

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号： 19790844  
 研究課題名 (和文) 双極性障害モデル動物を用いた新規気分安定薬候補物質の検討  
 研究課題名 (英文) Effects of drug acting on mitochondrial calcium uptake in model mice for bipolar disorder  
 研究代表者  
 窪田 美恵 (KUBOTA MIE)  
 独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・研究員  
 研究者番号：90344035

## 研究成果の概要：

双極性障害モデル動物である脳内mtDNA変異蓄積マウスを用い、ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>制御異常を調べたところ、変異マウス脳ミトコンドリアでは、Ca<sup>2+</sup>取り込み速度亢進が観察された。この分子機構と変異マウスで観察された異常行動との関連について調べるため、CypD阻害剤の輪回し行動に対する影響を検討した。CypD阻害剤を変異マウスに約2週間、連続的に腹腔内投与し、輪回し行動を観察したところ、約1週間後から行動異常は徐々に減少し、2週間後には有意に減少した。ミトコンドリア機能を標的とした薬剤が、新たな奏効機序を持つ気分安定薬候補物質になる可能性が考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	17,000,000	0	17,000,000
2008年度	16,000,000	480,000	20,800,000
年度			
年度			
年度			
総計	33,000,000	480,000	37,800,000

## 研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 精神神経科学

キーワード：ミトコンドリア、双極性障害、精神薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 双極性障害における双極性障害における遺伝学的解析、および磁気共鳴スペクトロスコーピー法による脳画像解析を用いた研究により、ミトコンドリアDNA (mitochondrial DNA; mtDNA) 異常との関連が示唆されている (Kato T, Kato N, Bipolar Disord., 2, 180-190, 2000)。このミトコンドリア機能障

害仮説に基づき、変異ミトコンドリア DNA polymerase (mutant polymerase ; *mutPolg1*) を神経特異的に導入し、mtDNA 変異を脳内に蓄積するトランスジェニック (transgenic; Tg) マウスを作成した。この *mutPolg1* Tg マウスでは、加齢に伴う mtDNA 変異増加が確認され、長期行動観察の結果、患者に似た周期的行動量変化を示し、気分安

定薬の効果が認められた (Kasahara, T. *et al.*, *Mol Psychiatry*, 11, 577-593, 2006)。(2) 患者末梢血を用いた研究結果で、Ca<sup>2+</sup>シグナリング異常が知られているため、このマウス神経細胞をモデルとして細胞内Ca<sup>2+</sup>動態を調べた。神経細胞の活動と細胞内シグナリングを介したCa<sup>2+</sup>上昇は*mutPolg1* Tgマウス海馬神経細胞では減少していた。また、単離ミトコンドリア分画を用いたCa<sup>2+</sup>取り込み能測定では、*mutPolg1* TgマウスミトコンドリアではCa<sup>2+</sup>取り込み速度亢進が観察された。ミトコンドリアは細胞質からCa<sup>2+</sup>を取り込み、取り込まれたCa<sup>2+</sup>はミトコンドリア透過性遷移 (mitochondrial permeability transition pore; mPTP) 開口を介して排出される。mPTP開口はミトコンドリアマトリックス、および内膜 (inner membrane; IM)、外膜 (outer membrane; OM) 上に局在する多数のタンパク質から構成されることが知られており、外膜上の代表的な構成タンパク質は電位依存性陰イオンチャネル (voltage-dependent anion channel; VDAC)、ベンゾジアゼピン受容体 (benzodiazepine receptor (Bzrp), ヘキソキナーゼ (hexokinase; HK)、クレアチンキナーゼ (creatine kinase; Ckmt) などである (図1)。また、mPTP開口には外膜上のタンパク質だけでなく、内膜上のアデニンヌクレオチド輸送体 (adenine nucleotide translocator; ANT)、マトリックスに存在するシクロフィリンD (Cyclophilin D; CypD) の結合が必要であることが提唱されている。CypD/ANTの結合阻害剤であるシクロスポリンA (Cyclosporin A; CsA) はmPTP開口のCa<sup>2+</sup>

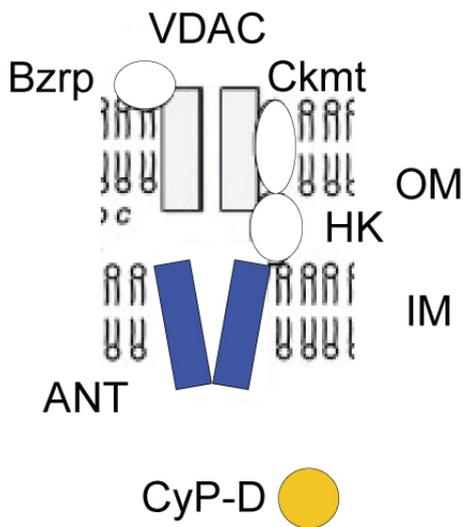


図1 推定されているミトコンドリア透過性遷移の構成タンパク質

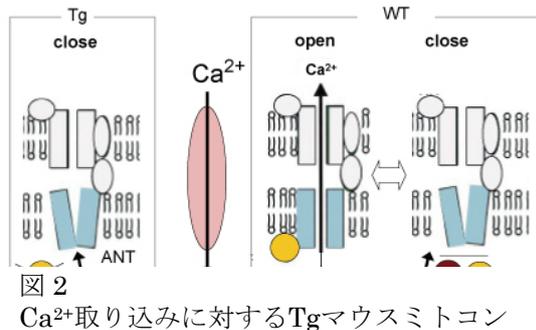


図2 Ca<sup>2+</sup>取り込みに対するTgマウスミトコンドリアでのCypD減少の影響、およびWTマウスミトコンドリアでのCypD阻害薬、CsAの影響

感受性を調節するとされている。このマウスにおける遺伝子発現解析ではCypDの発現低下が見られ、CsA存在下での野生型マウスミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>取り込み速度は亢進した。これらの結果は*mutPolg1* Tgマウスの脳ミトコンドリアにおけるCa<sup>2+</sup>取り込み速度亢進がCypD/ANTの結合を介したmPTP開口に関連することを示唆した (図2)。(Kubota, M. *et al.*, *J Neurosci*, 26, 12314-12324, 2006)

mtDNA変異を持つマウスミトコンドリアによるCa<sup>2+</sup>取り込み能変化は細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナリング変化の分子基盤として新規気分安定薬の標的となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

周期的行動変化、モノアミンレベル異常、神経細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナル変化、およびミトコンドリアCa<sup>2+</sup>制御異常を示す*mutPolg1* Tgマウスを双極性障害モデル動物として用いて行動異常を改善する候補物質を検討し、新規気分安定薬開発をめざした基礎的研究を行うことである。

## 3. 研究の方法

(1) mPTP阻害薬の単離ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>取り込み能への影響を確認するために測定系の確立を行った。従来の方法における弊害として、①脳由来ミトコンドリアをCa<sup>2+</sup>取り込み能測定に用いる場合には、活性の高いミトコンドリアを用いる必要があること、②マウス1個体の脳ホモジネートより利用できるミトコンドリア量に限界があり、mPTP阻害薬の影響を確認する際には、複数回の単離操作が必要であること、③*mutPolg1* Tgマウス由来ミトコンドリアを用いて測定する際には、同条件でCa<sup>2+</sup>濃度変化を測定でき、野生型との比較ができる系が必要であった。そのため、96穴プレートを用いた多サンプル同時Ca<sup>2+</sup>濃度測定装置を用いた測定系を確立した。*mutPolg1* Tgマウス、および野生型マウス脳から単離したミトコンドリアを用いて、分光蛍光光度計による同時測定を行った。既知濃

度Ca<sup>2+</sup>液を連続投与後、ミトコンドリア外液に含まれるCa<sup>2+</sup>感受性色素 (CaGreen-5N) の蛍光強度変化からミトコンドリア外液のCa<sup>2+</sup>濃度変化を記録した。Ca<sup>2+</sup>投与に伴う一過性の濃度上昇後、ミトコンドリアの取り込みに従って減少する蛍光強度からその減衰時間を解析した。mPTP開口はミトコンドリア内膜、および外膜に存在するタンパク質から構成される。mPTP開口を阻害するCsAやその類似体であるN-methyl-4-isoleucine cyclosporine (NIM811)をCypD阻害薬として用い、その濃度依存性やミトコンドリアの反応性を野生型マウス由来のミトコンドリア分画と比較した。

単離操作には当センター所有の超高速遠心機を使用し、Ca<sup>2+</sup>測定/解析は当研究室に備えられた多サンプル同時Ca<sup>2+</sup>濃度測定装置 (FDSS 3000) を用いて行った。

(2) 単離ミトコンドリアでの測定から、行動異常を改善させる薬剤の *in vivo* での検討を行った。投薬効果を確認するため、腹腔内投与を連続的に行い、数週間の行動異常の変化を観察した。周期的行動量の変動とミトコンドリアへの作用との関係性を調べるため、行動学的測定を行った個体の脳サンプルを用いて脳内薬物濃度を検出し、薬剤の脳内移行について確認した。行動学的測定/解析は、当研究機関に整備されている装置、および解析システムを使用した。動物の系統維持と管理、および行動学的解析はチーム内の共同研究者の支援を得て行った。

#### 4. 研究成果

(1) 96穴プレートを用いた多サンプル同時Ca<sup>2+</sup>濃度測定装置を用いた測定系の確立により、これまで1回の測定に必要な脳ミトコンドリアタンパク量に比べ、約1/8量で測定可能になった。また、野生型マウス脳から単離したミトコンドリアにおいて従来から用いられているPTP開口阻害剤である、CsA、その類似薬であるNIM811がミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>取り込み閾値を上昇させ、取り込み速度も亢進させることを確認した。各薬剤の濃度依存的效果を精度良く評価することが可能になった。また、CsAだけでなく、PTP機能を阻害することが知られているボンクレキシン酸やADPによってもCa<sup>2+</sup>取り込み速度が亢進することを確認した。これらの薬物は*mutPolg1* Tgマウス脳ミトコンドリアにおいてもPTP抑制作用、Ca<sup>2+</sup>取り込み亢進作用を示した。このことからCypD発現減少が主に*mutPolg1* Tgマウス脳ミトコンドリアにおけるCa<sup>2+</sup>取り込み亢進作用の原因となる分子機構である可能性が示唆された。

(2) CsAはミトコンドリアだけでなく、細胞質にあるカルシニューリンなど他のタンパク質への作用点も考えられている。また、脳

血液関門 (Blood Brain Barrier: BBB) を通過しにくい性質が知られているため、*in vivo* でもミトコンドリア特異的作用が示唆されているCsA類似薬であるNIM811を利用した。まず、行動異常に対する影響を調べるための予備実験として、*in vivo*での濃度依存的な脳内移行を確認した。野生型マウスにNIM811、およびCsA (5-50 mg/kg)の連続2週間投与を行い、脳内薬物濃度を確認した。CsA、NIM811 (5 mg/ml)投与群ではどちらの薬剤においても脳内濃度が検出されなかったが、20 mg/ml以上の濃度では、濃度依存的な薬物量の脳内薬物濃度が観察された。

輪回し行動テストにおいて、*mutPolg1* Tgマウスは明期開始後にもかかわらず、行動が抑制されない異常が観察されており、それを指標として薬剤投与の効果を観察した。NIM811 (40 mg/ml)を投与開始後、7-16日間の平均値を比較したところ、生食投与群に比べて異常行動は減少傾向を示した。これらのマウスの脳内では十分な薬剤濃度を検出できたため、薬剤がBBBを通過して作用したことが示唆された。薬剤濃度の結果と一致して、5 mg/ml投与群では、異常行動に対する抑制効果も観察されなかった。これらの結果から、ミトコンドリアにおいてCypD阻害作用、およびPTP抑制を介してNIM811が*mutPolg1* Tgマウスの異常行動を抑制することが示唆された。

これまでに精神疾患の病態モデル動物の開発例は少なく、特に双極性障害に焦点を当てたモデル動物は、うつ病モデル、統合失調症モデルに比べて報告例が少ない。また、動物モデルとしての妥当性を検証した研究例やそのモデルを薬剤開発や新規治療に向けて有効に利用した報告も少ない。その中で本研究は、臨床所見から得られた“ミトコンドリア障害仮説”を基盤として、作成された動物モデルの有用性を示唆する基礎的研究として位置づけられると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計3件)

・ Mie Kubota, Effects of drug acting on mitochondrial calcium uptake in mutant POLG transgenic mice, 2nd World Federation of Societies of Biological Psychiatry Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of Japan Societies Biological Psychiatry (2008年9月12日)、Toyama

・ Mie Kubota, Abnormal mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dynamics and behavioral phenotypes in

transgenic mice with mitochondrial DNA defects, The 7th European Meeting on Mitochondrial Pathology (2008年6月12日)、Stockholm

・ Mie Kubota, Gene Expression Profile in the Brain of Animal Model for Bipolar Disorder, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Integrative Approaches to Brain Complexity (2007年9月27日)、Cambridge

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

窪田 美恵 (KUBOTA MIE)

独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態

研究チーム・研究員

研究者番号：19790844