

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15050

研究課題名(和文)双極性障害治療薬の開発を目指した新規動物モデルの作製

研究課題名(英文)A new mice model of bipolar disease for the drug developments

研究代表者

新田 淳美(Nitta, Atsumi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：20275093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：双極性障害は、躁と鬱の両方が病態として観察され、思春期の男女で発症する疾病である。今まで、モデル動物もなく、病因が明確でないことから、抜本的な治療薬もなかった。我々は、Piccoloという分子を前頭葉皮質で減少させることで双極性障害モデルマウスの作成に成功した。さらに、本モデルを用いて、双極性障害の原因を解明するために、最新の光刺激反応実験と、我々が今までに培ってきたin vivo マイクロダイアリシス法または多電極細胞外電位記録システムを組み合わせることで、脳のどの部位のどの細胞の異常で双極性障害が発症する原因の一部を明らかにした。本モデルマウスを用いて、双極性障害治療薬の創生が期待される。

研究成果の概要(英文)：Bipolar disorder has both mania and depression phase and is occurred in adolescent period in human. There were no model animals when our study was started, because the cause of the disease was not clear, then there was no fundamental therapeutic medicines. We succeeded in creating bipolar disorder model mice by knock down of the psychological diseases-related molecule "Piccolo" in the frontal cortex. Furthermore, in order to elucidate the cause of bipolar disorder using this model, we conducted the optogenetics and the in vivo microdialysis method or multi-electrode extracellular potential recording system. We clarified the cause of the pathogenesis of bipolar disorder in part at the least. The mice model should be used for novel therapies for the bipolar disorder.

研究分野：神経精神薬理学、薬物治療学、医療薬学

キーワード：ピッコロ 双極性障害 光遺伝学 マウスモデル AAV 行動実験

1. 研究開始当初の背景

我々は、覚醒剤の連続投与による精神病モデル動物の脳内において著しく発現変動する遺伝子を探索し、タンパク質 Piccolo をコードする遺伝子 *PCLO* を見出した。Piccolo は、膵臓において、インスリンの分泌を調節するタンパク質として、1980 年代に見出されていたが、我々は、脳に存在し、生理機能を有することを今までに見出し、報告した。その後、国内外の多くのグループが研究を進展させ、Piccolo がプレシナプス細胞骨格マトリックスである active zone に局在しており、Q ドメイン、2 つの zinc finger ドメイン、3 つの coiled-coil ドメイン、PDZ ドメイン、2 つの Ca²⁺/phospholipid-binding (C2A および C2B) ドメインから構成される巨大なタンパク質であることも分かってきた。一方、最近の大規模な全ゲノム関連解析 (GWAS) では、*PCLO* intron 24 における一塩基多型 (SNP) rs13438494; c.15289-683A>C の C アレルが、双極性障害の関連危険因子であると報告されていた。さらに、この C アレルも持つ双極性障害患者の前頭前皮質では、*PCLO* mRNA の発現量が低下していることも報告されていた。そこで、我々は、これまでに *PCLO* intron 24 SNP に着目し、*PCLO* mRNA 発現に与える影響の検証を行っている。C アレル・ベクターを作製し、ヒト神経芽細胞腫 (HEK293) で発現させると、A アレルと比較して、intron 24 を含む mRNA の程度が異なることを検証し、報告している。さらに、日本人における臨床症状解析では、*PCLO* intron 24 SNP の C アレルが、摂食障害や精神刺激薬や鎮痛薬への要求性に関連していることも明らかにしている。本研究では、これらの知見をもととして、前頭前皮質内側部での Piccolo 発現低下による双極性障害モデル動物を作製しようとしたものである。

2. 研究の目的

双極性障害は、従来、躁うつ病と呼ばれていた病気であり、双極とは「2 つの極」という意味で、双極性障害は躁病の極とうつ病の極の両方をもつ気分障害を持つ疾病である。うつ病は、発生率が 3-5% (100 人中 3 から 5 人) であり、多くの患者がいる精神疾患であり、精神科医も、それぞれの患者に対して適切に投薬を含め治療を行っている。反面、うつ症状だけの単極性なのか、躁の病相を持つ双極性なのかの判断が難しく、治療の過程で、急に躁状態が表面化し、患者本人や家族を苦しめることとなっている。特に、うつ病の発症の年齢層が幅広く分布していることに対し、双極性障害は 20 歳代での発症が多く、

うつ病と診断された 10 から 20 歳代の患者の 2 割から 3 割が双極性障害に転じることから、学業や仕事および育児などへの支障が出て、本人のみならず、家族や周囲も、非常に大きな混乱が生じる。双極性障害の患者への薬物療法としては、気分安定薬、抗精神病薬、抗うつ薬、睡眠薬を患者ごとに適切に処方しているのが現状であり、双極性障害治療薬の開発は遅れている。開発が遅れている原因としては、病態を反映した適切なモデル動物が存在しなかったことが最も大きな原因である。表現系として、躁と鬱の逆の病態が観察されるモデルの作成は不可能と考えられていたが、我々は、今までに得られた実験成果をもとに *PCLO* 遺伝子にさまざまなプロモーター遺伝子を結合させ、さらに、アデノ随伴ウイルスベクターを用いることで、細胞種特異的にマウス脳で *PCLO* の発現を増加させることで作成が可能と考え、新規動物モデルの作成を目指した。

3. 研究の方法

(1) 双極性障害モデルマウスの作製と有用性解析

① 前頭前皮質 Piccolo 発現抑制マウスの作製 前述のように、*PCLO* mRNA の発現は、双極性障害患者の前頭前皮質において低下している。そこで、AAV-ChR2-mi*PCLO* ベクターを構築し、それをマウスの前頭前皮質に注入することによって、前頭前皮質特異的に *PCLO* をノックダウンしたマウスを作製した。

② 行動薬理学的解析

①に述べた前頭前皮質 Piccolo 発現抑制マウスを用いて、精神症状を評価するために図 1 に示す行動薬理学的モデル実験を行った。

双極性障害モデル動物としての表面的妥当性を検討した。さらに、既存の治療薬物の投与による行動障害の改善 (予測的妥当性) を検討した。

躁様症状: 運動量測定・聴覚性プレパルス抑制試験 (ドパミン神経機能障害)

うつ様症状: 強制水泳試験・尾懸垂試験・社会性相互作用試験 (セロトニン神経機能障害)

不安様症状: 高架式十字迷路試験・明暗箱試験 (γ -アミノ酪酸神経機能障害)

認知症状: 新奇物質認知試験・連合学習試験・短期作業記憶試験 (グルタミン酸神経機能障害)

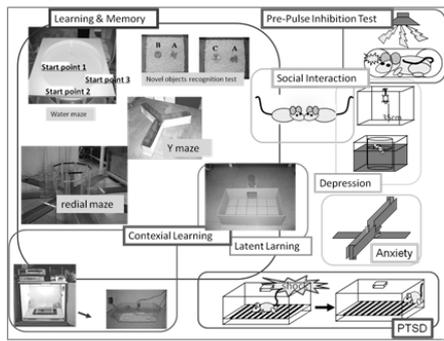


図1. 実験に用いた行動解析装置

③ オプトジェネティクス法を用いた神経伝達物質放出

遺伝子組み換えを行い光感受性遺伝子と *PCLO* 遺伝子の両方を発現増強したマウス脳で、光刺激システムと *in vivo* マイクロダイアリシスまたは多電極細胞外電位記録システムを組み合わせて実験を実施した (図2)。

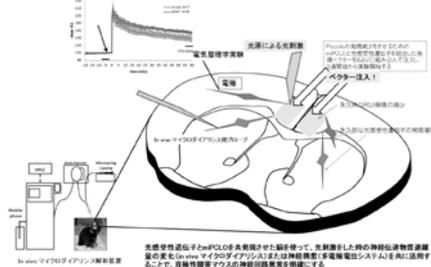


図2 オプトジェネティクス法および *in vivo* マイクロダイアリシス法の確立

4. 研究成果

(1) miPCLO-AAV の前頭前皮質への注入による発現減少

miPCLO-AAV を前頭前皮質へ注入し、4週間後にマウスの脳を取り出した。PCLO mRNA 量と Piccolo タンパク質量を RT-PCR 法および Western Blotting 法でそれぞれ測定したところ、いずれも、有意に発現量が低下していた。

(2) 双極性障害モデルマウスの作製と有用性解析

前頭前皮質で PCLO 遺伝子の発現量を減少していることを確認した。本マウスでは、コントロールマウスと比較して行動量の増強、プレパルスインヒビション能力の低下が観察され、さらに、うつ様の症状も示された。これらのことから病態モデルとしての表面的妥当性が示された。また、これらの行動異常は、抗精神病薬にて改善されたことから、予測的妥当性も確認することができた。以上のことから、本マウスが双極性障害のモデルマウスとして有用であることが分かった。

(3) オプトジェネティクス法を用いた神経伝達物質放出

遺伝子組み換えを行い光感受性遺伝子と *PCLO* 遺伝子の両方を発現増強したマウス脳で、光刺激システムと *in vivo* マイクロダイアリシス法でグルタミン酸やドーパミン量を測定したところ、神経刺激時の放出量が有意に変化していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① [Uno K](#), [Miyazaki T](#), [Sodeyama K](#), [Miyamoto Y](#), [Nitta A](#) Methamphetamine induces Shati/Nat8L expression in the mouse nucleus accumbens via CREB- and dopamine D1 receptor-dependent mechanism. *PLoS One*. 2017; 12: e0174196 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0174196
- ② [Fu K](#), [Lin H](#), [Miyamoto Y](#), [Wu C](#), [Yang J](#), [Uno K](#), [Nitta A](#) Pseudoginsenoside-F11 inhibits methamphetamine-induced behaviors by regulating dopaminergic and GABAergic neurons in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016 Mar; 233(5): 831-840. 査読有 doi: 10.1007/s00213-015-4159-8
- ③ [Uno K](#), [Kikuchi Y](#), [Iwata M](#), [Uehara T](#), [Matsuoka T](#), [Sumiyoshi T](#), [Okamoto Y](#), [Jinno H](#), [Takada T](#), [Furukawa-Hibi Y](#), [Nabeshima T](#), [Miyamoto Y](#), [Nitta A](#) Decreased DNA methylation in the Shati/Nat8l promoter in both patients with schizophrenia and a methamphetamine-induced murine model of schizophrenia-like phenotype. *PLoS One*. 2016 Jun 27; 11(6): e0157959. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0157959
- ④ [Uno K](#), [Nishizawa D](#), [Seo S](#), [Takayama K](#), [Matsumura S](#), [Sakai N](#), [Ohi K](#), [Nabeshima T](#), [Hashimoto R](#), [Ozaki N](#), [Hasegawa J](#), [Sato N](#), [Tanioka F](#), [Sugimura H](#), [Fukuda KI](#), [Higuchi S](#), [Ujike H](#), [Inada T](#), [Iwata N](#), [Sora I](#), [Iyo M](#), [Kondo N](#), [Won MJ](#), [Naruse N](#), [Uehara-Aoyama K](#), [Itokawa M](#), [Yamada M](#), [Ikeda K](#), [Miyamoto Y](#), [Nitta A](#): The piccolo intronic single nucleotide polymorphism rs13438494 regulates dopamine and serotonin uptake and shows associations with dependence-like behavior in genomic association study. *Cur. Mol. Med*. 2015, 15: 265-274. 査読有 doi: 10.2174/1566524015666150 3301

- ⑤ Ohara M, Tomoda F, Koike T, Liu H, Uno K, Nitta A, Inoue H: Pubertal administration of antiserum against nerve growth factor regresses renal vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015, 42: 687-694. 査読有 doi: 10.1111/1440-1681.12411.
- ⑥ Sumi K, Uno K, Matsumura S, Miyamoto Y, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Nitta A: Induction of neuronal axon outgrowth by Shati/Nat8l by energy metabolism in mice cultured neurons. *Neuroreport*. 2015, 26: 740-746. 査読有 doi: 10.1097/WNR.0000000000000416.
- ⑦ Toriumi K, Mamiya T, Song Z, Honjo T, Watanabe H, Tanaka J, Kondo M, Mouri A, Kim HC, Nitta A, Fukushima T, Nabeshima T. Deletion of SHATI/NAT8L decreases the N-acetylaspartate content in the brain and induces behavioral deficits, which can be ameliorated by administering N-acetylaspartate. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015 Nov; 25(11): 2108-2117 査読有 doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.08.003
- ⑧ Nakayama C, Oshima T, Kato A, Nitta A: Development of a communication learning program for pharmacists. *Jap J Pharm Health Care Sci*. 2015 Feb; 41(2): 80-92. 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphcs/41/2/41_80/_pdf
- [学会発表] (計 54 件)
- ① 濱谷康平, 宮本嘉明, 稲垣 良, 佐藤慶治, 村松慎一, 宇野恭介, 新田淳美: 前頭前皮質 Piccolo ノックダウンマウスにおけるマイルドストレス暴露は、うつ様行動を誘発する。第 90 回日本薬理学会年会; 2017 Mar15-17; 長崎ブリックホール, 長崎新聞文化ホール アストピア(長崎県・長崎市).
- ② Miyamoto Y, Fu K, Iegaki N, Sumi K, Furukawa-Hibi Y, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K, Nitta A: N-acetylaspartate synthetase Shati/Nat8l-overexpressed mice. *Neuroscience* 2016; 2016 Nov 11-15; San Diego (USA).
- ③ Fu K, Miyamoto Y, Saika E, Muramatsu S, Uno K, Nitta A: Effects of TMEM168

overexpression on methamphetamine-induced hyperlocomotion and place preference, and anxiety in mice via regulating dopaminergic and GABAergic neuronal systems in the nucleus accumbens of mice. *Neuroscience* 2016; 2016 Nov 11-15; San Diego (USA).

- ④ 宇野恭介, 葛斌, 村松慎一, 日比陽子, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美: マウス側坐核における Piccolo ノックダウンのドパミン遊離とメタンフェタミン誘発行動抑制作用. 平成 28 年度日本アルコール・アディクション医学会学術総会; 2016 Oct 7-8; タワーホール船堀(東京都・江戸川区)
- ⑤ 袖山健吾, 宮崎杜夫, 宇野恭介, 鷺見和之, 藤原俊幸, 村松慎一, 宮本嘉明, 新田淳美: マウス線条体における Shati/Nat8l 過剰発現のうつ病発症に対する脆弱性形成作用. 第 67 回日本薬理学会北部会; 2016 Sep 30; 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市).
- ⑥ 大竹和弥, 宮本嘉明, 傅柯荃, 徐承姫, 上野優香, 齋鹿絵里子, 村松慎一, 宇野恭介, 新田淳美: 薬物依存形成メカニズムにおける膜貫通タンパク質 TMEM168 の関与. 第 67 回日本薬理学会北部会; 2016 Sep 30; 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市).
- ⑦ 新田淳美: 新規分子 Shati/Nat8l の基礎研究成果をもととしたトランスレショナルリサーチ. 第 18 回応用薬理シンポジウム; 2016 Aug 5-6; 名古屋大学 医学部 医系研究棟 1 号館(地下会議室)(愛知県・名古屋市).
- ⑧ 宮本嘉明, 家垣典幸, 傅柯荃, 鷺見和之, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美: マウス線条体での N-アセチルアスパラギン酸合成酵素 Shati/Nat8l 過剰発現によるうつ病モデル動物の開発. 第 13 回うつ病学会総会; 2016 Aug 5-6; ウィンクあいち(愛知県産業労働センター)(愛知県・名古屋市).
- ⑨ 宇野恭介, 宮崎杜夫, 宮本嘉明, 袖山健吾, 新田淳美: 精神疾患関連遺伝子 Shati/Nat8l の遺伝子発現メカニズムの解析. 第 18 回応用薬理シンポジウム; 2016 Aug 5-6; 名古屋大学 医学部 医系研究棟 1 号館(地下会議室)(愛知県・名古屋市).

- ⑩ 宮本嘉明, 稲垣良, 佐藤慶治, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美.: 前頭前皮質のプレシナプス細胞質マトリックスタンパク質 Piccolo と精神疾患様行動との関連. 第46回日本神経精神薬理学会; 2016 Jul 2-3; COEX (韓国・ソウル市).
- ⑪ 袖山健吾, 藤原俊幸, 宮崎杜夫, 宇野恭介, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス背側線条体における N-アセチル転移酵素 Shati/Nat8L の過剰発現のうつ様行動増強作用. 第46回日本神経精神薬理学会; 2016 Jul 2-3; COEX (韓国・ソウル市).
- ⑫ 新田淳美, 宮崎杜夫, 菊地佑, 袖山健吾, 日比陽子, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 宇野恭介.: マウス側坐核における Shati/Nat8L の発現制御メカニズム. 第46回日本神経精神薬理学会; 2016 Jul 2-3; COEX (韓国・ソウル市).
- ⑬ 葛斌, 森下誠也, 宇野恭介, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス側坐核におけるピッコロノックダウンによるメタンフェタミン薬理作用への抑制効果. 第46回日本神経精神薬理学会; 2016 Jul 2-3; COEX (韓国・ソウル市).
- ⑭ 傅柯荃, 宮本嘉明, 林慧洋, 呉春福, 楊静玉, 宇野恭介, 新田淳美.: メタンフェタミン誘発行動異常に対するドパミンおよび GABA 作動性神経系を介したアメリカ人参成分 Pseudoginsenoside-F11 の抑制作用. 第46回日本神経精神薬理学会; 2016 Jul 2-3; COEX (韓国・ソウル市).
- ⑮ Sodeyama K, Fuzisawa K, Miyazaki T, Uno K, Muramatsu S, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A.: Overexpression of Shati/Nat8L in the dorsal striatum induces depression-like behaviors in mice. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology; 2016 Jul 3-5; Seoul (Korea).
- ⑯ Ge B, Morishita S, Uno K, Muramatsu S, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A.: Knockdown Piccolo suppressed Methamphetamine-induced behavioral changes and dopamine release in the nucleus accumbens of mice. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology; 2016 Jul 3-5; Seoul (Korea).
- ⑰ Fu K, Miyamoto Y, Lin H, Wu C, Yang J, Uno K, Nitta A.: Pseudoginsenoside-F11 inhibits methamphetamine dependence by regulating GABAergic and opioidergic neuronal system in the nucleus accumbens of mice 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology; 2016 Jul 3-5; Seoul (Korea).
- ⑱ Miyamoto Y, Inagaki R, Sato K, Muramatsu S, Nabeshima T, Uno K, Nitta A.: Presynaptic protein Piccolo knockdown in the prefrontal cortex induces cognitive and emotional impairment in mice. 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology; 2016 Jul 3-5; Seoul (Korea).
- ⑲ 新田淳美.: マウス in vivo マイクロダイアリス法を用いた薬物依存研究. 第55回日本生体医工学会大会; 2016 Apr 26-28; 富山国際会議場大手町フォーラム(富山県・富山市).
- ⑳ 葛斌, 宇野恭介, 森下誠也, 村松慎一, 宮本嘉明, 新田淳美.: メタンフェタミン誘発行動変化とドパミン遊離をマウス側坐核でのピッコロノックダウンは抑制する. 日本薬理学会第89回年会; 2016 Mar 9-11; パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- ㉑ 佐藤慶治, 宮本嘉明, 稲垣良, 袖山健吾, 宇野恭介, 村松慎一, 鍋島俊隆, 新田淳美.: 精神疾患におけるプレシナプス性タンパク質 Piccolo の関連. 日本薬理学会第89回年会; 2016 Mar 9-11; パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- ㉒ 傅柯荃, 宮本嘉明, 林慧洋, 呉春福, 楊静玉, 宇野恭介, 新田淳美.: ドパミンおよび GABA 作動性神経系を介するアメリカ人参由来サポニン PF11 のメタンフェタミンによる行動変化への抑制作用. 日本薬理学会第89回年会; 2016 Mar 9-11; パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- ㉓ Kequan Fu, Yoshiaki Miyamoto, Eriko Saika, Shin-ichi Muramatsu, Kyosuke Uno, Atsumi Nitta.: Accumbal TMEM168 overexpression in mice inhibits methamphetamine-induced hyperlocomotion and CPP. 平成27年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術

総会; 2015 Oct 11-13; 神戸国際会議場・
(兵庫県・神戸市).

- ②④ 新田淳美. : マウス前頭前皮質における Piccolo 発現低下による統合失調症様行動の誘導. 第 45 回日本神経精神薬理学会年会; 2015 Sep 24-26; タワーホール船堀(東京都・江戸川区).
- ②⑤ 岩田美奈, 宇野恭介, 宮崎杜夫, 袖山袖山健吾, 山森英長, 藤本美智子, 安田由華, 橋本亮太, 宮本嘉明, 鍋島俊隆, 武田雅俊, 新田淳美. : 精神疾患患者における末梢血中 SHATI/NAT8L の DNA メチル化率の低下. 第 45 回日本神経精神薬理学会年会; 2015 Sep 24-26; タワーホール船堀(東京都・江戸川区).
- ②⑥ 宮本嘉明, 佐藤慶治, 稲垣良, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美. : マウス前頭前皮質での Piccolo ノックダウンによるシナプス機能障害. 第 45 回日本神経精神薬理学会年会; 2015 Sep 24-26; タワーホール船堀(東京都・江戸川区).
- ②⑦ 宇野恭介, 鷺見和之, 松村祥平, 宮本嘉明, 古川-日比陽子, 鍋島俊隆, 村松慎一, 新田淳美. : 培養神経細胞における精神疾患関連分子 Shati/Nat8l の突起伸長への影響. 第 66 回日本薬理学会北部; 2015 Sep 18; 富山国際会議場大手町フォーラム(富山県・富山市).
- ②⑧ Nitta Atsumi, Sumi Kazuyuki, Uno Kyosuke, Matsumura Shohei, Miyamoto Yoshiaki, Furukawa-Hibi Yoko, Muramatsu Shin-ichi, Nabeshima Toshitaka. : Shati/Nat8l induces axon outgrowth via energy metabolism in the primary cultured neurons of mice. 第 58 回日本神経化学会大会; 2015 Sep 11-13; 大宮ソニックシティ(埼玉県・大宮市).
- ②⑨ 新田淳美, 稲垣良, 佐藤慶治, 村松慎一, 鷺見和之, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 宮本嘉明. : マウス前頭前皮質における Piccolo の発現低下による神経機能障害. 生体機能と創薬シンポジウム 2015; 2015 Aug 27-28; 日本大学薬学部(千葉県・船橋市).

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: プロポリスのミセル化抽出物を有効成

分とする認知機能改善剤

発明者: 新田淳美, 鷺見和之, 野池悠, 宇野恭介

権利者: 富山大学長

種類: 特願

番号: 2016-151747

出願年月日: 2016 年 8 月 2 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/yakuchi/top.html>

<http://sai-jisedai.jugem.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新田 淳美 (Nitta, Atsumi)

富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)
教授

研究者番号: 20275093

(2) 研究分担者

宮本 嘉明 (Miyamoto, Yoshiaki)

富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)
准教授

研究者番号: 20449101

宇野 恭介 (Uno, Kyosuke)

富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)
助教

研究者番号: 30608774

(3) 連携研究者

村松 慎一 (Muramatsu, Shin-Ichi)

自治医科大学医学部
教授

研究者番号: 10239543