

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790864
 研究課題名（和文）臨床研究への橋渡しを目指した双極性障害モデル動物の行動生理学的・分子生物学的解析
 研究課題名（英文）Behavioral physiological and molecular biological analyses of animal model for bipolar disorder

研究代表者
 笠原 和起 (Kasahara Takaoki)
 独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・副チームリーダー
 研究者番号：50344031

研究成果の概要（和文）：

双極性障害のモデル動物（変異 Polg1 トランスジェニック (Tg) マウス）の長期輪回し行動を解析した結果、季節性や光周性に関わる生理機能の重要性を見出し、マウスにおけるメラトニン合成について、新しい多くの知見を得た。また、マウスの健康を損ねることなく、気分安定薬であるリチウムを長期（3 ヶ月間）投与することに成功し、モデルマウスが示す長期の異常な行動変化に与えるリチウムの効果を調査した。

研究成果の概要（英文）：

I analyzed wheel-running activity of an animal model for bipolar disorder, mutant Polg1 transgenic mice, for more than a half year. This shed light on the pathophysiology involving the seasonality or photoperiodicity. I obtained novel findings on melatonin synthesis of mice. In addition, I succeeded in treating mice with lithium, a mood stabilizer, more than three months without affecting health of mice. Using the method of lithium treatment, I investigated the effect of lithium on the longitudinal manifestations of the model mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：双極性障害、動物モデル、Polg1、Wfs1、メラトニン、リチウム

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、双極性障害のミトコンドリア

異常仮説に注目し、モデルマウスの作製を行ってきた。欠失したミトコンドリア DNA (mtDNA) を伴う慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO) では双極性障害などの気分障害を併発する場合があることや、双極性障害患者の mtDNA に特定の多型や多重欠失が多いことが報告されている。そこで、CPEO の原因遺伝子のひとつである mtDNA 合成酵素 (POLG) に点変異を導入し、神経細胞のみで発現を誘導するプロモーターに連結してトランスジェニック (Tg) マウスを作った。ねらい通り、前脳において mtDNA の異常 (欠失と点変異) が週齢依存的に蓄積していた。この変異マウスは、ヒト疾患のモデル動物が満たすべき 3 条件 (構成妥当性、表面妥当性、予測妥当性) を満たすことから、双極性障害のモデルになりうると考えられた。

2. 研究の目的

モデル動物の作製に続く次のステップとして、臨床レベルで疾患の究明、および創薬等、新しい治療法の開発につながるよう、以下に述べる 3 点をこのモデルを用いて解明する。

- ・新しい中間表現型の解析
- ・薬・治療法の効果とメカニズムの検討
- ・複数の遺伝的要因を持ち合わせた新モデルの開発と分析

3. 研究の方法

- ・新しい中間表現型の解析

光マスキング効果に重要な部位である室傍核下部領域 (subparaventricular zone: SPZ) やその周辺の神経核の活動性を c-Fos の免疫染色によって調べる。光照射に伴って c-Fos タンパク質の発現が増加すると考えられるが、Tg マウスではその増加量が少ない、あるいは増加する神経細胞の数が少ないと推測している。また、この領域において、mtDNA の異常が顕著に蓄積していないか、ミトコンドリアの活性が低下していないか等を吟味する。申請者らはすでに欠失した短い mtDNA を特異的・定量的に増幅する PCR 法を開発しており、この方法を応用した in situ PCR 法、あるいはレーザーマイクロダイセクションによって当該領域を切り出してきて mtDNA を抽出して PCR を行う。

- ・複数の遺伝的要因を持ち合わせた新モデルの開発と分析

変異 Polg1 Tg マウス (Tg/+) と Wfs1 KO マウス (Wfs1 -/-) を掛け合わせて、二重変異マウスを作成する。この二重変異マウス (Tg/+; Wfs1 -/-) の輪回し行動を精査し、双極性障害に類似した行動異常が単なる Tg マウスよりも顕著であるかどうかを調べる。

- ・薬・治療法の効果とメカニズムの検討

リチウムはすでに試験を行ったが、それ以外の気分安定薬、具体的にはバルプロ酸とラモトリジンが Tg マウスの異常行動に対して改善効果があるかどうかを調べる。まずは、これらの薬剤を含んだいくつかの濃度の飼料を作製し、マウスの健康を損ねることなく、血中濃度が治療濃度域に達する薬剤の濃度を定める。その後、本実験として、薬剤入りの飼料を与えて長期間の輪回リズムの測定を行う。

動物モデルである Tg マウスでは、光マスキング効果の障害だけではなく、行動リズムの光同調性も悪い傾向があり、網膜からの光情報のうち、視覚以外に関わるシグナリングの異常が想定される。視覚以外の光情報伝達は、概日時計の光同調、メラトニン分泌量の調節、光マスキング効果、瞳孔反射に関わっていることが知られているが、臨床研究を目指す中間表現型として、メラトニンの調節に注目したい。双極性障害の患者において、メラトニンの動態の異常がしばしば報告されているのに加え、メラトニン受容体アゴニスト

(agomelatin) が双極性障害やうつ病に有効とされ、海外では臨床治療に用いられるようになったためである。しかしながら、このマウスモデルは一般的な実験用マウスの系統 C57BL/6 で開発したマウスのため、メラトニンの生合成能を有しない。そのため、メラトニン合成が可能な系統と掛け合わせたい。しかし、マウスのメラトニン合成酵素の遺伝子が未だにクローニングされていないため、本研究において、その遺伝子のクローニングを行う。

4. 研究成果

- ・複数の遺伝的要因を持ち合わせた新モデルの開発と分析

Tg マウス (Tg/+) と Wfs1 遺伝子 KO マウス (Wfs1 -/-) を掛け合わせた二重変異マウスを作成し、この新モデルの行動学的解析を行った。その結果、(単純な) Tg マウスの解析を通して明らかにした気分障害様の表現型のうち、日内リズムの異常と光マスキング効果の異常が二重変異マウスでは増悪していた。

- ・新しい中間表現型の解析

光マスキング効果が Tg マウスでは、さらに上述したように二重変異マウスでは減弱していることから、光マスキングに重要な部位である室傍核下部領域 (SPZ) やその周辺の神経核の活動性を調べた。具体的には、c-Fos の発現を免疫組織化学法によって調べたところ、二重変異マウスでは光刺激後の c-Fos 陽性細胞の数、c-Fos 陽性シグナルの両方とも、野生型マウスに比べて少なかった。

- ・薬・治療法の効果とメカニズムの検討

バルプロ酸の投与については、さまざまな投与方法、さまざまな濃度を試したが、マウスの全身の健康を損ねることなく、長期間 (1 ヶ月以上) にわたって投与することは難しく、断念した。

ラモトリジンは、適切な投与方法を見出し、2ヶ月間の投与実験を行った。その結果、Tgマウスが示す、気分障害様の異常行動のうちいくつかを改善した。しかし、リチウムよりは作用幅は狭かった。

マウスのメラトニン合成酵素の遺伝子をクローニングすることに成功した。また、その遺伝子のゲノム科学的な特徴の解析、およびマウスにおけるメラトニンの生理学的作用を解析し、多くの実験用マウスの系統において、メラトニン合成能を失った理由を推定した。マウスのメラトニン合成酵素遺伝子は、他の遺伝子よりも変異が入りやすい特徴があり、そのために活性を失ったマウス（メラトニンを合成できなくなったマウス）は、性腺の発達が早くなった。このことは、飼育舎という人工の環境下においては、そのマウスにとっても、飼育者にとっても有利に働いたと推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Kubota, M., Kasahara, T., Iwamoto, K., Komori, A., Ishiwata, M., Miyauchi, T., and Kato, T. Therapeutic implications of down-regulation of cyclophilin D in bipolar disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* (in press). 【査読有】
2. 笠原和起 気分障害薬物療法の脳科学. 精神科 (印刷中). 【査読無】
3. 笠原和起, 加藤忠史 双極性障害モデル実験動物. 生体の科学 64, 59-64 (2010). 【査読無】
4. Kasahara, T., Abe, K., Mekada, K., Yoshiki, A., and Kato, T. Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 6412-6417 (2010). 【査読有】
5. Hayashi, A., Kasahara, T., Kametani, M., Toyota, T., Yoshikawa, T., and Kato, T. Aberrant endoplasmic reticulum stress response in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **12**, 33-43 (2009).

【査読有】

6. Hayashi, A., Kasahara, T., Kametani, M., and Kato, T. Attenuated BDNF-induced upregulation of GABAergic markers in neurons lacking *Xbp1*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 758-763. (2008). 【査読有】
7. Kasahara, T., Kubota, M., Miyauchi, T., Ishiwata, M., and Kato, T. A marked effect of electroconvulsive stimulation on behavioral aberration of mice with neuron-specific mitochondrial DNA defects. *PLoS ONE* **3**, e1877 (2008). 【査読有】
8. Kato, T., Ishiwata, M., Yamada, K., Kasahara, T., Kakiuchi, C., Iwamoto, K., Kawamura, K., Ishihara, H., and Oka, Y. Behavioral and gene expression analyses of *Wfs1* knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neurosci. Res.* **61**, 143-153 (2008). 【査読有】
9. 野地なつ美, 笠原和起, 浅見忠男 PQQビタミン説へのアプローチ. 化学と生物 46, 339-345 (2008). 【査読無】
10. 笠原和起, 加藤忠史 双極性障害におけるミトコンドリア機能障害. 脳と精神の医学 19, 107-115 (2008). 【査読無】

[学会発表] (計 7 件)

1. Kasahara, T. Mouse models for bipolar disorder based on rare hereditary diseases. 第 32 回 日本神経科学大会 (名古屋) 2009 年 9 月
2. Kasahara, T., Kato, T. Identification of mouse HIOMT gene. Gordon Research Conference (ニューポート, 米国) 2009 年 7 月
3. 笠原和起, 阿部訓也, 加藤忠史 マウスのメラトニン合成能の飼育舎内進化. 第 23 回 モロシヌス研究会 (守山) 2009 年 7 月
4. 笠原和起, 石渡みずほ, 宮内妙子, 山田一之, 垣内千尋, 川村光毅, 石原寿光, 岡芳知, 加藤忠史 複数の遺伝的負因を持つ双極性障害モデルマウスの開発. 第 31 回 日本生物学的精神医学会 (富山) 2009 年 4 月

5. Kasahara, T., Kato, T. Mitochondrial Dysfunction in Bipolar Disorder. 2nd World Federation of Societies of Biological Psychiatry Asia-Pacific Congress・第30回日本生物学的精神医学会（富山）2008年9月
6. 笠原和起, 窪田美恵, 宮内妙子, 石渡みずほ, 加藤忠史. 双極性障害のミトコンドリア機能障害仮説に基づいたモデル動物が示す異常行動とそれに対する治療効果. 第27回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会（箱根）2008年6月
7. Kasahara, T., Kubota, M., Miyauchi, T., Ishiwata, M., Kato, T. Transgenic mice with neuron-specific mitochondrial DNA defects as a model for bipolar disorder. Euromit7（ストックホルム, スウェーデン）2008年6月

〔図書〕（計1件）

笠原和起 精神科臨床リュミエール 16巻（分担執筆） 中山書店（印刷中）.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 和起 (Kasahara Takaoki)

独立行政法人理化学研究所・精神疾患動態研究チーム・副チームリーダー

研究者番号：50344031