

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年度 ～2011 年度

課題番号：21591522

研究課題名（和文）コンプレキシンⅡ遺伝子欠損マウスを用いたストレス脆弱性メカニズムの研究

研究課題名（英文）Stress-related vulnerability and Complexin2 knockout mouse

研究代表者

西原 真理 (NISHIHARA MAKOTO)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：60380325

研究成果の概要（和文）：

コンプレキシンは各種生物間で、高度に保存されており脳内の分布が異なるタンパク質である。このタンパク質は SNARE 複合体に結合するシナプス前タンパク質として同定され、小胞体の融合プロセスと密接な関係が示唆されている。またコンプレキシンの発現変化が統合失調症を含め、数多くの神経精神科領域疾患で認められている。我々はこれまで、コンプレキシン 2 の欠損マウスは母子分離のような周産期ストレスに脆弱であることを、海馬 LTP や水迷路テストを指標にして電気生理学的にまた行動学的に示してきた。そこで我々はコンプレキシン 2 欠損マウスが精神症状と関連するかどうか、またストレス関連反応とリンクするかどうかを調べる一連の実験を行なった。まず、コンプレキシン 2 欠損マウスは運動学習が阻害されており、高用量のメタンフェタミンに対して過敏性を認めた。また大脳皮質や海馬で母子分離ストレスを負荷した場合に見られる脳由来神経栄養因子 mRNA 増加が、コンプレキシン 2 欠損マウスでは見られなかった。更に、コンプレキシン 2 欠損マウスと機械刺激の過敏性の関連についても示した。これらの結果は、コンプレキシン 2 遺伝子が様々な臨床的症状に重要な役割を有している可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

The complexions (CPLXs) are highly conserved proteins which are expressed differently in the central nervous system. CPLXs were identified as a presynaptic protein that bind to the SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) complex and closely related vesicle fusion process. Significant alternations of CPLXs expression levels are observed in a number of neurological and psychiatric disorders, including schizophrenia. We have already reported that the mice lacking CPLX2 were vulnerable to perinatal stress such as maternal separation using electrophysiological and behavioral methods. Thus, we designed a series of experiments whether CPLX2 knockout mice are related to psychiatric symptoms or stress mediated response. CPLX2 knockout mice have disturbances in motor learning process and hypersensitivities to high dose of methamphetamine. And the Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the cerebral cortex and hippocampus is increased under condition of maternal separation stress in the wild-type, however, this effect is not seen in the CPLX2 knockout mouse. Furthermore, we also showed the possible relationship between the CPLX2 knockout mouse and mechanical hyper-responsiveness. Taken together, these results suggested that the CPLX2 gene may play important roles in several clinical conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：コンプレキシン、遺伝子、行動学、ストレス脆弱性

1. 研究開始当初の背景

コンプレキシン (CPLX) は小分子で可溶性であり、シナプス前に局在するタンパク質として 1995 年にクローニングされた。このタンパク質は SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) 複合体と結合することが分かり、神経伝達物質の遊離メカニズムにどのように関与するかという研究が行われてきた。また CPLX には 1~4 のサブファミリーがあるが、特に CPLX1 と 2 の機能について研究が進められている。特に SNARE 調節物質として、CPLX にはシナプス前で小胞体を弱い刺激でもすぐに膜融合が可能な状態にクランプする機能と、カルシウムが流入した際に、SNARE 複合体を活性化する機能があることが重要とされている。また、CPLX と精神神経疾患との関連も数多く報告されている。まず、統合失調症患者において内側側頭葉の CPLX2 が mRNA 及びタンパクレベルで減少していることが死後脳研究から明らかとなったのをはじめとして、大うつ病、ハンチントン病、アルツハイマー病、ウェルニッケ脳症などでも CPLX との関連が示されている。これまで我々は、CPLX2 欠損マウスが母子分離ストレスに暴露されると、海馬における LTP (Long-term

potentiation) が阻害され、またモリス水迷路による評価では空間学習機能が障害されることを示した。そこで本研究では、CPLX2 欠損マウスの行動薬理的、生化学的解析を行ない、疾患モデルとしての整合性やストレス脆弱性についての検討を行うこととした。

2. 研究の目的

- ①CPLX2 欠損マウスの行動薬理的な特性が、ヒトにおける統合失調症などに関連があるのかどうかを調べる。即ち、運動学習や覚せい剤モデルに対して、CPLX2 欠損が影響するのかどうかについて。
- ②CPLX2 欠損マウスが母子分離ストレスに暴露された場合、不安行動の変化や脳内のシナプス可塑性に関与するような物質が変化するのかどうかを調べる。
- ③CPLX2 欠損マウスが痛覚に対して過敏性を有するのかどうかを調べる。

3. 研究の方法

CPLX2 欠損マウスの作成

欠損マウスは常法に基づいて作成され、遺伝的均一性を得るために C57/Bl/6 マウスに対してバッククロスが 15 世代以上行われた。ホモ型を得るためにヘテロ型を交配し、ジェノタイピングは尾の先端を用いて各個体に

対して PCR で確認した。

① 運動学習機能を評価するために CPLX2 欠損マウス及び、野生型マウスに Rotarod テストを行なった。徐々に回転数の上がる棒の上にマウスを乗せ、3 回のトレーニングの後テストを行ない、落下するまでの時間を測定した。また、覚せい剤モデルとしてドパミン受容体の間接的作動薬であるメタンフェタミンを 2mg/kg または 4mg/kg 腹腔内投与し、移所行動量を Ethovision を用いてビデオから直接測定した。

② CPLX2 欠損マウス及び、野生型マウスに対して母子分離ストレスは、生後 2 日目から 15 日目まで 14 日間負荷した。母子分離は毎日 1 時間、時間を決めて行った。その後、不安行動を評価するために、高架式十字迷路を使用し、Open-arm に滞在する時間や、侵入回数を Closed-arm に滞在する時間と比較した。また、シナプス可塑性に関連すると考えられている Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の mRNA 発現量が脳内で変化しているかどうかを調べるために、大脳皮質及び海馬をパンチアウトし、リアルタイム PCR 法を用い測定した。

③ 痛覚過敏性を調べるために、CPLX2 欠損マウス及び、野生型マウスに神経障害性疼痛モデルとして Chronic constriction injury (CCI) モデルを作成した。これに対して Von Frey 式フィラメントを用い、足上げ反応を測定した。

#### 4. 研究成果

① Rotarod を用いた運動学習では、トレーニング 1 回目では CPLX2 欠損マウスと野生型に差は見られないものの、欠損マウスでは学習効果が乏しく、テスト時には有意に落下するまでの時間が短かった (図 1) このことより、CPLX2 は運動学習に関与してい

ることが分かった。また運動学習と関連の深い小脳での CPLX2 発現も見られた (図 2)。

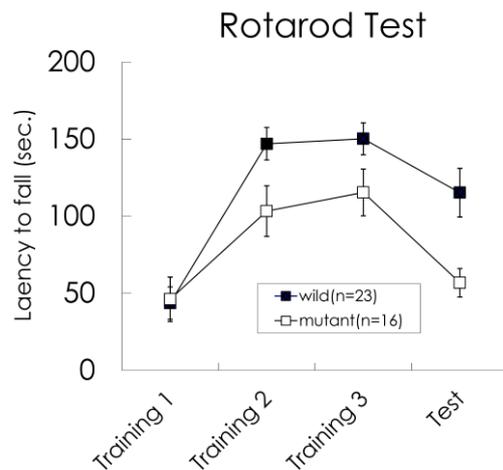


図 1 : Rotarod テストによる運動学習効果

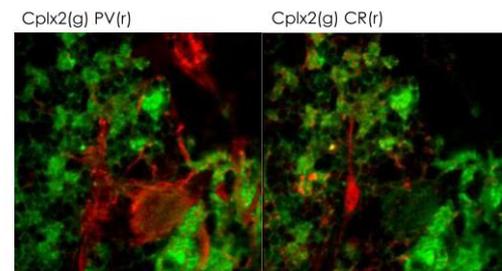


図 2 : カルレチニン (CR)、パルブアルブミン (PV) と CPLX2 の共発現

次に統合失調症に見られる陽性症状のモデルとして知られる、メタンフェタミン (MAP) の移所運動に対する効果を調べた。新規環境への馴化行動量には CPLX2 欠損マウスと野生型に差はなかったが、MAP を高用量 4mg/kg 腹腔内投与した際の移所運動については欠損マウスで有意に増加していた (図 3)。このことは、CPLX2 とドパミン受容体感受性に関連があり、統合失調症のモデルとしての可能性があることを示している。

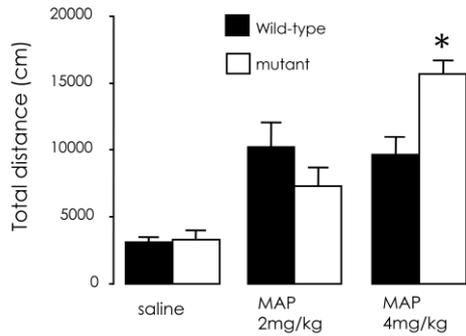


図 3：メタンフェタミンによる移所運動増加

② CPLX2 欠損マウスを母子分離ストレスに暴露した場合の不安行動は、遺伝子型及びストレスの両方において、高架式十字迷路による評価では有意な差を検出することはできなかった。しかし、母子分離ストレスを負荷した場合、野生型においては脳皮質、海馬の両方において有意に BDNF の mRNA 発現が増加していたにもかかわらず、この増加が CPLX2 欠損マウスでは見られないという

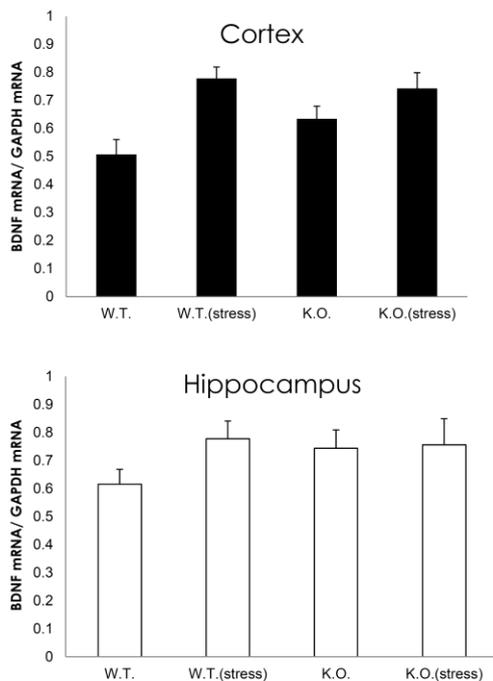


図 4：大脳皮質と海馬における BDNF mRNA 発現量

所見を得た (図 4)。

この結果についての解釈は今後も慎重に検討する必要があるが、これまでに我々が示した CPLX2 欠損と母子分離ストレスが重なった場合に空間学習を阻害するという現象と関連があるかもしれない。

③ 最近になって、CPLX2 欠損マウスがうつ病のモデルになる可能性が文献的に報告された。これに基づいて気分障害と関連が深い痛覚関連行動を調べたところ、Von Frey 式フィラメントによる足上げ回数は CPLX2 欠損マウスの方が、野生型よりも多く、機械的刺激に対する過敏性がある可能性が示された (図 5)。今後更に他の痛覚刺激に対しても過敏性があるのかどうかを調べる必要性があり、また CCI モデルにおける検討も現在継続しているところである。

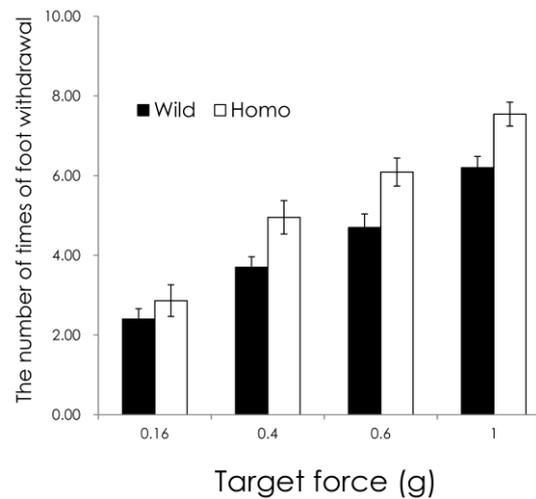


図 5：Von Frey 式フィラメントによる足上げ反応

以上のように、CPLX2 欠損マウスは、ストレス脆弱性を示し、またそれのみならず様々な症状との関連を示唆するような所見が得られた。しかし、研究結果は残念ながらまだ一定の整合性が得られるところまでは達しておらず、更なる検討が必要である。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

西原真理、山内祥豪、澤田健、加藤邦夫、統合失調症とコンプレキシン-病態モデルを指して、*Scizophrenia Frontier*、10 (4)、2009、74-79

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤邦夫 (KATOU KUNIO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：70346708

(H21 まで)

西原 真理 (NISHIHARA MAKOTO)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：60380325

(H21：研究分担者)

(2)研究分担者

山内祥豪 (YAMAUCHI YOSHITAKE)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：90437723

(3)連携研究者

なし