

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06752

研究課題名(和文)ドーパミン受容体の異常に着目した新たな統合失調症モデルの確立

研究課題名(英文)The D1R-specific NSF deficient mice as a novel schizophrenic model

研究代表者

謝 敏カク (Xie, MinJue)

福井大学・子どものこころの発達研究センター・助教

研究者番号：40444210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は独自にD1Rを発現する神経細胞に特異的なNSFコンディショナルノックアウトマウス(D1R-NSFck0)を開発した。D1R-NSFck0マウスでは自発回転運動および多動性が観察され、それらにはD2R遮断薬の効果があつた。また、驚愕反応および先行刺激による抑制反応においてもD1R-NSFck0マウスでは両方とも有意に低いことを見出した。これらは、D1Rを発現する神経細胞にNSFの欠損がドーパミン受容体およびドーパミンの発現異常に関与していることを強く示唆している。以上の結果により統合失調症のメカニズムについてNSFのドーパミンを制御する新たな分子としての役割を果たしている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が着目したNSFの機能異常は、統合失調症の発症メカニズムを包括的に理解する鍵の分子となる可能性がある。また、D1R-NSF ck0マウスのレスキュー実験によって脳内D1Rの発現低下が新たな統合失調症の治療標的候補となれば、統合失調症の新規治療法開発に道が開かれる。さらに、本研究結果から得られる知見は、運動・認知の情報処理や情動の制御機能を支える基本原理の理解にも貢献が十分に期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we generated the D1R-specific Nsf conditional knockout mice (D1R-NSFck0 mice) and investigated their behavioral, neurotransmitter, and neurophysiological phenotypes in vivo. D1R-NSFck0 mice exhibited the abnormal spontaneous rotation behaviors and high locomotion activity. The dopamine D2 receptor antagonist sulpiride suppressed the hyperactive in D1R-NSFck0 mice. We investigated the startle habituation and prepulse inhibition (PPI) test, and found that both startle habituation and PPI were impaired in D1R-NSFck0 mice. In addition, we found that dopamine was significantly increased in the striatum of D1R-NSFck0 mice compared with that of control mice. These findings demonstrate that Nsf plays a role in motor activation and sensorimotor gating via regulating the dopamine and dopamine receptor. D1R-NSFck0 mice exhibited locomotor up-regulation and a defect in sensorimotor gating, resembling the behavioral phenotype of schizophrenia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：NSF dopamine dopamine receptor schizophrenic model

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、その多くが思春期以降に幻覚や妄想を主症状として顕在化し、社会機能が著しく障害される精神疾患である。統合失調症の原因および病態発現のメカニズムはいまだ不明であるが、1950年のクロルプロマジンの発見以降、ドーパミン D2 受容体 (D2R) の遮断薬が統合失調症の陽性症状を改善したため、統合失調症をドーパミン受容体の過剰なシグナル伝達によって解釈する「ドーパミン仮説」がながく支持されてきた。さらに、D2R 遮断薬のような定型抗精神病薬の臨床効果が D2R の結合能に強く相関することが発見されて、ドーパミン仮説はより明確なものとなった (Seeman et al, Nature 1976)。これを支持する知見として、統合失調症患者の死後脳の線条体ではドーパミンや D2R 密度の増加が報告されている (Owen et al, Lancet 1978, Mackay et al, Arch Gen Psychiatry 1982)。一方、80年代以降には、定型抗精神病薬に反応しない患者群が存在することや、非定型の抗精神病薬クロザピンは D2R 遮断薬としての薬理作用が弱いことから、ドーパミン仮説は修正を余儀なくされた (Davis et al, Am J Psychiatry 1991)。この修正ドーパミン仮説では、線条体の D2R 系の過活動は従来と同じく陽性症状に関連するが、中脳から皮質のドーパミン D1 受容体 (D1R) 系はむしろ低活動とされ、陰性症状や認知障害を説明する。実際、統合失調症患者前頭前皮質の PET 研究で D1R の発現は低下する (Okubo et al, Nature 1997) と報告されているが、統合失調症で D1R の発現低下が生じるメカニズムはわかっていない。本研究では中枢神経系での D1R 発現機構に着目し「統合失調症では D1R の膜局在化に異変が起きているために諸症状が現れる」との仮説をたてた。そして、その仮説の検証のために、D1R を発現する神経細胞に特異的な NSF コンディショナルノックアウト (D1R-NSFcKO) マウスを開発した。

2. 研究の目的

本研究では、独自に作製した D1R-NSFcKO マウスの行動・薬理・病理解析による検証を進め、統合失調症モデル動物として成立するかどうかを検討する。ついで前頭前皮質病理と線条体病理との因果関係を明らかにし、脳内 D1R の発現低下が統合失調症の治療標的となり得るかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

NSF 遺伝子コンディショナルノックアウト(NSF-cKO)マウスの作製:

Cre/loxP システムを用いて NSF 遺伝子コンディショナルノックアウト(NSF-cKO)マウスの作出を行った。まず全身的に NSF 遺伝子をノックアウトしたマウスをデザインした。このマウス作出に使用されるターゲティングベクターでは第 6・第 7 エクソンの両側に loxP が配置され、その上流には FRT-En2SA-IRES-lacZ-pA-loxP-neo-FRT カセットが挿入されているため、loxP および FRT で挟むターゲティングベクターを構築し、このような遺伝子座を持つ NSF^{neo} マウスを作製した。ついで FLP マウスと掛け合わせることで、FRT-En2SA-IRES-lacZ-pA-loxP-neo-FRT カセットを抜く NSF^{lox} マウスを得た。その後、D1R Cre マウスまたは D2R Cre マウスを選択して NSF^{lox} マウスと交配することにより、D1R または D2R を発現細胞に特異的な NSF コンディショナルノックアウトマウス (D1R-NSFcKO) または (D2R-NSFcKO) を作製した。その後、維持して、以下の実験に提供した。

② マウスの脳組織学的・生化学的検討:

4~6 週齢の雄マウスの脳全体にわたる D1R、D2R、dopamine transporter (DAT)、Tyrosine hydroxylase (TH) および dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, 32 kDa (DARPP-32) を標的とした *in situ hybridization*, Western Blot および免疫染色法で評価。

マウスの行動解析:

4 週齢の雄マウスに見られる表現型を検討する目的で以下の行動評価を行う。正確を期するため、各群マウスは行動解析でオス n=10 以上を使用する。

オープンフィールドテスト

この試験は、新規の場所での行動量や不安行動、情動行動を解析する実験である。横方向のセンサーでマウスの運動量、縦方向のセンサーでマウスの立上回数が測れる明るい正方形のオープンフィールドの中に、4週齢の雄マウスを入れ、2時間で新奇環境での移動距離、立ち上がり回数、中央区画滞在時間を測定した。

24時間ホームケージ

ホームケージ内での社会的行動を明期・暗期12時間毎自発運動量を測定する。新奇環境への反応の違いの影響を受けることなく、より正確に社会的行動の傾向を測定する。

プレパルス・インヒビション(prepulse inhibition : PPI)

小動物に驚愕音を提示して反射強度を測定する。マウスに大きな音(120dB)を聞かせると驚愕反応が起こる。大きな音の前に少しだけ小さな音(74dB, 80dB, 84dB)を聞かせると、驚愕反応が抑制される。これはPPIと呼ばれ、注意力指標として用いられる。統合失調症での患者でPPIが低下していることが知られている。

ドーパミン、ノルエピネフリンおよびセロトニンの分析

4週齢の雄マウスの線条体を摘出し、ホモジナイズした後、上清をエイコム株式会社に提供し、HPLC-ECDによりドーパミン、ノルエピネフリンおよびセロトニン量を測定する。

ロータロッド試験(Rota-rod test)

丸棒の上に動物を乗せ強制的に歩行させるものであり、通常は少しの訓練を行うことで動物は丸棒の回転に同調して落ちることなく歩行する。しかし、平衡感覚や協調運動の障害、あるいは骨格筋の弛緩が生じている場合は丸棒の上をうまく歩行できずに落下してしまうため、これを運動機能の低下として評価する。

4. 研究成果

1) マウスの脳組織学的・生化学的検討の結果：

・D1R-NSFcKO マウスの作製

D1R-NSFcKO マウスではNSFの発現の低下があるかどうかを検討するために *In situ hybridization* を行った。コントロールマウスに比べ、D1R-NSFcKO マウスではD1Rが強く発現している線条体での *NSFmRNA* 発現が有意に低下したが、D1Rがあまり発現していない梨状葉および淡蒼球での *NSFmRNA* 発現が変化しなかった。このことからこのD1R-NSFcKO マウスの作製を確認した。D1R-NSFcKO マウスは生きているが、体重が有意に低下したことからD1R-NSFcKO マウスでは発育障害があると考えられる。

・線条体でのD1R発現の低下およびD2R発現増加

In situ hybridization およびWestern blot法によりD1R-NSFcKO マウスでは、線条体での *D1R mRNA* およびD1Rタンパク質発現が低下したが、D2Rタンパク質発現は増加した。さらに、Western Blot法および免疫染色によりDARPP32、DAT、THの発現変化がみられなかった。

・脳内線条体でのドーパミン過剰発現：脳内ドーパミン定量のためHPLC-ECD分析を行った結果、D1R-NSFcKO マウスでは脳内線条体でのドーパミン量が対照マウスに比べ、有意に増加していた。その他、ノルエピネフリンおよびセロトニンの増加も見られた。

マウスの行動解析結果：

・異常な回転運動や活動量亢進

D1R-NSFcKO マウスでは異常な自発回転運動が観察された。また、オープンフィールド新奇環境内における対照マウスに比べ、D1R-NSFcKO マウスの運動量は有意に増加した。さらに、24時間ホームケージ内における明期・暗期12時間毎の自発運動量も増加した。過活動により、D1R-NSFcKO マウスの体重が有意に低下した。

・スルピリド投与によるD1R-NSFcKO マウス運動量の改善：

オープンフィールドテストでスルピリド投与後、D1R-NSFcKO マウスの運動量が有意に減少した。

・スルピリドの投与によるNSFcKO マウス協調運動の改善

運動量の変化について理解を深めるためにロータロッド装置を用い、マウスの運動機能を調べた。コントロールマウスに比べ、D1R-NSFcKO マウスでは丸棒から落ちやすく、丸棒の滞在時間が有意に短かったことから、D1R-NSFcKO マウスの平衡感覚や協調運動の障害を見出した。

この運動機能の低下はスルピリド投与により有意に改善した。

・驚愕反応およびPPI低下

D1R-NSFcKO マウスでは感覚運動系機能評価である驚愕反応はコントロールマウスに比べて低かった。さらにPPI反応でもD1R-NSFcKO マウスでは有意に低いことが見られた。

D2R-NSFcKO マウスとの比較：

作製したD2R-NSFcKO マウスでは、D1R-NSFcKO マウスと異なって、ADHD 様な多動性、衝動性行動およびドーパミンシグナル異常（D2R、DAT、TH およびドーパミン発現の減少）が見出された。このことからD1R 発現細胞に対してNSFの欠損は直接路を介して大脳皮質の興奮性を弱めることは統合失調症に関わるが、D2R 発現細胞に対してNSFの欠損は間接路を介して大脳皮質の興奮性を高めることはADHDに関わる可能性があるのではないかと考えた。

今回の結果は、D1Rを発現する神経細胞に特異的なNSFの欠損がドーパミン受容体およびドーパミンの発現異常に関与していることを強く示唆している。さらに、統合失調症に類似した運動量増加や、D2R遮断薬スルピリドの効果やPPIの低下があることから、D1R-NSFcKO マウスは新たな統合失調症マウスモデルになる可能性があると考えられ、さらには、神経発達症の病態解明および治療の開発につながるようになるのではないかと期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Xie MJ, Yagi H, Iguchi T, Yamazaki H, Hanamura K, Matsuzaki H, Shirao T, Sato M.	4. 巻 185
2. 論文標題 Phldb2 is essential for regulating hippocampal dendritic spine morphology through drebrin in an adult-type isoform-specific manner.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurosci. Res.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwata K, Xie MJ, Paul C. Guest, Hirai T, Matsuzaki H	4. 巻 2511
2. 論文標題 Measurement of Mitochondrial Respiration in Cryopreserved Human PBMCs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 321-332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2395-4_24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Xie MJ, Iwata K, Ishikawa Y, Nomura Y, Tani T, Murata K, Fukazawa Y, Matsuzaki H	4. 巻 12
2. 論文標題 Autistic-Like Behavior and Impairment of Serotonin Transporter and AMPA Receptor Trafficking in N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Gene-Deficient Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Genet.	6. 最初と最後の頁 748627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2021.748627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iguchi T, Oka Y, Yasumura M, Omi M, Kuroda K, Yagi H, Xie MJ, Taniguchi M, Bastmeyer M, Sato M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Mutually repulsive EphA7-EfnA5 organize region-to-region corticopontine projection by inhibiting collateral extension.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Neurosci	6. 最初と最後の頁 4795-4808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0367-20.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Xie MJ, Murata K, Matsuzaki H
2. 発表標題 The D1R-specific NSF deficient mice as a novel schizophrenic model
3. 学会等名 17th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Xie MJ, Murata K, Matsuzaki H
2. 発表標題 Schizophrenia-like behavior in the D1R-specific NSF deficient mice
3. 学会等名 Neuroscience 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 謝 敏かく、佐藤 真
2. 発表標題 Phldb2は海馬の樹状突起スパインの形態を制御する
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会 / 第66回日本神経化学学会大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 謝敏かく、岩田圭子、石川保幸、村田航志、深澤有吾、松崎秀夫
2. 発表標題 NSF欠損マウスは自閉症様な異常を示す
3. 学会等名 第65回日本神経化学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xie MJ, Iwata K, Ishikawa Y, Fukazawa Y, Matsuzaki H
2. 発表標題 NSF deficient mice leads to autism like behavior with hippocampal synaptic dysfunction
3. 学会等名 第64回日本神経化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 自閉スペクトラム症の改善剤、この改善剤を含有する飲食品及び香料並びにこの改善剤を投与するための機器	発明者 松崎 秀夫、謝 敏 カク、財満 信宏、 吉岡 百合	権利者 福井大学、近畿 大学、稲畑香料 株式会
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-010567	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松崎 秀夫 (Matsuzaki Hideo) (00334970)	福井大学・子どものこころの発達研究センター・教授 (13401)	
研究 分 担 者	村田 航志 (Murata Koshi) (10631913)	福井大学・学術研究院医学系部門・助教 (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------