

研究成果報告書 (マイクロ精神病態)

---

マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出

---

3406

平成24年度～平成28年度科学研究費助成事業  
(科学研究費補助金) (新学術領域研究  
(研究領域提案型)) 研究成果報告書

平成30年6月

領域代表者 喜田 聡  
東京農業大学応用生物科学部教授

## <はしがき>

本業績集は平成24年度より平成28年度まで5年にわたり実施された文部科学省科学研究費補助金新学術領域（領域提案型）「マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出」（略称：マイクロ精神病態）（総予算11億5800万円；直接経費）の研究成果をまとめた報告書である。

我が国では、気分障害（うつ病、双極性障害など）、不安障害、心的外傷後ストレス障害（post traumatic stress disorders ; PTSD）、統合失調症などの精神疾患の生涯有病率は、5人に1人の割合を超えており、精神疾患は国内五大疾患の一つと位置付けられる。最近、精神疾患がマスメディアで取り上げられることも多くなっていることから、精神疾患は非常に身近な病気であり、社会的な関心も極めて高い疾患となっている。したがって、現代社会では、精神疾患の克服が急務である。一方、これだけ有病率の多い「脳の病気」であるにも関わらず、精神疾患が生物学的なメカニズムによる「病気」であることの社会的認識も遅れているのが現状である。

精神疾患の原因究明が困難である大きな要因は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に観察されているような目で見える（顕微鏡レベルで容易に観察できる）病態が同定されていない点である。しかも、ゲノム解析（疾患の原因となる遺伝子変異の同定）のみ進めても、精神疾患の解明に繋がらないことも明らかになりつつある。

以上のような背景から、本領域では、精神疾患の病態は、神経回路、回路を構成するニューロン、ニューロンを結ぶシナプス、さらに、細胞内分子動態に存在すると予想し、回路・細胞・シナプス・分子動態レベルの精神病態を「マイクロエンドフェノタイプ」と提言し、このマイクロエンドフェノタイプを同定し、この分子基盤と病態機序を解明することを共通目的として、様々なアプローチで研究を進めてきた。

一方で、今なお、脳機能を制御するメカニズムの解明ですら、発展途上である。したがって、脳を理解した上で、ようやく明らかになると思われる精神疾患のメカニズムは極めて難易度の高い研究対象と言え、この研究進展には基礎から臨床に至る研究者の叡智の結集が不可欠である。他方、生活習慣病やガンの研究領域では医学、農学、工学、理学の学問領域の垣根を超えて多くの基礎研究者がその屋台骨を支えている。そこで、本領域では、先に記したマイクロエンドフェノタイプを共通概念とすることで、基礎研究者が精神疾患研究に新規参入しやすい状況を作り出し、多様な基礎研究者が結集し、基礎研究と臨床研究が有機的に統合された新たな精神疾患研究領域を国内に創出することも目的とした。

この報告書には、以上のように、精神疾患の「マイクロエンドフェノタイプ」を共通概念として、マイクロエンドフェノタイプを同定し、この分子基盤と病態機序の解明を進めた研究成果を掲載した。

## <研究組織>

### 【計画研究】

- 領域代表者 : 喜田 聡 (東京農業大学・応用生物科学部・教授)
- 研究代表者 : 吉川武男 (国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー)
- 研究代表者 : 林朗子 (群馬大学・生体調節研究所・脳病態制御分野・教授)  
(高木朗子)
- 研究代表者 : 廣瀬謙造 (東京大学・大学院医学系研究科・教授)
- 研究代表者 : 加藤忠史 (国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー)
- 研究代表者 : 橋本謙二 (千葉大学・社会精神保健教育研究センター・教授)
- 研究代表者 : 富田博秋 (東北大学・災害科学国際研究所・教授)
- 研究代表者 : 喜田 聡 (東京農業大学・応用生物科学部・教授)
- 研究代表者 : 岩本和也 (熊本大学・大学院生命科学研究部・教授)
- 研究代表者 : 那波宏之 (新潟大学・脳研究所・教授)
- 研究分担者 : 鶴飼 涉 (札幌医科大学・医学部・講師)
- 連携研究者 : 河西春郎 (東京大学・大学院医学系研究科・教授)
- 連携研究者 : 金吉晴 (国立精神・神経医療研究センター・部長)
- 連携研究者 : 柿田明美 (新潟大学・脳研究所・教授)
- 連携研究者 : 武井延之 (新潟大学・脳研究所・准教授)
- 連携研究者 : 文東美紀 (熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授)
- 連携研究者 : 並木繁行 (東京大学・医学系研究科・助教)
- 連携研究者 : 浅沼大祐 (東京大学・医学系研究科・助教)
- 連携研究者 : 難波寿明 (新潟大学・脳研究所・助教)
- 連携研究者 : 加藤智朗 (理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員)
- 連携研究者 : 石間 環 (千葉大学・社会精神保健教育研究センター・特任研究員)
- 連携研究者 : 藤田有子 (千葉大学・社会精神保健教育研究センター・特任研究員)

### 【公募研究】

- 研究代表者 : 大倉正道 (埼玉大学・理工学研究科・准教授)
- 研究代表者 : 真鍋俊也 (東京大学・医科学研究所・教授)
- 研究代表者 : 橋本隆紀 (金沢大学・医学系・准教授)
- 研究代表者 : 木下 専 (名古屋大学・理学部・教授)
- 研究代表者 : 小林克典 (日本医科大学・医学部・准教授)
- 研究代表者 : 小出 剛 (国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・准教授)
- 研究代表者 : 菅谷佑樹 (東京大学・医学系研究科・助教)
- 研究代表者 : 深澤有吾 (福井大学・医学部・教授)
- 研究代表者 : 貝淵弘三 (名古屋大学大学院・医学系研究科・教授)
- 研究代表者 : 中澤 敬信 (大阪大学・歯学研究科・准教授)
- 研究代表者 : 深田優子 (生理学研究所・細胞器官研究系・准教授)
- 研究代表者 : 南 雅文 (北海道大学・薬学研究院・教授)

研究代表者 : 森 寿 (富山大学・大学院医学薬学研究部・教授)  
研究代表者 : 戸田重誠 (金沢大学附属病院・神経科精神科・講師)  
研究代表者 : 小泉修一 (山梨大学・医学工学総合研究部・教授)  
研究代表者 : 櫻井 武 (京都大学大学院・医学研究科・特定准教授)  
研究代表者 : 小林和人 (福島県立医科大学・医学部・教授)  
研究代表者 : 國井泰人 (福島県立医科大学・医学部・講師)  
研究代表者 : 田中謙二 (慶應義塾大学・医学部・准教授)  
研究代表者 : 宮川 剛 (藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授)  
研究代表者 : 佐藤正晃 (国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員)  
研究代表者 : **McHugh, Thomas** (国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー)  
研究代表者 : 池田和隆 (公益財団法人東京都医学総合研究所・依存性薬物プロジェクト・プロジェクトリーダー)  
研究代表者 : 久保健一郎 (慶應義塾大学医学部・解剖学・専任講師)  
研究代表者 : 喜多村和郎 (山梨大学・医学部・教授)  
研究代表者 : 橋本 均 (大阪大学・薬学研究科・教授)  
研究代表者 : 和氣弘明 (神戸大学大学院・医学研究科・教授)  
研究代表者 : 星野幹雄 (国立精神神経医療研究センター・神経研究所・部長)  
研究代表者 : 中山敬一 (九州大学・生体防御医学研究所・主幹教授)  
研究代表者 : 奥野浩行 (京都大学・医学研究科・特定准教授)  
研究代表者 : 山田清文 (名古屋大学・医学部附属病院・教授)  
研究代表者 : 古屋敷智之 (神戸大学大学院・医学研究科・教授)  
研究代表者 : 森信 繁 (高知大学・医学部・教授)  
研究代表者 : 衣斐督和 (京都府立医科大学・医学研究科・助教)  
研究代表者 : 水島 徹 (慶應義塾大学・薬学部・教授)  
研究代表者 : 坂口昌徳 (筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授)  
研究代表者 : **JOHANSEN, JOSHUA** (国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー)  
研究代表者 : 渡部文子 (東京慈恵医科大学・総合医科学研究センター 神経科学研究部・准教授)



< 交付決定額（配分額） >

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成24年度	231,400,000	69420000	300,820,000
平成25年度	232,400,000	69720000	302,120,000
平成26年度	243,600,000	73080000	316,680,000
平成27年度	222,000,000	66600000	288,600,000
平成28年度	225,600,000	67680000	293,280,000
総計	1,155,000,000	346500000	1,501,500,000

< 研究発表 >

（1）雑誌論文

< 計画研究 >

計画 A01 吉川武男

1. Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K, *Neuron*, 81:306-313, 2014

2. Defective craniofacial development and brain function in a mouse model for depletion of intracellular inositol synthesis. Ohnishi T, Murata T, Watanabe A, Hida A, Ohba H, Iwayama Y, Mishima A, Gondo Y, Yoshikawa T, *J Biol Chemistry*, 289:10785-10796, 2014

3. 22q11.2 deletion carriers reveals potential schizophrenia-associated novel variants. Balan S, Iwayama Y, Toyota T, Manabu M, Maekawa M, Yoshikawa T, *Br J Psychiatry*, 204:398-399, 2014

4. Genetic analysis of the glyoxalase system in schizophrenia. Bangel FN, Yamada K, Arai M, Iwayama Y, Balan S, Toyota T, Iwata Y, Suzuki K, Kikuchi M, Hashimoto T, Kanahara N, Mori N, Itokawa M, Stork O, Yoshikawa T, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 59:105-110, 2015

5. Exon resequencing of H3K9 methyltransferase complex genes, EHMT1, EHTM2 and WIZ, in Japanese autism subjects. Balan S, Iwayama Y, Maekawa M, Toyota T, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Esaki K, Yamada K, Iwata Y, Suzuki K, Ide M, Ota M, Fukuchi S, Tsujii M, Mori N, Shinkai Y, Yoshikawa T, *Molecular Autism*, 5:49, 2014

6. Functional characterization of FABP3, 5 and 7 gene variants identified in schizophrenia and autism spectrum disorder and mouse behavioral studies. Shimamoto C, Ohnishi T, Maekawa M, Watanabe A, Ohba H, Arai R, Iwayama Y, Hisano Y, Toyota T, Toyoshima M, Suzuki K, Shirayama Y, Nakamura K, Mori N, Owada Y, Kobayashi T, Yoshikawa T, *Hum Mol Genet*, 23:6495-6511, 2014

7. Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. Tomioka NH, Yasuda H, Miyamoto H, Hatayama M, Morimura N, Matsumoto Y, Suzuki T, Odagawa M, Odaka YS, Iwayama Y, Won Um J, Ko J, Inoue Y, Kaneko S, Hirose S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamakawa K, Aruga J, *Nat Commun*, 5:4501-4516, 2014

8. Replication and cross-phenotype study based upon schizophrenia GWASs data in the Japanese population: support for association of MHC region with psychosis. Saito T, Kondo K, Iwayama Y, Shimasaki A, Aleksic B, Yamada K, Toyota T, Hattori E, Esaki K, Ujike H, Inada T, Kunugi H, Kato T, Yoshikawa T, Ozaki N, Ikeda M, Iwata N, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 165:421-427, 2014

9. Zinc finger protein 804A (ZNF804A) and verbal deficits in individuals with autism. Anitha A, Thanseem I, Nakamura K, Vasu MM, Yamada K, Ueki T, Iwayama Y, Toyota T, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Suzuki K, Sugiyama T, Tsujii M,

Yoshikawa T, Mori N, *J Psychiatry Neurosci.*, 39: 294-303, 2014

10. Sequencing and expression analyses of the synaptic lipid raft adapter gene PAG1 in schizophrenia. Balan S, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Ide M, Iwata Y, Suzuki K, Kikuchi M, Hashimoto T, Kanahara N, Yoshikawa T, Maekawa M, *J Neural Transmission*, 122:477- 485, 2015

11. Utility of scalp hair follicles as a novel source of biomarker genes for psychiatric illnesses. Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M, Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T, *Biol Psychiatry*, 78:116-125, 2015

12. Population-dependent contribution of the major histocompatibility complex region to schizophrenia susceptibility. Yamada K, Hattori E, Iwayama Y, Toyota T, Iwata Y, Suzuki K, Kikuchi M, Hashimoto T, Kanahara N, Mori N, Yoshikawa T, *Schizophrenia Research*, 168:444-449, 2015

13. Investigation of the fatty acid transporter-encoding genes SLC27A3 and SLC27A4 in autism. Maekawa M, Iwayama Y, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Hisano Y, Toyota T, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Takagai S, Yamada K, Ota M, Fukuchi S, Okada Y, Akamatsu W, Tsujii M, Kojima, Owada Y, Okano H, Mori N, Yoshikawa T, *Scientific Reports*, 5:16239, 2015

14. Cerebrospinal fluid metabolomics identifies a key role of isocitrate dehydrogenase in bipolar disorder. Yoshimi N, Futamura T, Bergen S, Iwayama Y, Ishima T, Sellgren C, Ekman CJ, Jakobsson J, Pålsson E, Kakumoto K, Ohgi Y, Yoshikawa T, Landén M, Hashimoto K, *Molecular Psychiatry*, 21:1504-1510, 2016

15. Fatty acid composition and fatty acid binding protein expression in the postmortem frontal cortex of patients with schizophrenia: a case-control study. Hamazaki K, Maekawa M, Toyota T, Iwayama Y, Dean B, Hamazaki T, Yoshikawa T, *Schizophrenia Research*, 171:226-232, 2016

16. Cerebrospinal fluid metabolomics identifies a key role of isocitrate dehydrogenase in bipolar disorder: evidence in support of mitochondrial dysfunction hypothesis. Yoshimi N, Futamura T, Bergen SE, Iwayama Y, Ishima T, Sellgren C, Ekman CJ, Jakobsson J, Pålsson E, Kakumoto K, Ohgi Y, Yoshikawa T, Landén M, Hashimoto K, *Molecular Psychiatry*, 21:1504-1510, 2016

17. Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, Ohnishi T, Balan S, Hisano Y, Iwayama Y, Toyota T, Matsumoto T, Itasaka N, Sugiyama S, Tanaka M, Yano M, Dean B, Okano H, Yoshikawa T, *Translational Psychiatry*, 6: e934, 2016

18. Mutation screening of GRIN2B in schizophrenia and autism spectrum disorder in a Japanese population. Takasaki Y, Koide T, Wang C, Kimura H, Xing J, Kushima I, Ishizuka K, Mori D, Sekiguchi M, Ikeda M, Aizawa M, Tsurumaru N, Iwayama Y, Yoshimi A, Arioka Y, Yoshida M, Noma H, Oya-Ito T, Nakamura Y, Kunimoto S, Aleksic B, Uno Y, Okada T, Ujike H, Egawa J, Kuwabara H, Someya T, Yoshikawa T, Iwata N, Ozaki N, *Scientific Reports*, 6:33311, 2016

19. Fatty acid composition of the postmortem corpus callosum of patients with schizophrenia, bipolar disorder, or major depressive disorder. Hamazaki K, Maekawa M, Toyota T, Dean B, Hamazaki T, Yoshikawa T, *European Psychiatry*, 39:51-56, 2017

20. Age-dependent effects of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene Val158Met polymorphism on language function in developing children. Sugiura L, Toyota T, Matsuba-Kurita H, Iwayama Y, Mazuka R, Yoshikawa T, Hagiwara H, *Cerebral Cortex*, 27:104-116, 2017

21. High-resolution copy number variation analysis of schizophrenia in Japan. Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, Shimamura T, Shiino T, Yoshimi A, Kimura H, Takasaki Y, Wang C, Xing J, Ishizuka K, Oya-Ito T, Nakamura Y, Arioka Y, Maeda T, Yamamoto M, Yoshida M, Noma H, Hamada S, Morikawa M, Uno Y, Okada T, Iidaka T, Iritani S, Yamamoto T, Miyashita M, Kobori A, Arai M, Itokawa M, Cheng MC, Chuang YA, Chen CH, Suzuki M, Takahashi T, Hashimoto

R, Yamamori H, Yasuda Y, Watanabe Y, Nunokawa A, Someya T, Ikeda M, Toyota T, Yoshikawa T, Numata S, Ohmori T, Kunimoto S, Mori D, Iwata N, Ozaki N, *Molecular Psychiatry*, 22:430-440, 2017

22. Comprehensive association analysis of 27 genes from the GABAergic system in Japanese individuals affected with schizophrenia. Balan S, Yamada K, Iwayama Y, Hashimoto T, Toyota T, Shimamoto C, Maekawa M, Takagai S, Wakuda T, Kamenno Y, Kurita D, Yamada K, Kikuchi M, Hashimoto T, Kanahara N, Yoshikawa T, *Schizophrenia Research*, 185:33-40, 2017

23. Contribution of induced pluripotent stem cell technologies to the understanding of cellular phenotypes in schizophrenia (review article). Balan S, Toyoshima M, Yoshikawa T *Neurobiology of Disease*, in press.

計画 A01 林(高木)朗子

1. GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca<sup>2+</sup> signaling. Hayama T, Noguchi J, Watanabe S, Takahashi N, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC, Matsuzaki M, Kasai H., *Nature Neuroscience*, 16:1409-1416, 2013

2. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC, Urakubo H, Ishii S, Kasai H., *Science*, 345:1616-20, 2014

3. Peripheral biomarkers revisited: integrative profiling of peripheral samples for psychiatric research. Hayashi-Takagi A(CA), Vawter MP, Iwamoto K., *Biol Psychiatry*, 75:920-928, 2014

4. PAKs inhibitors ameliorate schizophrenia-associated dendritic spine deterioration in vitro and in vivo during late adolescence. Hayashi-Takagi A, Araki Y, Nakamura M, Vollrath B, Duron SG, Yan Z, Kasai H, Haganir RL, Campbell DA., Sawa A., *Proc Natl Acad Sci USA*, 111:6461-7, 2014

5. Sub-diffraction resolution pump-probe microscopy with shotnoise limited sensitivity using laser diodes. Miyazaki J, Tsurui H, Hayashi-Takagi A, Kasai H, Kobayashi T., *Opt Express*, 22:9024-32, 2014

6. Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by disrupted-in-schizophrenia-1. Wei J, Graziane NM, Wang H, Zhong P, Wang Q, Liu W, Hayashi-Takagi A, Korth C, Sawa A, Brandon NJ, Yan Z., *Biol Psychiatry*, 75:414-424, 2014

7. Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and  $\beta$  cells. Takahashi N, Sawada W, Noguchi J, Watanabe S, Ucar H, Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Ohno M, Tokumaru H, Kasai H., *Nature Commun* 6,333-8. 8531., 2015, doi: 10.1038/ncomms9531

8. Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. Hayashi-Takagi A (CA), Yagishita S, Nakamura M, Shirai F, Wu YI, Loshbaugh AL, Kuhlman B, Hahn KM, Kasai H., *Nature*, 525:333-8, 2015

9. Fast 3D visualization of endogenous brain signals with high-sensitivity laser scanning photothermal microscopy. Miyazaki J, Iida T, Tanaka S, Hayashi-Takagi A, Kasai H, Okabe S, Kobayashi T., *Biomed Opt Express*, 7:1702-1710, 2016

10. Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo. Nagaoka A, Takehara H, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, Ishii K, Shirai F, Yagishita S, Akagi T, Ichiki T, Kasai H., *Scientific Reports*, 6:26651, 2016

11. Synapse pathology and translational applications for schizophrenia. Hayashi-Takagi A (CA), *Neuroscience Research*, 114:3-8, 2017

12. Optogenetics: Applications in psychiatric research. Shirai F, Hayashi-Takagi A (CA), *Psychiatry Clin Neurosci*, In press, 2017

13. Synaptic ensemble underling for selection and consolidation of neuronal circuits during learning. Hoshiba Y, Wada T, Hayashi-Takagi A (CA)., *Frontiers in Neural Circuits*, In press, 2017

14. Calcineurin knockout mice show a selective loss of small spines. Okazaki H, Hayashi-Takagi A, Nagaoka A, Negishi M, Ucar H, Yagishita S, Ishii K, Toyozumi T, Fox K, Kasai H. *Neurosci Lett*. 671:99-102. 2018

#### 計画 A01 廣瀬謙造

1. Cell surface-anchored fluorescent aptamer sensor enables imaging of chemical transmitter dynamics. Tokunaga T, Namiki S, Yamada K, Imaishi T, Nonaka H, Hirose K, Sando S., *J. Am. Chem. Soc.*, 134:9561-4, 2012

2. Acidic-pH-Activatable Fluorescence Probes for Visualizing Exocytosis Dynamics. Asanuma D, Takaoka Y, Namiki S, Takikawa K, Kamiya M, Nagano T, Urano Y, Hirose K., *Angew Chem Int Ed Engl.*, 53:6085-9, 2014

3. High-Throughput Screening System To Identify Small Molecules That Induce Internalization and Degradation of HER2. Isa M, Asanuma D, Namiki S, Kumagai K, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Hirose K., *ACS Chem Biol.*, 9:2237-41, 2014

4. High-throughput development of hybrid-type fluorescent glutamate sensor for analysis of synaptic transmission. Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N & Hirose K., *Angew Chem Int Ed Engl.*, 53:13439-43, 2014

5. Spatiotemporal Control of Receptor Tyrosine Kinase Activity by Caged Ligands. Isa M, Namiki S, Asanuma D, and Hirose K., *Chem Lett*, 44: 150-1, 2015

6. Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N, Sugao K, Taiko I, Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Hirose K. *Nature Neurosci.* 21, 41-49 (2018)

7. The Altered Supramolecular Structure of Dopamine D2 Receptors in Disc1-deficient Mice. Onishi T, Sakamoto H, Namiki S, Hirose K. *Sci Rep.* 8, 1692 (2018)

#### 計画 A02 加藤忠史

1. Increased L1 Retrotransposition in the Neuronal Genome in Schizophrenia. Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K, *Neuron*, 81:306-313, 2014

2. A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia. Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Bundo M, Kato T, *Molecular Brain*, 7:5, 2014

3. Heterozygous Polg mutation causes motor dysfunction due to mtDNA deletions. Fuke S, Kametani M, Yamada K, Kasahara T, Kubota-Sakashita M, Kujoth GC, Prolla TA, Hitoshi S, Kato T, *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1:909-920, 2014

4. Microendophenotypes of psychiatric disorders: phenotypes of psychiatric disorders at the level of molecular dynamics, synapses, neurons, and neural circuits. Kida S, Kato T, *Current Molecular Medicine*, 15:111-118, 2015

5. Depression-like Episodes in Mice Harboring mtDNA Deletions in Paraventricular Thalamus. \*Kasahara T, \*Takata A, \*Kato T M, Kubota-Sakashita M, Sawada T, Kakita A, Mizukami H, Kaneda D, Ozawa K, Kato T(\*co-first authors), *Molecular Psychiatry*, 21:39-48, 2016

6. Animal models of recurrent or bipolar depression. Kato T, Kasahara T, Kubota-Sakashita M, Kato TM, Nakajima K, *Neuroscience*, 321:189-196, 2016

7. Neurobiological basis of bipolar disorder: Mitochondrial dysfunction hypothesis and beyond. Kato T, *Schizophrenia Research*, S0920-9964: 30481-9, 2016

8. Exome sequencing for bipolar disorder points to roles of de novo loss-of-function and protein-altering mutations. \*Kataoka M, \*Matoba N, Sawada T, Kazuno AA, Ishiwata M, Fujii K, Matsuo K, Takata A, Kato T(\*co-first authors in alphabetical order), *Mol Psychiatry*, 21:885-93, 2016
9. Exome sequencing in the knockin mice generated using the CRISPR/Cas system. Nakajima K, Kazuno A, Kelsoe J, Nakanishi M, Takumi T, Kato T, *Scientific Reports*, 6:34703, 2016
10. Enrichment of deleterious variants of mitochondrial DNA polymerase gene (POLG1) in bipolar disorder. Kasahara T, Ishiwata M, Kakiuchi C, Fuke S, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Iwata Y, Fujii K, Kanba S, Ujike H, Kusumi I, Kataoka M, Matoba N, Takata A, Iwamoto K, Yoshikawa

計画 A02 橋本謙二

1. Neurite outgrowth mediated by the heat shock protein HSP90 $\alpha$ : a novel target for the antipsychotic drug aripiprazole. Ishima T, Iyo M, Hashimoto K. *Transl. Psychiatry*, 2:e170, 2012
2. Sigma-1 receptor chaperone and brain-derived neurotrophic factor: emerging links between cardiovascular disease and depression. Hashimoto K. *Prog. Neurobiol.*, 100:15-29, 2013
3. Targeting of NMDA receptors in the new treatment of schizophrenia. Hashimoto K. *Expert Opin. Ther. Targets*, 18:1049-1063, 2014
4. Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety, and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. Li SX, Fujita Y, Zhang JC, Ren Q, Ishima T, Wu J, Hashimoto K. *Neurobiol. Dis.*, 62:124-134, 2014
5. Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in the hippocampus and nucleus accumbens after inflammation. Zhang JC, Wu J, Fujita Y, Yao W, Ren Q, Yang C, Li SX, Shirayama Y, Hashimoto K. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 18:pyu077, 2015
6. R-Ketamine: A rapid onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. Yang C, Shirayama Y, Zhang JC, Ren Q, Yao W, Ma M, Dong C, Hashimoto K. *Transl. Psychiatry*, 5:e632, 2015
7. Alterations in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in the brain regions of a learned helplessness rat model and antidepressant effects of TrkB agonist and antagonist. Shirayama Y, Yang C, Zhang JC, Ren Q, Yao W, Hashimoto K. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 25:2449-2458, 2015
8. A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold facilitates glutamate clearance. Ageta-Ishihara, N. Yamazaki, M., Konno, K., Nakayama, H., Abe, M., Hashimoto, K., Nishioka, T., Kaibuchi, K., Hattori, S., Miyakawa, T., Tanaka, K., Huda, F., Hirai, H., Hashimoto, K., Watanabe, M., Sakimura, K., Kinoshita, M. *Nat. Comm.*, 6: 10090, 2015
9. Hippocampal p11 plays a role in the sustained antidepressant effect of ketamine in the chronic unpredictable mild stress model. Sun HL, Zhou ZQ, Zhang GF, Yang C, Wang XM, Shen JC, Hashimoto K, Yang JJ. *Transl. Psychiatry*, 6:e741, 2016
10. Abnormality in glutamine-glutamate cycle in the cerebrospinal fluid of cognitively intact elderly individuals with major depressive disorder: 3-year follow-up study. \*Hashimoto K, Bruno D, Nierenberg J, Marmar CR, Zetterberg H, Blonnow K, Pomara N. *Transl. Psychiatry*, 6:e744, 2016
11. Gene deficiency and pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase confers resilience to repeated social defeat stress. Ren Q, Ma M, Ishima T, Morisseau C, Yang J, Wagner K, Zhang JC, Yang C, Yao W, Dong C, Han M, Hammock BD, Hashimoto K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 13:E1944-52, 2016
12. Cerebrospinal fluid metabolomics identifies a key role of isocitrate dehydrogenase in bipolar disorder: Evidence in

support of mitochondrial dysfunction hypothesis. Yoshimi N, Futamura T, Bergen SE, Iwayama Y, Ishima T, Sellgren C, Ekman CJ, Jakobsson J, Pålsson E, Kakumoto K, Ohgi Y, Yoshikawa T, Landén M, [Hashimoto K](#). *Mol. Psychiatry*, 21:1504-1510, 2016

13. Supplementation with D-serine prevents the onset of cognitive deficits in adult offspring after maternal immune activation. Fujita Y, Ishima T, [Hashimoto K](#). *Sci. Rep.*, 6:37261, 2016

14. (R)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than its metabolite (2R,6R)-hydroxynorketamine. Yang C, Qu Y, Abe M, Nozawa D, Chaki S, [Hashimoto K](#). *Biol. Psychiatry*, 82:e43-e44, 2017.

15. Altered expression of BDNF, BDNF pro-peptide, and their precursor proBDNF in the brain and liver tissues from psychiatric disorders: rethinking the brain-liver axis. Yang B, Ren Q, Zhang JC, Chen QX, [Hashimoto K](#). *Transl. Psychiatry*, 7:e1128, 2017.

16. Blockade of interleukin-6 receptor in the periphery promotes rapid and sustained antidepressant actions: a possible role of gut-microbiota-brain axis. Zhang JC, Yao W, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, [Hashimoto K](#). *Transl. Psychiatry*, 7:e1138, 2017

17. Increased EphA4-ephexin1 signaling in the medial prefrontal cortex plays a role in depression-like phenotype. Zhang, J.C., Yao, W., Qu, Y., Nakamura, M., Dong, C., Yang, C., Ren, Q., Ma, M., Han, M., Shirayama, Y., Hayashi-Takagi, A., and [Hashimoto, K](#). *Sci. Rep.* 7:7133, 2017.

#### 計画 A02 富田博秋

1. Expression analysis of a novel mRNA variant of the schizophrenia risk gene ZNF804A. Okada T, Hashimoto R, Yamamori H, Umeda-Yano S, Yasuda Y, Ohi K, Fukumoto M, Ikemoto K, Kunii Y, [Tomita H](#), Ito A, Takeda M., *Schizophrenia Research*, 141(2-3):277-278, 2012

2. Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, [Tomita H](#), Ozawa H, Niikawa N, Kurotaki N., *Journal of Human Genetics*, 57(6):338-341, 2012

3. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features. Yoneda Y, Saito H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, [Tomita H](#), Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N., *Journal of Human Genetics*, 57(3):207-211, 2012

4. G protein-linked signaling pathways in bipolar and major depressive disorders. [Tomita H](#), Ziegler ME, Kim HB, Evans SJ, Choudary PV, Li JZ, Meng F, Dai M, Myers RM, Neal CR, Speed TP, Barchas JD, Schatzberg AF, Watson SJ, Akil H, Jones EG, Bunney WE, Vawter MP., *Frontiers in Genetics*, 23(4):1-12, 2013

5. Fluorescently activated cell sorting followed by microarray profiling of helper T cell subtypes from human peripheral blood. Ono C, Yu Z, Kasahara Y, Kikuchi Y, Ishii N, [\\*Tomita H](#)., *Plos One*, 9(11): e111405, 2014

6. The associations among the dopamine D2 receptor Taq1, emotional intelligence, creative potential measured by divergent thinking, and motivational state and these associations' sex differences. Takeuchi H, [Tomita H](#), Taki Y, Kikuchi Y, Ono C, Yu Z, Sekiguchi A, Nouchi R, Kotozaki Y, Nakagawa S, Miyauchi CM, Iizuka K, Yokoyama R, Shinada T, Yamamoto Y, Hanawa S, Araki T, Hashizume H, Kunitoki K, Sassa Y, Kawashima R., *Front Psychol*, 6:912, 2015

7. Cognitive and neural correlates of the 5-repeat allele of the dopamine D4 receptor gene in a population lacking the 7-repeat allele. Takeuchi H, [Tomita H](#), Taki Y, Kikuchi Y, Ono C, Yu Z, Sekiguchi A, Nouchi R, Kotozaki Y, Nakagawa S, Miyauchi CM, Iizuka K, Yokoyama R, Shinada T, Yamamoto Y, Hanawa S, Araki T, Hashizume H, Kunitoki K, Sassa Y, Kawashima R., *Neuroimage*, 110:124-135, 2015

8. Sex differences in the effects of adolescent social deprivation on alcohol consumption in  $\mu$ -opioid receptor knockout mice. Moriya Y, Kasahara Y, Hall S, Sakakibara Y, Uhl G, Tomita H, Sora I., *Psychopharmacology*, 232(8):1471-1482, 2015
9. Therapeutic concentration of lithium stimulates complement C3 production in dendritic cells and microglia via GSK-3 inhibition. Yu Z, Ono C, Aiba S, Kikuchi Y, Sora I, Matsuoka H, Tomita H., *Glia*, 63(2):257-270, 2015
10. Effects of the BDNF Val66Met Polymorphism on Gray Matter Volume in Typically Developing Children and Adolescents. Hashimoto T, Fukui K, Takeuchi H, Yokota S, Kikuchi Y, Tomita H, Taki Y, Kawashima R., *Cereb Cortex*, 26(4):1795-1803, 2016
11. Microglial gene expression alterations in the brains of patients with psychiatric disorders. Sakai M, Takahashi Y, Yu Z, Tomita H., *Adv Neuroimmune Biol*, 6(2):83-93, 2016
12. Linking Activation of Microglia and Peripheral Monocytic Cells to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. Takahashi Y, Yu Z, Sakai M, Tomita H., *Front Cell Neurosci*, 10:144, 2016
13. The VEGF gene polymorphism impacts brain volume and arterial blood volume. Takeuchi H, Tomita H, Taki Y, Kikuchi Y, Ono C, Yu Z, Sekiguchi A, Nouchi R, Kotozaki Y, Nakagawa S, Miyauchi CM, Iizuka K, Yokoyama R, Shinada T, Yamamoto Y, Hanawa S, Araki T, Kunitoki K, Sassa Y, Kawashima R., *Hum Brain Mapp*, in press
14. Microglial production of TNF-alpha is a key element of sustained fear memory. Yu Z, Fukushima H, Ono C, Sakai M, Kasahara Y, Kikuchi Y, Gunawansa N, Takahashi Y, Matsuoka H, Kida S, Tomita H., *Brain Behav Immun*, in press
15. Polymorphisms in the microglial marker molecule CX3CR1 affect the blood volume of the human brain. Sakai M, Takeuchi H, Yu Z, Kikuchi Y, Ono C, Takahashi Y, Ito F, Matsuoka H, Tanabe O, Yasuda J, Taki Y, Kawashima R, Tomita H. *Psychiatry Clin Neurosci*. in press

計画 A03 喜田 聡

1. A functional role for CREB as a positive regulator of memory formation and LTP. \*Kida, S. *Experimental Neurobiology*, 21, 136-140, 2012
2. Roles of CREB in the regulation of FMRP by group I metabotropic glutamate receptors in cingulate cortex. Wang, H., Morishita, Y., Miura, D., Naranjo, J.R., Kida, S. & Zhuo, M., *Mol. Brain*, 5, 27, 2012
3. Genetic enhancement of neuropathic and inflammatory pain by forebrain upregulation of CREB-mediated transcription. Descalzi G, Fukushima H, Suzuki A, Kida, S. Zhuo M., *Mol. Pain*, 8, 90, 2012
4. Interactions between  $\alpha$ CaMKII and calmodulin in living cells: conformational changes arising from CaM –dependent and -independent relationships. Kato, K., Iwamoto, T. & \*Kida, S. *Mol. Brain*, 6, 37, 2013 DOI: 10.1186/1756-6606-6-37
5. Time-dependent enhancement of hippocampus-dependent memory after treatment with memantine: implications for enhanced hippocampal adult neurogenesis. Ishikawa, R., Kim, R., Namba, T., Kohsaka, S., Uchino, S. & \*Kida, S. *Hippocampus*., 24, 784-93. 2014
6. Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. \*Kida, S. & Serita, T. *Brain Research Bulletin*., 105, 17-24. 2014
7. Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. Fukushima, H., Zhang, Y., Archbol, G., Ishikawa, R., Nader, K. \*Kida, S. *eLife*, 3, e02736, 2014
8. Region-Specific Activation of CRTCL1-CREB Signaling Mediates Long-Term Fear Memory. Nonaka, M., Kim, R., Fukushima, H., Sasaki, K., Suzuki, K., Okamura, M., Ishii, Y., Kawashima, T., Kamijo, S., Takemoto-Kimura, S., Okuno,

- H., Kida, S., Bito, H. *Neuron.*, 84, 92-106. 2014
9. Microphenotypes of mental disorders: a systematic approach to study disease mechanisms. Sawa, A., Kida, S., Ikeda, K. *Current Molecular Medicine.* 15:109-110, 2015
10. PARP-1 activity is required for the reconsolidation and extinction of contextual fear memory. Inaba, H., Tsukagoshi, A., \*Kida, S. *Mol. Brain*, 8:63, 2015
11. Elucidating mechanisms for mental disorders: from specific molecules to pathology. Kida, S., Sawa, A., Ikeda, K. *Current Molecular Medicine.* 15:191-2. 2015
12. Microendophenotypes of psychiatric disorders –Phenotypes of psychiatric disorders at the level of molecular dynamics, synapses, neurons, and neural circuits-. \*Kida, S. & Kato, T. *Current Molecular Medicine.* 15:111-118, 2015
13. PI3K Regulates BMAL1/CLOCK-mediated Circadian Transcription from the *Dbp* Promoter. Morishita, Y., Miura, D., \*Kida, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80: 1131-1140. 2016
14. N-glycosylation in the hippocampus is required for the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. Inaba, H., Kai, D., \*Kida, S. *Neurobiology of learning and memory*, 135: 57-65, 2016
15. Hippocampal neurogenesis enhancers promote forgetting of remote fear memory after hippocampal reactivation by retrieval. Ishikawa, R., Fukushima, H., Frankland, P.W., \*Kida, S. *eLife*, 5: e17464, 2016
16. Microglial production of TNF-alpha is a key element of sustained fear memory. Yu, Z., Fukushima, H., Ono, C., Sakai, M., Kasahara, Y., Kikuchi, Y., Gunawansa, N., Takahashi, Y., Matsuoka, H., Kida, S., Tomita, H. *Brain Behav. Immun.*, 59:313-321, 2017
17. Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampusdependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke-Korsakoff syndrome. Inaba, H., Kishimoto, T., Oishi, S., Nagata, K., Hasegawa, S., Watanabe, T., Kida, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80:2425-2436, 2016
18. Constitutive activation of CREB in mice enhances temporal association learning and increases hippocampal CA1 neuronal spine density and complexity. Serita, T., Fukushima, H., \*Kida, S. *Scientific Reports*, 7:42528, 2017
19. Functional connectivity of multiple brain regions required for the consolidation of social recognition memory. Tanimizu, T., Kenney, J.W., Okano, E., K. Kadoma., K. Frankland., P.W., \*Kida, S. *J. Neurosci.*, 37, 4103-4116, 2017
20. Nagayoshi T, Isoda K, Mamiya N, \*Kida, S. Hippocampal calpain is required for the consolidation and reconsolidation but not extinction of contextual fear memory. *Mol Brain.* 10, 61, 2017
21. Matsuura A, Ishima T, Fujita Y, Iwayama Y, Hasegawa S, Kawahara-Miki R, Maekawa M, Toyoshima M, Ushida Y, Suganuma H, Kida, S., Yoshikawa T, Iyo M, Hashimoto K. Dietary glucoraphanin prevents the onset of psychosis in the adult offspring after maternal immune activation. *Sci Rep.* 8:2158. 2018
22. Brain networks activated to form object recognition memory. Tanimizu, T, Kono, K, \*Kida, S. *Brain Research Bulletin.*, in press

#### 計画 A03 岩本和也

1. Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses of monozygotic twins discordant for intelligence levels. Yu CC, Furukawa M, Kobayashi K, Shikishima C, Cha PC, Sese J, Sugawara H, Iwamoto K, Kato T, Ando J, Toda T., *PLoS One*, 7:e47081, 2012
2. A systematic evaluation of whole genome amplification of bisulfite-modified DNA. Bundo M, Sunaga F, Ueda J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K., *Clinical Epigenetics*, 4:22, 2012



3. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. Nishioka M, Bundo M, Kasai K, Iwamoto K., *Genome Medicine*, 4:96, 2012
4. Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. Nishioka M, Bundo M, Koike S, Takizawa R, Kakiuchi C, Araki T, Kasai K, Iwamoto K., *Journal of Human Genetics*, 58:91-97, 2013
5. Neuronal cell-type specific DNA methylation patterns of the Cacna1c gene. Nishioka M, Shimada T, Bundo M, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Kano Y, Sasaki T, Kasai K, Kato T, Iwamoto K., *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31:89-95, 2013
6. Effect of mood stabilizers on DNA methylation in human neuroblastoma cells. Asai T, Bundo M, Sugawara H, Sunaga F, Ueda J, Tanaka G, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K., *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16:2285-2294, 2013
7. DNA methylation analysis of BDNF gene promoters in peripheral blood cells of schizophrenia patients. Ikegame T, Bundo M, Sunaga F, Asai T, Nishimura F, Yoshikawa A, Kawamura Y, Hibino H, Tochigi M, Kakiuchi C, Sasaki T, Kato T, Kasai K, Iwamoto K., *Neuroscience Research*, 77:208-214, 2013
8. Epigenetic regulation of serotonin transporter in psychiatric disorders. Sugawara H, Bundo M, Ishigooka J, Iwamoto K., Kato T., *Journal of Genetics and Genomics*, 40:325-329, 2013
9. DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. Ikegame T, Bundo M, Murata Y, Kasai K, Kato T, Iwamoto K., *Journal of Human Genetics*, 58:434-438, 2013
10. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. \*Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, Takuma H, Bundo M, Iwamoto K., Tamaoka K, Murayama S, Saido T, Tsuji S., *Human Molecular Genetics*, 23:648-656, 2014
11. Comprehensive survey of CNVs influencing gene expression in the human brain and its implications for pathophysiology. Mehta D, Iwamoto K., Ueda J, Bundo M, Adati N, Kojima T, Kato T., *Neuroscience Research*, 79:22-33, 2014
12. Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K., *Neuron*, 81:306-313, 2014
13. A role of ADAR2 and RNA editing of glutamate receptors in mood disorders and schizophrenia. Kubota-Sakashita M, Iwamoto K., Bundo M, Kato T., *Molecular Brain*, 7:5, 2014
14. Comprehensive DNA methylation analysis of human neuroblastoma cells treated with blonanserin. Murata Y, Nishioka M, Bundo M, Sunaga F, Kasai K, Iwamoto K., *Neuroscience Letters*, 563:123-128, 2014
15. A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: A capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. Koike S, Bundo M, Iwamoto K., Suga M, Kuwabara H, Ohashi Y, Shinoda K, Takano Y, Iwashiro N, Satomura Y, Nagai T, Natsubori T, Tada M, Yamasue H, Kasai K., *Translational Psychiatry*, 4:e379, 2014
16. Effects of quetiapine on DNA methylation in neuroblastoma cells. Sugawara H, Bundo M, Asai T, Sunaga F, Ueda J, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K., *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 56C:117-121, 2014
17. Peripheral biomarkers revisited: integrative profiling of peripheral samples for psychiatric research. \*Hayashi-Takagi A, Vawter MP, Iwamoto K., *Biological Psychiatry*, 75:920-928, 2014

18. Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders. Kato T, Iwamoto K., *Neuropharmacology*, 80C:133-139, 2014
19. Cell type-specific DNA methylation analysis in neurons and glia. Bundo M, Kato T, Iwamoto K., *Epigenetic Methods in Neuroscience Research*, Springer, Berlin, 115-123, 2015
20. Epigenome-wide association study of DNA methylation in panic disorder. Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Miyagawa T, Umekage T, Kawamura Y, Bundo M, Iwamoto K., Tochigi M, Kasai K, Kaiya H, Tani H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T., *Clinical Epigenetics*, 9:6, 2017
21. DNA methylation and hydroxymethylation analyses of the active LINE-1 subfamilies in mice. Murata Y, Bundo M, Ueda J, Kubota-Sakashita M, Kasai K, Kato T, Iwamoto K\*. *Scientific Reports*, 7:13624, 2017
22. Polyunsaturated fatty acid deficiency during neurodevelopment in mice models the prodromal state of schizophrenia through epigenetic changes in nuclear receptor genes. Maekawa M, Watanabe A, Iwayama Y, Kimura T, Hamazaki K, Balan S, Ohba H, Hisano Y, Nozaki Y, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Iwamoto K, Bundo M, Osumi N, Takahashi E, Takashima A, Yoshikawa T\*. *Translational Psychiatry*, 7:e1229, 2017
23. Enrichment of deleterious variants of mitochondrial DNA polymerase gene (POLG1) in bipolar disorder. Kasahara T, Ishiwata M, Kakiuchi C, Fuke S, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Iwata Y, Fujii K, Kanba S, Ujike H, Kusumi I, Kataoka M, Matoba N, Takata A, Iwamoto K., Yoshikawa T, \*Kato T., *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, in press
24. Use of human methylation arrays for epigenome research in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Ueda J, Murata Y, Bundo M, Oh-Nishi A, Kassai H, Ikegame T, Zhao Z, Jinde S, Aiba A, Suhara T, Kasai K, Kato T, Iwamoto K., *Neuroscience Research*, in press
25. Identification of somatic mutations in monozygotic twins discordant for psychiatric disorders. Nishioka M, Bundo M, Ueda J, Yoshikawa A, Nishimura F, Sasaki T, Kakiuchi C, Kato T\*, Iwamoto K\*. *npj Schizophrenia*, 4:7, 2018
26. DNA methylation of ANKK1 and response to aripiprazole in patients with acute schizophrenia: A preliminary study. Miura I\*, Kunii Y, Hino M, Hoshino H, Matsumoto K, Kanno-Nozaki K, Horikoshi S, Kaneko H, Bundo M, Iwamoto K, Yabe H. *Journal of Psychiatric Research*, 100:84-87, 2018
27. DNA methylation analyses of the candidate genes identified by a methylome-wide association study revealed common epigenetic alterations in schizophrenia and bipolar disorder. Sugawara H, Murata Y, Ikegame T, Sawamura R, Shimanaga S, Takeoka Y, Saito T, Ikeda M, Yoshikawa A, Nishimura F, Kawamura Y, Kakiuchi C, Sasaki T, Iwata N, Hashimoto M, Kasai K, Kato T, Bundo M\*, Iwamoto K\*. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72:245-254, 2018
28. An epigenome-wide methylation study of healthy individuals with or without depressive symptoms. Shimada-Sugimoto M, Otowa T\*, Miyagawa T, Umekage T, Kawamura Y, Bundo M, Iwamoto K, Ikegame T, Tochigi M, Kasai K, Kaiya H, Tani H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T. *Journal of Human Genetics*, 63:319-326, 2018
29. Identification of somatic mutations in postmortem human brains by whole genome sequencing and their implications for psychiatric disorders. Nishioka M, Bundo M, Ueda J, Katsuoka F, Sato Y, Kuroki Y, Ishii T, Ukai W, Murayama S, Hashimoto E, Nagasaki M, Yasuda J, Kasai K, Kato T\*, Iwamoto K\*. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72:280-294, 2018
30. Mutations of the glycine cleavage system genes possibly affect the negative symptoms of schizophrenia through metabolomic profile changes. Yoshikawa A, Nishimura F, Inai, A, Eriguchi, Y, Nishioka, M, Takaya A, Tochigi M, Kawamura Y, Umekage T, Kato K, Sasaki T, Ohashi Y, Iwamoto K, Kasai K, Kakiuchi C\*. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72:168-179, 2018

31. Somatic mutations in the human brain: implications for psychiatric research. Nishioka M, Bundo M, Iwamoto K\*, Kato T\*. *Molecular Psychiatry* in press

32. DNA methylation profiling in a neuroblastoma cell line exposed to the antipsychotic perospirone. Murata Y, Bundo M\*, Sunaga F, Kasai K, Iwamoto K\*. *Pharmacopsychiatry*, in press

計画 A03 那波宏之

1. Association of SNPs linked to increased expression of SLC1A1 with schizophrenia. Horiuchi Y, Iida S, Koga M, Ishiguro H, Iijima Y, Inada T, Watanabe Y, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Tochigi M, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Kakita A, Takahashi H, Nawa H., Arinami T., *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*, 159B(1):30-37, 2012

2. Experimental schizophrenia models in rodents established with inflammatory agents and cytokines. Nawa H., Yamada K., *Methods Mol Biol.*, 829:445-451, 2012

3. Exposure to the cytokine EGF leads to abnormal hyperactivity of pallidal GABA neurons: implications for schizophrenia and its modeling. Sotoyama H, Namba H, Chiken S, Nambu A, Nawa H., *J Neurochem.*, 126:518-528, 2013

4. ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. Iwakura Y, Nawa H., *Front Cell Neurosci.*, 7:4, 2013

5. ErbB2 dephosphorylation and anti-proliferative effects of neuregulin-1 in ErbB2-overexpressing cells; re-evaluation of their low-affinity interaction. Wang R, Iwakura Y, Araki K, Keino-Masu K, Masu M, Wang XY, Takei N, Higashiyama S, Nawa H., *Sci Rep.*, 3:1402, 2013

6. Neurobehavioral deficits of epidermal growth factor overexpressing transgenic mice: impact on dopamine metabolism. Eda T, Mizuno M, Araki K, Iwakura Y, Namba H, Sotoyama H, Kakita A, Takahashi H, Satoh H, Chan SY, Nawa H., *Neurosci Lett.*, 547:21-25, 2013

7. ErbB inhibitors ameliorate behavioral impairments of an animal model for schizophrenia: implication of their dopaminergic modulatory actions. Mizuno M, Sotoyama H, Namba H, Shibuya M, Eda T, Wang R, Okubo T, Nagata K, Iwakura Y, Nawa H., *Transl Psychiatry.*, 3:e252, 2013

8. Elevated postmortem striatal t-DARPP expression in schizophrenia and associations with DRD2/ANKK1 polymorphism. Kunii Y, Miura I, Matsumoto J, Hino M, Wada A, Niwa S, Nawa H., Sakai M, Someya T, Takahashi H, Kakita A, Yabe H., *Prog Neuropsychopharmacol Biol.*, 53:123-128, 2014

9. Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H., Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K., *Neuron.*, 81(2):306-313, 2014

10. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. Takei N, Nawa H., *Front Mol Neurosci.*, 7:28, 2014

11. Neuropathologic implication of peripheral neuregulin-1 and EGF signals in dopaminergic dysfunction and behavioral deficits relevant to schizophrenia: their target cells and time window. Nawa H., Sotoyama H, Iwakura Y, Takei N, Namba H., *Biomed Res Int.*, 2014:697935, 2014

12. A possible link between BDNF and mTOR in control of food intake. Takei N, Furukawa K, Hanyu O, Sone H, Nawa H., *Front Psychol.*, 5:1093, 2014

13. Neurobehavioral differences between mice receiving distinct neuregulin variants as neonates; impact on sensitivity to MK-801. Kato T, Abe Y, Hirokawa S, Iwakura Y, Mizuno M, Namba H, Nawa H., *Curr Mol Med.*, 15(3):222-236,

2015

14. Assessment of copy number variations in the brain genome of schizophrenia patients. Sakai M, Watanabe Y, Someya T, Araki K, Shibuya M, Niizato K, Oshima K, Kunii Y, Yabe H, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Hashimoto T, Hishimoto A, Kitamura N, Iritani S, Shirakawa O, Maeda K, Miyashita A, Niwa S, Takahashi H, Kakita A, Kuwano R, Nawa H., *Mol Cytogenet.*, 8:46, 2015

15. Pathological implications of oxidative stress in patients and animal models with schizophrenia: the role of epidermal growth factor receptor signaling. Nagano T, Mizuno M, Morita K, Nawa H., *Curr Top Behavior Neurosci.*, in press

16. Perinatal exposure to neuregulin-1 results in disinhibition of adult midbrain dopaminergic neurons: Implication in schizophrenia modeling. Namba H, Okubo T, Nawa H., *Sci Rep.*, 6:22606, 2016

17. Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor. Sotoyama H, Iwakura Y, Oda K, Sasaoka T, Takei N, Kakita A, Enomoto H, Nawa H. *Neurosci Lett.* 654:99-106, 2017.

18. Epidermal growth factor signals attenuate phenotypic and functional development of neocortical GABA neurons. Namba H, Nagano T, Jodo E, Eifuku S, Horie M, Takebayashi H, Iwakura Y, Sotoyama H, Takei N, Nawa H. *J Neurochem* 142: 886-900, 2017.

19. Glutamate-dependent ectodomain shedding of neuregulin-1 type II precursors in rat forebrain neurons. Iwakura Y, Wang R, Inamura N, Araki K, Higashiyama S, Takei N, Nawa H. *PLoS One.* 12(3):e0174780, 2017.

#### 計画研究分担者 鶴飼 渉

1. Effects of atelocollagen on neural stem cell function and its migrating capacity into brain in psychiatric disease model. Yoshinaga T, Hashimoto E, Ukai W., Ishii T, Shirasaka T, Kigawa Y, Tateno M, Kaneta H, Watanabe K, Igarashi T, Kobayashi S, Sohma H, Kato T, Saito T. *J Neural Transm(Vienna)*., 120:1491-1498, 2013

2. Stem cell therapy: a new approach to the treatment of refractory depression. Kigawa Y, Hashimoto E, Ukai W., Ishii T, Furuse K, Tsujino H, Shirasaka T, Saito T., *J Neural Transm(Vienna)*., 121:1221-1232, 2014 doi:10.1007/s00702-014-1194-2

3. Antipsychotics promote GABAergic interneuron genesis in the adult rat brain: Role of heat-shock protein production. Kaneta H, Ukai W., Tsujino H, Furuse K, Kigawa Y, Tayama M, Ishii T, Hashimoto E, Kawanishi C. *J Psychiatr Res.*, 92:108-118, 2017 doi: 10.1016/j.jpsychires

#### < 公募研究 >

#### 公募 A01 大倉正道

1. Pretreatment of donor islets with the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor improves the efficiency of islet transplantation. Mera T, Itoh T, Kita S, Kodama S, Kojima D, Nishinakamura H, Okamoto K, Ohkura M., Nakai J, Iyoda T, Iwamoto T, Matsuda T, Baba A, Omori K, Ono J, Watarai H, Taniguchi M, Yasunami Y, *Am J Transplantation*, 13:2154-2160, 2013

2. Principal component analysis of odor coding at the level of third-order olfactory neurons in Drosophila. Hiroi M, Ohkura M., Nakai J, Matsuda N, Hashimoto K, Inoue K, Fiala A, Tabata T, *Genes Cells*, 18:1070-1081, 2013

3. Imaging of astrocytic activity in living rodents. Takata N, Shinohara Y, Ohkura M., Mishima T, Nakai J, Hirase H, *Neuromethods*, 85:191-207, 2014

4. Large-scale imaging of subcellular calcium dynamics of cortical neurons with G-CaMP6-actin. Kobayashi C, Ohkura M., Nakai J, Matsuki N, Ikegaya Y, Sasaki T, *NeuroReport*, 25:501-506, 2014

5. Reward-timing-dependent bidirectional modulation of cortical microcircuits during optical single-neuron operant conditioning. Hira R, Ohkubo F, Masamizu Y, Ohkura M, Nakai J, Okada T, Matsuzaki M, *Nature Communications*, 5:5551, 1-12, 2014
6. Water-soluble jack-knife prawn extract inhibits 5-hydroxytryptamine-induced vasoconstriction and platelet aggregation in humans. Gamoh S, Kanai T, Tanaka-Totoribe N, Ohkura M, Kuwabara M, Nakamura E, Yokota A, Yamasaki T, Watanabe A, Hayashi M, Fujimoto S, \*Yamamoto R, *Food Funct*, 6:444-449, 2015
7. Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. Inoue M, Takeuchi A, Horigane SI, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bitto H, *Nature Methods*, 12:64-70, 2015
8. Comparison of genetically encoded calcium indicators for monitoring action potentials in mammalian brain by two-photon excitation fluorescence microscopy. Podor B, Hu Y, Ohkura M, Nakai J, Croll R, Fine A, *Neurophotonics*, 2(2):021014, 1-7, 2015
9. Generation and imaging of transgenic mice that express G-CaMP7 under a tetracycline response element. Sato M, Kawano M, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Nakai J, Hayashi Y, *PLoS One*, 10(5):e0125354, 1-13, 2015
10. A top-down cortical circuit for accurate sensory perception. Manita S, Suzuki T, Homma C, Matsumoto T, Odagawa M, Yamada K, Ota K, Matsubara C, Inutsuka A, Sato M, Ohkura M, Yamanaka A, Yanagawa Y, Nakai J, Hayashi Y, Larkum ME, Murayama M, *Neuron*, 86:1304-1316, 2015
11. JSAP1/JIP3 and JLP regulate kinesin-1-dependent axonal transport to prevent neuronal degeneration. Sato T, Ishikawa M, Mochizuki M, Ohta M, Ohkura M, Nakai J, Takamatsu N, Yoshioka K, *Cell Death and Differentiation*, 22:1260-1274, 2015
12. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiba K, Itohara S, Nakai J, Iwai Y, Hirase H, *Nature Communications*, 7:11100, 1-10, 2016
13. Olfactory receptor for prostaglandin F2 $\alpha$  mediates male fish courtship behavior. Yabuki Y, Koide T, Miyasaka N, Wakisaka N, Masuda M, Ohkura M, Nakai J, Tsuge K, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Yoshihara Y, *Nature Neuroscience*, 19:897-904, 2016
14. The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, Nakai J, Ohkura M, Taguchi T, Yamanaka A, *Scientific Reports*, 6:29480, 1-15, 2016
15. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U, *Nature*, 538:388-391, 2016

#### 公募 A01 真鍋俊也

1. Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short-term plasticity. Watanabe, Y., Katayama, N., Takeuchi, K., Togano, T., Itoh, R., Sato, M., Yamazaki, M., Abe, M., Sato, T., Oda, K., Yokoyama, M., Takao, K., Fukaya, M., Miyakawa, T., Watanabe, M., Sakimura, K., Manabe, T. and Igarashi, M., *J. Biol. Chem.*, 288(48):34906-34919, 2013
2. The glutamate receptor GluN2 subunit regulates synaptic trafficking of AMPA receptors in the neonatal mouse brain. Hamada, S., Ogawa, I., Yamasaki, M., Kiyama, Y., Watabe, A. M., Kassai, H., Nakano, K., Aiba, A., Watanabe, M. and Manabe, T. *Eur. J. Neurosci.*, 40:3136-3146, 2014
3. LMTK3 deficiency causes pronounced locomotor hyperactivity and impairs endocytic trafficking. Inoue, T., Hoshina, N., Nakazawa, T., Kiyama, Y., Kobayashi, S., Abe, T., Yamamoto, T., Manabe, T. and Yamamoto, T., *J. Neurosci.*,

34(17):5927–5937, 2014

4. AMPAR activation-independent antidepressant actions of ketamine metabolite. Yang, C., Kobayashi, S., Nakao, K., Han, M., Qu, Y., Ren, Q., Zhang, J.-c., Ma, M., Dong, C., Toki, H., Yamaguchi, J.-i., Chaki, S., Shirayama, Y., Nakazawa, K., Manabe, T. and Hashimoto, K. (2018). *Biol.Psychiat.* (in press)

公募 A01 橋本隆紀

1. Lower gene expression for KCNS3 potassium channel subunit in parvalbumin-containing neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. Georgiev D, Arion D, Enwright JF, Kikuchi M, Minabe Y, Corradi JP, Lewis DA, Hashimoto T., *American Journal of Psychiatry*, 171: 62-71, 2014

2. Cortical gene expression after a conditional knockout of 67 kDa glutamic acid decarboxylase in parvalbumin neurons. Georgiev D, Yoshihara T., Kawabata R, Matsubara T, Tsubomoto M, Minabe Y, Lewis DA, Hashimoto T., *Schizophrenia Bulletin*, 42:992-1002, 2016

公募 A01 木下 専

1. Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. Ageta-Ishihara N, Yamakado H, Morita T, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Takahashi R, Kinoshita M., *Molecular Brain*, 6:35, 2013

2. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. Ageta-Ishihara N, Miyata T, Ohshima C, Watanabe M, Sato Y, Hamamura Y, Higashiyama T, Mazitschek R, Bito H, Kinoshita M., *Nature Communications*, 4:2532, 2013

3. Silent information regulator 2 homolog 1 (SIRT1) counters cerebral hypoperfusion injury by deacetylating endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Hattori Y, Okamoto Y, Maki T, Yamamoto Y, Oishi N, Yamahara K, Takahashi R, Kalaria RN, Fukuyama H, Kinoshita M., Ihara M., *Stroke*, 45: 3403-3411, 2014

4. SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70 chaperone system. Watanabe S, Ageta-Ishihara N, Nagatsu S, Takao K, Komine O, Endo F, Miyakawa T, Misawa H, Takahashi R, Kinoshita M., Yamanaka K., *Molecular Brain*, 7:62, 2014

5. Transgenic supplementation of SIRT1 fails to alleviate acute loss of nigrostriatal dopamine neurons and gliosis in a mouse model of MPTP-induced parkinsonism. Kitao Y, Ageta-Ishihara N, Takahashi R, Kinoshita M., Hori O., *F1000Research*, 4:130, 2015

6. A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold facilitates glutamate clearance. Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Hashimoto K, Nishioka T, Kaibuchi K, Hattori S, Miyakawa T, Tanaka K, Huda F, Hirai H, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M., *Nature Communications*, 6:10090, 2015

7. Methods for immunoblot detection and electron microscopic localization of septin subunits in mammalian nervous systems. Parajuli LK, Ageta-Ishihara N, Ageta H, Fukazawa Y, Kinoshita M., *Methods in Cell Biology*, 136:285–294, 2016

8. CDC42EP4, a perisynaptic scaffold protein in Bergmann glia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration. Ageta-Ishihara N, Konno K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Kinoshita M. *Neurochemistry International*, in press

公募 A01 小林克典

1. Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurologic phenotypes related to schizophrenia. Onouchi T, Kobayashi K., Sakai K, Shimomura A, Smits R, Sumi-Ichinose C, Kurosumi M, Takao K, Nomura R, Iizuka-Kogo A, Suzuki H, Kondo K, Akiyama T, Miyakawa T, Fodde R, Senda T., *Molecular Brain*, 7:21, 2014

2. Enhanced stability of hippocampal place representation caused by reduced magnesium block of NMDA receptors in the dentate gyrus. \*Hayashi Y, Nabeshima Y, Kobayashi K, Miyakawa T, Tanda K, Takao K, Suzuki H, Esumi E, Noguchi S, Matsuda Y, Sasaoka T, Noda T, Miyazaki J, Mishina M, Funabiki K, Nabeshima Y., *Molecular Brain*, 7:44, 2014
3. Role of the 5-HT4 receptor in chronic fluoxetine treatment-induced neurogenic activity and granule cell dematuration in the dentate gyrus. Imoto Y, Kira T, Sukeno M, Nishitani N, Nagayasu K, Nakagawa T, Kaneko S, Kobayashi K, Segi-Nishida E., *Molecular Brain*, 8:29, 2015
4. Rapid and lasting enhancement of dopaminergic modulation at the hippocampal mossy fiber synapse by electroconvulsive treatment. Kobayashi K, Imoto Y, Yamamoto F, Kawasaki M, Ueno M, Segi-Nishida E, Suzuki H., *Journal of Neurophysiology*, 117:284-289, 2017
5. Rapid and stable changes in maturation-related phenotypes of the adult hippocampal neurons by electroconvulsive treatment. Imoto Y, Segi-Nishida E, Suzuki H, Kobayashi K, *Molecular Brain*, 10:8, 2017

#### 公募 A01 小出 剛

1. Behavioral characterization of escalated aggression induced by GABA(B) receptor activation in the dorsal raphe nucleus. Takahashi A, Schilit A N, Kim J, Debold J F, Koide T, Miczek K A., *Psychopharmacology*, 224:155-156, 2012
2. Genomic mixing to elucidate the genetic system of complex traits. Koide T, Goto, T, Takano-Shimizu, T., *Experimental Animals*, 61:503-509, 2012
3. Identification of both copy number variation-type and constant-type core elements in a large segmental duplication region of the mouse genome. Umemori J, Mori A, Ichiyana K, Uno T, Koide T, *BMC Genomics*, 14:455, 2013
4. Selection for reluctance to avoid humans during the domestication of mice. Goto T, Tanave A, Moriwaki K, Shiroishi T, Koide T, *Genes, Brain, and Behavior*, 12:760-770, 2013
5. Enhanced prepulse inhibition and low sensitivity to a dopamine agonist in Hes1-knockout mice. Kanno K., Kokubo H., Takahashi A., Koide T, Ishiura S., *Journal of Neuroscience Research*, 92:287-297, 2014
6. Control of intermale aggression by the medial prefrontal cortex activation in the mouse. Takahashi A, Nagayasu K, Nishitani N, Kaneko S, Koide T, *PLoS ONE*, 9:e94657, 2014
7. A male-specific QTL for social interaction behavior in mice mapped with automated pattern detection by a hidden Markov model incorporated into newly developed freeware. Arakawa T, Tanave A, Ikeuchi S, Takahashi A, Kakihara S, Kimura S, Sugimoto H, Asada N, Shiroishi T, Tomihara K, Tsuchiya T, Koide T, *Journal of Neuroscience Methods*, 234:127-134, 2014
8. Segregation of a QTL cluster for home-cage activity using a new mapping method based on regression analysis of congenic mouse strains. Kato S, Ishii A, Nishi A, Kuriki S, Koide T, *Heredity*, 113:416-423, 2014
9. Genetic mapping of escalated aggression in wild-derived mouse strain MSM/Ms: association with serotonin-related genes. Takahashi A, Shiroishi T, Koide T, *Frontiers in Neuroscience*, 8, Article 156, 2014
10. Glutamate input in the dorsal raphe nucleus as a determinant of escalated aggression in male mice. Takahashi A, Lee RX, Iwasato T, Itohara S, Arima H, Bettler B, Miczek KA, Koide T, *The Journal of Neuroscience*, 35:6452-6463, 2015
11. Mapping of genetic factors that elicit intermale aggressive behavior on mouse chromosome 15: intruder effects and the complex genetic basis. Takahashi A, Sugimoto H, Kato S, Shiroishi T, Koide T, *PLoS ONE*, 10:e0137764, 2015
12. Cell adhesion molecule Caspr3 is expressed in the mouse basal ganglia during early postnatal stages. Hirata H, Umemori J, Yoshioka H, Koide T, Watanabe K, Shimoda Y., *Journal of Neuroscience Research*, 94:74-89, 2016

13. Caspr3-deficient mice exhibit low motor learning during the early phase of the accelerated rotarod task. Hirata H, Takahashi A, Shimoda Y, Koide T., *PLoS ONE*, 11:e0147887, 2016

14. Pup exposure facilitates retrieving behavior via the oxytocin neural system in female mice. Okabe S, Tsuneoka Y, Takahashi A, Oyama R, Watarai A, Maeda S, Honda Y, Nagasawa M, Mogi K, Nishimori K, Kuroda M, Koide T. Kikusui T., *Psychoneuroendocrinology*, 79:20-30, 2017

15. Hierarchy in the home cage affects behaviour and gene expression in group-housed C57BL/6 male mice. Horii Y, Nagasawa T, Sakakibara H, Takahashi A, Tanave A, Matsumoto Y, Nagayama H, Yoshimi K, Yasuda M, Shimoi K, Koide T. (corresponding author), *Scientific Reports*, 7: 6991, 2017 DOI:10.1038/s41598-017-07233-5, PMID: 28765614

16. Selective breeding and selection mapping using a novel wild-derived heterogeneous stock of mice revealed two closely linked loci for tameness. Matsumoto Y (3名略), Tanave A (2名略), Koide T. *Scientific Reports*. 7: 4607, 2017

#### 公募 A01 菅谷佑樹

1. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Nakazawa T, Hashimoto R, Sakoori K, Sugaya Y. Tanimura A, Hashimoto Y, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Umeda- Yano S, Kiyama Y, Konno K, Inoue T, Yokoyama K, Inoue T, Numata S, Ohnuma T, Iwata N, Ozaki N, Hashimoto H, Watanabe M, Manabe T, Yamamoto T, Takeda M, Kano M., *Nature Communications*, 7:10594., 2016

#### 公募 A01 深澤有吾

1. Synapse-dependent and independent mechanisms of thalamocortical axon branching are regulated by neuronal activity. Matsumoto N, Hoshiko M, Sugo N, Fukazawa Y. Yamamoto N., *Dev. Neurobiol.*, 76:323-336, 2016

2. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh S-E, Kim SJ, Lee G, Bae H, Woorhouse A, Mikoshiba K, Fukazawa Y. Koizumi S, Nabekura J., *J. Clin. Invest.*, 126:1983-1997, 2016

3. CAPS1 stabilizes the state of readily releasable synaptic vesicles to fusion competence at CA3-CA1 synapses in adult hippocampus. Shinoda Y, Ishii C, Fukazawa Y. Sadakata T, Ishii Y, Sano Y, Iwasato T, Itohara S, Furuichi T., *Scientific Reports*, 6:31540, 2016

4. The number and distribution of AMPA receptor channels containing fast kinetic GluA3 and GluA4 subunits at auditory nerve synapses depend on the target cells. Rubio ME, Matsui K, Fukazawa Y. Kamasawa N, Harada H, Itakura M, Molnar E, Abe M, Sakimura K, Shigemoto R., *Brain Structure and Function*, in press, 2017

5. Differential association of GABAB receptors with their effector ion channels in Purkinje cells. Luján R, Aguado C, Ciruela F, Cózar J, Kleindienst D, de la Ossa L, Wickman K, Watanabe M, Shigemoto R, Fukazawa Y. *Brain Structure and Function* 223, 2017, 1565-1587.

6. Elasticity-based boosting of neuroepithelial nucleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter. Tomoyasu Shinoda, Arata Nagasaka, Yasuhiro Inoue, Ryo Higuchi, Yoshiaki Minami, Kagayaki Kato, Makoto Suzuki, Takefumi Kondo, Takumi Kawaue, Kanako Saito, Naoto Ueno, Yugo Fukazawa, Masaharu Nagayama, Takashi Miura, Taiji Adachi, Takaki Miyata.. *PLoS Biology* 16, 2018, e2004426.

7. Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. Darin Lanjakornsiripan, Baek-Jun Pior, Daichi Kawaguchi, Shohei Furutachi, Tomoaki Tahara, Yu Katsuyama, Yutaka Suzuki, Yugo Fukazawa, Yukiko Gotoh. *Nature Commun* 9, 2018, 1623.

8. Optogenetic activation of non-nociceptive A $\beta$  fibers induces neuropathic pain-like sensory and emotional behaviors after nerve injury in rats. Ryoichi Tashima, Keisuke Koga, Misuzu Sekine, Kensho Kanehisa, Yuta Kohro, Keiko



Tominaga, Katsuyuki Matsushita, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Yugo Fukazawa, Kazuhide Inoue, Hiromu Yawo, Hidemasa Furue, and Makoto Tsuda *eNeuro* 5, 2018, e0450-17.

#### 公募 A01 貝淵弘三

1. Phosphoproteomics of the Dopamine Pathway Enables Discovery of Rap1 Activation as a Reward Signal In Vivo. Nagai T, Nakamuta S, Kuroda K, Nakauchi S, Nishioka T, Takano T, Zhang X, Tsuboi D, Funahashi Y, Nakano T, Yoshimoto J, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Miura M, Nishi A, Kobayashi K, Yamada K, Amano M, Kaibuchi K., *Neuron*, 89:550-565, 2016

2. Immunohistochemical evaluation of the GABAergic neuronal system in the prefrontal cortex of a DISC1 knockout mouse model of schizophrenia. Umeda K, Iritani S, Fujishiro H, Sekiguchi H, Torii Y, Habuchi C, Kuroda K, Kaibuchi K., Ozaki N., *Synapse*, 70:508-518, 2016

3. "Neuropeptide Y neuronal network dysfunction in the frontal lobe of a genetic mouse model of schizophrenia", Morosawa S, Iritani S, Fujishiro H, Sekiguchi H, Torii Y, Habuchi C, Kuroda K, Kaibuchi K., Ozaki N., *Neuropeptides*, 16:30121-30124, 2017

#### 公募 A01 中澤敬信

1. CRTH2, a prostaglandin D2 receptor, mediates depression-related behavior in mice. Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T., Habu R, Ago Y, Wang H, Kanoh T, Hayata-Takano A, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Hashimoto R, Matsuda T, Waschek JA, Kasai A, Nagayasu K, Baba A, Hashimoto H, *Behav. Brain Res.*, 284:131-137, 2015

2. p13 overexpression in pancreatic  $\beta$ -cells ameliorates type 2 diabetes in high-fat-fed mice. Higashi S, Katagi K, Shintani N, Ikeda K, Sugimoto Y, Tsuchiya S, Inoue N, Tanaka S, Koumoto M, Kasai A, Nakazawa T., Hayata-Takano A, Hamagami K, Tomimoto S, Yoshida T, Ohkubo T, Nagayasu K, Ago Y, Onaka Y, Hashimoto R, Ichikawa A, Baba A, Hashimoto H, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 461(4):612-617, 2015

3. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Nakazawa T., Hashimoto R, Sakoori K, Sugaya Y, Tanimura A, Hashimoto Y, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Umeda-Yano S, Kiyama Y, Konno K, Inoue T, Yokoyama K, Inoue T, Numata S, Ohnuma T, Iwata N, Ozaki N, Hashimoto H, Watanabe M, Manabe T, Yamamoto T, Takeda M, Kano M, *Nat. Commun.*, 7:10594, 2016

4. Whole-exome sequencing and neurite outgrowth analysis in autism spectrum disorder. Hashimoto R, Nakazawa T., Tsurusaki Y, Yasuda Y, Nagayasu K, Matsumura K, Kawashima H, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Umeda-Yano S, Fukunaga M, Fujino H, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Takeda M, Matsumoto N, Hashimoto H, *J. Hum. Genet.*, 61(3):199-206, 2016

5. De novo POGZ mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of POGZ. Matsumura K, Nakazawa T., Nagayasu K, Gotoda-Nishimura N, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Yamamori H, Yasuda Y, Hashimoto R, Hashimoto H, *J. Mol. Psychiatry*, 4:1, 2016

6. Prostaglandin D2 signaling mediated by the CRTH2 receptor is involved in MK-801-induced cognitive dysfunction. Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T., Kanoh T, Ago Y, Matsuda T, Hashimoto R, Ohi K, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Kasai A, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Takuma K, Ogawa A, Baba A, Hashimoto H, *Behav. Brain Res.*, 314:77-86, 2016

7. Double *In situ* Hybridization for MicroRNAs and mRNAs in Brain Tissues. Kasai A, Kakihara S, Miura H, Okada R, Hayata-Takano A, Hazama K, Niu M, Shintani N, Nakazawa T., Hashimoto H, *Front. Mol. Neurosci.*, 9:216, 2016

8. Phosphorylation of NMDA receptor GluN2B subunit at Tyr1472 is important for trigeminal processing of itch. Inoue A, Uchida H, Nakazawa T., Yamamoto T, Ito S, *Eur J. Neurosci.*, 44:2474-2482, 2016

9. Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury. Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura

N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S, *eNeuro*, 3:e0110-16, 2016

10. Critical involvement of the orbitofrontal cortex in hyperlocomotion induced by NMDA receptor blockade in mice. Seiriki K, Kasai A, Kuwaki T, Nakazawa T, Yamaguchi S, Hashimoto H, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 480(4):558-563, 2016

11. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, Akamatsu W, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R, *Schizophr. Res.*, 181:75-82, 2017

12. Effect of Clozapine on DNA Methylation in Peripheral Leukocytes from Patients with Treatment-Resistant Schizophrenia. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Watanabe S, Umehara H, Shimodera S, Nakazawa T, Kikuchi M, Nakaya A, Hashimoto H, Imoto I, Hashimoto R, Ohmori T, *Int. J. Mol. Sci.*, 18(3), pii:E632, 2017

#### 公募 A01 深田優子

1. Postsynaptic nanodomains generated by local palmitoylation cycles. Fukata M, Sekiya A, Murakami T, Yokoi N, Fukata Y, *Biochem Soc Trans*, 43:199-204, 2015 doi: 10.1042/ BST20140238

2. The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. Lovero KL, Fukata Y, Granger AJ, Fukata M, Nicoll RA., *Proc Natl Acad Sci USA*, 112:E4129-37, 2015 doi: 10.1073/pnas.1511910112

3. Local palmitoylation cycles and specialized membrane domain organization. Fukata Y, Murakami T, Yokoi N, Fukata M., *Curr Top Membr*, 77:97-141 ISSN 1063-5823, 2016

4. Dysfunctional ADAM22 implicated in progressive encephalopathy with cortical atrophy and epilepsy. Muona M, Fukata Y, Anttonen AK, Laari A, Palotie A, Pihko H, Lönnqvist T, Valanne L, Somer M, Fukata M, Lehesjoki AE., *Neurol Genet*, 2:e46, 2016

5. Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes. Yokoi N, Fukata Y, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata M. *J Neurosci*, 36:6431-6444, 2016 (†, co-first authors; †, cocorresponding authors), F1000 Prime recommended

6. The LGI1-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and synaptic disorders. Fukata Y, Yokoi N, Miyazaki Y, Fukata M., *Neurosci Res*, 116:39-45, 2017

7. Coupling of a voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel homolog with a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in yeast. Cho T, Ishii-Kato A, Fukata Y, Nakayama Y, Iida K, Fukata M, Iida H., *Genes Cells*, 22:94-104, 2017

8. Epilepsy and synaptic proteins. Fukata Y, Fukata M., *Curr Opin Neurobiol*, 45:1-8, 2017

#### 公募 A02 南 雅文

1. Corticotropin-releasing factor enhances inhibitory synaptic transmission to type III neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. Nagano Y, Kaneda K, Maruyama C, Ide S, Kato F, Minami M, *Neurosci. Lett.*, 600:56-61, 2015

2. Activation of adenylate cyclase-cyclic AMP-protein kinase A signaling by corticotropin-releasing factor within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis is involved in pain-induced aversion. Kaneko T, Kaneda K, Ohno A, Takahashi D, Hara T, Amano T, Ide S, Yoshioka M, Minami M, *Eur. J. Neurosci.*, 44:2914-2924, 2016

3. Activation of the NMDA receptor-neuronal nitric oxide synthase pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain. Deyama S, Sugano Y, Mori S, Amano T, Yoshioka M,

Kaneda K, Minami M, *Neuropharmacology*, 118:59-68, 2017

4. Suppressive effects of morphine injected into the ventral bed nucleus of the stria terminalis on the affective, but not sensory, component of pain in rats. Maruyama, C., Deyama, S., Nagano, Y., Ide, S., Kaneda, K., Yoshioka, M., Minami, M. *Eur. J. Neurosci.*, 47, 40-47 (2018)

公募 A02 森 寿

1. Decreased levels of free D-aspartic acid in the forebrain of serine racemase (Srr) knock-out mice. Horio M, Ishima T, Fujita Y, Inoue R, Mori H, Hashimoto K., *Neurochem. Int.*, 62: 843-847, 2013

2. Is D-Cycloserine a Prodrug for D-Serine in the Brain? Horio, M. Mori, H., Hashimoto, K., *Biol. Psychiatry.*, 73:e33-e34, 2013

3. In silico and pharmacological screenings identify novel serine racemase inhibitors. Mori, H., Wada, R., Li, J., Ishimoto, T., Mizuguchi, M., Obita, T., Gouda, H., Hirono, S., Toyooka, N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24:3732-5, 2014

4. FBXO22 is required for optimal synthesis of the NMDA receptor co-agonist D-serine. Dikopoltsev, E., Foltyn, V. N., Zehl, M., Jensen, O. N., Mori, H., Radzishevsky, I., Wolosker, H., *J. Biol. Chem.*, 289: 33904-33915, 2014

5. Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got111), a putative aspartate racemase? Tanaka-Hayashi, A., Hayashi, S., Inoue, R., Ito, T., Konno, K., Yoshida, T., Watanabe, M., Yoshimura, T., Mori, H., *Amino Acids*, 47: 79-86, 2015

6. Clinical and electrophysiological effects of D-serine in a schizophrenic patient positive for anti N-methyl-D-aspartate receptor antibodies. Heresco-Levy, U., Durrant, A. R., Ermilov, M., Javitt, D. C., Miya, K., Mori, H., *Biological Psychiatry*, 77:e27-e29, 2015

7. Neuromodulatory effect of Gas- or Gαq-coupled GPCR on NMDAR selectively activates the NMDAR/Ca<sup>2+</sup>/calcineurin/ CREB-regulated transcriptional coactivator 1 (CRTC1) pathway to effectively induce *Bdnf* expression in neurons. Fukuchi, M., Tabuchi, A., Kuwana, Y., Watanabe, S., Inoue, M., Takasaki, I., Izumi, H., Tanaka, A., Inoue, R., Mori, H., Komatsu, H., Takemori, H., Okuno, H., Bito, H., Tsuda, M., *J. Neurosci.*, 35:5606-5624, 2015

8. Mechanisms of splicing-dependent trans-synaptic adhesion by PTPδ-IL1RAPL1/IL-1RAcP for synaptic differentiation. Yamagata, A., Yoshida, T., Sato, Y., Goto-Ito, S., Uemura, T., Maeda, A., Shiroshima, T., Iwasawa-Okamoto, S., Mori, H., Mishina, M., Fukai, S., *Nature Communications*, 6:6926, 2015

9. In vivo imaging of CREB phosphorylation in awake-mouse brain. Ishimoto, T., Mano, H., Mori, H., *Sci. Rep.*, 5:9757, 2015

10. Nuclear compartmentalization of serine racemase regulates D-serine production: Implications for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. Kolodney, G., Dumin, E., Safory, H., Rosenberg, D., Mori, H., Radzishevsky, I., Wolosker, H., *J. Biol. Chem.*, 290:31037-50, 2015

11. Serine racemase is involved in D-aspartate biosynthesis. Ito, T., Hayashida, M., Kobayashi, S., Muto, N., Hayashi, A., Yoshimura, T., Mori, H., *J Biochem.*, 160:345-353, 2016

12. Endocytosis following dopamine D2 receptor activation is critical for neuronal activity and dendritic spine formation via Rabex-5/PDGFRβ signaling in striatopallidal medium spiny neurons. Shioda, N., Yabuki, Y., Wang, Y., Uchigashima, M., Hikida, T., Sasaoka, T., Mori, H., Watanabe, M., Sasahara, M., Fukunaga, K., *Molecular Psychiatry*, 22: 1205-1222, 2016.

13. Application of hairless mouse strain to bioluminescence imaging of Arc expression in mouse brain. Izumi, H.,

Ishimoto, T., Yamamoto, H., Mori H., *BMC Neuroscience.*, 18:18, 2017

14. Mice lacking BCAS1, a novel myelin-associated protein, display hypomyelination, schizophrenia-like abnormal behaviors, and up-regulation of inflammatory genes in the brain. Ishimoto, T., Ninomiya, K., Inoue, R., Koike, M., Uchiyama, Y., Mori, H., *GLIA*, 65:727-739, 2017

15. Glucocorticoid receptor-mediated amygdalar metaplasticity underlies adaptive modulation of fear memory by stress. Ran Inoue, Kareem Abdou, Ayumi Hayashi-Tanaka, Shin-ichi Muramatsu, Kaori Mino, Kaoru Inokuchi, and Hisashi Mori *eLife*, 2018, in press

公募 A02 戸田重誠

1. Repeated exposure of adult rats to transient oxidative stress induces various long-lasting alterations in cognitive and behavioral functions. Iguchi Y, Kosugi S, Nishikawa H, Lin Z, Minabe Y, Toda S., *PloS One*, 9:e114024, 2014

2. Pre-stress performance in an instrumental training predicts post-stress behavioral alterations in chronically stressed rats. Iguchi Y, Kosugi S, Lin Z, Nishikawa H, Minabe Y, Toda S., *Frontiers in Behave Neurosci*, 9:119, 2015

3. Reconsidering animal models of major depressive disorder in the elderly. Toda S., Iguchi Y, Ziqiao L, Nishikawa H, Nagasawa T, Watanabe H, Minabe Y, *Frontiers in Aging Neurosci*, 8, article 188, 1-6, 2016

公募 A02 小泉修一

1. Microglia release ATP by exocytosis. Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Kasai, H., Moriishi, K., Moriyama, Y., Koizumi, S., *Glia*, 61(8):1320-30, 2013

2. Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. Shinozaki, Y., Nomura, M., Iwatsuki, K., Moriyama, Y., Gachet, C., Koizumi, S., *Scientific Reports*, 4, 2014

3. Astrocyte-Mediated Ischemic Tolerance. Hirayama, Y., Ikeda- Matsuo, Y., Notomi, S., Enaida, H., Kinouchi, H., Koizumi, S., *Journal of Neuroscience*, 35(9):3794-3805, 2015

4. Muller cell-mediated neurite outgrowth of the retinal ganglion cells via P2Y6 receptor signals. Taguchi, M., Shinozaki, Y., Kashiwagi, K., Shigetomi, E., Robaye, B., Koizumi, S., *Journal of Neurochemistry*, 136(4): 741-751, 2016

5. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. Kim, S.K., Hayashi, H., Ishikawa, T., Shibata, K., Shigetomi, E., Shinozaki, Y., Inada, H., Roh, S.E., Kim, S.J., Lee, G., Bae, H., Moorhouse, A.J., Mikoshiba, K., Koizumi, S. and Nabekura, J., *J Clin Invest.*, 126(5):1983-1997, 2016

6. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, AW., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, AJ., Yoshimura, Y., Nabekura, J., *Nat Commun*, 7:12540, 2016

7. Hypoxia-independent mechanisms of HIF-1 $\alpha$  expression in astrocytes after ischemic preconditioning. Hirayama, Y., Koizumi, S., *Glia*, 65(3):523-530, 2017

8. Anti-depressant fluoxetine reveals its therapeutic effect via astrocytes. Kinoshita, M., Hirayama, Y., Fujishita, K., Shibata, K., Shinozaki, Y., Shigetomi, E., Takeda, A., Le, H.P.N., Hayashi, H., Hiasa, M., Moriyama, Y., Ikenaka, K., Tanaka, K.F. and \*Koizumi, S. *EBioMedicine*, in press.

公募 A02 櫻井 武

1. Roles of glial cells in schizophrenia: possible targets for therapeutic approaches. Takahashi, N., Sakurai, T., *Neurobiology of Disease*, 53:49-60, 2013

2. Converging models of schizophrenia – Network alterations of prefrontal cortex underlying cognitive impairments –

Sakurai, T., Gamo, N.J., Hikida, T., Kim, S-H., Murai, T., Tomoda, T., Sawa, A. *Progress in Neurobiology*, 134:178-201, 2015

3. Sequence of molecular events during maturation of developing mouse prefrontal cortex. Ueda, S., Niwa, M., Hioki, H., Sohn, J., Kaneko, T., Sawa, A., Sakurai, T., *Molecular Neuropsychiatry*, 1:94-104, 2015

4. Valley of death: A proposal to build a “translational bridge” for the next generation. Gamo, N.J., Birknow, M.R., Sullivan, D., Kondo, M.A., Horiuchi, Y., Sakurai, T., Slusher, S.B., Sawa, A., *Neuroscience Research*, 115:1-4, 2017

5. Ulk1 protects against ethanol-induced neuronal stress and cognitive deficits in object discrimination. Sumitomo, A., Ueta, K., Mauchi, S., Hirai, K., Horike, K., Hikida, T., Sakurai, T., Sawa, A., Tomoda, T., *Neuroscience Research*, 117:54-61, 2017

6. The roles of cell adhesion molecules in brain wiring and neuropsychiatric disorders. Sakurai, T., *Molecular and Cellular Neuroscience*, 81:4-11, 2017

7. Role of DISC1 in neuronal trafficking and its implication in neuropsychiatric manifestation and neurotherapeutics., Tomoda, T., Hikida, T., Sakurai, T., *Neurotherapeutics*, 14:623-629, 2017

8. Circuitry based human neuroanatomy for the next generation., in psychiatry and neuroscience., Sakurai, T., *Molecular Neuropsychiatry*, 3:92-96, 2017

9. Methylphenidate and guanfacine ameliorate ADHD-like phenotypes in Fez1- deficient mice. Akiko Sumitomo, Ayumi Saka, Keisho Ueta, Kouta Horike, Kazuko Hirao, Nao J. Gamo, Takatoshi Hikida, Keiichi I. Nakayama, Akira Sawa, **Takeshi Sakurai** and Toshifumi Tomoda. *Molecular Neuropsychiatry*, 3, 223-233, 2017

10. Ulk2 controls cortical excitatory-inhibitory balance via autophagic regulation of p62 and GABAA receptor trafficking in pyramidal neurons. Akiko Sumitomo, Hiroshi Yukiitake, Kazuko Hirai, Kouta Horike, Keisho Ueta, Youjin Chueng, Eiji Warabi, Toru Yanagawa, Shiho Kitaoka, Tomoyuki Furuyashiki, Shuh Naruiya, Tomoo Hirano, Minae Niwa, Etienne Sibille, Takatoshi Hikida, **Takeshi Sakurai**, Koko Ishizuka, Akira Sawa, and Toshifumi Tomoda. *Human Molecular Genetics*, in press

11. A mouse model of 22q11.2 deletions: molecular and behavioral signatures of Parkinson’s disease and schizophrenia. Akiko Sumitomo, Kota Horike, Kazuko Hirai, Nancy Butcher, Erik Boot, **Takeshi Sakurai**, Frederick C. Nucifora Jr, Anne S. Bassett, Akira Sawa and Toshifumi Tomoda. *Science Advances*, in press

#### 公募 A02 小林和人

1. Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra. Sano, H., Chiken, S., Hikida, T., Kobayashi, K., and Nambu, A., *J. Neurosci.*, 33(17):7583-7594, 2013

2. Highly efficient retrograde gene transfer into motor neurons by a lentiviral vector pseudotyped with fusion glycoprotein. Hirano, M., Kato, S., Kobayashi, K., Okada, T., Yaginuma, H., and Kobayashi, K. *PLoS One*, 8(9):e75896, 2013

3. Improved transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene transfer by optimizing the junction of fusion envelope glycoprotein. Kato, S., Kobayashi, K., and Kobayashi, K. *J. Neurosci. Methods*, 227:151-158, 2014

#### 公募 A02 國井泰人

1. Elevated postmortem striatal t-DARPP expression in schizophrenia and associations with DRD2/ANKK1 polymorphism. Kunii Y., Miura I, Matsumoto J, Hino M, Wada A, Niwa SI, Nawa H, Sakai M, Someya T, Takahashi H, Kakita A, Yabe H., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 53:123-8, 2014

2. Revisiting DARPP-32 in postmortem human brain: changes in schizophrenia and bipolar disorder and genetic associations with t-DARPP-32 expression. Kunii Y., Hyde TM, Ye T, Li C, Kolachana B, Dickinson D, Weinberger DR,

Kleinman JE, Lipska BK., *Mol Psychiatry.*, 19(2):192-9, 2014

5. CHRNA7 and CHRFAM7A mRNAs: Co-Localized and Their Expression Levels Altered in the Postmortem Dorsolateral Prefrontal Cortex in Major Psychiatric Disorders. Kunii Y, Zhang W, Xu Q, Hyde TM, McFadden W, Shin JH, Deep- Soboslay A, Ye T, Li C, Kleinman JE, Wang KH, Lipska BK. *Am J Psychiatry.*, 172(11):1122-30, 2015

6. Assessment of copy number variations in the brain genome of schizophrenia patients. Sakai M, Watanabe Y, Someya T, Araki K, Shibuya M, Niizato K, Oshima K, Kunii Y, Yabe H, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Hashimoto T, Hishimoto A, Kitamura N, Iritani S, Shirakawa O, Maeda K, Miyashita A, Niwa S, Takahashi H, Kakita A, Kuwano R, Nawa H., *Mol Cytogenet.*, 8:46, eCollection, 2015

7. Decreased VEGFR2 expression and increased phosphorylated Akt1 in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. Hino M, Kunii Y, Matsumoto J, Wada A, Nagaoka A, Niwa SI, Nawa H, Takahashi H, Kakita A, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Yabe H., *J Psychiatr Res.*, 82:100-108, 2016

8. Decreased calcineurin immunoreactivity in the postmortem brain of a patient with schizophrenia who had been prescribed the calcineurin inhibitor, tacrolimus, for leukemia. Wada A, Kunii Y, Matsumoto J, Hino M, Nagaoka A, Niwa SI, Yabe H., *Neuropsychiatr Dis Treat.*, 12:1645-1650, eCollection, 2016

9. Prominent increased calcineurin immunoreactivity in the superior temporal gyrus in schizophrenia: A postmortem study. Wada A, Kunii Y, Matsumoto J, Hino M, Yang Q, Niwa SI, Yabe H., *Psychiatry Res.*, 247:79-83, 2016

#### 公募 A02 田中謙二

1. Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. Miyazaki KW, Miyazaki K, Tanaka KF, Yamanaka A, Takahashi A, Tabuchi S, Doya K., *Current Biology*, 24(17):2033-2040, 2014

2. Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. Denny CA, Kheirbek MA, Alba EL, Tanaka KF, Brachman RA, Laughman KB, Tomm NK, Turi GF, Losonczy A, Hen R., *Neuron*, 83:189-201, 2014

3. In Vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca(2+) indicator. Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, Satoh K, Kitajima N, Yoshida K, Okubo Y, Sasaki T, Moritoh S, Hasuwa H, Mimura M, Horikawa K, Matsui K, Nagai T, Iino M, Tanaka KF, *Cell Rep*, 8:311-8, 2014

4. 5-HT1A Receptors on Mature Dentate Gyrus Granule Cells are Critical for the Antidepressant Response, Samuels BA, Anacker C, Hu A, Levinstein MR, Pickenhagen A, Tsetsenis T, Madroñal N, Donaldson ZR, Drew LJ, Dranovsky A, Gross CT, Tanaka KF, Hen R., *Nat Neurosci*, 18:1606-1616, 2015

5. Distinct Circuits Underlie the Effects of 5-HT1B Receptors on Aggression and Impulsivity. Nautiyal KM, Tanaka KF, Barr MM, Tritschler L, Le Dantec Y, David DJ, Gardier AM, Blanco C, Hen R, Ahmari SE., *Neuron*, 86:813-826, 2015

6. Optogenetic activation of CA1 pyramidal neurons at the dorsal and ventral hippocampus evokes distinct brain-wide responses revealed by mouse fMRI. Takata N, Yoshida K, Komaki Y, Xu M, Sakai Y, Hikishima K, Mimura M, Okano H, Tanaka KF, *PLoS One*, 10:e0121417, 2015

7. Ventrolateral striatal medium spiny neurons positively regulate food-incentive, goal-directed behavior independently of D1 and D2 selectivity. Natsubori A, Tsutsui-Kimura I, Nishida H, Bouchekioua Y, Sekiya H, Uchigashima M, Watanabe M, de Kerchove d'Exaerde A, Mimura M, Takata N, Tanaka KF, *J Neurosci.*, 37(10):2723-2733, 2017

8. Dysfunction of ventrolateral striatal dopamine receptor type 2-expressing medium spiny neurons impairs instrumental motivation. Tsutsui-Kimura I, Takiue H, Yoshida K, Xu M, Yano R, Ohta H, Nishida H, Bouchekioua Y, Okano H, Uchigashima M, Watanabe M, Takata N, Drew MR, Sano H, Mimura M, Tanaka KF, *Nat Communications*, 8:14304, 2017

公募 A02 宮川剛

1. The immature dentate gyrus represents a shared phenotype of mouse models of epilepsy and psychiatric disease. Shin R, Kobayashi K, Hagihara H, Kogan JH, Miyake S, Tajinda K, Walton NM, Gross AK, Heusner CL, Chen Q, Tamura K, Miyakawa T, Matsumoto M., *Bipolar Disorders*, 15(4):405-421, 2013
2. Immature dentate gyrus: an endophenotype of neuropsychiatric disorders. Hagihara H, Takao K, Walton NM, Matsumoto M, Miyakawa T., *Neural Plasticity*, 2013:318596, 2013
3. Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. Ageta-Ishihara N, Yamakado H, Morita T, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Takahashi R, \*Kinoshita M., *Molecular Brain*, 6:35, 2013
4. Chronic fluoxetine treatment reduces parvalbumin expression and perineuronal nets in gamma-aminobutyric acidergic interneurons of the frontal cortex in adult mice. Ohira K, Takeuchi R, Iwanaga T, Miyakawa T., *Molecular Brain*, 6:43, 2013
5. Transcriptomic evidence for immaturity of the prefrontal cortex in patients with schizophrenia. Hagihara H, Ohira K, Takao K, Miyakawa T., *Molecular Brain*, 7:41, 2014
6. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. Takao K, Miyakawa T., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(4):1167-1172, 2015
7. Reply to Warren et al. and Shay et al.: Commonalities across species do exist and are potentially important. Takao K, Hagihara H, Miyakawa T., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(4):E347-348, 2015
8. Combined behavioral studies and in vivo imaging of inflammatory response and expression of mGlu5 receptors in schnurri-2 knockout mice. Choi JK, Zhu A, Jenkins BG, Hattori S, Kil KE, Takagi T, Ishii S, Miyakawa T, Brownell AL. *Neuroscience Letter*, 609:159-164, 2015
9. A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold facilitates glutamate clearance. Ageta-Ishihara N, Yamazaki M, Konno K, Nakayama H, Abe M, Hashimoto K, Nishioka T, Kaibuchi K, Hattori S, Miyakawa T, Tanaka K, Huda F, Hirai H, Hashimoto K, Watanabe M, Sakimura K, Kinoshita M., *Nature Communications*, 6:10090, 2015
10. Circadian Gene Circuitry Predicts Hyperactive Behavior in a Mood Disorder Mouse Model. Hagihara H, Horikawa T, Nakamura HK, Umemori J, Shoji H, Kamitani Y, Miyakawa T., *Cell Reports*, 14(12):2784-96, 2016
11. CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. Katayama Y, Nishiyama M, Shoji H, Ohkawa Y, Kawamura A, Sato T, Suyama M, Takumi T, Miyakawa T, Nakayama KI., *Nature*, 537:675-679, 2016
12. Transcriptomic immaturity of the hippocampus and prefrontal cortex in patients with alcoholism. Murano T, Koshimizu H, Hagihara H, Miyakawa T., *Scientific Reports*, 7:44531
13. Decreased brain pH as a shared endophenotype of psychiatric disorders. Hagihara H, Catts VS, Katayama Y, Shoji H, Takagi T, Huang FL, Nakao A, Mori Y, Huang KP, Ishii S, Graef IA, Nakayama KI, Shannon Weickert C, Miyakawa T. *Neuropsychopharmacology*, [Epub ahead of print], 2017
14. Decreased brain pH as a shared endophenotype of psychiatric disorders. Hagihara H, Catts VS, Katayama Y, Shoji H, Takagi T, Huang FL, Nakao A, Mori Y, Huang KP, Ishii S, Graef IA, Nakayama KI, Shannon Weickert C, \*Miyakawa T. *Neuropsychopharmacology*. 43, 459-468. 2018.
15. Immature morphological properties in subcellular-scale structures in the dentate gyrus of Schnurri-2 knockout mice: a model for schizophrenia and intellectual disability. Nakao A, Miyazaki N, Ohira K, Hagihara H, Takagi T, Usuda N, Ishii S, Murata K, \*Miyakawa T. *Molecular Brain*. 10(1):60. 2017.

公募 A02 佐藤正晃

1. Generation and imaging of transgenic mice that express G-CaMP7 under a tetracycline response element. Sato M, Kawano M, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Nakai J, Hayashi Y, *PLoS ONE*, 10(5):e0125354, 2015
2. Hippocampus-dependent goal localization by head-fixed mice in virtual reality, Sato M, Kawano M, Mizuta K, Islam T, Lee MG, Hayashi Y, *eNeuro*, 4(3):e0369-16.2017, 2017

公募 A02 Thomas McHugh

1. Noradrenergic modulation of dopamine release and pH shift in the mouse dorsal hippocampus and ventral striatum. Weitemier AZ and McHugh TJ. *Brain Research*, 1657:74-86, 2016.
2. Silencing CA3 disrupts temporal coding in the CA1 Ensemble. Middleton SJ and McHugh TJ. *Nature Neuroscience*, 19: 945-951, 2016
3. Top-Down Cortical Input during NREM Sleep Consolidates Perceptual Memory. Miyamoto D, Hirai D, Fung CCA, Inutsuka A, Odagawa M, Suzuki T, Boehringer R, Adaikkan C, Matsubara C, Matsuki N, Fukai T, McHugh TJ, Yamanaka A, Murayama M. *Science*, 352:1315-1318, 2016
4. CA3 synaptic silencing attenuates kainic acid induced seizures and hippocampal network oscillations. Yu LMY, Polygalov D, Wintzer ME, Chiang MC, McHugh TJ. *eNeuro*, 3, 2016
5. A video based feedback system for control of an active commutator during behavioral physiology. Roh M, McHugh TJ, Lee K. *Molecular Brain*, 8:61, 2015
6. Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. Tsuneoka Y, Tokita K, Yoshihara C, Amano T, Esposito G, Huang AJ, Yu LM, Odaka Y, Shinozuka K, McHugh TJ, Kuroda KO. *EMBO J*, 34:2652-70, 2015
7. Inhibiting the Activity of CA1 Hippocampal Neurons Prevents the Recall of Contextual Fear Memory in Inducible ArchT Transgenic Mice. Sakaguchi M, Kim K, Yu LM, Hashikawa Y, Sekine Y, Okumura Y, Kawano M, Hayashi M, Kumar D, Boyden ES, McHugh TJ, Hayashi Y. *PLoS One*, 10:e0130
8. A role for CA3 in social recognition memory. Chiang MC, Huang AJY, Wintzer ME, Ohshima T, McHugh TJ. *Behav Brain Res.* in press

公募 A02 池田和隆

1. Involvement of cholinergic system in hyperactivity in dopaminedeficient mice. Hagino Y, Kasai S, Fujita M, Setogawa S, Yamaura H, Yanagihara D, Hashimoto M, Kobayashi K, Meltzer HY, Ikeda K, *Neuropsychopharmacology*, 40:1141-1150, 2015
2. Improvement of learning and increase in dopamine level in the frontal cortex by methylphenidate in mice lacking dopamine transporter. Takamatsu Y, Hagino Y, Sato A, Takahashi T, Nagasawa SY, Kubo Y, Mizuguchi M, Uhl GR, Sora I, Ikeda K, *Curr Mol Med*, 15:245-252, 2015
3. Distinct roles of opioid and dopamine systems in lateral hypothalamic intracranial self-stimulation. Ide S, Takahashi T, Takamatsu Y, Uhl G, Niki H, Sora I, Ikeda K, *Int J Neuropsychopharmacol*, 20:403-409,2017
4. Light/dark phase-dependent spontaneous activity is maintained in dopamine-deficient mice.Fujita M, Hagino Y, Takeda T, Kasai S, Tanaka M, Takamatsu Y, Kobayashi K, Ikeda K (2017) *Mol Brain* 10(1):49.
5. Genome-wide scan identifies candidate loci related to remifentanil requirements during laparoscopic-assisted colectomy.Nishizawa D, Mieda T, Tsujita M, Nakagawa H, Yamaguchi S, Kasai S, Hasegawa J, Fukuda K, Kitamura A, Hayashida M, Ikeda K (2018) *Pharmacogenomics* 19(2):113-127.



6. Genome-wide association study identifies polymorphisms associated with the analgesic effect of fentanyl in the preoperative cold pressor-induced pain test. Takahashi K, Nishizawa D, Kasai S, Koukita Y, Fukuda K, Ichinohe T, \*Ikeda K (2018) *J Pharmacol Sci* 136(3):107-113.
7. A randomized controlled study of the effect of ifenprodil on alcohol use in patients with alcohol dependence. Sugaya N, Ogai Y, Aikawa Y, Yumoto Y, Takahama M, Tanaka M, Haraguchi A, Umeno M, \*Ikeda K (2018) *Neuropsychopharmacology Rep* 38:9-17.
8. Opioid and non-dopamine reward circuitry and state-dependent mechanisms. Fujita M, Ide S, \*Ikeda K. *Ann NY Acad Sci* in press.
9. Association between the rs7583431 single-nucleotide polymorphism close to the activating transcription factor 2 (ATF2) gene and the analgesic effect of fentanyl in the cold pain test. Aoki Y, Nishizawa D, Yoshida K, Hasegawa J, Kasai S, Takahashi K, Koukita Y, Ichinohe T, Hayashida M, Fukuda K, \*Ikeda K. *Neuropsychopharmacology Rep* in press.
10. Association between rs2275913 single-nucleotide polymorphism of the interleukin-17A gene and perioperative analgesic use in cosmetic orthognathic surgery. Ohka S, Nishizawa D, Hasegawa J, Takahashi K, Nakayama K, Ebata Y, Fukuda K, \*Ikeda K. *Neuropsychopharmacology Rep* in press.
11. Reward-enhancing effect of methylphenidate is abolished in dopamine transporter knockout mice: a model of attention deficit/hyperactivity disorder. Ide S, Ikekubo Y, Hua J, Takamatsu Y, Uhl GR, Sora I, \*Ikeda K. *Neuropsychopharmacology Rep* in press.

公募 A02 久保健一郎

1. Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin  $\alpha 5\beta 1$ . Katsutoshi Sekine, Takeshi Kawauchi, Ken-ichiro Kubo, Takao Honda, Joachim Herz, Mitsuharu Hattori, Tatsuo Kinashi, and Kazunori Nakajima., *Neuron*, 76(2):353-369, 2012
2. Dab1-mediated colocalization of multi-adaptor protein CIN85 with Reelin receptors, ApoER2 and VLDLR, in neurons. Takahiro Fuchigami, Yutaka Sato, Yuya Tomita, Tetsuya Takano, Shin-ya Miyauchi, Yukinori Tsuchiya, Taro Saito, Ken-ichiro Kubo, Kazunori Nakajima, Mitsunori Fukuda, Mitsuharu Hattori, and Shin-ichi Hisanaga. *Genes to Cells*, 18(5):410-424, 2013
3. Hippocampal pyramidal neurons switch from a multipolar migration mode to a novel “climbing” migration mode during development. Ayako Kitazawa<sup>a</sup>, Ken-ichiro Kubo<sup>a</sup>, Kanehiro Hayashi<sup>a</sup>, Yuki Matsunaga, Kazuhiro Ishii, and Kazunori Nakajima., (A. Kitazawa<sup>a</sup>, K. Kubo<sup>a</sup>, and K. Hayashi<sup>a</sup> are cofirst authors), *J. Neurosci.*, 34(4):1115-1126, 2014
4. Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are expressed in distinct spatio-temporal patterns in developing mouse cerebral cortex. Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, Kei-ichi Katayama, Takao Honda, Takahiro, Fujino, Tokuo T. Yamamoto, and Kazunori Nakajima. *J. Comp. Neurol.*, 523(3):463-478, 2015
5. How does Reelin control neuronal migration and layer formation in the developing mammalian neocortex?. Katsutoshi Sekine, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima., *Neurosci. Res.*, 86(September):50-58, 2014
6. Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis. Takao Kohno<sup>a</sup>, Takao Honda<sup>a</sup>, Ken-ichiro Kubo<sup>a</sup>, Yoshimi Nakano, Ayaka Tsuchiya, Tatsuro Murakami, Hideyuki Banno, Kazunori Nakajima, and Mitsuharu Hattori., (T. Kohno<sup>a</sup>, T. Honda<sup>a</sup>, and K. Kubo<sup>a</sup> are co-first authors), *J. Neurosci.*, 35(11):4776-4787, 2015
7. Reelin has a preventive effect on phencyclidine-induced cognitive and sensory-motor gating deficits. Kazuhiro Ishii, Taku Nagai, Yuki Hirota, Mariko Noda, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada, Ken-ichiro Kubo<sup>a</sup>, and Kazunori Nakajima., (K. Kubo<sup>a</sup>, and K. Nakajima<sup>a</sup> are corresponding authors), *Neurosci. Res.*, 96:30-36, 2015

8. Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, Ayako Kitazawa, and Kazunori Nakajima., *Front. Neurosci.*, 9, Article 135, 2015
9. The COUP-TFII/Neuropilin-2 is a molecular switch steering diencephalon-derived GABAergic neurons in the developing mouse brain. Shigeaki Kanatani, Takao Honda, Michihiko Aramaki, Kanehiro Hayashi, Ken-ichiro Kubo, Mami Ishida, Daisuke H. Tanaka, Takeshi Kawauchi, Katsutoshi Sekine, Sayaka Kusuzawa, Takahiko Kawasaki, Tatsumi Hirata, Hidenori Tabata, Per Uhlén, and Kazunori Nakajima., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(36):E4985-94, 2015
10. Neuronal heterotopias affect the activities of distant brain areas and lead to behavioral deficits. Kazuhiro Ishii, Ken-ichiro Kubo, Toshihiro Endo, Keitaro Yoshida, Seico Benner, Yukiko Ito, Hidenori Aizawa, Michihiko Aramaki, Akihiro Yamanaka, Kohichi Tanaka, Norio Takata, Kenji F. Tanaka, Masaru Mimura, Chiharu Tohyama, Masaki Kakeyama, and Kazunori Nakajima., (K. Ishii and K. Kubo are co-first authors) *J. Neurosci.*, 35(36):12432-12445, 2015
11. Developmental origin of abnormal dendritic growth in the mice brain induced by disruption of AhR signaling in utero. Eiki Kimura, Ken-ichiro Kubo, Chieri Matsuyoshi, Seico Benner, Mayuko Hosokawa, Toshihiro Endo, Ling Wenting, Kazuhito Yokoyama, Kazunori Nakajima, Masaki Kakeyama, Chiharu Tohyama., *Neurotoxicol Teratol.*, 52 (Pt A):42-50, 2015
12. In utero bisphenol A exposure induces abnormal neuronal migration in the cerebral cortex of mice. Wenting Ling, Toshihiro Endo, Ken-ichiro Kubo, Masaki Kakeyama, Kazunori Nakajima, and Chiharu Tohyama., *Front. Endocrinol.*, 7, Article 7, 2016
13. SUMOylation of DISC1: a potential role in neural progenitor proliferation in the developing cortex. Stephanie Tankou, Kazuhiro Ishii, Christina Elliott, Krishna C. Yalla, Jon P. Day, Keiko Furukori, Ken-ichiro Kubo, Nicholas J. Brandon, Qiyi Tang, Gary Hayward, Kazunori Nakajima, Miles D. Houslay, Atsushi Kamiya, George Baillie, Koko Ishizuka, and Akira Sawa., *Mol. Neuropsychiatry*, 2(1):20-27, 2016
14. DISC1 a key molecular lead in psychiatry and neurodevelopment: No-More Disrupted-in-Schizophrenia. Minae Niwa, Tyler Cash-Padgett, Ken-ichiro Kubo, Atsushi Saito, Kazuhiro Ishii, Akiko Sumitomo, Yu Taniguchi, Koko Ishizuka, Hanna Jaaro-Peled, Toshifumi Tomoda, Kazunori Nakajima, Akira Sawa, and Atsushi Kamiya., *Mol. Psychiatry*, 21(11):1488-1489, 2016
15. Excessive activation of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse. Eiki Kimura, Ken-ichiro Kubo, Toshihiro Endo, Kazunori Nakajima, Masaki Kakeyama, and Chiharu Tohyama., *J. Toxicol. Sci.*, 42(1):25-30, 2017
16. Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. Yuki Matsunaga, Mariko Noda, Hideki Murakawa, Kanehiro Hayashi, Arata Nagasaka, Seika Inoue, Takaki Miyata, Takashi Miura, Kenichiro Kubo, and Kazunori Nakajima., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 21;114(8):2048-2053, 2017
17. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. Ken-ichiro Kubo, Kimiko Deguchi, Taku Nagai, Yukiko Ito, Keitaro Yoshida, Toshihiro Endo, Seico Benner, Wei Shan, Ayako Kitazawa, Michihiko Aramaki, Kazuhiro Ishii, Minkyung Shin, Yuki Matsunaga, Kanehiro Hayashi, Masaki Kakeyama, Chiharu Tohyama, Kenji F. Tanaka, Kohichi Tanaka, Sachio Takashima, Masahiro Nakayama, Masayuki Itoh, Yukio Hirata, Barbara Antalffy, Dawna D. Armstrong, Kiyofumi Yamada, Ken Inoue, and Kazunori Nakajima., *JCI Insight*, 2(10):e88609, 2017
18. ApoER2 controls not only neuronal migration in the intermediate zone, but also termination of migration in the developing cerebral cortex. Yuki Hirota, Ken-ichiro Kubo, Takahiro Fujino, Tokuo T. Yamamoto, and Kazunori Nakajima., *Cereb. Cortex*, in press, 2017

公募 A02 橋本 均

1. Anxiolytic-like effects of restraint during the dark cycle in adolescent mice. Ota Y, Ago Y, Tanaka T, Hasebe S, Toratani

Y, Onaka Y, [Hashimoto H](#), Takuma K, Matsuda T, *Behav. Brain Res.*, 284:103-111, 2015

2. CRTH2, a prostaglandin D2 receptor, mediates depression-related behavior in mice. Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T, Haba R, Ago Y, Wang H, Kanoh T, Hayata-Takano A, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Hashimoto R, Matsuda T, Waschek JA, Kasai A, Nagayasu K, Baba A, [Hashimoto H](#), *Behav. Brain Res.*, 284:131-137, 2015

3. The Female Encounter Test: A Novel Method for Evaluating Reward-Seeking Behavior or Motivation in Mice. Ago Y, Hasebe S, Nishiyama S, Oka S, Onaka Y, [Hashimoto H](#), Takuma K, Matsuda T, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 18(11):pyv062, 2015

4. Reductions in synaptic proteins and selective alteration of prepulse inhibition in male C57BL/6 mice after postnatal administration of a VIP receptor (VIPR2) agonist. Ago Y, Condro MC, Tan YV, Ghiani CA, Colwell CS, Cushman JD, Fanselow MS, [Hashimoto H](#), Waschek JA, *Psychopharmacology(Berl)*, 232(12):2181-2189, 2015

5. p13 overexpression in pancreatic  $\beta$ -cells ameliorates type 2 diabetes in high-fat-fed mice. Higashi S, Katagi K, Shintani N, Ikeda K, Sugimoto Y, Tsuchiya S, Inoue N, Tanaka S, Koumoto M, Kasai A, Nakazawa T, Hayata-Takano A, Hamagami K, Tomimoto S, Yoshida T, Ohkubo T, Nagayasu K, Ago Y, Onaka Y, Hashimoto R, Ichikawa A, Baba A, [Hashimoto H](#), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 461(4):612-617, 2015

6. Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model. Hara Y, Takuma K, Takano E, Katashiba K, Taruta A, Higashino K, [Hashimoto H](#), Ago Y, Matsuda T, *Behav. Brain Res.*, 289:39-47, 2015

7. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Is Upregulated in Murine Skin Inflammation and Mediates Transient Receptor Potential Vanilloid-1-Induced Neurogenic Edema. Helyes Z, Kun J, Dobrosi N, Sándor K, Németh J, Perkecz A, Pintér E, Szabadi K, Gaszner B, Tékus V, Szolcsányi J, Steinhoff M, [Hashimoto H](#), Reglődi D, Bíró T, *J. Invest. Dermatol.*, 135(9):2209-2218, 2015

8. Decreased expression of hippocampal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger isoform-1 by pentylentetrazole kindling in mice. Kawanai T, Taruta A, Inoue A, Watanabe R, Ago Y, [Hashimoto H](#), Hasebe S, Ooi Y, Takuma K, Matsuda T, *Epilepsy Res.*, 115:109-112, 2015

9. Pharmacological profile of encounter-induced hyperactivity in isolation-reared mice. Hasebe S, Ago Y, Nishiyama S, Oka S, [Hashimoto H](#), Takuma K, Matsuda T, *Behav. Pharmacol.*, 26:681-690, 2015

10. Structured line illumination Raman microscopy. Watanabe K, Palonpon AF, Smith NI, Chiu LD, Kasai A, [Hashimoto H](#), Kawata S, Fujita K, *Nat. Commun.*, 6:10095, 2016

11. High-Fat Diet Augments VPAC1 Receptor-Mediated PACAP Action on the Liver, Inducing LAR Expression and Insulin Resistance. Nakata M, Zhang B, Yang Y, Okada T, Shintani N, [Hashimoto H](#), Yada T, *J. Diabetes. Res.*, 2016:9321395, 2016

12. Rivastigmine improves isolation rearing-induced prepulse inhibition deficits via muscarinic acetylcholine receptors in mice. Higashino K, Ago Y, Umeki T, Hasebe S, Onaka Y, [Hashimoto H](#), Takuma K, Matsuda T, *Psychopharmacology(Berl)*, 233(3):521-528, 2016

13. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Nakazawa T, Hashimoto R, Sakoori K, Sugaya Y, Tanimura A, Hashimoto Y, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Umeda-Yano S, Kiyama Y, Konno K, Inoue T, Yokoyama K, Inoue T, Numata S, Ohnuma T, Iwata N, Ozaki N, [Hashimoto H](#), Watanabe M, Manabe T, Yamamoto T, Takeda M, Kano M, *Nat. Commun.*, 7:10594, 2016

14. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) contributes to the proliferation of hematopoietic progenitor cells in murine bone marrow via PACAP-specific receptor. Xu Z, Ohtaki H, Watanabe J, Miyamoto K, Murai N, Sasaki S, Matsumoto M, [Hashimoto H](#), Hiraizumi Y, Numazawa, Shioda S, *Sci. Rep.*, 6:22373, 2016

15. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Is Involved in Adult Mouse Hippocampal Neurogenesis After Stroke. Matsumoto M, Nakamachi T, Watanabe J, Sugiyama K, Ohtaki H, Murai N, Sasaki S, Xu Z, [Hashimoto H](#), Seki T, Miyazaki A, Shioda S, *J. Mol. Neurosci.*, 59(2):270-279, 2016
16. Whole-exome sequencing and neurite outgrowth analysis in autism spectrum disorder. \*Hashimoto R, Nakazawa T, Tsurusaki Y, Yasuda Y, Nagayasu K, Matsumura K, Kawashima H, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Umeda-Yano S, Fukunaga M, Fujino H, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Takeda M, Matsumoto N, [Hashimoto H](#), *J. Hum. Genet.*, 61(3):199-206, 2016
17. De novo POGZ mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of POGZ. Matsumura K, Nakazawa T, Nagayasu K, Gotoda-Nishimura N, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Yamamori H, Yasuda Y, Hashimoto R, [Hashimoto H](#), *J. Mol. Psychiatry*, 4:1, 2016
18. PACAP suppresses dry eye signs by stimulating tear secretion. Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, Yofu S, Kagami N, [Hashimoto H](#), Shintani N, Baba A, Mark L, Lanekoff I, Kiss P, Farkas J, Reglodi D, Shioda S, *Nat. Commun.*, 7:12034, 2016
19. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. Kormos V, Gáspár L, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Balogh A, [Hashimoto H](#), Reglódi D, Helyes Z, Gaszner B, *Neuroscience*, 330:335-358, 2016
20. Involvement of GABAA receptors in 5-HT1A and  $\sigma$ 1 receptor synergism on prefrontal dopaminergic transmission under circulating neurosteroid deficiency. Ago Y, Hasebe S, Hiramatsu N, Mori K, Watabe Y, Onaka Y, [Hashimoto H](#), Takuma K, Matsuda T, *Psychopharmacology(Berl)*, 33(17):3125-3134, 2016
21. Improvement by methylphenidate and atomoxetine of social interaction deficits and recognition memory impairment in a mouse model of valproic acid-induced autism. Hara Y, Ago Y, Taruta A, Katashiba K, Hasebe S, Takano E, Onaka Y, [Hashimoto H](#), Matsuda T, Takuma K, *Autism Res.*, 9(9):926- 939, 2016
22. Prenatal Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Affects Gene Expression of Autism-Related Molecules and Delays Neuronal Maturation. Kawanai T, Ago Y, Watanabe R, Inoue A, Taruta A, Onaka Y, Hasebe S, [Hashimoto H](#), Matsuda T, Takuma K, *Neurochem. Res.*, 41(10):2574-2584, 2016
23. Prostaglandin D2 signaling mediated by the CRTH2 receptor is involved in MK-801-induced cognitive dysfunction. Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T, Kanoh T, Ago Y, Matsuda T, Hashimoto R, Ohi K, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Kasai A, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Takuma K, Ogawa A, Baba A, [Hashimoto H](#), *Behav. Brain. Res.*, 314:77-86, 2016
24. PACAP Protects the Adolescent and Adult Mice Brain from Ethanol Toxicity and Modulates Distinct Sets of Genes Regulating Similar Networks. Lacaille H, Duterte-Boucher D, Vaudry H, Zerdoumi Y, Flaman JM, [Hashimoto H](#), Vaudry D, *Mol. Neurobiol.*, *Epub ahead of print*, 2016
25. Double *In situ* Hybridization for MicroRNAs and mRNAs in Brain Tissues. Kasai A, Kakihara S, Miura H, Okada R, Hayata-Takano A, Hazama K, Niu M, Shintani N, Nakazawa T, [Hashimoto H](#), *Front. Mol. Neurosci.*, 9:216, 2016
26. Critical involvement of the orbitofrontal cortex in hyperlocomotion induced by NMDA receptor blockade in mice. Seiriki K, Kasai A, Kuwaki T, Nakazawa T, Yamaguchi S, [Hashimoto H](#), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 480(4):558-563, 2016
27. Role of prefrontal serotonergic and dopaminergic systems in encounter-induced hyperactivity in methamphetaminesensitized mice. Tanaka T, Ago Y, Umehara C, Imoto E, Hasebe S, [Hashimoto H](#), Takuma K, Matsuda T, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, pii:pyw115, 2016
28. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from

monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, Akamatsu W, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R, *Schizophr. Res.*, 181: 75-82, 2017

29. Effect of Clozapine on DNA Methylation in Peripheral Leukocytes from Patients with Treatment-Resistant Schizophrenia. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Watanabe S, Umehara H, Shimodera S, Nakazawa T, Kikuchi M, Nakaya A, Hashimoto H, Imoto I, Hashimoto R, Ohmori T, *Int. J. Mol. Sci.*, 18(3), pii:E632, 2017

30. Early Neurobehavioral Development of Mice Lacking Endogenous PACAP. Farkas J, Sandor B, Tamas A, Kiss P, Hashimoto H, Nagy AD, Fulop BD, Juhasz T, Manavalan S, Reglodi D, *J. Mol. Neurosci.*, 61(4):468-478, 2017

31. Decreased cohesion in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior. Fujita Y, Masuda K, Bando M, Nakato R, Katou Y, Tanaka T, Nakayama M, Takao K, Miyakawa T, Tanaka T, Ago Y, Hashimoto H, Shirahige K, Yamashita T, *J. Exp. Med.*, in press

32. High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates. Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue K, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Waschek JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H, *Neuron*, 94: 1085-1100, 2017

#### 公募 A02 和氣弘明

1. Non-synaptic junctions on myelinating glia promote preferential myelination of electrically-active axons. Wake H, Ortiz FC, Woo DH, Lee PR, Angulo MC, Fields RD., *Nature Commun*, 6:7844, 2015

2. Microglial Contact Prevents Excess Depolarization and Rescues Neurons from Excitotoxicity. Kato G, Inada H, Wake H, Akiyoshi R, Miyamoto A, Eto K, Ishikawa T, Moorhouse AJ, Strassman A, Nabekura J., *eNeuro* 3(3). pii: ENEURO.0004-16, 2016

3. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J., *Nature Commun*, 7:12540, 2016

#### 公募 A02 星野幹雄

1. Classic cadherin expressions balance postnatal neuronal positioning and dendrite dynamics to elaborate the specific cytoarchitecture of the mouse cortical area. Egusa SF, Inoue YU, Asami J, Terakawa YW, Hoshino M, Inoue T, *Neurosci Res*, 105:49-64, 2015

2. Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T, Uezumi A, Mikami N, Nakamura M, Sato T, Ikawa M, Hoshino M, Tsuchida K, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S, *Cell Rep*, 13 (2): 302-301, 2015

3. TTBK2 with EB1/3 regulates microtubule dynamics in migrating cells through KIF2A phosphorylation. Watanabe T, Kakeno M, Matsui T, Sugiyama I, Arimura N, Matsuzawa K, Shirahige A, Ishidate F, Nishioka T, Taya S, Hoshino M, Kaibuchi K, *J Cell Biol*, 210 (5): 737-751, 2015

4. Exogenous Sonic Hedgehog modulates the pool of GABAergic interneurons during cerebellar development. De Luca A, Parmigiani E, Tosatto G, Martire S, Hoshino M, Buffo A, Leto K, Rossi F, *Cerebellum*, 14 (2): 72-85, 2015

5. The retrotrapezoid nucleus neurons expressing Atoh1 and Phox2b are essential for the respiratory response to CO<sub>2</sub>. Ruffault P-L, D'Autreaux F, Hayes JA, Nomaksteinsky M, Autran S, Fujiyama T, Hoshino M, Hagglund M, Kiehn O, Brunet J-F, Fortin G, Goridis C, *eLife*, 10.7554, 2015

6. Heterozygous disruption of Autism susceptibility candidate 2 causes impaired emotional control and cognitive memory. Horii K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Yamada K, Hoshino M, *PLoS One*, 10(12):e0145979, 2015

7. Origins of oligodendrocytes in the cerebellum, whose development is controlled by the transcription factor, Sox9. Hashimoto R, Horii K, Owa T, Miyashita S, Dewa K, Masuyama N, Sakai K, Hayase Y, Seto Y, Inoue YU, Inoue T, Ichinohe N, Kawaguchi Y, Akiyama H, Koizumi S, Hoshino M, *Mech Dev*, 140:25-40, 2016

#### 公募 A02 中山敬一

1. CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. Katayama Y, Nishiyama M, Shoji H, Ohkawa Y, Kawamura A, Sato T, Suyama M, Takumi T, Miyakawa T, Nakayama KI, *Nature*, 537(7622):675-679, 2016

2. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide. Matsumoto A, Pasut A, Matsumoto M, Yamashita R, Fung J, Monteleone E, Saghatelian A, Nakayama KI, Clohessy JG, Pandolfi PP., *Nature*, 541(7636):228-232, 2017

3. A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K, Goshima N, Mori M, Kawamura Y, Ogawa K, Fukuda E, Nakatsumi H, Natsume T, Fukui K, Horimoto K, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakayama KI, *Nature Methods*, 14(3):251-258, 2017

4. Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. Yachie N, Robotic Biology Consortium (incl. Nakayama KI), Natsume T. *Nature Biotechnology*, 35(4):310-312, 2017

5. Essential role of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis in maintenance of hematopoietic stem cells. Muto, Y., Nishiyama, M., Nita, A., Moroishi, T., Nakayama, KI, *Nature Communications*, in press, 2017

#### 公募 A03 奥野浩行

1. Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. Kawashima, T., Kitamura, K., Suzuki, K., Nonaka, M., Kamijyo, S., Takemoto-Kimura, S., Kano, M., Okuno, H., Ohki, K., Bito, H., *Nat Methods*, 10:889-895, 2013

2. Region-specific activation of CRF1-CREB signaling mediates long-term fear memory. Nonaka, M., Kim, R., Fukushima, H., Sasaki, K., Suzuki, K., Okamura, M., Ishii, Y., Kawashima, T., Kamijyo, S., Takemoto-Kimura, S., Okuno, H., Kida, S., Bito, H., *Neuron*, 84:92-106, 2014

3. A new era for functional labeling of neurons: activity-dependent promoters have come of age. Kawashima, T., Okuno, H., Bito, H. *Front. Neural Circuits*, 8:37, 2014

4. Whole-brain mapping of behaviourally induced neural activation in mice. Vousden, DA., Epp, J., Okuno, H., Nieman, BJ., van Eede, M., Dazai, J., Ragan, T., Bito, H., Frankland, PW., Lerch, JP., Henkelman, RM., *Brain Struct. Funct.*, 220:2043-2057, 2015

5. Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno, H., *Front. Mol. Neurosci.*, 8, Article 78, 2016

#### 公募 A03 山田清文

1. Roles of matrix metalloproteinases and their targets in epileptogenesis and seizures. Mizoguchi H, Yamada K. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, 11:45-52, 2013

2. Animal models of schizophrenia for molecular and pharmacological intervention and potential candidate molecules. Mouri A, Nagai T, Ibi D, Yamada K. *Neurobiol. Dis.*, 53:61-74, 2013

3. Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. Ibi D, Nagai T, Nakajima A, Mizoguchi H, Kawase T, Tsuboi D, Kano S, Sato Y, Hayakawa M, Lange UC, Adams DJ, Surani MA, Satoh

- T, Sawa A, Kaibuchi K, Nabeshima T, Yamada K., *Glia*, 61:679-693, 2013
4. Neuronal Per Arnt Sim (PAS) domain protein 4 (Npas4) regulates neurite outgrowth and phosphorylation of synapsin I. Yun J, Nagai T, Furukawa-Hibi Y, Kuroda K, Kaibuchi K, Greenberg ME, Yamada K., *J. Biol. Chem.*, 288:2655-2664, 2013
5. Anti-dementia activity of nobiletin, a citrus flavonoid. Nakajima A, Ohizumi Y, Yamada K., *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, 12:75-82, 2014
6. Induction of interferone-induced transmembrane protein 3 gene expression by lipopolysaccharide in astrocytes. Nakajima A, Ibi D, Nagai T, Yamada S, Nabeshima T, Yamada K., *Eur. J. Pharmacol.*, 745: 166-175, 2014
7. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. Nakai T, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Asai N, Enomoto A, Asai M, Yamada S, Saifullah MAB, Sokabe M, Takahashi M, Yamada K., *J. Neurosci.*, 34:14995-15008, 2014
8. Alterations of GABAergic and dopaminergic system in mutant mice with disruption of exons 2 and 3 of the Disc1 gene. Nakai T, Nagai T, Wang R, Yamada S, Kuroda K, Kaibuchi K, Yamada K., *Neurochem. Int.*, 74:74-83, 2014
9. Matrix metalloproteinase-3 is a possible mediator of neurodevelopmental impairment due to olyI:C-induced innate immune activation of astrocytes. Yamada S, Nagai T, Nakai T, Ibi D, Nakajima A, Yamada K., *Brain Behav Immun.*, 38:272- 282, 2014
10. Therapeutic targets for neurodevelopmental disorders emerging from animal models with perinatal immune activation. Ibi D, Yamada K., *Int. J. Mol. Sci.*, 16:1-12, 2015
11. Stress increases DNA methylation of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene. Furukawa-Hibi Y, Yun J, Nagai T, Yamada K., *Neuroreport*, 26:827-832, 2015
12. Insular neural system controls decision-making in healthy and methamphetamine-treated rats. Mizoguchi H, Katahira K, Inutsuka A, Fukumoto K, Wang T, Nagai T, Sato J, Sawada M, Ohira H, Yamanaka A, Yamada K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112:E3930-3939, 2015
13. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and reduces soluble A $\beta$  levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). Nakajima A, Aoyama Y, Shin, EJ, Nam Y, Kim HC, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Yokoi, T, Ohizumi Y, Yamada K., *Behav. Brain Res.*, 289:69-77, 2015
14. The role of Girdin in the CNS. Itoh N, Enomoto A, Nagai T, Takahashi M, Yamada K., Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory: *Rev. Neurosci.*, 27:481-490, 2016
15. Phospho-proteomics of the dopamine pathway enables discovery of Rap1 activation as a reward signal in vivo. Nagai T, Nakamuta S, Kuroda K, Nakauchi S, Nishioka T, Takano T, Zhang X, Tsuboi D, Funahashi Y, Nakano T, Yoshimoto J, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Miura M, Nishi A, Kobayashi K, Yamada K., Amano M, Kaibuchi K., *Neuron*, 89: 550-565, 2016
16. Prenatal nicotine exposure impairs the proliferation of neuronal progenitors, leading to fewer glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex. Aoyama Y, Toriumi K, Mouri A, Hattori T, Ueda E, Shimato A, Sakakibara N, Soh Y, Mamiya T, Nagai T, Kim HC, Hiramatsu M, Nabeshima T, Yamada K., *Neuropsychopharmacology*, 41: 578-589, 2016
17. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants."Kubo KI, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalfy B, Armstrong DD, Yamada K., Inoue K, Nakajima K. *JCI Insight.* 2, pii: 88609 (2017)

公募 A03 古屋敷智之

1. Roles of dopamine and inflammation-related molecules in behavioral alterations caused by repeated stress. Furuyashiki T., *J Pharmacol Sci*, 120:63-69, 2012
2. Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates murine hematopoietic stem/ progenitor cells directly via EP4 receptor and indirectly through mesenchymal progenitor cells. Ikushima YM, Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Takubo K, Furuyashiki T., Narumiya S, Suda T., *Blood*, 121:1995-2007, 2013
3. Orally administered rubiscolin-6, a  $\delta$  opioid peptide derived from Rubisco, stimulates food intake via leptomeningeal lipocallin-type prostaglandin (PG) D synthase in mice. Kaneko K, Lazarus M, Miyamoto C, Oishi Y, Nagata N, Yang S, Yoshikawa M, Aritake K, Furuyashiki T., Narumiya S, Urade Y, Ohinata K., *Mol Nutr Food Res*, 56:1315-1323, 2012
4. A role for microglia in repeated stress-induced functional changes in the medial prefrontal cortex in rodents. Kitaoka S, Furuyashiki T., *J Neurol Disord*, 1:1000123, 2013
5. EphA4-dependent axon retraction and midline localization of Ephrin-B3 are disrupted in the spinal cord of mice lacking mDia1 and mDia3 in combination. Toyoda Y, Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Nishimaru H, Hioki H, Kaneko T, Ishizaki T, Furuyashiki T., Narumiya S., *Genes Cells*, 18:873-875, 2013
6. Prostaglandin E receptor EP1 forms a complex with dopamine D1 receptor and directs D1-induced cAMP production to adenylyl cyclase 7 through mobilizing G<sub>βγ</sub> subunits in human embryonic kidney 293T cells. Ehrlich AT, Furuyashiki T., Kitaoka S, Kakizuka A, Narumiya S., *Mol Pharmacol*, 84:476-486, 2013
7. The MluI cell cycle box (MCB) motifs, but not damageresponsive elements (DREs), are responsible for the transcriptional induction of the *rhp51+* gene in response to DNA replication stress. Sartagul W, Zhou X, Yamada Y, Ma N, Tanaka K, Furuyashiki T., Ma Y., *PLoS One*, 9:e111936, 2014
8. The CCAAT/enhancer-binding protein delta/miR135a/ thrombospondin 1 axis mediates PGE<sub>2</sub> induced angiogenesis in Alzheimer's disease. Ko CY, Chu YY, Narumiya S, Chi JY, Furuyashiki T., Aoki T, Wang SM, Chang WC, Wang JM., *Neurobiol Aging*, 36:1356-1368, 2015
9. The combined effect of clothianidin and environmental stress on the behavioral and reproductive function in male mice. Hirano T, Yanai S, Omotehara T, Hashimoto R, Umemura Y, Kubota N, Minami K, Nagahara D, Matsuo E, Aihara Y, Shinohara R, Furuyashiki T., Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N., *J Vet Med Sci*, 77:1207-1215, 2015
10. Azoles activate Aft1-mediated transcription through MAP kinase pathway for antifungal effects in fission yeast. Hu L, Fang Y, Hayafuji T, Ma Y, Furuyashiki T., *Genes Cells*, 20:695-705, 2015
11. Characterization of tamoxifen as an antifungal agent using the yeast *Schizosaccharomyces pombe* model organism. Zhang X, Fang Y, Jaiseng W, Hu L, Lu Y, Ma Y, Furuyashiki T., *Kobe J Med Sci*, 61(2):E54-63, 2015
12. Constitutive Tor2 activity promotes retention of the amino acid transporter Agp3 at trans-Golgi/endosomes in fission yeast. Liu Q, Ma Y, Zhou X, Furuyashiki T., *PLoS One*, 10:e0139045, 2015
13. Tor signaling regulates transcription of amino acid permeases through a GATA transcription factor Gaf1 in fission yeast. Ma Y, Ma N, Liu Q, Qi Y, Manabe R, Furuyashiki T., *PLoS One*, 10:e0144677, 2015
14. Genetic interactions among AMPK catalytic subunit Ssp2 and glycogen synthase kinases Gsk3 and Gsk31 in *Schizosaccharomyces Pombe*. Qingyun, Ma Y, Kato T, Furuyashiki T., *Kobe J Med Sci*, 62:E70-E78, 2016
15. The loss of Lam2 and Npr2-Npr3 diminishes the vacuolar localization of Gtr1-Gtr2 and disinhibits TORC1 activity in fission yeast. Ma N, Ma Y, Nakashima A, Kikkawa U, Furuyashiki T., *PLoS One*, 11:e0156239, 2016
16. mDia and ROCK mediate actin-dependent presynaptic remodeling regulating synaptic efficacy and anxiety. Deguchi



Y, Harada M, Shinohara R, Lazarus M, Cherasse Y, Urade Y, Yamada D, Sekiguchi M, Watanabe D, Furuyashiki T, Narumiya S., *Cell Reports*, 17:2405-2417, 2016

17. G-CSF-induced sympathetic tone provokes fever and primes antimobilizing functions of neutrophils via PGE<sub>2</sub>. Kawano Y, Fukui C, Shinohara M, Wakahashi K, Ishii S, Suzuki T, Sato M, Asada N, Kawano H, Minagawa K, Sada A, Furuyashiki T, Uematsu S, Akira S, Uede T, Narumiya S, Matsui T, Katayama Y., *Blood*, 129:587-597, 2017

18. Depressive-like behaviors are regulated by NOX1/NADPH oxidase by redox modification of NMDA receptor 1., Ibi M, Liu J, Arakawa N, Kitaoka S, Kawaji A, Matsuda KI, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Zhu K, Teramukai S, Furuyashiki T, Yabe-Nishimura C., *J Neurosci*, 37:4200-4212, 2017

19. Dopamine D1 receptor subtype mediates acute stress-induced dendritic growth in excitatory neurons of the medial prefrontal cortex and contributes to suppression of stress susceptibility in mice. Shinohara R, Taniguchi M, Ehrlich AT, Yokogawa K, Deguchi Y, Cherasse Y, Lazarus M, Urade Y, Ogawa A, Kitaoka S, Sawa A, Narumiya S, Furuyashiki T, *Mol Psychiatry*, in press

#### 公募 A03 衣斐督和

1. Clioquinol induces DNA double-strand breaks, activation of ATM, and subsequent activation of p53 signaling. Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C, *Toxicology*, 299:55-59, 2012

2. NOX1/NADPH oxidase is involved in endotoxin-induced cardiomyocyte apoptosis. Matsuno K, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Cui W, Murata A, Nakamura H, Ibi M, Ikami K, Zhang J, Matoba S, Jin D, Takai S, Matsubara H, Matsuda N, Yabe-Nishimura C, *Free Radic Biol Med*, 53:1718-1728, 2012

3. Deficiency of NOX1/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase leads to pulmonary vascular remodeling. Iwata K, Ikami K, Matsuno K, Yamashita T, Shiba D, Ibi M, Matsumoto M, Katsuyama M, Cui W, Zhang J, Zhu K, Takei N, Kokai Y, Ohneda O, Yokoyama T, Yabe-Nishimura C, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34:110-119, 2014

4. Characterization of N-glycosylation sites on the extracellular domain of NOX1/NADPH oxidase. Matsumoto M, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Zhang J, Zhu K, Nauseef WM, Yabe-Nishimura C, *Free Radic Biol Med*, 68:196-204, 2014

5. Clioquinol increases the expression of VGF, a neuropeptide precursor, through induction of c-fos expression. Katsuyama M, Ibi M, Matsumoto M, Iwata K, Ohshima Y, Yabe-Nishimura C, *J Pharmacol Sci*, 124:427-432, 2014

6. NADPH oxidase NOX1 is involved in activation of protein kinase C and premature senescence in early stage diabetic kidney. Zhu K, Kakehi T, Matsumoto M, Iwata K, Ibi M, Ohshima Y, Zhang J, Liu J, Wen X, Taye A, Fan C, Katsuyama M, Sharma K, Yabe-Nishimura C, *Free Radic Biol Med*, 83:21-30, 2015

7. Depressive-like behaviors are regulated by NOX1/NADPH oxidase by redox modification of NMDA receptor. Ibi M, Liu J, Arakawa N, Kitaoka S, Kawaji A, Matsuda KI, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Zhu K, Teramukai S, Furuyashiki T, Yabe-Nishimura C, *J. Neurosci.*, 37: 4200-4212, 2017

8. Augmented neutrophil extracellular traps formation promotes atherosclerosis development in socially defeated apoE<sup>-/-</sup> mice. Yamamoto, K., Yamada, H., Wakana, N., Kikai, M., Terada, K., Wada, N., Motoyama, S., Saburi, M., Sugimoto, T., Kami, D., Ogata, T., Ibi, M., Yabe-Nishimura, C., Matoba, S. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500 (2), pp. 490-496. (2018)

#### 公募 A03 坂口昌徳

1. Post-training ablation of adult-generated olfactory granule cells degrades odor-reward memories. Arruda-Carvalho M, Akers KG, Guskjolen AJ, Sakaguchi M, Josselyn S, Frankland PW, *J. Neurosci.*, 2014 Nov 19, 34(47):15793-803, 2014

2. Inhibiting the activity of CA1 hippocampal neurons prevents the recall of contextual fear memory in inducible ArchT transgenic mice. Sakaguchi M, Kim K, Yu LMY, Hashikawa Y, Sekine Y, Okumura Y, Kawano M, Hayashi M, Kumar D, Boyden ES, McHugh TJ, Hayashi Y\*, *Plos ONE*, 10(6), 1-11, 2015

3. Effect of context exposure after fear learning on memory generalization in mice. Fujinaka A, Li R, Hayashi M, Kumar D, Changarathil G, Naito K, Miki K, Nishiyama T, Lazarus M, Sakurai T, Kee N, Nakajima S, Wang SH, Sakaguchi M, *Mol. Brain*, 9:2, 1-7, 2016

4. Auditory conditioned stimulus presentation during NREM sleep impairs fear memory in mice. Purple R, Sakurai T, Sakaguchi M, *Sci. Rep.*, 7:46247, 1-9, 2017

5. Regulatory influence of sleep and epigenetics on adult hippocampal neurogenesis and cognitive and emotional function. Akers KG, Chérasse Y, Fujita Y, Sakthivel S, Sakurai T, Sakaguchi M, *Stem Cells*, in press.

#### 公募 A03 渡部文子

1. Artificial Association of Pre-stored Information to Generate a Qualitatively New Memory. Ohkawa, N., Saitoh, Y., Suzuki, A., Tsujimura, S., Murayama, E., Kosugi, S., Nishizono, H., Matsuo, M., Takahashi, Y., Nagase, M., Sugimura, Y.K., Watabe, A.M., Kato, F., Inokuchi, K., *Cell Reports*, 11:261-269, 2015

2. The lateral parabrachial nucleus is actively involved in the acquisition of fear memory in mice. Sato, M., Ito, M., Nagase, M., Sugimura, Y.K., Takahashi, Y., Watabe, A.M., Kato, F., *Molecular Brain*, 8:22, 1-15, 2015

3. SAD-B Kinase regulates presynaptic vesicular dynamics at hippocampal Schaffer collateral synapses and affects contextual fear memory. Watabe, A.M., Nagase, M., Hagiwara, A., Hida, Y., Tsuji, M., Ochiai, T., Kato, F., Ohtsuka, T., *Journal of Neurochemistry*, 136:36-47, 2016

4. Enhanced long-term potentiation in mature rats with a history of cryptogenic infantile spasms. Tsuji, M., Takahashi, Y., Watabe, A.M., Kato, F., *Epilepsia*, 57:495-505, 2016

5. Synaptic and network consequences of monosynaptic nociceptive inputs of parabrachial nucleus origin in the central amygdala. Sugimura, Y.K., Takahashi, Y., Watabe, A.M., Kato, F., *Journal of Neurophysiology*, 115: 2721-2739, 2016

6. Cellular tagging as a neural network mechanism for behavioral tagging. Nomoto, M., Ohkawa, N., Nishizono, H., Yokose, J., Suzuki, A., Matsuo, M., Tsujimura, S., Takahashi, Y., Nagase, M., Watabe, A.M., Kato, F., Inokuchi, K., *Nature Communications*, 7:12319, 1-11, 2016

7. Overlapping memory trace indispensable for linking, but not recalling, individual memories. Yokose, J., Okubo-Suzuki, R., Nomoto, M., Ohkawa, N., Nishizono, H., Suzuki, A., Matsuo, M., Tsujimura, S., Takahashi, Y., Nagase, M., Watabe, A.M., Sasahara, M., Kato, F., Inokuchi, K., *Science*, 355:398-403, 2, 2017

#### 公募 A03 Joshua Johansen

1. Encoding of fear learning and memory in distributed neural circuits. Herry, C & Johansen, J.P., *Nature Neuroscience*, 17(12):1644-54, 2014

2. Hebbian and neuromodulatory mechanisms interact to trigger associative memory formation. Johansen, J.P., Diaz-Mataix, L., Hamanaka, H., Ozawa, T., Ycu, E., Koivumaa, J., Kumar, A., Hou, M., Deisseroth, K., Boyden, E. & LeDoux, J.E., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51):E5584-92, 2014

3. Projection specificity in heterogeneous locus coeruleus cell populations: implications for learning and memory. Uematsu, A., Tan, B.Z., Johansen, J.P., *Learning & Memory*, 22:444-451, 2015

4. Evaluation of ambiguous associations in the amygdala by learning the structure of the environment. Madarasz, T.J., Diaz-Mataix, L., Akhand, O., Ycu, E.A., LeDoux, J.E., Johansen, J.P., *Nature Neuroscience*, 19:965-972, 2016

5. A feedback neural circuit for calibrating aversive memory strength. Ozawa, T., Ycu, E.A., Kumar, A., Yeh, L-F., Ahmed, T., Koivumaa, J., and Johansen, J.P., *Nature Neuroscience*, 20(1):90-97, 2017
6. Modular Organization of the Brainstem Noradrenaline System Coordinates Opposing Learning States. Uematsu, A., Tan, B.Z., Ycu, E.A., Sulkes, J., Koivumaa, J., Junyent, F., Kremer, E.J., Witten, I.B., Deisseroth, K. and Johansen, J.P. Modular Organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. *Nature Neuroscience*. 20(11) 1602-1611, 2017
7. Dysregulation of aversive signaling pathways: a novel circuit endophenotype for pain and anxiety disorders. Yeh, L-F., Watanabe, M., Sulkes-Cuevas, J. Johansen, J.P. *Current Opinion in Neurobiology*, 48: 37-44, 2017
8. Learning rules for aversive associative memory formation. Ozawa, T. & Johansen, J.P. *Current Opinion in Neurobiology*. 49: 148-157, 2018

(2) 学会発表

- (1) Hayashi-Takagi A. Wide-field mapping of Hebbian synaptic potentiation using the synaptic optoprobes. Gordon Research Conference, March 26-31, 2017, Lucca (Italy)
- (2) 吉川武男, 22q11 欠失をもつ統合失調症の iPS 細胞解析, 第 1 2 回日本統合失調症学会, 2017 年 3 月 23 日, 米子コンベンションセンターBIG SHIP (鳥取)
- (3) 豊島学, 赤松和土, 岡田洋平, 大西哲生, 岡野栄之, 吉川武男, 患者由来の iPS 細胞を用いた神経発達障害に関わる miRNA の分子病態の解明, 第 12 回日本統合失調症学会, 2017 年 3 月 23 日, 米子コンベンションセンターBIG SHIP (鳥取)
- (4) 大西泰地, 並木 繁行, 廣瀬 謙造, Alteration of the spatial DRD2 in the striatal subregion of schizophrenia model mice, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017 年 3 月 15 日, 長崎新聞文化ホール (長崎県)
- (5) 喜田聡, 記憶制御に対するビタミン群の役割, 第 99 回 (公社) 日本栄養・食糧学会 関東支部シンポジウム「栄養とメンタルヘルス —栄養と心の健康のかかわり—」2017 年 3 月 4 日, 明治大学 (東京)
- (6) Hayashi-Takagi A. Mapping of Hebbian synaptic potentiation using the synaptic optoprobes Brian Mind Institute Symposium, EPFL, Dec. 12-13, 2016, Lausanne EPFL (Switzerland)
- (7) Satoshi Kida, Regulation of Memory Retrieval by Hippocampal Circadian Clock, ZING Conferences "Memory Mechanisms in Health and Disease" Dec 5-8, 2016 Tampa (USA)
- (8) 長葭大海, 福島穂高, 喜田聡, 光遺伝学的手法を用いた想起後の恐怖条件付け文脈記憶制御に対する海馬の役割の解析, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (9) 岩本和也, エピゲノム解析による精神疾患の新規病因・病態解明, 第 35 回日本認知症学会 2016 年 12 月 2 日, 東京国際フォーラム(東京)
- (10) 岩本和也, 気分安定薬・抗精神病薬がエピゲノム状態に与える影響について, 第 26 回日本臨床精神神経薬理学会 2016 年 11 月 18 日, ホルトホール大分(大分)
- (11) Rie ISHIKAWA, Satoshi KIDA, Comparisons and discrimination of fear and extinction neurons at the molecular and cellular levels, The 46th annual meeting of Society for neuroscience, 2016 年 11 月 12-16 日, San Diego (USA)
- (12) Hayashi-Takagi A. Mapping of Hebbian synaptic potentiation using the synaptic optoprobes Janelia Conference, November 6-9, 2016, Virginia (USA)
- (13) 喜田 聡, 海馬操作によるトラウマ記憶の忘却促進, 2016 年医療心理懇話会, 2016 年 11 月 2 日, フクラシア東京ステーション(東京)
- (14) Hayashi-Takagi A. Functional connectomics using synaptic optogenetics and an activity-dependent neuronal tracing, Cold Spring Harbor - Asia Meetings, October 17-21, 2016, Suzhuo (China)
- (15) Satoshi Kida, Regulation of memory retrieval by forebrain clock, 19<sup>th</sup> Korean Society for Brain and Neural Science (KSBNS) annual meeting Retention and modulation of long-term memory, Sep. 28-29, 2016, Seoul(Korea)
- (16) 並木繁行, 神経伝達物質開口放出におけるシナプス分子ナノアセンブリの機能的役割, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 27 日, 仙台国際センター (仙台市)
- (17) 喜田 聡, 想起後の恐怖記憶制御のメカニズムと PTSD, 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学会大会 合同年会 大会長合同企画 「記憶・情動の分子基盤破綻と精神疾患」 2016 年 9 月 8-10 日, 福岡国際会議場 (福岡)
- (18) Satoshi Kida, Regulation of fear memory after retrieval -mechanisms of transition from fear to safety-, 第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20 日~22 日(20 日) パシフィコ横浜(神奈川県)
- (19) 石川理絵, 喜田聡, 扁桃体における恐怖ニューロンと消去ニューロンの同定, 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 20-22 日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- (20) 長葭大海, 福島穂高, 喜田聡, 光遺伝学的手法を用いた恐怖条件付け文脈記憶に対する想起中の海馬活性化と不活性化の影響, 第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 20-22 日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- (21) Shigeyuki Namiki, Hirokazu Sakamoto, Tetsuro Ariyoshi, Kenzo Hirose, Regulation of synaptic

- vesicle exocytosis by nanoassembly of synaptic molecules, 第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月 22 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (22) Satoshi Kida, Active transition from fear to safety, International Symposium on “Microendophenotype on psychiatric disorders” 「Cellular and Circuit Mechanisms underlying Psychiatric Disorders」 2016 年 7 月 19 日、横浜ワールドポーターズ(神奈川)
- (23) Satoshi Kida, Identification of fear and extinction neurons, The 11<sup>th</sup> International Conference for Neurons and Brain Diseases, Vancouver 2016 - , July 14-16, 2016 Vancouver (Canada)
- (24) 喜田 聡、恐怖記憶の制御基盤とその制御に対する海馬の役割、日本睡眠学会第 41 回定期学術集会、2016 年 7 月 7-8 日、京王プラザホテル(東京)
- (25) Rie ISHIKAWA, Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA, Enhancement of forgetting remote contextual fear memory through increase in adult hippocampal neurogenesis in combination with reactivation of hippocampus by long-time memory recall, The 30th CINP World Congress, 2016 年 7 月 3-5 日 Seoul (South Korea)
- (26) 豊島学, 赤松和土, 岡田洋平, 大西哲生, 田中元雅, 岡野栄之, 吉川武男, 統合失調症患者由来神経幹細胞における分化異常の分子病態, 第 46 回日本神経精神薬理学会年会, 2016 年 7 月 2 日, COEX ソウル(韓国)
- (27) Manabu Toyoshima, Wado Akamatsu, Yohei Okada, Hideyuki Okano and Takeo Yoshikawa, Schizophrenia patient-derived hiPSCs exhibit changes in Neurogenic and Gliogenic Competences, CINP 2016, July 4, 2016 COEX, Seoul (South Korea)
- (28) 岩本和也、精神疾患患者神経細胞におけるゲノム・エピゲノム変異の探、第 46 回日本神経精神薬理学会、2016 年 7 月 2 日、ソウル(韓国)
- (29) Kenzo Hirose, Quantal nature of synaptic transmission visualized by a single synapse glutamate imaging technique, Current Trends and Future Directions of Synaptic Plasticity Research, 2016 年 6 月 25 日、The University of Maryland (Baltimore USA)
- (30) 喜田 聡、ビタミン A 情報伝達経路活性化による記憶能力向上の分子機構 Molecular Mechanisms of memory enhancement by activation of Vitamin A signaling pathway、日本栄養食糧学会、2016 年 5 月 13-15、武庫川女子大学 (兵庫)
- (31) 芹田龍郎、福島穂高、喜田聡、転写因子 CREB 恒常的活性化による海馬ニューロンスパイン密度と樹状突起分枝数の増加、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27-30 日、札幌市(北海道)
- (32) 堺大樹、喜田聡、恐怖記憶形成に対する断眠処置の影響の解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27-30 日、札幌市(北海道)
- (33) 宮原瑞希、長谷川俊介、喜田 聡、時計遺伝子 BMAL1 による海馬 CA1 ニューロンの樹状突起スパイン形態の制御、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27-30 日、札幌市(北海道)
- (34) 豊島学, 赤松和土, 岡田洋平, 大西哲生, Shabeesh Balan, 田中元雅, 岡野栄之, 吉川武男、22q11.2 欠失を伴った統合失調症患者由来神経幹細胞における分子病態解析、第 11 回日本統合失調症学会、2016 年 3 月 25-26 日、ベイシア文化ホール (群馬)
- (35) Iwamoto K. Increased L1 copy number in neuronal genome of schizophrenia and implications for its pathophysiology. 第 93 回日本生理学会 2016 年 3 月 22-23、札幌コンベンションセンター(北海道)
- (36) 吉川武男、炎症と精神疾患、JST-ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト最終成果報告会、2016 年 3 月 17 日、大阪大学会館講堂 (豊中)
- (37) 中山 翔太、並木 繁行、坂本 寛和、宮川 剛、廣瀬 謙造、Analysis of synaptic molecular arrangement in a mouse model of schizophrenia、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (38) 大西泰地、中山翔太、坂本 寛和、並木 繁行、廣瀬 謙造、Subregion-specific alteration of DRD2 expression in the striatum of model mice of schizophrenia、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (39) Shunsuke HASEGAWA, Hiroshi HOSODA, Yue ZHANG, Miho OHTA, Shintaro OKADA, Paul W. Frankland, Sheena A. Josselyn, Satoshi KIDA, Molecular mechanism for time-dependent regulation

of memory retrieval by forebrain circadian clock, The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2015 年 12 月 1-4 日、神戸

- (40) Rie ISHIKAWA, Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA, Erasure of recent and remote hippocampus-dependent fear memory by enhancing memory forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis with Memantine, The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2015 年 12 月 1-4 日、神戸
- (41) Yoshikazu MORISHITA, Daiki MIURA, Satoshi KIDA, PI3K regulates BMAL1/CLOCK-dependent circadian transcription rhythms, The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2015 年 12 月 1-4 日、神戸
- (42) 喜田 聡、恐怖記憶の形成・想起・再固定化・消去の分子機構の解明、AMED-CREST「脳神経回路」研究領域/神経回路制御関連研究チーム合同ワークショップ「神経回路制御による行動変容と臨床応用への展開」、平成 27 年 11 月 19 日、東京
- (43) 喜田 聡、脳機能に対する栄養素の役割、第 23 回 植物油栄養懇話会、2015 年 11 月 13 日、東京
- (44) Akiko Hayashi-Takagi, Visualization of learning-related memory trace and its erasure by “Synaptic optogenetics”, Society for Neuroscience, 2015 年 10 月 20 日, Chicago (USA)
- (45) 喜田 聡、海馬時計機能による記憶想起制御、記憶回路研究会「異なる動物種間での記憶回路制御機構の統合的理解による記憶回路原理の解明」2015 年 10 月 8-9 日、生理学研究所、岡崎
- (46) S. KIDA, Active Transition of Memory Phases from Fear to Safety, Symposium on Memory and Mind, Tohoku Forum for Creativity Thematic Program” 2015 年 9 月 28-29 日、仙台(宮城県)
- (47) 林(高木)朗子、大脳皮質シナプスと個体レベル行動との関連解析：新規光感受性シナプスプロローブを用いた Synaptic optogenetics 法の開発、第 37 回日本生物学的精神医学会、2015 年 9 月 26 日、タワーホール船堀(東京都)
- (48) 岩本和也、脳神経系細胞におけるゲノム・エピゲノム状態の変動と精神疾患、第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会シンポジウム、2015 年 9 月 24-26 日、タワーホール船堀(東京)
- (49) 菅原裕子、岩本和也、精神疾患の診断におけるエピジェネティックバイオマーカーの有用性の検討、第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会若手合同シンポジウム 2015 年 9 月 24-26 日、タワーホール船堀(東京)
- (50) S. KIDA, Erasure of recent and remote hippocampus-dependent fear memory by enhancing memory forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis. The 7<sup>th</sup> meeting of MCCS-Asia Sep 19-20, 2015, Wuzhen (China)
- (51) S. KIDA Erasure of Recent and Remote Fear Memory by Enhancing Forgetting (Symposium “Synaptic Plasticity in Healthy and Disease” 2015 Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences (KSBNS), Sep 11-12, 2015, Daegu (Korea)
- (52) 喜田 聡、Regulation of memory retrieval by forebrain circadian clock、シンポジウム 生物の適応能を飛躍的に高めたリズム制御分子と高次中枢システムの世界、第 58 回日本神経化学学会大会 理事会企画シンポジウム、平成 27 年 9 月 11 日、大宮 (埼玉県)
- (53) Iwamoto K, Kato T. Epigenetic alterations in neuronal cells of patients with bipolar disorder and schizophrenia. 第 58 回日本神経化学学会大会 ISN/JSN Joint Symposium, 2015 年 9 月 11-13 日、大宮ソニックシティ(埼玉)
- (54) 廣瀬 謙造 The Imaging Technology to Investigate Synaptic Transmission, 第 58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月 12 日、大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)
- (55) 喜田 聡、前脳時計機能による記憶想起のサーカディアン制御機構の解析、シンポジウム「記憶貯蔵と想起制御研究の最前線」第 38 回日本神経科学大会、平成 27 年 7 月 28 日(火)～31 日(金) 29 日、神戸
- (56) 長谷川俊介、細田浩司、張悦、太田美穂、岡田辰太郎、Paul W. Frankland、Sheena A. Josselyn、喜田聡、前脳領域 BMAL1 は記憶想起の時刻制御を媒介する、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28-31 日、神戸
- (57) 石川理絵、喜田 聡、恐怖記憶想起後の Reconsolidation update 制御機構の解析、第 38 回日

本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸

- (58) 稲葉洋芳、櫻井雅弘、甲斐大輔、喜田聡、海馬依存性記憶形成に対するN-及びO-結合型糖鎖修飾の役割、第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸
- (59) 芹田龍郎、天野翔次郎、喜田聡、記憶制御におけるヒストン修飾ダイナミクスの役割、第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸
- (60) 森下良一、三浦大樹、喜田聡、PI3KによるBMAL1/CLOCKを介する時計遺伝子群の発現制御、第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸
- (61) 海老原てい、篠澤貴寛、野本真順、内田周作、喜田聡、レチノイン酸情報伝達系活性化が記憶能力亢進を導く分子メカニズムの網羅的解析、第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸
- (62) 渡辺玉絵、岸本拓也、長谷川俊介、喜田聡、ビタミンB1欠乏による記憶障害のメカニズム-海馬におけるニューロン数とスパイン密度の減少、第38回日本神経科学大会、2015年7月28-31日、神戸
- (63) 林(高木)朗子、新規光感受性シナプスプローブ AS-PaRac1 を用いた記憶回路の可視化・操作、第38回日本神経科学大会、2015年7月28日、神戸国際会議場(兵庫)
- (64) Bundo M, Kato T, Iwamoto K. Brain genome and epigenome analyses in psychiatric disorders. 第38回日本神経科学学会シンポジウム、2015年7月28-31日、神戸国際会議場(兵庫)
- (65) 有吉 哲郎、坂本 寛和、並木 繁行、廣瀬 謙造, Molecular mechanisms for the formation of Munc13-1 nanoclusters at presynaptic terminals, 第38回日本神経科学大会、2015年7月28日、神戸国際会議場、神戸国際展示場 (兵庫県)
- (66) 廣瀬 謙造 Synaptic Function Illuminated by a Hybrid-Type Fluorescent Glutamate Probe, New Biological Frontiers Illuminated by Molecular Sensors and Actuators、2015年6月30日、GIS Convention Center at National Taiwan University (Taipei, Taiwan)
- (67) S. KIDA Erasure of recent and remote fear memory by enhancing adult hippocampal neurogenesis, 10th International Conference for Neurons and Brain Disease, June 22-24, 2015, Xian (China)
- (68) 吉川武男、脂肪酸関連分子からみた統合失調症、第111回日本精神神経学会学術総会 会長企画シンポジウム、2015年6月4日、大阪国際会議場 (大阪)
- (69) 岩本和也、加藤忠史、エピジェネティクスと精神疾患」第111回日本精神神経学会シンポジウム、2015年6月4-6日、大阪国際会議場(大阪)
- (70) S. KIDA, Erasure of recent and remote fear memory by enhancing forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis, Symposium "New insights into classical memory issues". 9th Annual Canadian Neuroscience Meeting, May 24 -27, 2015, Vancouver (Canada)
- (71) Satoshi Kida, Takuya Kishimoto, Satoru Ohishi, Kan Nagata, Tamae Watanabe, Shunsuke Hasegawa, Thiamine deficiency impairs hippocampus-dependent memory and spine density of hippocampal neurons, 12th Asian Congress of Nutrition (12th ACN), May 14-18, 2015, Pacifico Yokohama (Kanagawa)
- (72) 石川理絵、喜田聡、Reconsolidation-updateによる恐怖記憶制御の組織学的解析、第59回日本農芸化学大会、2015年3月26-29日、岡山
- (73) 豊島学、岡田洋平、赤松和土、糸川昌成、岡野栄之、吉川武男、統合失調症特殊例の神経発達・神経分化における分子病態解析、第10回日本統合失調症学会、2015年3月27-28日、都市センターホテル (東京)
- (74) Akiko Hayashi-Takagi, Synapse protection as a novel therapeutic strategy for psychiatric diseases, 第92回日本生理学会、2015年03月23日、神戸国際会議場 (兵庫)
- (75) 林(高木)朗子、大脳皮質シナプスと個体レベル行動との関連解析-新規光感受性シナプスプローブを用いた Synaptic optogenetics 法の開発一、第88回日本薬理学会、2015年03月18日、名古屋国際会議場 (愛知)
- (76) 有吉哲郎、坂本寛和、並木繁行、廣瀬謙造、シナプス前部における Munc13-1 ナノクラスター形成の分子機構について、第88回日本薬理学会年会、2015年3月18日、名古屋国際会議場 (愛知)
- (77) 吉川武男、複雑形質に対する遺伝学的アプローチ、首都大学東京 言語の脳遺伝学研究センター キックオフ・シンポジウム、2015年3月7日、首都大学東京 (東京)

- (78) Kato T, Neurobiology of bipolar disorder. The 5th World Congress of Asian Psychiatry, Mar. 3-5, 2015, Fukuoka
- (79) 吉川武男, 統合失調症：栄養と遺伝子、Antipsychotics Bridge Conference 2015、2015年2月4日、ホテルグランヴィア大阪（大阪）
- (80) 吉川武男, 統合失調症：代謝と遺伝子、SCBR (Schizophrenia Clinical and Basic Research) FORUM 2015、2015年1月31日、住友会館泉ガーデンタワー（東京）
- (81) 吉川武男, 自閉症の根底にある代謝障害：脂質関連遺伝子からみた自閉症、IIAS 研究プロジェクト「精神発達障害から考察する decision making の分子的基盤」第1回研究会、2015年1月10、11日、国際高等研究所（木津川）
- (82) Kato T, Epigenetics of mental disorders: from myth to evidence. 2nd UK-Japan Workshop on Neural Epigenetics: Epigenetics and transcription in the brain: Toward Single Cell Analysis. Dec. 16, 2014, London (UK)
- (83) Shojiro AMANO, Satoshi KIDA, Roles of Histone modifications in the hippocampus in formation of contextual fear memory, The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 2014年11月25-27日、横浜
- (84) 岩本和也, 文東美紀, 加藤忠史, 脳ゲノム解析と精神疾患、第37回日本分子生物学会ワークショップ、2014年11月25-27日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- (85) 金原直也, 坂本寛和, 並木繁行, 廣瀬謙造, 超解像顕微鏡によって視覚化されたシナプス前終末におけるカルシウムチャンネルの空間配置、第37回分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜（神奈川県）
- (86) 豊島学, 岡田洋平, 赤松和土, 岡野栄之, 吉川武男, 統合失調症の神経発達障害における miRNA の発現変化の影響、第41回日本脳科学学会、2014年11月22-23日、福井県県民ホール（福井）
- (87) 豊島学, iPS 細胞を用いた統合失調症特殊例の分子病態解析、第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会 合同年会 合同シンポジウム、2014年11月20-22日、名古屋国際会議場（愛知）
- (88) Rie ISHIKAWA, Paul W. FRANKLAND, Satoshi KIDA, Erasure of recent and remote hippocampus-dependent fear memory by enhancing memory forgetting through increase in adult hippocampal neurogenesis, Neuroscience 2014, 2014年11月15-19日, Washington D.C.
- (89) Hiroyoshi INABA, Akinori TSUKAGOSHI, Satoshi KIDA, Poly ADP-ribosylation is required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory, Neuroscience 2014 2014年11月15-19日, Washington, D.C.
- (90) 喜田 聡, 石川理絵, NMDA 型グルタミン酸受容体を介した海馬神経新生操作による記憶制御、日本アミノ酸学会 第8回学術大会 平成26年11月8-9日、東京
- (91) 吉川武男, 統合失調症のバイオマーカーについて、第1回 Chiba Mental Disorder Seminar、2014年10月29日、ホテル ザ・マンハッタン（千葉）
- (92) 吉川武男, 統合失調症の異質性、平成26年度沖縄県委託事業「医療基盤活用型クラスター形成支援事業」シンポジウム、2014年10月10日、ロワジールホテル&スパタワー那覇（沖縄）
- (93) 喜田 聡, 恐怖記憶制御と PTSD、第36回日本生物学的精神医学会第57回日本神経化学学会大会 合同年会（奈良）マイクロエンドフェノタイプから考える精神疾患研究 平成26年9月30日、奈良
- (94) 豊島学, 岡田洋平, 赤松和土, 岡野栄之, 吉川武男, miRNA の発現変化による神経細胞分化への影響、第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会 合同年会、2014年9月29日～10月1日、奈良県文化会館（奈良）
- (95) 岩本和也, 精神疾患のエピジェネティクス、第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会公開シンポジウム、2014年9月29-10月1日、奈良県文化会館（奈良）
- (96) 岩本和也, 文東美紀, 池亀天平, 菅原裕子, 石郷岡純, 笠井清登, 加藤忠史, 双極性障害のエピジェネティクス～セロトニントランスポーターにおける候補遺伝子解析、第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会シンポジウム、2014年9月29-10月1日、奈良県文化会館（奈良）



- (97) 喜田 聡、恐怖記憶再固定化と消去を制御する記憶痕跡、日本神経科学会 neuroscience 2014、平成 26 年 9 月 11-13 日、横浜
- (98) 福島穂高、張 悦、金 亮、喜田 聡、古い恐怖条件付け文脈記憶の安定性制御機構の解析、第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11-13 日、横浜
- (99) 石川理絵、Paul W. Frankland、喜田 聡、メマンチン投与による神経新生促進が海馬依存性恐怖記憶を忘却させる、第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11-13 日、横浜
- (100) 稲葉洋芳、塚越昭紀、喜田 聡、恐怖条件付け文脈記憶再固定化及び消去に対するポリ ADP リボシル化の役割、第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11-13 日、横浜
- (101) 天野翔次郎、喜田 聡、恐怖記憶固定化に対するヒストン修飾の役割、第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11-13 日、横浜
- (102) 櫻井雅弘、甲斐大輔、稲葉洋芳、喜田 聡、恐怖条件付け文脈記憶形成に対する海馬 O-結合型糖鎖修飾の役割、第 37 回日本神経科学大会“2014 年 9 月 11-13 日、横浜
- (103) 吉川武男、統合失調症の遺伝学的理解、第 37 回日本神経科学大会 (Neuro2014)、2014 年 9 月 11~13、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (104) 廣瀬謙造、超解像顕微鏡法によるシナプス機能を担う分子構築の解明、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- (105) Kato T, Iwamoto K, Neural genome analysis of bipolar disorder and schizophrenia. Symposium “Chromatin (Epigenetic) regulation of neuronal development. Neuroscience 2014, Sept. 12, 2014, Yokohama
- (106) 加藤忠史、岐路に立つ精神医学～臨床・基礎の橋渡しに向けて、基礎脳科学者のための精神疾患臨床 ABC 教育コース、第 37 回日本神経科学学会大会、2014 年 9 月 11 日、横浜
- (107) 喜田聡、マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出 ～PTSD の治療方法開発に向けた恐怖記憶制御基盤の解明～、新学術領域グリアアセンブリワークショップ、2014 年 8 月 8-9 日、京都
- (108) 岩本和也、脳の遺伝子研究からうつ病の原因はわかるか？、第 11 回日本うつ病学会総会ワークショップ、2014 年 7 月 18-19 日、広島国際会議場 (広島)
- (109) S. KIDA, Regulation of memory retrieval by forebrain circadian clock, 9th International Conference for Neurons and Brain Disease, 平成 26 年 7 月 14-16 日、Madrid (Spain)
- (110) Naoya Kimpara, Hirokazu Sakamoto, Shigeyuki Namiki and Kenzo Hirose, Analyzing molecular basis of neurotransmitter release with fluorescent glutamate imaging, 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014)、2014 年 7 月 16~17 日、Cape Town International Convention Centre (南アフリカ共和国)
- (111) Shigeyuki Namiki, Hirokazu Sakamoto, Tetsuro Ariyoshi, Naoya Kimpara and Kenzo Hirose, Supramolecular assemblies of synaptic proteins for synaptic vesicle release site at central synapses, 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014)、2014 年 7 月 16~17 日、Cape Town International Convention Centre (南アフリカ共和国)
- (112) 加藤忠史、岩本和也、双極性障害と統合失調症における脳ゲノミクス研究、第 130 回日本薬理学会関東部会シンポジウム 2「脳のミクロ機能や精神疾患を理解するための網羅的解析技術とマルチオミクスデータ解析」、2014 年 7 月 5 日、東京
- (113) Kato T, Development of mood stabilizers based on mitochondrial dysfunction hypothesis of bipolar disorder. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, June 22-26, 2014, Vancouver, Canada
- (114) 浅沼大祐、高岡洋輔、並木繁行、長野哲雄、浦野泰照、廣瀬謙造、新規酸性環境検出蛍光プローブによるエキソサイトーシスダイナミクス可視化手法、第 9 回日本ケミカルバイオロジー学会、2014 年 6 月 13 日、大阪大学豊中キャンパス (大阪府)
- (115) Akiko Hayashi-Takagi, Visualization of learning-related memory trace and its erasure by "Synaptic optogenetics", iCeMS International Symposium, June 12, 2014, 京都大学
- (116) 文東美紀、加藤忠史、岩本和也、統合失調症患者死後脳では LINE-1 コピー数が増大している、第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会、2014 年 5 月 25-27 日、伊藤国際学術研究センター (東京)

- (117) 吉川武男、統合失調症の新規病態の可能性について、浜松医科大学精神科マンデークラブセミナー、2014年4月21日、浜松医科大学（浜松）
- (118) 福島穂高、張悦、石川理絵、金亮、喜田聡、カルシニューリンを起点とした想起後の受動回避記憶強化、第58回日本農芸化学大会、2014年3月27-30日、東京
- (119) 石川理絵、Paul W. Frankland、喜田聡、NMDA受容体阻害剤メマンチンによる海馬依存性記憶の破壊、第58回日本農芸化学大会、2014年3月27-30日、東京
- (120) 天野翔次郎、喜田聡、恐怖記憶固定化に対するヒストン修飾の役割の解析、第58回日本農芸化学大会、2014年3月27-30日、東京
- (121) 廣瀬謙造、シナプスにおけるグルタミン酸放出のイメージング、第91回日本生理学会大会、2014年3月16-18、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島）
- (122) 豊島学、岡田洋平、赤松和土、糸川昌成、岡野栄之、吉川武男、疾患由来iPS細胞を用いたカルボニルストレス性統合失調症の病因解明、第9回統合失調症学会、2014年3月14-15、京都テルサ（京都）
- (123) 岩本和也、脳ゲノム解析による統合失調症の病態解析」第9回日本統合失調症学会シンポジウム、2014年3月14-15日、京都テルサ・京都
- (124) 廣瀬謙造、中枢神経系におけるグルタミン酸およびATPの蛍光イメージング、STROKE2014、2014年3月13-15、大阪国際会議場
- (125) 喜田聡、記憶制御に対するビタミンAの役割、第7回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、2014年3月6日-7日、東京
- (126) Hiroyoshi INABA, Akinori TSUKAGOSHI, Satoshi KIDA, Roles of poly ADP-ribosylation in the hippocampus in consolidation and reconsolidation of fear memory, The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2013年12月3-6日、神戸
- (127) 豊島学、前川素子、大西哲生、岡田洋平、赤松和土、糸川昌成、岡野栄之、吉川武男、iPS細胞を用いたカルボニルストレス性統合失調症の病因解析、第46回精神神経系薬物治療報告会 2013年12月6日、千里ライフサイエンスセンタービル（大阪）
- (128) 廣瀬謙造、Supramolecular assembly controls neurotransmitter release、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6、神戸国際会議場（兵庫）
- (129) 喜田聡、PTSDのマイクロエンドフェノタイプとしての恐怖記憶制御基盤、シンポジウム「精神疾患研究のパラダイムシフト-精神病態のマイクロエンドフェノタイプ-」、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会、平成25年10月26日、沖縄
- (130) 石川理絵、喜田聡、NMDA受容体阻害剤メマンチンを用いた海馬依存的恐怖記憶の破壊、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会、2013年10月24-26日、沖縄
- (131) 吉川武男、統合失調症の脳発達段階で何が起きているか—iPS細胞を用いたアプローチ、第43回日本神経精神薬理学会「精神疾患研究のパラダイムシフト—精神病態のマイクロエンドフェノタイプ—」シンポジスト、2013年10月24-26日、沖縄コンベンションセンター（沖縄）
- (132) 岩本和也、死後脳神経細胞におけるゲノム・エピゲノム解析による精神疾患の病因探索、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会 2013年10月24-26日、沖縄コンベンションセンター（沖縄）
- (133) 岩本和也、精神疾患患者末梢血試料を用いたエピゲノム解析、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会 2013年10月24-26日、沖縄コンベンションセンター（沖縄）
- (134) 廣瀬謙造、ナノスコピーによる精神病態へのアプローチ、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会 2013年10月24-26、沖縄コンベンションセンター（沖縄）
- (135) 喜田聡、記憶制御に対する栄養素の役割、食と生命のサイエンス・フォーラム「脳の認知機能に及ぼす栄養の役割」、2013年10月2日、東京
- (136) 喜田聡、恐怖記憶制御のマイクロエンドフェノタイプ、生理学研究所研究会「記憶回路研究会」感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻、平成25年9月2-3

- 日、岡崎
- (137) 喜田 聡、基礎研究者による精神疾患研究～研究対象としてのマイクロエンドフェノタイプ、シンポジウム「精神神経疾患研究のパラダイムシフト～マイクロエンドフェノタイプとは何か～」包括型脳科学研究推進支援ネットワーク・夏のネットワーク、平成 25 年 8 月 30 日、名古屋
  - (138) 福島穂高、張 悦、金 亮、喜田聡、カルシニューリンを起点とした想起後の受動回避記憶の増強、平成 25 年度 「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ、2013 年 8 月 29 日-9 月 1 日、名古屋
  - (139) Manabu Toyoshima, Yohei Okada, Wado Akamatsu, Masanari Itokawa, Hideyuki Okano, Takeo Yoshikawa, Effect of carbonyl stress on neural differentiation and development、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ、2013 年 8 月 29 日-9 月 1 日、名古屋国際会議場 (名古屋)
  - (140) Kida, S., Role of Calcineurin in Enhancement of Fear Memory after Retrieval, The 8<sup>th</sup> International Conference for Neurons and Brain Diseases, 2013年 7 月2-4日, National University of Singapore (Singapore)
  - (141) 廣瀬謙造, Supramolecular organization underlying synaptic transmission. Systems Biology of Cellular Signaling (International Symposium) 2013 年 7 月 1 日、東京大学小柴ホール
  - (142) Kida, S., Neural circuits and cellular and molecular mechanisms underlying fear learning, 11th World Congress of Biological Psychiatry (“ Perspectives in neurobiology of PTSD and disaster-related psychiatric disorders”), 2013年6月25日, Kyoto
  - (143) Kida, S., Dynamic regulation of fear memory after retrieval: Therapeutic targets for the treatment of PTSD, WFSBP-Neuro Joint Symposium (“Neurocircuit for physiological and pathophysiological brain”), 2013年6月23日, Kyoto
  - (144) Takeo Yoshikawa, Examination of neurodevelopmental theory by using iPS cells, 11th World Congress of Biological Psychiatry Symposium: Disturbed neuronal cell signaling events: Updates and future directions for the translational research in schizophrenia, 2013年6月23-27, Kyoto International Conference Center (Kyoto)
  - (145) Akiko Hayashi-Takagi, Delineation of learning engram by novel synaptic optogenetic tool, 6th international neural microcircuit conference, June 25, 2013, Okazaki
  - (146) Iwamoto K., Epigenetic analysis of the peripheral cells in psychiatric disorders. 11th World Congress of Biological Psychiatry June 23-27 2013, Kyoto, Japan
  - (147) Iwamoto K, Kato T., Comprehensive genome and epigenome analyses of neuronal genomes in major psychiatric disorders. Neuro2013, June 20-23, 2013 京都国際会館 (京都)
  - (148) 喜田 聡、Circadian regulation of memory retrieval by BMAL1, Neuro2013シンポジウム (認知機能向上及び障害のメカニズムー分子、細胞、回路レベルの解析から) , 2013年6月20日、京都
  - (149) 福島穂高、張 悦、金 亮、喜田聡、カルシニューリンを起点とした想起後の受動回避記憶の増強、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20-23 日、京都
  - (150) 張 悦、福島穂高、喜田聡、リン酸化 CREB と Erk の発現レベルを指標とした恐怖記憶強化と消去制御に関わるニューロン集団の同定、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20-23 日、京都
  - (151) 石川理絵、喜田聡、メマンチン投与による海馬依存的記憶の破壊、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20-23 日、京都
  - (152) 稲葉洋芳、甲斐大輔、喜田聡、恐怖条件付け文脈記憶形成時の海馬における糖鎖修飾の役割の解析、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20-23 日、京都
  - (153) 豊島学, 市川智恵, 岡田洋平, 赤松和土, 糸川昌成, 岡野栄之, 吉川武男、統合失調症を併発した 22q11.2 欠失症候群患者由来の iPS 細胞を用いたトランスクリプトーム解析、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20-23、京都国際会議場 (京都)
  - (154) Akiko Hayashi-Takagi, AS-PA (Activated synapse targeting photoactivatable) probe: a novel synaptic probe for "synaptic optogenetics", Neuro2013, June 20, 2013, Kyoto

- (155) Kida, S., Enhancement of fear memory after retrieval, The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Symposium (“Molecular, Cellular and Circuit Mechanisms underlying Cognition”), 2013年6月19日, Kyoto
- (156) Hotaka FUKUSHIMA, Yue ZHANG, Ryang Kim, Satoshi KIDA, Enhancement of fear memory after retrieval through the activation of calcineurin, The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Conference, 2013年6月19日, 京都
- (157) Yue ZHANG, Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA, Distinct time-dependent roles of Erk activation in the reconsolidation and extinction memory phases, The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Conference, 2013年6月19日, 京都
- (158) Rie ISHIKAWA, Satoshi KIDA, Erasure of hippocampus-dependent memory by memantine, The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Conference, 2013年6月19日, 京都
- (159) Toshiyuki TANIMIZU, Kazune KADOMA, Emiko OKANO, Yue ZHANG, Hotaka FUKUSHIMA, Satoshi KIDA, Identification of neural network recognizing “novelty” in the social recognition task in mice, The 6th Molecular Cellular Cognition Society (MCCS)-Asia Conference, 2013年6月19日, 京都
- (160) Manabu Toyoshima, Tomoe Ichikawa, Yohei Okada, Wado Akamatsu, Masanari Itokawa, Hideyuki Okano, Takeo Yoshikawa 「Transcriptome analyses of human induced pluripotent stem cells from 22q11.2 deletion syndrome patients with schizophrenia」、第6回 MCCS-Asia シンポジウム、2013年6月19日、京都国際会議場（京都）
- (161) 吉川武男、iPS細胞から見たカルボニルストレス」、第109回日本精神神経学会学術総会トピックフォーラム10「酸化ストレス・炎症から解く精神神経疾患：病態解明から治療戦略へ」、2013年5月25日、福岡国際会議場（福岡）
- (162) Kida, S., Dynamic regulation of fear memory after retrieval, Meeting México-Japan (Memory Traces & Tags), 2013年4月25-26日, Centro Académico Cultural UNAMx (Mexico)
- (163) Kida, S., Enhancement of fear memory after retrieval, ISN-ASN 2013 (Mechanisms of memory enhancement of erasure), 2013年4月20-24日, Cancun (Mexico)
- (164) Kato T., Neurobiology of bipolar disorder. Toward development of new mood stabilizers. Plenary Lecture, CINP 2013 Thematic Meeting Pharmacogenomics and Personalised Medicine in Psychiatry”, April 22, 2013, Jerusalem (Israel)
- (165) 吉川武男、iPS細胞を用いた統合失調症の研究、第8回統合失調症学会、平成25年4月19日、浦河町総合文化会館（北海道）
- (166) 谷水俊之、門間和音、岡野絵美子、張悦、福島穂高、喜田聡、社会的認知制御記憶固定化および社会性認知記憶に基づいた新規性認知機構の組織学的解析、第57回日本農芸化学会大会、2013年3月24-28日、仙台
- (167) 河野恭平、張悦、谷水俊之、岡野絵美子、喜田聡、新規物体認知記憶固定化制御機構の脳組織学的解析、第57回日本農芸化学会大会、2013年3月24-28日、仙台
- (168) 加藤忠史 精神疾患の動物モデル 現状と課題 第86回日本薬理学会年会 シンポジウム20 実験動物モデルはどこまでヒトに迫れるかー成果と課題、今後の期待ー 2013年3月22日、福岡
- (169) 廣瀬謙造、細胞シグナル動態を可視化するハイブリッド型蛍光プローブ、日本化学会第93春季年会、2013年3月22日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス
- (170) 瀧川健司、並木繁行、坂本寛和、有吉哲郎、金原直也、浅沼大祐、廣瀬謙造、シナプス伝達を可視化する高性能グルタミン酸センサーの開発、第86回日本薬理学会年会、2013年3月22日、福岡国際会議場
- (171) 太田裕作、岸俊輔、並木繁行、廣瀬謙造、新規 FRET 型蛍光プローブによって明らかにされた神経細胞での入力パターンの Cdc42 活性へのカルシウム依存的な変換機構、第86回日本薬理学会年会、2013年3月21日、福岡国際会議場
- (172) 浅沼大祐、高岡洋輔、並木繁行、瀧川健司、神谷真子、長野哲雄、浦野泰照、廣瀬謙造、エキソサイトシスダイナミクスを可視化する酸性環境検出蛍光プローブ、第86回日本薬理学会年会、2013年3月21日、福岡国際会議場

- (173) Kato T. Neurobiological basis of bipolar disorder. 16<sup>th</sup> annual conference of the international society for bipolar disorders, Keynote Lecture, Mar. 18-21, 2013, Seoul (South Korea)
- (174) 喜田聡、想起後の恐怖記憶制御のダイナミクス、自然科学研究機構国際拠点形成プロジェクト「脳の階層的な研究」報告会&シンポジウム、2013年3月5日、岡崎
- (175) 加藤忠史、エピジェネティクスは精神疾患の謎を解明することができるか？ 神経エピジェネティクス：メカニズムから疾患まで UK-Japan Workshop “Neural Epigenetics: From Mechanisms to Disease” February 26-27, 2013、東京
- (176) Kida S., Dynamic regulation of fear memory after retrieval, MCCS-Australia (Asia-pacific), 2013年2月2日, Melbourne (Australia)
- (177) Kato T., Pathophysiology research perspective -A roadmap toward conquering mental illness. JSNP/CINP International Workshop: Future Strategy for Psychotherapeutic Drug Development Perspectives from Industry-Government-Academia Collaboration. December 17, 2012, Hiroshima
- (178) 喜田聡、Enhancement of fear memory after retrieval through protein degradation and synthesis、第35回日本分子生物学会ワークショップ「遺伝子発現とタンパク質分解によって産み出される記憶制御のダイナミクス」、2012年12月11日、福岡
- (179) 谷水俊之、門間和音、岡野絵美子、張悦、福島穂高、喜田聡、社会的認知記憶固定化及び再固定化制御機構に関わる脳領域の同定。第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡
- (180) 河野恭平、張悦、谷水俊之、喜田聡、新規物体認知記憶固定化における制御機構の脳組織学的解析。第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡
- (181) 喜田聡、タンパク質分解を起点とした想起後の記憶制御、生理学研究所シンポジウム「記憶回路研究会」個体内記憶回路の同定とその機能解析による学習記憶制御基盤の統合的理解、2012年11月20-21日、岡崎
- (182) 加藤忠史、うつ病の根本的治療法の開発を目指して 国立民族学博物館学術潮流サロン 2012年11月20日、吹田
- (183) Nishioka M, Bundo M, Koike S, Kakiuchi C, Araki T, Kasai K, Iwamoto K., DNA methylation alterations in first-episode schizophrenia patients: comprehensive analysis using peripheral blood cells. **62nd Annual Meeting of American Society of Human Genetics**, Nov 6-10 2012, San Francisco (USA)
- (184) Kato T., Iwamoto K., DNA Methylation Analysis in Bipolar Disorder. Neuroepigenetics: A new perspective on memory mechanisms and brain disorders, “Current Trends in Biomedicine” Workshop. October 29-31, 2012, Baeza (Spain)
- (185) 加藤忠史、気分障害とミトコンドリア機能障害 第31回 日本認知症学会学術集会 シンポジウム4 認知症・うつとシナプス異常 2012年10月26日、筑波
- (186) 加藤忠史、双極性障害におけるエピゲノム解析 第57回人類遺伝学会大会 シンポジウム6 エピジェネティクス研究の新展開 2012年10月25日、東京
- (187) 太田裕作、岸俊輔、並木繁行、廣瀬謙造、新規 FRET 型蛍光プローブによって明らかにされた神経細胞でのカルシウムによる Cdc42 の活性調節機構の解明、第127回日本薬理学会関東部会、2012年10月20日、東京国際フォーラム
- (188) Yue ZHANG、Hotaka FUKUSHIMA、Satoshi KIDA、Distinct neuron populations in the enhancement/reconsolidation and extinction phases of reactivated inhibitory avoidance memory in the hippocampus, amygdala and mPFC, The 42nd annual meeting of Society for neuroscience, 2012年10月13-17日, New Orleans (USA)
- (189) Kato T., M, Komori A, Sakashita-Kubota M, Kasahara T, Kato T Mood disorders model mice that express mutant form of mitochondrial DNA polymerase show changes in genes regulating HPA axis in the paraventricular nucleus of the thalamus and recurrent depression-like symptom. Neuroscience 2012, Oct. 13-17, 2012, New Orleans (USA)
- (190) Sasaki F, Sakashita-Kubota M, Kasahara T, Okano H, Kato T. Chronic stress influences wheel-running activities in mutant Polg1 transgenic mice. Neuroscience 2012, Oct. 13-17, 2012, New Orleans (USA)
- (191) 加藤忠史、双極性障害の病態と治療 横浜 Bipolar 研究会 2012年10月3日、横浜

- (192) 加藤忠史、精神疾患研究のストラテジー 第 55 回日本神経化学学会大会 若手研究者育成セミナー 2012 年 9 月 29 日、神戸
- (193) 高田篤、吉川武男、加藤忠史、ポスト GWAS 時代の精神疾患遺伝研究 第 34 回日本生物学的精神医学会 シンポジウム 11 精神疾患研究の将来展望- ゲノムと神経科学 2012 年 9 月 28 日、神戸
- (194) 喜田聡、特異的ニューロン集団が産み出す想起後の記憶制御のダイナミクス、第 35 回日本神経科学大会シンポジウム「個々の神経細胞の働きを俯瞰して見る脳機能」、2012 年 9 月 19 日、名古屋
- (195) 福島穂高、張悦、喜田聡、タンパク質分解を介する想起後の受動回避記憶制御機構の解析、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋
- (196) 張悦、福島穂高、喜田聡、CREB と ERK のリン酸化を指標とした恐怖記憶強化と消去制御に関わるニューロン集団の同定、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋
- (197) 谷水俊之、門間和音、岡野絵美子、張悦、福島穂高、喜田聡、社会的認知記憶固定化及び再固定化を制御する脳領域の組織学的解析、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋
- (198) 甲斐大輔、喜田聡、恐怖条件付け文脈記憶に対する海馬における糖鎖修飾の役割の解析、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋
- (199) 窪田美恵、笠原和起、加藤忠史、変異 *Polgl* トランスジェニックマウスにおける双極性障害に類似した表現型 第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月 18-21 日、名古屋
- (200) 喜田聡, Dynamic regulation of fear memory after retrieval by distinct neural circuits, National Institute for Physiological Sciences International Workshop 2012 Central Neuroplasticity in Sensory-Emotional Link, 2012 年 9 月 15 日, Okazaki (Aichi)
- (201) 金原直也、坂本寛和、太向勇、並木繁行、廣瀬謙造、グルタミン酸イメージングによるプレシナプス機能を制御する分子基盤の解析、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋国際会議場
- (202) 有吉哲郎、坂本寛和、並木繁行、廣瀬健造、脳スライスにおける単一シナプス解像度でのグルタミン酸イメージング技術の開発、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋国際会議場
- (203) 瀧川健司、並木繁行、坂本寛和、浅沼大祐、廣瀬謙造、蛍光イメージングプローブのハイスループット作製技術の開発、第 14 回応用薬理シンポジウム、2012 年 9 月 3 日、ベルクラシック甲府
- (204) 加藤忠史、見逃されている双極性障害、心といのちを守るシンポジウム広島、2012 年 9 月 1 日、広島
- (205) Kato T, Neurobiology of bipolar disorder: Mitochondrial dysfunction and beyond. The 4th Biennial Symposium on Brain and Mind Research in the Asia-Pacific (APRU\*1-BMAP 2012) August 30, 2012, Tokyo
- (206) 加藤忠史、双極性障害の神経生物学 生命科学夏の学校 ワークショップ 2 2012 年 8 月 24 日、蒲郡
- (207) 加藤忠史、精神・神経疾患における基礎研究と臨床研究の融合 脳科学研究戦略推進プログラム・包括脳合同企画「神経科学研究の未来—基礎研究と臨床研究をどのように連携して進めるか？」 包括型脳科学研究支援ネットワーク 夏のワークショップ 2012 年 7 月 26 日、仙台
- (208) 金原直也、坂本寛和、並木繁行、廣瀬謙造、蛍光グルタミン酸プローブを用いた神経伝達物資放出を制御する分子基盤の解析、第 126 回日本薬理学会関東部会、2012 年 7 月 14 日、北里大学薬学部
- (209) 喜田聡, Circadian regulation of memory retrieval by BMAL1, EMCCS--FENS 5th annual meeting, 2012 年 7 月 13 日, Barcelona (Spain)
- (210) 加藤忠史、双極性障害の神経病理学的基盤の探索 新潟脳神経研究会特別例会 2012 年 6 月 28 日、新潟
- (211) 喜田聡, Circadian regulation of memory retrieval by BMAL1. International Conference of

Neurons and Brain Diseases. June 27, 2012, Montreal (Canada)

- (212) 加藤忠史、うつ病の根本的治療法の開発に向けて 日本医学ジャーナリスト協会 2012年6月25日、東京
- (213) Kubota-Sakashita M, Kasahara T, Kato T, Mutant *Polg1* transgenic mice as a model of bipolar disorder. International Behavioral Neuroscience Society 21th Annual Meeting, June 5-10, 2012, Kailua-Kona (USA)
- (214) Sugawara H, Iwamoto K, Bundo M, Adati N, Kusumi I, Okazaki Y, Ishigooka J, Kojima T, Kato T, Hypermethylation of serotonin transporter gene in bipolar disorder detected by epigenome analysis of discordant monozygotic twins. 28th CINP Congress (CINP 2012), June 3-7, Stockholm (Sweden)
- (215) 吉川武男、統合失調症GABA仮説の遺伝学的検証およびマウスにおける評価、日本実験動物科学・技術九州2012、シンポジウム「動物の社会行動解析からヒトの精神疾患を考える」、平成24年5月25日、別府国際コンベンションセンター（大分県）
- (216) 喜田 聡、Dynamic regulation of fear memory after retrieval. Bio-X 2012 International Symposium on Molecular Cognition and Translational Research on Neuropsychiatric Disorders. Apr 29th, 2012, Shanghai (China)
- (217) 吉川武男、De novo 均衡転座を持った統合失調症ゲノム切断点遺伝子の解析、第1回高次神経科学研究会、平成24年4月6日、山口大学医学部大学院（山口県）

### (3) 図書

#### 計画 A01 吉川武男

1. 精神科領域の用語解説「GWAS」, 吉川武男, 分子精神医学, Vol. 12, No. 4, 295-299, 2012
2. 次世代シーケンサーを用いた精神疾患の遺伝研究, 高田篤, 加藤忠史, 吉川武男, 分子精神医学, Vol. 13, No. 2, 114-120, 2013
3. 統合失調症の遺伝子研究, 治徳大介, 吉川武男, 日本臨床, Vol. 71, No. 4, 599-604, 2013
4. 精神疾患のゲノム解析, 治徳大介, 西川徹, 吉川武男, MedicalScienceDigest, Vol. 40, No. 5, 232-235, 2014
5. L-セリン欠乏は異常スフィンゴ脂質を含む脂肪体の形成を誘導する, 江崎加代子, 佐矢野智子, 赤木巧, 吉川武男, 平林義雄, 古屋茂樹, アミノ酸研究, Vol. 9, No. 2, 87-89, 2015
6. 統合失調症はどこまで理解できているか, 吉川武男, 島本知英, 和田唯奈, 心の科学, 110-116, 2016
7. 遺伝子発現からみたうつ病の神経科学, 前川素子, 豊島学, 吉川武男, うつ病の臨床: 現代の病理と最新の治療, 32-37, 2016
8. 統合失調症の神経発達障害にかかわる miRNA の分子基盤, 豊島学, 吉川武男, 分精神医学, Vol. 16, No. 4, 8-14, 2016

#### 計画 A02 加藤忠史

1. 岐路に立つ精神医学 - 精神疾患解明へのロードマップ、勁草書房 2013年刊 232ページ
2. 動物に「うつ」はあるのか-「心の病」がなくなる日、PHP出版 2012年刊 197ページ

#### 計画 A02 橋本謙二

1. Chapter 37: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) – TrkB signaling in depression: Biomarker and novel therapeutic target. Hashimoto K., In: Melatonin, Neuroprotective Agents and Antidepressant Therapy. Edited by F. Lopez-Munoz *et al.* Springer Publisher, 621-629, 2016

2. Sigma-1 receptor agonists and their clinical implications in neuropsychiatric disorders. Albayrak Y, Hashimoto K., In: Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets. Edited by Smith SB, & Su TP, *Springer Publishers*, 153-161, 2017

3. Chapter 4: Rapid antidepressant activity of ketamine beyond NMDA receptor. Hashimoto K., In: The NMDA Receptors. Edited by Hashimoto K. *Springer Publishers*, 69-81, 2017

#### 計画 A02 富田博秋

1. 第 8 章 死後脳研究, 富田博秋, メンタル医療～原因解明と診断, 治療の最前線～, シーエムシー出版, 86-95, 2013 年

2. 遺伝子-環境相関-PTSD に関する双生児研究と遺伝子研究-, 富田博秋, PTSD ハンドブック-科学と実践, 金剛出版, 185-202, 2014 年

#### 計画 A03 喜田 聡

1. 「Memory reconsolidation versus extinction」(pp119-137) (「Memory reconsolidation」Cristina Alberini 編集) Elsevier 社 2013 年

2. Memory reconsolidation and extinction

3. 「Memory Mechanisms on Health and Disease」 Karl Peter Giese 編集 World Scientific 社 2013 年

4. S. Josselyn., S. Kida, P. Sandra, and A. Silva, CREB, plasticity and memory, in Immediate Early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction, L. Kaczmarek and H. Robertson, Editors. 2002, Elsevier Science. p. 329-361.

5. 扁桃体を中心とした前脳領域による恐怖記憶制御 pp111-124

6. 分子脳科学 三品昌美編 化学同人 2015 4 22

7. 「精神疾患のマイクロエンドフェノタイプ」(pp99-105)メンタル医療 (糸川昌成監修) シーエムシー出版 2013 年 10 月 25 日刊

#### 計画 A03 那波宏之

1. 脳の発生と発達, 那波宏之, 統合失調症 第 11 章, 監修: 日本統合失調症学会, 編集: 福田正人 他 3 名, 医学書院発行, 2013 年

#### 公募 A01 大倉正道

1. 光遺伝学ツールを用いた光制御および蛍光測定手法の開発, 大倉正道, 中井淳一, 『オブジェクトネティックス～光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線～』, (株) エヌ・ティー・エス, 324, 107-117, 2013

2. 蛍光バイオセンサーの開発, 大倉正道, 中井淳一, 『進化分子工学～高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発～』, (株) エヌ・ティー・エス, 424, 267-273, 2013

3. Ca<sup>2+</sup>イメージング, 大倉正道, \*中井淳一, 『組織細胞化学 2014』, 日本組織細胞化学会, 230, 161-168, 2014

4. 高感度 Ca<sup>2+</sup>プローブ G-CaMP を用いた脳内シナプス活動のイメージング, 大倉正道, 中井淳一, 『脳内環境-恒常性維持機構の破綻と病気』, (株) メディカルドゥ, 220, 108-113, 2014



5. Optogenetic manipulation and robing. Ohkura M, Sadakari J, Nakai J, 『Optogenetics: light-sensing proteins and their applications』 Part 2, Chapter 9, Springer, 409, 133-148, 2015

6. 脳内環境辞典, 大倉正道 (分担執筆), (株) メディカルドゥ, 156, 30-31, 2017

#### 公募 A01 真鍋俊也

1. シナプス可塑性ー長期増強: LTP/長期抑圧: LTD, 小林静香, 真鍋俊也, 脳神経科学イラストレイテッド 改訂第3版, 真鍋俊也, 森寿, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛 (編), 羊土社, 177-184, 2013年4月1日発行

2. 興奮の伝達: シナプス伝達の調節, 真鍋俊也, 中枢神経におけるシナプス伝達「標準生理学」第8版 第2編 神経と筋 第6章, 監修: 小澤澗司, 福田康一郎, 羊土社, 154-166, 2014年3月27日発行

3. 興奮性組織: 神経, 真鍋俊也, 「ギャノン生理学」第24版 第I編 医科生理学の細胞および分子的基礎 5章, (McGraw-Hill) (翻訳: 丸善) 監訳: 岡田泰伸, 97-113, 2014年1月30日発行

#### 公募 A01 小林克典

1. 抗うつ作用を担う海馬神経可塑性の解析, 小林克典, ブレインサイエンス・レビュー 2015 (分担執筆) 廣川信隆編, クバプロ (東京都千代田区), 125-143, 2015

#### 公募 A01 小出 剛

1. 「行動の遺伝の謎」, 小出 剛, 『遺伝子が語る生命 38億年の謎』, 国立遺伝学研究所編, 悠書館, 227項, 2014

2. 「個性は遺伝子で決まるのか」, 小出 剛, ベレ出版, 2015

3. 「さまざまなマウス系統 遺伝的多様性と表現型への影響」, 吉見一人, 小出 剛, 『マウス表現型解析スタンダード』伊川正人, 高橋智, 若菜茂晴編集, 羊土社, 2016

4. “Automated Estimation of Mouse Social Behaviors Based on a Hidden Markov Model”, Arakawa T, Tanave A, Takahashi A, Kakihara S, Koide T, Tsuchiya T., *In: Hidden Markov Models. Methods in Molecular Biology*, Volume 1552, 185-197, 2017

#### 公募 A01 深澤有吾

1. Methods for immunoblot detection and electron microscopic localization of septin subunits in mammalian nervous systems, Parajuli LK, Ageta-Ishihara N, Ageta H, Fukazawa Y, Kinoshita M, *In: “Methods in Cell Biology 136 Septins”*, Gladfelter, AS. (ed.) Academic Press, 286-294, 2016.7, ISBN: 978-0-12- 803998-4. DOI 10.1016/bs.mcb.2016.04.021

#### 公募 A02 森 寿

1. 情動学習の分子機構, 井上蘭, 森寿, 情動の仕組みとその異常, 山脇成人, 西条寿夫編集, 情動学シリーズ2, 朝倉書店, 2-17, 2015年5月25日初版

2. Serine racemase knockout mice: Neurotoxicity, Epilepsy, and Schizophrenia, Inoue R. and Mori, H., *D-Amino Acids physiology, Metabolism, and Application*. (Yoshimura et al. eds.) Springer, p119-136, 2016.

3. Overview of the NMDA receptor. Mori H., *The NMDA Receptor* (Hashimoto K. ed). The Receptor. Vol. 30., Humana Press, p1- 18, 2017.

#### 公募 A02 森 寿

1. 情動学習の分子機構, 井上蘭, 森寿, 情動の仕組みとその異常, 山脇成人, 西条寿夫編集, 情動学シリーズ2, 朝倉書店, 2-17, 2015年5月25日初版
2. Serine racemase knockout mice: Neurotoxicity, Epilepsy, and Schizophrenia, Inoue R. and Mori, H., *D-Amino Acids physiology, Metabolism, and Application*. (Yoshimura et al. eds.) Springer, p119-136, 2016.
3. Overview of the NMDA receptor. Mori H., *The NMDA Receptor* (Hashimoto K. ed). The Receptor. Vol. 30., Humana Press, p1- 18, 2017.

#### 公募 A02 戸田重誠

1. 「依存症の生物学的メカニズム」, 戸田重誠, 分子精神医学, 先端医学社, vol16, No.3, 64-69, 2016,
2. 「生化学研究の長期展望」, 戸田重誠, 特集, 精神医学研究の発展可能性に関する長期展望: 臨床への還元の視点とともに, 精神科 30, 科学評論社, vol30, No.3, p, 2017

#### 公募 A02 小林和人

1. “Vectors for highly efficient and neuron-specific retrograde gene transfer for gene therapy of neurological diseases” Kato, S., Kobayashi, K., Inoue, K., Takada, M., and Kobayashi, K., *Gene Therapy -Tools and Potential Applications*, (ed. Francisco Martin Molina) Chapter 15, InTech, Rijeka (Croatia), pp.387-398, 2013.

#### 公募 A03 奥野浩行

1. “Neuroplasticity”, Okuno, H. In “*Homeostatic control of brain function*” Masino, SA. & Boison, D, eds., Oxford University Press, 174-186, 2015.
2. “神経特異的前初期遺伝子 Arc によるシナプス機能調節機構”, 奥野浩行, In “ブレインサイエンスレビュー2016”, 廣川信隆編, クバ プロ, 99-118, 2016
3. “Single-cell RNA-Seq ② (試薬編)”, 奥野浩行, In “*RNA-Seq 実験ハンドブック*” 鈴木讓編, 羊土社, 166-173, 2016
4. “Inverse synaptic tagging by Arc”, Okuno, H. Araki, A., Minatohara, K. In “*Novel Mechanisms of Memory*” Giese, K.P. & Radwanska, K., eds., Springer, 99-118, 2016.

#### 公募 A03 古屋敷智之

1. 「アクチン」の項担当, 篠原亮太, 古屋敷智之, 脳科学辞典, <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/アクチン>, 2013
2. 「ストレスにおけるアラキドン酸由来生理活性脂質の役割」の項担当, 古屋敷智之, 「生体の科学」65巻1号特集「精神疾患の病理機構」(岡本仁 編) 48-54, 2013
3. 「反復社会挫折ストレスにおけるプロスタグランジン E2 による前頭前皮質ドパミン系制御の役割」の項担当, 古屋敷智之, 「生化学」87巻 122-124, 2014
4. 「ドパミン依存的な情動行動における PGE2-EP1 経路の役割と精神疾患との関連」, 北岡志保, 古屋敷智之, 実験医学増刊号「脂質疾患学」(村上誠, 横溝岳彦 編) 146-151, 2015

5. Part III Lipid Mediators and Diseases, 22. Roles and actions of arachidonic acid-derived bioactive lipids in stress-related behaviors. Furuyashiki T, Kitaoka S., *Bioactive Lipid Mediators Current Reviews and Protocols*, Takehiko Yokomizo, Makoto Murakami eds., Springer, 315-328, 2015

#### 公募 A03 森信 繁

1. Neurobiology of PTSD (Liberzon I, Ressler K eds) Translational research from animals to humans, Morinobu S, Yamamoto S, Fuchikami M, Oxford University Press, New York, pp.336-349, 2016

#### 公募 A03 坂口昌徳

1. The importance of acute intervention for preventing generalization in PTSD patients. 大石誠, 中島聡美, 坂口昌徳, 医学のあゆみ, v258i13, 1209-1210, 2016

2. 脳内で新生するニューロンと中枢神経再生への応用, 坂口昌徳, ブレインサイエンスレビュー, 廣川 信隆(編), クバプロ(出), 1-5, 2016

#### 公募 A03 渡部文子

1. “生理学問題集 (CBT 準拠) 第 2 版”, 渡部文子 (問題作成委員として参画), 日本生理学会教育委員会 (編) 文光堂, 2015

2. “イラストレイテッド統合臨床基礎医学”, (訳書) 渡部文子, 加藤総夫, 第 4 章, 栗原敏 監訳, 丸善出版, 2017 予定

3. “スタンフォード神経生物学 Principles of Neurobiology”, (訳書) 渡部文子, 第 8 章 運動系と制御系, 柚崎通介, 岡部繁男, 監訳, メディカルサイエンスインターナショナル, 2017

### <研究成果による産業財産権の出願・取得状況>

#### 計画 A01 廣瀬謙造

1. 特許出願: 「酸性環境検出蛍光プローブ」、特願 2013-00532636、発明者: 浦野泰照、長野 哲雄、浅沼 大祐、廣瀬 謙造、並木 繁行、高岡 洋輔、権利者: 国立大学法人東京大学、2011 年 9 月 7 日出願、国内 (出願番号: 特願 2013-532636)

2. 特許出願: 「新規蛍光標識方法」、発明者: 廣瀬謙造、浅沼大祐、並木繁行、田中理恵子、権利者: 国立大学法人東京大学、2017 年 1 月 19 日出願、国内 (出願番号: 特願 2017-7952)

#### 計画 A01 林朗子 (高木朗子)

1. 特許出願: 「シナプス増強を可視化するプローブ」、特願 2014-120841、発明者: 林 (高木) 朗子、河西春郎、権利者: 国立大学法人東京大学、2014 年 6 月 11 日 2 出願、国内 (出願番号: 特願 2013-532636)

#### 計画 A02 橋本謙二

1. 特許出願: 「R-ケタミンおよびその塩の医薬品としての応用」、発明者: 橋本謙二、権利者: 千葉大学、特願 2013-190066 号、2013 年 9 月 13 日出願、国内、国外 WIPO 出願中 (出願番号:PCT/JP2014/004730)

2. 特許出願: 「双極性障害の診断方法及び治療化合物のスクリーニング方法」、発明者: 橋本謙二、吉川武男、他、権利者: 千葉大学、特願 2016-099251、2015 年 5 月 18 日出願 (外国出願)

3. 薬物依存症の治療薬としての TrkB 受容体拮抗薬、橋本謙二、千葉大学、特願 2014-230008 号、2014 年 11 月 12 日出願、国内

#### 計画 A03 喜田 聡

1. 特許取得: 「記憶能力減退に対する被験化合物のスクリーニング方法」、発明者: 喜田 聡、権利者: 東京農業大学、特許第 5569894 号、2014 年 7 月 4 日取得

2. 特許出願: 「PTSD の治療薬のスクリーニング方法」、発明者: 喜田 聡、権利者: 東京農業大学、特願 2014-225209、2014 年 11 月 5 日出願

「各計画・公募研究課題の研究成果」

## 統合失調症由来iPS細胞を用いた病態関連分子・細胞基盤の解明

(平成24年度～28年度)

計画班員 吉川 武男 理化学研究所脳科学総合研究センター チームリーダー

### 研究目的

統合失調症の発症脆弱性基盤として「神経発達障害仮説」が有力であるが、これまではヒト由来サンプルを用いて当該仮説に直接アプローチできる方法論がなかった。そこで我々は罹患者からiPS細胞を作製して、神経発達最初期の異常やその後の分化過程の異常を実際のヒト神経細胞で捉えることによって、「神経発達障害仮説」の具体的事象の解明、すなわち分子・細胞病理の新しいパラダイムをマイクロエンドフェノタイプと想定し、その発見に挑むことを目的とした。疾患対象者として、ゲノムに大きな変異（コピー数多型）のあるサンプルや遺伝子にナンセンス変異やフレームシフトを持つサンプルに主眼を置き、強調された表現型を観察できる可能性を追求することとした。

### 研究背景

統合失調症の発症脆弱性基盤としては、環境要因と遺伝的要因がある。環境要因の例としては、我々はマウスを用いて、脳発達期の食餌中の多価不飽和脂肪酸の欠乏が、統合失調症前駆様状態を生じさせることを見出した。統合失調症と脂肪酸との関連については、本領域の研究期間を通して他にもいくつかの研究報告を行ってきた。

遺伝的基盤は、ヒトゲノム中に散在するDNA多型（SNP、コピー数多型など）に起因するが、重要なタンパクの機能を大きく変えるSNPやコピー数多型以外のものは発症リスクに対する寄与率は小さい。統合失調症発症リスクの最も大きなゲノム多型の1つとして、染色体22q11.2領域のヘテロ欠損（22q11.2欠失）が知られている。22q11.2欠失は、DiGeorge症候群の原因でもある。一方、統合失調症の発症や病態生理には、慢性軽度炎症やそれと表裏一体の関係にある酸化ストレスの関与が考えられているが、酸化ストレスの一種としてカルボニルストレスがある。カルボニルストレスのスカベンジャー酵素として*GLI1*遺伝子があるが、我々は以前共同研究の一員として、統合失調症ではカルボニルストレスが増加していること、その原因として*GLI1*遺伝子のフレームシフト変異を持っている罹患者がいることを報告した。また、その後一般の統合失調症で、*GLI1*, 2遺伝子の関連解析を報告した。

統合失調症が多因子性で病理・病態の異質性が大きいことを考慮した場合、統合失調症の分子・細胞メカニズム（エンドフェノタイプ）研究においてiPS細胞の利点を活かすためには、発症寄与効果の大きなゲノム変異をもつ患者由来の試料を解析するのが合理的であると考えた。そこで本領域研究では、22q11.2欠失を持っている統合失調症、*GLI1*遺伝子にフレームシフト変異を持っている統合失調症患者からiPS細胞を樹立して解析を行うことにした。

### 研究結果

(1) 22q11.2欠失を持つ統合失調症患者由来の神経幹細胞では、増殖能の低下、神経突起伸長の低下、神経細胞とアストロサイトへの分化効率の異常など、神経発達障害を示唆する表現型（マイクロエンドフェノタイプ）を見出した。これらの異常のメカニズムとしては、欠失領域にコードされている*DGCR8* (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) 遺伝子（タンパク産物はmicro RNAのプロセッシングに関わる）のヘテロ欠損を起点として、特定のmiRNA (miR-17 familyやmiR-185) の発現低下を引き起こし、その結果としてp38 $\alpha$  (MAPK14) の翻訳が亢進しタンパク量が増加するパスウェイが考えられた。p38 $\alpha$ は、ストレス刺激（ $\gamma$ 線、UV、浸透圧、リボトキシン、酸化ストレス、炎症性サイトカインなど）で誘導されるキナーゼである。実際、p38 $\alpha$ の阻害剤であるSB203580を培養液に加えると、神

経細胞への分化の低下 (decreased neurogenic competence)、アストロサイトへの分化の亢進 (increased gliogenic competence) が改善された (図A)。

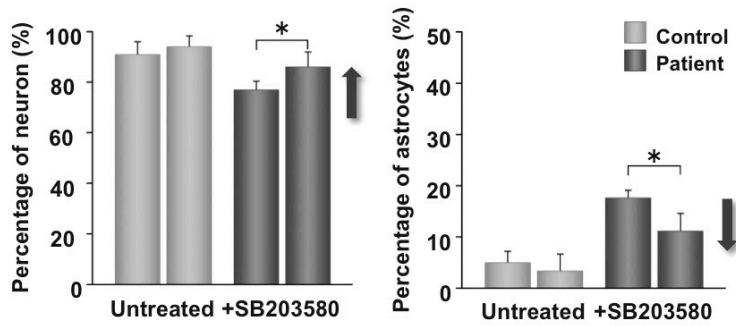
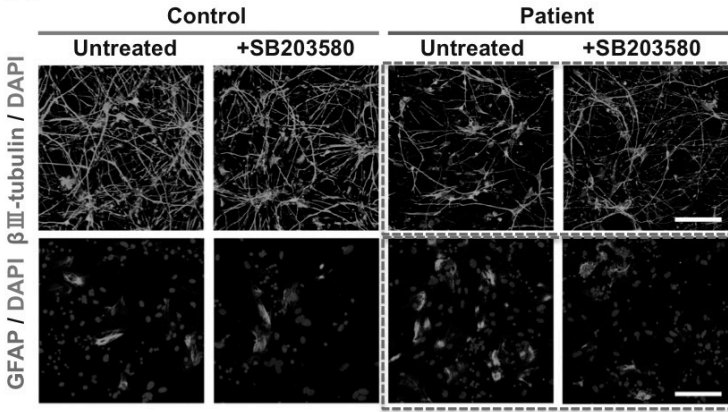
22q11.2欠失を持つ統合失調症患者由来のiPS細胞で検出されたincreased gliogenic-to-neurogenic competence ratioというマイクロエンドフェノタイプが、一般の統合失調症でも普遍的にみられるのかを確かめるために、死後脳を用いて神経細胞マーカー (*MAP2*)、アストロサイトマーカー (*GFAP*) の発現レベルを解析した。その結果、統合失調症患者死後脳においては、神経細胞とアストロサイトのマーカー量比にiPS細胞レベルと同様の異常があることが明らかになった (図B)。死後脳所見の原因としては、p38 $\alpha$ の上流因子としてmiRNAではなく炎症を含む何らかのストレス刺激が考えられる。いずれにしても、p38 $\alpha$ を介した脳発達期における神経幹細胞の分化効率の微細な変化が、統合失調症の病因の可能性の一つであることが示唆された。

(2) *GLO1*遺伝子変異を持つ統合失調症患者由来のiPS細胞では、カルボニルストレスが亢進し、神経幹細胞への分化効率や神経幹細胞マーカー (*SOX1*) の発現が低下することが明らかになった。これらの異常は、カルボニルストレス消去剤 (ピリドキサミン、 $\alpha$ -リポ酸) で回復した。また、患者由来のiPS細胞では、CRMP2のAGE (終末糖化産物) 化が亢進しており、*GLO1*遺伝子をゲノム編集で欠損させた健常者由来のiPS細胞においても同様の結果が見られた。*CRMP2*は遺伝的に統合失調症との関連が報告されている。よってCRMP2は、統合失調症の中でもカルボニルストレス負荷が病理に関係する一群において、重要な標的分子である可能性が示唆された (論文準備中)。

## まとめ

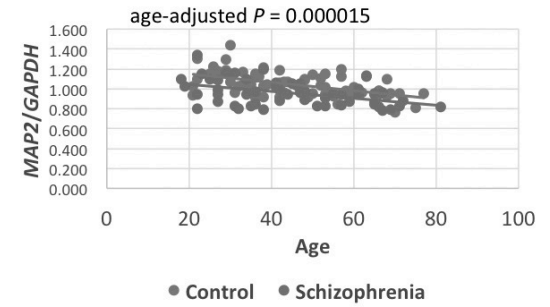
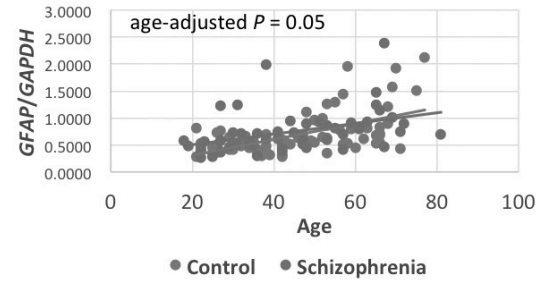
本領域研究では、統合失調症のiPS細胞として22q11.2欠失を持ったもの、あるいは*GLO1*遺伝子にフレームシフト変異を持ったもの、というように特殊例を解析したが、前者からはp38 $\alpha$ を介するincreased gliogenic-to-neurogenic competence ratioというメカニズムが見出され、gliogenic-to-neurogenic competenceの異常という収束点は、一般の統合失調症の死後脳でも確認された。この結果は、統合失調症の新たな予防・治療薬の標的として、p38 $\alpha$ 分子が候補になり得ることを示唆するものである。一方、後者の解析からは、これまで統合失調症との遺伝的な関連のみが知られていたCRMP2が、どのように疾患の病態生理と関わっているのか、今後のアプローチの有用な材料を提供するものと期待される。

疾患iPS研究においては、線維芽細胞 (採取するのに侵襲が大きい) ではなく末梢血中のTリンパ球からiPS細胞 (TiPS細胞) を樹立する方法<sup>11)</sup>、ならびにゲノム編集技術でiPS細胞に目的のゲノム変異を導入する方法、といった有用なツールが開発されたため、研究の自由度が向上し、今後の大いなる発展が望める。ただ、統合失調症の大きな異質性を乗り越えて真に当事者の役に立つ成果を得るためには、なお一層の努力が必要である。

**A**

**A** : p38  $\alpha$  阻害剤であるSB201580を加えると、疾患iPS細胞で低下していた神経細胞への分化能が上昇し、亢進していたアストロサイトへの分化効率が抑えられた。対照群iPS細胞には影響がなかった。

**B** : 死後脳では年齢とともにアストロサイトマーカーであるGFAPの発現レベルが上昇し、神経細胞マーカーであるMAP2の発現レベルが低下するが、統合失調症では全年齢層でGFAPの発現が対照群に比較して上昇、MAP2の発現が低下していた。

**B**

# 精神疾患マイクロエンドフェノタイプとしての樹状突起スパインの解析

(平成24年度～28年度)

計画班員 林 (高木) 朗子 群馬大学・生体調節研究所・脳病態制御分野・教授

## 研究目的および背景

シナプスは脳回路の最小単位であり、その適切な形成および可塑性が正常な神経回路の基盤である。様々な精神疾患に、大脳皮質のグルタミン酸作動性シナプスの関与が強く示唆されるものの、生体脳でどのような病態がシナプスレベルで進行していくのか（マイクロエンドフェノタイプ）は未解明である。グルタミン酸作動性シナプスの約7割は、樹状突起上にマッシュルーム様構造（スパイン）を形成する。スパインの特徴の一つに、その形態と機能に著しい相関があること、即ち、形態をイメージングするだけで、そのシナプス機能を精度良く推測できるという方法論的な大きな利点がある。そこで2光子顕微鏡により、スパインをin vivoで繰り返しイメージングすること、Optogeneticsによってスパイン形態を人為的に操作すること、これら同一個体に行動解析を併用することにより、スパインという疾患病態（マイクロエンドフェノタイプ）を、in vivoで可視化及び人為的操作により行動との関連を検証することに挑戦する。本申請は、このSynaptic optogeneticsとも表現できる新技法によりスパインと精神疾患関連行動との因果律に迫ることを試みる。

## 研究方法

【戦略1】表面的・構成的・予測的妥当性を満たす有力な疾患モデルの、異常行動発症前後のin vivo 2光子顕微鏡イメージングを縦断的に行い、疾患関連行動解析を併用する。これらを通じて、大脳皮質スパインと行動との関連や、新規治療薬の効果を測定出来る実験系を確立する。

【戦略2】光刺激特異的にスパイン形態変化を誘発するPaRac1を神経入力の入ったシナプス後肥厚部に特異的に発現するActivated Synapse targeting PhotoActivatable-Rac1 (AS-PaRac1) の開発に成功している。この新規光プローブを大脳皮質へ遺伝子導入した後、特定のタスクをマウスに付加すると、同タスクに必要な脳領域シナプスにAS-PaRac1が再局在することを確認している。そこで同脳領域を光刺激をすることでそのようなタスクに必要なスパイン群を特異的に改変するSynaptic optogeneticsの確立を試み、ある特定のスパイン群を書き換えることで如何なる行動が誘発されるか検証する。

## 研究結果

統合失調症モデルマウスである前頭野特異的DISC1ノックダウンマウスのin vivo 2光子励起スパインイメージングを行ったところ、マウスの思春期に相当する時期にスパインが過剰に除去され、シナプス密度が大きく減少することを見出した (図A)。スパイン減少を予防する薬剤は、統合失調症の関連症状の一つである感覚運動情報制御機能の障害に対しても治療効果を有した。このことはスパインというマイクロエンドフェノタイプが如何に異常行動に相関するかを示唆した (Hayashi-Takagi A *et al*, 2014, *Proc Natl Acadsci USA*)。一方で、スパインと行動とのより直接的なエビデンスを得るため、スパイン形態を人為的に消去する新しい技術: Synaptic optogenetics (AS-PaRac1) を開発した。AS-PaRac1は長期増強が誘導されたシナプスだけを青色光で消去する性質があることが実験的に確認され (図B)、実際に学習後に青色光を照射すると既得学習を消去でき、確かにスパインが行動を強力に制御できるという世界ではじめての直接的エビデンスとして報告できた (Hayashi-Takagi A *et al*, 2015, *Nature*)。この仕事はNature Methods、Cell誌などに特集を組まれ、2017年7月でのThomson Reutersの引用は61回であり、高被引用文献 (該当フィールドの上位1%) としてランクされ、このような新技術を病態モデルに展開することで、病態生理を担うスパインパソロジーの描出が劇的に展開する



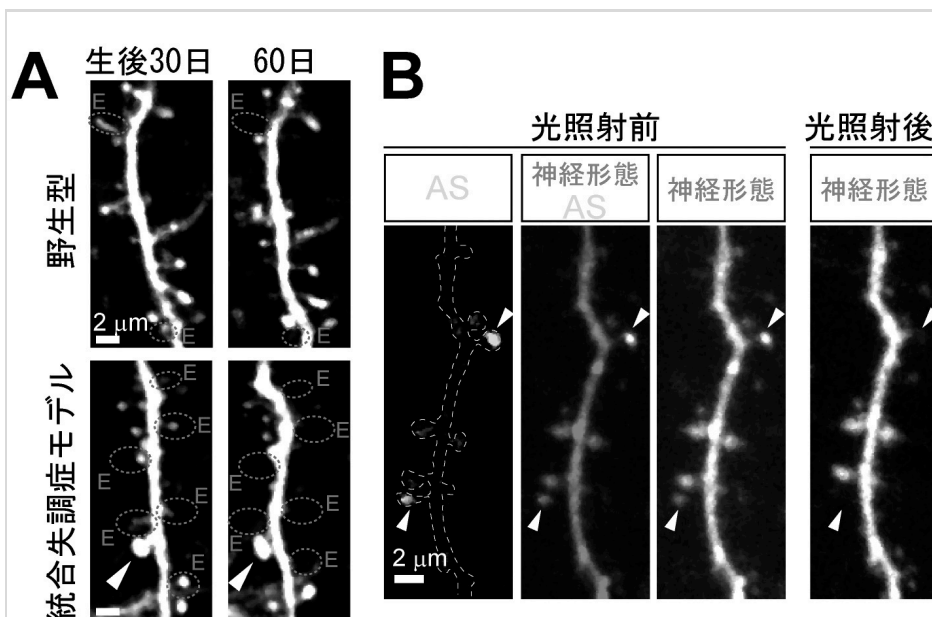
と思われる。これらの一連の仕事より精神疾患のマイクロエンドフェノタイプとしてのスパインをin vivoで可視化し、さらに操作出来るようになり、当初の計画以上の完成度で目標達成できたと考えている。

### まとめ及び今後の展望

思春期相当期の統合失調症モデルマウスの前頭前野領域において、樹状突起スパインの過剰な刈り込み現象を同一個体を用いた縦断的2光子励起イメージングで観察でき、スパイン保護効果を有する化合物は個体レベルの行動異常の一部を改善することが出来た。一方で、シナプス異常がどのようなメカニズムで神経回路障害や、その結果としての前頭前野機能異常を誘発するのかは未解明な部分が多い。そこで今後は、2光子励起顕微鏡や電気生理学を用いた前頭前野シナプス特性の実験データを基に、SZモデル動物の前頭前野神経回路障害の数理モデルの確立を試みる。これらのシミュレーションにより、情報処理の基盤となる前頭前野神経回路のダイナミクスや安定性が、SZモデルマウスにおいてどのように野生型マウスと異なるか、どのパラメーターが回路異常への寄与が大きいかを検証する。さらに神経回路における個々のスパインの寄与についても解析を進める。スパインは活動電位の発生にたいして非線形的に大きな効果を有し、とりわけ大きなスパインではこの非線形効果が顕著であることが明らかになりつつある。DISC1とCalcineurinという2つの異なるSZモデルマウスで、前頭前野での“際立って巨大なスパ

インの分布”という共通するシナプス特性が既にあきらかであるため、このようなモデルマウスにおける樹状突起の非線形性をモデル化し、回路シミュレーションを行う。これにより、実験で予想される発火頻度や発火パターンの変化をどの程度シミュレーションによって説明されるかということを検証し、SZモデルマウス機能不全に寄与する要因が樹状突起の演算機能なのか、レセプターのパラメーターにあるのか、あるいは回路ダイナミクスにあるのかを検証する。

上記のようにスパインが統合失調症の重要なマイクロエンドフェノタイプであることを示唆しているが、あくまでも相関関係しか示すことが出来ない。そこで、目的スパインをin vivoで直接光操作できる光感受性プローブAS-PaRac1を開発し、記憶・学習の基盤としてのスパインの重要性を示すことが出来た。今後は、この光プローブを精神疾患病態モデルマウスへ展開することによって、機能的なコネクティクスが疾患モデルマウスでどのように対照マウスと異なるのかを、全脳レベルで定量的に解明していく。



## 精神疾患におけるシナプス超分子構造機能連関の変容

(平成24年度～28年度)

計画班員 廣瀬 謙造 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経生物学

### 研究目的

精神疾患の病態の背景にある分子メカニズムを理解し、診断・治療法の開発を飛躍的に進めるには観察可能な生物学的な指標であるマイクロエンドフェノタイプの同定が重要である。本研究では、ハイコンテントスクリーニング、超解像イメージング等の先端技術駆使し、精神疾患関連遺伝子や精神疾患モデル動物の脳で生じている微細な変化、特に精神疾患のマイクロエンドタイプとなりうるシナプス関連分子の微細配置（超分子構造）の変容を同定することを目的とする。

### 研究背景

統合失調症、自閉症病などの精神疾患における脳機能の障害の背景にシナプス機能の変容があることが明らかになりつつある。今後の精神疾患研究ではシナプス機能と病態をつなぐ重要な遺伝子や、シナプスレベルの微細な変容に着目した研究が重要である。これまでの大規模ゲノム解析に基づく研究によって統合失調症や自閉症のリスク遺伝子として多くのシナプス関連分子が同定されており精神疾患の病態とシナプス機能の異常との関連を示唆する知見が蓄積されつつある (Chen *et al.* *J. Cell. Biol.* 2008)。これまでに同定された多くの精神疾患のリスク遺伝子については遺伝子改変動物が作出され、多くの遺伝子改変動物が精神疾患様の行動を示すことが報告されている (Koob *et al.* *Methods Mol Biol.* 2012)。今後は精神疾患の病態を良く反映した動物モデルの作出に加え、精神疾患モデル動物においてシナプス機能に関する分子についてのより詳細な解析と解析結果のヒトの精神疾患の病態との対応付けが課題となる。

シナプス等の微細な細胞内の構造や分子配置をナノメートルスケールの空間分解能で詳細に解析するためには近年技術の進歩が著しい超解像顕微鏡が有用である。これまでにシナプス関連分子の局在の詳細な解析に超解像顕微鏡技術が導入されており、精神疾患モデル動物でのシナプス機能に異常についても従来の解析手法では見出せなかった微細な分子配置（超分子構造）の変容を同定し、ヒトの病態とモデル動物との接点となることが期待されている。

### 研究結果

#### シナプス機能の変容に着目した自閉症関連遺伝子の検索

精神疾患関連遺伝子を同定するために自閉症と統合失調症患者のゲノム解析によって得られているコピー数変異 (CNV) 情報を基にした分子スクリーニングを行った。本研究では近年の精神疾患研究から重要性が示されているグルタミン酸シグナル系の異常に着目して興奮性シナプスでのグルタミン酸受容体のリサイクリング制御に関与する分子の同定を目指した。そのために、マウス培養大脳皮質神経細胞において対象遺伝子のノックダウンと過剰発現をした際に生じるグルタミン酸受容体のシナプスへの組み込み効率の変化を定量できるハイコンテントイメージング解析系を構築した。この解析系を用いることで、ヒトの16p11.2ローカスに位置する遺伝子 (Sez612) をグルタミン酸受容体のシナプス組み込みに関与する遺伝子として同定した。続いて、作出したSez612ノックアウトマウスについて行動解析を行い、常同行動やコミュニケーション障害、固執傾向等の幅広い自閉症様行動を示すことを明らかにした。また、生化学的及び薬理的解析によってSez612はβセクレターゼであるBACE1によって切断されて細胞外に放出され、その結果グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスの効率の調節に関与することを明らかにした。自閉症とSez612との関係について吉川チームとの連携により、複数の自閉症患者においてSez612の変異を同定し、そのうちの7つの変異体はグルタミン酸のシナプス組み込みに障害があることを明らかにした。

## シナプス分子の超分子構造解析に資する超解像顕微鏡プラットフォームの開発

シナプス分子の超分子構造の可視化解析に供する超解像顕微鏡システムの整備を行った。多数の一分子蛍光の明滅画像から再構成的に超解像画像を取得する3D-STORM顕微鏡法と励起範囲を光学的に限局させるSTED顕微鏡法をベースにシナプス分子の超分子構造の解析に資する超解像顕微鏡プラットフォームを開発した。一分子蛍光画像データから分子の存在位置を推定する最尤推定法を採用したアルゴリズムをGPGPU上に実装した解析ソフトウェアを開発し、超解像イメージの高速取得を実現した。また、超解像イメージから超分子構造の特徴を客観的に抽出し、分子の空間分布を評価するためにRipleyのK 関数法を組み込んだ解析ソフトウェアを完成させた。複数種の分子の超分子構造のシナプス内での空間パターンの比較のための光学系の設計と実装、及び異なった分子間の空間的位置関係を評価するpair correlation 関数などを利用した空間分布解析系を構築した。

開発した超解像顕微鏡プラットフォームは既存の様々なシナプス機能の評価法と組み合わせた運用が可能である。本研究ではグルタミン酸イメージングによってシナプスからのグルタミン酸放出の特性を調べ終えた標本を免疫染色し、超解像イメージングを行うことによってシナプス毎にシナプス機能とシナプス分子の超分子構造との直接的な対応付けを可能にした。この解析プラットフォームを導入することで、Munc13-1分子がプレシナプスのアクティブゾーンで形成する直径70nm程度の分子クラスターの個数がシナプス小胞の放出部位の数を規定することを明らかにした。

## 精神疾患モデルでのシナプス分子超分子構造の解析

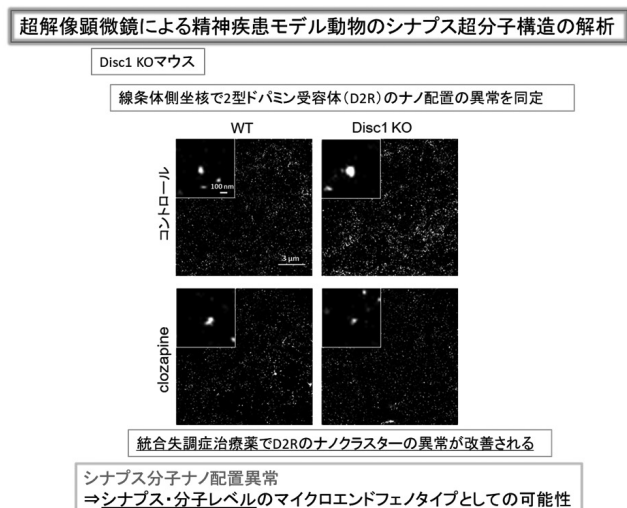
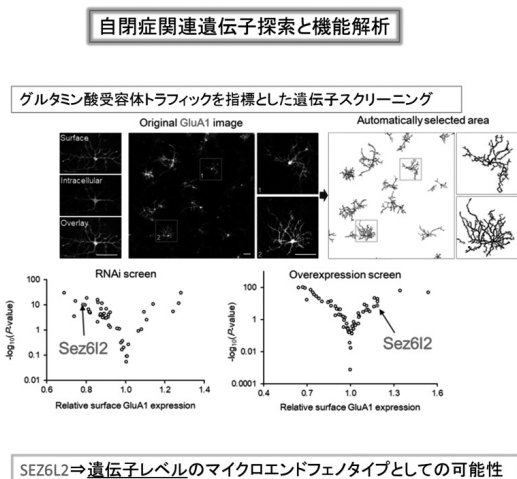
先行研究において精神疾患様の行動が確認されている複数の遺伝子改変マウスの脳内各部位でのシナプス分子の微細な配置の変容を解像顕微鏡プラットフォームを用いて検索した。その結果、Schnurri-2ノックアウトマウス (Takao K, *et al.* *Neuropsychopharmacology*. 2013) では海馬内顆粒細胞層のシナプスにおいて形成されているグルタミン酸受容体GluA1サブユニットの80 nm程度のナノクラスターの大きさや数が野生型マウスの標本と比べて著明に減少していることを明らかにした。

DISC1ノックアウトマウス (Kuroda K, *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 2011) の解析では海馬、大脳皮質、線条体を中心にシナプス関連分子の微細配置を解析した。その結果、線条体側坐核においてドパミン受容体2型サブユニット (D2R) が形成する70 nm程度の大きさのナノクラスターの大きさ、数がDISC1ノックアウトマウスでは有意に増加していることを明らかにした。加えて、DISC1ノックアウトマウスの線条体側坐核のmedium spiny neuronのスパインについてGolgi-Cox染色法によって調べた結果、当該部位においてスパインの数が野生型マウスと比べて著しく減少していることを明らかにした。DISC1ノックアウトマウスでのD2Rのナノクラスターやスパイン形態の変容は非定型統合失調症治療であるクロザピンの投与によって野生型のレベルまで回復することを明らかにした。以上の結果は、シナプス分子の超分子構造が詳細な作用機序が不明であった精神疾患治療薬の薬物作用点である可能性を示唆するものであり、今後の精神疾患の病態分子メカニズムや創薬における新規の戦略の開発に貢献する可能性がある。

## まとめ

本計画研究では、精神疾患のマикроエンドフェノタイプとしてシナプス機能への関与が考えられる遺伝子や分子の微細配置 (超分子構造) に着目して研究を進めた。ハイコンテントスクリーニングでは自閉症関連遺伝子としてSez6l2を同定し、Sez6l2によるグルタミン酸受容体のトラフィック機能の調節機構を明らかにした。Sez6l2ノックアウトマウスは多様な自閉症様行動を示すことから今後の自閉症の分子メカニズムの解明や創薬研究への応用が期待できる。加えて、新規に構築した超解像顕微鏡プラットフォームを精神疾患モデル動物の解析に導入することで海馬や線条体においてシナプス関連分子の超

分子構造の変容をマイクロエンドフェノタイプとして同定するとともに、超分子構造の治療標的としての可能性を示した。



(左図) ハイコンテンツスクリーニングによる自閉症関連遺伝子Sez612遺伝子の同定と機能解析。(右図) 超解像顕微鏡法を用いた精神疾患モデル動物におけるシナプス分子の超分子構造の変容の同定及び超分子構造異常の精神疾患治療薬による改善効果。

## 双極性障害の原因神経回路の解明

(平成24年度～28年度)

計画班員 加藤 忠史 理化学研究所脳科学総合研究センター チームリーダー

### 研究目的

双極性障害は、主要な精神疾患の一つである。リチウムなどの気分安定薬がその予防に有効であるが、副作用が強く、新たな薬剤の開発が期待されている。しかし、モデルマウスが存在しないことなどから、新規気分安定薬の開発は未だ成功していない。また、抗うつ薬は双極性障害の経過を悪化させるため、使わない方が良くとされているが、初発のうつ状態ではうつ病と診断する他なく、診断法の開発が急務となっている。診断法、治療法を開発するためには、その原因を細胞レベルで解明することが必要である。

しかしながら、これまでの双極性障害研究は、ゲノム研究と脳画像研究が中心であり、その間の神経細胞および神経回路レベルの病態についてはほとんどわかっていなかった。

本研究の目的は、双極性障害の細胞レベルでの病態、すなわちマイクロエンドフェノタイプを、動物モデルを用いて同定し、患者死後脳で確認することである。

### 研究背景

我々はこれまでに、双極性障害患者の磁気共鳴スペクトロスコピーにより、ミトコンドリア病類似の脳エネルギー代謝障害を見いだした<sup>2)</sup>。ミトコンドリア病では高頻度に双極性障害を合併することが報告されている。また、双極性障害患者の死後脳で、代表的なミトコンドリア病の一つである慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO) に特徴的な所見である、ミトコンドリアDNA (mtDNA) 欠失の蓄積が見られた。

我々は、双極性障害の発端者およびその両親を含む79のトリオ家系の全エクソーム解析を行った。その結果、蛋白変化を引き起こすデノボ変異を持つ患者では発症年齢が低いこと、双極性障害で見られる機能喪失デノボ変異は、一般人口ではこうした変異があまり見られない遺伝子に多いこと、双極I型障害および統合失調感情障害では、対照群に比して有意に多くの機能喪失デノボ変異が見られ、Ca<sup>2+</sup>結合蛋白の遺伝子が多いことなどから、デノボ変異が双極性障害の発症に関与している可能性を示した。また、Ca<sup>2+</sup>チャネルとの関連を示したゲノムワイド関連研究の結果や、双極性障害を伴う遺伝病が小胞体またはミトコンドリアという細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアの疾患であることと合わせ、双極性障害の病態に細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナリングが関与することが示唆された。

また、CPEOの原因遺伝子の一つであるポリメラーゼ $\gamma$  (Polg) を、双極性障害患者および対照群でシーケンスした。見出されたアミノ酸置換を引き起こす変異について、蛋白を作成し、酵素活性を測定した<sup>4)</sup>。その結果、双極性障害患者で見られる変異は、*in silico*予測で機能障害の程度が高く、活性測定でも酵素活性を低下させるものが多かった。またCPEOの原因変異は、双極性障害患者796名中3名に見られ、対照群 (767名中0名) に比べ有意に多かったことから、PolgのCPEO原因変異は、双極性障害のリスク因子となると考えられた。

そこで、CPEOの原因遺伝子 (Polg) の変異マウスがモデルマウスになると考えた。変異Polgのノックインマウスは、筋に変異が蓄積するため、行動解析に適さないことから、Polgの変異体を脳だけに発現させた遺伝子改変マウスを作成した。

このマウスでは、2週間ほど続く輪回し行動量の低下が見られ、この活動低下を詳細に分析した結果、この状態は平均半年に1回見られ、うつ病の診断基準 (興味喪失、睡眠障害、食欲の変化、動作の緩慢、疲れやすい、社会行動の障害) を満たすことがわかった。

この状態は、うつ病に類似した生理学的変化 (副腎皮質ホルモンの増加など) を示した。また、この状態は、選択的セロトニン取り込み阻害薬で減少、リチウム中止後増加すること、過眠・過食という非定型症状を呈すること、三環系抗うつ薬が躁転様の行動量増加を引き起こすことなどから、双極性障害

の抑うつエピソードに類似していると考えられた。

双極性障害のマイクロエンドフェノタイプを明らかにするには、このマウスの行動変化がいかなる神経回路の障害によるのかを明らかにする必要がある。

そこで、本研究では、このモデルマウスを用いて、双極性障害の原因神経回路を探索した。

## 研究結果

活動低下エピソードの原因となる脳部位を明らかにするため、異常なmtDNAが多く蓄積している脳部位を探索した。マイクロダイセクション装置を用いて、凍結脳切片を小片に切り分け、各小片からDNAを抽出し、欠失mtDNAをリアルタイムPCR法により定量した。その結果、欠失mtDNAの分布は、トランスジーンの発現量とは相関せず、情動関連部位に多く蓄積していた。中でも、視床室傍核(PVT)に最も多く蓄積が見られた。mtDNA由来蛋白質であるチトクロームc酸化酵素(Cox)と核DNA由来ミトコンドリア蛋白であるコハク酸デヒドロゲナーゼ(SDH)の二重染色により、PVTにはCox陰性細胞が集積していることがわかった。Cox陰性細胞をダイセクションして、リアルタイムPCR法により検討したところ、Cox陰性細胞にはmtDNA欠失が蓄積していることがわかった。

うつ状態を示したミトコンドリア病患者の死後脳で検討を行ったところ、同様のCox陰性細胞が視床室傍部に見られた。

このマウスで見られたうつ様エピソードにおけるPVTの意義を明らかにするため、loxPにより囲まれたstopシグナルの後にTetオペレーターをつないだトランスジーンと、Tetにより破傷風毒素を発現するトランスジーンの両方を持つトランスジェニックマウスにおいて、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてPVTにCreを発現させ、PVTの神経細胞の神経伝達を人為的に遮断し、行動解析を行った。その結果、類似のエピソードが現れた。これは、モデルマウスのうつ状態が、PVTの病変により生じていることを示している。

## まとめ

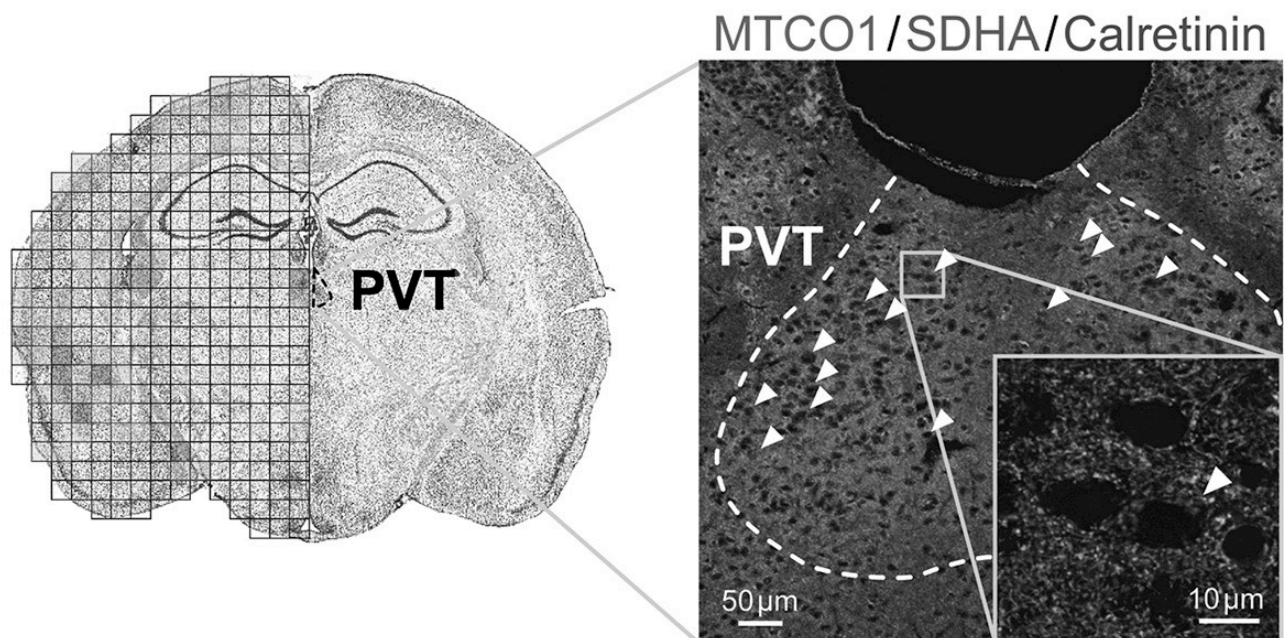
視床室傍核(PVT)は、視床下部外側野のオレキシンニューロン、視床下部室傍核のCRHニューロン、縫線核のセロトニンニューロンなどからの投射を受け、側坐核、扁桃核、内側前頭前野など、情動に関わる脳部位に投射を送る部位であり、気分障害との関連が疑われるほとんどの部位と線維連絡を持つことから、気分障害の原因神経回路の中核を占めると考えられる。近年PVTは、恐怖条件付けやオピエートの離脱症状に関わっていることが明らかにされるなど、その情動制御における役割が注目されているが、報酬に関わる側坐核と恐怖に関わる扁桃核の両方を同時に制御しているPVTの異常がどのようにして躁とうつという対極的な症状を呈するのかという点が、今後の課題であろう。

なお、このモデルマウスのPVTにおいて細胞死が起きていれば、神経幹細胞による治療の標的にもなり得ると考えられるが、これまでの検討では、アストロサイトの活性化やミクログリアの集積など、細胞死を示唆する所見は得られなかった。今後、このマウスのPVTにおいて、どのような細胞レベルの病態が生じているのかという点も明らかにしていく必要がある。

今回見いだされた、PVTの神経変性を伴わないミトコンドリア機能障害は、双極性障害のマイクロエンドフェノタイプとなりうるものである。

また、このモデルマウスは自発的かつ反復的なうつ状態を示すモデルマウスとしては初めてのものであり、これまでとは作用メカニズムが異なる抗うつ薬や気分安定薬の開発につながると期待できる。

今後の研究で、双極性障害やうつ病の一部が、PVTの病変で起きることが証明できれば、精神疾患を脳病理所見により定義することができ、新しい診断法の開発につながる可能性がある。



左) 双極性障害モデルマウスにおいて病変を探索した結果、視床室傍核にmtDNA欠失が蓄積していることがわかった。

右) この部位にはCox(チトクロームc酸化酵素)陰性細胞が集積していた。

T, Kato T., *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 71: 518–529, 2017

# グルタミン酸シグナルを介した精神疾患病態に関するマイクロエンドフェノタイプの解明

(平成24年度～28年度)

計画班員 橋本 謙二 千葉大学社会精神保健教育研究センター 教授

## 研究目的

精神疾患のマイクロエンドフェノタイプのうち、最も知られているのは、統合失調症やうつ病などの気分障害の脳における樹状突起スパイン密度の変化である。代表的な興奮性アミノ酸であるグルタミン酸は、統合失調症や気分障害の病態に深く関わっていることが知られている。特に、グルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体は、精神疾患の病態に関与しており、新しい治療ターゲットとして期待されている。本研究では、NMDA受容体の内在性調節因子D型セリンおよびNMDA受容体拮抗薬ケタミンを用いて、精神疾患病態に関するマイクロエンドフェノタイプを明らかにすることを目的とした。

## 研究背景

統合失調症のNMDA受容体機能低下仮説は、古くから提唱され、現在も支持されている仮説である。すなわち、NMDA受容体拮抗薬であるフェンサイクリジンやケタミンを健常者に投与すると、統合失調症と酷似した症状（陽性症状、陰性症状、認知機能障害）を引き起こすことから提唱された。これまで我々は、NMDA受容体の内在性調節因子D型セリンの低下が、NMDA受容体機能低下仮説に関係していることを報告してきた。本研究では、D型セリンとD型セリンの合成酵素セリンラセマーゼ（serine racemase: *srr*）遺伝子欠損マウスを用いて、統合失調症のマイクロエンドフェノタイプにおけるD型セリンの役割を調べた。

近年、うつ病のグルタミン酸仮説が注目されている。NMDA受容体拮抗薬ケタミンが、治療抵抗性うつ病患者に対して、即効性の抗うつ効果を示すことが報告され、欧米ではケタミンの適応外使用が普通に行われている。本研究ではうつ病の動物モデル、ケタミンの光学異性体を用いて、うつ病のマイクロエンドフェノタイプの解明を行った。

## 研究結果

統合失調症の母体感染モデル（妊娠期にPolyICを投与）を用いて生まれた仔マウスは、4-5週齢では認知機能障害が観察され、統合失調症の前駆期のモデルとして考えられ、成熟期（10週齢以降）には統合失調症様の行動異常やバルブアルブミン陽性細胞の低下が観察される。この系で、4週齢から8週齢までD型セリンを飲料水で飲ませると、成熟期（10週齢以降）における行動異常を予防することが判った。本研究は、ハイリスク児にD型セリンを服用すると、精神病への移行を予防できる可能性を示唆した。また、*Srr*遺伝子欠損マウスを用いたメタボロミクス解析を実施したところ、この遺伝子は解糖系に影響を与えることを見出した。

炎症を惹起するリポポリサッカライド（LPS）を投与したマウス脳を詳細に調べると、前頭皮質や海馬では、樹状突起スパイン密度が低下し、逆に側坐核では増加していることを見出した。興味深いことに、これらのスパイン密度の変化は、脳由来神経栄養因子（BDNF）の変化と関連しており、TrkB化合物が抗うつ効果を示すことを明らかにした。一方、マウスやラットに繰り返しのストレスを与えると、うつ症状や樹状突起スパイン密度の変化を示すことが知られている。社会的敗北ストレスモデルや学習性無力モデルを用いた結果、前頭皮質や海馬では、樹状突起スパイン密度が低下し、逆に側坐核では増加していることを見出した。興味深いことに、これらのスパイン密度の変化は、脳由来神経栄養因子（BDNF）の変化と関連した。TrkB作動薬（7,8-dihydroxyflavone）は、前頭皮質や海馬におけるBDNF-TrkBシグナルの低下を改善することにより抗うつ効果を示す。一方、TrkB拮抗薬ANA-12は、側坐核におけるBDNF-TrkBシグナルの亢進をブロックすることにより抗うつ効果を示すことを明らかにした（図）。



ニコチン受容体の $\alpha 7$ サブタイプは、うつ病などの精神疾患の病態に関わっていることが知られている。今回、 $\alpha 7$ ニコチン受容体遺伝子欠損マウスがうつ症状を示すこと、またこの遺伝子欠損マウスは、前頭皮質および海馬は正常で、側坐核のBDNF-TrkB系が亢進してうつ症状を示すことを見出した。興味深いことに、TrkB拮抗薬ANA-12は、この遺伝子欠損マウスのうつ症状を改善するが、TrkB作動薬には抗うつ効果は無かった<sup>6)</sup>。同様に、覚せい剤の繰り返し投与で惹起されるうつ症状（離脱症状の一つ）も、側坐核におけるBDNF-TrkB系が亢進しておきることを見出した。

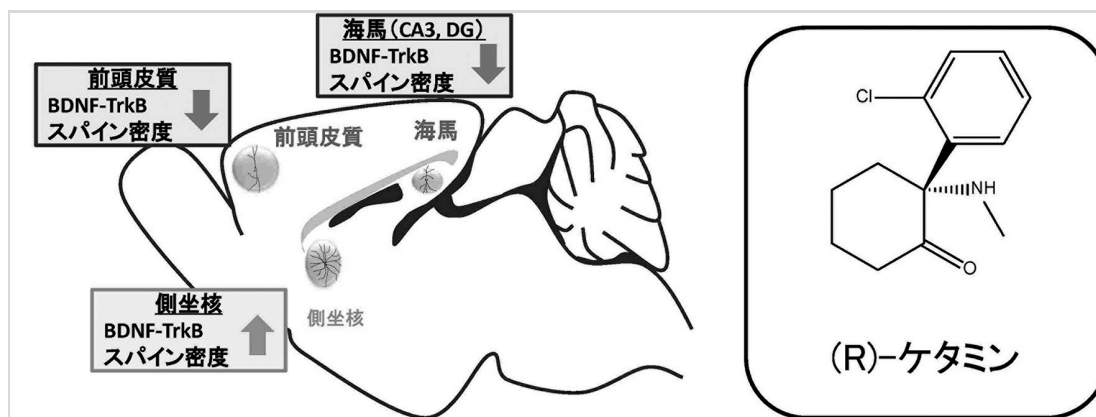
さらに、炎症や酸化的ストレスに関わる転写因子Nrf2の遺伝子欠損マウスは、前頭皮質や海馬におけるBDNF-TrkB系の低下によってうつ症状を示すことを見出した。また脂肪酸代謝に関わる可溶性エポキシド加水分解酵素および前頭皮質におけるEphA4-ephexin1系の亢進がうつ病の病因に関係することを明らかにした。このように、うつ症状には、前頭皮質および海馬におけるBDNF-TrkB系の低下によって起きる症状と、側坐核におけるBDNF-TrkB系の亢進で起きる症状があると推測される（図）。これらの違いが、既存の抗うつ薬に反応する群、反応しない群（治療抵抗性）に分かれる要因の一つであると推測している。

NMDA受容体拮抗薬ケタミンの抗うつ効果は、未だ詳細は機序は明らかでない。我々は、NMDA受容体への親和性が弱いR-ケタミンの方が、NMDA受容体への親和性が高いS-ケタミンより抗うつ効果が強く、副作用（精神病惹起作用、薬物依存等）が少ないことを見出した。また前頭皮質におけるパルブアルブミン陽性細胞の低下は、S-ケタミンの投与では起きるが、R-ケタミンの投与では起きなかった。さらに、無麻酔サルPETを用いた研究からも、S-ケタミンは、線条体におけるドパミン放出を起こすが、R-ケタミンでは起きなかった。

さらに気分障害の生体試料（血液、CSF）のメタボロミクス解析を実施し、気分障害のバイオマーカー（イスクエン酸、アスコルビン酸など）を見出した。さらに、精神疾患の死後脳を用いて、脳-肝連関の重要性を提唱した。

## まとめ

統合失調症病態のマイクロエンドフェノタイプにおけるD型セリンの役割、うつ病のマイクロエンドフェノタイプにおける脳部位におけるBDNF-TrkB系の関係を明らかにした。さらに、副作用を軽減した新規抗うつ薬R-ケタミンを開発した。



### うつ病脳のマイクロエンドフェノタイプ

うつ病の脳部位におけるマイクロエンドフェノタイプ:前頭皮質や海馬におけるBDNF-TrkB系の低下が原因で起きるうつ症状群と、側坐核などの報酬系のBDNF-TrkB系の亢進が原因で起きるうつ症状群が存在する。

副作用の少ない新規抗うつ薬候補化合物 (R) -ケタミンの構造式

## 精神神経免疫相関が関与する精神疾患病態のマイクロエンドフェノタイプの解明

(平成24年度～28年度)

計画班員 富田 博秋 東北大学 災害科学国際研究所 災害精神医学分野 教授

### 研究目的

本申請研究では精神神経免疫相関現象の病態への関与が示唆される心的外傷後ストレス障害(PTSD)、統合失調症、気分障害の末梢血液等の免疫細胞の病態を網羅的分子遺伝学的解析により特定するとともに、免疫細胞の病態変化が中枢神経病態や行動とどのように関連しているかを死後脳研究、動物研究により解明し、マイクロエンドフェノタイプを利用した精神病態の新規診断方法や治療法の開発を目指して下記の目的で研究を行った。

- (1) 心的外傷後ストレス障害のマイクロエンドフェノタイプとしてのミクログリア機能を特定すること
- (2) 胎生期の母体免疫ストレス負荷による統合失調症罹患性惹起メカニズムに関わるエンドフェノタイプを特定すること
- (3) 精神疾患に関与する免疫細胞サブポピュレーションの特定の技術を開発すること
- (4) 気分安定薬の薬効に関連する免疫関連マイクロエンドフェノタイプを特定すること

### 研究背景

精神神経免疫相関現象の精神疾患病態への関与が示唆されて久しいが、精神疾患のミクログリアや末梢免疫細胞における病態に関連する変化の詳細は不明のままであった。

例えば、心的外傷後ストレス障害(PTSD)の病態は神経回路のレベルで恐怖記憶の固定化・持続という観点から、動物モデルで精力的に解明が進んでいる一方、これまでにPTSD罹患患者の血液やストレスを与えられたモデル動物の脳における炎症性サイトカインの発現異常が指摘されてきた。アストロサイトとともに脳内で炎症性サイトカインを産生するミクログリアは末梢の免疫細胞と類似の由来、機能を持ち、中枢神経内の免疫・炎症制御の中心的役割を担うと考えられている。近年では、それに加えて、神経細胞のシナプスの刈込を調整する等、神経回路機能調整にも関わっていることが明らかになっている。炎症は精神現象と異なり、ある程度、客観的に把握し得る現象で、末梢の組織でも脳内と共通のメカニズムで炎症が生じることから、脳内の現象を反映する末梢血液中のバイオマーカーの特定が有用な切り口になることが想定された。

一方、近年、精神疾患の末梢血液検体の網羅的分子遺伝学的解析が多く報告されるようになってきているが、血液の細胞構成が多様であること、末梢血の現象が中枢神経病態の何を反映しているかが不明であることは、これらの研究の解釈を困難にしていた。

以上のことより、精神神経免疫相関現象の精神疾患病態への関与に着目して、精神疾患のマイクロエンドフェノタイプを特定し、免疫や炎症に着目した精神疾患病態解明や治療法開発を進めるための研究基盤を構築するための研究企画が望まれた。

### 研究結果

#### (1) 心的外傷後ストレス障害のマイクロエンドフェノタイプとしてのミクログリア機能の特定

電気刺激を受けたことのない対照マウスでは、観察時間中、行動がすくむことはなく動き続けるのに対して、恐怖記憶固定マウス群では全観察時間の50%程度の時間、行動がすくんでいた。一方、恐怖記憶消去マウス群では、すくみ反応時間が25%程度まで減少した。恐怖体験を経験していない対照マウスの脳においては、記憶に関与する海馬において前述のミクログリア細胞全体のうち、炎症性サイトカインであるTNF $\alpha$ を産生する活性化ミクログリアは30%程度であったのに対し、恐怖記憶固定マウスではその比率が50%近くまで上昇した。

これに対して、恐怖記憶消去マウスではTNF  $\alpha$  を産生する活性化ミクログリアの比率が30%を切るまでに減少した。このことから、恐怖体験の過程でミクログリアのTNF  $\alpha$  産生が高まり、その産生の低下が恐怖記憶の消去と相関していることが示唆された。

上記と同じ方法で恐怖記憶の固定・消去への効果を検証する際に同時にミノサイクリンを投与されたマウスでは、始めから電気刺激を与えられていない対照マウスと同様にほとんど止まることなくずっと動き続け、顕著な恐怖記憶消去の促進効果が認められた。海馬において、炎症性サイトカインTNF  $\alpha$  を産生するミクログリアの比率も恐怖記憶の消去に伴って50%近くから30%を切るまでに減少することが再現されたが、ミノサイクリン投与によりその比率は5%前後まで落ちており、ミノサイクリンによる顕著なミクログリアTNF  $\alpha$  産生抑制が観察された。

以上のことから、恐怖記憶の消去にはマウス海馬のミクログリアTNF  $\alpha$  産生亢進の減少が関与していることが示され、ミノサイクリン等のミクログリアTNF  $\alpha$  産生を抑制する薬剤が心的外傷後ストレス障害の病状を改善する可能性が示唆された (*Brain Behav Immun.* 2017 ; 論文)。

## (2) 胎生期の母体免疫ストレス負荷による統合失調症罹患性惹起メカニズムに関わるエンドフェノタイプの特定

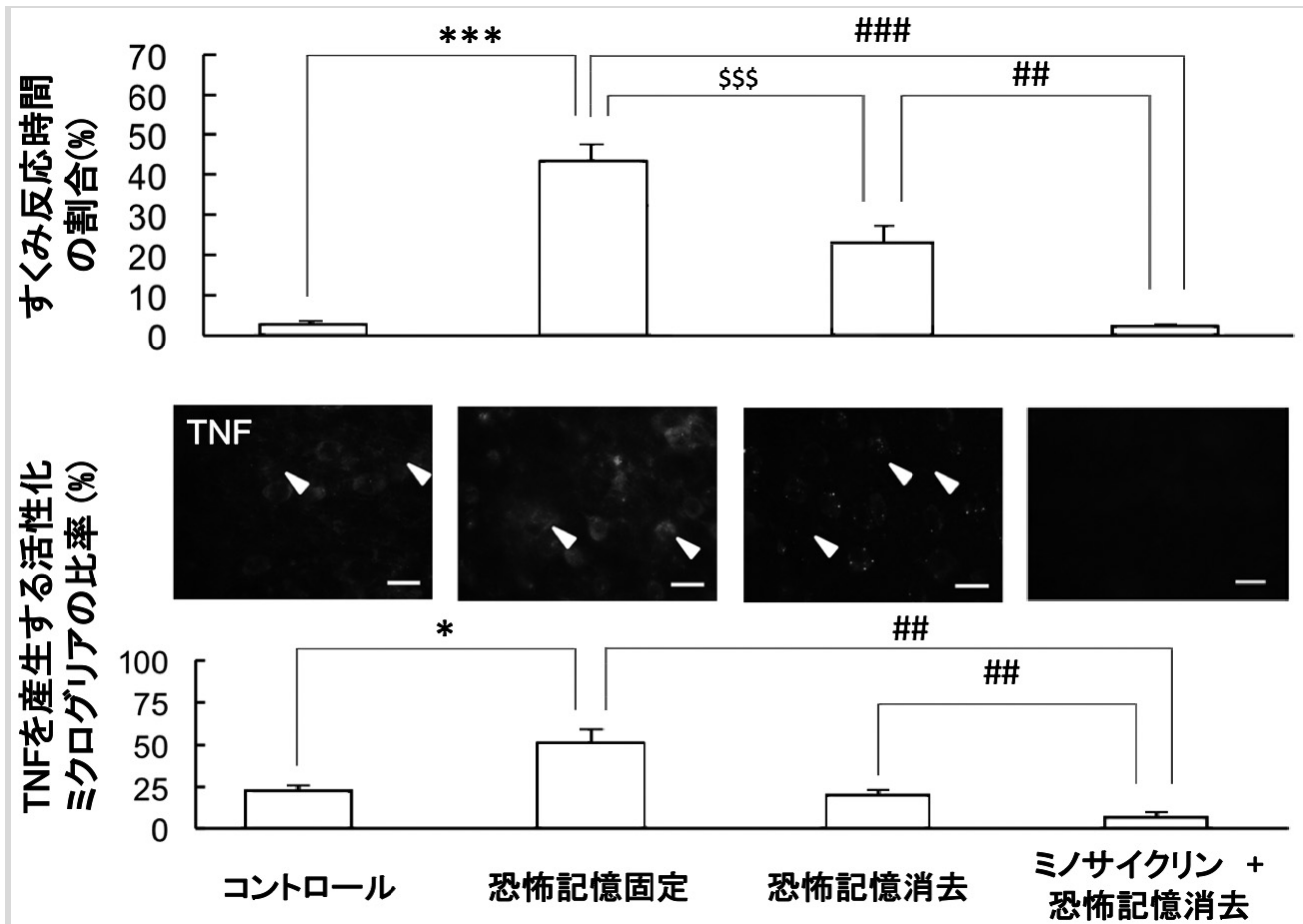
妊娠マウスにウイルスの dsRNA と同様の免疫活性を持つ polyinosinic- polycytidylic acid (poly I:C) を投与し、その仔の成長後の行動を検証し、統合失調症モデルマウスとしての行動特性を認めた。雌雄差が認められ、特に雌マウスにおいて顕著であった。更に、脳内の遺伝子発現とDNAメチル化のプロファイリングにおいても、雌マウスに顕著な変化が観察された。マウスモデルにおける実験結果と死後脳組織での検証により、グリア関連遺伝子のゲノム領域のメチル化と遺伝子発現を胎生期の母体免疫ストレス負荷による統合失調症罹患性惹起メカニズムに関わるエンドフェノタイプとして特定した。

## (3) 精神疾患に関与する免疫細胞サブポピュレーション特定ための技術開発

精神疾患に関与する免疫細胞サブポピュレーションの特定に向けての基盤技術として、精神疾患病態への関与が知られているTh1、Th2ヘルパーT細胞特異的な新規細胞表面マーカーを特定した (*Plos One.* 2014 ; 論文)。本知見は精神疾患に関与する免疫細胞サブポピュレーションであるTh1、Th2ヘルパーT細胞を特定するための技術開発に繋がることを期待される。

## (4) 気分安定薬の薬効に関連する免疫関連マイクロエンドフェノタイプの特定

双極性障害に有効な気分安定薬リチウムがミクログリアや末梢の分化単球系細胞の補体C3の産生を顕著に亢進させることを特定し、リチウム治療の奏功機序、副作用発現機序の解明を進めるとともに、双極性障害のリチウム治療への反応性や副作用出現のバイオマーカーとしての応用の可能性を示唆するエビデンスを得た。また、ミクログリア由来の培養細胞で、リチウムによる遺伝子発現変化がリチウムの標的分子として知られているグリコーゲン合成酵素リン酸化酵素を介した現象であることを確認した。リチウムの奏功機序、ないし、その副作用発現にリチウムのミクログリアと末梢単球系細胞の補体C3産生能への影響が関与しており、末梢単球系細胞のC3定量により、リチウム療法の治療反応性や副作用発現を予見できる技術開発に繋がる可能性が示唆された (*Glia.* 2015 ; 論文)。



恐怖記憶固定マウスではすくみ反応時間が有意に上昇した。一方、恐怖記憶消去マウスでは有意に減少するが、抗炎症作用のあるミノサイクリンを投与するとその減少が有意に促進された（上図）。これに対応して恐怖記憶固定マウスでは海馬ミクログリアにおけるTNFの産生が増加し、恐怖記憶の消去マウスでは減少したが、ミノサイクリンを投与によりTNF産生の減少は更に促進された（中・下図）。

# 環境要因が導く精神疾患モデルを用いたマイクロエンドフェノタイプ同定と分子基盤解明

(平成24年度～28年度)

計画班員／領域代表 喜田 聡 東東京農業大学・応用生物科学部・教授

## 研究目的

心的外傷後ストレス障害 (Post traumatic stress disorders; PTSD) は交通事故等の恐怖体験により発症するため、身近な精神疾患であると言えよう。しかし、その発症メカニズムは不明である。現在、恐怖体験の記憶、すなわち、恐怖記憶を繰り返し想起させる「持続エクスポージャー (暴露) 療法」がPTSDの最も有効な認知行動療法とされているが、手間とコストがかかるため、簡便なPTSD治療法開発が待たれている。

恐怖記憶は動物からヒトに共通する生物の防御反応の一つであり、PTSD発症の原因は恐怖記憶制御の破綻であると理解されている。古くから、げっ歯類の恐怖条件付け課題を用いて、恐怖記憶を形成する「固定化」機構が解析されてきた。興味深いことに、近年の解析から、恐怖記憶を想起すると「不安定化」され、「再固定化されることが示された。一方で、恐怖記憶を想起させ続けると恐怖を減弱させる「消去」も誘導される。重要な点として、この記憶消去は暴露療法の生物学的基盤であると認識されつつある。最近では、再固定化と消去はPTSD治療の標的として注目され、これら記憶プロセス群を標的として暴露療法の迅速化が試みられている。

以上の背景の中で、我々のグループでは、想起後の恐怖記憶制御機構の分子・細胞・回路レベルの解析を進めてきた。恐怖記憶再固定化の分子機構を世界で初めて解明し、再固定化と消去は行動学・組織学・生化学的に対照的な性状を示すこと、さらに、再固定化と消去は独立したプロセスではないことを明らかにしてきた。さらに、恐怖記憶制御回路は多領域にまたがること、しかも、想起後にダイナミックに変化することを示してきた。

本課題では、PTSD病態と関連する恐怖記憶制御のマイクロエンドフェノタイプを同定し、さらに、恐怖記憶制御回路の性状とこれらの機能的役割を解析することを目的とした。

### 1. 恐怖記憶想起により恐怖が増強される新規PTSDマウスモデルの開発

PTSDモデルとして、パブロフ型恐怖条件付け課題がヒト及びげっ歯類において世界的に用いられている。しかし、この課題では、条件刺激に再エクスポージャーすると恐怖記憶は想起されるものの、非条件刺激が与えられない条件下では、即座に恐怖記憶消去が誘導される。このため、恐怖記憶の想起によって、PTSDが発症する過程を再現することができなかった。そこで、受動的回避反応課題を用いて、この欠点を克服した新規PTSDモデルの開発を試みた。受動的回避反応課題では、明箱から暗箱に移ると電気ショックを与えられて恐怖記憶を形成させるため、明箱に戻すだけでは、恐怖記憶が想起されるものの、消去は誘導されない。そこで、この課題における明箱にのみマウスを戻す効果を検討した結果、明箱にマウスを戻すだけで、すなわち、電気ショックを与えなかったにも関わらず、恐怖記憶が増強されることが明らかとなった。以上の結果から、本系は、恐怖記憶を思い出させるだけで恐怖が増強される、より妥当性の高いマウスPTSDモデルであると結論した。

### 2. 恐怖記憶回路の同定とその性状、機能的役割の解析

上記の新規PTSDモデルを用いて、恐怖記憶想起後に恐怖が増強されるメカニズムを解析し、想起後の恐怖記憶増強の基盤は記憶再固定化であることを示した。さらに、恐怖増強回路として、扁桃体、海馬と前頭前野にまたがる回路を同定し、回路内のニューロンでは、脱リン酸化酵素カルシニューリンを起点とするプロテオソーム依存的タンパク質分解が記憶不安定化を誘導し、転写因子CREBによる遺伝子発現活性化が再固定化を誘導していることが示された。以上より、「扁桃体-前頭前野皮質-海馬」回路が恐怖体験後のPTSD発症と関連するマイクロエンドフェノタイプであると考えられた。恐怖条件付け文脈課題との比較から、この回路における前頭前野の過活性化がPTSD発症と関連すると考察した。

### 3, 恐怖記憶消去回路の同定と機能解析

消去誘導条件下では、再固定化誘導に伴い誘導される遺伝子発現はキャンセルされ、扁桃体と前頭前野において遺伝子発現が改めて誘導されること、さらに、再固定化時と同様に、消去回路ニューロンでは、カルシニューリン活性化を起点とするプロテオソーム依存的タンパク質分解と転写因子CREBを介する遺伝子発現が同時に活性化されることも明らかにした。さらに、消去特異的な分子動態として、ERKの活性化（リン酸）を同定した。以上のように、扁桃体と前頭前野には再固定化回路と消去回路がそれぞれ独立して存在するものの、それぞれの回路ではニューロン内に同様の生化学的変化が誘導され、再固定化と消去は極めて類似した分子機構により制御される実態が明らかとなった。

### 4, 消去誘導機構の解析

我々の解析では、再固定化時には海馬において遺伝子発現が誘導されるのに対して、消去時には遺伝子発現が誘導されないこと、すなわち、消去が誘導されると、海馬が不活性化されることが示されている<sup>(9)</sup>。そこで、海馬の活性状態により記憶が再固定化、あるいは、消去されるかが決定されると考え、光遺伝学的手法を用いて、この仮説を検討した。前脳にアーチロドプシンT (ArchT)を発現するトランスジェニックマウスを用いて、恐怖記憶想起中に海馬を人為的に不活性化させると、恐怖反応の減少が観察され、海馬不活性化が恐怖記憶を減弱させることが示された。従って、恐怖記憶想起時に、海馬不活性化を介して、恐怖記憶の消去あるいは忘却が誘導されるメカニズムの存在が示唆された。

### 5, 持続エクスポージャー療法の改良法の開発

PTSDの原因となる「古い恐怖記憶」を標的としたPTSD治療方法開発に着手した。まず、「古い記憶」でも想起時間が長くなると再固定化が誘導される研究成果に基づき、「古い恐怖記憶」想起後の記憶制御メカニズムを解析した。「古い記憶」では短い想起時間（3分）であると海馬における遺伝子発現は観察されないものの、想起時間を長くすると（10分）、海馬においても遺伝子発現が誘導されること、10分間の想起後に海馬を不活性化すると恐怖記憶の想起が阻害されること、10分間の想起後に海馬の遺伝子発現を阻害すると再固定化が阻害されることが認められ、「古い恐怖記憶」であろうとも想起時間を長くすると海馬依存性記憶に戻ることが示唆された。

そこで、海馬神経新生が海馬依存性記憶の忘却を促進する知見を応用して、古い恐怖記憶を海馬依存性に戻した後であれば、海馬神経新生を促進することで恐怖記憶を忘却させることができないか解析した（特許出願）。その結果、恐怖記憶形成の8週間後に、上記と同様に10分間想起させて、その後海馬神経新生を活性化した結果、恐怖記憶の忘却が誘導された。従って、トラウマ記憶想起と海馬神経新生亢進を組み合わせることによって、古い記憶であろうとも、トラウマ記憶忘却を効率的に誘導することが可能であり、エクスポージャー療法を短縮できる可能性が示された。

### 6, 恐怖記憶制御及び社会行動制御機構解明

恐怖記憶固定化と再固定化に対して海馬におけるN型糖鎖修飾並びにポリADPリボシル化の翻訳後修飾の必要性を明らかにした。一方、社会行動制御に対する海馬、扁桃体、前頭前野、帯状皮質による回路の重要性を*in silico*解析も併用して明らかにした。

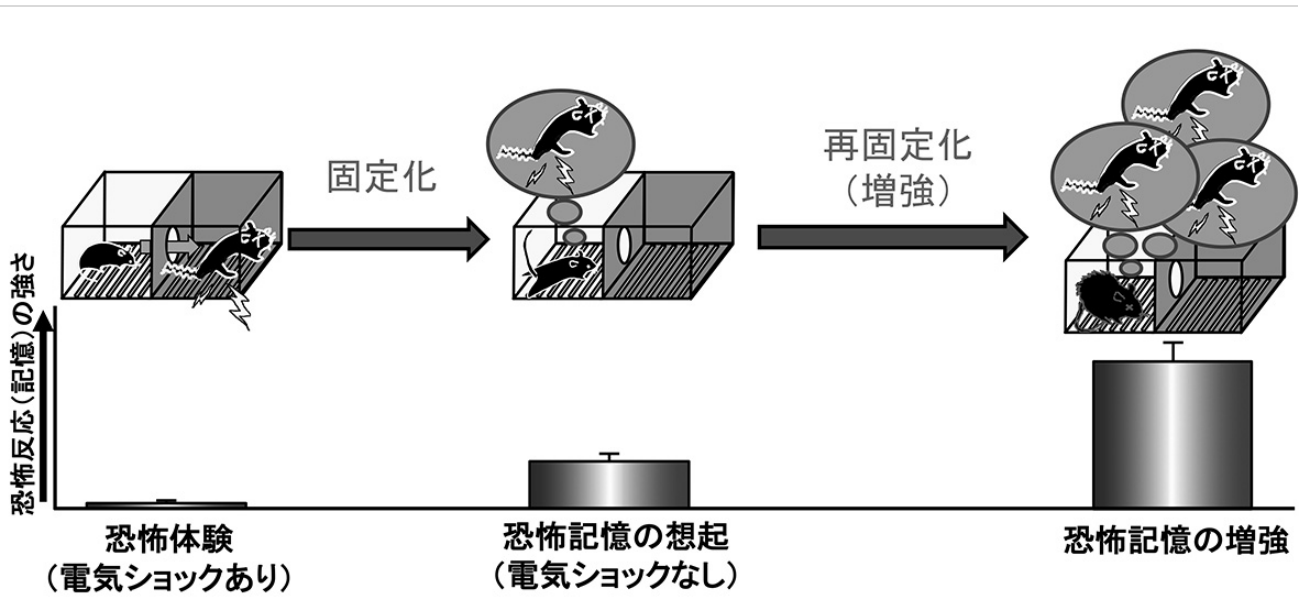
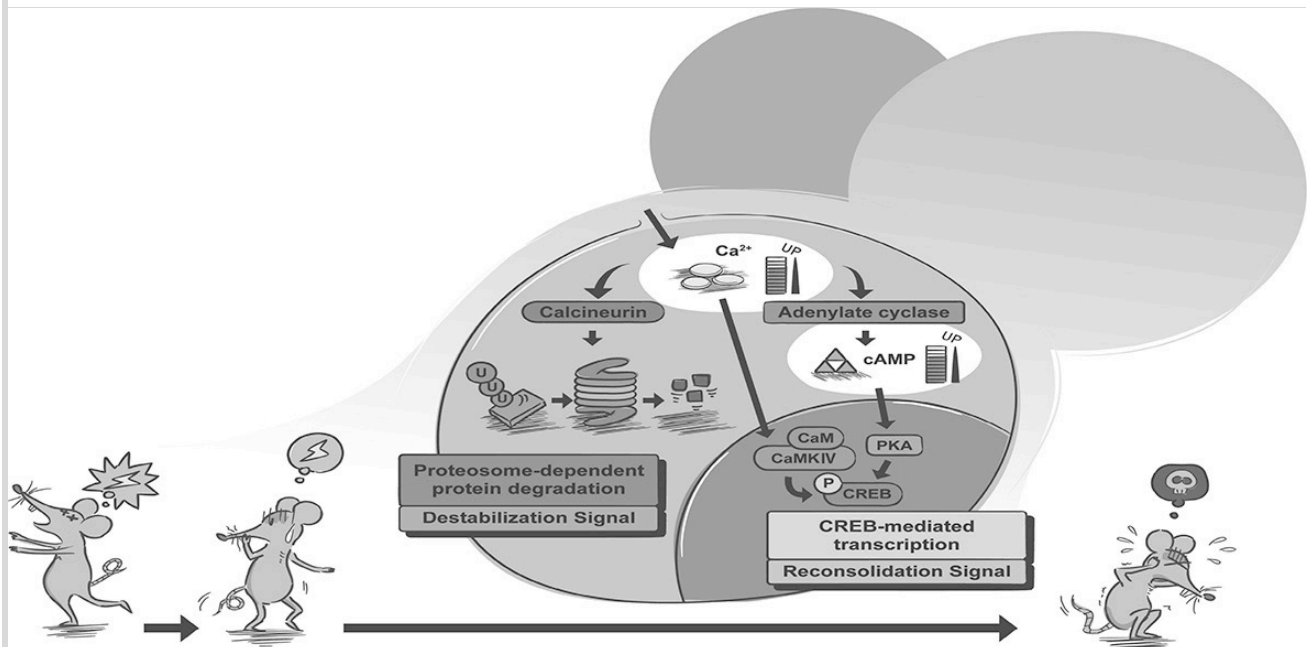


図 受動的回避反応課題における想起後の恐怖記憶の増強



## 精神疾患患者死後脳における神経細胞ゲノム動態の解析

(平成24年度～28年度)

計画班員 岩本 和也 熊本大学大学院生命科学研究部 教授

### 研究目的

神経細胞の核内ゲノム動態として、エピゲノム状態およびゲノム配列の状態を検討し、新学術領域研究「マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出」の達成目標である、精神疾患のマイクロエンドフェノタイプとしての確立が可能であるかどうかを明らかにする。

### 研究背景

脳神経系の細胞は、様々な神経細胞やグリア系細胞から構成されており、細胞種ごとにエピジェネティックな修飾状態が異なっていると考えられている。また、染色体の異数性やトランスポゾン転移など様々な体細胞変異が生じていることも知られている。しかし、これらエピゲノムの状態や体細胞変異が、どのように精神疾患と関係しているかは明らかではなかった。申請者らは、ヒト死後脳から神経細胞を単離する技術を有しており、本技術を使ったゲノム・エピゲノム解析により、精神疾患の病因・病態解析を着想するに至った。

### 研究結果

健常者前頭葉由来神経細胞と非神経細胞の全ゲノムバイサルファイト解析(WGBS)の結果、非CpG部位の神経細胞での高メチル化や、神経細胞・非神経細胞特異的なDNAメチル化状態を明らかにした。また、WGBS解析を行った検体を用いたhmC-Seq解析の結果、神経細胞でのhmCレベルの濃縮が確認され、細胞種特異的遺伝子発現パターンとの一致が認められた。また、トランスポゾンLINE-1配列に着目したエピゲノム状態を調べたところ、進化的に新しいLINE-1サブファミリーであるLIPAやL1HSにおいて低メチル化が認められると共に高いヒドロキシメチル化率の集積が認められた。これらは神経細胞特異的に生じており、公共データベースを利用した肝臓データの解析では認められなかった。

統合失調症および双極性障害患者前頭葉神経細胞でのメチル化解析では、プロモーター領域における全体的な低メチル化傾向が認められた。また、神経機能に重要な遺伝子におけるDNAメチル化変化が同定された。疾患に依存して変動しているDNAメチル化状態については、RRBS法により確認できることを明らかにした。

ゲノム解析として、トランスポゾンLINE-1のゲノムコピー数を患者試料の前頭葉と肝臓でRT-PCR法を用いて測定し、肝臓で補正した値を算出したところ、精神疾患患者群(統合失調症、双極性障害、大うつ病)で有意なコピー数上昇を認めた。特に統合失調症患者群で顕著な上昇を認めたため、統合失調症患者前頭葉の独立した脳サンプルセットを用い追試を行ったところ、神経細胞で有意なコピー数増大を確認することができた。

本所見に基づき、LINE-1コピー数上昇について、動物実験による確認実験を行った。Poly(I:C)化合物が投与された妊娠マウスから生まれた仔マウスについて、前頭葉部位のLINE-1コピー数を測定したところ有意な上昇を再現できた。また、EGFを投与したマカクモデルにおいても有意な上昇を観察することができた。

次に22q11欠失を有し、統合失調症を発症した患者から樹立したiPS細胞を用いた実験を行った。iPS細胞を神経細胞に誘導し、神経細胞核を単離した後にLINE-1コピー数を測定したところ、健常者から同様の実験を行った場合と比べて有意なコピー数の上昇を認めた。

また、健常者3名、統合失調症患者3名について前頭葉と肝臓試料について全ゲノム解析を行い、LINE-1の脳での新規挿入部位の同定と比較を行った。新規挿入部位については、ゲノムの場所および遺伝子の位置との対応関係について群間で有意差は認められなかった。しかし、新規挿入が生じた遺伝子



を比較したところ、患者群では統合失調症に関連していると考えられている遺伝子群や神経機能に重要な遺伝子群への挿入が認められた。

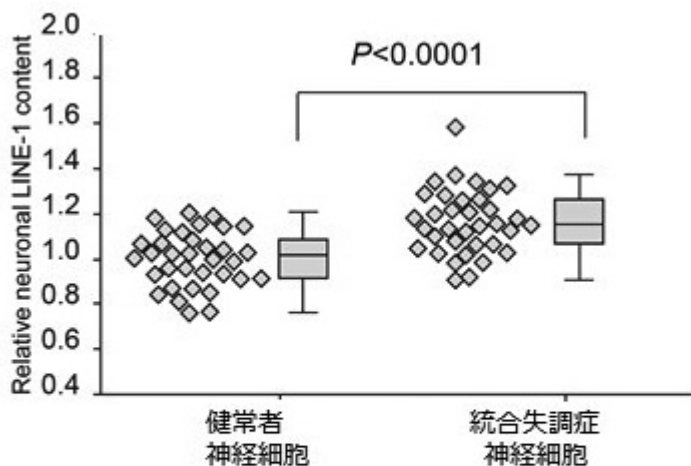
一塩基変異の体細胞変異解析のために、健常者の大脳皮質、小脳、大脳皮質由来神経細胞、非神経細胞、肝臓など多様なソースのゲノムDNAを用いて、イルミナ社次世代シーケンサーによる高深度の全ゲノム解析を行った。シーケンスリードについて厳密なQCを行い、ヒトゲノム参照配列にマッピングしたところ、それぞれのサンプルにおいておおむねX100の深度が得られた。

既に癌研究などで体細胞変異検出の実績が報告されているMutectおよびStrelkaを用い、体細胞変異の候補を抽出した。候補抽出時に、体細胞変異が検出されたシーケンスリードの品質評価を個別に行った。得られた候補について独立したシーケンスライブラリー調整によるアンプリコンシーケンシングを、小型次世代シーケンサーMiSeqを用いて行った。約2万リードの深度で体細胞変異候補の頻度計算を行い、全ゲノム解析から得られたデータの追試を行った。追試の成否をフィードバックしながら、体細胞変異候補の抽出法の改善を行い、最終的に、体細胞変異検出パイプラインの確立に成功した。

確立したパイプラインを用い脳試料のデータに適用したところ、3検体から合計31ヶ所の体細胞変異の同定に成功した。これらは全てアンプリコンシーケンシングにて追試が可能であった。脳試料における体細胞変異は、アミノ酸置換を伴わないものが多く、生理学的条件下では、細胞機能に大きな影響を与えるものは少ないと考えられた。一方で、神経細胞で発現している遺伝子群において集中して生じており、精神神経疾患との深い関連性を有することも示唆された。

## まとめ

本研究全体を通して、精神疾患患者の神経細胞核内ゲノムは、エピゲノム変異と共にLINE-1コピー数上昇など体細胞変異の蓄積が生じていることを明らかにした。このことから神経細胞核内ゲノム動態は精神疾患のマイクロエンドフェノタイプとして捉えることができ、今後の病因・病態解析に有用であると考えられた。



統合失調症患者死後脳神経細胞における  
トランスポゾンLINE-1のゲノムコピー数定量  
(Bundo et al., Neuron 2014)

# 精神疾患においてサイトカインがもたらす神経エンドフェノタイプの変換と病態

(平成24年度～28年度)

計画班員 那波 宏之 新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

## 研究目的

サイトカインは、免疫系ばかりでなく神経細胞の成長と機能、生死を左右する蛋白性の調節因子である。多くの神経変性疾患や精神疾患において、サイトカインのシグナル異常や発現異常が報告されているものの、その分子病態・作用機序には多くの謎がある。本研究では、精神疾患との関連性が高いサイトカインに着目して、モノアミン神経系に対する解剖学的・生理機能的・分子生物学的な回路変換、いわゆるマイクロエンドフェノタイプの病態を明らかにしようとした。

とりわけ本計画では、初代神経培養系でモノアミン神経に対する反応性が確定しているGDNF, EGF, Neuregulin-1などのサイトカインに特に着目し、生体内のモノアミン神経のマイクロエンドフェノタイプに対する生体内反応に対する以下の3つの疑問を明らかにすることを研究目標として設定した。

- (1) In Vivoのモノアミン神経回路に対するサイトカインの解剖学的な影響は？
- (2) サイトカインが及ぼすモノアミン神経の興奮性変化・シナプス病態は？
- (3) モノアミン神経回路変化と精神疾患患者の脳内変化との対応関係は？

これらの研究目標は 下記の4つの実験を通して解明が進められた。

## 研究背景

我々は先行研究において、サイトカインのなかでも上皮成長因子 (EGF) やNeuregulin-1はドパミン機能発達に強い影響を及ぼすこと、統合失調症の患者脳や末梢組織で異常発現していることを見出し、「モノアミン神経回路の発達が最もサイトカイン暴露に影響されやすく脆弱である」ことを提唱している。しかし当該サイトカインの変調が、ドパミンを含むモノアミン神経回路のマイクロエンドフェノタイプに具体的にどのような影響を及ぼしているのか、また当該疾患の脳機能病態にどう関連しているのか多くの疑問が残されていた。

実際にはモノアミン神経種、投射路ごとにサイトカインに対する反応性・脆弱性が異なることが予想されるが、具体的に各神経の反応性差や認知行動変化との対応関係、精神疾患病態との関連性は解明されていない。そこで本計画ではドパミンを代表とするモノアミン神経に対するin vivoにおけるサイトカインの生理活性とその機序を明らかし、統合失調症との病態関連性を探求した。

## 研究結果

### <課題1>サイトカインの過剰・欠乏によるモノアミン神経回路変化の解明

EGF投与ラットは 平常時のドパミン神経活動が上昇していることが判明している。そこで本モデルの脳内セロトニン神経とノルアドレナリン神経活動も麻酔下で測定したが、対照群と差異はみられなかった。つまり、3種のモノアミン神経のなかでは、ドパミン神経が、研究対象としたサイトカインに対し最も高い反応性と脆弱性を呈していた。次にドパミン神経自身のセロトニン感受性を比較してみた。するとEGF投与モデル群ではドパミン神経の多くがセロトニンに反応してその活動を上昇させるのに対し、むしろ対照群では低下させる細胞が多かった。つまり本モデルではドパミン神経活動のセロトニンへの反応方向が逆転していたのである。この事実は非定型抗精神病薬の薬効の優位性をも説明するものである。

さらにEGF投与で作製された統合失調症モデルラットの社会行動低下とドパミン神経活動変化の相互関係を解析した。自由行動下で無線システムをつかった脳神経活動記録とIn vivoダイアリス法を用い、EGFで作製された統合失調症モデルラットの前頭前野からのドパミン放出変化を計測した。無刺激の定常時にはEGFモデルのドパミン神経活動、ドパミン放出、ともに亢進していた。しかし、新奇ラッ

トに遭遇させた時（社会ストレス負荷時）のドーパミン放出・活動上昇率は、対照群の動物に比して弱く、それがストレス脆弱性の原因をなしていると推定された。

#### ＜課題2＞サイトカインの過剰・欠乏によるモノアミン合成と放出量への影響評価

EGF過剰発現トランスジェニックマウスはプレパルス抑制や社会行動、コカイン感受性などの行動に障害を与え、統合失調症のモデル動物としての適合性を備えていることが判明した。しかし本トランスジェニックマウスの脳内では、ドーパミン合成酵素の低下とドーパミン含量の変動が観察され、行動変化の主要因がドーパミンの変化である可能性が示唆された。続いて抗がん剤に使われているEGFRキナーゼ阻害剤によるEGFシグナルの遮断効果が、EGF投与による上記の結果とは逆に、抗精神病薬理活性を発揮する可能性を調べた（図参照）。

用いたのはEGFの新生児投与で作製された統合失調症モデルラットである。3種類のキナゾリン系EGFRキナーゼ阻害剤をモデルラットの脳室内へポンプ投与した。結果、モデル動物の行動異常（プレパルス抑制、ラテント恐怖学習障害）が阻害剤の投与濃度依存的に改善した。平行してこのEGFRキナーゼ阻害剤投与はドーパミン神経の自発発火頻度、基底核のドーパミン代謝も正常化していた。これらの結果はEGFRキナーゼ阻害剤が抗精神病薬活性を有することを示すものである。

#### ＜課題3＞サイトカインによるモノアミン神経の膜興奮性変化や自発発火パターン変化と行動相関の分析

新生児EGF投与モデルラットは、生後その日数を重ねるに従い、音驚愕反応強度やそのプレパルス抑制率が徐々に異常性を高めてゆく。性成熟を迎える8週齢を超えるまで、このような認知行動変化が増大するのだが、この原因としてドーパミン神経の発火変動が関与している可能性が仮説として浮かび上がった。そこで、麻酔下で覚醒行動の影響を排除した状態で、黒質ドーパミン神経の発火頻度を各週齢ごとに、EGFモデルラットと健常ラットで比較してみた。結果、EGFモデルラットのドーパミン発火頻度は思春期前に健常ラットのそれに下回る傾向にあったものの、思春期後の生後12週齢からは、その関係が逆転し、より高頻度な発火を呈した。

ここでみられた統合失調症EGFモデルラットにおける思春期後に見られる黒質ドーパミン神経の発火頻度上昇が、どのような分子メカニズムで起きているのかを探索した。統合失調症患者の黒質ではイオンチャンネルの発現変化が際立っていたので（課題4参照）、ここでもカチオン電流を中心に解析した。パッチクランプ法を用いた電位パルスとカリウムチャンネルへの作動薬物を活用して計測したところ、発火頻度を調節すると言われる過分極活性型カチオン電流  $I_h$  と  $Ca^{2+}$  活性型カリウムチャンネル（SK）が関与する可能性が示唆され、現在、より詳細に調査中である。

#### ＜課題4＞死後脳を用いた当該精神疾患におけるモノアミン神経のマイクロエンドフェノタイプ解析

統合失調症におけるドーパミン神経のマイクロエンドフェノタイプ解析を、研究協力者喜田らと共同でRNA-SEQ法にて実施した。統合失調症におけるドーパミン神経の分子病態・病理が、当該動物モデルと同様に観察されるかどうか、患者死後脳の分子プロファイリングにより比較した。統合失調症の剖検例を用いて黒質ドーパミン神経よりRNAを抽出し、次世代シーケンサーによるタグ解析により、両者の遺伝子の発現変化を分析したところ、統合失調症の患者黒質では、種々のカリウムチャンネル群は顕著に発現変動しており、EGF投与による統合失調症モデルラットにおける黒質ドーパミン神経の生理学的変化とマッチすることが判明した。この結果は、当該EGF投与動物は統合失調症モデル動物としての妥当性を有するものとして注目される。

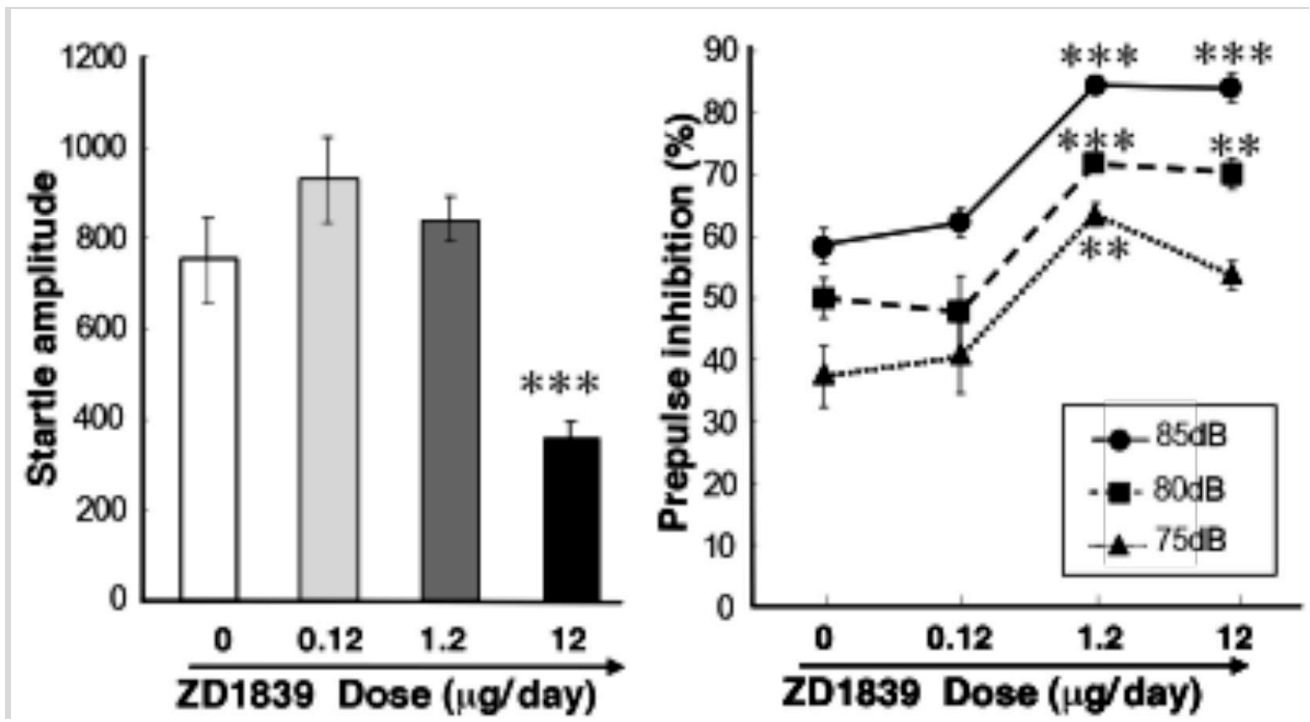


図) 統合失調症モデルラットに対する抗がん剤ZD1839の音驚愕反応改善効果 (左) とプレパルス抑制上昇効果 (右)。ZD1839の濃度依存的に驚愕反応が低下し、プレパルス抑制が改善している。

## ヒトiPS細胞を用いた精神疾患モデルの作成と病態解析

(平成24年度～28年度)

計画班員 鶴飼 渉、 辻野 華子、 木川 昌康 札幌医科大学医学部神経精神医学講座

### 研究目的

当分担研究の目的は、細胞移植法を用いて、精神疾患の新たな動物モデルの作成を試みるものである。また、疾患患者iPS細胞由来の神経細胞が組み込まれた脳組織を提供することで、病態のより高度な技術解析を可能にすることを目指した。ヒト健常者、および患者体細胞より作成したiPS細胞から、神経系の細胞に分化を進めたiPSneurosphereを得て、これをマウス/ラットの脳室および胎仔頭蓋内へ投与する方法で移植し、動物の脳神経回路変異や行動異常を解析した。また、同時に、iPS-neurosphereを用いたin vitro解析を実施し、患者由来の神経系細胞の脆弱性、発達異常につながる細胞病態の発見を目指した。

### 研究背景

例えば、統合失調症の病態機序に関しては、脳画像研究から、脳諸領域灰白質の萎縮・脳室拡大等が報告され、脳神経回路網の形成・維持・修復の異常が疾患発症に深く関わっていることが推察されてきた。また、近年の研究では、成体脳における海馬や側脳室下帯 (SVZ) 領域を中心とした持続的な幹細胞の増殖と、海馬・SVZ領域からの細胞の皮質への遊走とGABA系ニューロン分化が報告され、細胞供給の過程と神経新生機能変化が、病態機序に大きく関わっている可能性が考えられている。加えて、例えば中枢神経系に豊富に存在し、未分化な状態の細胞群であるNG2陽性細胞が、GABA系インターニューロンへ分化しているとの知見が報告されているが、GABA系インターニューロン、中でもパルブアルブミン (PV) 陽性細胞は、脳神経活動における $\gamma$ -band powerの形成を担い、脳細胞が発するオシレーションの統合作用から、実行機能などの脳高次機能の発現・維持に深く関係していることが推察されている。しかしながら、それらの変異における生物学的メカニズムはいまだ不明な点が多く、新しい解析法の開発が強く求められている。

### 研究結果

研究領域内で連携する班員から、健常者、および患者（統合失調症の症状を有する22q11.2症候群）由来 iPS-neurosphereの提供を受け、始めに、蛍光色素等で標識後に、マウス、およびラットの脳室内への投与を進めた。投与1～3か月後、健常者由来、患者由来のいずれの移植細胞も脳内での存在が観察され、帯状回、海馬領域に比較的多く認められた。しかしながら、この方法では、移植細胞の生存率は悪く、また、生存率の定量化も困難であり、移植細胞の分化動態や、他の研究者と連携してのシナプスの形態と機能変異の解析は困難であった。そこで、より多くの移植細胞が生存していくことが期待される投与方法として、胎仔頭蓋内投与方法の検討を進めた。この方法では、胎生期 (E14) ラット脳の頭蓋内に、色素標識したiPS-neurosphereを投与し、脳室内投与の場合よりも、多くの移植細胞の生存が得られ、1～3ヶ月齢の前脳部 Medial preoptic nucleus 領域では、ニューロンとして生存も認めた。胎児頭蓋内投与は、細胞分化後のシナプス機能を追跡する上で期待がもたれたが、この方法では、なぜか健常者由来のiPS-neurosphereを投与した胎仔の出生のみが正常に起こらず、健常者、および患者由来細胞を移植したラットを同時に得て比較解析することができなかった。これはこれで、非常に興味深い知見ではあるが、当初の研究計画を進めていく上では課題として残る結果となった。

次に、iPS-Neurosphereを用いた細胞機能解析の検討準備として、成体ラットSVZ領域由来のNG2陽性細胞 (NG2(+)-Neurosphere) に着目し、GABA系インターニューロンへの分化機能について、NMDA受容体

拮抗薬MK-801（統合失調症モデル）と、各種抗精神病薬処置の影響をin vitroで比較検討するとともに、併せてそれらで生じた細胞内変化の機序について、細胞増殖・分化に深く関わるシャペロン分子の1つHSP90に焦点をあて解析を実施した。その結果、非定型抗精神病薬のオランザピン、アリピプラゾール、およびブロナンセリンの処置が、NG2(+)-NeurosphereのGABA系インターニューロンへの分化を促進させることが示された。また、効果のあった非定型抗精神病薬は、いずれもHSP90の発現を増加させ、HSP90の発現および関連シグナル変化と、成体脳GABA系インターニューロンの再生・機能促進作用が、治療薬の脳神経活動修復を介した認知機能障害の改善効果に関係している可能性が示された<sup>1)</sup>。

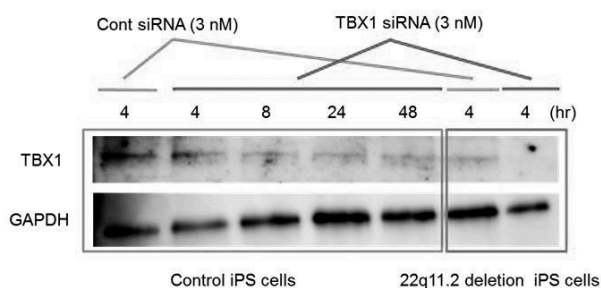
次に、22q11.2欠失症候群患者由来のiPS-Neurosphereから分化誘導したニューロンの神経突起上のフィロポディア（スパイン前駆構造体）の動きに注目し、タイムラプスイメージングを用いた運動変化の比較解析を試みた。iPS細胞から作製したiPS-NeurosphereをFGF(-)、LIF(-)の分化条件下で培養・分化させ、ニューロンの突起先端から少し後ろの部分において、突起からのフィロポディアの運動（伸展と収縮）を記録した結果、患者由来ニューロンでは、フィロポディア運動（数・頻度・大きさ）が、健常者由来iPSCsに比べ減弱していることを認めた。さらに、フィロポディア運動変異の分子メカニズムを明らかにする目的で、22q11.2領域に含まれる遺伝子にコードされ、自閉症関連遺伝子産物としての可能性が明らかとなった、写因子TBX1の発現変化との関連について解析を進め、遺伝子サイレンシングによって、TBX1タンパク発現を低下させることで、健常者iPSCs由来ニューロンでフィロポディア運動が減弱することを示した。

## まとめ

22q11.2欠失患者からiPS細胞を作製し、neurosphereを経てneuronに分化させた際の細胞機能変異と、iPS細胞を移植しての個体の行動解析研究を実施した。患者由来のiPS-neurosphereを投与することで、マウスのsocial interaction行動が減弱するとの知見を得た。しかし、本条件下では、iPS-neurosphereの脳内での機能発現をシナプスレベルで解析していくレベルには至っていない。そこで、in vivoでの検討と並行して、iPS-neurosphereから分化させたニューロンの機能解析を進。検討段階では、非定型抗精神病薬が、HSP産生変化を介して成体脳由来NG2(+)-NeurosphereのPV陽性GABAergic interneuronへの分化を促進することを報告し、次に、同様の方法で、iPS-neurosphereを用いた際の解析を進め、患者由来ニューロンでは、フィロポディア運動（数・頻度・大きさ）が、健常者由来ニューロンに比べ減弱していることをつかんだ。現在、移植細胞の機能解析をより綿密に進められる方法で投与した際の行動変化解析の実施と、TBX1発現変化や、パルブアルブミンを含め、フィロポディア運動を支えるアクチン分子の機能に影響を及ぼす分子群を中心に、メカニズム探索を進めていきたいと考えている。

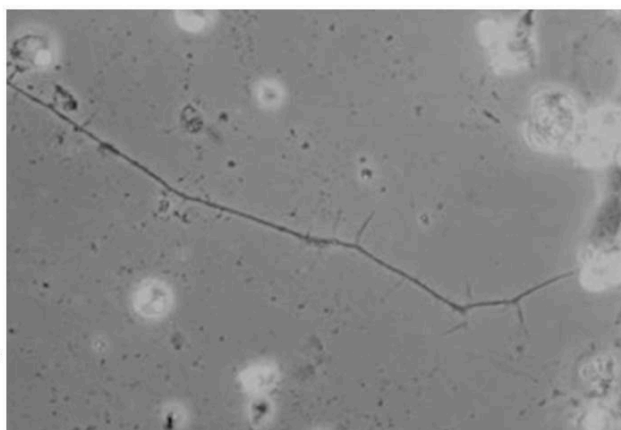
図1

TBX1  
protein expression



TBX1 siRNA  
Control siRNA (Dharmacon)  
Silent Fect (Developed for mainly intracellular delivery of siRNA in mammalian cells)

図2



健常者および患者iPS細胞由来ニューロンにおける遺伝子サイレンシングによるTBX1蛋白発現の低下（図1）と、健常者iPS細胞由来ニューロンにおけるフィロポディア運動の減弱（タイムラプスイメージングによる観察）（図2）。

高感度シナプスカルシウムプローブを用いたスパイン病態進行機構の研究（平成25年度～26年度）

高感度シナプスカルシウムプローブを用いたスパイン内代謝の病態進行の研究（平成27年度～28年度）

公募班員 大倉 正道 埼玉大学大学院理工学研究科・准教授

## 研究目的

海馬は記憶の形成や想起に関わる脳部位であり、海馬錐体細胞においてグルタミン酸作動性の興奮性シナプスの入力部位である個々の樹状突起棘（スパイン）が記憶に重要であると考えられている。統合失調症等の一部の精神疾患では進行性の記憶障害が生じるが、そのマイクロ病態として海馬でのスパインの萎縮やスパイン数の減少等が明らかにされてきた。しかしこれらのマイクロ病態がどのように進行しているのかは未だに解明されていない。前期の研究では、統合失調症様精神症状を誘発させる薬物の投与や遺伝子の操作によって個々のスパインの形態・機能やシナプス近傍の神経内外環境がどのように変化するのかを明らかにし、記憶障害の発現・進行に関わるマイクロ病態を解明することを目的としている。

一方、海馬でのスパインの萎縮やスパイン数の減少等に伴って生じる1つのマイクロ病態として、ミトコンドリアの障害による代謝異常が関与する可能性が明らかにされ始めている。しかしミトコンドリア障害とシナプス病態が経時的にどのように進行するのかは未だに明らかにされていない。そこで後期の研究では、統合失調症様の症状を誘発させる薬物の投与や遺伝子の操作によって個々のスパインのCa<sup>2+</sup>活動・代謝活動、およびシナプス近傍の神経内外環境がどのように変化するのかを明らかにし、記憶障害の発現・進行に関わるマイクロ病態を解明することを目的としている。

## 研究背景

我々は緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いた蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブG-CaMPを開発し(Nakai, Ohkuraら、*Nat Biotechnol*, 2001)、イメージングによる神経回路機能の研究を行ってきた(Muto, Ohkuraら、*Curr Biol*, 2013等)。プローブの改良を進めた結果、今では個々のシナプスの自発活動の可視化も十分な段階に達してきた(Ohkura, Nakaiら、*PLoS One*, 2012; Muto, Ohkuraら、PNAS, 2011)。また測定技術に関しても、2光子顕微鏡における深達度が今やGFP発現ラットでは脳表下1.5mmであり512 x 512 pixelsのサイズで30枚/秒での撮影が可能となってきた。また我々はこれまでに、高感度Ca<sup>2+</sup>プローブを用いた培養細胞レベルでのイメージングで、細胞内のATP濃度とベースCa<sup>2+</sup>濃度の間には明確な相関があることを見出した。我々はシナプス修飾による神経回路機能の調節に興味を持ってきたが、現在の技術的レベルで、例えば、統合失調症モデルマウスにおいて記憶障害が現れる前から発症の前兆となり得る微弱なシナプスの活動異常を検出できる可能性も見えてきた。

## 研究結果

前期の研究では、シナプスの形態とCa<sup>2+</sup>活動の経時変化をイメージングで測定することを可能にする蛍光プローブの作製を行った。さらにシナプス病態の経時的な進行を明らかにするため、長時間培養下での蛍光イメージングを行うための実験条件を検討した。一方我々が以前に開発した高感度なシナプスCa<sup>2+</sup>プローブであるG-CaMP6-actinをマウス海馬スライスのCA3神経細胞に発現させて蛍光Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った結果、発火閾値下での膜電位変化量と樹状突起スパインにおけるCa<sup>2+</sup>蛍光変化量に相関があることを見出した。

またシナプス病態の経時的な進行を明らかにするため、統合失調症様精神症状の誘発との関連が想定されている異常なDisc1変異体等を神経細胞に発現させ、その効果を蛍光イメージングで検討した。一方我々が以前に開発した赤色Ca<sup>2+</sup>プローブであるR-CaMP1.07を基にして、超高感度かつ超高速で微弱な神経活動を検出できる赤色蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブR-CaMP2を開発し、従来以上に高精度に神経活動を解析でき



ることを示した。

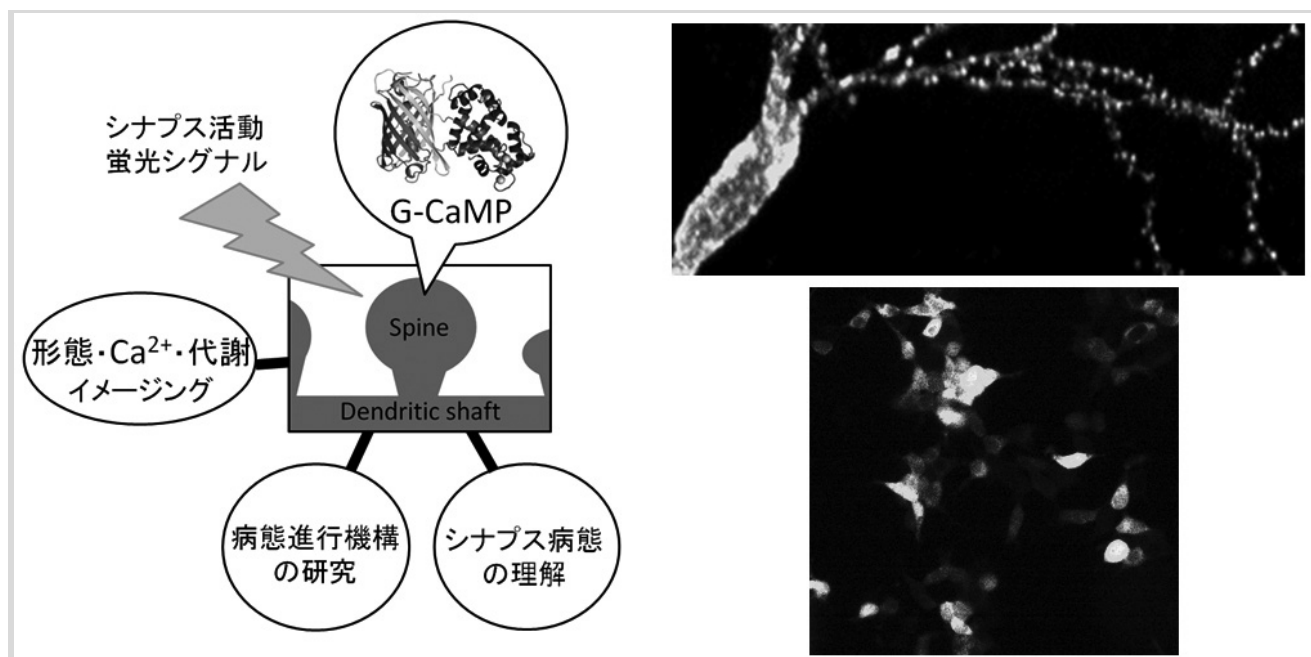
後期の研究では、スパイン内Ca<sup>2+</sup>活動と代謝活動の経時変化をイメージングで測定することを可能にする蛍光プローブの作製を行った。さらにシナプス病態の経時的な進行を明らかにするため、長時間培養下での蛍光イメージングを行うための実験条件を検討した。一方、生体レベルでの2光子イメージング法による神経発火活動の検出に適した蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブの比較検討を行った結果、我々が以前に開発した緑色Ca<sup>2+</sup>プローブであるG-CaMP7が特に優れたパフォーマンスを示すことを見出した。そこでテトラサイクリン応答配列の使用によりG-CaMP7を特定の時期にだけ発現させることができるトランスジェニックマウスの作成を行った。そしてこのトランスジェニックマウスの活用により、海馬等の部位において単一神経細胞レベルで高精度に神経Ca<sup>2+</sup>活動を解析できることを示した。またG-CaMP7を興奮性神経細胞の一部とアストロサイトに発現させることができるトランスジェニックマウスの作成を行い、大脳皮質のCa<sup>2+</sup>活動をマクロレベルで解析できることを示した。

シナプス病態の経時的な進行を明らかにするため、異常なDisc1変異体等を上記の蛍光プローブとともに神経細胞に発現させて蛍光イメージングによる検討を行った。また、Ca<sup>2+</sup>活動の変容に影響を及ぼす機能分子を見出し、その効果を神経細胞での蛍光イメージングにより評価した。

## まとめ

本研究で神経細胞の局所形態、Ca<sup>2+</sup>活動および代謝活動を可視化できる蛍光プローブが開発された。高感度・高性能な緑色蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブは、閾値上および閾値下の神経活動を検出できる性能を備えており、発火閾値下での膜電位変化量と樹状突起スパインにおけるCa<sup>2+</sup>蛍光変化量の相関解析への応用を可能にした。また超高感度かつ超高速応答性の赤色蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブは、格段に高精度な神経活動の検出を可能にした。これらにより統合失調症のシナプス病態との関連が想定される分子の発現系において神経細胞の局所形態、Ca<sup>2+</sup>活動・代謝活動の経時的イメージング解析を進めることが出来た。

また、領域内共同研究（林(高木)朗子先生、佐藤正晃先生、小泉修一先生、喜田聡先生、坂口昌徳先生、山田清文先生、喜多村和郎先生、久保健一郎先生、宮川剛先生、Joshua Johansen先生との共同研究）を通じて、様々な脳部位や細胞内局所の機能解析を進めることが出来た。



## 精神神経疾患の発症基盤としてのNMDA受容体の制御機構の解明

(平成25年度～26年度)

公募班員 真鍋 俊也 東京大学医科学研究所神経ネットワーク分野 教授

### 研究目的

中枢神経系の興奮性シナプスでは、通常のシナプス伝達はAMPA受容体が担っているが、シナプスが高頻度で活性化する場合にはNMDA受容体が活性化し、長期増強（LTP）に代表されるシナプス可塑性が誘導される。これが海馬依存性の記憶形成などの基盤機構であると考えられてきたが、NMDA受容体が過度に活性化すると神経細胞死が起こり、ある種の精神神経疾患ではNMDA受容体の機能や局在の異常がその原因である可能性が唆されている。本研究計画では、NMDA受容体の制御機構の異常が、どのように精神神経疾患の発症につながるかを明らかにするための基礎的解析を進めた。

### 研究背景

一般的な興奮性シナプスでは、イオン透過型であるAMPA受容体とNMDA受容体、および、代謝型受容体であるmGluRが発現している。mGluRはグルタミン酸が結合することで細胞内の生化学過程を調節し、ニューロンの興奮性を制御する。一方、AMPA受容体とNMDA受容体は、ともに一価の陽イオンを透過するが、NMDA受容体は二価の陽イオンであるカルシウムイオンも透過するという特性を有している。細胞内のカルシウムイオンは細胞外に比べてきわめて低い濃度になるように調節されているため、NMDA受容体が活性化すると、細胞内に大量のカルシウムイオンが流入し、細胞内の種々の酵素を活性化することにより、シナプス可塑性が誘導・発現される。病的な状況で、多量のカルシウムイオンが流入する場合には細胞死が引き起こされる。このようなNMDA受容体の機能に関しては研究がかなり進んでいるが、NMDA受容体のシナプス部位での局在がどのように調節され、それに異常が起こった場合に、回路レベルや個体レベルでどのような変化がみられるかについてはあまり研究が進んでいない。また、NMDA受容体のGluN2サブユニットは、生直後にはGluN2Bサブユニットのみが発現しており、発達に伴ってGluN2Aサブユニットに置換されていくが、その機能的役割についてもほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、NMDA受容体のシナプス部位への輸送とそれによるシナプス機能分子の調節機構に焦点を当てて研究を進めた。

### 研究結果

(1) 個体レベルでの運動量調節におけるNMDA受容体の輸送の役割に関する研究：LMTK (lemur tyrosine kinase) ファミリーのひとつであるLMTK3は脳にほぼ選択的に発現しているチロシンリン酸化酵素であるが、その中枢神経系における機能についてはほとんどわかっていない。そこで、この分子を欠損するノックアウト (KO) マウスを作製したところ、自発運動量が増加し、恐怖反応とうつ様行動が低下していることがわかった。また、KOマウスの大脳皮質および海馬でのシナプス膜におけるNMDA受容体のGluN1およびGluN2Bサブユニットの発現は変化していないが、細胞内に存在するこれらのサブユニットの量が増加していることを見出した。これは、これらのサブユニットのエンドサイトーシスが増加したか、あるいは、シナプス膜への挿入が抑制されていると考えられるが、シナプス膜での発現量は野生型マウスと同程度に保たれていると考えられた。このようなNMDA受容体の輸送機構の変化が、最終的にKOマウスの個体でみられた行動上の異常を引き起こしているものと結論された (Inoue *et al.*, *J. Neurosci.*, 2014)。

(2) NMDA受容体サブユニットによるAMPA受容体シナプス部位局在調節機構に関する研究：NMDA受容体のGluN1およびGluN2Bサブユニットは胎生期から成体まで常に中枢神経系に発現しているが、GluN2Aサブユニットは生直後にはほとんど発現しておらず、生後発達に伴ってGluN2Bサブユニットに代わって発現してくることがわかっている。しかし、このスイッチングがどのような生理的意義を有しているかに

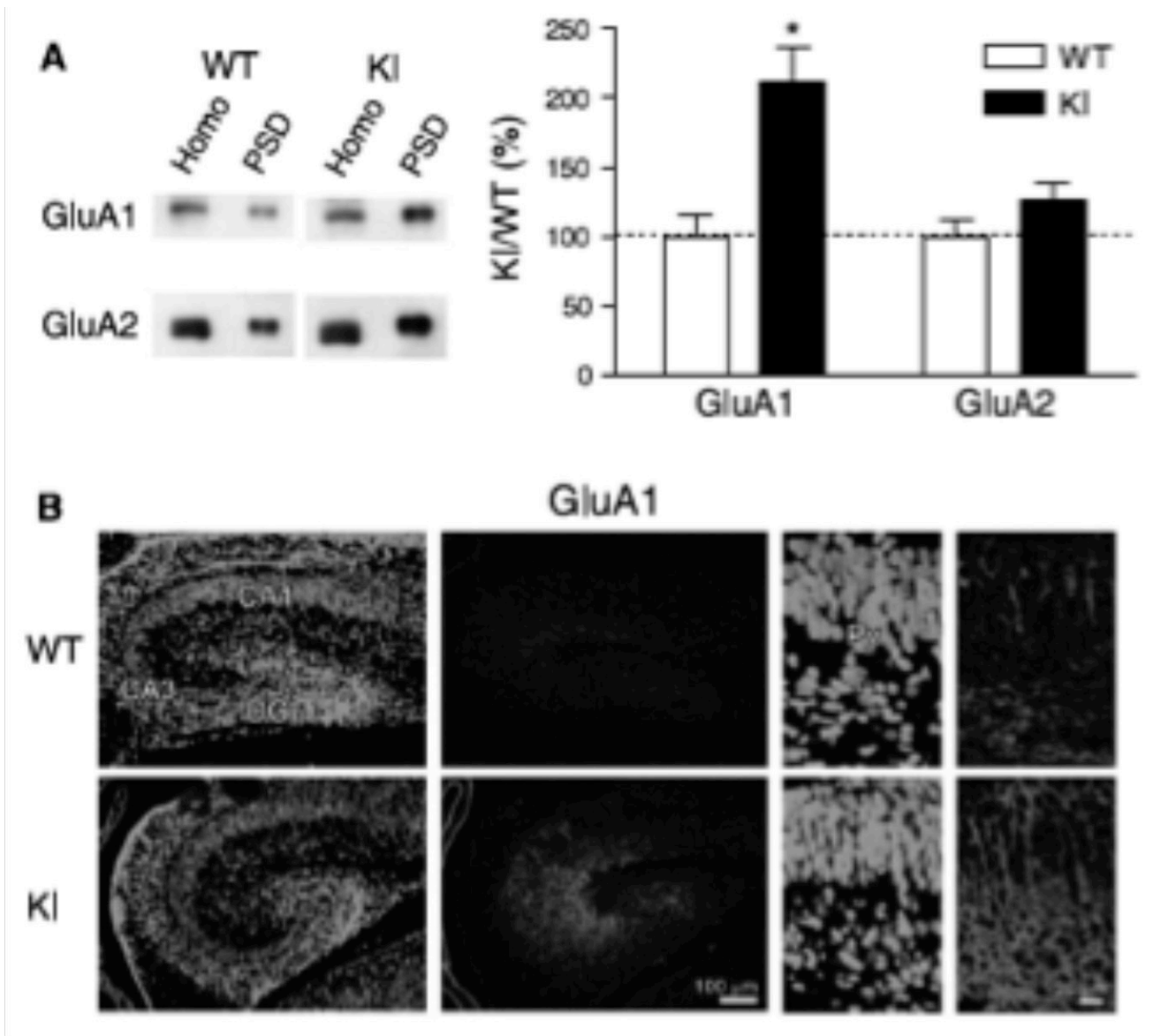
についてはほとんど明らかになっていなかった。そこで、本研究では、GluN2Bサブユニットの代わりにGluN2Aサブユニットを発現するノックイン (KI) マウスを作製し、その機能解析を行った。このKIマウスは、ミルクを飲むことができず、生後すぐに死亡することがわかり、GluN2Bサブユニットは生存に必須であり、GluN2Aサブユニットではその機能を補完することができないことがわかった。一方、このKIマウスでは、シナプス部位におけるAMPA受容体のGluA1サブユニットの発現が著しく増加することが明らかとなり、GluN2Bサブユニットは、GluA1サブユニットの輸送を調節することが明らかとなった

(図)。したがって、GluN2B-GluN2AスイッチングはAMPA受容体の局在調節に関与することがわかった (Hamada *et al.*, *Eur. J. Neurosci.*, 2014)。

(3) 自閉症に伴うてんかん発症におけるNMDA受容体シナプス局在の役割に関する研究 : Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) の変異は重度のてんかん発作を伴うウェスト症候群や非典型レット症候群を引き起こすことが知られているが、てんかんを引き起こす機構については、まったく不明であった。この研究では、CDKL5のKOマウスを作製し、その機能解析を進めた。KOマウスでは、カニン酸投与により引き起こされるてんかん発作には野生型マウスと差がみられなかったが、NMDA投与により引き起こされるてんかん発作の程度がKOマウスで亢進していた。KOマウスの海馬スライス標本で、CA1シナプスにおけるシナプス伝達を電気生理学的に解析したところ、野生型マウスに比べNMDA受容体応答が有意に増大し、しかも、シナプス部位でのGluN2Bサブユニットが増加していることが明らかとなった。また、NMDAにより誘発されるてんかん発作がGluN2Bサブユニット選択的なアンタゴニストにより抑制されることがわかった。GluN2Bサブユニットの全体の発現量には差がないことから、シナプス部位への輸送が亢進しているか、あるいは、取り込みが抑制されているために、シナプス部位でのGluN2Bサブユニットの量が増加しているものと考えられた。したがって、CDKL5は、GluN2Bの輸送を制御することにより、シナプス部位での発現量を調節していると考えられ、KOマウスではこの機構の異常によりてんかんなどの症状が出現するものと結論された (Okuda *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, 2017)。

## まとめ

これまで、精神神経疾患や神経細胞死などにNMDA受容体に関与するということが多数報告されているが、そこでは、NMDA受容体にカルシウムイオン透過性があるために、細胞内でのカルシウム依存性の生化学過程を中心にして研究が進められてきた。しかし、NMDA受容体のシナプス部位での発現量と精神神経疾患の関連に注目した研究はあまりなかった。本研究では、NMDA受容体の輸送機構の障害により、種々の個体レベルでの行動異常が引き起こされることが明らかとなり、今後、このような点に注目した研究が展開していくものと思われる。また、GluN2サブユニットは、そのサブユニットの違いによりNMDA受容体のシナプス応答の時間経過が変化することは知られていたが、本研究ではGluN2BサブユニットがAMPA受容体のシナプス部位への輸送を調節していることや各種の機能分子によりGluN2Bサブユニットの輸送が選択的に調節され、その異常により行動異常が引き起こされることが明らかになり、単なるNMDA受容体シナプス応答の電流量や時間経過の違いだけでなく、GluN2AサブユニットにはないGluN2Bサブユニット特異的な細胞内過程の制御機構が存在することが明らかとなったが、今後はこの点に注目した研究が進展することも期待される。



NMDA受容体のGluN2BサブユニットをGluN2Aサブユニットに置換したノックインマウス (KI) では、生直後でのAMPA受容体のGluA1サブユニットのシナプス部位 (PSD分画) での蛋白発現が野生型マウス (WT) に比べて上昇し (A)、免疫組織染色でも海馬における発現上昇が観察されている (B)。

(Hamada *et al.*, *Eur. J. Neurosci.*, 2014)

# 統合失調症の脳皮質におけるパルプアルブミン陽性ニューロン特異的KCNS3サブユニットの発現変化

(平成25年度～28年度)

公募班員 橋本 隆紀 金沢大学医学系 精神行動科学 准教授

## 研究目的

統合失調症は代表的な精神疾患で、世界各国共通に人口の約1%が罹患することが知られている。症状としては幻覚や妄想の他に、注意や思考などの認知機能の低下が慢性的に持続する。幻覚や妄想は、抗精神病薬と呼ばれる神経伝達物質ドーパミンによるシナプス伝達を遮断する薬により改善が見込まれるが、認知機能低下は、それに対する効果的な薬が無いことから、患者の自立や社会復帰を妨げる最大の要因となっている。そこで我々は、認知機能障害の有効な治療法の開発に役立てるために、その生物学的メカニズムの解明を行っている。

## 研究背景

認知機能はニューロンが領域内および領域間でシナプスにより結合して形成する神経ネットワークにより担われている。各領域では、多数のニューロンの活動が周期的に同期することで周期的神経活動(オシレーション)が生じ、オシレーションが同調することで領域間のコミュニケーションが成立し、認知機能のための情報処理が行われる。

脳皮質や買い場で押しレーションの形成を担っているのが、パルプアルブミン(PV)を発現する抑制性の介在ニューロン(PVニューロン)である。PVニューロンは、同じ領域内や離れた他の領域にある錐体ニューロンから興奮性シナプス入力を受け、近傍の錐体ニューロンの細胞体に抑制性シナプスを作り、その発火タイミングを同期させることで、オシレーションの形成やオシレーションの領域間の同調に役立っている。

我々はこれまで、統合失調症ではPVニューロンにおいて、PVそのものや伝達物質GABAを合成する酵素GAD67の遺伝子発現が低下していることを報告してきた。さらに、統合失調症では、オシレーションの異常も多く報告されており、PVニューロンの機能変化が、オシレーションの形成または領域間の同調性の異常をもたらし、認知機能障害に関与すると考えられる。

KCNS3は、我々がヒト脳皮質のPVニューロンに選択的に発現することを見出した遺伝子で、電位依存性カリウムチャンネルのサブユニットをコードする。KCNS3を含むチャンネルは、興奮性シナプス電位により素早く活性化されて外向きカリウム電流を生じさせることで、興奮性シナプス電位の持続時間を短くしていると考えられる。この短い興奮性シナプス電位により、PVニューロンは同期性の高い錐体ニューロンの興奮によって発火しやすい性質を持つ。すなわち、KCNS3はPVニューロンが領域内外の錐体ニューロンの同期した活動により発火し、さらに周囲の錐体ニューロンの活動を同期させるのを促進し、オシレーションの形成とその領域間の同調に貢献していると考えられる。我々は先行研究で、統合失調症患者の前頭前野ではKCNS3 mRNAの発現が低下していること、このような変化は患者と同様に抗精神病薬を投与したサルでは認められないことを明らかにした。

本研究では、統合失調症におけるKCNS3の発現低下が、PVニューロンの機能変化を介して、オシレーションや神経ネットワークの機能異常やなどに関与している可能性を検証するため、統合失調症例および比較対照例から得られた死後脳を用いて(1) PVニューロンにおけるKCNS3の発現変化、(2) 認知機能を担う皮質神経回路を構成する複数の領域におけるKCNS3の発現を調べ、(3) PVニューロン特異的にKCNS3遺伝子を不活化したノックアウトマウスの作成を行った。

## 研究結果

(1) 統合失調症患者14名と対照者14名の前頭前野からPerineuronalnetに結合する*Vicia villosa* agglutininと抗NeuN抗体で2重染色されるPVニューロンのみを顕微鏡下に切り出した(図A)。KCNS3

mRNAの発現は、統合失調症で41%ほど低下していた。また、KCNS3と結合してチャネルを形成するKCNB1サブユニットのmRNAも44%低下しており、KCNS3とKCNB1の発現には有意な相関が認められた。

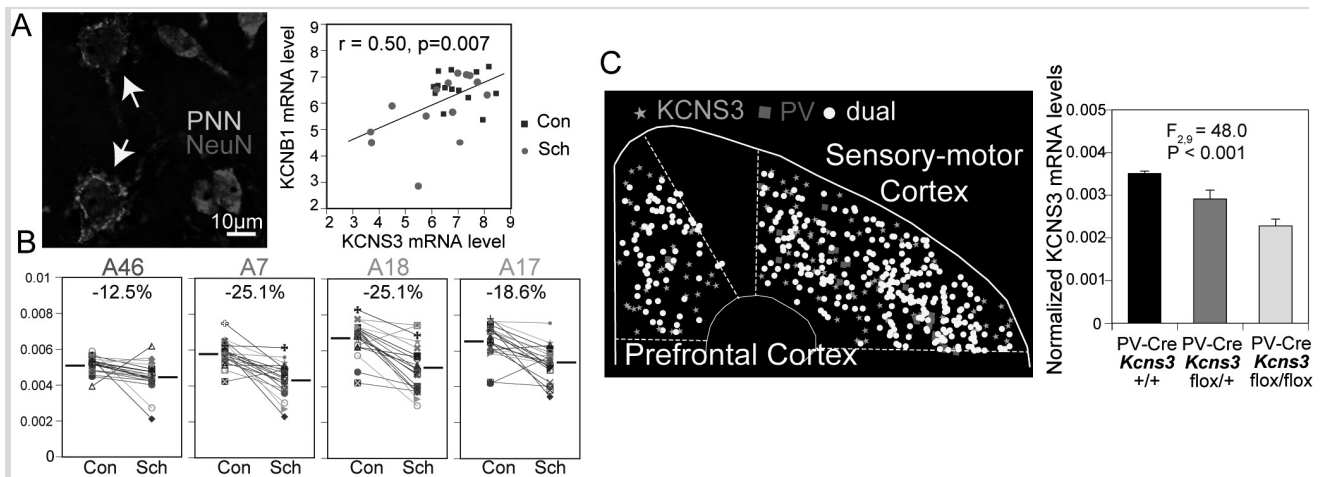
(2) 患者で典型的に低下が認められる認知機能である作業記憶について、それを担う神経ネットワークを構成する背外側前頭前野 (A46)、後部頭頂葉 (A7)、二次視覚野 (A18)、一次視覚野 (A17) の4領域を、諸条件がマッチした統合失調症例と比較対照例の20ペアの各症例から得て、KCNS3の遺伝子発現を cyclophilin-A, beta-actin, GAPDHを内部標準とするPCR法で解析した。その結果、統合失調症では、KCNS3の発現が、A46 (-12.5%)、A7 (-25.1%)、A18 (-25.1%)、A17 (-18.6%) の各領域で優位に低下していた (図B)。

(3) PVニューロン特異的な遺伝子不活化を確立するために、Cre遺伝子組み換え酵素を発現するPV-CreマウスとGABA合成酵素GAD67をコードするgad1遺伝子がCreの認識するloxP配列で挟まれたflox-gad1マウスを掛け合わせた。その結果、PVニューロンのみで、GAD67 mRNAの発現がgad1 (flox/+)マウスで50%、gad1 (flox/flox)マウスで80%に低下していることが確認された (n=5)。興味深いことに、このマウスは、作業記憶には変化が検出されず、統合失調症とは異なりPVやGAD65の発現が上昇しており、PVニューロンにおけるGAD67の発現低下は、PVニューロン変化の上流メカニズムではないことが考えられた。

次に、マウス脳内でKCNS3がPVニューロンに選択的に発現していることを調べるために、C57BL6マウスの前頭葉皮質において、PV mRNAとKCNS3 mRNAの同時検出を行った。その結果、PVニューロンの90%以上がKCNS3 mRNAを発現し、KCNS3 mRNA陽性ニューロンの60%以上がPVmRNAを発現することを確認した (図C左)。その上で、flox-kcns3マウスを作成し、PV-Creマウスと交配させたところ、皮質におけるKCNS3の発現が、kcns3 (flox/+)マウスで野生型の83%にPV (Cre/+) KCNS3 (flox/flox)マウスで75%に低下していることが判明した (n=4) (図C右)。

## まとめ

本研究では、PVニューロンによるオシレーション形成を担うと想定されるKCNS3カリウムチャネルサブユニットの発現が、PVニューロンにおいて、共にチャネルを構成するKCNB1サブユニットと相関する形で低下していること、作業記憶を担う神経ネットワークを構成する複数の領域で同様に低下していることを明らかにした。一方、PVニューロン特異的な遺伝子ノックアウトにより、従来まで重要視されていたPVニューロンにおけるGABA合成酵素GAD67の発現低下は、PVニューロン変化の本質的なメカニズムではない可能性が示唆された。一方、KCNS3の発現低下は、PVニューロンによるオシレーション形成を低下させることで、認知機能低下の病態生理にGAD67の発現低下よりも直接的に関与していることが考えられた。そして、これを検証するために、PVニューロン特異的にkcns3遺伝子をノックアウトしたマウスの作成に成功し、このマウスにおいてPVニューロンの特性や認知機能の解析を進めている。KCNS3はヒト大脳皮質ではPVニューロンにほぼ特異的に発現が認められるので、PVニューロンの機能異常を選択的に是正する治療法の分子標的としても有望である。今後は、統合失調症の病態生理におけるKCNS3の重要性を確立し、認知機能低下の有効な治療法の開発に役立てたい。



(A) Perineuronal netとNeuNの2重染色によるPVニューロン (矢印) の同定と統合失調症のPVニューロンにおける*KCNS3*と*KCNB1*の発現低下 (B)皮質4領域における*KCNS3*の発現変化 (C)野生型マウス皮質での*KCNS3* mRNAとPV mRNAの同時検出(左)とPVニューロン特異的*Kcns3*ノックアウトマウスマウスの皮質における*KCNS3* 発現変化 (右)

# 免疫電子顕微鏡（凍結切断および3次元）を用いたシナプスとグリアの微細形態異常解析

（平成25年度～26年度）

研究代表者 木下 専 名古屋大学理学研究科

連携研究者 深澤 有吾 名古屋大学医学研究科（現所属：福井大学医学部）

## 研究目的

統合失調症など精神疾患の患者死後脳や重度発達障害のモデル動物において、興奮性シナプスにおける樹状突起棘（スパイン）の形態や体積の異常が多数報告されている。シナプス密度、シナプス近傍の微細構造（スパイン形態・体積など）、グルタミン酸やドーパミンなど経伝達物質受容体・輸送体の分布・密度などの量的指標は精神症状と相関するマイクロエンドフェノタイプとしての有用性が期待される。これらの情報をナノメートルの精度で取得できるイメージング手法は電子顕微鏡法に限られる。本研究ではシナプス膜やグリア膜を裏打ちする足場蛋白質（セプチンおよびCDC42EP4）と精神・神経疾患との関連に着目し、遺伝子欠損マウスの機能障害を探索した。責任領域において生化学的手法や電子顕微鏡3次元再構築（ssTEM）などの微細形態学的手法で同定したシナプス異常をマイクロエンドフェノタイプとみなし、分子基盤、生理的意義、病態との関連の探索を試みた。

## 研究背景

統合失調症および双極性障害の患者死後脳（背外側前頭前野）の大規模プロテオーム解析により、多数例で増加がみられる蛋白質としてセプチン・サブユニットSEPT5、SEPT6、SEPT11が同定され、同領域のトランスクリプトーム解析では関連遺伝子CDC42EP4の発現増加が報告された。海外発のこれらの知見を病態理解につなげるためには、神経系に高発現し、複合体を形成するセプチンやCDC42EP4の生理機能を知る必要がある。代表者らは、セプチン・サブユニットSEPT4の欠損がマウスの線条体／側坐核シナプスの微細形態と分子動態に及ぼす影響を探索し、軸索終末のドーパミン輸送体DATの減少と行動薬理的異常をもたらすこと、SEPT4の慢性的過剰が行動レベルを低下させることなどを示した（*Neuron* 2007）。連携研究者はssTEM法や凍結切断レプリカ標識免疫電顕法を駆使してシナプス微細形態およびシナプス分子局在を解析してきた。

## 研究結果

### 1) セプチンはHDAC6による脱アセチル化を介して微小管の安定性を負に制御することにより樹状突起と軸索の発達を促進する

神経突起の成長には、チューブリンとセプチンという2つのGTP結合タンパク質の重合体が必要である。しかし、これらの細胞骨格系が協働しているのか、協働しているとすればどのようなメカニズムによるのかはわかっていない。本研究では、周産期マウスの大脳皮質ニューロンでセプチン重合体の必須サブユニットSEPT7をノックダウンあるいはノックアウトすると微小管が過剰にアセチル化され、大脳半球間および皮質脊髄路の軸索投射と樹状突起形成が阻害されることを示した。次に、初代培養ニューロンを用いたin vitro 実験により、SEPT7の欠乏が過剰アセチル化を介して微小管の過剰安定化ないし成長遅延をもたらすことを示した。さらに、SEPT7欠乏の表現型と $\alpha$ -チューブリン脱アセチル化酵素HDAC6の薬理的阻害の表現型の類似性や両者の物理的相互作用などから、HDAC6の酵素活性ではなく、アセチル化 $\alpha$ -チューブリンとの結合にSEPT7が必要であることを示した。以上およびその他の所見から、セプチンがHDAC6による微小管脱アセチル化の物理的足場として働くことで、微小管の安定化を神経突起成長に最適なレベルに抑制制御していることが示唆される。すなわち、ユビキタスに存在する2つの細胞骨格系が、神経発生過程においてはHDAC6を介して共役していることが明らかになった。なお、本研究で樹立したSept7条件欠損マウス系統は国内外で多彩な生命現象の解析に活用されている（文



献3, 6, 7および投稿準備中)。

## 2) シナプスを包囲するグリア突起内のCDC42EP4-セプチン複合体がグルタミン酸輸送体の足場となり、グルタミン酸クリアランスを促進する

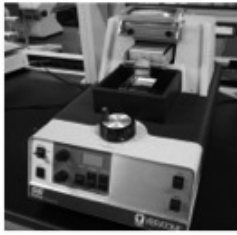
神経伝達物質の迅速な再取り込みは、シナプス伝達の時間分解能の向上、過活動抑制、恒常性維持に必須である。小脳皮質に高密度に存在する興奮性シナプスからグルタミン酸を除去するトランスポーターGLASTは、バークマングリア細胞（大型化し、高度に分化した放射状アストログリア）の突起に大量に集積するが、集積の分子機構や生理的意義は不明であった。本研究では、セプチン、非筋型ミオシンII B/MYH10、CDC42EP4などを含む蛋白質複合体がシナプス周囲のグリア突起膜直下に集積していることを見出した。CDC42EP4欠損マウス小脳試料の生化学的、微細形態学的、電気生理学的、行動学的解析により、1) GLASTがセプチンから解離して2) シナプスから遠ざかり、3) グルタミン酸が残留して神経伝達が過剰となり、4) 軽度の運動学習障害を呈し、5) 正常個体には無効な低用量のトランスポーター阻害剤に過敏に反応して著しい運動障害を呈した。以上および先行研究から、上記複合体がGLASTをシナプス近傍に集積させる足場ないし拡散障壁としてグルタミン酸クリアランスの効率化に寄与していることがわかった。GLASTは一部の運動失調症、てんかん、統合失調症、緑内障の原因遺伝子であり、統合失調症脳ではCDC42EP4 やセプチンの発現ないし含有量に量的異常がみられること（研究背景に記載）から、上記および関連する遺伝子改変マウス系統の異常を病態モデルと想定して解析を続けている。

## まとめ

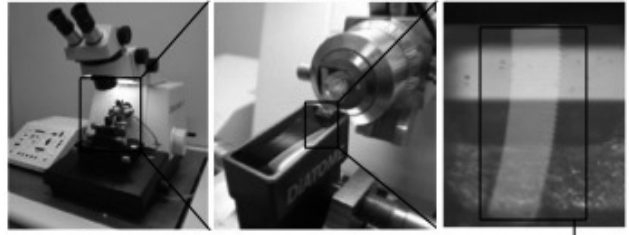
統合失調症の一部で報告されているグルタミン酸トランスポーターの遺伝子変異や発現異常、死後脳でのCDC42EP4やセプチンの量的異常は、上記と類似したメカニズムで精神病態に関与する可能性がある。いずれも網膜の放射状グリアであるMüller細胞にも発現しており、CDC42EP4欠損マウス網膜の解析（共同研究による未発表データ）から、放射状グリアに共通する傍シナプス装置としてグルタミン酸代謝に寄与することが示唆されている。小脳と網膜以外ではアストログリアのGLT-1/EAAT2が主要なグルタミン酸トランスポーターであるが、CDC42EP4/セプチンは脳全域のアストログリアにも発現しているため、統合失調症における両者の量的異常はグルタミン酸代謝を介して病態を修飾している可能性があり、さらなる検討が必要である。

# serial section transmission EM (ssTEM)法

1. 灌流固定、スライス(50 μm)

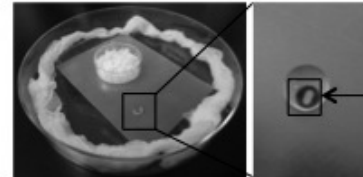


4. 連続超薄切片の作成(50 nm)



2. 酸化オスミウムによる後固定、酢酸ウラン染色

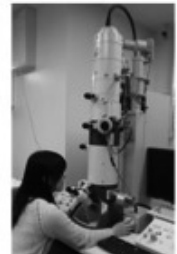
5. 鉛染色



3. 脱水、樹脂包埋

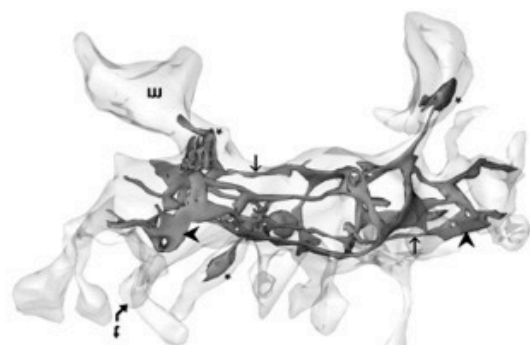
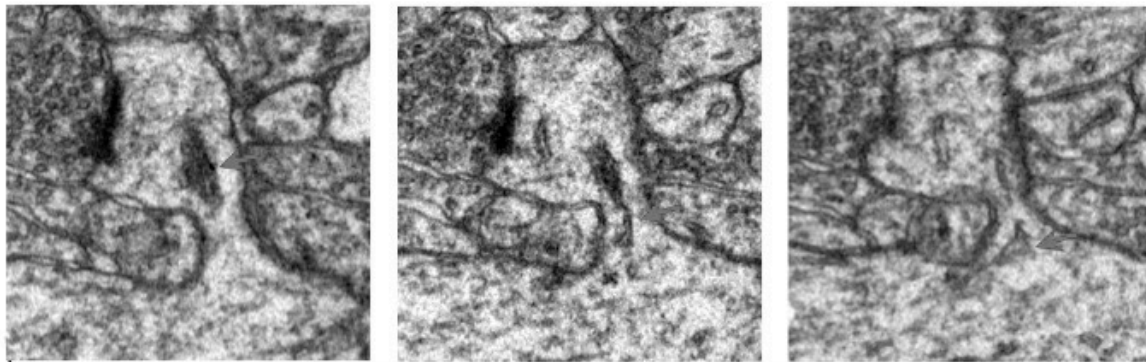


6. 透過型電子顕微鏡連続像取得  
100 kV  
x12000-25000

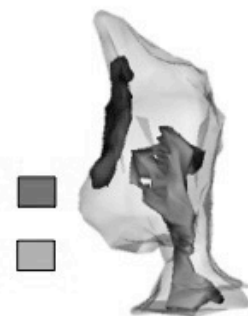


Parajuli, Ageta-Ishihara, Ageta, Fukazawa, Kinoshita.  
*Methods in Cell Biology* 136, 285–294, 2016.

## ssTEM法による透過電顕連続画像の3次元再構築例



シナプス後肥厚 (PSD)  
滑面小胞体



自験例 (未発表)

Cooney, Hurlburt, Selig, Harris, Fiala.

*Journal of Neuroscience* 22, 2215-2224, 2002.

(左図) ssTEM法の概要。(右図) 連続切片画像 (一部) から後シナプス側 (スパイン領域) を立体再構築することにより、PSD面積、スパイン体積などの2-3次元的定量指標の精密計測だけでなく、小胞体など内膜系の同定も可能となる。

## 精神疾患のプレシナプスエンドフェノタイプの形成・維持機構の解析

(平成25年度～28年度)

公募班員 小林 克典 日本医科大学薬理学 准教授

### 研究目的

中枢シナプスは精神疾患の発症メカニズムや病態の解明、治療法開発における重要な標的と考えられている。近年、我々は海馬歯状回の成熟不全が精神疾患のエンドフェノタイプとなることを提唱し、さらにその機能異常が、歯状回の出力シナプスにおけるプレシナプス機能の低下（短期シナプス可塑性の障害）として顕著に表出することを明らかにした。本研究では、これを精神疾患のプレシナプスエンドフェノタイプと考え、その形成、維持機構を明らかにし、表現型の制御を可能にすることを目的とする。

### 研究背景

多くの精神疾患において中枢シナプスの異常が示唆されており、疾患の発症メカニズムや病態の解明、治療法開発の重要な標的と考えられている。我々は、統合失調症等の精神疾患に関連した顕著な行動異常を示す遺伝子改変マウスにおいて、海馬神経系の異常を報告してきた。特に、成体海馬歯状回の顆粒細胞が未成熟状態にあることを発見し、歯状回の成熟不全が精神疾患のエンドフェノタイプとなる可能性を提唱した。さらに成体マウスに対する抗うつ薬の投与や反復的な痙攣の誘発によって、成熟顆粒細胞が未成熟様の状態に変化する「脱成熟」現象を発見した。歯状回の成熟異常はレット症候群や脆弱X症候群のモデルマウスでも示唆されており、この表現型は複数の精神神経疾患や薬物誘発性の精神症状などに共通の神経病態に寄与すると考えられる。歯状回の成熟不全に伴う最も顕著な機能異常は、顆粒細胞の軸索（苔状線維）がCA3錐体細胞に形成する興奮性シナプスにおいて観察される（図A）。成熟苔状線維シナプスでは頻回刺激によって巨大なシナプス促進（プレシナプス性の短期的増強）が生じるが、歯状回が未成熟又は脱成熟状態にあると、シナプスの成熟度も低下してシナプス促進が顕著に抑制される（図B参照）。シナプス促進低下ならびに脱成熟は抗うつ薬投与によって生じるため、抗うつ薬効果に関与する可能性がある。過度の変化は明らかな行動異常を伴うため、躁転などの抗うつ薬の有害反応にも寄与すると考えられる。そこで、本研究ではこれを薬物の有害反応や精神疾患に共通のプレシナプスエンドフェノタイプとして解析する。予備的解析によって、同様のシナプス機能変化が電気痙攣療法の動物モデルである電気痙攣刺激でも生じることが示唆された。つまり、神経系の過剰興奮がこのエンドフェノタイプの形成に寄与すると考えられる。精神疾患の病態として興奮抑制バランスの異常が示唆されており、上記の遺伝子改変マウスの中には発達期の過剰興奮が成熟異常の原因として示唆されているものもある。神経興奮は神経成熟を促進することも知られており、神経興奮の不足による成熟不全もあり得る。本研究ではこれらの点に着目し、プレシナプスエンドフェノタイプの形成と維持における神経興奮の役割を明らかにし、表現型の制御を可能にすることを試みる。

### 研究結果

成体マウスに電気痙攣刺激（ECS）を与えると、海馬歯状回において複数の成熟神経細胞マーカーの発現が低下し、繰り返し刺激によって最初期遺伝子発現が抑制された。ECS後のマウスから海馬スライス標本を作製し、電気生理学的解析を行ったところ、歯状回顆粒細胞の細胞体において興奮性の上昇が見られ、さらに苔状線維シナプスにおいてシナプス促進の低下を含む顕著な機能変化が見られた（図B）。これらの変化は抗うつ薬による脱成熟とほぼ同一であり、ECSによって歯状回顆粒細胞の脱成熟が誘導され、プレシナプスエンドフェノタイプが形成されることが確認された。歯状回における遺伝子発現を網羅的に解析したところ、ECSによる発現変化は抗うつ薬投与による変化と極めて類似しており、

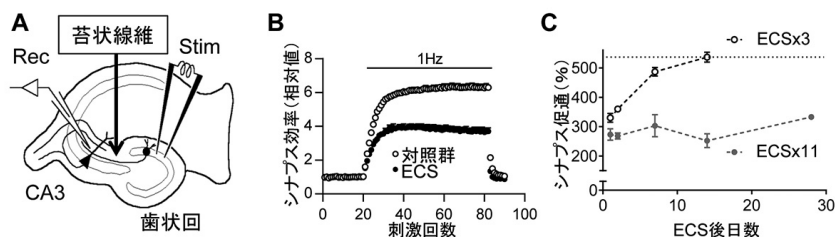
過去に解析した未成熟歯状回を示すマウスの海馬遺伝子発現とも有意な相関を示した。これらの結果によって、ECSでもこれまでに解析したモデルマウスと同様の歯状回の表現型変化が生じることが示された。

数回のECSでもシナプス促進は有意に低下したが、この変化は2週間で完全に回復した。一方、ECSを10回以上繰り返すと、4週間以上持続する長期的な変化が見られた(図C)。シナプス促進に対するECSの効果は4週齢以上のマウスで見られたが、特別高い感受性を示す臨界期のようなものは見られなかった(未発表データ)。本研究の過程で、抗うつ薬による脱成熟は神経新生の促進と有意に相関することが示されたが、ECSによる脱成熟とその持続は神経新生を阻害した条件でも影響を受けなかった。また、抗うつ薬による脱成熟はセロトニン5-HT<sub>4</sub>受容体を必要とするが、ECSによる脱成熟の誘導は5-HT<sub>4</sub>受容体の欠損やセロトニン神経系の障害の影響を受けず、NMDA型グルタミン酸受容体遮断薬や、タンパク質合成阻害薬の投与によって抑制された。従って、ECSによる脱成熟と抗うつ薬による脱成熟は表現型変化としては非常に類似しているが、その誘導メカニズムは大きく異なると考えられる。

ECSによって生じる神経機能変化をさらに詳細に解析したところ、顆粒細胞に対するシナプス入力刺激による活動電位発生が促進されており、さらにシナプス入力の興奮抑制(E/I)バランスが興奮方向に変化していた。プレシナプスエンドフェノタイプの維持に対するE/Iバランスの変化の影響を検討するため、GABA<sub>A</sub>受容体機能を亢進させるジアゼパムを投与したところ、シナプス伝達の長期的な変化が抑制された。ジアゼパムの効果は、ECS処置の後に薬物投与した場合でも見られた。さらに、NMDA受容体遮断薬をECS後に投与した場合でも、シナプス伝達の長期的な変化が抑制された。以上の結果より、ECSによって生じた興奮性の上昇が、NMDA受容体の活性化を介して、プレシナプスエンドフェノタイプの維持に寄与することが示唆された。

## まとめ

神経系を過剰興奮させる刺激によって、歯状回顆粒細胞の脱成熟ならびにプレシナプスエンドフェノタイプとしてのシナプス促進低下が急速に誘導され、刺激の繰り返しによってこのエンドフェノタイプが長期的に維持されることが本研究によって明らかになった。シナプス促進の低下は刺激後のジアゼパム投与によって回復したため、このエンドフェノタイプの維持の少なくとも一部は神経興奮によって担われていると考えられる。E/Iバランスの異常が精神疾患の病態に関与することはこれまでも示唆されていたが、本研究の結果を考慮すると、E/Iバランスの変化そのものに加えて、それに依存した二次的な神経機能変化が精神疾患の病態生理に寄与することが推察される。また、逆にE/Iバランスを適正化することによって、興奮性異常のみならず二次的な変化を含む神経病態が改善する可能性が示唆されたことになる。抗うつ薬とECSによって同様の脱成熟が誘導されたことは、脱成熟が抗うつ薬効果の基盤であることを支持する結果と言える。治療効果と有害反応との違いが、単純にその程度に依存するのか、あるいは他の条件に依存するのかが、今後の検討課題と考えられる。



(A) 海馬の神経回路の模式図。(B) 電気痙攣刺激(ECS)による苔状線維シナプスにおけるプレシナプスエンドフェノタイプの誘導。1Hz刺激によるシナプス促進がECS投与によって顕著に低下した。(C) 3回のECS後のシナプス促進低下は2週間で回復するが、11回のECS後は変化が4週間以上持続した。B、C: Imoto *et al.*, 2017より改変。

## PACAP高発現マウスを用いたPTSD脆弱性のマイクロエンドフェノタイプ

(平成24年度～28年度)

公募班員 小出 剛 国立遺伝学研究所マウス開発研究室

### 研究目的

心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の発症リスクには大きな個人差があるといわれており、その原因解明は予防法を確立する上でも重要である。本研究では、PTSDの発症リスクの個人差に関わる基盤を実験動物であるマウスを用いて明らかにする。PTSDは事故、災害、犯罪被害などの極度のストレス経験により引き起こされるが、その生涯診断有病率は1%と高く社会的にも大きな問題となっている。PTSD罹患感受性のマイクロエンドフェノタイプを明らかにする。ストレス脆弱マウス系統を用いて、PTSD罹患リスクの個人差に関わるメカニズムを解明するためのモデルマウスとしての妥当性を行動学的に詳細に調べる。更に、ストレス負荷後のマイクロエンドフェノタイプを、神経系の組織レベル、細胞レベル、遺伝子発現レベルで解明し、ヒトPTSD罹患リスクの個人差についての研究基盤を確立することを目的とする。

### 研究背景

日本産野生マウス系統であるMSMは実験用系統のC57BL/6 (B6) と比較して高い不安様行動を示し、過剰なストレス応答を示す (Koide et. al. 2000 *Mamm Genome*, Takahashi et. al. 2006 *Behav Genet*)。このことから、MSM系統はストレス脆弱性に関するメカニズムを調べる上で有用な実験系となることが期待されている。我々は、このような系統間の情動反応性の違いに関わる遺伝子を明らかにするために、コンソミックマウス系統を用いた遺伝学的解析を行ってきた。コンソミックマウス系統とは、B6系統の染色体のうち、ある1対の染色体のみをMSM系統のものへと置き換えた系統であり、各染色体について系統が作出されている (Takada et. al. 2008 *Genome Res*)。一連のコンソミックマウス系統の解析から、複数の染色体が情動反応性の違いに寄与することが明らかとなっており、その中でも第17番染色体上に不安様行動を増加させる遺伝子が存在することが示された (Takahashi et. al. 2008, *Genes Brain Behav*)。第17番染色体上の原因遺伝子を同定するために、染色体のより狭い領域のみをMSM系統のものと置き換えたコンジェニック系統を多数作製して解析を行った結果、17番染色体のテロメア近傍領域 (約2Mbp) に候補遺伝子としてAdcyap1 遺伝子を同定した。このAdcyap1は、動物のストレス応答に重要な役割を果たす下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) をコードする遺伝子である。PACAPはPTSDの発症に関与していることが報告されており、MSMおよび本コンジェニックマウスは、ストレス脆弱性やPTSD罹患リスクの個人差メカニズムの探索において、有用なモデル動物になると期待された。

### 研究結果

MSMとB6系統由来のPACAP遺伝子は、タンパク質コード領域には多型が無いが、視床下部領域における発現量はMSMに由来する遺伝子で有意に高く、実際にPACAP量も多いことが分かった。また、PACAP遺伝子の転写産物には主に3つのスプライシングバリエントがあるが、そのうちのエクソン1Bをスキップしたバリエント3は、MSMで発現が高く、B6では顕著に低い発現を示すことが分かった。このバリエント3の役割を明らかにするために、それぞれのバリエントタイプの5' 非翻訳領域にレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子をつないだ発現ベクターを作製して、細胞へのトランスフェクションを行うことで翻訳効率を比較した。その結果、バリエント3が最も高い翻訳効率を示すことが分かった。次に、このPACAP遺伝子の高発現に関わる分子機構の解析を進めた。遺伝子の塩基配列解析の結果、イントロン領域に顕著なGT配列の繰返し多型が存在した。このGT配列の長さが異なる発現コンストラクトを用いた解析の結果、長いGT配列の繰返しは高いエンハンサー活性があることが分かった。さらに、長いGT繰

返し配列を持つ発現ベクターでは、転写産物のスプライシングに違いが生じて、エクソン1Bスキップによるバリエーションの量が増えることが分かった。このように、MSMではGT配列多型に依存する遺伝子調節の違いによりPACAPの量が上昇し、それにより高い不安様行動を示すことを示した。PACAP遺伝子の高発現による影響を調べるために、MSM由来PACAP遺伝子を持つコンジュニック系統 (B6-PACAP<sup>MSM</sup>) を用いて、ストレス負荷後の応答性を調べた。B6-PACAP<sup>MSM</sup>系統は、コントロールであるB6系統と比較して、新奇場面における探索的な立ち上がり行動が減少し、一方で静止行動が増加する。また、拘束ストレス負荷をした後の血中コルチコステロン量の増加が、B6-PACAP<sup>MSM</sup>系統でB6と比較して長く持続することが分かった。更に、恐怖条件付け記憶の消去学習はB6-PACAP<sup>MSM</sup>系統でB6で同程度できるものの、その消去の維持はB6-PACAP<sup>MSM</sup>において低いことが分かった。これらのことから、B6-PACAP<sup>MSM</sup>系統は高いストレス応答性を示すとともに、PTSD様の表現型を示すことが明らかになった。

## まとめ

これまでに、ヒトの研究からPACAPとPTSDの関連が報告されている (Ressler et. al. 2011 *Nature*)。PTSD患者では、血中のPACAP量が有意に増加しており、またPACAP受容体にある遺伝的多型がPTSDへの罹りやすさに関わっていることも報告されている。PACAPはHPA軸を介したストレス応答に関与しており、PACAPを欠損したマウスではストレス関連行動が変化する (Hashimoto et. al. 2001, *PNAS*)。しかし、PACAP量の違いがどのようにストレス脆弱性、そしてPTSD症状と関連するか、そのメカニズムはまだほとんど明らかになっていない。本研究で明らかになったPACAP高発現マウスは、ヒトのPTSD患者のモデルとして活用できる可能性が示された。今後は、さらにストレス脆弱性の鍵となる神経回路の同定や、ストレスに対する過剰な反応からの回復法の開発など様々な研究への応用が期待できる。

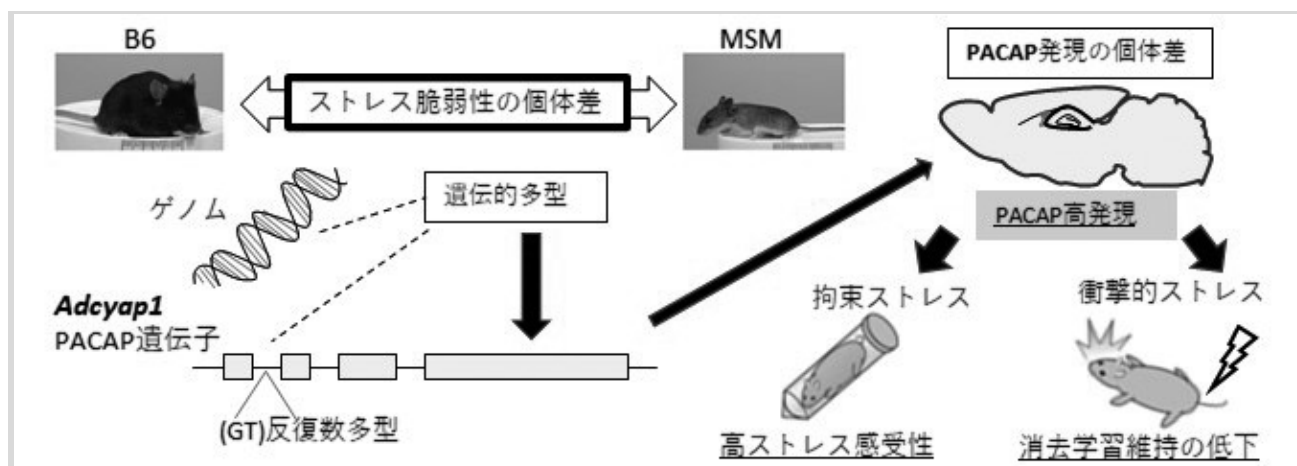


図 本研究成果の流れ 野生系統MSMと実験用系統B6の間には顕著な不安様行動の違いがあり、その原因遺伝子の一つとしてPACAP遺伝子を同定した。解析の結果、PACAP遺伝子はMSMで高発現しており、それにより高いストレス感受性と恐怖記憶消去の維持に異常が認められた。

## うつ病における新生神経細胞の役割の解明

(平成26年度～28年度)

公募班員 菅谷 佑樹 東京大学大学院医学系研究科 助教

### 研究目的

海馬歯状回は類似した記憶の分離や記憶の消去を司る脳領域であり、うつ病や不安障害の病態において重要な役割を果たしていると考えられている。歯状回の特徴として、神経細胞新生が生涯続いていることが挙げられ、神経細胞新生の変化がうつ病や不安障害の発症や、抗うつ薬の効果の発現に寄与しているという報告もある。

しかし、うつ病様の行動を示している動物や抗うつ薬を投与された動物において、海馬歯状回の古い細胞と新生神経細胞がそれぞれどのような活動パターンを示しているのかは全く明らかになっていない。それはこれまで古い細胞と新しい細胞の活動パターンを電気生理学的な記録によって区別できなかったからである。

本研究では、脳深部のカルシウムイメージング技術を用いてうつ病モデルの動物における海馬歯状回の新しい神経細胞と古い神経細胞の活動パターンを明らかにすることを目的とする。

### 研究背景

海馬は哺乳類においては大腦皮質に覆われた大腦辺縁系という回路の一部を構成する脳領域であり、場所情報の記憶やエピソード記憶に重要な役割を果たしていると考えられている。海馬はCA1、CA2、CA3、歯状回という領域から構成される。そのうち、歯状回は顆粒細胞と呼ばれる多数の興奮性細胞と少数の興奮性および抑制性介在細胞からなり、類似した記憶の弁別や記憶の忘却、消去に必要な領域であると考えられている<sup>1,2</sup>。また、近年のヒトや動物モデルを用いた研究から、歯状回はうつ病や不安障害の病態において重要な役割を果たしている可能性が指摘されている<sup>3</sup>。

歯状回の最も注目すべき特徴の一つに、神経細胞新生が挙げられる。ヒトやげっ歯類などでは主に脳室の周囲の脳室下層と歯状回顆粒下層において神経細胞新生が生涯続く。歯状回の新生神経細胞数はさまざまな環境要因によって変動し、記憶のパターン分離や忘却に関連していると考えられている<sup>1,4</sup>。多くのうつ病モデル動物において顆粒細胞新生が減少し、抗うつ薬の投与によって新生顆粒細胞数が回復することが報告されており<sup>5</sup>、動物の不安行動モデルにおいて、顆粒細胞新生を抑制すると、ストレスによる行動変化が起きやすくなることから<sup>6</sup>、新生顆粒細胞の活動がうつ病や不安障害の病態で何らかの役割を果たしていると考えられる。

しかし、新生顆粒細胞と成熟顆粒細胞の活動がどのようにうつ病様の行動と関連しており、抗うつ薬がそれらの活動をどのように変化させるのかは全く明らかになっていない。その理由は、これまでのマルチユニット記録による細胞活動の記録では成熟顆粒細胞と新生顆粒細胞の活動を明確に区別できないからである。

近年、細胞外記録に代わる神経活動の観察方法としてカルシウムイメージングが発展している。GCaMPなどのカルシウムインジケーターでは活動電位による細胞内カルシウム濃度の変化を観察でき、ウイルスベクター技術と組み合わせることで、特定の細胞に時期特異的にカルシウムインジケーターを発現させ、特定の神経細胞の活動パターンの詳細な解析を行うことが可能となっている。

本研究では新生細胞特異的にGCaMPを発現させ、カルシウムイメージングによる歯状回の新生および成熟顆粒細胞の活動の計測を行い、うつ病モデルにおける新生および成熟顆粒細胞の役割について明らかにすることを目的とする。

### 研究結果

マウス歯状回顆粒細胞にアデノ随伴ウイルスベクターでカルシウムインジケーターを発現させ、恐怖



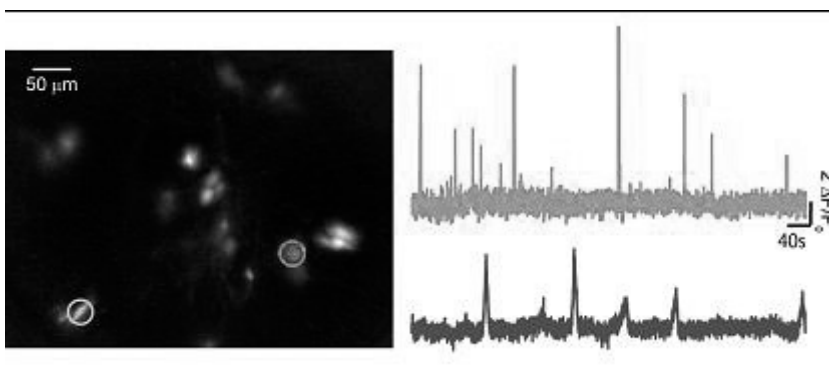
条件付け課題の記憶想起時の新生顆粒細胞と成熟顆粒細胞の活動を記録した。新生神経細胞のラベリングにはネスチンプロモーターを用い、細胞分裂後6週で活動を記録した。また対照群として同じ文脈、音に暴露しつつも電気刺激を与えていない群の顆粒細胞の活動を記録した。

条件刺激に暴露して条件付け記憶を想起させた際の神経細胞の活動を解析したところ、恐怖記憶を獲得したマウスでは、対照群と比較して、恐怖記憶の想起時に動物の行動に伴って成熟顆粒細胞の活動が大きく変化していることが明らかとなった。ところが、新生顆粒細胞では成熟顆粒細胞に比べて記憶想起時の動物の行動に伴う神経活動の変化が少なかった。したがって、成熟顆粒細胞と比較して新生顆粒細胞は恐怖記憶の想起時の活動変化が少ないといえる。最近の報告では歯状回の新生顆粒細胞が抑制性介在細胞を介して周囲の成熟顆粒細胞の活動を抑制していることが明らかとなっており、恐怖記憶の想起課題時に周囲の顆粒細胞の活動をコンスタントに抑制することで歯状回顆粒細胞のスパースな発火を生み出している可能性が示唆された。

次に、海馬歯状回は抗うつ薬の効果発現のターゲットとして注目されていることから、抗うつ薬の作用機序の一つであるセロトニン1C受容体のアンタゴニストを投与し、恐怖記憶想起課題試行中の成熟顆粒細胞および新生顆粒細胞の活動を記録した。アンタゴニストの投与によって記憶想起課題中の動物の行動に伴う成熟顆粒細胞の活動の変化が抑制された。新生顆粒細胞の活動が周囲の成熟顆粒細胞の活動を抑制する働きをもっていることを考慮すると、新生顆粒細胞の活動が高まることによる成熟顆粒細胞の活動の抑制や、抗うつ薬による活動の変化の抑制が両者の抗うつ作用の作用機序の一部である可能性が示唆された。抗うつ薬投与時の新生顆粒細胞の活動に関しては現在解析を進めている。

## まとめ

今回、我々はカルシウムイメージング技術を用いることで新生顆粒細胞および成熟顆粒細胞の自由行動下の活動の記録を行った。その結果、新生顆粒細胞と成熟顆粒細胞で行動に伴う活動の変化に違いがあることが示唆された。また、抗うつ薬の作用機序の一部が行動に伴う成熟顆粒細胞の活動の変化を抑制することにある可能性が示唆された。今後、これらの活動パターンの特徴を踏まえて新生顆粒細胞や成熟顆粒細胞の活動を操作することによって、これらの細胞の活動による不安や抑うつ様行動の制御のメカニズムを明らかにすることができれば、非侵襲的脳深部電気刺激<sup>7</sup>などを用いた新しい治療法の開発に役立つ可能性が示唆された。



左) 自由行動下のマウス海馬歯状回においてカルシウムインジケータを発現した分裂後6週の新生顆粒細胞のカルシウムイメージング

右) 左の図において○で囲まれた領域の蛍光輝度変化



## コネクトーム技術を用いた脳内微小構造の標準化と異常解析

(平成27年度～28年度)

公募班員 深澤 有吾 福井大学 医学部 教授

### 研究目的

本研究課題では、ヒトの認知症や精神疾患に類似した行動薬理的表現型の原因となるマイクロエンドフェノタイプが脳内のシナプス構造、特にシナプス前後構造を構成する各オルガネラや機能ドメインなどの微細構造の量的特徴に現れると予想し、①シナプス構造を高分解能で三次元的に可視化し、その微細構造を精密且つ定量的に評価できる解析基盤を構築すること、②野生型マウスにおける様々な種類のシナプス結合の微細構造間の相関関係を明らかにすること、そして、③これら構造相関情報から、精神神経疾患モデルマウスにおけるシナプス構造異常を検出する新たな解析手法を確立することを目的とした。

### 研究背景

精神疾患患者のゲノム解析から疾患と有意に相関した遺伝子変異が見出されている (Nature 511, 421-427, 2014)。マウス遺伝子にこれら変異を導入するとヒトの神経疾患と類似した行動薬理的な表現型が現れるので、これらを神経疾患のモデルとして、疾患原因の解明や予防法や治療法の開発に向けた研究が行われている。

動物行動は種々の神経細胞同士が細胞接着構造を介して互いに連結して形成された脳内神経回路により行われ、脳内の領域毎に特有な局所回路が存在する。正常な脳機能はこれら神経回路が協調して動作することで発揮されるので、疾患モデルマウスの脳各部位の局所回路や線維連絡を一つ一つ調べ、異常な連絡箇所が同定できれば、疾患原因の解明に繋がる。しかし行動薬理的異常を示す病態モデルマウスの脳内回路の異常を同定できた例は殆ど無い。

疾患モデルマウスにおける脳内異常検出が困難な原因の一端は、脳の構造的多様性と緻密性にある。それぞれの局所回路は多種類の興奮性細胞と抑制性細胞が複雑に連絡することで形成され、更に個々の局所回路が脳内の多数の領域と連絡している。これら神経細胞同士の連絡はシナプスと呼ばれる直径1ミクロンにも及ばない微小な細胞間情報伝達構造で支えられている。従って、その詳細を調べるには電子顕微鏡レベルの高い空間解像度での観察を必要とし、広大な脳で、どのシナプス（群）が異常であるかを網羅的に調べることは困難であった。

私はこれまで、電子顕微鏡を用いたシナプス構造と機能分子の発現の解析基盤の構築を行いながら、種々のシナプスにおける機能と構造の関連性を解析してきた。この解析の中で、シナプスの種類毎の構造的多様性を明らかにするとともに、シナプスを構成する種々のオルガネラや構造ドメインの構造特徴が互いに相関し、この相関の様子がシナプスの種類毎に異なることに気付いた。

そこで本研究課題では、最新の電子顕微鏡技術である三次元走査型電子顕微鏡を用いて野生型マウスの種々のシナプス微細構造を定量的に解析し、個々の神経連絡を形成するシナプス結合の微細構造間の相関関係を明らかにすると共に、この相関関係を指標に行動薬理的に異常な表現型を示すマウスのシナプス構造異常（マイクロエンドフェノタイプ）の検出を試みた。その結果、本課題で確立したシナプス評価法が、精神疾患の病態解明研究に新たな解析基盤を提供できることを確認した。

### 研究結果

#### ①シナプス構造を三次元的に可視化し、その微細構造を定量的に評価できる解析基盤の構築

近年、脳内神経回路の全貌を明らかにする目的で開発されたコネクトーム機器（高分解能型走査型電子顕微鏡）を用いて、脳内シナプス結合全体を高解像度且つ定量的に微細形態が観察できる試料処理方法と画像取得条件を決定した（図A）。更に、撮影した画像からシナプスの三次元像を再構築し、各種

微細構造の形態学的特徴を計測する手法を確立した（図B）。

## ②野生型マウスにおける様々な種類のシナプス結合の微細構造間の相関関係の解明

マウス海馬及び歯状回に分布する軸索－スパイン構造を形成する興奮性シナプス結合4種類を同定しながら撮影し、各シナプスに含まれる微細構造の形態的特徴間の相関関係を解析した。その結果、解析した全てのシナプス結合で、「シナプス前ボタンの体積」、「ボタン内シナプス小胞の数」、「シナプス後スパインの体積」、及び、「シナプス後肥厚の面積」の4つの計測値間で、統計学的に有意な相関関係が認められた。このことより、複雑且つ多様に見えるシナプス結合構造にも構造相関が存在し、どのシナプスでも上記4つの構造変数が一定の関係を保つように形成されていることを明らかにした。

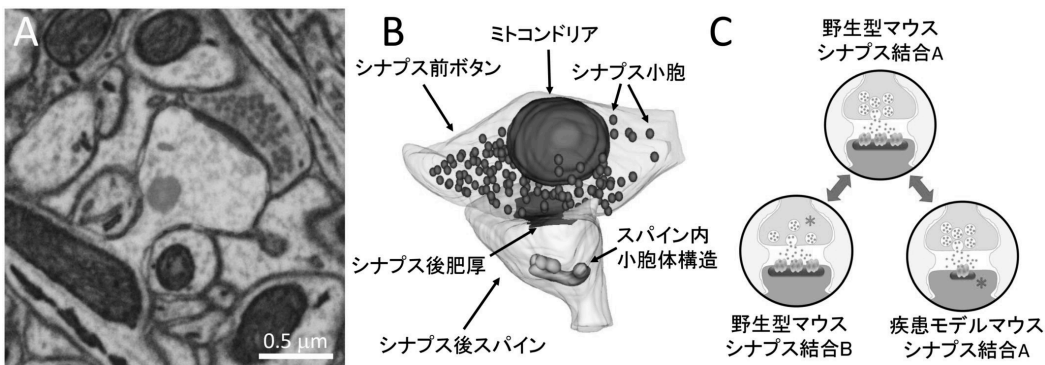
更に、各相関の様子（傾きとY切片の値）は、シナプス結合の種類毎に固有の値を示すことも明らかとなり、シナプス結合の種類毎の構造特徴が微細構造相関上に現れることも明らかにした（図C、野生型シナプス間の比較）。各シナプス微細構造は、シナプス伝達における機能的特性と相関することが報告されていることから、今後、各微細構造と伝達機能との対応関係を詳細に明らかにして行くことで、観察されたシナプスの機能を微細構造の定量的解析情報に基づいて予測することが可能であることが示唆された。

## ③構造相関情報から疾患モデルマウスのシナプス構造異常を検出する解析手法の確立

細胞骨格分子の一つで、神経細胞における役割が未知の分子をコードする遺伝子を欠損したマウスXは、行動薬理的試験において、空間認知機能の低下を伴う見当識症状を示す。本研究では、このマウスの歯状回分子層に分布する興奮性シナプス結合の構造解析を行い、野生型マウスの同種のシナプス結合の微細構造情報と比較することで（図C、野生型マウスと疾患モデルマウスのシナプス構造の比較）、上記実験で開発した新たなシナプス構造評価系のマイクロエンドフェノタイプ検出における有用性を検証した。その結果、このマウスのシナプスでは、シナプス前後の協調した構造調節に異常が起きていることを突き止めた。この様なフェノタイプは他の観察手法では取得できないことから、本研究で確立したシナプス微細構造の定量的な評価手法が脳内シナプスの異常検出に有用であることを示している。

## まとめ

本研究で確立した新たなシナプス構造解析法は、既存法に無い視点と精度でシナプスの構造特徴を抽出し、更に、病態モデルマウスにおけるシナプス構造異常を検出できることを証明した。本手法を用いて種々の神経疾患モデルマウスのシナプス構造を調べることで、新たなマイクロエンドフェノタイプが発見でき、精神疾患の発症機序の解明と新規治療法の開発の両面に寄与できると考えている。



本研究の実験手法とねらい A) 高分解能型走査型電子顕微鏡を用いたシナプスの高解像度観察の例  
シナプス前ボタン（青）、シナプス後スパイン（黄）、シナプス後肥厚（赤） B) 連続画像より再構築されたシナプス結合の三次元構造とその機能ドメイン構造 C) シナプス結合の微細構造相関を利用した結合種に固有な特徴（\*）抽出と異常（\*）検出

# 精神疾患発症脆弱性分子のシグナルネットワークとマイクロエンドフェノタイプ

(平成24年度～28年度)

公募班員 貝淵 弘三 名古屋大学大学院医学系研究科 神経情報薬理学 教授

## 研究目的

統合失調症は難治性の精神疾患の1つである。当該疾患の病因・病態に中枢神経系の発達異常が深く関与していることが示唆されているが、その分子病態メカニズムは理解できていない。本研究では統合失調症患者サンプルを用いた全ゲノム解析から同定した精神疾患脆弱性分子の中で神経発達関連分子に着目し、その分子群の神経ネットワーク形成機構やシナプス形態・伝達機能を詳細に解析することで、新たなマイクロエンドフェノタイプの作出を目指した。

## 研究背景

統合失調症は思春/青年期から壮年期にかけて発症傾向を示す重篤な精神疾患である。統合失調症の病因は未だ明らかにされていないが、統合失調症患者の死後脳及び脳イメージング解析から統合失調症病因説の1つとして神経発達障害仮説が提唱されている。神経細胞は、動的に形態を変化させることで神経ネットワークを構築し、記憶・学習や情動などの高次機能を制御している。神経細胞の形態変化には、低分子量G蛋白質ファミリーを介した細胞内シグナル伝達による細胞骨格制御が重要な役割を担っていることが知られている。近年、我々は連携研究者ら（名古屋大・医・精神医学）と共に統合失調症患者サンプルを用いた高精度DNAコピー数多型(CNV)解析から病因寄与度の高い稀なExonic CNVを同定し、多数の低分子量G蛋白質制御因子をコードする統合失調症脆弱性分子を見いだした。低分子量G蛋白質であるRhoやRapファミリーGTPasesは神経形態制御を通じて神経発達に重要な役割を果たすことが知られているが、これらの制御タンパク質群がどのように統合失調症の病態に関与するのかは不明であった。

## 研究結果

本研究では神経発生における統合失調症発症脆弱性分子の機能を明らかにするべく、分子細胞生物学的解析を行った。具体的にはRhoおよびRap-GTPases制御分子や神経形態制御に関わるNDE1分子に着目して統合失調症の分子病態解明に取り組んだ。我々は、神経発達への低分子量G蛋白質制御分子（BCR, DOCK4, ARHGAP10, ARHGAP26, RAPGEF1）の関与を検討するため、初代培養海馬神経細胞でRNA干渉法を用いた遺伝子機能阻害実験を行った結果、ARHGAP10(RhoA-GTPase 活性化因子)やRAPGEF1(Rap1グアニンヌクレオチド交換因子)、NDE1の機能阻害が神経突起形成に異常を引き起こすことを見出した。ARHGAP10はGAP活性領域とBAR/PH領域で分子内相互作用することでGAP活性を抑制していた。そしてFynキナーゼはBAR/PH領域でのリン酸化を介してGAP活性の調節に関与していた。さらに我々は統合失調症患者のゲノム情報を勘案して新たにARHGAP10疾患モデルマウス作製し、当該マウスでは内在性のRhoGAP活性が低下していること、ARHGAP10疾患モデルマウス由来の培養海馬神経細胞で樹状突起の形成異常が起こっていることを見いだした。RAPGEF1の機能阻害は発達神経においては樹状突起の形成異常が認められたが、成熟神経のシナプス形態には異常が認められなかった。我々はRap1シグナル伝達に関わる分子病態基盤を明らかにするため、統合失調症の陽性症状を模倣したコカイン薬理モデルを指標としてRap1シグナル伝達の生理的意義を評価した。具体的にはRap1コンディショナルノックアウトマウスを用いて線条体特異的にRap1を機能欠損させたところ、コカイン誘導性の快情動行動に異常が認められた。これらの結果は、低分子量G蛋白質RhoAやRap1の制御シグナルが精神疾患の分子病態に関与していることを示唆した。また我々は、統合失調症発症脆弱性分子であるNDE1に関わる分子病態を明らかにするため、プロテオミクス解析を用いてNDE1と相互作用する分子を100種類以上同定した。遺伝子オントロジー解析では、NDE1が細胞骨格制御に関わる分子群と多く相互作用していることが分かった。加えて我々は、神経

発達における疾患患者特有のミスセンス変異 (NDE1-S214F) の影響を検討した。子宮内電気穿孔法による NDE1-S214F 変異体発現は大脳皮質の形成阻害を引き起こした。さらに野生型および NDE1-S214F 変異導入マウスの脳可溶化物を用いた免疫沈降実験から NDE1 蛋白質複合体を精製し、質量分析により構成蛋白質の網羅的同定を行った。結果として NDE1-S214F 変異で結合が低下する NDE1 相互作用分子を 20 種類以上同定した。S214F 変異体により相互作用が低下した NDE1 相互作用分子について、REACTOME-PPI データベース ([reactome.org](http://reactome.org)) による *in silico* パスウェイ解析を行った結果、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー関連シグナルが有意にエンリッチしていることが分かった。生化学的解析では、NDE1-S214F 変異が Rac/Cdc42 エフェクター分子 IQGAP1 や RhoA エフェクター分子 MRIP と NDE1 の相互作用を阻害していることを見出した。これらの知見から NDE1 が関わる統合失調症病態では、Rho ファミリー関連シグナルを介した細胞骨格の制御プロセスが関連していることを示唆した。

## まとめ

近年、DNA コピー数多型 (CNV) やエクソーム解析の発展により精神疾患患者に様々な遺伝子異常が生じていることが明らかになった。しかしながら、同定された疾患脆弱性分子について分子細胞生物学的解析は十分に行われていない。本研究では精神疾患の病因・病態との関わりを理解するため、新規疾患脆弱性分子が関わる神経形態およびネットワーク形成機構を詳細に解析することで、新たなマイクロエンドフェノタイプの作出を目指した。ARHGAP10 疾患モデルマウスを用いた機能解析では期待された顕著なスパイン形態異常は認められなかったものの、RhoA シグナル伝達低下が生じていることが明らかになった。また Rap1 コンディショナルノックアウトマウス解析では、スパイン形態に異常が認められないものの、ドーパミンシグナル伝達が著しく阻害され、情動行動に異常をきたすことを見出した。これらの知見は、統合失調症の病態が細胞形態を含む外的要因とは別に、“シグナル伝達不全” という内的要因も深く関与していることを示唆するものであった。本研究では“シグナル伝達不全” がマイクロエンドフェノタイプとして不偏的なものであるかについては検証できていない。しかしながら、最近では光分子プローブの開発が進み、非侵襲的に動物個体内で細胞内シグナル伝達を評価・調節することが可能になりつつある。今後、我々は上述の非侵襲分子プローブを用いて精神疾患モデルマウスの細胞内シグナル伝達を評価することで精神疾患に関わるマイクロエンドフェノタイプを明らかにできると考えている。

### ● 全ゲノム解析から得られた遺伝学的知見 ●



- ・統合失調症と NDE1-S214F 変異との連鎖 (Kimura et al, Schizophr Bull, 41(3), 2015)
- ・統合失調症患者における ARHGAP10 や RAPGEF1 遺伝子座での CNV 欠損 (Kushima et al, Mol Psychiatry, 22(3), 2017)

プロテオミクスによる分子ネットワーク解析およびゲノム情報を勘案した疾患モデルマウスの生理解析

### ● 本課題の研究成果 ●



#### <低分子量G蛋白質が関わる分子病態>

- ・ARHGAP10 や RAPGEF1 は樹状突起形成に関与する
- ・統合失調症患者の疾患アレルを模倣した ARHGAP10 モデルマウスでは RhoGAP 活性が低下していた
- ・RAP1 シグナル伝達は情動行動を制御する (Nagai et al, Neuron, 89(3):550-565, 2016)



#### <NDE1蛋白質が関わる分子病態>

- ・NDE1-S214F 変異は大脳皮質形成を阻害する
- ・S214F 変異に影響を受ける 20 種類以上の NDE1 相互作用分子を網羅的に同定した
- ・S214F 変異は Rac/Cdc42 シグナル伝達分子 IQGAP1 との相互作用を阻害する

**細胞内シグナル伝達の変動はマイクロエンドフェノタイプとして有望である**

## iPS細胞の分化系の技術開発および独自の統合失調症多発家系患者の分子病態解析

(平成27年度～28年度)

公募班員 中澤 敬信 大阪大学大学院歯学研究科 准教授

### 研究目的

統合失調症は幻覚・妄想、意欲低下、および認知機能障害等が認められる精神障害で、約100人に1人が発症する非常に頻度が高い疾患です。現存する治療薬を用いても十分に治療されない患者も多く、また主要な治療薬の副作用も大きな問題となっています。統合失調症の治療に向けた戦略には、疾患の病因・病態の分子レベルの理解が必要です。そのためには、モデルマウスを用いた研究や死後脳を用いた研究のみならず、患者脳を直接的に対象とした研究が重要ですが、ヒト脳へのアクセスは著しく困難であるため分子病態の理解は世界的に進んでいません。そこで、本研究では、患者由来神経細胞を直接的に扱うことが可能となるiPS細胞技術を利用して統合失調症発症の分子病態の一端を明らかにすること、およびiPS細胞の神経細胞への分化系の技術基盤の開発を目的としました。

### 研究背景

複数の抗精神病薬を、十分量、十分期間投与しても改善が認められない治療抵抗性統合失調症患者の存在が問題となっています。治療抵抗性統合失調症に有効な抗精神病薬であるクロザピン治療は、治療抵抗性統合失調症患者の約6割程度に有効であることが知られておりますが、クロザピンには無顆粒球症という致命的な副作用が、0.5～1.0%程度に認められており、クロザピンが十分に普及しない大きな原因の1つとなっています。また、クロザピンは複雑な薬理学的特性をもっているため、クロザピンの有効性のメカニズムは未だ不明です。クロザピンの有効性のメカニズムを明らかにするためには、治療抵抗性統合失調症患者の神経細胞を用いた研究が重要であると考えられますが、患者脳サンプルを研究に用いることはできないことから、現在までは、主に動物モデルや齧歯類の神経細胞を用いた研究が主流でした。しかし、治療抵抗性統合失調症に対する確立した動物モデルがなく、治療抵抗性統合失調症の分子病態は不明な点が多いのが実態です。そこで、本研究では、治療抵抗性統合失調症患者から樹立したiPS分化神経細胞を解析することにより、治療抵抗性統合失調症の分子病態の一端を明らかにすることを試みました。

### 研究結果

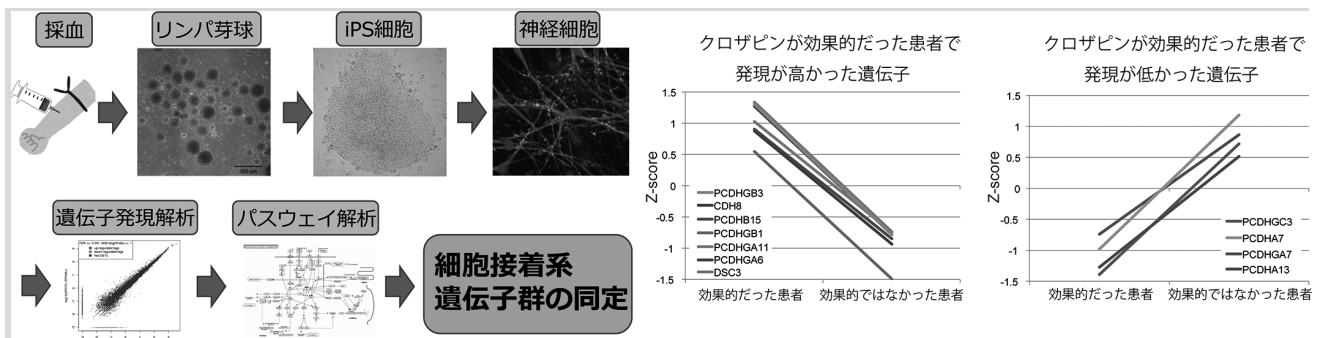
本研究では、治療抵抗性統合失調症である一卵性双生児に注目した解析を実施しました<sup>1)</sup>。この一卵性双生児患者では、片方の患者は治療抵抗性統合失調症治療薬のクロザピンの投与で寛解し、他方の患者においてはクロザピンの効果がありませんでした。一卵性双生児にも関わらず、明確に抗精神病薬に対する治療応答性に相違がある分子メカニズムを明らかにすることを目的として、両者の不死化リンパ芽球からiPS細胞を作製しました。次に、神経細胞の分化に関与するbHLH型転写因子である*Neurogenin2*の過剰発現系を用いて、それぞれの患者のiPS細胞から比較的均質な興奮性神経細胞を得ました。得られたiPS細胞由来分化神経細胞をmock処理、もしくはクロザピン処理し、神経細胞から全RNAを調製し、遺伝子発現解析を実施しました。その結果、クロザピンの効果が見られた患者では、効果がみられなかった患者と比較して、167遺伝子で高い発現が認められ、また、95遺伝子で低い発現が認められました。それらの262遺伝子に関して、パスウェイ解析を実施したところ、細胞接着関連の機能が推定されるグループに有意に濃縮されていることがわかりました (GO:0007156, homophilic cell adhesion; FDR q value, 4.76E-04)。具体的には、*PCDHGB3*、*CDH8*、*PCDHB15*、*PCDHGB1*、*PCDHGA11*、*PCDHGA6*、および*DSC3*遺伝子の発現量がクロザピンの効果が見られた患者で高く、*PCDHGC3*、*PCDHA7*、*PCDHGA7*、および*PCDHA13*遺伝子の発現量が低いことがわかりました (図参照)。iPS細胞の作製に使用した患者の不死化リンパ芽球およびiPS細胞についても、同様に遺伝子発現解析を行いました。興味深いことに、その発

現に同様な差異を見いだすことはできなかったことから、本研究で同定した遺伝子発現量の相違は、iPS分化神経細胞特異的であることが示唆されました。

上記研究の他に、本研究では独自に見いだしている統合失調症の多発家系由来の患者からiPS細胞を樹立しました。iPS分化神経細胞の機能異常を解析する研究を実施し、患者特異的にモノアミン受容体の動態に異常があることを予備的に見いだしました（中澤ら、未発表データ）。また、領域内外の多くの先生との共同研究により、細胞内タンパク質輸送制御分子ARHGAP33が統合失調症と関連していることを見だし、細胞内タンパク質輸送制御分子群のiPS分化神経細胞を用いた機能解析のための技術基盤の確立を実施しました（中澤ら、未発表データ）。

## まとめ

本研究成果により、細胞接着系遺伝子群の発現量の相違が、クロザピン反応性に関与している可能性が示唆されました。細胞接着系遺伝子群の発現量が異なる分子メカニズムは不明ですが、エピジェネティクスの関与が考えられます。今後、クロザピン反応性に関与する分子メカニズムを包括的に明らかにするためには、他患者サンプルを用いた再現性を確認する研究、細胞接着系遺伝子群の発現量の相違が神経細胞機能に与える影響の解析、および遺伝子欠損マウスを用いた分子病態研究や全脳イメージング研究<sup>4)</sup>等が重要になります。また、細胞接着系遺伝子群の発現量が、クロザピンに対する反応性を予測するマーカーとなる可能性が示唆されます。将来的には、本研究により得られた成果は、治療抵抗性統合失調症に対する有効かつ副作用の少ない新たな治療薬の開発に貢献する可能性のみならず、（治療抵抗性）統合失調症の細分類化が可能となる、新たな系の開発に資する可能性があります。



左) 本研究の流れ。治療抵抗性一卵性双生児患者からiPS細胞を樹立し、iPS分化神経細胞を用いた遺伝子発現解析を実施しました。

右) 一卵性双生児患者間で発現量が異なっていた遺伝子。文献1) から引用（改変）。

# 超解像で可視化するシナプスナノドメインに着目した精神病態表現型解析

(平成27年度～28年度)

公募班員 深田 優子 自然科学研究機構 生理学研究所 准教授

## 研究目的

NMDA仮説に代表されるように、統合失調症など精神疾患の病態はシナプス機能異常と密接に関連していると推測されるが、これに基づく定量的なエンドフェノタイプは確立していない。一方、統合失調症様の精神症状を亜急性に生じる免疫介在性脳炎は、患者自己抗体がNMDA受容体やLGI1など脳内シナプスの抗原蛋白質に直接作用して発症する。したがって、免疫介在性脳炎自己抗体が惹起するシナプスの変容は、精神疾患におけるマイクロエンドフェノタイプを反映するものと考えられる。本研究では、われわれが最近超解像顕微鏡を用いて可視化に成功したシナプスナノドメインの構造的、機能的変化をシナプス変容の表現型としてとらえ、免疫介在性脳炎自己抗体が惹起するようなシナプスナノドメインの変容が、精神病態のマイクロエンドフェノタイプとなりうるか検討する。

## 研究背景

統合失調症や気分障害などの精神疾患は1) 遺伝要因と環境要因が複雑に絡み合って発症すること、2) ヒト固有の精神症状を再現しうるモデル動物の構築が困難であることから、遺伝子変異-蛋白質機能異常と臨床症状の間を確実につなげる理想的な(マイクロ)エンドフェノタイプの同定と解析が必須である。最近、統合失調症の有力な病態機構として、「NMDA仮説」が注目されている。シナプス発達異常やNMDA型グルタミン酸受容体(NMDA受容体)を介したシナプス伝達の機能低下は、精神疾患発症と密接に関連性すると考えられるが、この仮説に基づく定量可能なエンドフェノタイプは未だ確立していない(図1)。

われわれは、脳の興奮性シナプス伝達の制御機構を明らかにすることを目的として、AMPA型グルタミン酸受容体(AMPA受容体)制御分子を同定し、その生理機能を解析してきた。これまでに、1) AMPA受容体制御分子として、てんかん原因遺伝子産物LGI1リガンドとその受容体ADAM22を発見し(Fukata *et al. Science* 2006)、2) LGI1・ADAM22結合が、AMPA受容体を介したシナプス伝達を正に制御すること(Fukata *et al. Proc Natl Acad Sci* 2010)、3) LGI1およびADAM22の単一遺伝子変異が、LGI1-ADAM22の結合を阻害し、ヒトのてんかん病態を引き起こすことを明らかにした(Yokoi *et al. Nat Med* 2015; Muona *et al. Neurol Genet* 2016)。さらに、最近、免疫介在性脳炎患者がLGI1に対する自己抗体を有することが示された(Lai *et al, Lancet Neurol* 2010)。免疫介在性脳炎では(亜)急性に精神症状(不安、パニック、抑うつ、幻視、妄想、感情鈍麻、人格変化等)やけいれん、記憶障害、意識障害などの中枢神経症状が生じる。われわれは、免疫介在性脳炎に関連するシナプス抗原に対する自己抗体(シナプス自己抗体)を網羅的に同定すると共に、多種抗体のELISA測定法を開発し、LGI1自己抗体が単独で、けいれん、記憶障害を主症状とする辺縁系脳炎の発症と強く関連することを示した。また、LGI1自己抗体が、LGI1とADAM22受容体との結合を可逆的に阻害し、シナプスにおけるAMPA受容体数を低下させることを明らかにした(Ohkawa *et al. J Neurosci* 2013; Ohkawa *et al. J Neurosci* 2014)。一方、NMDA受容体に対する自己抗体を有する脳炎は抗NMDA受容体脳炎と呼ばれ、その多くが統合失調症様の精神症状で発症する。NMDA受容体自己抗体は、シナプスNMDA受容体を内在化させ、NMDA受容体を介したシナプス伝達を低下させる(Hughes *et al, J Neurosci* 2010)。初期診断が統合失調症等の精神疾患であった患者の一部からも、NMDA受容体抗体が見出される症例があり、統合失調症と抗NMDA受容体脳炎には共通した病態が関与していることが強く示唆される。また、LGI1抗体やAMPA受容体抗体陽性の辺縁系脳炎でも、精神症状を示す症例が少なくない。すなわち、これらシナプス自己抗体は直接、精神症状につながる共通のシナプス変容を惹起する、言い換えれば、シナプス機能変容が精神症状と密接に関連することを裏付けるものと考えられる(図1)。

一方で、われわれは、ポストシナプス主要構成分子でグルタミン酸受容体の足場蛋白質であるPSD-95のシナプス局在化機構として、パルミトイル化修飾機構を解析してきた (Fukata and Fukata, *Nat Rev Neurosci* 2010)。われわれはパルミトイル化PSD-95を特異的に認識するプローブを超解像STED顕微鏡と組み合わせ、生神経細胞で初めてポストシナプス内部構造を可視化することに成功し、ポストシナプス構成単位ナノドメインを発見した (Fukata *et al*, *J Cell Biol* 2013) (図1)。さらに、各ナノドメインがそれぞれAMPA受容体の捕捉単位となっており、ナノドメイン内AMPA受容体の配置、密度を検出することに成功した。シナプスナノドメインは、シナプス構造および機能単位として、シナプス伝達、シナプス可塑性、そしてシナプス病態に密接に関わることが予測された。

## 研究結果

1) ポストシナプスナノドメインにおけるグルタミン酸受容体の配置関係を調べるために、神経細胞におけるCrispr/Cas9法により、AMPAおよびNMDA受容体に対する各種抗体の特異性を検証し、特異的染色を与える抗体を得た(未発表)。

2) ポストシナプスナノドメインの構造・機能変化と密接に関与すると考えられるPSD-95パルミトイル化修飾機構の制御機構を解明する過程で、次の知見等を得た (Yokoi, Fukata *et al*, *J Neurosci*.2016 および未発表)。

(i) 細胞、組織中の多種のシナプス蛋白質のパルミトイル化修飾状態を生化学的に調べる手法APEGS法を開発した。

(ii) (i)の手法を用いて、神経細胞における各種蛋白質のパルミトイル化状態とそのダイナミクス (パルミトイル化と脱パルミトイル化の変化) を調べることに成功した。

(iii) 神経細胞に発現するPSD-95はその大部分がパルミトイル化されていた。しかし、このパルミトイル化状態は安定ではなく、持続的に脱パルミトイル化が進行しており、約2時間でターンオーバーするパルミトイル化-脱パルミトイル化回転が存在していた(図2)。

(iv) 多種のパルミトイル化蛋白質のうちPSD-95だけが持続的なパルミトイル回転を受けており、他の蛋白質は安定なパルミトイル化状態を維持していた。

(v) 神経細胞におけるPSD-95のパルミトイル化-脱パルミトイル化回転のスピードは、シナプス発達初期には早く、発達に伴い遅くなることが分かった(図2)。

(vi) パルミトイル化-脱パルミトイル化回転の脱パルミトイル化 反応を担う酵素ABHD17を発見した。

3) シナプス機能発達、すなわち興奮性シナプス伝達を担うAMPA受容体機能の発達について、LGI1-ADAM22-PSD-95分子経路による制御機構を明らかにした (Lovero *et al*. *Proc Natl Acad Sci* 2015)。

## まとめ

ポストシナプスナノドメインの構造、機能変化はPSD-95のパルミトイル化-脱パルミトイル化回転と密接に関連すると考えられた。ABHD17はPSD-95の脱パルミトイル化酵素として、既知のパルミトイル化酵素DHHCとともにシナプス局所でパルミトイルサイクルを駆動し、この相反する2つの酵素活性のバランスがPSD-95のパルミトイル化レベルを調節し、ポストシナプスナノドメインの形成、再構築を制御すると推測される。今後は、ナノドメインの変容に加えて、PSD-95パルミトイル回転の変動も、精神病態におけるシナプス変容を定量化するためのマイクロフェノタイプとして考慮する必要がある(図1)。



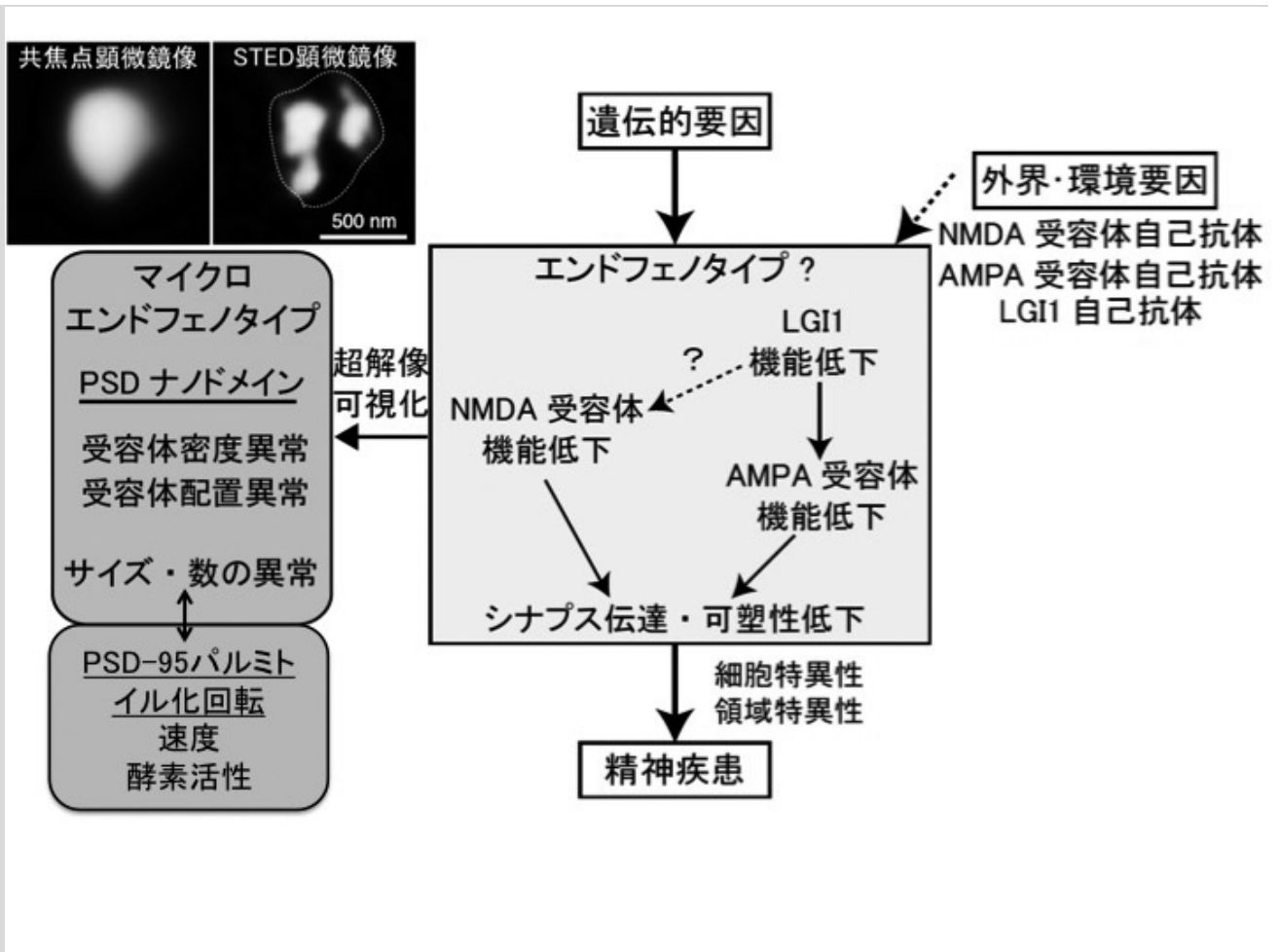


図1：シナプス発達・機能異常と精神疾患-シナプスナドメイン可視化によるアプローチ

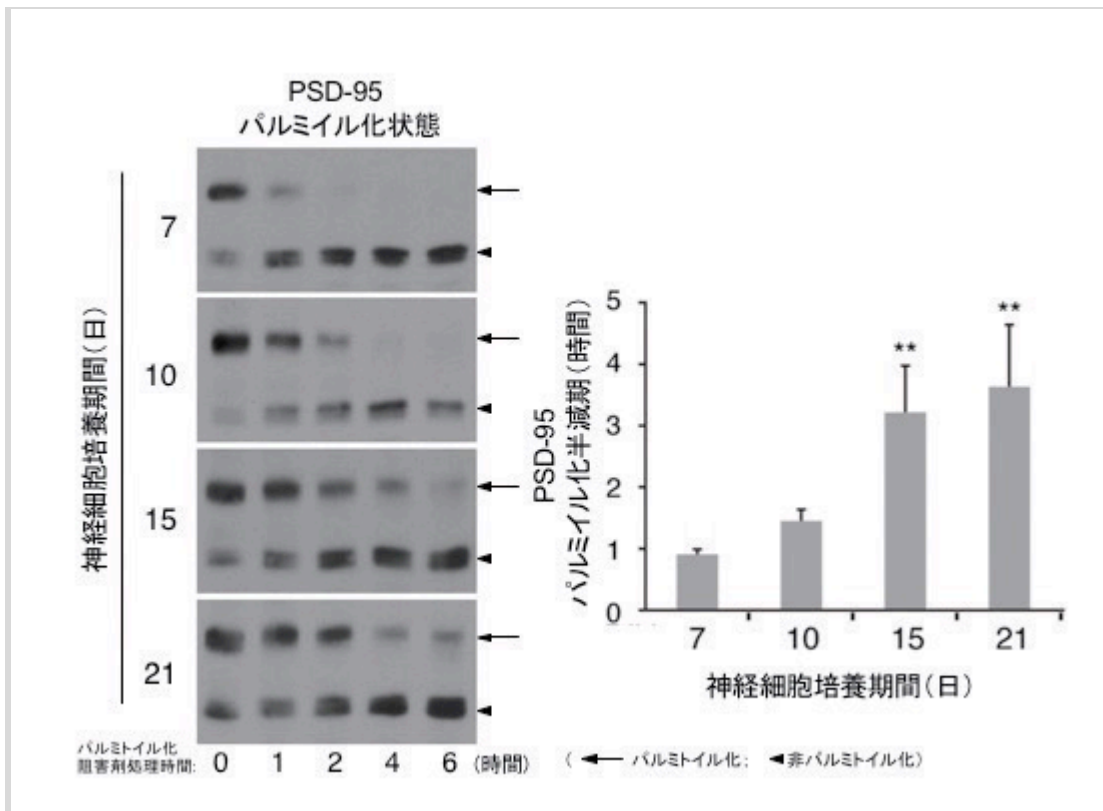


図2：シナプス発達に伴うPSD-95パルミトイル回転スピードの変化

うつ病・不安障害モデル動物における分界条床核神経回路の機能的変化（平成25年度～26年度）

慢性ストレス・慢性疼痛による分界条床核-腹側被蓋野神経回路の機能的変化（平成27年度～28年度）

公募班員 南 雅文 北海道大学 大学院薬学研究院 教授

## 研究目的

うつ病や不安障害を患うために、抑うつ気分や不安情動を生成する神経機構を有しているとは考え難い。ヒトを含む哺乳類は、危険な時間帯や場所において、また、疾患や傷害を患った際に、自らの行動を抑制し周囲に対する警戒を高めることで身を守る生体防御システムとして、このような負情動生成機構を獲得・進化させてきたと考えられる。したがって、うつ病や不安障害のメカニズムを理解するためには、生体防御システムとしての抑うつ・不安の神経機構・神経回路を明らかにした上で、患者あるいは病態モデル動物においてその神経機構・神経回路がどのように変化しているかを解析することが必要である。本研究では、痛み刺激が抑うつ、嫌悪、不安を惹起する神経機構・神経回路を明らかにし、慢性痛およびうつ病モデル動物における当該神経機構・神経回路の機能的変化を明らかにすることによりうつ病や不安障害の脳内メカニズム解明に資することを目的とする。

## 研究背景

我々はこれまで、痛みによる負情動生成に関わる神経機構を研究し、痛み刺激が分界条床核におけるノルアドレナリン (NA) 神経およびコルチコトロピン放出因子 (CRF) 神経の情報伝達亢進を介して嫌悪・不安情動を惹起することを明らかにしてきた。特に嫌悪反応については、分界条床核 2 型神経細胞の活動亢進が、下図左に示すような 3 本の GABA 神経を介した神経回路により腹側被蓋野ドパミン (DA) 神経を抑制することで嫌悪反応を惹起する可能性を示唆する組織学的研究成果を報告している。実際に、分界条床核から腹側被蓋野に投射する神経の活動を光遺伝学的に操作することで嫌悪反応や嗜好反応を惹起できることが、米国の Deisseroth や Stuber のグループにより報告されている。腹側被蓋野ドパミン神経の神経活動の抑制は嫌悪反応だけでなく、アンヘドニア（無快感）や意欲低下などの抑うつ状態とも関連することから、分界条床核-腹側被蓋野神経路が、生体防御システムとしての抑うつ気分あるいは抑うつ様行動の生成に重要な役割を果たしていることが考えられる。

## 研究結果

我々はこれまでに、分界条床核 2 型神経細胞の活性化が嫌悪情動を惹起すること、また、CRF 刺激により分界条床核 2 型神経細胞が活性化することを明らかにしているが、CRF 受容体の下流の細胞内情報伝達については明らかでなかった。そこで、電気生理学的手法により、分界条床核 2 型神経細胞活性化にかかわる細胞内情報伝達を検討したところ、アデニル酸シクラーゼ-cAMP-PKA 系が関与することが明らかとなった（下図右）。さらに、行動薬理的解析により、痛みによる嫌悪反応惹起に CRF 遊離亢進を介した背外側分界条床核での PKA 活性化が関与していることを明らかにした。

分界条床核 3 型神経は腹側被蓋野や視床下部外側核に投射し、その活性化は快情動生起や不安情動抑制につながることを報告されている。一方、我々は CRF が GABA 作動性である分界条床核 2 型神経に選択的に作用し神経活動を亢進させることを報告している。そこで、CRF が分界条床核 2 型神経細胞の活性化を介して分界条床核 3 型神経への抑制性シナプス入力を亢進させる可能性を電気生理学的手法により検討した。背外側分界条床核を含む脳スライスを用いたホールセルパッチクランプ法による解析により、CRF が分界条床核 3 型神経細胞における、自発的抑制性シナプス後電流 (spontaneous inhibitory postsynaptic current, sIPSC) を増大させることを明らかにした。

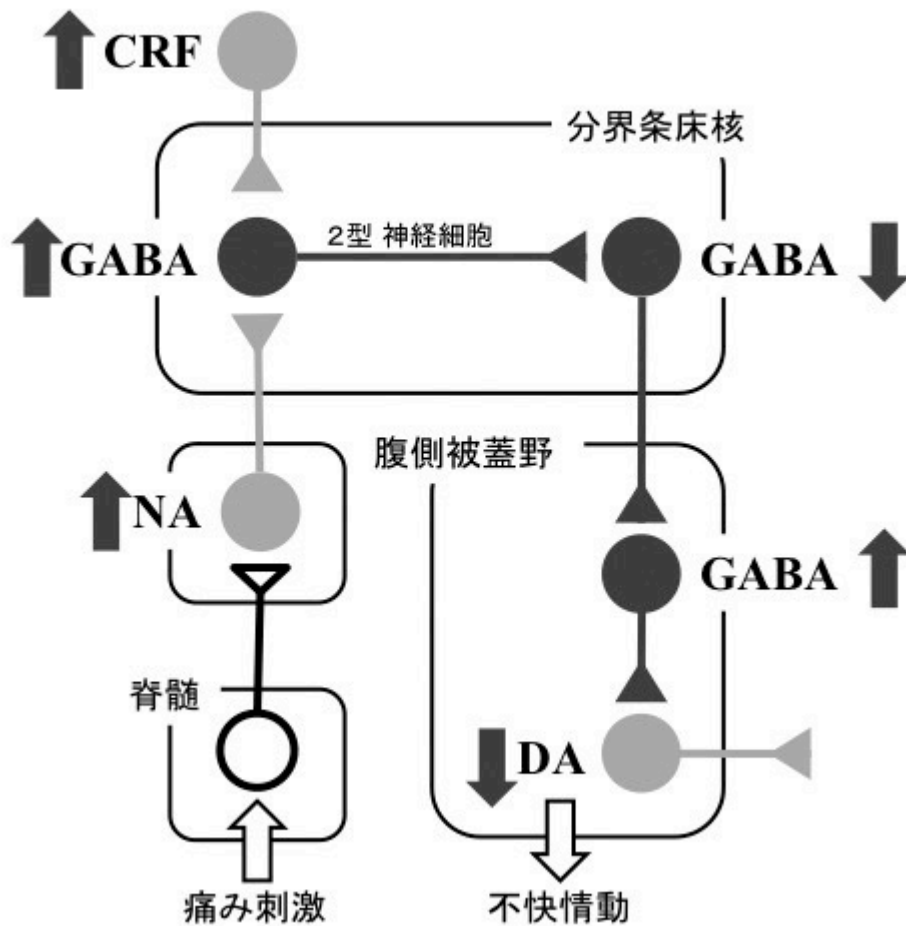
腹側分界条床核においては、AMPA 受容体および NMDA 受容体を介した情報伝達が痛みによる嫌悪反応の惹起に関与すること、NMDA 受容体の下流において神経型一酸化窒素合成酵素 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) が活性化することが嫌悪反応惹起に重要であることを明らかにした。さらに、電気生

理学的手法を用いて、N0が腹側分界条床核内の2型神経細胞を脱分極させることも明らかにした。

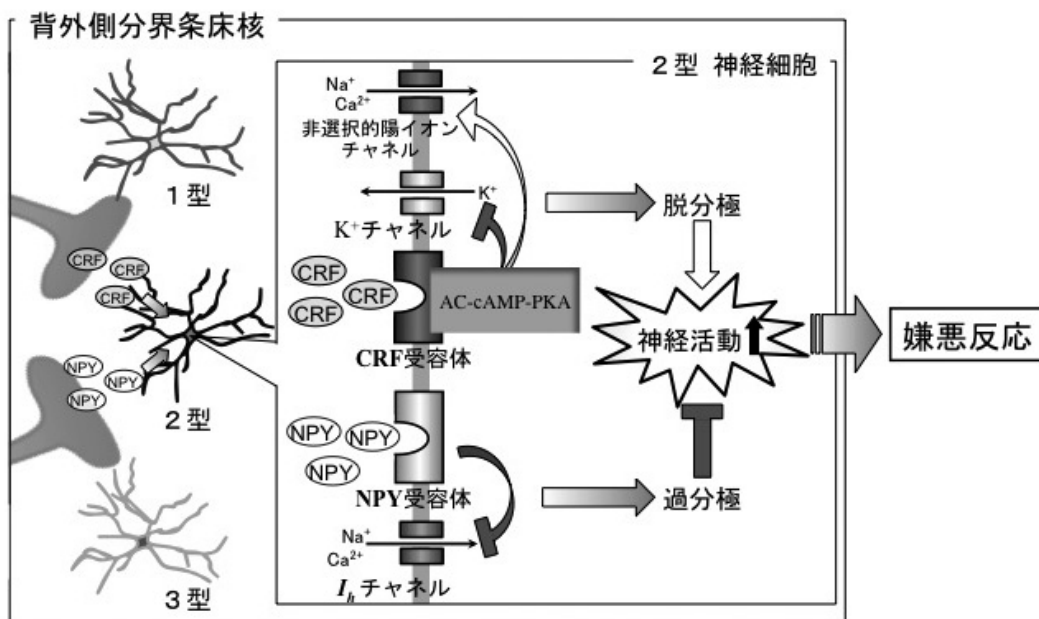
平成27年度からの「慢性ストレス・慢性疼痛による分界条床核-腹側被蓋野神経回路の機能的変化」に関する研究課題は、計画班員として参画していた新学術領域研究の申請が採択されたため中途辞退した。以後、科研費基盤研究などの他の競争的資金により、慢性ストレス・慢性痛による分界条床核-腹側被蓋野神経回路の機能的変化について研究を進めたところ、慢性痛の早い時期（神経障害性疼痛発症後2週間）では、報酬刺激に対する側坐核内ドパミン遊離亢進が観察されるが、遅い時期（神経障害性疼痛発症後4週間）では報酬刺激による側坐核内ドパミン遊離亢進は観察されなくなることを見いだした。また、4週間の慢性軽度ストレスによるうつ病モデル動物においても報酬刺激による側坐核内ドパミン遊離亢進が観察されなかった。慢性痛モデルおよびうつ病モデル動物において、報酬系に関わるドパミン神経の抑制が観察されたことから、これら病態モデルでは前頁図左に示した神経回路において機能的変化が生じている可能性が考えられた。そこで、腹側被蓋野に投射する分界条床核3型神経における抑制性入力の変化を電気生理学的手法により調べたところ、慢性痛モデル動物では対照群と比較し、分界条床核3型神経におけるsIPSCが増大していた。分界条床核3型神経の活動が抑制されることにより、腹側被蓋野GABA神経が脱抑制機構により活性化し、結果としてドパミン神経活動が抑制されることが、脳内報酬系機能の低下につながる可能性が考えられる。

## まとめ

うつ病や不安障害のメカニズムを理解するためには、生体防御システムとしての抑うつ・不安の神経機構・神経回路を明らかにした上で、患者あるいは病態モデル動物においてその神経機構・神経回路がどのように変化しているかを解析することが必要であるとの考えのもと、まず、痛みによる嫌悪反応に関わる神経回路として、前頁図左に示す分界条床核2型神経活性化から、3本のGABA神経を介して腹側被蓋野ドパミン神経活動抑制に至る神経機構を明らかにし、分界条床核2型神経活性化にアデニル酸シクラーゼ-cAMP-PKA系が関与していることも明らかにした。現在までにさらに研究を進め、慢性痛モデル動物やうつ病モデル動物では、痛みによる嫌悪反応に関わる神経機構に機能的変化が生じていることを明らかにした。すなわち、これら病態モデル動物では、報酬系に関わるドパミン神経の活動が抑制されていることを明らかにした。ドパミン神経活動の低下は、うつ病や慢性痛の患者に見られるアンヘドニア（無快感）や意欲低下などの抑うつ状態に関与している可能性が考えられる。さらに、ドパミン神経活動低下に関わる分界条床核内の機能的変化について検討したところ、慢性痛モデル動物において、腹側被蓋野に投射する分界条床核3型神経への抑制性入力が増大していることが明らかとなった。今後、うつ病モデル動物においても分界条床核3型神経への抑制性入力が増大しているか否かを検討する必要がある。



左図：分界条床核 2 型神経細胞の活動亢進が、3 本の GABA 神経を介した神経回路により腹側被蓋野ドパミン (DA) 神経を抑制することで嫌悪反応を惹起する。



右図：CRF受容体活性化は、アデニル酸シクラーゼ (AC) - cAMP - PKA系の活性化を介して嫌悪反応を惹起する。

ストレス性精神疾患における扁桃体外側核の役割の解明（平成25年度～26年度）

ストレス性精神疾患における扁桃体外側核の病態解明（平成27年度～28年度）

公募班員 森 寿 / 井上 蘭 富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・分子神経科学講座

## 研究目的

我々は、ストレスホルモンのひとつであるグルココルチコイド受容体(Nr3c1, GR)遺伝子を、扁桃体外側核(LA)選択的に欠損させた(LA-GRcKO)マウス系統を独自に作製した。本研究では、このLAGRcKOマウスと野生型(WT)対照マウスを用いて比較し、ストレスが伴う恐怖条件付け学習の評価を行う。またLAを中心とした脳機能的変化と分子動態変化を明らかにし、心的外傷後ストレス障害(PTSD)をはじめとするストレス性の精神疾患や感情障害で見られる情動認知機能障害の分子機構と責任神経回路の性質を明らかにすることを研究目的とする。

## 研究背景

気分障害や不安障害等のストレスに関わる精神疾患の生涯有病率は、我が国では20%近くに達しており、国民の健康福祉の観点や労働力に対する影響等の経済的観点からも大きな損失であり、克服すべき課題のひとつである。恐怖やストレスは、視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸の活性化を引き起こし、副腎皮質からストレスホルモンのひとつであるグルココルチコイドを分泌させる。血流で脳内に運ばれたグルココルチコイドは、情動記憶制御に関わる脳内のグルココルチコイド受容体(GR)に結合し恐怖記憶の制御を行う。一方、過剰な恐怖やストレスが原因となる心的外傷後ストレス障害(PTSD)では、神経伝達の過剰によるNMDA型グルタミン酸受容体(NMDAR)の活性化とGRの過剰活性化が同期して起こり、神経機能の可塑的变化による恐怖記憶の強い固定が、病的な恐怖反応を誘起すると考えられている。

扁桃体は、異なる機能的特徴を持ち、形態学的に区別される10群以上の神経亜核から構成され、その中でも、扁桃体外側核(LA)は、大脳皮質や視床からの感覚情報が入力し可塑的变化を示す亜核であり、恐怖記憶に関わる神経回路の中心的役割を担っている。恐怖条件付け課題などの連合学習では、音などの条件刺激(CS)と電気ショックなどの非条件刺激(US)の情報がLAに入力することで神経機能の可塑的な変化が生じ、長期的な恐怖記憶の形成が行われると考えられている。しかしながら、恐怖記憶の獲得、固定化および消去の一連の過程の中で、LAにおける分子・細胞・神経回路レベルでの変化については、不明な部分が多い。LAにはGRが多く発現し情動制御に関わると考えられ、また、GR複合体シャペロンに含まれるFKBP5遺伝子の多型がPTSDのリスクファクターのひとつであることから、GRの重要性が示唆されているが、恐怖記憶におけるLAのGR機能は明確になっていない。さらに、LAの機能変化は、海馬等の記憶制御部位にも影響を与えると考えられるが、その機構も十分に明らかではない。

これらの背景のもと、我々はLAでのGRによる恐怖記憶制御での役割を明らかにするために、LAで選択性高く発現するGastrinreleasingpeptide (GRP)遺伝子座に組換え酵素Cre遺伝子を挿入したマウス系統(GRP-iCreKI)、ならびにGR(Nr3c1)遺伝子座にCreの認識配列(loxP)を挿入したマウス系統(GR-floxP)をそれぞれ作製し、交配によりLAでGRを遺伝子ノックアウトしたマウス系統(LAGRcKO)を作製し解析を進めた(Inoue *et al.*, *SNF meeting*, 2012)。

## 研究結果

LA-GRcKOマウスと対照WTマウス系統を用いた解析により、以下の研究結果が得られた。1) LA-GRcKOマウスのLAでは、GR発現神経細胞数がWTマウスに比べ70%程度低下していた(図)。強いCre活性が検出された海馬CA3領域では、本来GR発現細胞が少なくGR-KOの影響は少ないと考えられた。2) CS(手がかり音刺激)とUS(電気ショック)の連合を用いた音恐怖条件付けによる情動学習課題を用いて、条件付け過程、文脈テスト、音刺激テスト、での恐怖反応によるすくみ行動を評価した。LA-GRcKOマウスは、CSとUSの連合回数が3回までの場合は、WTマウスと変わらない程度のすくみ反応を示すが、連合回数が6

回になると、音刺激テスト特異的にWTマウスに比べて有意に低いすくみ反応を示した。3) LA-GRcK0マウスで検出された音刺激テストの障害が、LAでのGR遺伝子の欠損によることを確認するために、自治医科大学の村松慎一教授にGR発現AAVベクターを作製していただき、LA-GRcK0マウスのLAに注入しGRの発現を回復させると、音恐怖反応が上昇した。4) 音恐怖条件付け前に、マウスに拘束ストレス負荷を行うと、文脈テストによる恐怖反応は、LA-GRcK0マウスおよびWTマウスで同様に有意に上昇した。一方、音刺激テストではWTマウスでは、すくみ反応の低下が観察されたが、LA-GRcK0マウスではこの低下が消失した。また、このすくみ反応の低下効果は拘束ストレス1時間後に音恐怖条件付けを行った場合には観察されたが、拘束ストレス直後や24時間後の条件付けでは観察されなかった。5) 強いUSを用いた音恐怖条件付け直後に拘束ストレス負荷を行うと、音刺激テストでは、WTマウスには影響は見られなかったが、LA-GRcK0マウスでは、恐怖反応が増強した。また、この条件では、LA-GRcK0マウスの血中コルチコステロンが上昇した。以上の研究結果より、LAのGRは危険性が高い状況で特徴的な手がかり刺激に対する適応的な恐怖反応の制御に重要であると考えられた。また、LAが血中コルチコステロンのフィードバック制御に関わる可能性も示唆された（論文投稿中）。

また、本研究以外に、オリゴデンドロサイトに特異的に発現するBcas1遺伝子K0マウスを用いた解析により、音驚愕反射のプレパルス抑制障害とミエリン形成異常および炎症反応の上昇を見いだした。これらの結果から、統合失調症様症状にミエリン形成異常や炎症反応に関わる可能性が示唆された。

## まとめ

本研究により、扁桃体外側核でのグルココルチコイド受容体が、ストレスが高い状況での適応的な恐怖反応の制御に重要であることが明らかとなった。今回の結果と過去の報告から、PTSD等の情動記憶の障害の背景にストレスホルモンの異常や扁桃体外側核の機能異常に関わるものが強く示唆された。従ってこれらの病態の治療を考える上で、GRシグナルや扁桃体外側核を標的とした治療の重要性が示された。

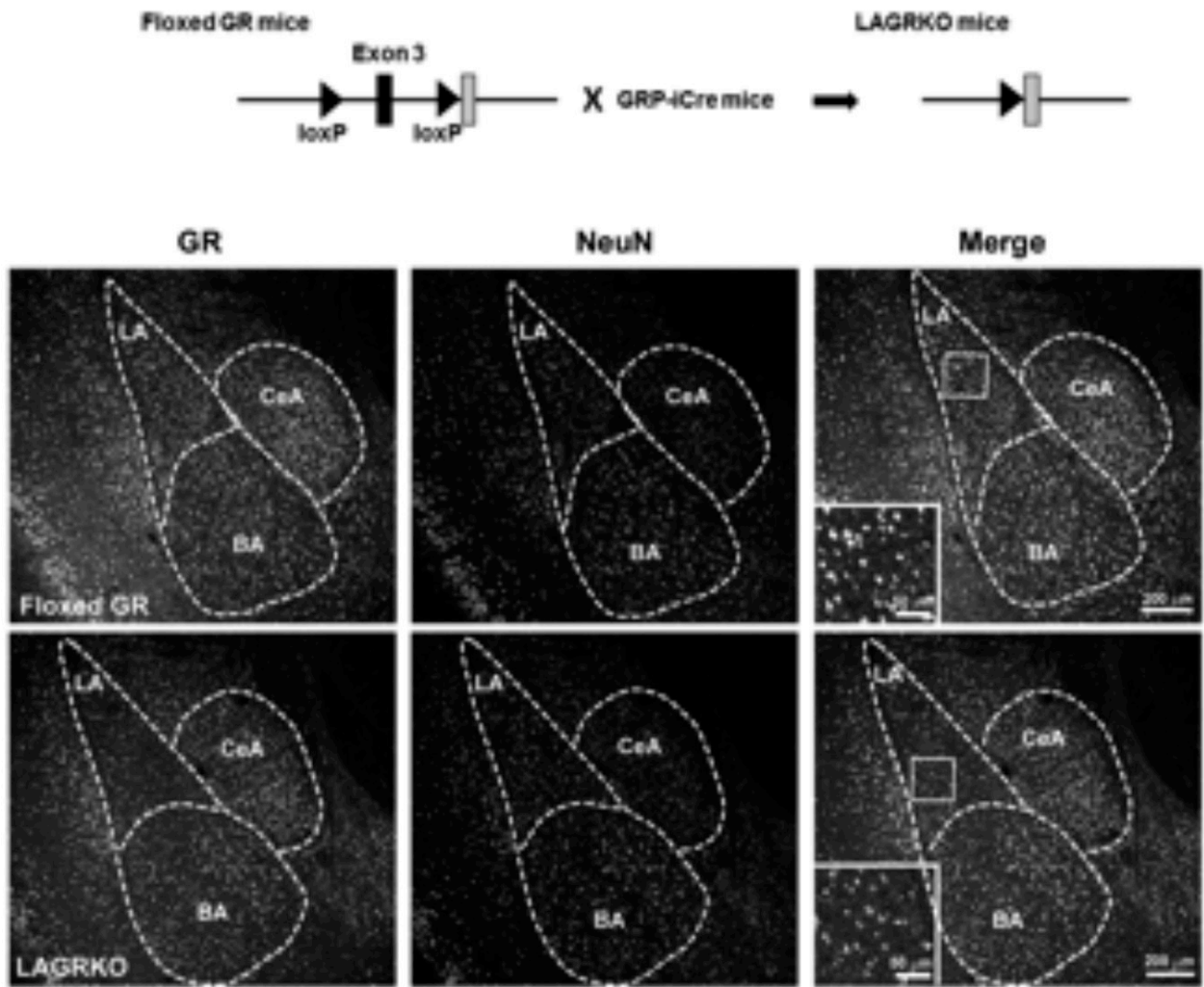


図 扁桃体外側核(LA)選択的グルココルチコイド受容体 (GR)ノックアウトマウス

GRの発現を扁桃体脳切片の免疫組織化学法により解析し、上段がコントロールWTマウスで、下段がLAGRKOマウス。GRのシグナルが、下段のLAで選択的に低下している。

## 病態マーカーとしてのin situグルタチオン化タンパク質の検出法の確立と応用

(平成24年度～25年度)

公募班員 戸田 重誠 金沢大学附属病院神経科精神科；現昭和大学医学部精神医学講座

### 研究目的

精神疾患の発現に関与するストレスや薬物は、酸化ストレス負荷を誘導しうる。その結果として起こる可逆的なタンパク質の機能的変化は、病状を分子レベルで反映する病態特異的なマーカー（マイクロエンドフェノタイプ）として機能すると予想されることから、これを何らかの手法で検出できれば、病態生理の解明のみならず、病勢の評価や治療法の解明、及び治療効果の判定に非常に有益と考えられる。本研究では、最近報告されたin situ タンパク質グルタチオン化検出法を動物脳に適応することで、そのような可逆的なタンパク質の機能的変化を検出する手法の確立を目指す。続いて、同手法をうつ病や薬物依存の動物モデルにも応用し、各疾患あるいはその治療薬の効果と酸化ストレスの関連を明らかにする。また、このような可逆性のマイルドな酸化ストレスが脳機能全般にもたらす影響について検討する。

### 研究背景

多くの精神疾患では、酸化ストレスあるいはそれに拮抗する内在性の抗酸化ストレスシステム（＝redox制御）の病態への関与が指摘されている。例えば、統合失調症や双極性障害、発達障害あるいは薬物依存の病態に酸化ストレスもしくはそれに拮抗するredox制御のシグナル伝達系が関与しているとの報告が相次ぎ、細胞死には至らない程度マイルドな酸化ストレス負荷が病態に関与する可能性が強く示唆されている。タンパク質を酸化ストレスによる非可逆的酸化・分解から保護するグルタチオン化は可逆的な現象であり、複数の気分安定薬や精神疾患でグルタチオン化促進作用の存在が示唆されてきた。しかしながら各疾患の病態生理との関連は未だに明らかでない。その理由として、いつ、どの脳部位（回路）、どの細胞でグルタチオン化が起きているのかを脳全体で可視化し、網羅的に捉える技術がこれまで存在しなかったことが挙げられる。

### 研究結果

以前に細胞や肺組織で報告されたin situグルタチオン化タンパク質検出法（Aesif *et al*, *Am J Pathology*, 2009）を脳組織で再現できるか検討を行った。グルタチオン化タンパク質の増加が側坐核で予想されている慢性コカイン投与後のラット脳を4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、作成した脳切片をフリーのSH基をN-ethylmaleimideでブロックした後、リコンビナントGlutaredoxin1 (Grx1)でグルタチオン化したシスティン基を還元化した後にN-(3-maleimidylpropinyl)biocytinでラベリングし、steptoavidin-FITCでシグナル検出を試みた。しかしながら対照実験と比べ有意なシグナルの増強は確認されなかった。一方、通常グルタチオン化を誘導するチオール基酸化剤diamideの添加実験でもシグナルは確認されなかった。原因として、①灌流固定の段階で内在性のGrxの活性化が誘導されるなどの理由で脱グルタチオン化が起きてしまっている、②in vitroでのGrx1活性が十分でない、③チオール基がホルマリン架橋の結果全てS-S結合に置換され、Grx1やN-(3-maleimidylpropinyl)biocytin (MPB)、diamideの作用部位が失われた、などが考えられた。特に強い還元作用を持つホルマリンが脳内チオール基の脱グルタチオン化と、その結果生じたフリーのチオール基のS-S結合化を共に促進し、Grx1やMPB、diamideの作用部位が失われた可能性が高いと想定された。その後も、様々な工夫を重ねたが、問題は解決されなかった。アポトーシス誘導で、血管内皮細胞に陽性シグナルが確認されたが、同細胞でグルタチオン化が報告されているタンパク質に特異的な抗グルタチオン化抗体を用いて検討したところ、偽陽性と判明した。また、本手法の出典であるin situグルタチオン化タンパク質検出法に関しても、その後追試の報告がなく、本質的に未解決な問題を抱えたものであったと考えられる。そのた



め、残念ながら当初の第一目標である脳切片を用いたin situグルタチオン化タンパク質検出法の開発は成功しなかった。一方、マイルドな慢性酸化ストレスが脳機能にもたらす影響について、上記と併行して行動薬理的な検討を進めた。薬理的に一過性にマイルドな酸化ストレスを誘導する薬剤2-cyclohexene-1-one (CHX) を急性あるいは慢性投与し、意欲の指標となるprogressiveratio条件下での道具学習、習慣化の促進、逆転学習、ドパミンアゴニスト様作用を示すコカインに対する反応性、及び強制水泳への影響を検討した。その結果、CHXの慢性投与は道具学習獲得には影響を与えなかった。一方、強制水泳では対照群に比べCHX投与群で無動性が抑制され、抗うつ剤様の効果を示した(図1)。また慢性CHX投与群では急性コカイン誘発性行動が対照群に比べ抑制された。その一方、急性CHX投与は一過性に道具学習後の脱価値化を阻害したが、慢性CHX投与群ではその効果が遷延した。さらに各行動あるいは認知指標間の相関関係について主要因解析法を用いて検討したところ、複数の指標間で慢性CHX投与後に相関関係の変化が観察された(図2)。従ってCHX投与は必ずしもそれ自体でうつ病様表現型、あるいは抗うつ剤様効果を模倣はしないが、全体として脳機能のバランスを変化させていると示唆された。特に幾つかの行動指標はドパミン関係と考えられたため、ドパミン神経系が可逆的な酸化ストレスの影響を受けやすいと予想された(Iguchi *et al*, *PLoS One*, 2014)。この研究で用いた行動薬理的指標は、従来のうつ病動物モデルで用いる指標だけでなく、意思決定や意欲に特異的に関係する指標、例えば習慣化の速さをみる脱価値化テストや、progressiveratio法を導入した点で非常に画期的である。この方法論をさらに発展させ、予測不能な慢性ストレス負荷によるうつ病動物モデルにおいて、ストレス負荷前に各個体の意欲や意思決定特性の違いについて、上記行動指標群を用いて予め幾つかの亜群に分け、ストレス負荷後に起こる表現系の変化について違いを群間比較したところ、それぞれの亜群が独自のストレス誘発性の表現系を示すことを確認した(Iguchi *et al*, *Front Behav Neurosci*, 2015)。すなわち本研究の結果、動物のうつ病モデルを用いて、うつ病誘発性ストレス負荷前のラットの個体差から、同ストレス負荷後の行動変化を予測することに初めて成功した。臨床場面では、うつ病になりやすい人とそうでない人(ストレス脆弱性 v. s. レジリエンス)、あるいは同じうつ病でも症状や薬物反応性の個人差が非常に大きいことがよく知られているが、本研究は健常時の各個体(個人)の行動特性の詳しいデータがあれば、うつ病へのなりやすさや治療反応性の予測、さらに治療のカスタマイズ化の指針作成も可能となりうることを強く示唆している。

## まとめ

①精神疾患の発症要因候補である酸化ストレスは、脳内タンパク質の可逆的なグルタチオン化を誘導すると予想され、その検出は病態生理の解明のみならず、病状の評価や治療法の解明、及び治療効果の判定に非常に有益と考えられることから、in situ タンパク質グルタチオン化検出法を動物脳に適用することで、そのような可逆的なタンパク質の機能的変化を検出する手法の確立を目指した。残念ながら、同手法の確立には至らなかった。②マイルドな慢性酸化ストレス負荷が動物の高次機能に与える影響について、一過性に脳内にマイルドな酸化ストレスを誘導する薬剤CHXをラットに連日投与し、各種認知行動指標を用いて評価を行なった。その結果、CHX投与は必ずしもそれ自体でうつ病様表現型、あるいは抗うつ剤様効果を模倣はしないが、全体として脳機能のバランスを変化させることが確認された。③動物のうつ病モデルを用いて、うつ病誘発性ストレス負荷前のラットの個体差から、同ストレス負荷後の行動変化を予測することに初めて成功した。

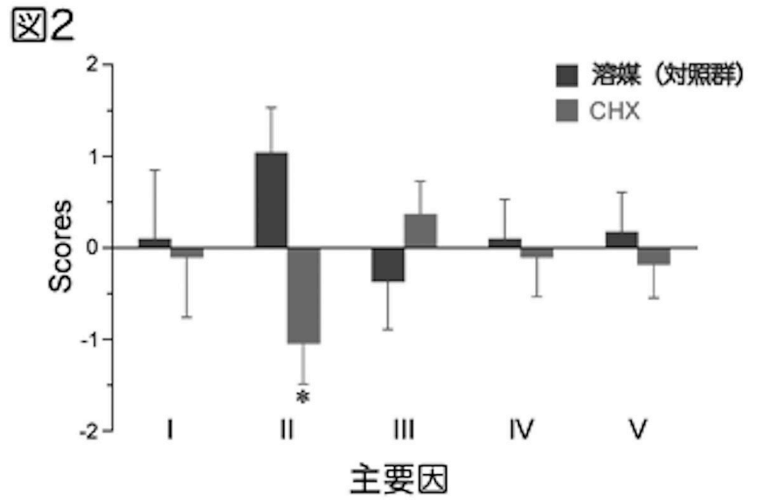
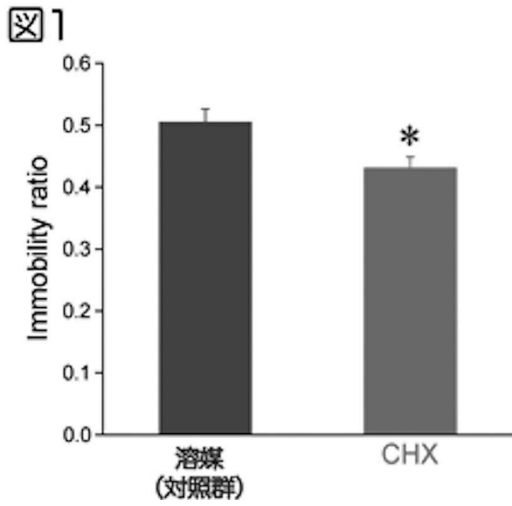


図1 慢性CHX投与した動物では、強制水泳時の不動性（＝抑うつ効果）の減弱を示した。

図2 慢性CHX投与した動物では、主要因解析法で、II群（コカイン投与前後の広場活動性、強制水泳後の不動性、脱価値化率などの指標を含む）で対照群との有意な違いを認めた。

## 精神疾患のグリア性マイクロエンドフェノタイプ

(平成25年度)

公募班員 小泉 修一 山梨大学医学部薬理学講座 教授

### 研究目的

種々の精神疾患の分子病態にグリア細胞の機能変調が関与していることを示す研究が相次いでいる。しかし、各種向精神薬の治療効果にグリア細胞への作用が関与しているか否かについては、殆ど分かっていない。そこで、抗うつ薬の標的としてグリア細胞（特にアストロサイト）が必要であるか否かを明らかにすることを計画した。研究にはSSRI型抗うつ薬であるfluoxetine (FLX)を用いた。本研究の目的は抗うつ薬の治療効果発現に、グリア細胞への作用が必須であることを明らかにすることである。具体的な到達目標は、(1) FLXのグリア細胞に対する作用様式を精査すること、(2) 抗うつ作用との相関を明らかにすること、(3) 最後にFLXのグリア細胞への薬理作用と抗うつ作用の因果関係を明らかにすることである。

### 研究背景

我々はこれまでに、グリア細胞と各種機能との機能連関に関する研究を行って来た。グリア細胞が所謂グリア伝達物質と呼ばれる化学伝達物質を放出し、脳の機能を積極的かつダイナミックに制御していること、シナプスの刈り込み・新生により、シナプス回路を繋ぎ替えてしまうこと、またグリア細胞は、脳内環境変化に非常に敏感であり、各種疾患時には、その形態及び機能を劇的に変化させることが知られている。さらに、各種化学物質に曝露された際に、先ず最初にその性質を変化させる。しかし、医薬品、特に向精神薬が脳内に到達した際に、グリア細胞に作用していることが明らかにもかかわらず、その作用様式、応答様式、さらに治療効果との関連性に関しては殆ど知られていない。

うつ病の主たる病因は、モノアミン神経系の機能不全によると長い間信じられてきた。実際、モノアミン神経、ノルアドレナリン (NA) 及びセロトニン (5HT) の再取り込み阻害薬は、抗うつ作用を呈し、5HT選択的再取り込み阻害薬 (SSRI) は治療の第一選択薬としてしばしば用いられる。一定の治療効果が認められる一方で、これらモノアミン神経系に対する治療薬が全く奏効しない例が多いこと、治療効果発現までに2種間程度のタイムラグがあること、なとうつ病の分子病態には、単にモノアミン神経機能不全では説明出来ない分子メカニズムが潜んでいる可能性が高い。

グリア細胞とうつ病に関する報告は余りないが、死後脳のトランスクリプトーム解析により多くのグリア関連分子の異常が認められており、グリア細胞の機能異常も大きく関係していることが示唆されている。しかし、死後脳を用いた解析の殆どの場合、服用していた抗うつ薬の作用による変化である可能性を否定することが出来ず、実際の分子病態とグリア細胞機能変調との因果関係はよく分からないままであった。

Caoらは、モデルマウスを用いた網羅的な機能分子変化の解析により、うつ病モデルマウスでは細胞外ATP濃度が減少していること、さらに細胞外ATPを増加させることによりうつ症状が改善することを報告し、うつ病の分子病態に細胞外ATPの減少が中心的な役割を果たしていることを明らかとした。このうつ病のATP仮説であるが、そのATPソースとしてアストロサイトを想定していた。我々もアストロサイトと神経細胞の機能連関では、細胞外ATPがグリア伝達物質として中心的な役割を果たしていることを示してきた。そこで、抗うつ薬はアストロサイトに作用して、細胞外ATP放出を引き起こすことにより、抗うつ作用を呈する、との仮説を提唱し、その検証を行う事を計画した。つまり、うつ病分子病態のグリア性マイクロエンドフェノタイプをアストロサイトATP放出不全に注目して解析するものである。

### 研究結果

先ず初代培養アストロサイトをを用い、FLX投与により細胞外ATP（以下ATP<sub>o</sub>）が変化するか否かを解析した。FLXは濃度依存的にATP<sub>o</sub>を増加させ、これはCa<sup>2+</sup>依存的であった。ATP<sub>o</sub>亢進の分子メカニズムの解析を行ったところ、放出の分子メカニズムを明らかにしたところ、FLXは開口放出によりATP<sub>o</sub>を亢進させていることが明らかとなった。これは、ATP開口放出に関係するアストロサイト分子Xを見出した。アストロサイト分子Xを抑制すると、FLXによるATP放出はほぼ消失した。

In vivo実験系を用い、FLXがアストロサイトのATP<sub>o</sub>を増加させるか否かの検討を行った。マイクロダイアリシス法による解析により、FLXは投与二週間以降からATP<sub>o</sub>を増加させることが明らかとなり、これは分子X発現の時間経過と一致していた。Xノックアウト動物を作製したところFLXによるATP放出は消失した。

ATP<sub>o</sub>とFLXの治療効果との相関関係を明らかとするため、アストロサイト特異的なXコンディショナルノックアウト動物を作製した。FLXによる項筒効果は、Tail suspension (TS)テストを用いた無動時間測定により評価した。野生型マウスでは、FLX慢性投与により、マウスの無動時間は顕著に短縮された（抗うつ作用）。しかし、アストロサイト特異的Cコンディショナルノックアウト動物では、FLXによる無動時間の短縮は惹起されなかった。さらに、アストロサイト特異的X過剰発現マウスを作製し、FLXによる抗うつ作用を解析した。Xをアストロサイトに過剰に発現させると、より低いFLX投与量にて抗うつ作用が発現されることが明らかとなった。

アストロサイトのATP<sub>o</sub>放出亢進が、何故抗うつ作用と関連するののかに関する検討は、現在進行中である。種々の栄養因子の産生・放出が関係している可能性を見出したが、詳細は今後の課題である。

## まとめ

SSRI型抗うつ薬FLXの薬理作用にアストロサイトからのATP放出亢進作用があること、このATP放出作用と抗うつ作用発現との間に明らかな因果関係があることが明らかとなった。また、今回認められたFLXの作用は、少なくともいくつかの既存の抗うつ薬（三環系抗うつ薬、SNRI型抗うつ薬）に共通した知見であった。ATPの放出メカニズムに、開口放出が関係していることも見出した。

FLXにより亢進したATP<sub>o</sub>が何故抗うつ作用を呈するのか、の分子メカニズムの解明は今後の大きな課題である。しかし、複数の神経栄養因子の亢進と関係していることを見出しており、実行因子としてのこれら分子とアストロサイト性抗うつメカニズムの関連性の解明が待たれる。

以上、本研究により抗うつ薬の作用標的として、アストロサイトが必須の役割を有する事が明らかとなった。これは、うつ病のマイクロエンドフェノタイプとして、アストロサイトの機能変調、つまりアストロサイトのATP放出不全が大きく関係していることを強く示唆する。うつ病治療の新しい治療戦略として、グリア細胞（アストロサイト）に介入する重要性を強く示唆する結果である。

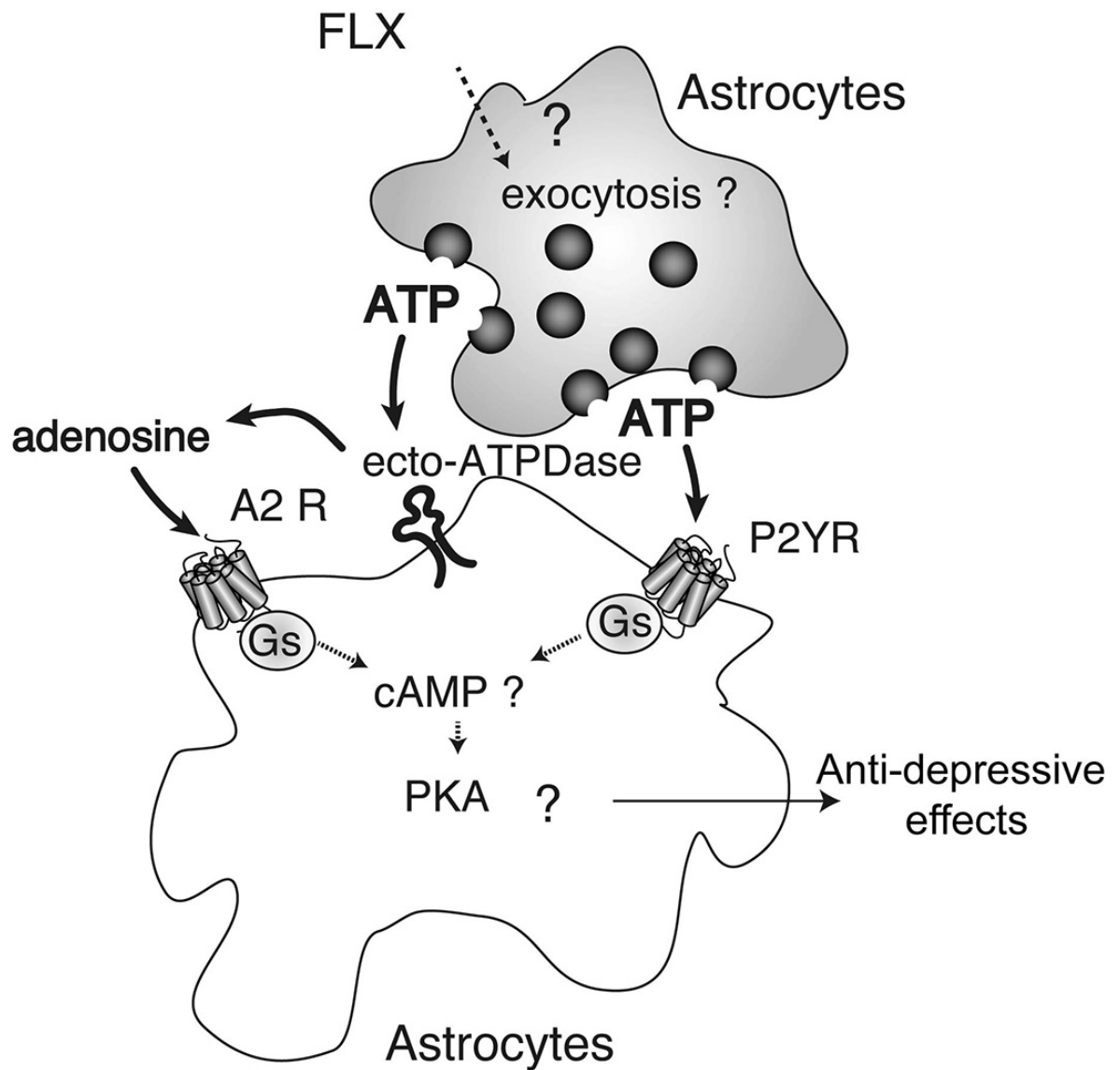


図 抗うつ薬FLXのアストロサイトに対する作用の模式図

FLX投与により、アストロサイトはATPを放出することにより、ATP<sub>o</sub>を亢進させる。このATP放出は開口放出によるものであった。ATP<sub>o</sub>増加により、アストロサイトはPKA等を介した栄養因子放出によりアストロサイト性の抗うつ作用を呈する。

社会性行動の異常に関わる回路のマイクロエンドフェノタイプの解明（平成25年度～26年度）

精神疾患に関与する遺伝環境因子で前頭前野発達期に現れるマイクロエンドフェノタイプ（平成27年度～28年度）

公募班員 櫻井 武 京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター 教授

## 研究目的

社会性行動の異常は様々な精神疾患に付随してみられる表現型で、特に自閉症や発達障害の中心症状の一つである。社会性行動に関わる神経回路をマウスで明らかにし、さらに社会性行動の異常を示すマウスモデルを用いて、その回路に関わる脳領域での社会性行動の異常につながる計測可能な生物学的変化すなわちマイクロエンドフェノタイプを明らかにする。

自閉症や統合失調症といった発達精神障害は、発達期に遺伝ならびに環境要因によって引き起こされる脳内の（神経回路の）変化によって生じると考えられている。社会性行動を含む様々な認知機能に関与する前頭前野の発達の生物学的過程を、マウスで時系列に沿って明らかにし、遺伝ならびに環境要因を付与したマウスモデルにおいてその発達過程に見られる変化が、遺伝ならびに環境要因によって引き起こされる表現型にどうつながるかを指標に、発達精神障害につながる発達期の前頭前野におけるマイクロエンドフェノタイプを明らかにする。

## 研究背景

近年のヒトゲノム解析により、染色体の微小領域の欠損あるいは重複によるコピーナンバー変異の精神疾患への関与が知られてきた。その中で、染色体7q11.23の領域の欠損はウィリアムス・ビューレン症候群という発達障害を引き起こす。この症候群は様々な身体症状ならびに神経精神症状を示す稀な疾患であるが、中でも特徴的なのは社会性刺激に対して過剰な反応を示すことで、カクテルパーティー症候群とも呼ばれる過剰な社会性行動を行動表現型として示す事が知られている。一方、最近の大規模なヒトゲノム解析の結果から、同じ染色体領域の重複が自閉症を含む一連の共通した特有の表現型を示す症候群を呈することも明らかになってきた。興味深い事にこの重複の場合、社会性行動は低下する。これらの事実は、この染色体領域に社会性行動の神経回路の形成に関わる遺伝子（群）が存在し、その量的な変化によって社会性行動の程度が制御される可能性を示唆している。

この領域には約30の遺伝子が存在するが、非定型欠損の患者さんの遺伝子型と表現型の相関の解析から、社会性行動に関係する領域内の遺伝子の候補が幾つかに絞られ、我々はその中でもGtf2iという遺伝子に注目し、その欠損マウス、あるいはトランスジェニックマウスを用いて社会性行動への影響を調べたところ、Gtf2i遺伝子を1コピーしか持たないマウスでは社会性刺激に対する過剰な反応及び順応化の遅延、一方3コピー持つマウスでは社会性行動の低下が見られた（櫻井投稿準備中）。この結果は社会性行動の神経回路の形成に関わる遺伝子がGtf2iである可能性を支持する。従って、これらのマウスモデルの社会性行動に関わる神経回路の解析により、社会性行動の異常に伴う神経生物学的な変化、マイクロエンドフェノタイプの同定につながり、ひいてはそれらを指標にして精神疾患に伴う社会性行動の異常の生物学的基盤を明らかに出来る可能性がある。

自閉症や統合失調症といった発達精神障害は脳の発達の過程で遺伝ならびに環境要因によりその発達に障害が引き起こされ、その結果として発症すると考えられる。離乳は完了したもののまだ発達期にあるマウスを、社会性刺激から隔離した状態で飼育すると、隔離する時期に応じた前頭前野の変化を引き起こし、それに伴って認知機能の異常を含む隔離時期に特異的な行動表現型を示す事が知られている

（図1）。この結果は、認知機能を担う前頭前野の発達期に社会性刺激に対する感受性の高い時期、臨界期を持つ回路が存在し、社会性刺激の有無によりその時期に応じた特定の回路に変化が生じ、その回路が担う行動に付随した行動表現型につながる可能性を示唆する。従って、マウスにおける前頭前野の発達の過程を時系列に沿って明らかにし、その発達過程に遺伝ならびに環境要因が及ぼす影響、マイク

ロエンドフェノタイプを明らかにする事によって、こういったマイクロエンドフェノタイプと社会性行動を含めた認知機能の異常との関係を明らかに出来る可能性がある。

## 研究結果

まず、マウスにおいて社会性行動に関わる神経回路、特に社会性刺激に対する応答性ならびに反復する社会性刺激に対する順応性に関わる神経回路を明らかにするため、社会性刺激を繰り返す行動パラダイムで活性化される脳領域を、活性化した神経細胞に誘導されるc-fos分子に対する抗体を用いた免疫染色で脳全体に渡って解析し、その結果に基づいて社会性行動に関係する脳領域の想定されるワイヤリングダイアグラムを作成した（図2）。

それに基づき、社会性行動に重要な働きをすると考えられた脳領域の前頭前野と扁桃体での遺伝子発現のパターンを、野生型とGtf2iヘテロザイゴスのマウスで比較した。その結果、これらの領域でオキシトシンシステムに属する遺伝子の発現レベルに違いがあることが明らかとなった（櫻井投稿準備中）。オキシトシンは、大脳皮質等で神経回路への入力を調節するニューロモデュレーターとしての役割を果たしている一方、社会性を支える伝達物質として自閉症の治療にも試みられており、我々の系においても、社会性行動に関与する回路に作用し社会性刺激に対する反応性を調節している可能性が示唆された（図2）。

したがって、前頭前野や扁桃体でオキシトシンシステムの遺伝子発現の変化が社会性行動の異常に伴うマイクロエンドフェノタイプである可能性が考えられる。

上記の様に、マウスの前頭前野には社会性刺激によってその成熟が影響を受ける時期がある。これは、ヒトで示唆されているのと同様にマウスの前頭前野の発達過程は遺伝ならびに環境要因で何らかの影響を受ける可能性があるということを示唆する。その影響の生物学的基盤を理解しヒトの病態の理解につなげるには、マウスの前頭前野の正常での発達過程を理解する必要がある。この過程を時系列で明らかにするために、脳の発達過程で起こる生物学的な事象を代表する遺伝子を幾つか選択し、その発現パターンを時系列で定量的PCRを用いて追跡する事で、発達過程に起こる現象の順序及びタイミングを推定した。その結果、前頭前野ではまず、興奮性の神経細胞の成熟が起こり、続いて抑制性の神経細胞の成熟、その後ミエリン形成が大体離乳時までに起こるが、さらにグルタミン酸の放出が成人型になるにはもう少し時間がかかり、ドパミンによるニューロモデュレーションの経路の成熟なども含めてその成熟の過程は思春期の終わりくらいまで続く事が明らかになった（図1）。また、これらの発達のタイミングは脳の他の領域よりも遅い事がわかった。

このように一連の生物学的過程が前頭前野の発達において、ある一定のタイミングで順に起こる事がわかったので、そういった過程が、発達障害を引き起こすと考えられる遺伝要因、環境要因でどういった影響を受けるかを調べるために、自閉症や統合失調症で変異の見られるシナプスの分子であるシャンク3の変異マウス（遺伝要因）、そして妊娠マウスをポリIC処理する事により母胎内で炎症を惹起した状態から生まれたマウス（環境要因）の発達において、前頭前野での遺伝子発現の時系列に沿ったパターンを野生型のマウスと比較検討した。その結果、どちらのマウスでもミエリン形成の過程が一過性におくれる事、そしてその後、ドパミンレセプター遺伝子の発現が上昇する事を見いだした（櫻井投稿準備中）。この結果は、遺伝ならびに環境要因が前頭前野の発達過程のタイミングを狂わせ、それによって脳領域の回路の成熟過程に変化が起こる可能性を示唆する。

前頭前野の発達段階の遺伝子発現のパターンの時系列における変化は、成体でみられる行動表現型と結びつけられる可能性があり、とするならば遺伝子発現の時系列におけるパターンの変化はマイクロエンドフェノタイプとして有用であると推測される。

## まとめ

近年のヒトゲノム解析で得られた結果からヒトの発達精神障害に関与する遺伝子群が同定され、それを改変したマウスモデルが作製され、解析されている。こういった構成妥当性 (construct validity) をもつモデルをヒトの疾患の理解につなげるためには、マウスとヒトを比較しながら測定可能な生物学的な表現型に行動表現型を相関させ、その生物学的表現型を狙った新しい診断、治療法の開発につなげていく必要がある。このプロジェクトで明らかになったマウスモデルでの行動表現型と相関する可能性のあるマイクロエンドフェノタイプの解析を今後も継続し、ヒトの病態の理解、診断、治療につなげていく努力が必要となる。最後に4年間に渡りサポートしていただいた領域の研究者の先生方、代表の喜田先生に心から感謝したい。

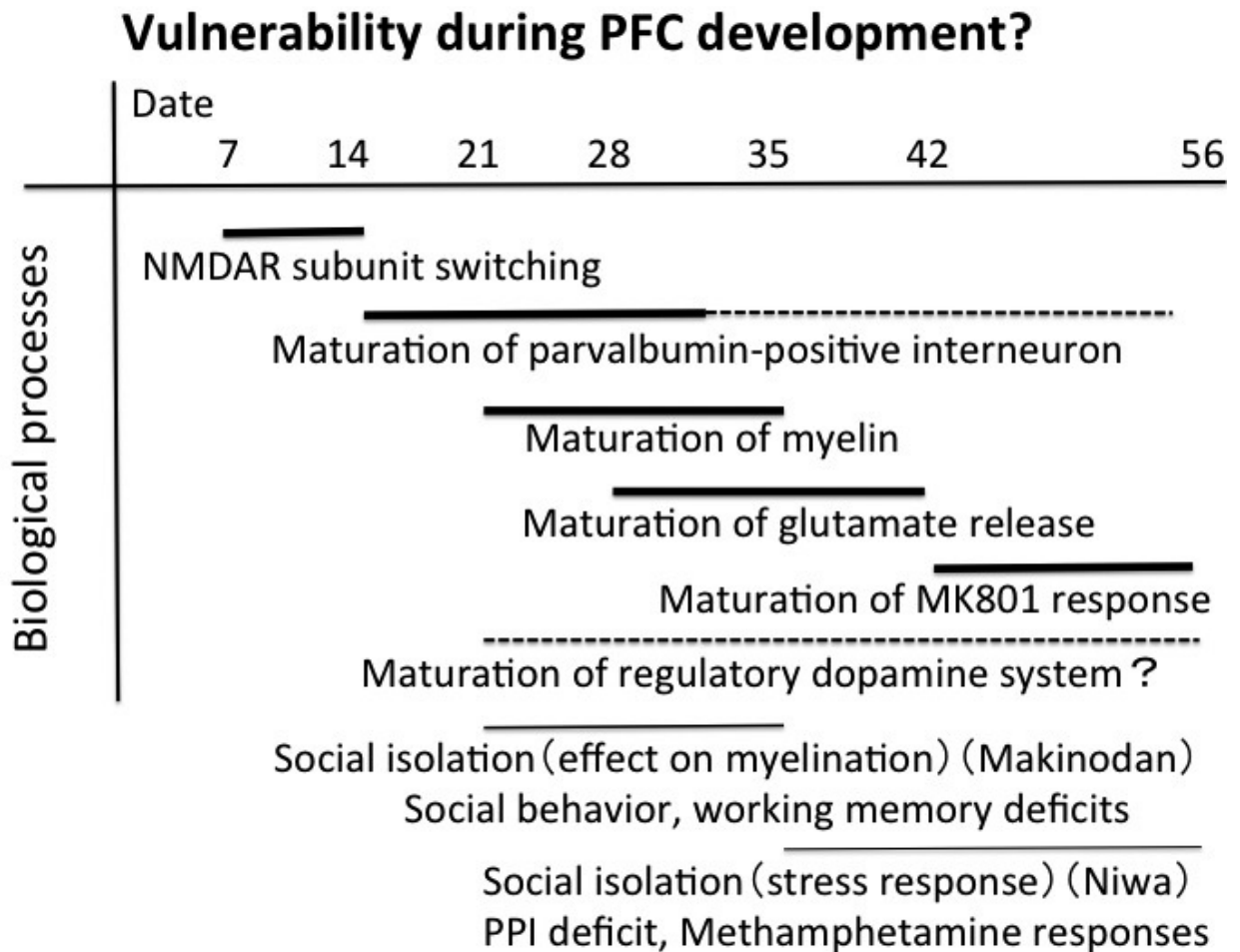


図1 マウス前頭前野での発達のシーケンス

興奮性の細胞でグルタミン酸レセプターのスイッチングが起こり、その後抑制性のインターニューロンの成熟が起こる。ミエリン形成が進むのは生後3-5週くらいだが、その後思春期を通じてさらに回路の成熟が進み、成体に近い形の反応性を獲得するのは生後8週くらいである。社会性刺激を与えない操作を生後3-5週に加えた場合と生後5週から8週に加えた場合で生じるマイクロエンドフェノタイプは異なり、その後に見られる行動表現型にも差が見られる<sup>20)</sup>。



# Social behavior circuitry and social habituation

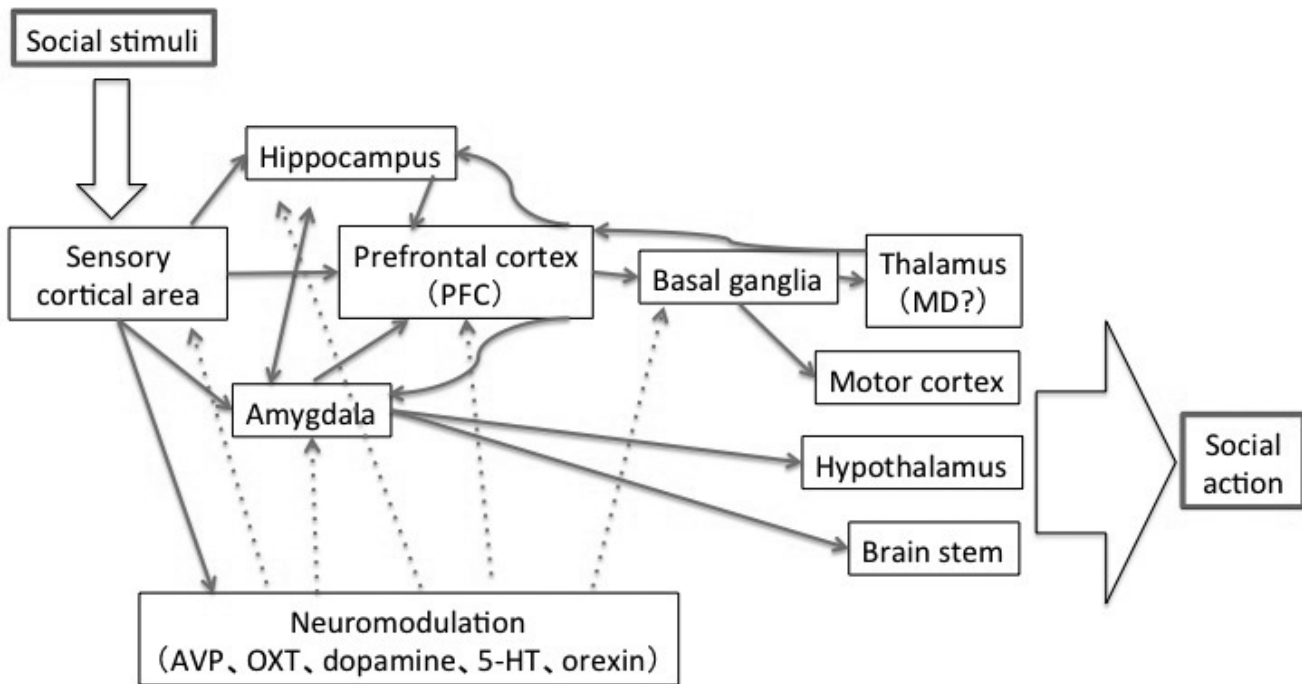


図2 反復される社会性刺激で活性化されるマウス脳領域の想定されるワイヤリングダイアグラム  
社会性刺激が入ってきた場合、こういった脳領域の活性化を経てマウスは社会性行動をとると考えられる。その過程はオキシトシンシステムを含むニューロモデュレーションで調節される（櫻井投稿準備中）。

## 前頭前野皮質回路の遺伝子操作による病態モデル解析

(平成25年度～26年度)

公募班員 小林 和人 福島県立医科大学

### 研究目的

統合失調症などの精神疾患の発病は、前頭前野皮質を中心とする脳領域の機能異常に起因し、それらをめぐる脳領域での物質代謝や神経伝達の変化が病態に深く関係するが、精神疾患の病態の基盤となる脳内神経回路の障害のメカニズムについては十分に理解されていない。本新学術領域研究では、内側前頭前野皮質 (medial prefrontal cortex/mPFC) を中心とする神経回路について、mPFC への入力経路およびmPFCあるいは線条体に局在する GABA 作動性介在ニューロンの役割が、統合失調症様の行動障害にどのように関係するのかを解析することを目的とした。特に、神経回路を構成する特定の神経路を標的とする新規のウィルスベクター機能を向上させ、死後脳解析により入力線維の減少することが報告されているmediodorsal thalamic nucleus (MD) からmPFC に投射する神経路の除去の誘導を試みた。また、GABA 作動性介在ニューロンについては、パルブミン (parvalbumin/PV) を含有する介在ニューロンの機能についてトランスジェニックラットを用いて解析する実験系の構築を試みた。

### 研究背景

私たちの研究室では、遺伝子改変技術を利用して、大脳皮質—基底核—視床ネットワークを介する学習や行動制御のメカニズムの解明に取り組んできた。遺伝子改変技術を応用し、複雑な神経回路から特定の神経細胞種を除去するイムノトキシン細胞標的法を用いて、このネットワークを構成する神経細胞の役割を明らかにした (Sano *et al.*, 2013)。また、最近では、高頻度逆行性遺伝子導入 (HiRet/NeuRet) ベクターという新しいウィルスベクター系を開発し、特定の神経路の機能を解析する技術に応用した (Kato *et al.*, 2013; Hirano *et al.*, 2013)。大脳皮質—基底核—視床ネットワークの機能異常は、種々の精神神経疾患の病態と深く関係することが知られている。本研究では、私たちの研究室の技術を応用し、特に、統合失調症の病態に関与することが示唆される神経回路に操作を施し、特定の神経路や細胞種の機能異常と病態との関係を明らかにする研究に取り組むこととした。

### 研究結果

第一に、特定神経回路の構造と機能を研究するために有効なNeuRetベクターの性能の向上を目指した。我々は、以前に、レンチウィルスベクターにおいて狂犬病ウィルスと水泡性口内炎ウィルス由来の2種類の糖タンパク質 (RV-GとVSV-G) を融合させることにより神経細胞への逆行性遺伝子導入の効率を向上できることを明らかにした。本研究では、この糖タンパク質の融合点を最適化することにより、さらに高い遺伝子導入効率を示すウィルスベクターの開発に成功した (Kato *et al.*, 2014)。RV-GとVSV-Gの連結部位を最適化するために、この部位をN末端あるいはC末端方向に移動した種々の融合糖タンパク質を作成した。それぞれを用いてシュードタイプ化したレンチベクター (GFPを導入遺伝子として搭載) を調製し、マウス脳内での遺伝子導入効率を評価した。多くの融合糖タンパク質を解析した結果、連結部位をC末端方向へ1アミノ酸シフトした融合糖タンパク質が以前のタンパク質よりも有意に高い遺伝子導入効率を示すことが明らかとなり、このタンパク質を融合糖タンパク質E型 (FuG-E) と名付けた。FuG-Eは、神経細胞特異的な逆行性遺伝子導入をさらに向上させ、今後の神経回路機能を研究するために重要な技術基盤を提供すると考える。

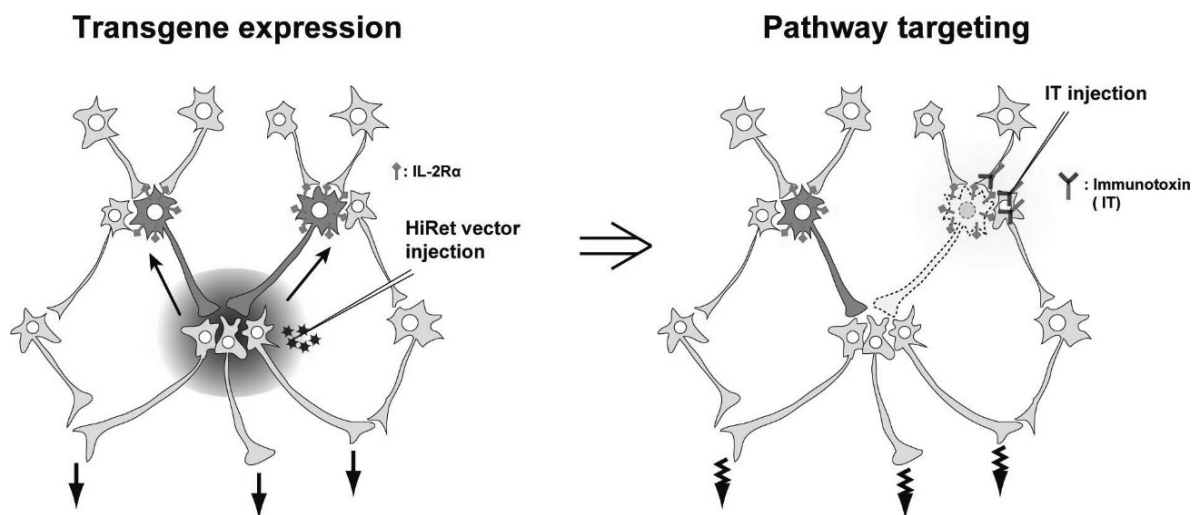
第二に、NeuRetベクターを応用して、MDからmPFCへ投射する神経路の病態との関係を調べるために、本経路の除去を試みた。MD-mPFC経路の投射を確認するために、NeuRet-GFPベクターをマウスのmPFCに注入し、脳内の逆行性遺伝子導入を解析した。マウス脳の切片を抗GFP抗体を用いて免疫染色した結

果、MDに多くのGFP陽性細胞が見出された。次に、MD-mPFC経路の除去を誘導するために、イムノトキシンの受容体であるインターロイキン-2受容体 $\alpha$ サブユニット(IL-2R $\alpha$ )をコードするNeuRet-IL-2R $\alpha$ -GFPベクターをmPFCに注入し、その後、片側性にイムノトキシンあるいはPBSをMDに注入した。1週間後に脳の切片を免疫染色により解析した結果、PBS注入側に比較して、イムノトキシン処理側で陽性細胞が顕著に減少しており、イムノトキシン投与によりMD-mPFC経路の除去が誘導できることが明らかとなった。本実験により、MD-mPFC経路を選択的に欠損する動物モデルが作成され、この動物は、今後、作業記憶や行動柔軟性に関する行動課題をテストすることにより、本経路と統合失調症の病態との関係を解析するために有益なモデルを提供すると考える。

第三に、PVを含有するGABA 作動性介在ニューロンの機能についてトランスジェニックラットを用いて解析する実験系の構築を試みた。PVをコードする細菌人工染色体(BAC)クローンをを用いてCre組み換え酵素を発現するコンストラクトを作成し、DNAをラット受精卵に注入することによって、トランスジェニックラットを作製した。複数のファウンダーより繁殖し、PV細胞においてCreの高い発現効率を示すラット系統を選択した。このラットの脳内に、CreloxP組換えによりGFPを発現するアデノ随伴ウイルスベクターを注入することにより、実際にPV細胞において選択的に組換えが起ることを確認した。これらの発現は大脳皮質および線条体で観察された。本トランスジェニック系統は、今後、大脳皮質や線条体のPV含有GABA 作動性介在ニューロンの病態における役割を研究するために有効なモデル動物になる。

## まとめ

本研究では、mPFCを中心とする神経回路に着目し、特に、MDからmPFCに投射する経路とPV含有介在細胞の役割を解析するための実験系を構築した。神経回路を構成する特定の神経路を標的とするNeuRetベクターの機能を向上させるためにFuG-Eを開発し、MD-mPFC経路を選択的に除去するための技術を確認した。また、PV-Creトランスジェニックラットを作成し、GABA 作動性介在ニューロンの機能を研究する実験基盤を確立した。これらの技術基盤は、今後、mPFC関連の神経回路を構成する特定の神経路や細胞種の機能異常と統合失調症様の病態の関係を明らかにし、精神疾患の病態発現機構の究明に貢献することが期待される。



図の説明：選択的な神経路ターゲティング技術

組み換え体イムノトキシン(IT) に対する受容体遺伝子をコードする高頻度逆行性遺伝子導入(HiRet)ベクターを脳領域に注入し、複数の入力経路に遺伝子を導入する。その後、上流の特定領域にイムノトキシンを注入することにより、特定神経路の除去を誘導する。(Kato *et al.* *Rev. Neurosci.*, 2013)

# 統合失調症脳内タンパク質群の発現解析ータンパク質多項目同時測定システムを用いてー

(平成25年度～26年度)

公募班員 國井 泰人 公立大学法人福島県立医科大学会津医療センター精神医学講座 准教授

## 研究目的

統合失調症病態におけるドパミン系・グルタミン酸・GABA系の異常を、動物実験や画像研究などの間接的アプローチではなく、死後脳組織を用いて病態の現場を直接的に検討することである。これまで代表者らが統合失調症死後脳組織を用いて分析を進めてきたドパミン系・グルタミン酸・GABA系の分子を中心に、ごく少量のサンプルでタンパク質の多項目同時測定を可能にするルミネックス法という革新的な手法から新たなマイクロエンドフェノタイプの創出を目指すことを目的とする。

## 研究背景

我々はこれまで統合失調症の病態理解には死後脳組織の解析が不可欠と考え、日本初の系統的な精神疾患死後脳バンクの運営に従事してきた。我々は、統合失調症の有力な病因仮説に基づき、ドパミン系・グルタミン酸系・GABA系分子について、当バンクの死後脳組織を用いて検証しようと試みてきた。ドパミン系とグルタミン酸系の両方を調節する主要分子であるDARPP-32及びカルシニューリンについての免疫組織化学的検討の結果、統合失調症前頭前皮質や上側頭回、島皮質などでの発現異常を見出してきた。しかし、免疫組織化学法やin situ hybridizationなど組織形態を保ちながら解析する手法は、抗体やプローブを介した間接的な検出法であり、一サンプルから多くの物質についての解析することが困難であるため、結果として限りある貴重なサンプルを多く消費するという欠点があった。近年タンパク質の多項目同時測定法としてルミネックス法が開発されている。ルミネックス法は多検体の解析に優れごく少量のサンプル量で解析できるという特徴がある。そこで我々は、ルミネックス法を用いることにより、前述の問題点を解決できると考え、統合失調症と健常対照との間でのドパミン関連分子、グルタミン酸関連分子、GABA関連分子を標的タンパク質として死後脳内のタンパク質発現比較を行なった。

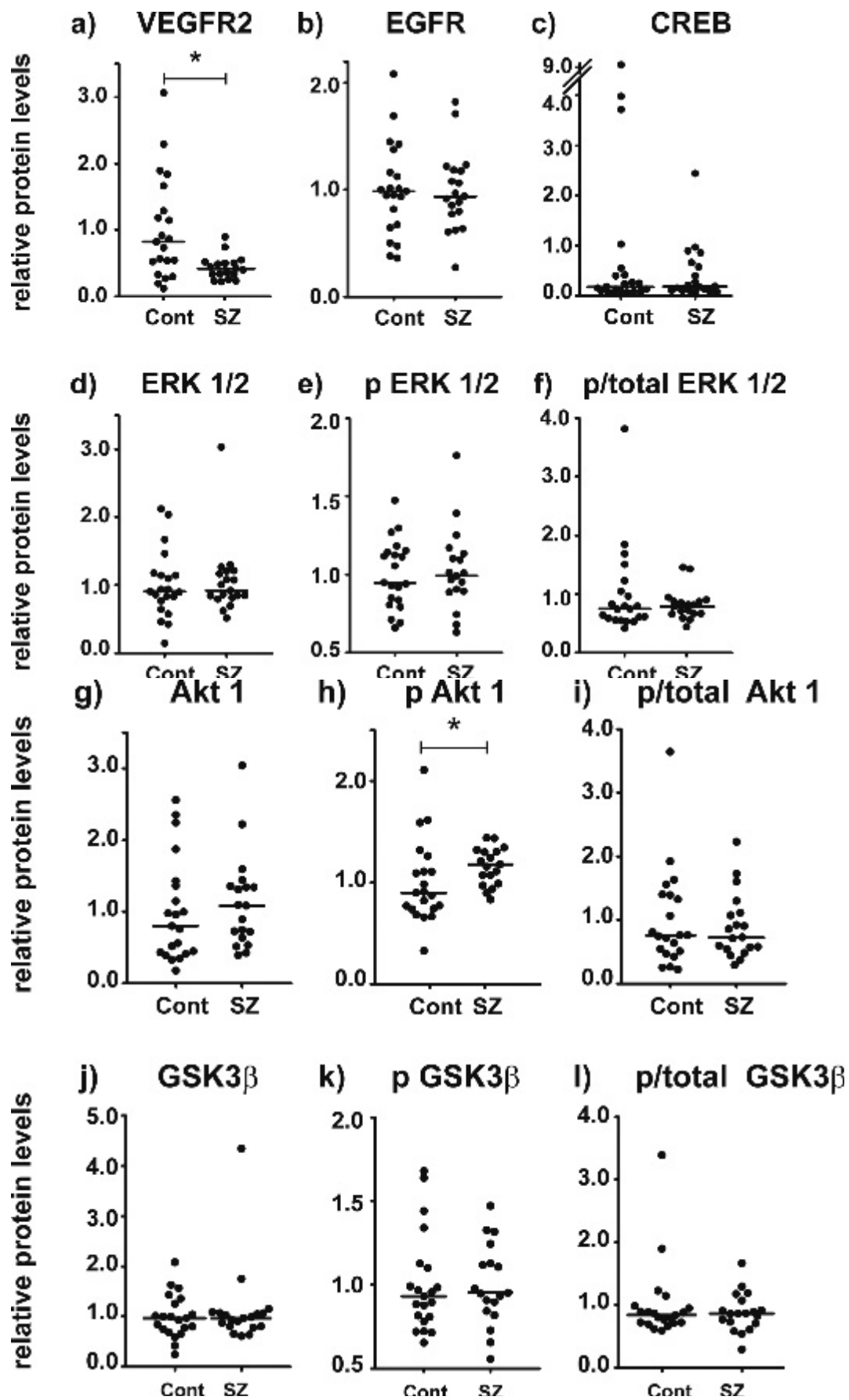
## 研究結果

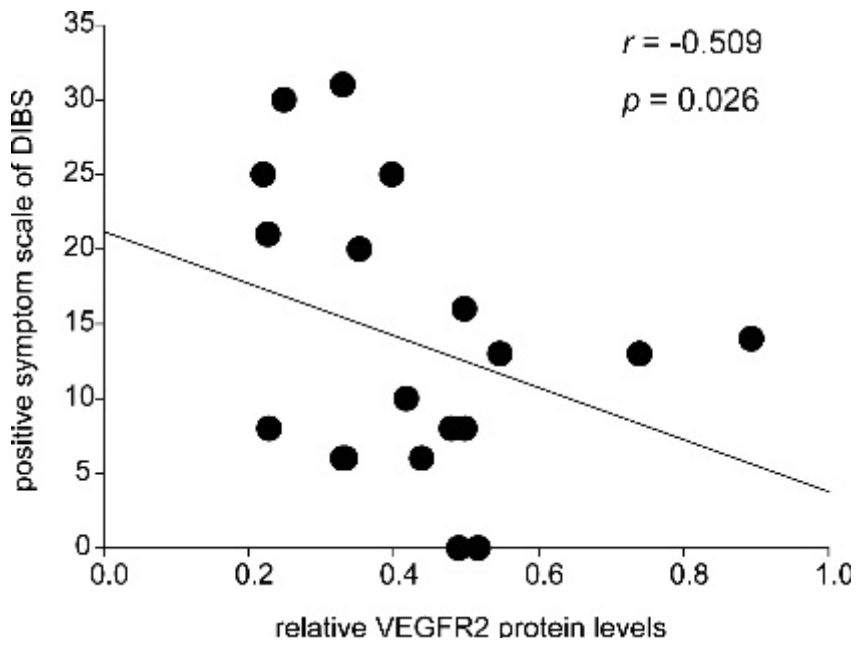
年齢、性別、死後時間をマッチさせた統合失調症死後脳19例、健常対照死後脳21例の凍結脳サンプルの前頭前皮質(BA10)および側坐核についてvascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), epidermal growth factor receptor (EGFR)、Akt1、リン酸化Akt1(Ser473)、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、リン酸化ERK1/2 (Thr185/Tyr187)、glycogen synthase kinase 3  $\beta$  (GSK3  $\beta$ )、リン酸化GSK3  $\beta$  (Ser9)、およびcAMP response element binding protein (CREB)のタンパク質発現量をBead-Based Multiplex Immunoassay (Luminexシステム)により多項目同時測定した。さらに統合失調症群と対照群間で発現量の差がみられたVEGFR2については、発現量と生前の臨床症状スコアとの関連について、またその遺伝子多型と各タンパク質の発現量、統合失調症発症の有無との相関を解析した。同時多項目測定の結果、VEGFR2が統合失調症群の前頭前皮質において有意に減少していた。統合失調症群において前頭前皮質のVEGFR2発現量と生前の陽性症状スコアの間には負の相関がみられた。また、統合失調症群の前頭前皮質ではリン酸化Akt1が増加していた。遺伝子多型解析の結果、VEGFR2遺伝子の多型(rs7692791)はAkt1の発現量とERK1/2およびAkt1のリン酸化レベルを予測することが示された。

## まとめ

VEGFR2は細胞外からの血管増殖刺激をAktシグナル伝達系に伝える因子であることから、統合失調症群の前頭前皮質のVEGFR2発現量低下は統合失調症の病因が微小血液循環の異常にあるとする仮説を説明

する可能性がある。





左、中図：前頭皮質において血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR2）の発現が統合失調症で低下していた。Akt1のリン酸化（Ser473）が統合失調症で上昇していた。

右図：統合失調症の陽性症状に対する評価尺度と VEGFR発現量との間に負の相関が見られた。

## うつ病における神経回路変容の抽出と解析

(平成25年度～26年度)

公募班員 田中 謙二 慶應義塾大学医学部 精神・神経科学教室

### 研究目的

うつ病の主要な症状の一つに、意欲障害がある。意欲の障害がどのような神経回路変容によって起こるのかよく分かっていない。一方で、行動神経科学において目的指向型行動の神経基盤は比較的良く研究されており、目的指向型行動の障害が意欲障害であるという定義も提案されている。本研究では、目的指向型行動を障害する神経回路を同定し、意欲障害のマイクロエンドフェノタイプを確立することを目的とした。

### 研究背景

脳機能イメージングの進歩により、うつ病における各脳部位の活動変化が捉えられるようになってきた。更にはうつ病患者に対して神経回路の操作（ブロードマン25野や側坐核へ脳深部刺激（deep brain stimulation））を行い、うつ病を治療する）も行われるようになってきた。以上のヒトを用いた観察と操作から、うつ病で観察される神経回路変容をマイクロエンドフェノタイプとして理解する準備が整ってきた。

特に意欲障害はうつ病における中核的な症状であり、意欲障害に伴う報酬系の変容が繰り返し報告されてきた。報酬系を担う中心は腹側線条体を含む神経回路であり、この回路は目的指向型行動を支配する回路でもある。意欲障害における神経回路のマイクロエンドフェノタイプを同定するという試みの中で、腹側線条体を神経回路のマイクロエンドフェノタイプと宣言するのは容易である。しかし、領域から細胞へとよりミクロな視点で捉えるのは容易ではない。なぜなら、線条体には投射先（解剖）も機能（生理）も全く異なる2種類の細胞集団、ドパミン受容体1型を発現する線条体medium spiny neuron（以下D1-MSN）とドパミン受容体2型（D2）を発現するMSN（D2-MSN）があり、それぞれを分離して解析することが困難とされてきたからである。細胞レベルのマイクロエンドフェノタイプに迫るには、D1-MSNとD2-MSNを厳密に分離して機能を操作し、活動を観察する技術が求められる。

代表者は、意欲障害の中でも、神経損傷が原因で発症する病態に着目した。ハンチントン病はMSNが変性することによって錐体外路症状が出現することがよく知られているが、神経症状が出現する前に意欲障害などの精神障害が出現する。特に病初期は、MSNのうちD2-MSNから障害を受けることが知られている。この臨床知をアイデアとして、D2-MSNが損傷を受けると意欲障害になるという仮説を立てた。この仮説を実証するために用いたのが時期特異的に細胞毒を発現させることの出来る遺伝子発現誘導システムである。細胞毒を時期特異的に発現させる実験と目的指向型行動を定量できるオペラント行動課題を組み合わせ、腹側線条体の領域を同定し、その後、目的指向型行動中のD2-MSNの活動を明らかにする。この活動パターンを参考にして、オプトジェネティクスでD2-MSNの活動を抑制する。以上の操作・観察研究を通じて、腹側線条体のどの領域のD2-MSNの、どのような活動様式の変容が意欲障害のマイクロエンドフェノタイプであるのか明らかにする。

### 研究結果

#### 1. D2-MSN選択的、時期特異的な細胞毒発現

代表者は細胞毒（ジフテリアトキシンA, DTA）をD2-MSN選択的に発現させるために、テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムを利用した。既存のtet0-DTAマウスと組み合わせることを目的として、ドパミン受容体2型プロモーター制御下でtTAを発現するマウス（*Drd2*-tTAマウス）を新規に作出した。*Drd2*-tTA::tet0-DTAマウス（D2-DTA）ではドキシサイクリン（DOX）投与中は細胞毒DTAの発現が無く、DOX投与を中止するとDTAの発現が開始された。*Drd2*を発現するコリン作動性介在神経やドパミン神経に

はDTAの発現が無かったので、この操作はD2-MSNに局限した操作であった。

すべてのD2-DTAマウスは、DOX投与中止後、両側の腹外側線条体からDTAの発現が始まり同心円状にその発現領域が広がっていった。DOX投与を7日後に再開するとDTAの発現が停止し、DTAの発現を腹外側線条体に局限させることができた。

## 2. オペラント行動課題による意欲障害の抽出

D2-DTAマウスをDOX投与下でprogressive ratio課題をトレーニングした。Progressive ratio課題は毎日行い、意欲の指標であるBreak pointが安定したところでDOX投与を中止し、7日後にDOX投与を再開した。この時break pointが約半分に低下し、これが2週間持続した。腹外側線条体D2-MSNの障害によって意欲が低下することが明らかになった。

## 3. オペラント行動課題中のD2-MSNの活動観察

*Drd2-tTA::tet0*-YCマウス（D2-MSNにカルシウム蛍光タンパクyellow cameleon nano50が発現するマウス）を作成し、腹外側線条体D2-MSNの活動を、光ファイバーで観察する実験系を構築した。この実験系では、光ファイバーが腹外側線条体に導かれており、435 nmの光がYCに照射され、YCから発せられるCFP、YFP蛍光が同じ光ファイバーを通じて検出器に届く。およそ300個のD2-MSNの集合カルシウム濃度変化を観察していることになる。オペラント行動課題中に観察した結果、トライアル開始時、レバー押し開始時、エサ報酬を得たときの3ポイントでD2-MSNの細胞内カルシウム濃度が高まることを明らかにした。

## 4. トライアル開始時のD2-MSN活動が意欲行動を制御する

*Drd2-tTA::tet0*-ArchTマウス（D2-MSNに抑制性オプシンArchTが発現するマウス）を作成し、腹外側線条体D2-MSNの活動を秒単位で抑制する実験系を構築した。この抑制性オプトジェネティクス実験では、トライアル開始時とレバー押し開始時の2ポイントで光操作の効果を調べた。オペラント行動課題中に、光抑制を行った結果、トライアル開始時の抑制で意欲行動の低下が見られたのに対し、レバー押し開始時の抑制では意欲行動に変化は見られなかった。上述した光観察と光操作の結果から、トライアル開始時の腹外側D2-MSNの活動が意欲行動を仲介していることが明らかになった。

## まとめ

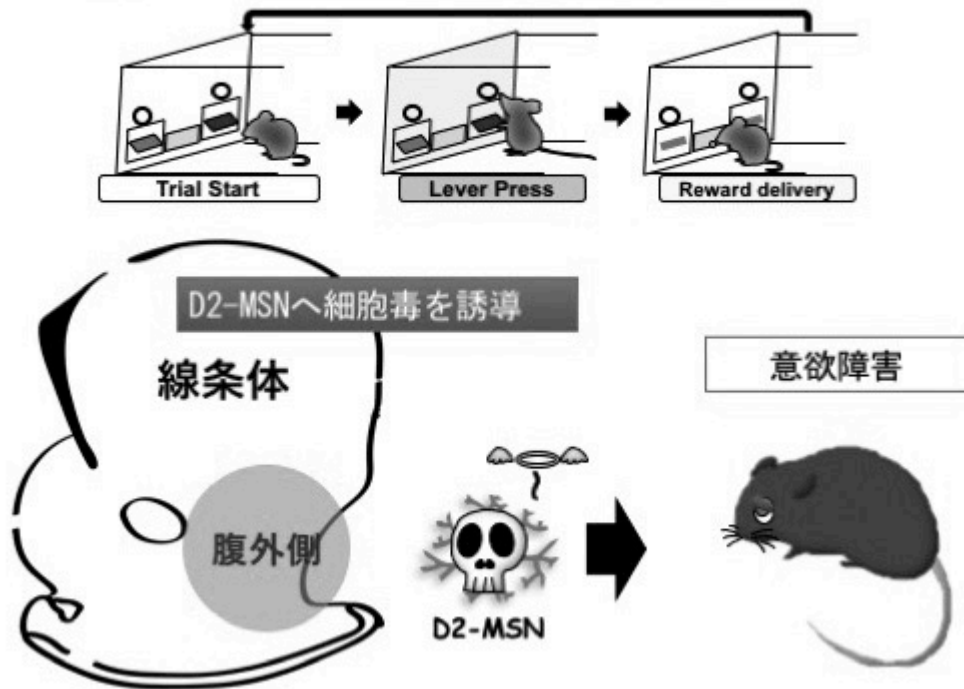
ハンチントン病における線条体投射神経障害と意欲障害の関係をヒントに始めた本研究は、マウス腹外側線条体D2-MSNの変性・細胞死によって意欲障害が生じるという結果を得るにいたった。従来、覚せい剤を報酬とした目的指向型研究では、腹内側線条体D2-MSNの活性化によって意欲行動が減弱し、D2-MSNの不活性化によって意欲行動が増加することが知られていたため、ハンチントン病の意欲障害は線条体D2-MSNの障害と無関係かもしれないと言われていた。解釈としては2つあり、覚せい剤など病的に意欲を向上させる報酬と、食べ物という自然な報酬でD2-MSNの役割が異なるという解釈が一つで、もう一つの解釈は、腹内側と腹外側線条体D2-MSNの機能が異なるというものである。おそらくどちらも妥当な解釈である。エサ報酬を用いた意欲行動の研究数が少ないので、更なる追試が必要である。

うつ病では、神経細胞死は無いと考えられているので、細胞毒を用いた研究成果をそのままうつ病の意欲障害の理解に結びつけることは出来ない。しかし、細胞死を伴わないオプトジェネティクスを用いた急性のD2-MSNの活動抑制によっても同様の意欲低下が観察されている。このため細胞死を伴う神経疾患における意欲障害も、細胞死を伴わない精神疾患における意欲障害も、腹外側線条体D2-MSNの機能変容がマイクロエンドフェノタイプであると主張できるのではないかと考えられる。

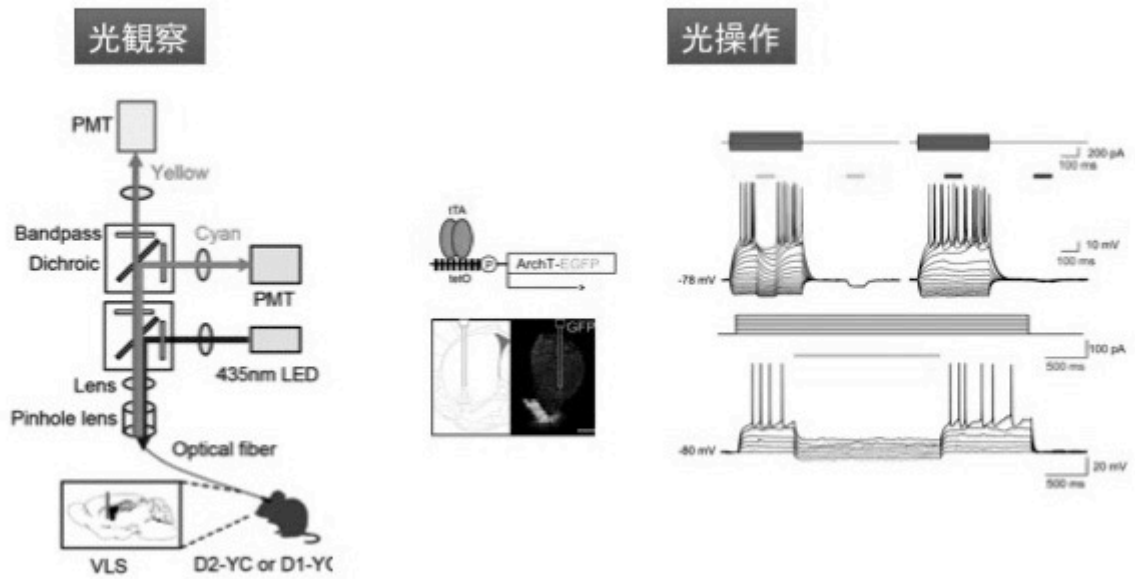


A

エサ報酬を用いたオペラント行動課題 (progressive ratio task)



B



- A. 腹外側線条体D2-MSNだけに細胞毒を発現させると意欲が低下する。  
 B. ファイバーフォトメトリー法によるD2-MSNによる光観察でトライアル開始時にD2-MSNの活動があがり、そのタイミングで光抑制すると意欲障害がおこる。

# 非定型炎症を伴う精神疾患モデル動物を活用したマイクロ精神病態の同定と分子機序解明

(平成25年度～28年度)

公募班員 宮川 剛 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 教授

## 研究目的

統合失調症や双極性障害などの精神疾患の患者の脳において炎症が生じ、これにより各種の脳の異常と行動レベルでの障害が生じているという仮説が注目されている。しかし、脳内の炎症がどのようにして生じ、また、それがどのような脳の異常、そして行動の異常を引き起こしているのかは分かっていない。我々はこれまでに、軽度ではあるが極めてロバストな慢性炎症を示し、かつ、行動レベルでも精神疾患様の一連の症状を示す複数系統のマウスを同定してきた。これらの精神疾患モデルマウスの脳で見られる軽度の慢性炎症と、それによって誘導される各種の脳内の異常をマイクロエンドフェノタイプと捉え、(1) 遺伝的・環境的要因が軽度慢性炎症を引き起こすメカニズムを解明すること、(2) 軽度慢性炎症が原因となって生じるマイクロエンドフェノタイプを同定し制御すること、を目指す。

## 研究背景

我々はこれまでに180系統以上の遺伝子改変マウスの行動を網羅的に解析し、多数の精神・神経疾患モデルマウスを同定してきた。この中でも特に顕著な行動異常プロファイルを示す $\alpha$ CaMKIIヘテロ欠損マウスで、成体の脳にもかかわらず、海馬歯状回のほぼすべての神経細胞が未成熟な状態にある「非成熟歯状回」という現象を世界で初めて見出した。この「非成熟歯状回」は、やはり顕著な行動異常を示すSchnurri-2(Shn2)欠損マウスや変異体SNAP-25ノックインマウス、さらには、抗うつ薬を慢性投与した野生型マウスや薬剤誘発性てんかんモデルマウスにおいても確認された。さらに我々は、「非成熟歯状回」様の異常がヒトの統合失調症患者と双極性障害患者の死後脳でも見られることを確認し、神経・精神疾患の有力なエンドフェノタイプとして提唱している。特にShn2欠損マウスは、脳の遺伝子発現パターンが統合失調症患者の死後脳のものと同様であったほか、抑制性神経細胞マーカーのパルバルブミン(PV)やオリゴデンドロサイトマーカーの発現減少、シータ波・ガンマ波などの脳波異常など統合失調症患者の脳で報告されている多くの特徴を備えており、優れた統合失調症モデルであることが明らかとなった。驚くべきことに、ゲノムワイドの遺伝子発現解析やプロテオミクス解析によって、Shn2欠損マウスを含めた「非成熟歯状回」を示す精神疾患モデルマウスの脳において、軽度の慢性炎症が共通して生じていることがわかってきた。この軽度の慢性炎症では、複数の補体やMHCの遺伝子などの発現が増加しているが、典型的な炎症性サイトカインの発現にはあまり変化が見られない。この非定型な炎症を特徴付ける遺伝子発現パターンは、統合失調症患者の死後脳でも確認しており、この種の炎症が精神疾患をもたらす脳の各種異常の原因の一つとなっていることが推測される。しかし、非定型慢性炎症がなぜ生じ、それがどのような脳の異常を引き起こしているのかは明らかになっていない。

また、我々はバイオインフォマティクスの手法によりゲノムワイドに遺伝子発現のパターンを解析し、ヒト炎症性疾患と対応するマウスモデルでの遺伝子発現パターンがよく類似していることを明らかにしている。この解析手法は異なる生物種間においても遺伝子発現パターンを比較するのに非常に有効であり、本研究でも同手法を用いてモデルマウスの脳での遺伝子発現と精神疾患患者の死後脳の遺伝子発現を比較し、新たなマイクロエンドフェノタイプの同定に活用した。

## 研究結果

### (1) 脳における軽度慢性炎症を引き起こす遺伝的・環境的要因の同定

脳内の慢性炎症を示す統合失調症モデルとしてNeurogranin(Nrgn)欠損マウスを新たに見出した。NRGNは統合失調症との関連が報告されている。Nrgn欠損マウスは統合失調症に関連した各種の行動異常および脳内異常(非成熟歯状回やPV発現の低下など)を示すことを見出した。このマウスは海馬でアス

トロサイトが活性化していることが知られている。これらの知見は、慢性炎症が統合失調症に関連していることを支持するものである。これまでの我々の研究において、非成熟歯状回を示す各種遺伝子改変マウスの歯状回顆粒細胞は電気生理学的に興奮しやすいという特性を持つこと、てんかんモデルマウスで非成熟歯状回やグリア細胞活性化が生じることがわかっている。これらの知見から、神経の過剰興奮が非成熟歯状回や脳内炎症の原因となっていると考えられた。この仮説を検証するため、**光遺伝学的手法を用いて歯状回の顆粒細胞選択的に過活動を誘導したところ、顆粒細胞の擬似的未成熟化とアストロサイトの活性化**が見られた（未発表）。この結果から、神経過活動が脳内炎症および非成熟歯状回の原因の一つであると考えられた。

## (2) 脳の軽度慢性炎症が原因となって生じるマイクロエンドフェノタイプの新規同定

脳の軽度慢性炎症を示すShn2欠損マウスにおいて、3D電子顕微鏡を用いたコネクトーム解析により脳微細構造の異常の有無を調べた。その結果、Shn2欠損マウスの歯状回顆粒細胞の樹状突起のスパインは、**幼若なスパインがもつ形態的特徴**（細く長いスパイン）を示すことがわかってきた。

非成熟歯状回の *in vivo*での神経活動の状態はこれまで不明であった。そこでマイクロエンドスコープを用い、自由行動下のマウスで**in vivo カルシウムイメージング**を行った。これまでのところ、双極性障害モデルと考えられる  $\alpha$ CaMKIIヘテロ欠損マウスと抗うつ薬の慢性投与マウスにおいて、**歯状回顆粒細胞で発火頻度が増加**している傾向が見られてきており、これらのマウスの歯状回において神経の過活動が生じていることが示唆される（未発表）。

当初の計画以上の特筆すべき成果として、マイクロアレイデータを用いたバイオインフォマティクス解析により、**統合失調症患者の前頭皮質や、アルコール中毒症患者の前頭皮質および海馬において、擬似的な未成熟状態が見られる**ことを明らかにした。抗うつ薬の慢性投与によりマウスの前頭皮質においてPVニューロンの**擬似的な未成熟化**が生じる可能性も示した。さらに最近、統合失調症や双極性障害、自閉症（17など複数の精神疾患モデルマウスにおいて、**脳のpHが低下**していることを明らかにした。脳のpH低下は、統合失調症と双極性障害患者の死後脳データのメタ解析でも確認されたことから、これらの精神疾患のエンドフェノタイプのひとつであると考えられる。脳pHの低下は各種のマイクロエンドフェノタイプに影響を与えている可能性がある。

以上の結果およびこれまでの知見から、様々な遺伝的・環境的要因が脳内炎症・神経過活動を介して非成熟歯状回をはじめとする各種の脳内異常を引き起こし、これが共通した行動レベルでの異常の原因となっていることが考えられる（図1）。

## まとめ

我々は、非定型な慢性炎症を伴う精神疾患モデルマウスを複数系統同定し、それらのマウスにおいて様々なマイクロエンドフェノタイプを見出してきた。しかし、この慢性炎症がこれらの異常の原因なのかはさらなる検討が必要である。これまでの研究で、ある種の抗炎症薬の投与によりShn2欠損マウスが示すアストロサイトの活性化や作業記憶の低下などの一部の行動異常の正常化に成功しているが<sup>12</sup>、慢性炎症の抑制によりどのマイクロエンドフェノタイプが正常化し、正常化しないのかを詳細に調べる必要がある。慢性炎症が各種の脳内異常、行動レベルでの障害を引き起こすメカニズムが解明されることによって、統合失調症、双極性障害などの各種の精神疾患の新規の予防・治療法の確立への貢献が期待される。

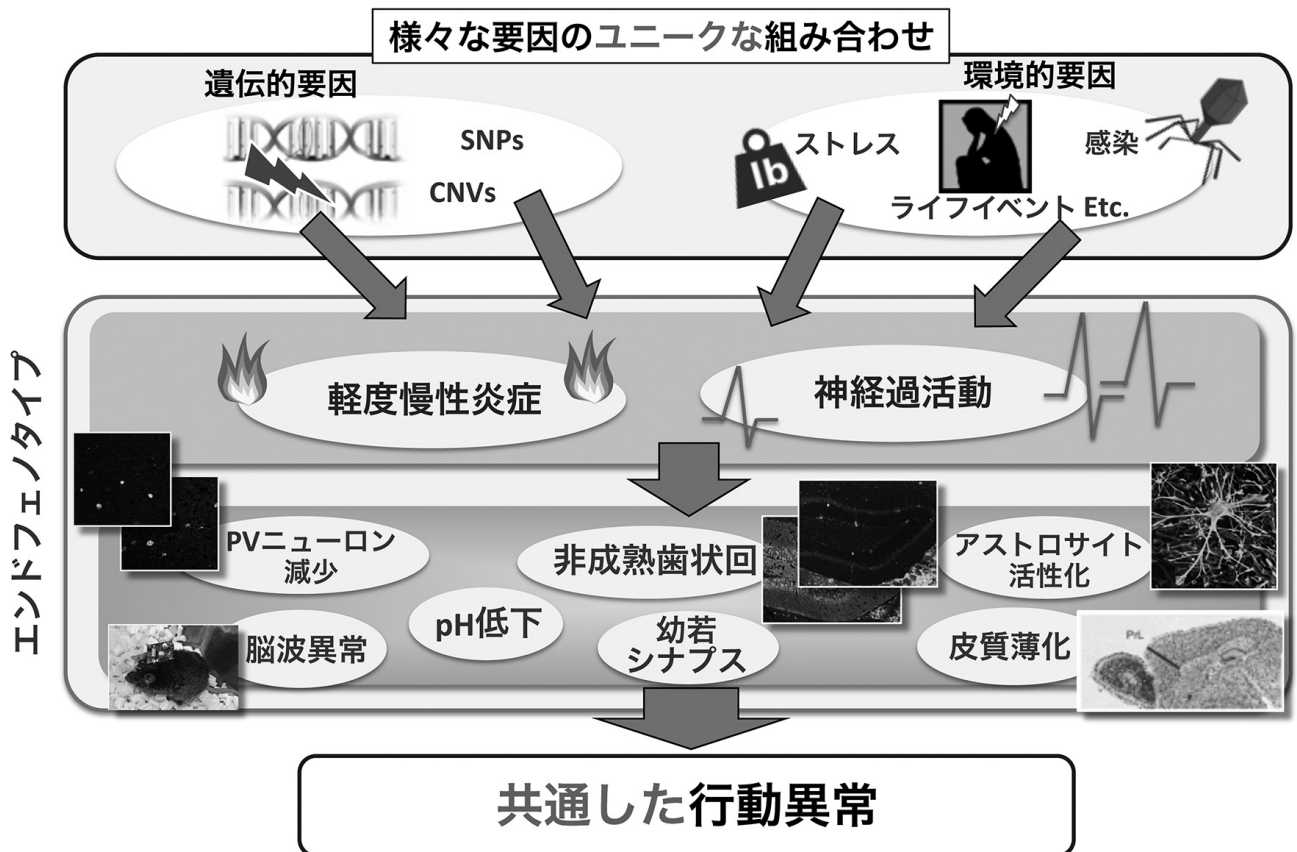


図1. 精神疾患において、様々な遺伝的・環境的要因によって脳内に慢性炎症や神経科活動が生じ、それが非成熟歯状回をはじめとした脳内の各種異常を引き起こし、その結果、各疾患に共通した行動レベルでの異常が生じていることが想定される。

# 仮想現実環境下の機能イメージングによる精神・発達障害の微小回路病態の解明

(平成25年度～26年度)

公募班員 佐藤 正晃 埼玉大学脳末梢科学研究センター/理化学研究所脳科学総合研究センター

## 研究目的

種々の精神疾患で認められる行動異常の背後にある神経回路機能の異常を同定するには、行動中の動物の回路活動を大規模かつ高解像度に計測する技術の確立が不可欠である。本研究では、我々が独自に確立したin vivo深部脳イメージング、蛍光カルシウムセンサータンパク質発現トランスジェニックマウス、およびマウス用仮想現実(バーチャルリアリティ、VR)システムなどの先端技術を精神疾患研究に応用し、顕微鏡周囲に作り出されたVR環境下で行動する疾患モデルマウスの海馬神経回路活動を、単一細胞解像度の二光子カルシウムイメージングで可視化することで、その微小な機能回路異常を同定することを目的とした。

## 研究背景

VRは被験者に提示する感覚刺激の量と質を柔軟に設定できるため、海外の精神科領域では種々の恐怖症などの不安障害のリハビリテーションに治療応用されている。基礎神経科学領域では以前からヒトやサル脳研究における行動課題に利用されていたが、2005年にラットがVR空間をナビゲーションできることが報告されて以降、げっ歯類の実験系としてその重要性を増している。特にVRは顕微鏡または電極下に頭部固定した動物の実験環境を柔軟に操作できることから、二光子レーザー顕微鏡や多電極記録などの先端的な回路機能計測法との親和性が高く、精神疾患の微小な機能回路病態の解明に大きな潜在的有用性をもっている。

我々はこれまで、学習行動中のマウスの海馬CA1神経回路活動の可視化のために、in vivo深部脳イメージングの確立と蛍光カルシウムセンサータンパク質を発現するトランスジェニックマウスの作製、およびマウス用VRシステムの構築を独自に行ってきた。本研究は、このような基盤技術をもとに、精神疾患研究により適したVR課題を確立し、疾患モデルマウスにおける微小な機能回路病態をin vivoイメージングによって同定することを目指した。

本研究は精神・発達障害モデルマウスの例としてShank2欠損マウスを研究対象とした。Shank2はグルタミン酸作動性シナプス後肥厚部のタンパク質複合体に含まれる足場タンパク質の一つである。Shank2欠損マウスでは、社会行動の減少や発声コミュニケーション行動の減少など、ヒトの自閉症の特徴に似た表現型が見られることが報告されている。また、これらのマウスはモリス水迷路課題における空間学習の異常を示すこと、およびその海馬では、NMDA型受容体が関わるグルタミン酸神経伝達とシナプス可塑性に異常を示すことから、本研究に最も適したモデルマウスであると考えられた。

## 研究結果

我々は、頭部固定したマウスがVR空間内の目的地に一定時間留まると報酬がもらえる新しい行動課題を考案した(図)。このVRシステムでは、頭部を固定したマウスが空気で浮かせた発泡スチロール製球形トレッドミルの上を走ると、その回転を光学センサーが検知し、VR空間の風景がマウスの歩行に応じてワイド液晶モニタに描かれる仕組みになっている。VR空間内の直線路の始点を出発したマウスは、途中で壁と床に緑のパネルの目印の付いた目的地でチューブから報酬の水が得ることができる。直線路の外には、山、タワー、建物などを模した手がかりが配置されている。直線路の終点に到達したマウスは、再び始点に戻されて次のトライアルを繰り返す。マウスはまず目的地を通過しただけで報酬が得られる簡単な非遅延課題で訓練された後、目的地内で一定時間(1～1.5秒)留まったときだけに報酬が得られる遅延課題で訓練された。

我々はまず、直線路の内外の視覚的な特徴を操作することで、目的地に付けられた目印がマウスのVR空間の認識に重要であることを明らかにした。遅延課題であらかじめ訓練して目的地で立ち止まることを学習したマウスを用い、直線路の外の手がかりを除いた条件で課題を解かせたところ、目的地の滞在時間と成功トライアルの割合は、手がかりを除かなかった対照条件から変化しなかった。しかし、目的地の目印を除いた条件では、目的地の滞在時間と成功トライアルの割合は、目印を除かなかった対照条件から有意に減少した。

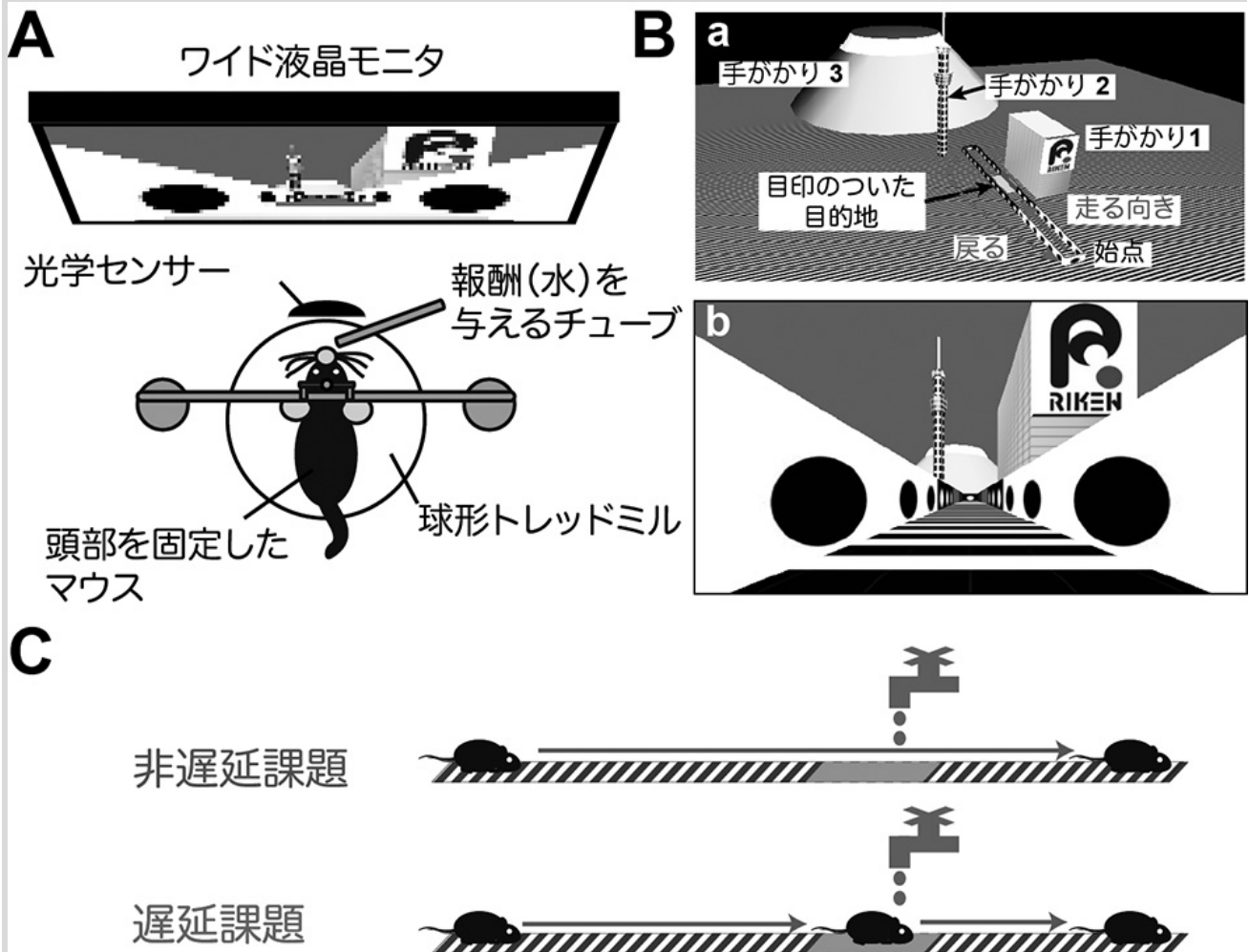
次に、海馬の活動がこの目的地の認識に関わっているかどうかを調べるために、AMPA/カイニン酸型グルタミン酸受容体の阻害薬であるCNQXを海馬に微量注入する実験を行った。遅延課題であらかじめ訓練したマウスの海馬CA1野にCNQXを注入した直後に課題を解かせると、目的地の滞在時間と成功トライアルの割合は著しく低下したが、注入後1～3日たった回復後では、これらの指標は注入前のレベルに戻った。対照として生理食塩水を注入した条件では、このような変化はみられなかった。

最後に、自閉症モデルマウスの一つであるShank2欠損マウスを用いて、VR空間における目的地の学習にShank2が必要かどうかを調べた。正常マウスとShank2欠損マウスを非遅延課題に続いて遅延課題で訓練すると、非遅延課題では目的地の滞在時間に差はみられなかったが、遅延課題ではShank2欠損マウスに目的地の滞在時間の有意な低下が認められた。また目的地で留まることをあらかじめ学習させた後に、目的地を直線路の始点に近い方に移動させた目的地移動実験では、正常マウスは速やかに新しい目的地に留まることを再学習したが、Shank2欠損マウスでは移動後の新しい目的地に留まる時間も正常マウスに比べて短いという結果が得られた。

以上の結果は、マウスにおけるVR空間の認識には、実世界の空間認識に似た海馬に依存したメカニズムが働いていること、および、その学習には、シナプス後部のタンパク質複合体形成を介してシナプス伝達とその効率の変化を支えているShank2が必要であることを示している。

## まとめ

本研究において、我々は頭部固定マウス用の新規VR行動課題を確立し、自閉症モデルマウスの一つであるShank2欠損マウスを用いた実験によって、この課題が精神・発達障害モデルマウスの研究に有用であることを示した。我々の論文は、頭部固定VRを用いて疾患モデルマウスの表現型異常を明らかにした最初の論文となった。マウスがVRのようなある種の人工的な環境の下でどのような行動を示すかは、まだ不明な点が多い。今後は、運動と視覚にズレを生じさせるようなVR環境を用いた実験や、社会行動のような複雑な行動をVRの特定の刺激の組み合わせで再現するような実験を進めることで、現実感や社会性といった複雑な感覚や行動を、神経回路や遺伝子などの詳細なレベルで理解する研究へと発展させたい。



A: 本研究で用いた頭部固定マウス用VRシステム。B: 本研究で確立したVR行動課題。種々の手がかりと目印の配置された仮想直線路の俯瞰図(a)と、マウスの視点から見た仮想直線路(b)。C: 報酬地点を通過ただけで報酬が得られる非遅延課題と、報酬地点で一定時間とどまったときのみ報酬が得られる遅延課題。

## The role of region CA2 in Memory and Disease

(平成24年度～28年度)

公募班員 Thomas McHugh RIKEN Brain Science Institute

### 研究目的

The hippocampus is a crucial memory structure in both humans and rodents. It has been suggested that different aspects of memory processing are assigned to the anatomical subfields (CA1/CA2/CA3 /dentate gyrus (DG)); of the structure. The DG is implicated in distinguishing new and old contexts (pattern separation), owing to its properties of sparse activity, high cell number, and excitable adult-born neurons, whereas the highly plastic recurrent connections in CA3 are thought to contribute to rapid storage of new information in a manner that ensures accurate retrieval even when recall cues are incomplete or noisy (pattern completion). However *a role for the often ignored CA2 region has yet to be determined*. CA2, given its highly convergent spatial and sensory input from the cortex and memory driven input from CA3, may be well suited to integrate the degree of change in a context and guide behavior accordingly. Patient data suggests a loss of inhibition in this region is one of the most profound anatomical changes in the schizophrenic hippocampus. Thus, increases in CA2 activity may be directly related to both the cognitive dysfunction and the psychosis observed in patients

### 研究背景

Hippocampal CA2 pyramidal cells project locally into both the neighboring CA1 and CA3 subfields, leaving them well positioned to influence network physiology and information processing for memory and space. While recent work has suggested unique roles for CA2, including encoding position during immobility and generating ripple oscillations, an interventional examination of the integrative functions of these connections has yet to be reported. Here we demonstrate that CA2 recruits feed-forward inhibition in CA3 and chronic genetically-engineered shutdown of CA2 pyramidal cell synaptic transmission consequently results in increased excitability of the recurrent CA3 network. In behaving mice this led to spatially-triggered episodes of network-wide hyperexcitability during exploration, accompanied by the emergence of high frequency discharges during rest. These findings reveal CA2 as a regulator of network processing in hippocampus and suggest CA2 mediated inhibition in CA3 plays a key role in establishing the dynamic excitatory/inhibitory balance required for proper network function.

### 研究結果

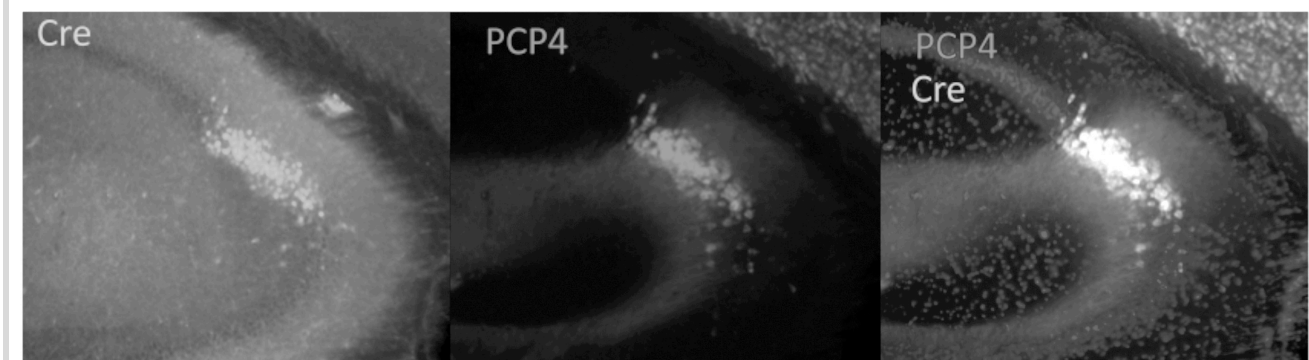
We found that a chronic loss of CA2 output leads to increases in excitability in the recurrent CA3 network and more surprisingly, a novel pathophysiology that manifests as hippocampal network hyperexcitability, both during exploration and rest. While our *in vitro* data suggest that the mechanism underlying these phenotypes is a loss of CA2 PCs driven FFI in CA3, it is important to note that *in vitro* stimulation protocols do not replicate *in vivo* circuit function and may overestimate this process. However, we feel that our ability to detect FFI even at weak stimulation intensities coupled with our *in vivo* data implicating increased CA3 circuit excitability as the driver of the pathophysiology suggest that this inhibition plays a functional role in controlling hippocampal E/I balance. Further, we employed the Gi DREADD system to demonstrate that an acute partial inhibition of CA2 PC spiking led to an increase in the spatial concentration of pyramidal cell spiking during locomotion, implicating CA2 in preserving a distributed sparse code for place. These observations suggest CA2 output is necessary to establish the dynamic excitatory/inhibitory balance required for proper network function. One intriguing question is why the place-triggered hyperexcitability events observed in CA2-TetX mice reflect properties of individual place cells. In both the CA2-TetX and CA2-DREADD mice we observed a subtle but spatially organized shift in pyramidal cell spiking. In the chronic blockade model this increase directly preceded the onset of the increase in LFP power, suggesting a buildup of excitation to levels sufficient to trigger a suprathreshold population event as the underlying cause for the network-wide pathophysiology. Following acute blockade the increase



was less obvious, but also spatial in nature, with neurons with place fields shifting close to the peak of the ensemble activity increasing their firing while neurons distant from it decreased. These findings, combined with the increase in excitability we observed in the recurrent CA3 network, suggest one role of CA2-recruited inhibition in CA3 may be to modulate the sparsity and/or strength of CA3 recurrent attractor state networks. We speculate that the location of the build-up of excitation in a given context may be linked to a preexisting local maximum in the density of the representation that is reinforced in the absence of CA2-driven inhibition.

#### まとめ

Our data demonstrates profound effects of CA2 silencing on both the single neuron and network level, both ‘downstream’ in CA1 and ‘upstream’ in CA3. Moreover, we find a novel pathophysiology that manifests as spatially-triggered hyperexcitability. We believe our findings suggest a key role of CA2 transmission in the dynamic regulation of information flow in the hippocampal circuit.



The *Cacng5*-Cre transgenic mouse allows genetic access to the pyramidal cells specifically in the CA2 region of the hippocampus.

ドーパミンシグナルを介した精神疾患病態に関するマイクロエンドフェノタイプの解明（平成25年度～26年度）

精神疾患病態におけるドーパミンシグナル関連マイクロエンドフェノタイプの解明（平成27年度～28年度）

公募班員 池田 和隆公益財団法人東京都医学総合研究所  
精神行動医学研究分野 依存性薬物プロジェクト

## 研究目的

ドーパミンは、主要な精神活動や運動を制御する極めて重要な脳内物質であり、ドーパミンシグナルの変調は精神疾患病態におけるマイクロエンドフェノタイプであると考えられる。ドーパミン欠乏マウスの解析は、ドーパミンシステムの機能解明において画期的な手法であるが、研究代表者らにより、従来の条件ではドーパミンが脳に残存していることおよび真に欠乏させるとマウスが多動になるという驚くべき実験結果が得られた。そこで、真のドーパミン欠乏マウスを解析することで、ドーパミンシグナル変調というマイクロエンドフェノタイプが精神活動に与える影響を解明することを目的とした。具体的には、ドーパミン欠乏時における以下の解明を目的とした。(1)異常行動に対する定型、非定型抗精神病薬の効果、(2)活動を制御する脳領域の同定、(3)発現変化する遺伝子群の同定、(4)異常行動を制御する脳内システムの同定。

## 研究背景

ドーパミンは、快情動、人格、注意など主要な精神活動や運動を制御する極めて重要な脳内物質である。ドーパミンシグナルの変調は精神疾患病態におけるマイクロエンドフェノタイプであると考えられる。

連携研究者の小林和人らとPalmiterらは、遺伝子組換え技術を駆使してそれぞれ独立にドーパミン欠乏マウスを作出し、このマウスが顕著な運動量低下を示すことを報告した。また、Palmiterらはこのマウスを用いることで、モルヒネの報酬効果がドーパミンシステムに依存しないことなど、ドーパミンシステムの生理的役割に関する研究報告を一流誌に数多く発表した。しかし、研究代表者らは、このマウスでは、L-ドーパ（ドーパミンの前駆体であり、このマウスの生存には継続的な投与が必要）の投与中止24時間後（Palmiterらの実験条件）では細胞外ドーパミン量が野生型マウスの2%ほどは残存していること、L-ドーパ投与中止72時間後では検出限界以下であること、また、72時間以降ではむしろ多動を示し、この多動は定型抗精神病薬であるハロペリドールを投与しても抑制されない（図1）という予想外の予備的実験結果を得ていた。そこで、真のドーパミン欠乏マウスを解析することで、ドーパミンシグナル変調というマイクロエンドフェノタイプが精神活動に与える影響を解明できると考え、本研究を着想した。

## 研究結果

ドーパミン欠乏マウスは、ドーパミンの前駆体であるL-DOPAを毎日投与することで長期間飼育することができた。3日間のL-DOPA断薬後に移所運動量試験を行った結果、ドーパミン欠乏マウスは初期には低活動であったが、30分間に徐々に行動量が増加し、その後測定した5時間は顕著な活動亢進を示した。定型抗精神病薬のハロペリドールを投与したところ、野生型マウスでは強い鎮静効果が現れたのに対して、ドーパミン欠乏マウスの活動量は亢進したままであった。一方、非定型抗精神病薬のクロザピンを投与したところ、野生型マウスと同様にドーパミン欠乏マウスにおいても移所運動量が顕著に低下した。クロザピンには多数の作用点が知られているが、それぞれの作用点に特異的な薬物を投与したところ、ムスカリニックアセチルコリン受容体作動薬がクロザピンと同様に移所運動量を低下させることが明らかとなった。次に、マイクロダイアリス分析により、線条体におけるアセチルコリンの細胞外

濃度を測定した。その結果、ドーパミン欠乏マウスは細胞外アセチルコリン量が有意に低下していることが明らかになった。さらに、ドーパミン欠乏マウスの脳を採取し、免疫組織化学解析、ウェスタンブロット解析、遺伝子発現解析を行ったところ、アセチルコリン合成酵素であるコリンアセチル転移酵素の遺伝子発現および蛋白質量が有意に低下していることが明らかになった。これらの結果より、ドーパミンが枯渇することによる異常行動にはアセチルコリンシステムが関与していることが分子レベルで明らかとなった。

最後に、ドーパミン欠乏マウスの活動量亢進時の神経活動を野生型マウスと比較し、解析した。c-fos発現を指標に検討したところ、ドーパミン欠乏マウスの線条体の一部領域および海馬CA1、CA3領域において、c-fos発現細胞数が多く、神経活動が過剰になっていることが認められた。

## まとめ

ドーパミン量が過剰になると、活動量の亢進や精神症状が現れ、抗精神病薬によってドーパミンシグナルが抑制されるとそれらの症状が改善する(図1A)。また、ドーパミン量が不足すると、活動量が低下してパーキンソン病(PD)の症状が現れ、L-DOPAなどによりドーパミン量を増加させるとそれらの症状が改善すると考えられてきた(図1A)。しかし、連携研究者の小林和人らが遺伝子組換え技術を駆使して作出したドーパミン欠乏マウスの活動量を評価したところ、ドーパミンがほぼ完全に欠乏した状態であるにもかかわらず、新奇環境曝露下での活動量がむしろ亢進することを見出した。そこで、この活動量亢進がどのような機序で引き起こされているのかを探るため、ドーパミン欠乏マウスの亢進した活動量を抑制する薬剤を探索した。定型抗精神病薬であるハロペリドールは無効だったのに対して、非定型抗精神病薬のクロザピンはドーパミン欠乏マウスの活動量を抑制した。つまり、ドーパミン量が極端に減少するとむしろ活動量が亢進し、この異常行動はハロペリドールでは抑制できず、クロザピンによって抑制された。

クロザピンの作用点は多数あるので、それぞれに特異的な薬剤の効果を調べたところ、ムスカリニック受容体作動薬のオキシトレモリンがドーパミン欠乏マウスの活動量を抑制した。さらに、マイクロダイアリス、遺伝子発現解析、免疫組織化学解析によって、ドーパミン欠乏マウスではアセチルコリンが低下していることが示された。これらの結果より、ドーパミン欠乏時に活動量が亢進するメカニズムとして、ムスカリニック受容体の活動低下が考えられた。最後に、ドーパミン欠乏マウスの活動量亢進時の神経活動を野生型マウスと比較し、解析したところ、ドーパミン欠乏マウスの線条体の一部領域および海馬CA1、CA3領域において、神経活動が過剰になっていることが認められた(論文執筆中)。これらの領域は、新奇刺激によって活性化されることが報告されており、今回の解析から、新奇刺激に対する脳領域の活性化はドーパミン非依存的であることが認められた。また、複数回曝露による馴化によってこれらの領域の活性化が低下することも報告されていることから、ドーパミン欠乏マウスの活動量亢進にはこれらの領域の過剰な活性化が関与する可能性が示唆された。これらより、ドーパミンはこれらの領域の活性化を抑制し、馴化による活動量の低下に関わる可能性があると考えられる。

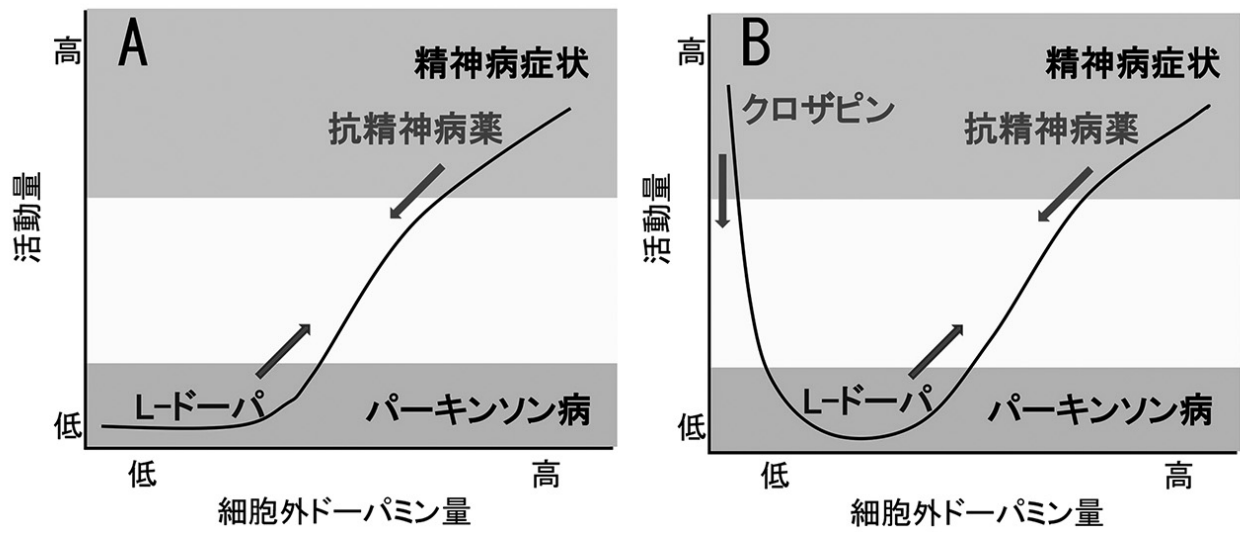


図1：細胞外ドーパミン量と活動量の関係および疾患と治療薬との関係の新旧モデル

(A) 従来考え方。(B) 新しい考え方。ドーパミン量が極端に不足すると、活動量が亢進して精神病症状が現れ、クロザピンによりそれらの症状が改善する。

# 微細な組織構築変化をマイクロエンドフェノタイプとする精神神経疾患の病態解明

(平成25年度～28年度)

公募班員 久保 健一郎 慶應義塾大学医学部・解剖学

## 研究目的

精神・神経疾患に罹患した患者の死後脳では微細な組織構築の乱れが報告されることがあり、その要因の一つとして、発生過程における神経細胞移動の障害が想定されている。このため、本研究では、神経細胞移動の障害が、どのように精神・神経疾患の病態に関与するのかを明らかにすることを目的に研究を進めた。我々は、かねてより、精神・神経疾患を引き起こす遺伝的要因が、神経細胞の移動障害が起こる可能性を示唆してきた。しかし、精神・神経疾患の発症には、遺伝的要因のみならず、環境要因の関与も重要であるとされる。このため、果たして環境要因によって神経細胞の移動障害が生じるのかを検証した。そして、これらの神経細胞の移動障害が、どのような病態に関わるのかを明らかにするために、人為的に神経細胞の移動障害を引き起こしたマウスを作成して、病態の理解を試みた。また、神経細胞の移動に関わる分子細胞メカニズムについても解析を行った。

## 研究背景

統合失調症や自閉スペクトラム症をはじめ、種々の精神・神経疾患が神経発達障害として捉えられるようになった。統合失調症や自閉スペクトラム症に罹患した患者の死後脳では微細な組織構築の乱れが報告されることがあり、発生過程における要因に起因してそれらの構造変化が起こることが想定されている。特に、大脳新皮質の白質に存在する神経細胞数の増加は、統合失調症で再現性よく観察される所見の一つであるとされる。より発達神経障害としての色彩が強い疾患ともいえる、自閉スペクトラム症でも、近年、白質内の神経細胞数の増加が報告されている。

この白質内の神経細胞数の増加がどのような要因によって生じるのかについては諸説あるが、古くからある説の一つは、神経細胞の移動が障害された結果、白質内の細胞数が増加するという説である。しかし、この白質内の神経細胞数の増加が、実際に神経細胞移動の障害の結果によって生じるのか、また、それが病態にどのように関与するのかについては不明である。

## 研究結果

### 環境要因による神経細胞移動と脳機能への影響の解明

精神・神経疾患を引き起こす遺伝的要因のみならず、環境要因によっても、脳に神経細胞移動の障害が生じることを明らかにした。特に、代表的な環境要因である発達段階の虚血が、神経細胞移動の障害に起因する脳の微細な組織構築の変化を生じ、その後の認知機能障害を引き起こすことを見いだした。

ヒトで発達段階の虚血に関わる病態の一つとして、妊娠週数28週未満に生まれる超早産児の脳虚血が挙げられるが、超早産児が虚血を経験する時期の脳において、神経細胞の移動が続いているのかどうかは不明であった。そのため、まず、ヒト胎児の脳の組織切片を用いた解析を行った。その結果、超早産児が生まれる時期である（超早産児が超虚血を経験する時期でもある）妊娠22週以降においても、大脳皮質の神経細胞移動が続いていると考えられた。さらに、虚血性の脳障害を合併した超早産児の脳の標本を調べると、多くの神経細胞が移動経路の途中である白質内に留まっている所見が観察された。

そこで、神経細胞の移動度が、ヒトの妊娠週数25週程度に相当する時期のマウス胎仔に虚血操作を加え、マウス子宮内電気穿孔法を用いて神経細胞の移動を観察した。すると、実際に、虚血によって神経細胞の移動が遅れ、白質内にとどまる神経細胞数が増加した。また、灰白質まで移動した神経細胞についても、最終配置に微細な変化が生じていた。このような胎児期に虚血を経験したマウスには、成育したのちに、認知機能障害が生じた。この時、マウス子宮内電気穿孔法を用いて、ラベルされた神経から伸びる軸索を観察すると、形成される回路にも変化が生じていた。

## 白質内の神経細胞が脳機能に及ぼす影響の解明

脳の発生段階における神経細胞の移動障害と、その結果として生じる白質内の神経細胞数の増加が引き起こす病態を明らかにするために、これまでの知見等をもとに、人為的に白質内の神経細胞数の増加を引き起こすことを試みて、白質内の神経細胞の異所性凝集塊である、ヘテロトピア (heterotopia) を作成した。

大脳皮質の表層 (II/III層) に位置する神経細胞は、反対側の大脳半球へと軸索を伸ばし、皮質と皮質の間の結合を担うが、ヘテロトピアが存在すると、軸索の伸長が、ヘテロトピアまで届いた所で止まってしまい、本来の、反対側の大脳皮質の表層へ伸びる軸索が大きく減少していた。行動の特徴を調べると、ヘテロトピアを持っているマウスでは、前頭葉機能が低下していた。電気生理学的計測を行ったところ、前頭葉の神経活動に変化が生じていた。

さらに、DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drug) システムを活用した神経細胞の活動調節を行った。その際のマウスの行動を調べてみると、ヘテロトピアを含む脳の領域にある神経細胞の活動を活性化した場合に、低下した前頭葉の活動が回復した。これら結果から、本来の位置と異なる場所に形成された白質内の神経細胞は、これまで想定されていなかったような脳の離れた場所の活動に影響を与え、症状を引き起こす可能性があることが明らかになった。

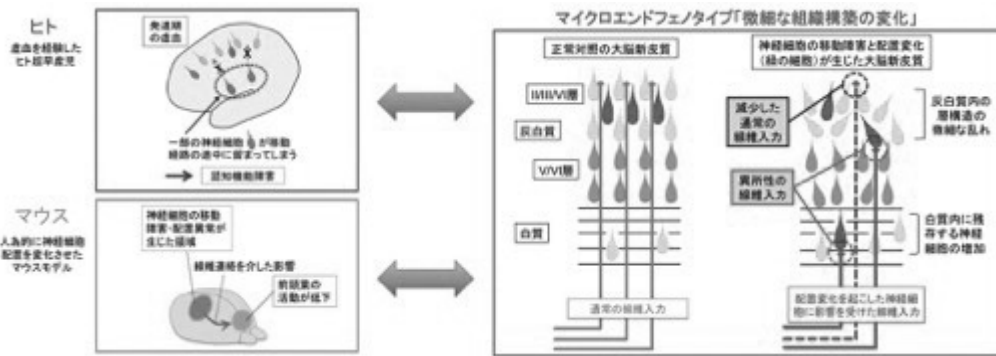
## 神経細胞移動の分子細胞メカニズムの解明

このように、神経細胞移動の障害とそれによって生じる細胞配置の変化は、精神・神経疾患のマイクロエンドフェノタイプの候補の一つと考えられた。このため、本研究では、神経細胞の移動に関わる分子メカニズムについても明らかにした。また、神経細胞の移動の細胞メカニズムとして、これまで不明であった、海馬における神経細胞の移動様式を解析したところ、新規の移動様式を見出したため、「クラッキング様式」と命名して報告した。

## **まとめ**

今回の研究によって、精神・神経疾患を引き起こす遺伝要因のみならず、環境要因によっても神経細胞の移動障害が起こり、その結果として生じる神経細胞配置の変化が脳機能に影響を及ぼすことが明らかになった。また、マウスにおいて人為的に神経細胞配置を変化させたところ、回路形成に変化が生じ、神経細胞配置が変化した部位から遠く離れた、前頭前皮質に影響を与えて動物行動の異常が生じることを見出した。この結果からは、これまでに想定されていなかった、神経細胞配置の変化がもたらす脳機能への広範な影響が示唆され、従来は大脳皮質の形成障害に付随的に生じたに過ぎないと捉えられていた神経細胞配置の変化が、むしろ積極的に精神・神経疾患の病態に関与している可能性も出てきた。

このように、神経細胞移動の障害とそれによって生じる微細な組織構築の変化は、精神・神経疾患のマイクロエンドフェノタイプの候補の一つと考えられた。今後、マウスとヒトの知見を照らし合わせながら、微細な組織構築の変化がどのように精神・神経疾患の病態に関与しているのかを明らかにしていきたい。



代表的環境要因の一つである発達期の脳虚血が神経細胞の移動を障害し、マイクロエンドフェノタイプの候補の一つである脳の微細な組織構築変化（神経細胞配置および回路形成における変化）を生じることを明らかにした。また、神経細胞の移動障害・配置変化を人為的に引き起こしたマウスモデルを作成して解析を行うと、マウスの前頭葉機能に影響が生じた。

## 精神病態脳における大規模2光子解析法の開発

(平成27年度～28年度)

公募班員 喜多村 和郎 山梨大学

### 研究目的

精神疾患は、シナプスの機能破綻が神経回路形成や機能異常を引き起こすことが原因であると考えられているが、現状で生きた脳、特に覚醒行動中のシナプス機能を評価できる技術は確立されていない。そこで、本研究では、高速3次元で広範囲の神経細胞およびシナプスの活動を捉えることのできる2光子イメージング法を確立することを目的とした。

### 研究背景

現在、動物個体の脳において深部からの細胞及びシナプスの活動を観察できる方法は2光子顕微鏡において他にはない。最近では、共振ミラーなどを用いた高速走査によって神経活動をリアルタイム(30Hz)で捉えることが可能となっているが、一般的には同時に観察できるのは1つの観察平面内(厚み数マイクロメートル)であり、3次元の脳組織中に分布する細胞やシナプスの活動を同時に観察することは難しい。ピエゾを用いた焦点走査によって3~4Hzの速度で体積走査することは可能であるが、すべての活動を正確に捉えるためには、より高速・高感度の3次元イメージングが必要不可欠である。また、通常の2光子顕微鏡では高い開口数を持つ対物レンズを用いる必要があり、用いる対物レンズの倍率が制限されることから視野が0.5mm四方程度に限られていた。本研究ではこれらの制限を克服してより多数の神経細胞やシナプスからの活動を観察できる顕微鏡法を確立することを目指した。

### 研究結果

まず、高速3次元で神経細胞及びシナプスの活動を捉えることのできる2光子イメージング法を確立した。具体的には、共振ミラーを用いた100Hzの平面走査とピエゾによる焦点走査を組み合わせた顕微鏡を用い、制御プログラムを最適化することによって、128×128ピクセルの解像度で、500 $\mu$ m×500 $\mu$ m×150 $\mu$ mの体積をz方向に10平面、8Hzの速度で観察できる2光子顕微鏡システムを構築した(左図)。観察例として、小脳プルキンエ細胞にGCaMP6fを発現させたマウスにおけるカルシウムイメージングを行った結果、脳表面近くの樹状突起から深さ約150 $\mu$ mのプルキンエ細胞層までの10平面をおよそ8Hzでカルシウムイメージングによる活動観察が可能なが確認できた。さらに、覚醒行動中のイメージングで問題となる揺れ補正について、時間的に連続する2つの画像間の2次元相関を用いて補正する方法を確立し、100Hzのサンプリング速度で平面内の揺れについてはほぼ完全に補正できることを確認した。また、カルシウムイメージングの解析に必須である関心領域(ROI)の抽出について、ピクセル輝度値の相互相関を求めることによる自動抽出法を実現した。これら、高速な体積走査で取得される大容量画像解析の半自動化によりデータ解析の効率化に成功した。計算時間の点では、まだ改善の余地が残されているため、最新の画像解析手法などを取り入れることで更なる改良を進めていく。

ピエゾによる焦点走査では、最大でも10平面で8Hzの走査しか実現できないために、特にスパイネイメージングでは取りこぼしが多い。さらに高速かつ高密度の観察手法の開発に取り組んだ。平面走査については共振ミラーを用いれば最大で100Hzの走査が可能であるため、焦点走査の高速化を目指して、超音波変調レンズ(TAGレンズ)を導入した。超音波レンズとは、音響光学素子の一つで超音波を与えて屈折率の勾配を作ることができるものであり、与える周波数によって屈折力を超高速(最大500kHz)で変化させることができる。TAGレンズを顕微鏡光学系に組み込み、2光子顕微鏡の平面走査の各ピクセルの滞在時間内に高速で焦点走査するシステムを構築した。この方法を用いることで、通常の2光子顕微鏡のZ方向の励起距離である数ミクロンを数十倍に拡大して50~100 $\mu$ m程度まで拡張できることを確



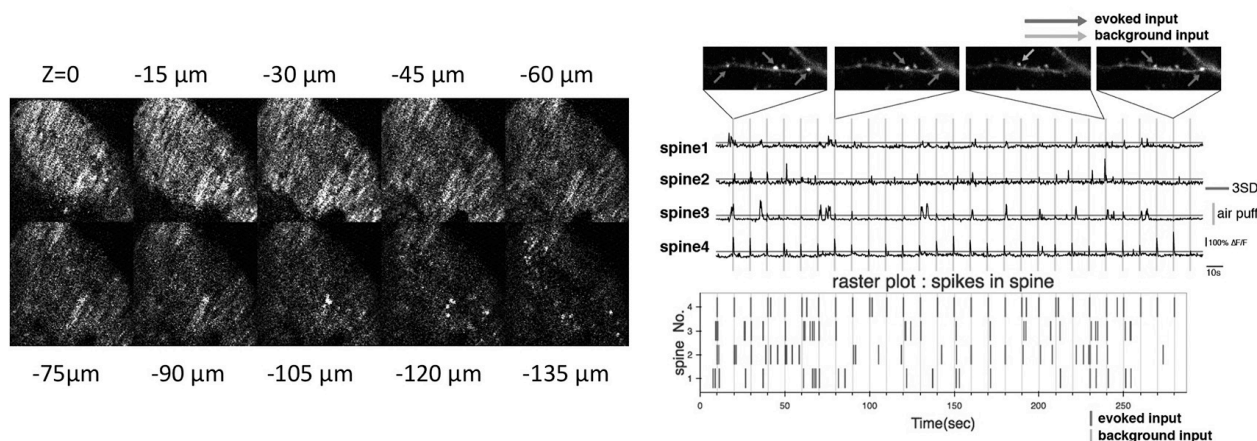
認した。これを用い、大脳皮質錐体細胞樹状突起イメージングを行った。TAGレンズOFFの状態では通常の励起体積のため、深さ方向に2~3  $\mu\text{m}$ の厚みにある部分しか観察できないが、TAGレンズを用いることでより多くの樹状突起が可視化できることを確認した。現在はZ方向に拡張された点分布関数 (PSF) によるイメージングを行っているため100  $\mu\text{m}$ の厚み内に存在する樹状突起の2次元投影像として画像取得をしているが、今後、深さ方向の情報を分離することで完全な高速3次元イメージングが可能なシステムを構築する。これらの改良により、これまで同時に観察できるスパインは最大でも30個程度であったものを10倍程度まで拡張することが可能であると期待される。

広範囲の2光子イメージングについては、現在盛んに新しい方法の開発が進められているが、いずれも独自の光学系で特注の対物レンズ等が必要とされており、市販されているものは非常に高額であるし、独自のシステムは顕微鏡の専門家でなければ利用することが難しい。そこで、一般的な通常の2光子顕微鏡を用いて、もう少し簡便に広範囲の観察が可能かどうかを検討した。市販されている低倍率の対物レンズ ( $\times 10$ ) を用いることで、約1mm四方の視野で単一細胞の活動観察が可能であることを確認した。より低倍率 ( $\times 4$ ) の対物レンズを用いた場合は、さらに広範囲 (約3mm四方) の観察が可能であったが現在のところ単一細胞の解像度を得るためには観察速度を下げる必要がありさらなる最適化が必要であると考えられた。

また、覚醒マウスの大脳皮質体性感覚野第2 / 3層錐体細胞におけるスパイン活動の解析を行った (右図)。これまで覚醒時のスパイン活動観察の報告はあまりないが、手術や固定法などを工夫することで揺れの問題は実用可能な程度まで改善できることがわかった。安静時およびヒゲ刺激時に活動するスパインの分布を調べたところ、以前麻酔下で報告した (Takahashi *et al.*, *Science*, 2012) のと同様に、近傍に位置するスパインが同期した入力を受ける確率が高くなっていることがわかった。さらに、麻酔下ではあまり観察されない、樹状突起におけるカルシウム上昇が覚醒時には観察された。現在、これらの樹状突起活動が樹状突起スパイク (文献1) のような活動を示しているのか、感覚入力との相関があるのかなどについてより定量的な解析を行っているところである。

## まとめ

本研究では、より広範囲を高速に観察することのできる2光子顕微鏡システムの開発と改良を行った。その結果、従来の方と比べて10倍程度、高速かつ広範囲に神経細胞やスパインを同時に観察することが可能となった。今後は、さらにシステムの最適化を施すことでより高解像度な観察を目指したい。また、高速・広範囲の観察に伴って得られる大量データの圧縮および解析方法の確立が必須となってくるが、逆に解析方法に適した観察方法の改良も必要になってくると考えられる。今後、これらの方法を用いて、まず正常脳において知覚や運動のみならず、判断や高次機能の神経回路および樹状突起メカニズム (文献1) を明らかにするとともに、精神病態モデル脳においてこれらの活動が行動異常とどのように結びついているのかを明らかにすることへと発展させていきたい。



(左) 小脳プルキンエ細胞にカルシウムセンサーGCaMP6fを発現させ、 $15\mu\text{m}$ ごとに10平面のvolume scanningを行った。(右) 覚醒マウスにおける大脳皮質体性感覚野第2/3層錐体細胞樹状突起のカルシウムイメージング。覚醒状態において安静時および感覚刺激時のスパインの活動を安定して観察することが可能。

## 高精細全脳イメージングによるマイクロ精神病態の探索

(平成27年度～28年度)

公募班員 橋本 均 大阪大学大学院薬学研究科 教授

### 研究目的

認知・精神活動や運動の調節など、様々な機能を制御する脳は、多数（マウス脳は約1億個、ヒト脳では約1000億個）の細胞（神経細胞やグリア細胞と呼ばれる細胞）で構成され、領域や神経回路毎に異なる機能が担われている。そのため、脳疾患の解明のためには、全脳細胞の形態・機能を捉え、仮説を設定することなく、その中に潜む症状と相関する変化を見出し、それを手掛かりに病態と治療機序の究明を目指す研究が必要である。

本研究の目的は、疾患モデル動物における脳細胞の形態・機能変化およびそれらと疾患モデルの表現型との関連を全脳レベルで解析して、新たなマイクロエンドフェノタイプを明らかにすることである。

### 研究背景

精神疾患は、複雑な遺伝子と環境因子の相互作用が脆弱性や発症に関わると考えられているが、ヒト病態脳組織へのアクセスの困難さなどから、その分子病態の理解は進んでいない。我々はこれまでに、例えば、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)遺伝子欠損マウスの表現型や薬物応答性が、統合失調症などのヒト精神疾患と類似する有用な動物モデルであることなどを示してきた。しかしこれまでは技術的な限界があり、限られた脳部位に解析の対象を絞った中間表現型解析しか行えなかった。

そこで我々は最近、マウスの全脳細胞をサブミクロンの高精細でイメージングするシステム(FAST, block-face serial microscopy tomographyと命名)を開発し、正常脳と病態脳の全細胞レベルの比較をノンバイアスに行うための画像解析システムの構築に取り組んでいる。

本研究では、高精細な全脳イメージング法FASTの改良と、妥当性が高い疾患モデルマウスの全ての脳細胞の分布、神経活動等をメゾスコピックに解析し、これまで検討されてこなかったマイクロ精神病態を探索した。

### 研究結果

FASTは、脳組織の表面付近を、平面分解能1ミクロン以下、深さ方向5ミクロンで撮影したのち、その一部をマイクロサイラーで切断・除去し、再び撮影することを繰り返して全体を撮影する連続切断法と、高速な撮影が可能なスピニングディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いており、各部の構成やセッティングを精査して、マウス脳を2.4時間で撮影することが可能になった。この解像度では、従来よりも数十倍高速であり、その速さを活かして多数の脳を撮影し、正常なマウスと疾患モデル動物の脳構造を比較することも可能になった。また、全ての細胞の核(Hoechst33258染色)、脳血管(蛍光標識tomatolectin染色)や血管作用性腸管ポリペプチド(VIP)発現介在神経細胞(VIP::tdTomatoマウス)の分布情報を取得することに成功した<sup>5)</sup>。さらに、慶應義塾大学医学部 田中謙二先生との当該領域内共同研究によりオリゴデンドロサイト特異的に蛍光標識するマウスを用いて、オリゴデンドロサイトの分布や形態情報を所得することに成功した(図B)。機能変化を捉えるため、神経活動により転写される最初期遺伝子であるArc 遺伝子のプロモーター制御下に不安定化蛍光蛋白質dVenusを発現するArc-dVenusマウスを用い、全脳領域から活性化した神経細胞の細胞体や繊維構造を捉えることにも成功した。

単一細胞を識別する空間解像度を維持したまま高速化したことにより、非ヒト霊長類コモンマーモセットの全脳(京都大学霊長類研究所 高田昌彦先生、井上謙一先生との共同研究)や、ヒトの脳(死後脳)を高精細にイメージングすることも可能になった。さらに、福島県立医科大学 矢部博興先生、國井泰人先生らとの領域内共同研究により、ヒト死後脳組織片(視覚野)を核染色し、過去最大の自動での高精細イメージングにも成功した。

次に、統合失調症のマウスモデルとして考えられるNMDA受容体阻害薬MK-801投与マウスのマイクロ精神病態の探索を実施した。単一細胞レベルの脳活動マップを作製し、仮説なしに正常マウスと疾患モデルマウスの神経活動パターンを網羅的に比較した。その結果、これまでに着目されてこなかった内側眼窩前頭皮質が活性化していることを見出した。一方で、MK-801投与マウスと同様に多動を示すメタンフェタミン投与マウスの脳では、内側眼窩前頭皮質の活性化はみられなかった。また、内側眼窩前頭皮質を化学的に損傷すると、MK-801により誘発される行動異常が一部抑制されることがわかった。さらに、定型抗精神病薬ハロペリドールは内側眼窩前頭皮質の活性化を抑制しないが、非定型抗精神病薬クロザピンは、MK-801による内側眼窩前頭皮質の活性化を抑制することがわかった。

## まとめ

今回、高精細な全脳解析システムFASTを高速化し、精神疾患の創薬への橋渡し研究に必須な非ヒト霊長類の全脳やヒト死後脳の大規模高精細イメージングを達成した。さらに、統合失調症モデルマウスの脳全体での神経活動を細胞単位で解析し、その特徴的な神経活動パターンを明らかにした。特に、これまで疾患との関連が知られていない内側眼窩前頭皮質の活性化は、統合失調症の新たなマイクロ精神病態となりうるものである。

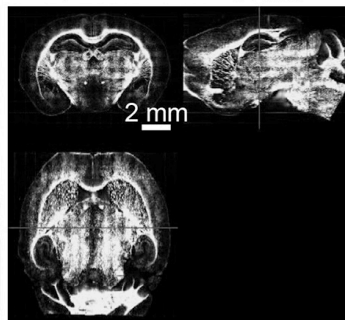
今後、FASTを用いた様々なモデル動物やヒト死後脳の解析を実施し、ヒト精神疾患病態および治療効果の作用機序の解明に貢献することが期待される。

### A FAST システムの全景

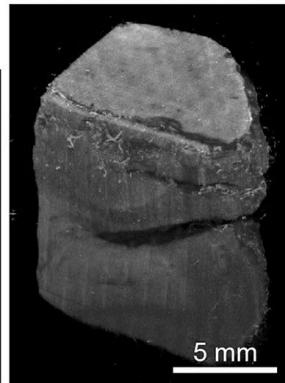


### B 全脳イメージングの例

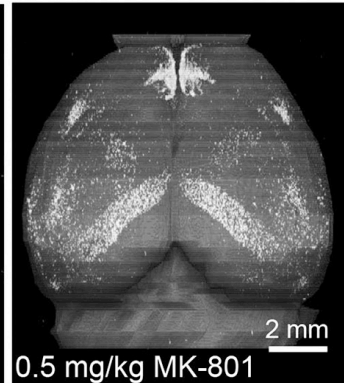
オリゴデンドロサイト全脳イメージ  
(PLP::ChR2-EYFP マウス脳)



### C ヒト死後脳組織への応用



### D MK-801 による活動変化



- A. イメージングシステムFAST の全景。スピニングディスク方式の共焦点顕微鏡、マイクロスライサー、自動ステージを連動させ、脳組織切片画像を連続して撮影する装置を開発した。
- B. 全脳イメージングによるオリゴデンドロサイトの脳内分布の可視化。オリゴデンドロサイトが蛍光標識されるPLP::ChR2-EYFP マウスの脳(慶應義塾大学医学部、田中謙二先生との共同研究)をFASTにより撮影し、三次元再構築後の冠状面、矢状面、横断面を示した。
- C. ヒト死後脳組織の三次元イメージング結果。視覚野の一部(福島県立医科大学、矢部博興先生、國井泰人先生らとの共同研究)を核染色し、FASTにより撮影した。高速化により、従来よりもサイズの大きい死後脳組織片を自動イメージングすることが可能になった。
- D. 活性化した神経細胞を蛍光標識できるArc-dVenus マウスを用いて、統合失調症モデルと考えられているNMDA 受容体拮抗薬MK-801 投与マウスを解析した結果、眼窩前頭皮質に顕著な活動の亢進が認められた。

## グリア細胞からみる精神疾患

(平成24年度～28年度)

公募班員 和氣 弘明 神戸大学 大学院医学研究科 システム生理学分野

### 研究目的

複雑に多様化する現代社会において、情動・認知といった高次脳機能に障害を呈する精神・神経疾患の病態解明、治療法の開発が早急に求められている。私たちはこれまで中枢神経系の免疫細胞であるミクログリアに着目し、研究を行ってきた。近年、精神疾患の病態における中枢神経系の免疫異常が着目されている。私たちはそのため、炎症などに応じてその制御機構が破綻した結果としての精神疾患を考えるに至った。そこで本研究では炎症によってミクログリアが変化し、シナプスの空間的活動制御機構が失われ、また髄鞘化による神経伝導速度の調節が破綻することで、個々のシナプスまたは神経細胞の発達・学習過程に伴う適切な可塑的变化が阻害されると考え、その結果学習行動異常、認知機能異常、また感覚情報処理の異常が起こるメカニズムをグリア細胞の生理機能を明らかにすることで解くことを目的とする。

### 研究背景

精神・神経疾患は神経回路の異常を主因とし、神経回路の恒常性を維持するメカニズムを考えることは非常に意義深い。これまでの精神疾患の研究はその遺伝子異常、個々の神経細胞の性質の変化、行動異常に主眼が置かれてきた。しかしながらその神経回路の特性の異常と行動異常を関連づけて詳細に検討した研究はほとんどない。申請者はこれまでグリア細胞であるミクログリア、オリゴデンドロサイトに着目し、グリア細胞がどのように神経回路の恒常性を維持しているかを解明してきた(図1)。以下に要点を示す。まず申請者は生きた動物に対する2光子顕微鏡に適応する技術開発をオリンパスとの共同研究で行い、2008年に世界に先駆けて大脳皮質深部1mmからのイメージングに成功している。この技術を用いて中枢神経唯一の免疫担当細胞であるミクログリアとシナプスの機能相関についての研究を行った。これまでミクログリアはその活性化型と疾患について着目して研究が行われてきた。仮に、疾患発症の結果、なんらかのシグナルによってミクログリアが活性化するのであれば、それは疾患への二次的な関与と考えられるが、ミクログリアの生理的な機能の破綻が原因となってその疾患が起こるのであれば、それはミクログリアの一次的な疾患への関与と捉えることができる。その意味でミクログリアの生理的な機能を調べることは非常に有意義である。これはミクログリアの疾患に対する二次的な関与ではなく、その生理的な機能の破綻から疾患を考え一時的な関与を持つという新しい提案である。これまで申請者はミクログリアがその生理的な状態でシナプスを監視し、可塑性の高い領域ではシナプスの除去にかかわることを示した(Wake *et al.*, *J. Neurosci*, 2009)。この研究では神経回路の恒常性をミクログリアが監視することを見出し、神経回路の恒常性の破綻という視点から発達障害、精神・神経疾患を考えるようになった(Wake *et al.*, *Trends in Neurosci*, 2013)

### 研究結果

これまでヒトのPETを用いた研究で、統合失調症初期において、ミクログリアの活性化が認められることが明らかになっている。そこで本研究ではまずミクログリアの発達期における生理的な機能の異常が20代における統合失調症などの発症に寄与するのではないかと考え、まずミクログリアの生理機能を明らかにすることを試みた。私たちは特にこれまでシナプスとミクログリアに着目して研究を行ってきたため、特に発達早期におけるこれらの関係に着目した。ミクログリアは発達期において大きく形態を変化させることが知られている。そこでこれらの変化を検証するために、まずミクログリアの発達における変化をIba-1 mRNAの発現を検証したところ、p 8-11ではその後の週齢よりも特異的に上昇しているこ

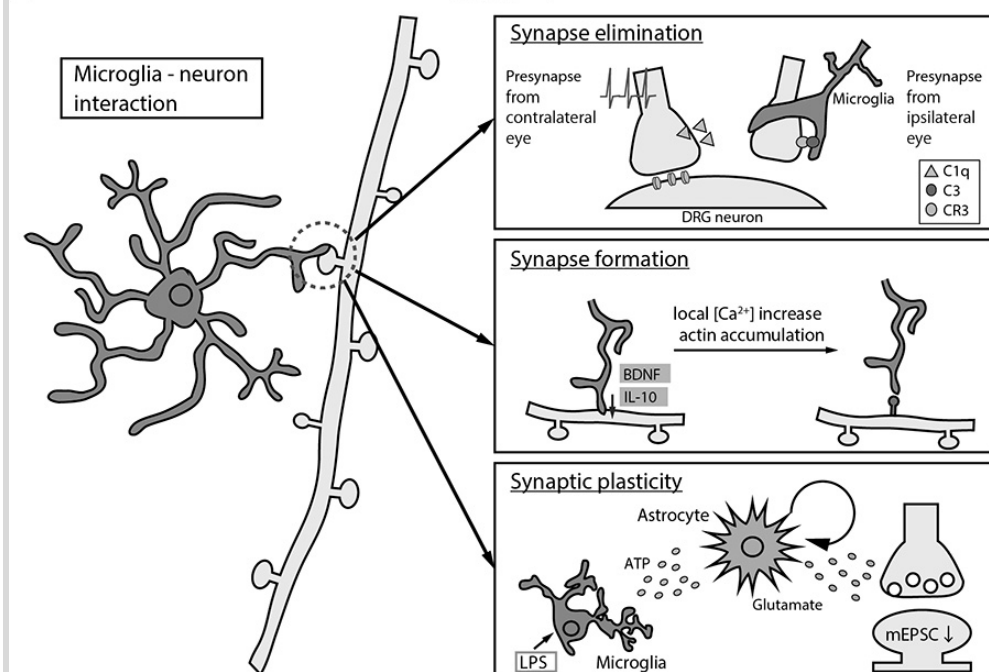
とがわかった。そこでミクログリア特異的に緑色蛍光タンパク質を発現するマウス (Iba1-GFPマウス) の神経細胞に子宮内電気穿孔法で赤色蛍光タンパク質を発現させ、p 8-11の発達早期において、ミクログリアの神経細胞に対する作用を生体で2光子顕微鏡を用いて可視化した。その結果ミクログリアは樹状突起に接触することで、特異的にシナプス形成を促進していることが明らかとなった。これはその後の週齢では観察できないことからp 8-11特異的であることが明らかとなった。さらにそのメカニズムとしてミクログリアが樹状突起に接触することで、樹状突起内のカルシウム上昇を引き起こし、アクチンの重合を促進することで引き起こされることがわかった。さらに、ミクログリアをp 8-11で特異的に除去したマウスにおいては、成熟期のスパインの密度が減少し、電気生理学的に検証される機能的スパインの減少も認めたことから成熟機能的スパインの形成にも寄与することが明らかとなった。さらにミクログリアを除去したマウスにおいては、大脳皮質4層から2/3層の機能的結合を減少することから、特定の神経回路の機能的結合にも寄与していることがあきらかとなった (Miyamoto *et al.*, *Nature Commun.*, 2016)。

さらにミクログリアは神経細胞の過興奮を起こすような病態(てんかんや統合失調症)などにおいてもその神経細胞に保護的に働くメカニズムを明らかにした (Kato *et al.*, *eNeuro*, 2016)。

### まとめ

これまでミクログリアが経験依存的に起こるシナプス除去過程にシナプスを貪食することで関わるということが明らかにされている。本知見を合わせることでミクログリアは発達期において厳密にシナプス数を制御し、この生理機能が損なわれることで発達障害・精神疾患に関わることを示唆される。今後成熟期におけるミクログリアの生理機能及び病態時の変化を明らかにすることでミクログリアの階層的な生理機能から病態の発症を検証することが可能となり、ミクログリアを治療標的とした治療法が開発されることを期待する。

図1. ミクログリアによるシナプス機能修飾



ミクログリアは発達早期にシナプスの形成を促進し、それによって特定の神経回路形成に作用する。さらにシナプス除去過程にシナプスを貪食することで寄与し、シナプスの可塑的変化の誘導にも関与する

## 各種精神疾患のde novo発症に共通に関連する遺伝子の機能解析と病態解明

(平成27年度～28年度)

公募班員 星野 幹雄 国立精神神経医療研究センター 部長

### 研究目的

AUTS2遺伝子は、そのde novo変異によって、統合失調症、自閉症スペクトラム障害(ASD)、うつ病、薬物依存、てんかんなどの、様々な精神疾患を惹起するとされている。しかし、この遺伝子の異常がいかにして多様な精神疾患・精神障害を引き起こすのかは未だに不明である。我々は、AUTS2遺伝子の破壊のされ方の違いによって、脳発達異常の種類と重篤度が異なり、結果として異なる種類の疾患が惹起されるのではないかという仮説を立てた。本研究では、AUTS2ゲノムに異なる変異を持つマウスを作成し、それを解析することによって、この仮説について検証を試みた。

### 研究背景

ヒト**Autism Susceptibility Candidate 2 (AUTS2)** 遺伝子は、当初、ASD、てんかん、ID、ADHDなどの精神症状を示す患者で、相互転座、DNA欠失および付加、などの異常が報告されていたが (Trends in Genetics, 29, 600-, 2013)、さらに最近では統合失調症患者においても様々な変異が見つかった (Molecular Psychiatry 19, 652-658, 2014)。特筆すべきことには、ほとんどすべてがde novo変異であり、ヘテロ接合体発症である。しかも、ヒトAUTS2遺伝子が極めて大きいゲノム構造を持ち(～1.2Mb)、変異の入りやすい極めて脆弱な領域に存在する (Science 316, 445-449, 2007)。これらのことから、AUTS2におけるde novo変異は、特定の種類の精神疾患というよりも、**統合失調症やASDを含む精神疾患に広く関係する**と考えられている。しかしながら、AUTS2は発生途上～成体の大脳、海馬などの神経細胞に広く発現するが、その分子機能や生理機能は全く不明である。それ故に、AUTS2の異常による精神疾患の病態の解明も全く進んでいない。ただいくつかの状況証拠から、AUTS2分子は核で機能すると広く信じられていた。

我々は、核で働くという先入観を排して、AUTS2が細胞質蛋白質として機能すること、そしてRhoファミリーG蛋白質であるRac1を活性化し、Cdc42を不活性化することによって、アクチン細胞骨格系を制御することを明らかにした。また、ノックアウト(KO)マウスを新たに作製し解析し、この分子が神経細胞移動や神経突起伸長に関与することを明らかにした。しかし、シナプス形成に関与するのかなど、研究開始当初の時点で不明な点は多かった。

さらに、米国のグループが、AUTS2が核内においてPolycomb Complex2の構成因子の一つとして作用し、さまざまな遺伝子の発現を調節している可能性を示しており、ますますこの遺伝子の持つ機能の多様性が示された。この遺伝子は複数の分子機能を持つことから、この遺伝子の破壊のされ方によって、分子機能の部分的欠損などが生じ、それによってさまざまな種類の精神疾患が惹起されるのではないかという可能性が示唆されていた。

### 研究結果

AUTS2には、Full-length isoformとshort isoformの二つのアイソフォームがある。Full-length isoformには細胞骨格制御活性、転写制御活性があるが、このshort isoformの機能は未だに不明である。我々は、ES細胞を用いて、タイプAおよびタイプBの遺伝子改変マウスを作成した。タイプAアレルは二種類のアイソフォームの両者の発現を失うものであり、タイプBアレルはFull-length isoformの発現は失うが、short isoformの発現はむしろ増大する、というものであった。両アレルともホモ接合体で生後致死であること、そしてヒト疾患のほとんどはヘテロ接合体発症であることから、我々はタイプAおよびタイプBのヘテロ接合体マウスを用いて、行動解析した(表)。

運動能力を見るLocomotor activity testでは、タイプAヘテロ変異マウスでは活動量が大きく低下す



るのに対して、タイプBについては活動初期のみ低下が観察された。Open Field Testでは、中心部への滞在時間がタイプAでは増加したが（不安の低下）、その表現型はタイプBでは認められなかった。

Elevated Plus Maze Test（高架式十字迷路）では、タイプA変異マウスではOpen arm time, Open arm entryの両者で増加が認められたが（不安の低下）、タイプBでは後者のみで増加が認められた。一方で3チャンバー式社会性行動実験では、タイプAでは異常が見られなかったが、タイプBでは

Sociability, Social Noveltyの二項目共に異常が認められた。Novel Object Recognition Testでは、タイプA、タイプB共に記憶力の低下が認められたが、Fear Conditioning Testでは音依存性の記憶がタイプA変異マウスのみで認められた。Prepulse Inhibition Testは、タイプBのみに異常が認められた。また、聴覚および痛覚については、タイプAおよびタイプBの両者で、知覚過敏が観察された。

## まとめ

本研究において、AUTS2遺伝子の壊れ方の違う二種類のマウス系統で、異なる種類の行動異常が検出された。AUTS2は1.2MBにもおよぶ長大な遺伝子であり、しかもde novoに変異が入りやすいゲノム領域であることが知られている。ここに様々な種類の変異（欠失、転座、重複、塩基置換等）が入ることで、遺伝子発現の時期、領域、あるいは発現アイソフォームの種類などが変化し、神経回路形成に異常を来し、その異常の度合いと種類によって、多様な重篤度の多種類の精神疾患が惹起されるのではないかと考えられた。今回の研究結果は、この仮説に対する一つの状況証拠を提示している。現在は、ヒトのASD型および統合失調症型のゲノム変異を再現したマウス系統の作成中であり、近い将来、その系統を使って行動解析および脳の形態・機能解析を行いたいと考えている。

## AUTS2変異マウスの行動解析

Behavioral test	Behavioral index	Type A (PLoSOne2015)	Type B (in preparation)
<b>Locomotor activity test</b>	Motor function	Decreased	No change (60 min) or decreased (first 15min)
<b>Open field test</b>	Anxiety-like behaviors		
Time spent in inner sector		Increased	No change
Distance traveled ratio		Increased	No change
Total distance traveled		Decreased	Decreased
<b>Elevated plus maze test</b>	Anxiety-like behaviors		
% Open arm time		Increased (p=0.11)	No change
% Open arm entry		Increased	Increased
Total arm time		Decreased (p=0.06)	No change
Total arm entry		No change	No change
<b>Social interaction (3 chamber)</b>	Social behaviors		
Sociability		No change	Decreased
Social novelty		No change	Decreased
<b>Novel object recognition test</b>	Memory		
Exploratory index		Decreased	Decreased
Total exploration time		No change	No change
<b>Fear conditioning test</b>	Memory		
Tone-dependent		Decreased	No change
Context-dependent		No change	No change
Nociceptive threshold	Sensitivity	Decreased	Decreased
<b>PPI test</b>	Sensorimotor gating		
PPI		No change	Decreased
Startle reflex at 120 dB		Increased	Increased



## 新規モデルマウスを用いた自閉症マイクロエンドフェノタイプの解明

(平成27年度～28年度)

公募班員 中山 敬一 九州大学生体防御医学研究所分子医科学分野

### 研究目的

近年、大規模な原因遺伝子探索がおこなわれクロマチンリモデリング因子 *Chromodomain Helicase DNA-binding 8 (CHD8)* が最も有力な自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder : ASD) の原因遺伝子候補として報告された。そこでわれわれはASD患者のCHD8変異を再現したモデルマウスを作製し行動解析をおこなったところ、予想通り自閉症様の行動異常が観察された。本研究ではこのCHD8変異マウスをASDモデルとして用い、ASDの発症メカニズムを解明する。クロマチンリモデリング因子であるCHD8の変異は遺伝子発現に影響すると考えられるため、予備検討として次世代シーケンス技術を用いた遺伝子発現パターンの解析を行ったところ、CHD8変異マウスにおいて神経発生のマスターレギュレーターであるRESTが活性化しており、これに伴って神経発生が遅延していた。そこでRESTの異常活性化と神経発生遅延がASDの発症原因であると考え、ASDモデルマウスにおいてこれらのマイクロエンドフェノタイプによるASD発症メカニズムの解明を行う。

### 研究背景

ASDは「社会性行動の障害」と「活動と興味の範囲の著しい限局性や固執傾向」を主な特徴とする発達障害であり、発症頻度は人口の1%以上と非常に高いことから病態の解明と治療法の確立が急務となっている。ASDの発症には遺伝的要因が強く関与することが知られており、これまでに多くの原因遺伝子候補が報告されてきた。特に近年ASD患者を対象とした大規模なエキソーム解析が行われた結果、クロマチンリモデリング因子の一つである *CHD8* が最も頻度の高い *de novo* 変異遺伝子として報告され、有力なASD原因遺伝子候補として注目を集めている。しかしながら、これまでに *CHD8* の遺伝子変異がASDの発症原因となる証拠は示されていなかった。

*CHD8* は Chromodomain Helicase DNA-binding タンパク質の一つであるクロマチンリモデリング因子であるが、われわれはこれまでに *CHD8* が p53 や  $\beta$  カテニンに結合し、これらの転写調節領域にヒストンH1をリクルートすることで転写活性を抑制していることを報告してきた。*Chd8* をホモ欠損したマウスは胎生初期に死亡するが<sup>3)</sup>、ASD患者で発見された *CHD8* 変異は全てヘテロ変異であったことに加え遺伝子の全域に分布していたことから、*CHD8* のハプロ不全がASDの原因であることが示唆された。そこでわれわれは *Chd8* ヘテロ欠損マウスがASDを発症しているかと予想した。

### 研究結果

*CHD8* の遺伝子変異をもつASD患者は典型的なASD症状に加えて、巨頭症と腸管の異常を高頻度で合併するという特徴がある。一方 *Chd8* ヘテロ欠損マウスも脳重量が増加し、腸管運動が低下する傾向を示すことから、やはりASD患者の特徴を再現していた。さらにASD患者の多くに不安の増加がみられることから、*Chd8* ヘテロ欠損マウスに「オープンフィールド試験」「明暗選択箱試験」「高架式十字迷路試験」という3つの独立した行動試験をおこない、不安の強さを検証したところ、いずれの試験においても *Chd8* ヘテロ欠損マウスは顕著に不安様行動の増加を示し、ASD患者の症状を再現していた。次にASDの主要な症状である固執傾向と社会性行動について検証した。まず「T字迷路試験」を用いて記憶学習と固執傾向を評価したところ、*Chd8* ヘテロ欠損マウスは記憶学習には異常が見られなかったものの、野生型と比較して強い固執傾向が観察された。さらに「社会的行動試験」を用いて社会性行動を観察したところ、*Chd8* ヘテロ欠損マウスは初対面のマウスの近くにいる時間は長くなるものの、コミュニケーション行動である追いかけ行動や臭い嗅ぎ行動は減少していた。この行動異常はASD患者の「受動型」と呼ばれるタイプのコミュニケーション障害に類似している。*Chd8* ヘテロ欠損マウスで観察されたこれらの行

動異常はヒトASDの症状によく似ており、これはCHD8のハプロ不全によってASDが発症したことを示唆するものである（図1）。

CHD8はクロマチンリモデリング因子であることから、われわれは遺伝子発現制御の異常がASDの発症原因であると推測した。この仮説を検証するためRNA-seq解析をおこない*Chd8*のヘテロ欠損によって発現が変化した遺伝子を探索したが、予想外に顕著に発現量が変化した遺伝子はほとんど検出できなかった。われわれは「少数の遺伝子の大きな変化ではなく、それぞれは小さい変動ながらも多数の遺伝子変化の相乗効果がASDの発症に関与している」と推測し、遺伝子の発現量変化を個々の遺伝子ではなく遺伝子セットとして解析する手法であるGene set enrichment analysis (GSEA)を用いて遺伝子の発現変化を解析したところ、*Chd8*ヘテロ欠損マウスの脳内でASD患者の遺伝子発現パターンと似た遺伝子発現変化が起きていることを発見した<sup>4)</sup>。特にシナプス関連タンパク質やイオンチャネルといった神経活性に関わる遺伝子の発現低下が目立つことから、神経細胞の機能低下がASDの症状に関与している可能性が示唆された。さらにこの中でも神経関連遺伝子の転写抑制因子であるRESTのターゲット遺伝子が最も顕著に発現が減少しており、これに伴って胎生初期から中期の神経発達が遅延していた。つまり*Chd8*ヘテロ欠損によってRESTが活性化した結果、神経発達が遅延したと考えられる。さらに興味深いことに、RESTターゲット遺伝子の発現低下はヒトASD患者の死後脳のデータにおいても同様に観察されたことから、RESTの活性化はヒトにおいてもASDに関与すると思われる。

## まとめ

本研究はCHD8のハプロ不全がASDの原因となることを直接的に示した初めての報告であり、さらにRESTの活性化がASD発症に関与することも今まで知られていなかったことから、これも本研究の重要な発見である。われわれは本研究で得られた知見から「CHD8ハプロ不全によるRESTの活性化によって神経発達が遅延した結果、ASDが発症する（図2）」という仮説を立て検証を進めている。また、*Chd8*ヘテロ欠損マウスはヒトASDを再現するモデル動物であり、研究ツールとしてだけでなく創薬にも大いに役立つことが期待される。われわれもすでに遺伝学的手法と薬剤投与による治療実験を始めており、ASDの治療法の開発を目指している。

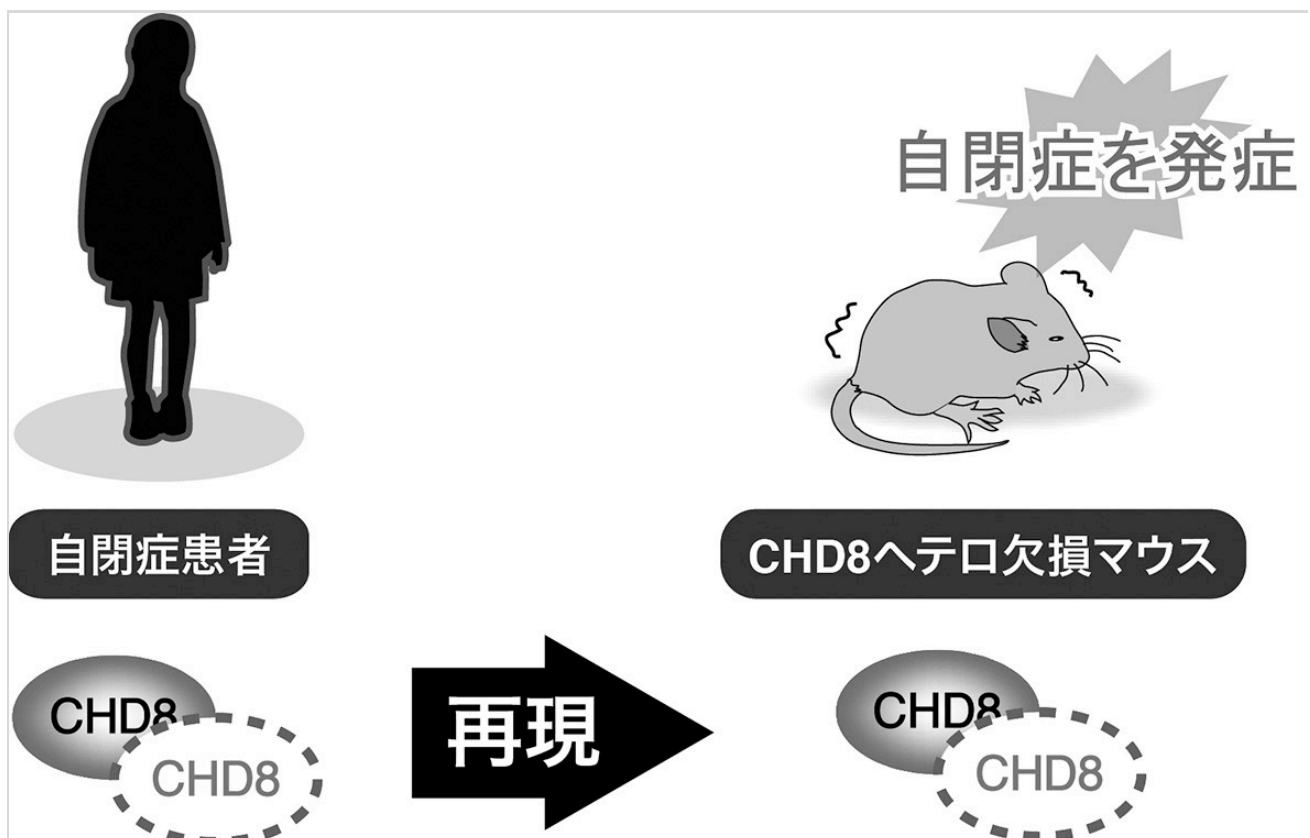


図1 ASD患者の遺伝子変異を再現したマウスはASDを発症した

ASD患者で発見された遺伝子変異は全てヘテロ欠損だったことから、*Chd8* をヘテロ欠損するマウスを製作することで遺伝子変異を再現したところ、このマウスは自閉症様の行動異常を示した。

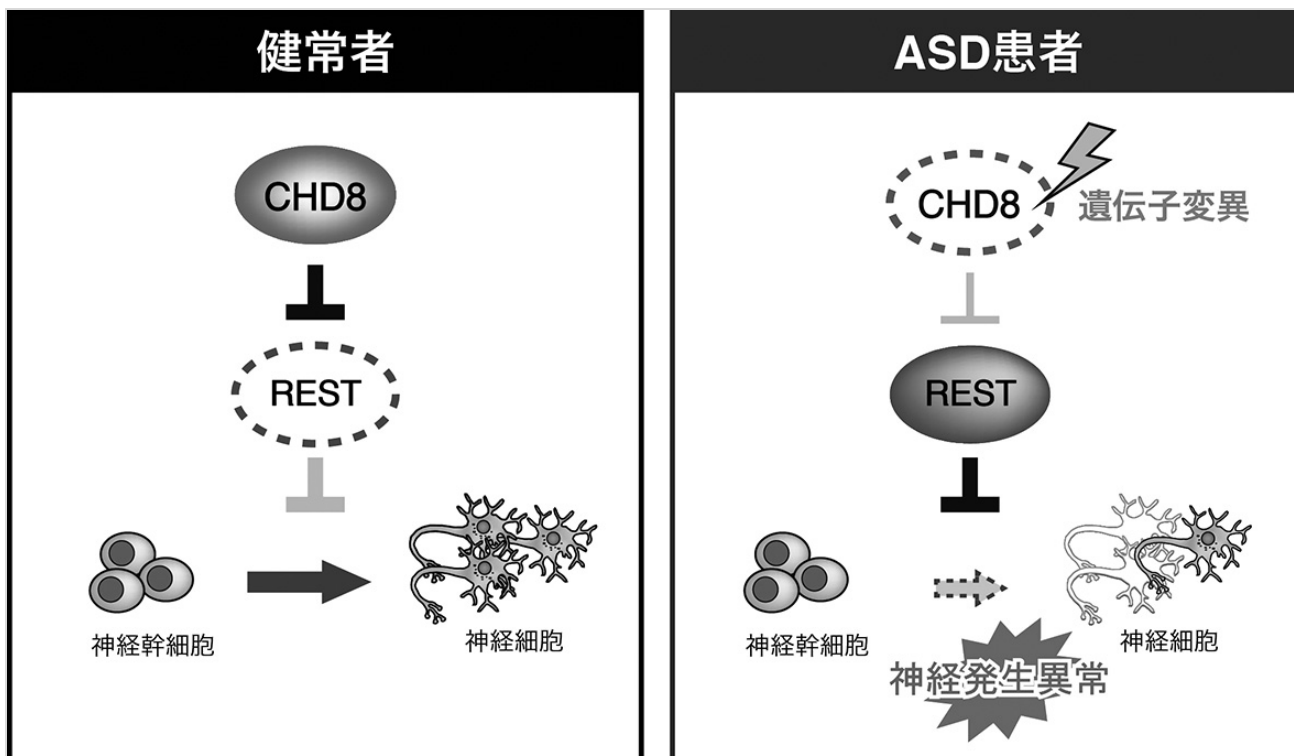


図2 CHD8 遺伝子変異によるASDの発症モデル

通常CHD8はRESTを抑制しているが、*CHD8* に遺伝子変異が起こるとRESTの抑制が解除され、RESTが活性化することで神経発達が障害される。われわれはこの神経発達の異常がASDの原因であると考えている。

# 新奇環境認知により活性化される単一ニューロン種のトランスクリプトーム解析

(平成24年度～28年度)

公募班員 奥野 浩行 京都大学・大学院医学研究科 特定准教授

## 研究目的

脳の認知機能の維持には神経活動依存的な遺伝子発現や蛋白質合成が重要な役割を果たしており、これらの細胞遺伝子応答の異常・失調と神経発達障害や精神疾患病態との関連が示唆されています。特に、外的からの感覚情報処理やその内的表現に関与する神経ネットワークにおける遺伝子発現応答の全体像を把握することは健康な脳の情報処理機構のみならず、神経・精神病態の理解に極めて重要だと考えられます。しかしながら、このような遺伝子応答は経験や生活履歴などによる個体差の影響も大きく、これまでのところ統一的な理解には至っておりません。本研究では、認知課題や経験によって活性化された大脳・海馬における神経細胞を可視化・同定することにより、脳スライスから実験群と対照群の細胞を単一細胞レベルで採取し、細胞タイプ特異的、活性化ニューロン特異的なトランスクリプトーム解析を行うことを目的としました。

## 研究背景

神経細胞においてシナプス活動に反応して最初に発現誘導される遺伝子群は前初期遺伝子(immediate-early genes, IEGs)と呼ばれ、シナプスの可塑性や恒常性の発現・維持に重要な役割を果たしていると考えられています。私たちは、これまで神経特異的なIEGの一つ、*Arc*(activity-regulated cytoskeleton associated protein)に注目し、この遺伝子産物によるシナプス制御を解析したところ、“逆シナプスタギング”機構によって可塑性シナプスと非可塑性シナプスのバランスを巧妙に制御していること、などを見出し報告いたしました。

これまでの疾患遺伝学的研究により、活動依存的遺伝子発現に関わる細胞内シグナル伝達系因子をコードする様々な遺伝子の変異が発達障害・精神遅延を引き起こすことが明らかになってきました。また近年の大規模ゲノムワイド解析により、*Arc*および*Arc*と複合体を形成するシナプスタンパク質をコードする遺伝子に変異を持つ確率は統合失調症を発症した患者群において対照群に比して有意に高い、という結果が複数の研究室より報告されています。

これらの知見より我々は*Arc*を含む活動依存的遺伝子の発現プロファイルは精神疾患群と正常群で異なり、この差異はマイクロエンドフェノタイプとなりうる、との仮説を立てて、このための技術開発を行うことを本研究の目標といたしました。具体的には、これまで我々が樹立した*Arc*レポーターマウス<sup>7)</sup>を用いて認知課題などで活性化した神経細胞を同定し、それらを単利して単一またはごく少数の同定細胞からRNA-Seqを行う、という系の開発を行いました。

## 研究結果

*Arc*レポーターマウス (*Arc-pro-Venus-pest Tg mouse*) を新奇環境に2時間暴露すると海馬歯状回やCA1領域でレポーターである緑色蛍光タンパク質の顕著な発現誘導がみられます(下図)。げっ歯類において新規環境暴露は空間認知に関わる神経回路を活性化し、海馬を含む大脳各領域において活動依存的遺伝子発現を強く誘導する刺激であることが知られています。

この神経活動レポーターマウスの海馬からスライスを作成し、蛍光顕微鏡観察でレポーター発現を指標にすることにより、新奇環境によって活性化された神経細胞を染色することなく可視化・同定することが可能になります。本研究においてはproof-of-concept実験として、海馬歯状回における活性化細胞を微小ガラスピペットを用いて単離採取し、そこから微量RNAからのcDNA合成・増幅法の1つであるSMART-Seq2法を用いて逆転写反応および増幅を行いました。対照としては、あらかじめアデノ随伴ウイルスにより赤色蛍光タンパク質で離散的に標識した神経細胞を同一個体内に準備しておき、同様に単離

採取したものを非活性化神経細胞サンプルとしました。これら活性化神経細胞cDNAおよび非活性化神経細胞cDNAはバーコード化して次世代シーケンス用ライブラリーを作成し、イルミナHiSeq2500により大規模並列シーケンスを行いました。

得られたシーケンス情報を用いてバイオインフォマティクスツールによる発現変動解析を行ったところ、これまで知られている多くのIEGsのほか、機能未知の遺伝子が多数検出されました。従来法である海馬組織全体から抽出したRNAを用いたRNA-Seq解析と比べたところ、発現変動を示す遺伝子の数および変動の程度が単離神経細胞サンプルにおいて大きいことから、本方法の高い感度と優位性が示唆されました。

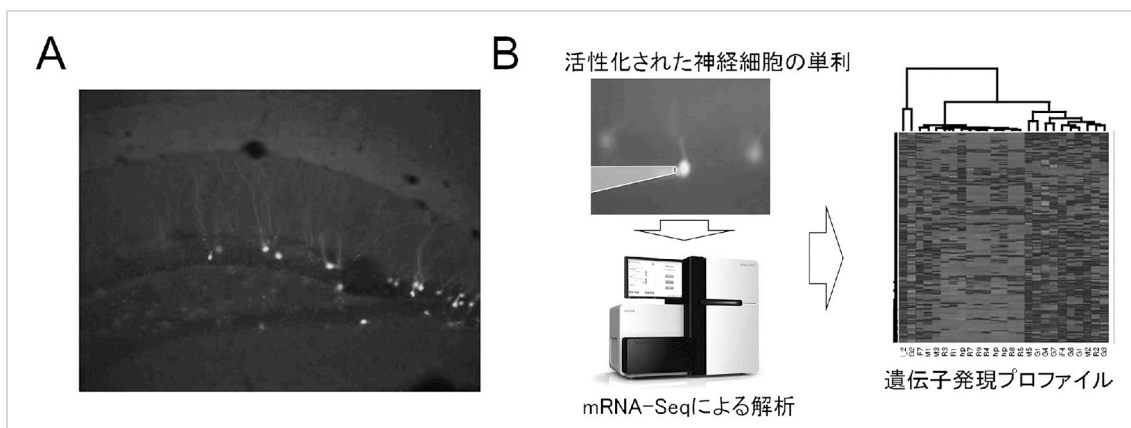
なお、本研究における次世代シーケンシングおよびマッピング、カウントは東京大学・新領域の鈴木讓教授および菅野晴夫教授との共同研究（新学術領域ゲノム支援、先進ゲノム支援）として行いました。

## まとめ

本研究では新奇環境刺激によって活性化された海馬歯状回顆粒細胞や海馬錐体細胞を蛍光レポーターにより単一細胞として同定し、そこから網羅的遺伝子発現解析を行う方法を確立いたしました。ガラスマイクロピペットによる細胞採取法と高感度の単一細胞RNASeq技術を組み合わせることにより、素早く単一細胞からのRNAの回収およびcDNA合成、網羅的遺伝子発現解析が可能です。

本研究では活性化神経細胞の同定に*Arc*遺伝子のレポーターを用いました。これまでのオプトジェネティクスやケモジェネティクスを用いた研究により*Arc*や*c-fos*等に代表される前初期遺伝子(IEGs)の発現は恐怖条件付けなどの情動記憶の形成に必須であることが明らかになってきています<sup>10)</sup>。また、最近の研究では*Arc*欠損マウスは統合失調症様行動を示すことが報告されています<sup>11)</sup>。本研究で開発した*Arc*レポーター陽性細胞のトランスクリプトーム解析を*Arc*欠損マウス、あるいは他の神経疾患モデルマウスに適用し、野生型マウスとの差異を明らかにすることによって、精神疾患エンドフェノタイプとしての遺伝子発現プロファイルが得られることを期待されます。

本研究で開発した単一・微小細胞からのRNA-Seq法は汎用性が高く、蛍光タンパク質等で標識された神経細胞やグリア細胞をピペットで単離できれば、多様な疾患動物モデルやサンプルにおいて、セルソーラーやレーザーマイクロダイセクションあるいはマイクロ流路チップなどの設備・器機を使わずに簡便に単一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析を実現することが可能です。今後、ご要望があれば本技術を共有し、少しでも精神疾患メカニズムの解明やエンドフェノタイプの発見に貢献したいと考えてお



ります。

遺伝子発現活性化レポーター陽性細胞からのRNA-Seq 解析

A) 新規環境刺激 2 時間後の*Arc* プロモーター-Venus マウス海馬歯状回における活性化神経細胞

B) 可視化同定された単一神経細胞の単離とRNA-Seq による遺伝子発現プロファイリング

ストレス応答性転写因子Npas4欠損マウスにおけるGABA神経発達と表現型解析（平成24年度～25年度）  
グリア細胞におけるMHCクラスI分子の過剰発現とマイクロエンドフェノタイプ（平成26年度～27年度）

公募班員 山田 清文 名古屋大学 医学部附属病院 教授

## 研究目的

統合失調症や自閉スペクトラム症などの神経発達障害において、脳神経回路の興奮／抑制（E/I）バランスの異常が脳機能障害の基盤にあると考えられるが、そのメカニズムは明らかではない。一方、全ゲノム解析により統合失調症と主要組織適合遺伝子複合体クラスI分子（MHCI）との関連性が示唆されており、MHCIは統合失調症の遺伝的要因あるいは環境要因に基づく神経発達障害を媒介する分子であると提唱されている。そこで第1期（平成25～26年度）においては、神経発達に関与する活動依存的かつストレス感受性転写因子であるNpas4の遺伝子欠損（Npas4-K0）マウスの脳機能変化を細胞レベルで解析し、そのマイクロエンドフェノタイプを明らかにした。第2期（平成27～28年度）の目標は、MHCI分子の過剰発現に関連するマイクロエンドフェノタイプを明らかにして、アストロサイトに発現するMHCIの神経発達障害における役割を明らかにすることである。

## 研究背景

ストレス（環境要因）がE/Iバランスの異常を引き起こす分子機構を解明すれば、ストレス関連精神疾患の治療薬の開発への応用も期待できる。例えば、幼若期隔離飼育ストレス（精神的ストレス）や拘束ストレス（身体的ストレス）によりGABAシナプス形成に関与するNpas4の発現低下と神経新生の障害が誘発され、ストレス負荷マウスは空間学習や情動行動の異常を示す。ストレスによるNpas4の発現低下に関して我々は、グルココルチコイド受容体がNpas4のプロモーターに直接結合して転写を抑制することを明らかにしている。そこで本研究第1期には、Npas4-K0マウスの行動異常とGABA神経発達およびシナプス可塑性に焦点を当てたマイクロエンドフェノタイプ解析を行った。

我々は統合失調症の環境要因を考慮した周産期擬似ウイルス感染モデル（polyICモデル）を開発し、周産期の異常免疫応答が神経発達障害を誘発する分子機構についても研究を進めてきた<sup>7,8)</sup>。PolyICモデルの神経発達障害の起点はアストロサイトの自然免疫応答であり、統合失調症様の行動異常と神経スパイン密度の低下などの神経発達障害の特徴を示す。さらに、polyICモデルマウスの海馬ではマウスMHCIであるH-2DやH-2Kの遺伝子発現が増加している。そこで第2期では、グリア細胞におけるMHCI分子の過剰発現に関連するマイクロエンドフェノタイプをin vitroおよびin vivoで解析することにより、神経発達障害におけるMHCIの役割を検討した。

## 研究結果

第1期の研究結果：

Npas4-K0マウスには、状況依存的すくみ行動（海馬依存的恐怖記憶）、プレパルス抑制およびロタロッド試験における協調運動学習に異常が認められた。さらに、側坐核や線条体ではGABA<sub>A</sub>受容体 $\alpha 1, 3, 5$ サブユニットの発現低下と $\alpha 2$ サブユニットの発現増加、小脳では $\alpha 1, 4, 5, \beta 2, 3$ および $\gamma 1, 2, 3$ 各サブユニットの発現低下が認められた。一方、拘束ストレス負荷によりNpas4プロモーターのCpGアイランドでDNAメチル化が亢進した。このCpGアイランドに存在する二つのCRE配列は動物種を超えてよく保存されており、ストレスによるDNAメチル化亢進がCRE配列を介したNpas4転写を抑制していることが示唆された。

E/Iバランスの障害という観点から、ペンチレンテトラゾール（PTZ）誘発性キンドリングにおけるNpas4の役割についても解析した。Npas4-K0マウスではPTZ誘発性キンドリングの形成が野生型マウスに

比較して顕著に促進された。その分子機構として、海馬神経細胞の興奮性制御におけるNpas4-Homer1aシグナルの関与が示唆され、Npas4標的遺伝子であるHomer1aはAMPA受容体のシナプス膜へのアンカーリングを抑制的に制御していると考えられた（論文投稿中）。

セリン・スレオニンキナーゼAktの基質であるGirdinは精神疾患関連遺伝子DISC1と相互作用し、軸索形成や海馬歯状回の神経新生を制御している。海馬培養神経細胞においてBDNF処置はGirdinのリン酸化（1416番目のセリン残基）を亢進した。一方、Girdinの1416番目セリン残基をアラニンに置換したGirdin SAマウスは学習・記憶障害を示し、海馬スライスではLTPの減弱とNMDA/AMPA比の低下が認められた。海馬におけるGirdinのリン酸化は学習・記憶の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

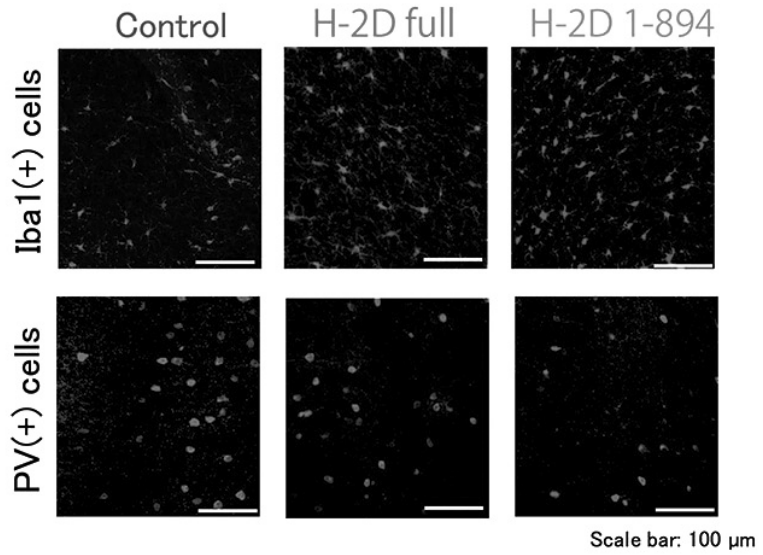
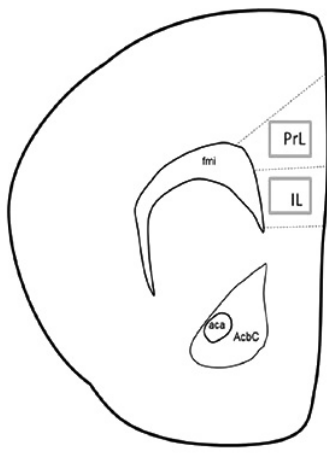
第2期の研究結果：

幼若期（7-8週齢）マウスにpolyICを腹腔内投与すると、前頭前皮質（mPFC）においてH-2D、H-2KなどのMHCIの遺伝子発現が増加した。In situ hybridization法により発現細胞を調べると、神経細胞の他、アストロサイトにおける遺伝子発現が認められたが、アストロサイトのMHCIが脳機能や行動へ及ぼす影響については報告がほとんどない。そこで、アデノ随伴ウイルスベクターベクターを用いて、GFAPプロモーター制御下に成熟マウスmPFCのアストロサイト特異的にH-2Dを発現誘導した。系統的行動解析により、H-2D発現マウスは認知機能と社会性行動に障害があることが示唆された。免疫組織学的解析により、H-2D発現マウスmPFCにおいてミクログリアの活性化、スパイン密度とパルブアルブミン陽性神経細胞数の減少などが認められた。一方、MHCIの分子動態を明らかにするため、膜貫通型および分泌型H-2Dをアストロサイトあるいは神経細胞へ過剰発現させ、MHCIの細胞内局在を二重免疫染色で検討した。その結果、アストロサイトおよび神経細胞において、膜貫通型および分泌型H-2Dは主にCD63陽性エクソソームに局在することを確認した。エクソソーム膜合成阻害薬の処置により、H-2D発現マウスの認知行動障害およびミクログリアの活性化などの神経病理学的変化は有意に改善した。H-2D発現マウスでは、アストロサイトからのエクソソーム分泌が近傍の神経細胞、ミクログリアに影響し、脳機能障害が誘発されることが示唆された（論文投稿中）。

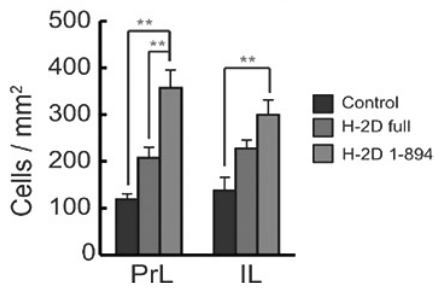
## まとめ

統合失調症などの神経発達障害に関連する分子として活動依存的転写因子Npas4が示唆されている。一方、Npas4はストレスにより発現が低下するストレス感受性遺伝子でもある。本研究において、Npas4の発現低下に関連するマイクロエンドフェノタイプとしてGABA<sub>A</sub>受容体サブタイプの発現変化と誘導型Homer1aの発現抑制ならびにシナプス膜興奮性の恒常性維持機構（膜結合型AMPA受容体のダウンレギュレーション）の障害が示唆された。

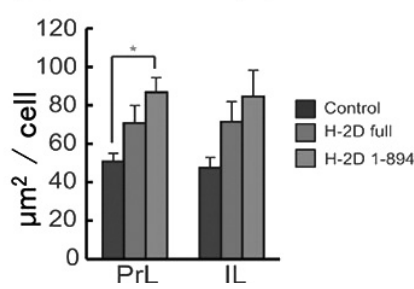
MHCIと統合失調症との関連性が示唆されており、神経系に発現するMHCIはスパインの刈り込みやシナプス可塑性への関与が示唆されている。本研究では、アストロサイトに発現するMHCIの病態生理学的役割と脳機能障害への関与について検討し、アストロサイトからのMHCIのエクソソーム分泌の可能性が示唆された。今後、MHCIとの関連性が示唆されている神経発達障害のバイオマーカーとしてのエクソソーム解析に興味を持たれる。



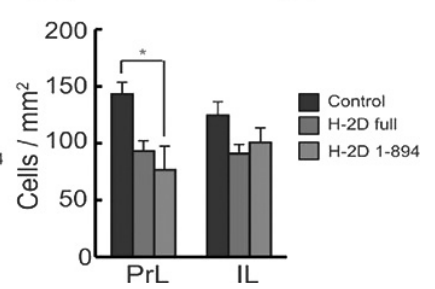
(A) Number of Iba1 (+) cells



(B) Size of Iba1 (+) cells



(C) Number of PV (+) cells



前頭前皮質に全長H-2Dあるいは分泌型H-2D(1-894)を発現するマウスモデルにおけるIba1(+)ミクログリアとPV(+)GABA神経の変化.

(A) Iba1(+)ミクログリアの細胞数,

(B) Iba1(+)ミクログリアの細胞体の大きさ,

(C) PV(+)GABA神経数. PrL: 前辺縁皮質, IL: 下辺縁皮質



# マウス反復ストレスによる情動変容を担う自然免疫分子の作用とその活性化機構

(平成25年度～28年度)

公募班員 古屋敷 智之 神戸大学 医学研究科 薬理学分野

## 研究目的・背景

社会環境や生活習慣から受けるストレスは心身の機能に多様な影響を与える。短期的で克服可能なストレスはストレスへの馴化や抵抗性を促すが、長期的で克服不可能なストレスは抑うつや不安亢進など情動変容を引き起こし、精神疾患をはじめ様々な疾患のリスク因子となる。しかしストレスによる情動変容を司るメカニズムには不明な点が多く、ストレスを標的とした精神疾患の予防・治療は確立していない。

これまで研究代表者らは、主にマウスうつ病モデルとされる反復社会挫折ストレスモデルを用い、単回ストレスが内側前頭前皮質に投射するドーパミン系を活性化しストレス抵抗性を高めるのに対し、反復ストレスが炎症関連分子プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) とその受容体EP1を介してこのドーパミン系の応答性を抑制し、うつ様行動を誘導することを示してきた。ミクログリアに濃縮して発現するPG合成酵素COX1が、反復ストレスによる脳内のPGE<sub>2</sub>産生とともに、うつ様行動の誘導に必須であることから、反復ストレスによるうつ様行動誘導におけるミクログリアの関与が示唆されていた。しかし、反復ストレスによるミクログリア活性化のメカニズムやうつ様行動誘導における意義は不明であった。

近年、組織恒常性破綻により内因性のダメージ関連分子が細胞から放出され、Toll-like receptor (TLR) など自然免疫受容体を介して無菌性の炎症を惹起することが提唱されている。本研究では、反復社会挫折ストレスによるうつ様行動誘導におけるTLRの役割や働きを調べた(論文改訂中)。また、反復ストレスによるうつ様行動誘導のメカニズムに示唆を得るため、単回ストレスによるストレス抵抗性増強を担うメカニズムも並行して解析した。

## 研究結果

まずTLR欠損マウスでは反復ストレスによるうつ様行動や不安亢進が消失することを発見した。反復ストレスによる情動変容には内側前頭前皮質の機能形態変化が関わると考えられているが、TLR欠損マウスでは反復ストレスによる内側前頭前皮質神経細胞の樹状突起萎縮が起らず、ストレス応答性減弱が抑制されていた。野生型マウスでは反復ストレスにより内側前頭前皮質のミクログリアが活性化されるが、側坐核では同様のミクログリア活性化は見られず、反復ストレスによるミクログリア活性化には脳領域特異性がある。TLR欠損マウスでは内側前頭前皮質でのミクログリア活性化が消失していた。これらの結果は、TLRが反復ストレスによる内側前頭前皮質での神経細胞の機能形態変化やミクログリア活性化、さらに情動変容に必須であることを示す。

情動回路におけるTLRの作用点を同定するために、野生型マウスから採取した初代培養ミクログリアをTLR欠損マウスの内側前頭前皮質に移植したところ、一過性ではあるが反復ストレスによるうつ様行動の誘導が回復した。一方、TLR欠損マウスから採取した初代培養ミクログリアの移植では回復が見られないことから、この作用は移植するミクログリアのTLRに依存していた。さらに、組換えレンチウイルスとミクログリアに選択的にCreを発現するマウスを組み合わせ、脳領域かつミクログリア選択的にTLRの発現を抑制する技術を独自に開発した。この技術を用いて内側前頭前皮質のミクログリアでのTLRの発現を抑制したところ、反復ストレスによるうつ様行動が消失した。以上の結果から、内側前頭前皮質でのTLRによるミクログリア活性化が反復ストレスによる情動変容に重要であることを示した。

内側前頭前皮質でのTLRによるミクログリア活性化が神経細胞の機能形態変化やうつ様行動を誘導するメカニズムに迫るため、野生型マウスとTLR欠損マウスの内側前頭前皮質または側坐核からミクログリアを単離し、網羅的遺伝子発現解析に供したところ、反復ストレスにより内側前頭前皮質でTLR依存的に誘導される炎症性サイトカインをいくつか見出した。これら炎症性サイトカインの中和抗体を内側

前頭前皮質に注入することで、反復ストレスによるうつ様行動の誘導を介達するミクログリア由来因子の実体に迫りたいと考えている。

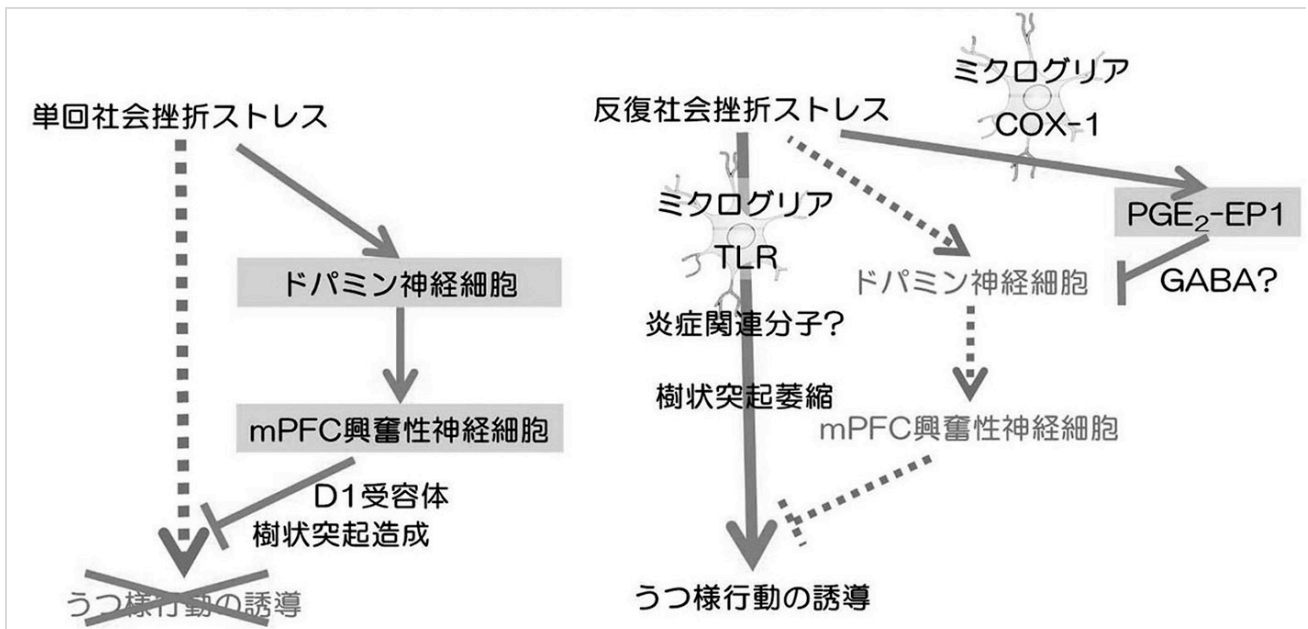
並行して、ストレスによる内側前頭前皮質ドパミン系の活性化がストレス抵抗性を増強するメカニズムについても研究を進めた。反復ストレスにより内側前頭前皮質のドパミンD1受容体サブタイプの発現が減少することを見出した。内側前頭前皮質神経細胞のD1受容体サブタイプの発現を抑制したところ、単回および反復ストレスによるうつ様行動の誘導が促進された。さらに内側前頭前皮質の興奮性神経細胞におけるD1受容体サブタイプの発現抑制によりうつ様行動の誘導が促進されるが、抑制性神経細胞におけるD1受容体サブタイプの発現抑制は影響を与えないことを示した。単回ストレスでは内側前頭前皮質にERKリン酸化やc-Fosの発現誘導が見られるが、D1受容体サブタイプの発現抑制により消失した。さらにこのD1受容体依存的なERKリン酸化は内側前頭前皮質の興奮性神経細胞に選択的であることから、単回ストレスのドパミンD1受容体シグナルは興奮性神経細胞で活性化されていることが示唆された。以上の結果は、単回ストレスによる内側前頭前皮質興奮性神経細胞のD1受容体サブタイプ活性化がストレス抵抗性を増強することを示す。

内側前頭前皮質のD1受容体サブタイプがストレス抵抗性を増強するメカニズムに迫るため、ストレスによる内側前頭前皮質神経細胞の形態変化におけるD1受容体サブタイプの関与を調べた。反復ストレスでは内側前頭前皮質の浅層錐体細胞の樹状突起萎縮がうつ様行動の度合いと相関して誘導される。内側前頭前皮質神経細胞のD1受容体サブタイプの発現抑制はうつ様行動誘導を促進するが、内側前頭前皮質錐体細胞の樹状突起萎縮には影響しなかった。一方、単回ストレスでは内側前頭前皮質の浅層錐体細胞の先端樹状突起が選択的に造成し、スパイン密度も増加することを世界に先駆け発見した。

この樹状突起造成は内側前頭前皮質神経細胞のD1受容体サブタイプの発現抑制により消失した。以上の結果は、単回ストレスによる内側前頭前皮質のD1受容体サブタイプ活性化が浅層錐体細胞の先端樹状突起の造成を誘導することを示し、これがストレス抵抗性増強と関連する可能性を示唆する。

## まとめ

これら一連の研究は、短期的なストレスがD1受容体サブタイプの活性化を介して内側前頭前皮質の浅層錐体細胞の樹状突起造成とともにストレス抵抗性増強を誘導すること、長期的なストレスがTLRを介するミクログリア活性化を介して内側前頭前皮質の浅層錐体細胞の樹状突起萎縮とともにうつ様行動を誘導することを示唆する(図)。また、これらの成果以外にも、長期的な隔離ストレスが側坐核神経細胞のシナプス前部の機能や構造の退縮を介して不安亢進を誘導することも報告したが<sup>4)</sup>、このメカニズムは反復社会挫折ストレスによるうつ様行動誘導には関与しない。従って、ストレスによる作用は多様であり、ストレスを標的とした創薬には、ストレスの各作用を選択的に操作するための標的分子の同定が重要であると考えられる。



短期的なストレスによるレジリエンス増強と長期的なストレスによるうつ様行動誘導を担う分子・神経回路基盤の概略図

# エピジェネティクスと組織化学的手法によるPTSDの病態解明と予防法の開発

(平成25年度～26年度)

公募班員 森信 繁 吉備国際大学保健医療福祉学部作業療法学科 高知大学医学部神経精神科学

## 研究目的

外傷後ストレス障害(PTSD)の治療には、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)や持続エクスポージャー(PE)療法が用いられている。しかしながら発症の契機となったトラウマ体験の侵入症状が軽減せず、難治化する症例もまれならず見られている。我々はMichigan大学のLiberzon博士らと共同で、ヒトPTSDでみられる多様な臨床症状と類似の症状を呈するPTSDモデルラットの作成を行ってきた。特にこのモデルラットでは、顕著な恐怖記憶の消去の障害を示し、難治性PTSD症例のモデルとなる事を報告してきた。このため本研究ではPTSD難治化のメカニズムの解明や新たな予防法の開発を目的に、このPTSDモデルラットを用いて、恐怖記憶の消去障害のメカニズムに関与する分子機序の解明や組織学的変化の解析を行った。

## 研究背景

PTSDはICD-10やDSM-Vの診断基準に示されるように、著しい恐怖体験を契機に、恐怖体験の侵入症状や過覚醒及び驚愕反応などの症状を呈する疾患である。同時にPTSD患者の多くがデキサメサドン抑制試験で過剰な抑制反応を示しており、視床下部—下垂体—副腎皮質(HPA)機能の過剰抑制がこの病態に関与している事が推測されている。

我々はMichigan大学精神科のLiberzon教授らと共同で、ラットに拘束・強制水泳・エーテル麻酔という、いずれも副腎皮質を刺激して過剰な副腎皮質ホルモン分泌を促すストレスを、連続して負荷するSingle Prolonged Stress (SPS)をラットに負荷する事によって、ヒトPTSDにみられる臨床症状に類似した以下のような行動を示す、PTSDモデルラットの作成を行ってきた。1) HPA機能の過剰抑制、2) 痛覚閾値の亢進、3) 不安行動の亢進、4) 恐怖反応の亢進(驚愕反応)、5) 恐怖記憶の消去の障害。

特に恐怖条件付け試験を用いた空間記憶に対するSPS負荷ラットにみられる恐怖記憶の消去の障害は、SPS負荷によって海馬のGlycine transporter 1の発現過剰が引き起こされ、このためシナプス間隙のGlycine濃度の低下からNMDA受容体刺激の減弱が続くため、恐怖条件付け刺激後の安全な環境への暴露を行っても新たな学習が形成されず、オリジナルの恐怖記憶が書き換えられない状態が維持されるためである事を明かにしてきた。このためNMDA受容体の活性化を消去訓練と合わせて行う事で、恐怖記憶の消去障害は修復される事が推測された。この仮説に基づいて、SPSラットに恐怖条件付け刺激後からd-cycloserineを慢性投与したところ、恐怖記憶の消去の障害が修復されることも報告してきた。

新たな記憶の形成には海馬でのヒストン・アセチル化の亢進の関与が報告されているため、我々は単回の脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬の投与と消去学習で、SPSラットにみられる恐怖記憶の消去の障害が早期に修復されないか実験を行った。その結果、HDAC阻害薬であるVorinostatを消去訓練後に単回投与することによって、恐怖記憶の消去障害の修復がみられ、その機序にはヒストン・アセチル化の亢進によるp-CREBのNMDA受容体NR2B subunit遺伝子プロモーター領域への結合の亢進を介した、NR2B subunit発現の亢進のあることを報告した。

## 研究結果

SPS負荷の過程では顕著な副腎皮質ホルモンの分泌亢進がみられるためSPS負荷によるGlucocorticoid受容体(GR)の細胞内から核内への移行が促進され、プロモーター上のGR結合部位へのGRの結合が亢進し、そのため下流の遺伝子の転写が増大することが推測される。このためSPS負荷後の異なった時間で海馬の細胞内・核内GR量をWestern Blot法で計測した結果、SPS負荷後1, 2時間の時点で有意なGR核内移行増大が検出された。抗GR抗体を用いた神経細胞でのChIP-sequencingから、アポトーシス調節遺伝

子やアポトーシス関連遺伝子の転写がGR結合を介して促進される事が示され、SPSラット海馬でもBcl-2発現は不変であったがBax発現の有意な亢進が検出された。

このようなSPS負荷によるGR結合を介したBcl-2/Baxの低下は、PTSDの病態にアポトーシスの活性化による、海馬の組織学的変化が引き起こされている可能性を示唆している。同時に新たな記憶の形成にはNMDA受容体系シグナルの活性化など分子レベルでの可塑性も必要であるが、樹状突起スパインの変化などのシナプス構造の可塑性も必要と推測されている。このため恐怖記憶の消去の障害がみられるSPSラットの海馬でも、何らかのシナプス形態の変化が引き起こされている可能性が推測されるため、SPSラットの海馬のスパイン形態をGolgi染色法を用いて解析した。その結果、CA1及びCA3分子層でのスパイン数の低下やCA1放線層でのスパイン直径の増大が検出された(図A, B)。計測したCA1, CA3の分子層および放線層では、スパインの長さには有意な変化はみられなかった。

これまでのヒトやげっ歯類を用いた研究から、恐怖記憶の消去には内側前頭前野から扁桃体や海馬への抑制性シグナルの減弱が関与している事が報告されている。特にラットをいた実験からBDNFを介した神経回路が、恐怖記憶の消去には重要であることが報告されている。同時に海馬での樹状突起スパイン内でのBDNFTrkB情報系の活性化は、記憶の形成に重要であることも報告されている。このような研究成果はSPSラットにみられる恐怖記憶の消去の障害に、樹状突起スパインの障害による海馬のBDNF機能の障害が関連している事が推測される。このため消去訓練前にSPSラットのInfralimbic medial prefrontal cortex (IL mPFC)やVentralhippocampusにBDNFをマイクロインフュージョンしたところ、恐怖記憶の消去の障害が修復されていた。同様にPrelimbic mPFCへのBDNF投与を行ったが、SPSラットの恐怖記憶の消去の障害に対して修復効果を示さなかった。

## まとめ

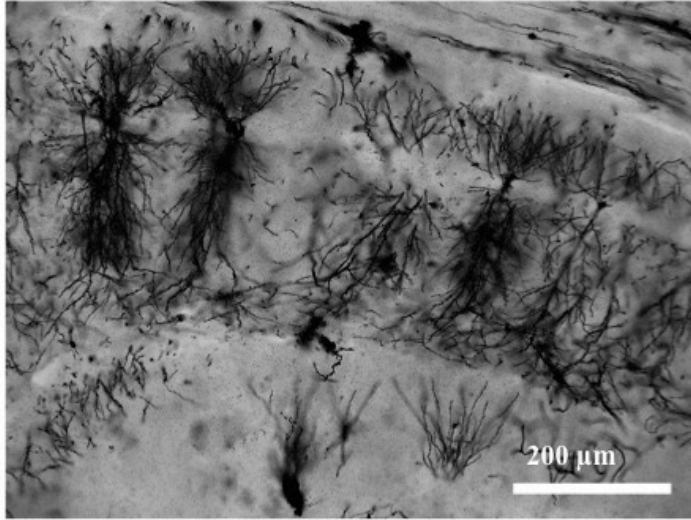
今回の研究ではPTSDの発症に顕著なストレス体験があるという診断基準に従って、ストレス暴露時にみられる副腎皮質ホルモンの過剰分泌を介して引き起こされる脳内の変化を、SPSラットの海馬を対象に恐怖記憶の消去の障害という観点から探索した。得られた研究結果をまとめると、ストレス暴露による副腎皮質ホルモンの分泌亢進からGRのGR結合部位への結合亢進からアポトーシス遺伝子の発現亢進が導かれ、樹状突起スパインの変性にリンクする可能性が示唆された。今回の研究でみられた海馬のスパインの形態変化が、恐怖記憶の消去の障害に密接に関与しているかについては、今後、SPSラットの恐怖条件付け後や消去訓練中の、スパイン形態の変化を解析する必要があると考える。

同時に今回の研究でみられたSPSラット海馬へのBDNFの投与によって恐怖記憶の消去障害が修復された結果は、SPSラットでみられた海馬スパインの変性によるBDNF分泌の低下から恐怖記憶の消去が進まない病態を形成している可能性が考えられた。

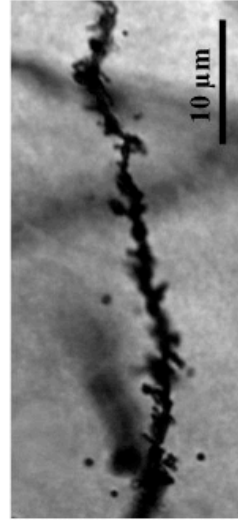
本研究の結果から推測されるPTSDの予防法としてはトラウマ体験後からのGR阻害薬の投与によるGRを介した海馬内遺伝子発現の変動を抑制する方法や、海馬でのBDNF濃度を増大させてトラウマに対する消去機能を促進させる対策などが有効と思われる。

# 海馬 Golgi染色

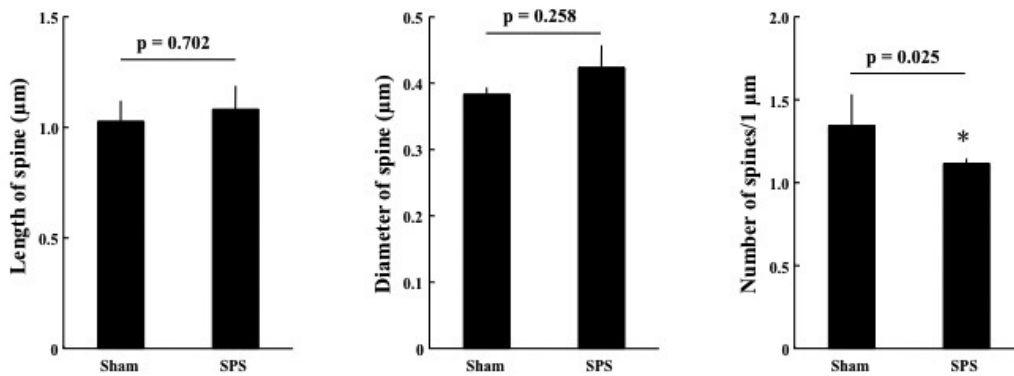
海馬CA1 (10x)



CA1 spine (60x)



## CA1分子層におけるspine



Sham n = 5, SPS n = 6

- A, SPS負荷ラットの海馬CA1領域のGolgi染色像 左側:海馬CA1 (10x)、右側:CA1スパイン (60x)  
B, SPS負荷ラットの海馬CA1分子層のスパイン形態の変化 左側:スパイン長、中側:スパイン径、右側:スパイン数 Sham n = 5, SPS n = 6

## NADPHオキシダーゼを介する精神疾患発症の新しい概念の開拓

(平成25年度～26年度)

公募班員 衣斐 督和 京都府立医科大学病態分子薬理学 講師

### 研究目的

生涯有病率が増加している精神疾患は、我が国において5大疾患に位置づけられ、可及的速やかな病態解明と新たな治療の確立が最重要課題となっている。精神疾患には遺伝・環境（ストレスなど）要因により引き起こされる種々の分子異常がその根底にある。しかしその複雑さ故に発症機序の十分な解明は進んでおらず、新たな治療薬の開発が滞っている現状である。特に環境因子が関与する発症機序の詳細は不明であるが、近年活性酸素種（ROS）による酸化ストレスの関与が示唆されている。このROSの産生源としてNADPHオキシダーゼに着目し、病態モデルでの行動発現機序と神経の形態・回路異常への関与を明らかにすることで、本酵素を介する精神疾患発症の新しい概念の開拓を行うことを目的とする。

### 研究背景

NADPHオキシダーゼは生体内の主要な活性酸素産生酵素であり、その触媒サブユニット（NOX）には複数の分子種が存在する。NOX2で構成されるNOX2/NADPHオキシダーゼが産生する過剰なROSは神経細胞死を惹起する。これに対し、新規分子種NOX1はROS産生能が低く、NOX2由来のROSとは異なるシグナル分子としての機能が想定されている。事実、ROSは細胞内機能分子に直接作用してその構造や機能を変化させることで活性を調節し、行動変化を引き起こすことを報告してきた。精神疾患には細胞死を伴わない高次脳機能障害を原因とすること、さらにROSによる酸化ストレスの関与が示唆されていることからNOX1に着目し、ストレスモデルで発現するうつ様行動における本酵素の役割を解析した<sup>4)</sup>。

### 研究結果

社会的敗北ストレスの暴露、またはコルチコステロン（CORT）の慢性投与により、野生型マウス（WT）において社会的行動、またはスクロース嗜好性の低下が認められた。しかし、Nox1欠損マウス（NOX1-KO）においてこれら低下が抑制されたことから、NOX1がうつ様行動発現に寄与することが示された。次にCORTによるNOX1 mRNA発現およびROS産生を検討した。NOX1に依存したROS産生は前頭前野（PFC）、NOX1 mRNA発現は腹側被蓋野（VTA）においてそれぞれ増加した。NOX1 mRNA発現を抑制する人工マイクロRNAを搭載したアデノ随伴ウイルスをVTAに微量注入すると、CORTによるROS増加とうつ様行動発現が抑制された。このことから、NOX1が関わるうつ様行動発現には、中脳皮質神経回路が寄与することが示唆された。

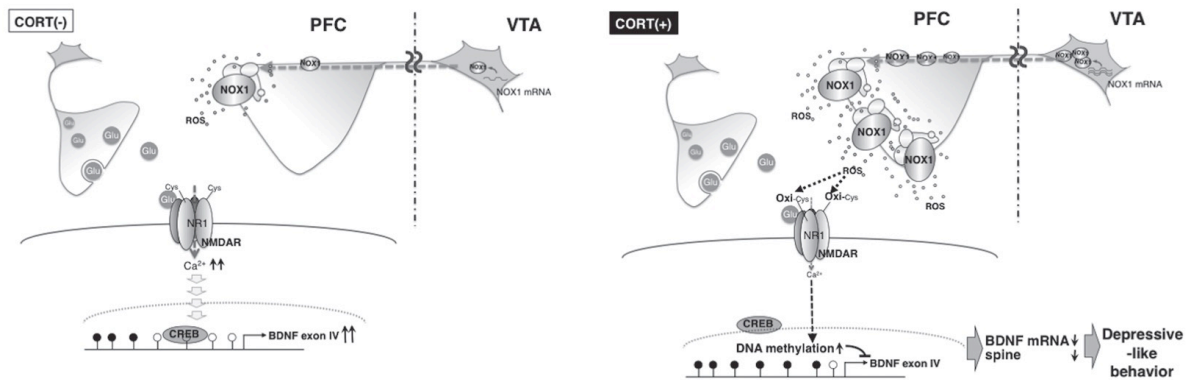
次に、うつ病態への関与が示唆されているBDNFの発現について検討した。ROS増加が認められたWTのPFCにおいて、CORTによりtotal BDNF mRNAとBDNF exon IV mRNAの発現が減少したが、NOX1-KOで認められなかった。また、これらmRNA発現減少はVTAのNOX1 mRNA発現と相関を示すこと、さらにBDNF exonIV mRNAの減少の機序としてDNAメチル化が寄与することを見出した。さらにBDNF mRNAの発現減少が認められたWTのPFCにおいて、CORTにより錐体細胞のスパン数が増加した。

NOX1から産生されるROSの標的分子を同定するため、タンパク分子の酸化修飾を網羅的に解析した。その結果、CORTによりNR1の<sup>744</sup>Cysの酸化修飾がNOX1-KOと比較してWTで増加した。NR1の<sup>744</sup>Cysのレドックス修飾はNMDA受容体機能を調節することが報告されている。そこでレンチウイルスにてNR1の変異体NR1 (C744A)を大脳皮質神経細胞に導入し、<sup>744</sup>Cysのレドックス修飾によるNMDA受容体機能を解析した。NMDA刺激によりBDNF exonIV mRNA発現の上昇がNR1またはNR1 (C744A)を過剰発現させた神経細胞で同程度認められた。しかし、過酸化水素存在下でNMDA刺激すると、BDNF exonIV mRNAの発現増加はNR1過剰発現させた神経細胞では有意に減少したが、NR1 (C744A)を過剰発現させた神経細胞ではその減少が抑制

された。この結果より、ROSによるNR1の酸化修飾はBDNF mRNAの発現減少に寄与することが示唆された。

## まとめ

NOX1はストレス、またはストレスホルモンにより惹起されるうつ様行動発現に寄与することが示され、その責任神経回路として中脳皮質回路が示唆された(図)。うつ様行動の発現機序として、PFCにおけるNOX1由来 ROSの増加がNR1の酸化修飾を亢進させ、その結果BDNF mRNA発現を減少させることが考えられる。今回、うつ病のマイクロエンドフェノタイプの候補として、NOX1由来ROSによるNR1の酸化修飾を見出すことができた。一方、PFCでのNR1の酸化修飾は、加齢に伴う注意力障害や認知障害に、またNMDA受容体機能低下は統合失調症との関連が示唆されていることから、これら神経機能障害に共通した機序としてNOX1を介したNMDA受容体機能低下が寄与する可能性が考えられ、今後さらなる解析が必要である。



NOX1によるうつ様行動発現の制御機構



# 心的外傷後ストレス障害(PTSD)における記憶情報処理の病態生理

(平成24年度～28年度)

公募班員 坂口 昌徳 筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構

## 研究目的

心的外傷（トラウマ）記憶などの記憶は、海馬で記録され固定化されると考えられている。一方、心的外傷後ストレス障害(PTSD)では、過剰に強いトラウマ記憶が脳内で処理できず、海馬および前前頭皮質の機能不全が起り、トラウマ記憶が引き起こす恐怖反応が制御不能になるとされている。結果として、軽微な刺激でも扁桃体の過活動が誘発され、フラッシュバックなどにより生じる恐怖反応が長期間持続する。本研究では、マウスの恐怖学習課題を用いて、トラウマ記憶のマイクロエンドフェノタイプの同定と、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 研究背景

PTSDの根幹症状のうち、動物モデルで扱えるものとして、24時間以上の長期間持続するトラウマ記憶とそれに付随する恐怖反応がある。PTSDの病態メカニズムとしては、恐怖反応を統御する扁桃体の制御機構の破綻、例えば前前頭皮質からの扁桃体の抑制の不足、および海馬からの扁桃体の過活動の維持などが原因と考えられている。PTSDの治療に効果の高い認知行動療法の一つに、Prolonged Exposure (PE)がある。PEの治療原理の一つは、患者にトラウマ記憶を繰り返し想起させ、記憶の正常な処理を促すことにある。逆に言えば、PTSDでは、通常生理的に起こるべき恐怖記憶処理機構に問題が生じていると言える。この正常に起こる処理機構として有力なのが、恐怖記憶の想起・再固定化中で起こる記憶の消去、そして、海馬から前頭葉を含む海馬外脳部位への恐怖記憶情報の転送（あるいは再整理）の機構である。

これまで、恐怖記憶情報の処理過程について多くの知見が得られた。HerryおよびLikhtikらは、マウスの恐怖記憶学習の際に、扁桃体に恐怖反応を惹起する細胞（恐怖細胞）、およびそれを抑制する細胞（恐怖消去細胞）が存在すること。そして恐怖細胞は、海馬から入力を受けること。恐怖消去細胞は前前頭皮質から入力を受けることを示唆した。一方で、Suzukiらは、恐怖記憶形成からの経過期間が、記憶消去の容易さに影響を及ぼすこと、Mamiyaらは前前頭皮質を障害すると恐怖記憶消去に障害がおこることを明らかにした。Kitamuraらは、海馬の神経の新生の程度により、恐怖記憶情報が海馬から海馬外へ転送される時間が変化することを示した<sup>8)</sup>。

## 研究結果

我々は、世界で初めて心的トラウマ直後に記憶汎化を引き起こしやすい時間帯が有ることと、その条件を見出した(図1)。具体的には、金属とプラスチック製の箱(A)で電気ショックを与えたマウスを形だけが異なる箱(B)へ入れた。そして、翌日再度AとBに入れ、恐怖記憶の想起によりマウスがおびえる反応を比較検討した。マウスが箱AとBを区別できていれば、Bでは電気ショックを受けていないのだから、おびえないはずである。しかし電気ショックから6時間以内にBに入れたマウスでは、翌日Bに入るとAとほぼ同じ程度おびえた。つまり、マウスはどちらの箱で電気ショックを受けたかの記憶が区別できなくなった(記憶の汎化が起こった)。これとは対照的に、Aと全く異なるガラス製の箱Cを用意しAとCで同様の実験を行ったが、マウスはCに入れてもおびえなかった。これらの知見から、トラウマから6時間以内に似た箱に入れるとその箱に汎化が起こることが示された。

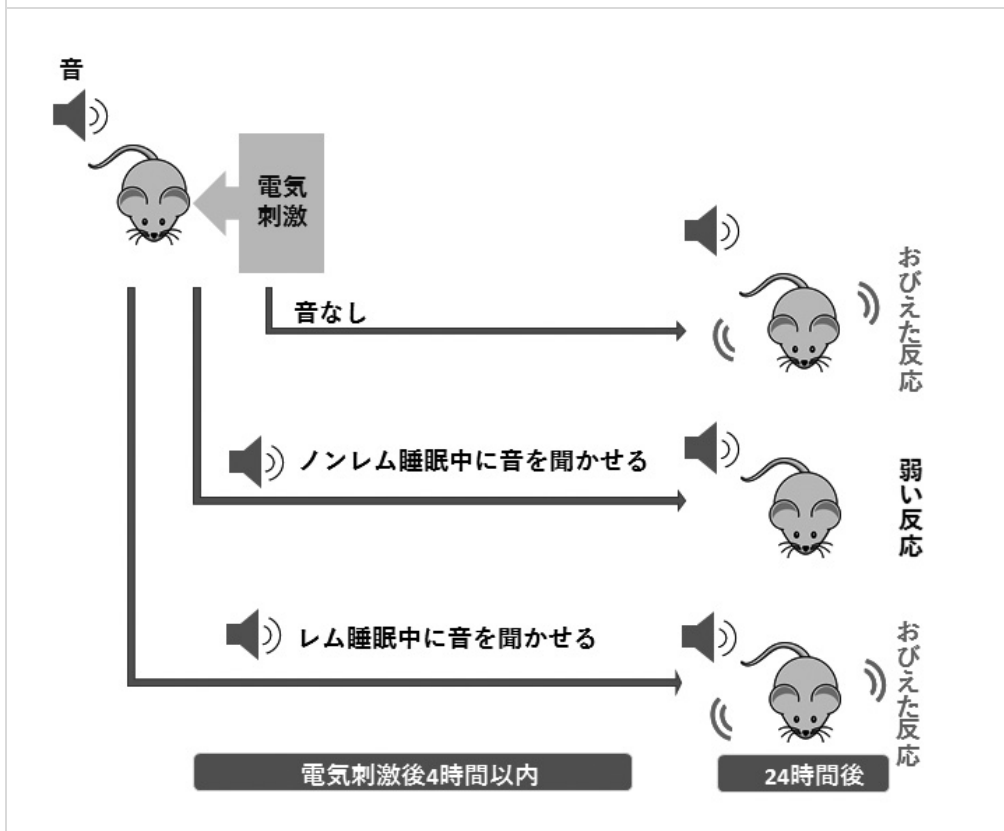
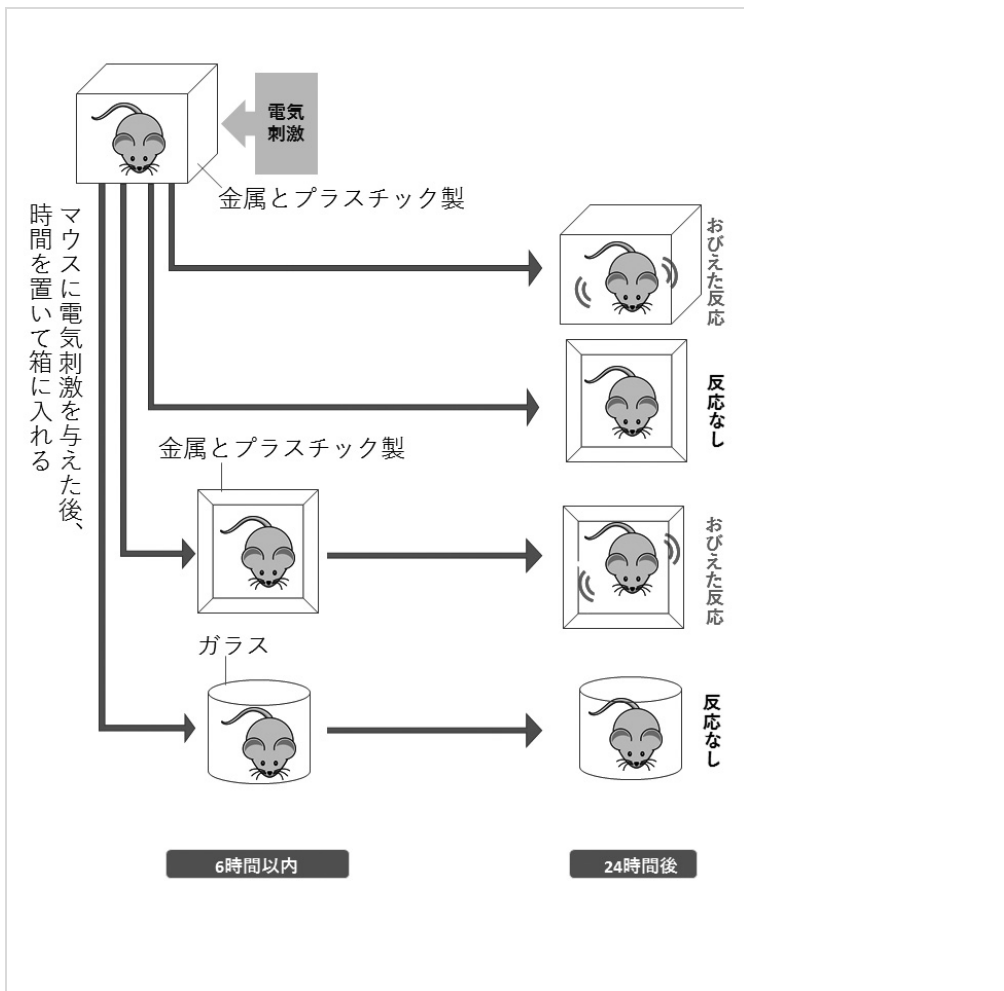
上記結果から、トラウマ学習直後にはその内容に変化が起こりやすい時間帯が有ることが示唆された。一方で、睡眠とトラウマ記憶の固定化の相関が注目されている。マウスはヒトと比べて睡眠サイクルが短く（約10数分程度で睡眠と覚醒を繰り返す）ため、学習直後からノンレムやレム睡眠を多く経験する。そこで、この時間帯の睡眠中に刺激を与えることで、トラウマ記憶に影響があるかを検討した(図2)。

マウスの睡眠は、脳波パターンに依存してレム睡眠およびノンレム睡眠の2つに分けられる。今回、特定の睡眠期に、恐怖学習に用いた音刺激を与えた場合の効果を検討することとした。音は、いつ刺激を与えるかをコントロールしやすいという利点がある。学習記憶課題としては、海馬依存性の有るTrace fear conditioningを用いることとした。この学習課題では、マウスには特段意味をなさない音を聞かせ、その20秒後に足に電気ショックを与える。これを繰り返すと、音電気ショックの前触れになることがマウスに記憶され、音を聞かせただけでおびえ反応を示すようになる。この20秒間の間隙中、マウスは音を聞いたことを覚えている必要がある。この実験上の操作により、このトラウマ記憶は海馬（と扁桃体）で記憶される様になるとされている。この学習の後、マウスを1. 学習に用いた音を聞かせない群（ホワイトノイズ群）、2. ノンレム睡眠、3. レム睡眠中に音を聞かせる群、の3つに振り分け、それぞれの群における恐怖反応を24時間後に再度音を聞かせることで判定した。レム睡眠に音を聞かせた群で、睡眠が若干程度ノンレム睡眠に移行しやすかったこと以外には、音を聞かせることが睡眠に対して大きな影響は認められなかった。また、この学習課題ではコンテキスト恐怖記憶も同時に測定可能であり、音を聞かせた影響をコンテキスト記憶には認めることはできなかった。最後に、テスト時に音を聞かせて反応を測定した所、2のノンレム睡眠時に音を聞かせたマウスのみにおいて、おびえ反応が減弱することが観察された。

## まとめ

日常生活において、強く感情を惹起する様な経験は、睡眠の質や、睡眠に関与する様々な現象（悪夢など）に影響を及ぼすことが経験される。PTSDの病態全てを動物実験で再現することは困難であるが、本研究のように、この記憶の汎化だけに対象を絞れば、動物実験でも検証が可能である。今回、我々はトラウマ記憶を受けた直後に記憶の汎化が起こりやすい時間帯が存在する、という一種のPTSDにおけるマイクロエンドフェノタイプの同定に成功した。

PTSDにおいて、治療により記憶が脳内から永遠に消え去ることは考えにくいだが、トラウマ記憶想起による情動反応が弱くなると、正常な日常生活が送れるようになる。現行の治療法でも非常に有効ではあるが、治療期間中に大きな心理的負荷を必要とすることや、期間が数ヶ月と長いこと、患者の治療意欲によって効果が大きく左右されること、などの問題点も指摘されている。今回我々は、音を用いて睡眠中に恐怖記憶を減弱できることを示した。本研究を通して、どの様にトラウマ記憶が脳内で処理され、その知見に基づいてPTSDの治療を改善していくことに貢献できればと考えている。



図左 恐怖記憶学習直後に、汎化が起こりやすい条件が存在する。学習直後の6時間以内に、学習に用いた箱に似て異なる箱に入れると、その箱に対しておびえ反応を示すようになる。図右 ノンレム睡眠中に音を聞かせることでおびえ反応を減弱させることに成功した。

## ストレス性精神疾患モデル動物における痛み情動回路の制御機構とその応用

(平成27年度～28年度)

公募班員 渡部 文子 東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・臨床医学研究所

### 研究目的

「痛み」など負の情動による恐怖記憶形成は、個体の生存維持に必須である一方、過度な恐怖記憶は心的外傷後ストレス障害（PTSD）やパニック障害など不安障害にもつながり、生活の質を大きく損なう。このような精神疾患の発症機構への手がかりとして、我々は橋の腕傍核から扁桃体に痛み信号を直接入力する「痛み直接回路」に着目した。この経路は慢性疼痛や恐怖記憶形成後にシナプス増強を示すことから、直接回路のシナプス増強による痛み負情動の破綻が情動障害に関与し、直接回路の可塑性破綻がマイクロ病態シナプスの本態であることが示唆される。そこで本領域では、痛み情動回路の可塑性を光遺伝学的に操作し、さらに情動障害を示すストレス性精神疾患モデル動物において破綻した恐怖記憶を再制御することを狙う。また、光誘発性電気生理学的解析により、病態シナプスの分子機構を解明し、得られた手がかりを行動レベルで検討することで、新たな治療法開発に繋がる基礎的知見を得ることを目指す。

### 研究背景

情動を担う扁桃体の中心核外包部（CeC）には、橋にある腕傍核（PB）から「痛み情報」が直接入力する。我々は、強い情動記憶形成後にPBシナプス増強が誘導されることを見出した（Watabe *et al.*, 2013）。また、このようなPBシナプス増強は、様々な慢性痛モデルでおこることも見出した（Ikeda *et al.*, 2007, Ochiai *et al.*, in prep）。これらの結果は、PBシナプス増強が負情動増悪因子となる可能性を示唆する。さらにPB活動を抑制すると情動記憶形成が顕著に障害されることも見出した。以上の知見から、PBシナプスは高い可塑性を持つこと、PB増強異常亢進という可塑性制御の破綻が、負情動増悪などを伴うストレス性精神疾患におけるシナプスレベルでのマイクロ病態であることが示唆される。そこで本研究では、PBシナプス可塑性の分子機構とその生理的意義の検討を行った。

### 研究結果

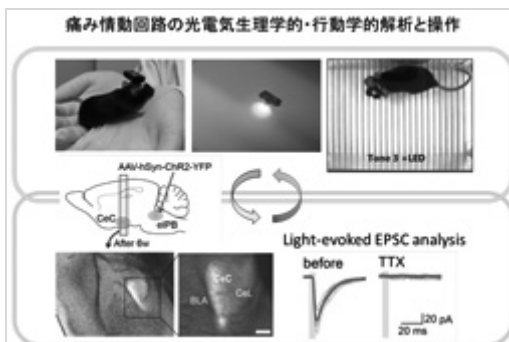
直接経路の起始核である腕傍核にチャンネルロドプシンを発現させ、投射先である扁桃体を可視化したところ、中心核の中でも特に外包部に強い発現が認められた。さらにこれらは単なる通過線維ではなく、機能的なシナプス結合を形成することを、プレシナプス光誘発興奮性後シナプス電流により確認した。さらにこれらの単シナプス入力が、炎症性疼痛モデル動物において顕著な増強を示すことを見出した（Sugimura *et al.*, 2016）。一方、個体レベルで光遺伝学的に痛み直接回路を光刺激したところ、まるであたかも痛み刺激を受けたかのような逃避行動を示した。さらに、この刺激を音刺激と連合提示したところ、人工的な恐怖記憶が形成された（Sato *et al.*, 2015）。

次に、1PBシナプス増強の分子メカニズムについて解析した。フォルマリン投与による炎症性疼痛モデル動物では、投与1時間以内に消失する急性疼痛行動と、投与6時間後にも継続するアロディニア（異痛症）が誘導されることが知られている。我々は、左後肢のフォルマリン投与6時間後において、プレシナプス性の長期増強を右扁桃体に見出した。さらに、痛みペプチドとして知られるカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）欠損マウスにおいて、このシナプス増強が顕著に減弱していることを見出した（Shinohara *et al.*, 2017）。興味深いことに、このシナプス増強は1時間で消失する急性疼痛行動とは相関を示さず、6時間後の投与側後肢のアロディニアと強い相関を示した。これらの結果から、直接経路シナプス増強に内在性CGRPが関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、痛み情動回路の制御破綻による病態シナプスが、慢性疼痛や恐怖記憶制御破綻などのマイクロエンドフェノタイプとして捉えられることが示唆された。

## まとめ

情動の座である扁桃体では、さまざまな感覚シグナルに情動的価値が付加される。このような連合により形成される情動記憶は、個体の生存に重要な鍵として機能する。扁桃体は機能や特性が異なる多数の神経亜核から構成されるが、従来の研究では外側核が視床や皮質からを介した感覚情報統合の責任領域として注目されてきた。今回我々は、このような経路とは独立に、腕傍核から扁桃体中心核への直接経路に着目した。今回見出された直接経路の可塑性異常は、慢性痛やストレス性疾患モデルにおけるマイクロエンドフェノタイプとなりうるものである。今後は、直接経路の可塑性メカニズムを、特に異なる時間経過に着目してより詳細に明らかにすることで、新たな治療法への開発に繋がる基礎的知見が期待できる。さらに、従来着目されていた視床や皮質を介した間接経路も、様々な疼痛モデルや恐怖記憶形成によってシナプス増強を示すことが知られる。CeCは間接経路と直接経路との連合の座とも捉えられることから、今後は両経路の相互作用やその生理的意義についても明らかにする必要がある。



痛み情動回路の解析と操作（上段）痛み情動回路を光遺伝学的に刺激することで、人工的な恐怖記憶を形成した。（下段）腕傍核からの投射線維は扁桃体中心核の外包部に特に強い単シナプス性の興奮性シナプス入力を示した。

## Microendophenotype Final Report 2

(平成24年度～28年度)

公募班員 Joshua Johansen 理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

### Research summary:

We elucidated an amygdala-to-midbrain feedback circuit which conveys information about future unpleasant experiences and inhibits aversive processing during learning to calibrate emotional memory strength (Ozawa *et al.*, 2017). Specifically we found that optogenetically inhibiting central nucleus of the amygdala projections to the midbrain periaqueductal gray disinhibited aversive shock responses when they were predicted by other sensory cues (Fig. 1). Furthermore, we found that inhibiting this pathway increased the strength of fear memories. This suggests a circuit microendophenotype for anxiety disorders in which dysregulation of this feedback pathway could predispose an individual to exaggerated fear learning and anxiety disorders. In addition to this project, we also published several other papers which were partially supported by funding from this grant. First, in theoretical/experimental work, we found that under ambiguous learning conditions when sensory outcome associations are unclear, animals use an inferential learning strategy and identified a novel role for the LA in regulating learning under uncertainty (Madarasz *et al.*, 2016). Second, we discovered that the brainstem locus coeruleus noradrenaline system is modularly organized and that this allows for the flexible specification of aversive emotional or flexible learning states (Uematsu *et al.*, in press)

