

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04031

研究課題名(和文) トランスレータブル視覚弁別試験の基盤研究と創薬への応用

研究課題名(英文) Development a translatable visual discrimination test in rodents to apply for drug discovery and development

研究代表者

山田 清文 (Yamada, Kiyofumi)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30303639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトとげっ歯類で共通するトランスレータブル認知機能試験であるタッチパネルを用いた視覚弁別試験を創薬基盤として確立するために、統合失調症患者で同定された遺伝子変異を有するマウスの認知機能を視覚弁別試験で評価した。検討した統合失調症関連遺伝子変異モデルマウスは全て認知異常を示し、その責任領域として線条体と前頭葉皮質を同定した。また、報酬連合学習における線条体の役割を調べ、ドーパミンD1受容体を発現する中型有棘神経細胞におけるMAPキナーゼの活性化が報酬連合学習に関連することを示した。さらに、患者型遺伝子変異を有するモデルマウスの解析から、創薬標的として複数の新規分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において視覚弁別機能に関連する神経回路の一端が解明できたことにより、高次脳機能の理解が大きく進んだと考えられる。さらに、統合失調症の情動認知機能障害に関わる分子としてDISC1、リーリンおよびARHGAP10を同定した。これらの研究成果は、これまで治療困難であった統合失調症の新規治療薬や予防薬の開発に繋がるものと期待できる。実際、患者型遺伝子変異を有する動物モデルの研究から、ドーパミンD2受容体などの従来の創薬標的とは異なる新しい創薬標的候補分子を同定した。以上、本研究成果は脳科学研究の発展に寄与するだけでなく、精神疾患の病態解明や新規治療薬の開発への応用展開が可能である。

研究成果の概要(英文)：Cognitive function in mouse models of schizophrenia was evaluated by a touchscreen-based visual discrimination (VD) test, a rational assay that can be performed by rodents and humans, in order to provide translational validity. Genetic mouse models of schizophrenia, including mouse carrying DISC1 deletion, schizophrenia-associated RELN or ARHGAP10 gene mutation, all exhibited impairments in the VD test, which was accompanied by an increase in c-Fos expression in the prefrontal cortex and dorsomedial striatum. We also demonstrated that mitogen-activated protein kinase signaling in the dopamine D1 receptor expressing-medium spiny neurons of the nucleus accumbens plays an important role in stimulus-reward learning. Through the comprehensive behavioral and neurochemical analyses of genetic mouse models of neuropsychiatric disorders we have identified several new targets for novel drug discovery and development.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：タッチパネル式視覚弁別試験 統合失調症 動物モデル DISC1 Npas4 MHC1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

情動と認知機能は生命活動に必須あり、齧歯類からヒトに至るまでその機能は高度に保存されている。認知機能はワーキングメモリーや長期記憶など様々な記憶の形成・保持・再生に不可欠であり、情動は報酬関連学習や不安・恐怖回避行動などにも関連する。一方、精神疾患患者においては情動・認知機能の障害が認められ、例えば統合失調症においては幻覚・妄想などの陽性症状、感情の平板化などの陰性症状に加え、認知障害は中核症状と位置づけられている。最近では薬物依存やギャンブル障害が社会問題となっているが、依存性障害の基盤にも情動と認知機能の障害がある。こうした医学的・社会的背景から、情動・認知機能を制御する神経ネットワークの同定や分子メカニズムの解明が強く求められており、創薬研究への応用が期待されている。

これまでに我々は、情動と認知機能に関する基礎研究を推進し、以下のような知見を報告している。(1) 物体認知に関する長期記憶には、前頭葉皮質のドーパミン D1 受容体 (D1R)-MAP キナーゼシグナルを介したタンパク合成が関与する。(2) 感覚情報処理機能には、微弱な聴覚刺激で活性化される GABA 作動性の淡蒼球-被蓋神経路が関与する。(3) ドーパミンによる快情動の制御には、ドーパミン神経伝達を増強あるいは抑制する内因性の機能分子群 (t-PA, TNF- α , GDNF) が関係する。(4) 統合失調症、自閉スペクトラム症、アルツハイマー病などの動物モデルの情動・認知障害の病態解析を行う。(5) 記憶に重要な転写因子 NPAS4 がストレスより発現抑制を受ける分子機構を明らかにする。(6) 抗精神病薬の創薬標的候補分子 (IFITM3, MMP-3 など) を同定する。(7) Akt の基質である Girdin は、海馬における BDNF シグナルと NMDA 受容体シグナルを統合してワーキングメモリーに関与する。(8) 独自に考案したラット用ギャンブル試験と DREADD システムによる神経活動操作法を駆使し、リスク回避型の意味決定に島皮質が重要である。(9) リン酸化プロテオミクスの手法を用いて快情動の基盤となる D1R 下流の細胞内シグナル分子群 (Rap1 など) を同定し、その機能を解明した。

一方、動物実験で認知機能改善作用が示唆された開発候補化合物でも、患者を対象とする臨床試験ではその効果を確認できない場合が多い。その原因の一つとして動物実験で広く用いられる行動試験 (水迷路・放射状迷路試験、受動的回避学習試験など) と臨床試験で用いられる記憶試験 (コンピュータ制御のタッチパネル試験など) のギャップがある。この問題点を克服するために我々は、タッチパネルを用いた視覚弁別試験による評価系を構築した (図 1)。

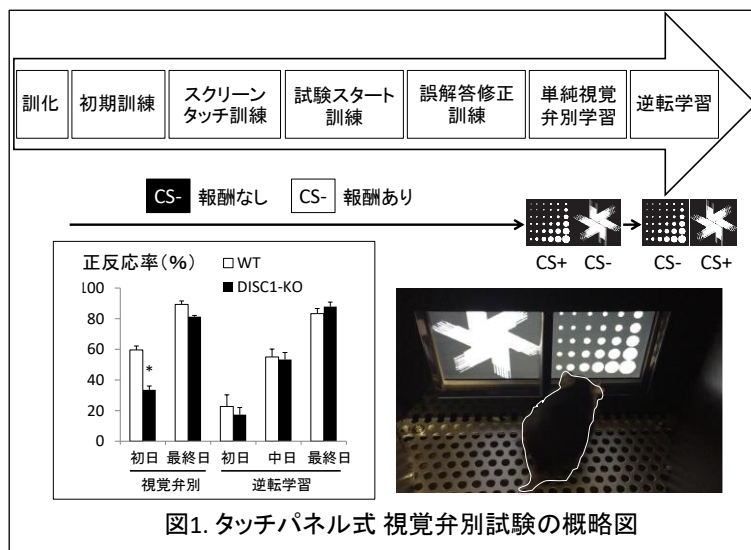


図 1. タッチパネル式視覚弁別試験の実験スケジュール

本試験は、スクリーンに投射されたオブジェクトを識別し、報酬と連動するオブジェクトを選択する評価系であり、トランスレータブル認知機能試験として注目を浴びている。創薬基盤としてタッチパネル式視覚弁別試験を活用するためには、先ず視覚弁別学習に関わる神経回路と分子機構を解明する必要がある。さらに、種々の精神疾患モデルの認知機能障害を検出可能であることを確認し、既存薬の効果を評価してその予測妥当性を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、げっ歯類とヒトで共通するトランスレータブル認知機能試験であるタッチパネルを用いた視覚弁別試験を創薬基盤として確立するために、(1) タッチパネル式視覚弁別の神経基盤を担う主要神経回路を特定し、(2) DREADD システムや光遺伝学を駆使して視覚弁別回路の制御機構を解明する。また、(3) 種々の神経精神疾患病態モデルマウスの認知機能を評価し、既存薬の効果を調べる。さらに、(4) リン酸化プロテオミクスを利用して新規治療標的候補分子の同定とそのバリデーションを行う。

3. 研究の方法

(1) 視覚弁別に関与する神経回路の同定と分子機構の解明

1-1. 視覚弁別に関する神経回路の同定

視覚弁別試験はオペラント学習、弁別学習、逆学習などのいくつかのステージに分類することができる。まずは、各ステージにおける活動神経を c-Fos や NPAS4 マッピングにより定量し、各ステージに神経活動が活発な脳領域の特定を行う。また、同定された候補領域が受ける入力線維や投射先の脳領域について、神経トレーサーを用いて解析する。

1-2. 視覚弁別神経回路の機能解析

1-1. で特定された弁別神経回路を DREADD システムや光遺伝学を利用して操作し、視覚弁別試験への影響を評価する。さらに、入力線維または投射先の神経細胞にも同様に DREADD や光遺伝学を組み合わせて発現させ、認知情動機能を担う神経ネットワークについて詳細に解析する。

(2) 視覚弁別試験を用いた精神疾患モデルの認知機能の評価

DISC1-KO マウスや MK801 モデルなどの病態モデルマウスを用いて視覚弁別試験を行い、認知機能の評価を行う。また、既存の抗精神病薬や抗うつ薬などを投与し、病態モデルマウスで認められた認知機能の改善効果の評価する。

(3) 治療標的候補分子の同定とバリデーション

3-1. 病態モデルマウスにおける神経回路の機能変化の同定

DISC1-KO マウスなどの病態モデルマウスを用いて c-Fos や NPAS4 マッピングを行い、精神疾患で異常な活性化や障害が認められる脳領域を特定する。特定された脳領域に AAV を用いて DREADD システムを発現させて神経回路機能を制御した際の認知機能の評価する。

3-2. 情動認知機能に関するシグナル分子の解析

病態モデルマウスにおいて神経活動変化が認められた脳領域をサンプルとしてリン酸化プロテオミクス解析を行い、視覚弁別試験に重要な役割を果たしているリン酸化シグナルを網羅的に解析する。得られた候補タンパク質の機能を解析するために AAV やレンチウイルスを利用した *in vivo* 発現系を構築し、視覚弁別試験により評価する。

4. 研究成果

(1) 視覚弁別に関する神経回路の同定と分子機構の解明

タッチパネル式視覚弁別試験を用いて、NMDA 受容体アンタゴニスト MK-801 誘発性認知障害に関わる脳領域を c-Fos 染色により解析し、前頭葉皮質の異常活性化が認知障害に関連していることを明らかにした。また、注意機能の評価することができる新たなタッチパネル試験として 5-choice serial reaction time task (5-CSRT) 試験を確立し、第一世代抗ヒスタミン薬による障害を検出できることを明らかにした。

神経炎症による脳内アストロサイトの活性化と認知機能障害の関連を調べる目的で、主要組織適合遺伝子複合体クラス I 分子 (MHC I) の分泌型 sH-2D を前頭葉皮質のアストロサイト特異的に発現させたモデルマウスを開発し、その視覚弁別障害と線条体中型有棘神経細胞の形態異常を明らかにした。

(2) 視覚弁別試験を用いた精神疾患モデルの認知機能の評価

統合失調症などの神経発達障害を伴う多くの精神疾患の生物学的メディエーターとして機能すると考えられている DISC1 タンパク質を欠損させた DISC1-KO マウスの認知機能変化をタッチパネル式視覚弁別試験で解析した。DISC1-KO マウスは訓練初期に学習障害を示し、その異常は治療抵抗性抗統合失調症に有効な clozapine により改善した (図 2)。また、DREADD システムを用いた実験により背内側線条体神経の異常興奮が関与していることが示唆された (図 3)。

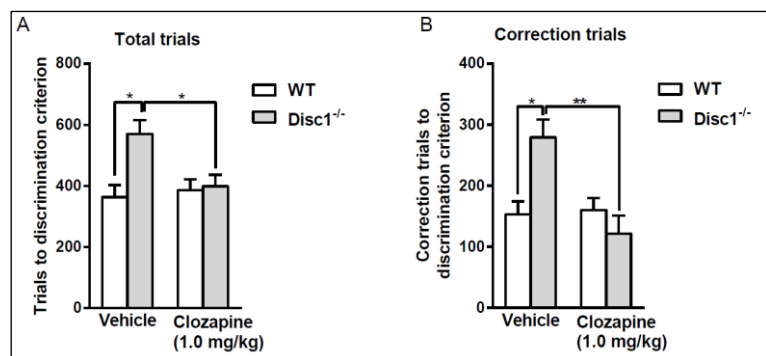


図 2(A) (B). DISC1-KO マウスの認知障害に対する clozapine の効果

Wulaer et al., Gene Brain Behav., 2018;e12478.

さらに、日本人統合失調症患者から同定したリーリン遺伝子 RELN のコピー数変異 (CNV、ヘテロ欠損) を有する統合失調症の病態モデルマウス (RELN 変異マウス) の脳機能障害として、タッチパネル式試験を用いて複雑な視覚弁別学習ならびに逆転学習の障害を同定した。同様に日本人患者から同定した ARHGAP10 遺伝子変異を有するモデルマウスの認知機能をタッチパネル式視覚弁別試験で評価し、その異常を明らかにした。また、大脳皮質錐体神経細胞のスパイン密度の低下などの異常を明らかにした。

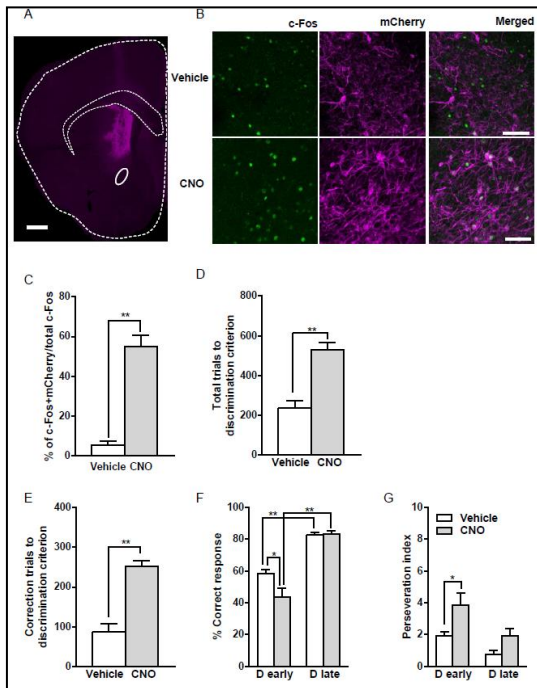


図 3. AAV ベクターを用いて hM3Dq-mCherry を線条体背内側部に発現させたマウスにおける CNO 刺激による視覚弁別障害

(A) : hM3Dq-mCherry の発現写真
 (B) (C) : CNO 投与による c-Fos 発現の増加
 (D)-(F) : CNO 投与による視覚弁別障害

Wulaer et al., Gene Brain Behav., 2018;e12478.

(3) 治療標的候補分子の同定とバリデーション

報酬連合学習と線条体の mitogen-activated protein (MAP) キナーゼとの関連性を解析し、特にドパミン D1 受容体 D1R を発現する中型有棘神経細胞 MSN (D1-MSN) における MAP キナーゼの活性化が報酬連合学習に関連することを示した (図 4)。

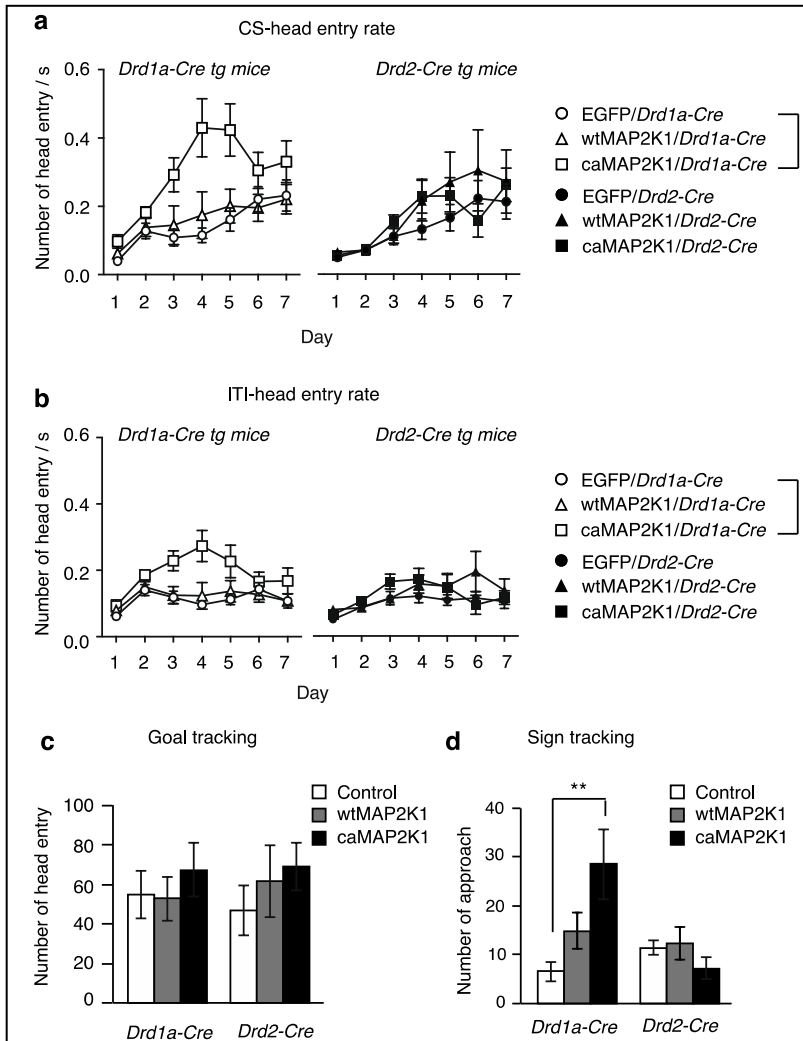


図 4. D1R-MSN あるいは D2R-MSN に MAP キナーゼを発現するマウスの報酬連合学習: D1R-MSN における MAP キナーゼの活性化はパブロフ型条件付け学習を増強する

(a) 条件刺激提示中の覗き込み行動出現率 (回数/秒)
 (b) 条件刺激非提示中の覗き込み行動出現率 (回数/秒)
 (c) 条件付けられたゴール追跡行動の数
 (d) 条件付けられた合図追跡行動の数

Saifullah et al., Sci. Rep. (2018) 8: 14413.

Reelin タンパク質の受容体の下流で機能する新たなシグナル分子を同定するために、RELN 変異マウス (Orelean リーラー) 脳をサンプルとしてリン酸化プロテオミクス解析を実施し、twinfilin1 を同定した。twinfilin1 のリン酸化に関与する酵素、リン酸化サイトを決定し、特異的リン酸化抗体の作製にも成功した。twinfilin1 のノックダウンにより培養神経細胞のスパインの形態が変化することを示した。また、ARHGAP10 遺伝子変異マウスの研究成果として、Rho キナーゼ阻害薬 Fasudil が薬理的統合失調症モデルマウスの行動異常を改善することを示し、統合失調症治療薬の新しい創薬標的として同定した。その他、統合失調症などの神経発達障害に関連する分子として Fst11, CRMP5, ALDH1L1 などを同定した。また、ストレス感受性転写調節 Npas4 により転写制御を受ける遺伝子として Homer1a を同定し、Npas4-Homer1a シグナルがてんかん発作に関与することを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Sobue A, Itoh N, Nagai T, Shan W, Hada K, Nakajima A, Murakami Y, Mouri A, Yamamoto Y, Nabeshima T, Saito K, Yamada K	4. 巻 66
2. 論文標題 Astroglial major histocompatibility complex class I following immune activation leads to behavioral and neuropathological changes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1034-1052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.23299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wulaer B, Nagai T, Sobue A, Itoh N, Kuroda K, Kaibuchi K, Nabeshima T, Yamada K	4. 巻 -
2. 論文標題 Repetitive and compulsive-like behaviors lead to cognitive dysfunction in Disc1 2-3/ 2-3 mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes, Brain and Behavior	6. 最初と最後の頁 e12478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gbb.12478.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saifullah MAB, Nagai T, Kuroda K, Wulaer B, Nabeshima T, Kaibuchi K, Yamada K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinase in D1 receptor-expressing neurons of the nucleus accumbens potentiates stimulus-reward learning in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 14413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-32840-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada S, Itoh N, Nagai N, Nakai T, Ibi D, Nakajima A, Nabeshima T, Yamada K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Innate immune activation of astrocytes impairs neurodevelopment via upregulation of follistatin-like 1 and interferon-induced transmembrane protein 3.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-018-1332-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Itoh N, Nagai T, Watanabe T, Taki K, Nabeshima T, Kaibuchi K, Yamada K.	4. 巻 493
2. 論文標題 Valosin-containing protein (VCP) is a novel IQ motif-containing GTPase activating protein 1 (IQGAP1)-interacting protein.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1384-1389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.09.159.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 .Shan W, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Sokabe M, Yamada K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) controls neuronal homeostasis in pentylenetetrazole-induced epilepsy through the induction of Homer1a.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14274.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizoguchi H, Wang T, Kusaba M, Fukumoto K, Yamada K.	4. 巻 359
2. 論文標題 Nicotine and varenicline ameliorate changes in reward-based choice strategy and altered decision-making in methamphetamine-treated rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Behav Brain Res.	6. 最初と最後の頁 935-941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2018.06.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizoguchi H, Yamada K.	4. 巻 124
2. 論文標題 Methamphetamine use causes cognitive impairment and altered decision-making.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 106-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2018.12.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitagawa K, Nagai T, Yamada K.	4. 巻 147
2. 論文標題 Pharmacological and proteomic analyses of neonatal polyI:C-treated adult mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 39-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.10.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Liao Jingzhu, Wulaer Bolati, Nagai Taku, Yamada Kiyofumi
2. 発表標題 Acute methamphetamine administration impairs cognitive function in a touchscreen-based visual discrimination task in C57BL/6 mice.
3. 学会等名 19th Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tian Wang, Kazuya Fukumoto, Hiroyuki Mizoguchi, Kiyofumi Yamada
2. 発表標題 An operant task for testing risky decision-making in mice.
3. 学会等名 19th Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro Hada, Akira Sobue, Bolati Wulaer, Norimichi Itoh, Akira Nakajima, Takatoshi Nabeshima, Taku Nagai, Kiyofumi Yamada
2. 発表標題 Specific MHC1 overexpression in astrocytes induces behavioral and neuropathological abnormalities in mice
3. 学会等名 Society for Neuroscience 48th Annual Meeting (NEUROSCIENCE2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Akira Sobue, Norimichi Ito, Kazuhiro Hada, Akira Nakajima, Murakami Yuki, Mouri Akihiro, Yamamoto Yasuko, Toshitaka Nabeshima, Kuniaki Saito, Taku Nagai, Kiyofumi Yamada
2. 発表標題	The pathophysiological role of astroglial MHC1 following systemic immune activation
3. 学会等名	第41回日本神経科学大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	羽田和弘、永井拓、伊藤教道、祖父江顕、Bolati Wulaer、森大輔、久島周、鍋島俊隆、尾崎紀夫、山田清文
2. 発表標題	統合失調症モデル側坐核ニューロンの形態学的およびメタンフェタミン反応性の変化
3. 学会等名	第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Bolati Wulaer, Taku Nagai, Akira Sobue, Keisuke Kuroda, Kozo Kaibuchi, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada.
2. 発表標題	Impaired visual discrimination learning in Disc1-knockout mice, reversed by clozapine treatment.
3. 学会等名	IBNS2017 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Bolati Wulaer, Taku Nagai, Akira Sobue, Norimichi Ito, Keisuke Kuroda, Kozo Kaibuchi, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada.
2. 発表標題	Cognitive deficit correlated with changes in neuronal activity in Disc1 mice in touchscreen-based visual discrimination task.
3. 学会等名	NEUROSCIENCE2017 (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名 山田清文
2. 発表標題 タッチパネル式視覚弁別試験を用いた精神疾患モデルマウスの認知機能解析
3. 学会等名 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部 http://www.med.nagoya-u.ac.jp/pharmacy/

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
研究協力者	永井 拓 (Nagai Taku) (10377426)	名古屋大学・医学部附属病院・准教授 (13901)	
研究協力者	溝口 博之 (Mizoguchi Hiroyuki) (70402568)	名古屋大学・環境医学研究所・講師 (13901)	
研究協力者	伊藤 教道 (Ithoh Norimichi) (30726310)	名古屋大学・医学部附属病院・特任助教 (13901)	