. DOI: 10.1159/000430095

[学会発表](計9件)

Shuhe Ueda, Akira Sawa, and Takeshi Sakurai. Analysis of Gtf2i mutant mice exhibiting abnormal social behavior. Annual meeting of Society of Neuroscience. 2015年10月 シカゴ(米国)

Shuhe Ueda, Akira Sawa and Takeshi Sakurai. Analysis of Gtf2i mutant mice exhibiting abnormal social behavior. 日本神経科学会 2015年7月 神戸国際会議場(神戸、兵庫)

Shuhe Ueda, Minae Niwa, Akira Sawa and Takeshi Sakurai. Developmental profiles of prefrontal cortex of normal and disease model mice. Cold Spring Harbor Meeting. 2015年3月 コールドスプリングハーバー(米国)

Shuhe Ueda, Minae Niwa, Hiroyuki Hioki, Jaerin Sohn, Takeshi Kaneko, Akira Sawa, and Takeshi Sakurai. Maturation processes of developing prefrontal cortex of normal and disease model mice. 日本解剖学会 2015年3月 神戸国際会議場(神戸、兵庫)

Takeshi Sakurai, Shuhe Ueda, Minae Niwa, and Akira Sawa. Prefrontal cortex as targets of developmental insults associated with developmental psychiatric disorders – mouse model analysis –. 日本薬理学会 2015年3月 名古屋国際会議場(名古屋、愛知)シンポジウム招待講演

Shuhe Ueda, Minae Niwa, Akira Sawa, and Takeshi Sakurai. Comprehensive gene expression profiling associated with the prefrontal circuit maturation. Annual meeting of Society for Neuroscience 2014年11月 ワシントンDC(米国)

Shuhe Ueda, Minae Niwa, Akira Sawa, and Takeshi Sakurai. Comprehensive gene expression profiling associated with the prefrontal circuit maturation. 日本神経科学会 2014年9月 パシフィコ横浜(横浜、神奈川)

上田修平、澤明、櫻井武 統合失調症の分子病態の理解を目的とした PTPRA ノックアウトマウスおよび PTPRZ トランスジェニックマウスの解析 日本統合失調症学会 2014年3月 京都テレサ(京都、京都)

Takeshi Sakurai, Toshifumi Tomoda, Takatoshi Hikida, and Akira Sawa. Towards understanding pathogenesis of schizophrenia through analysis of PTPRA knockout mice and PTPRZ transgenic mice. World Congress of Societies of Biological Psychiatry Congress. 2013年6月 京都国際会館(京都、京都)

[産業財産権]

出願状況(計1件)
名称 オートファジー誘導因子の同定と精神疾患の治療へのその応用
発明者 澤明、石塚公子、行武洋、友田利文、住友明子、櫻井武、足田貴俊

権利者 ジョンスホプキンス大学、京都大学
種類 用途特許
番号 US provisional patent application
number 62/281,544
出願年月日 2016年1月21日
国内外の別 国内、国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 武 (SAKURAI, Takeshi)
京都大学大学院、医学研究科、特定准教授
研究者番号：90615717