

「モデル動物を用いた精神疾患の神経回路病態の解明」

大阪大学蛋白質研究所 高次脳機能学研究室 疋田 貴俊

## 1 研究の背景と目的

精神疾患は遺伝要因と環境要因の組み合わせによって発症する複合疾患である。研究代表者が開発したスコットランドの精神疾患多発家系で見つかった変異型 DISC1 遺伝子を前脳神経細胞に導入したトランスジェニックマウスは遺伝要因のみでは表現型に乏しいが、周産期あるいは思春期に環境要因を導入することで成年期において行動異常を呈する。そこで本マウスモデルを用いて、遺伝-環境相互作用による精神疾患発症の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 2 研究方法・研究内容

変異型 DISC1 トランスジェニックマウス(Niwa et al., Science, 2013)を集団飼育する群(G)と思春期(生後 5-8 週齢)に孤立飼育する群(GXE)に分け、8 週齢以降に実験を行った。比較対照群として、同胞野生型マウスを集団飼育する群(CTL)と思春期に孤立飼育する群(E)に分け、同様に 8 週齢以降に実験を行なった。本研究は大阪大学蛋白質研究所動物実験委員会により承認されており、動物実験に関する倫理指針に従って行った。

薬物依存行動の観察は既報(Hikida et al., PNAS, 2001; 2003)に従った。コカイン投与は 10mg/kg を腹腔内注射にて行い、ロリプラムあるいは生理食塩水はコカイン投与 20 分前に投与した。行動量測定は、Coulbourn Instruments 社の赤外線モニターによった。条件付け場所嗜好試験には、MED Associates 社の測定装置を用いた。

それぞれのマウスの脳スライスから、脳アトラス(Paxinos & Franklin, 2013)に従い、側坐核、大脳皮質前頭前野、腹側被蓋野を取り出し、qPCR による mRNA 発現量、ウエスタンブロットティング法による蛋白量の測定、PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay 法(Promega)による酵素活性の測定を行なった。脳スライスに SKF81297 あるいはロリプラムを処置し、DARPP32 と GluA1 の PKA リン酸化を既報(Nishi et al., J Neurosci, 2008)に従い、それぞれのリン酸化抗体を用いて調べた。

## 3 研究成果

思春期に孤立飼育した変異型 DISC1 トランスジェニックマウス (GXE)、通常飼育した変異型 DISC1 トランスジェニックマウス (E)、思春期に孤立飼育した野生型マウス(E)、思春期に孤立飼育した変異型 DISC1 トランスジェニックマウス野生型マウス(CTL)の各群に対して、8 週齢より行動観察を行った。3 日間の生理食塩水投与による馴化の後、コカイン 10mg/kg を連日腹腔内注射を行うと、行動量が日々増加する逆耐性現象が観察された。思春期に孤立飼育した変異型 DISC1 トランスジェニックマウス (GXE)では、他のマウス群と比較してより大きな行動量増加が観察された (図 1 a, \*\*P<0.01, GXE, n=9; G, n=10; E, n=6; CTL, n=7)。一方、生理食塩水を連日投与をしても、行動量には変化がな

かった (図 1b, n=5 each)。

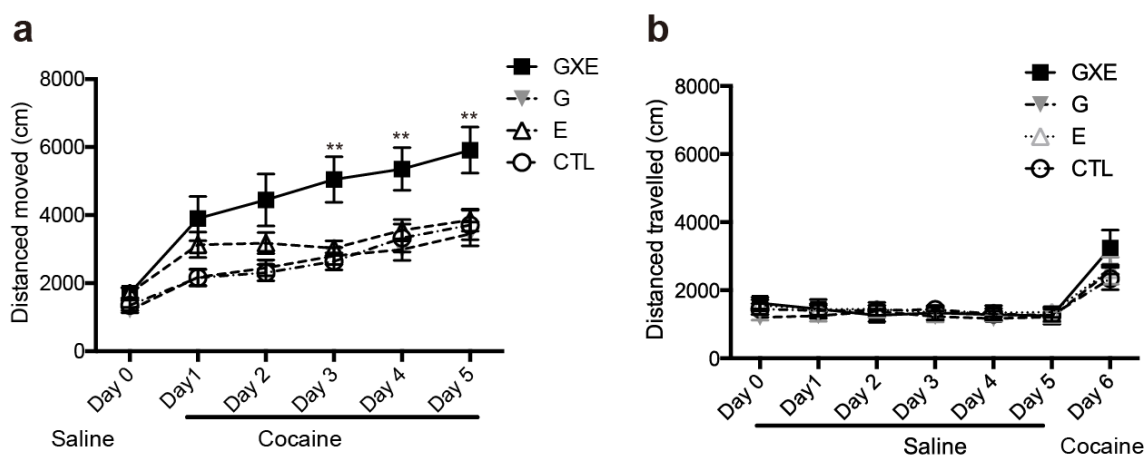


図 1. コカイン連日投与による行動量変化における遺伝-環境相互作用。Hikida et al., *Neurosci Res*, 2019 より引用。

図 1 で見られたコカイン連日投与による逆耐性現象は薬物依存の指標とされる (Kalivas & Stewart, *Brain Res Brain Res Rev*, 1991)。そこで、次にコカインに対する精神依存行動を測定するために、条件付け場所嗜好試験を行った。3 日間のコカイン投与による場所条件付けにより、コカインを投与された場所に対する嗜好性を獲得するが、思春期に孤立飼育した変異型 DISC1 トランスジェニックマウス (GXE) では、他のマウス群と比較をしてより大きな条件付け場所嗜好性を獲得した (Hikida et al., *Neurosci Res*, 2019)。

これらのことからコカイン依存行動の獲得において、遺伝-環境相互作用が関与することが明らかになった。

次に、コカイン依存行動の獲得における遺伝-環境相互作用の分子機構を探索した。薬物依存に関連することが知られている脳部位である側坐核、大脳皮質前頭前野、腹側被蓋野の分子変化を調べた (Di Chiara & Imperato, *PNAS*, 1988)。DISC1 蛋白質に結合することが知られている PDE4B と PDE4D に着目した (Hikida et al., *Expert Opin Ther Targets*, 2012)。PDE4 は、細胞内情報伝達分子である cAMP の分解を制御する酵素分子であり、側坐核、大脳皮質前頭前野、腹側被蓋野の神経細胞に存在する (Nishi & Snyder, *J Pharmacol Sci*, 2010)。DISC1 は PDE4 への結合により酵素活性を変化させる (Millar et al., *Science*, 2005)。

まず、側坐核、大脳皮質前頭前野、腹側被蓋野の PDE4B と PDE4D の mRNA を qPCR 法により調べたが、GXE、E、G、CTL の 4 群で差がなかった (Hikida et al., *Neurosci Res*, 2019)。次に側坐核、大脳皮質前頭前野、腹側被蓋野の PDE4B と PDE4D の蛋白量をウエスタンブロッティング法により調べたが、GXE、E、G、CTL の 4 群で差がなかった (Hikida et al., *Neurosci Res*, 2019)。

最後に、側坐核、大脳皮質前頭前野、腹側被蓋野における PDE4 の cAMP 分解酵素活性を調べると、側坐核特異的に GXE 群で PDE4 酵素活性が他のマウス群と比較をして有意に上昇していた (図 2 a, \* $P < 0.05$ , GXE, n=6; G, n=4; E, n=5; CTL, n=5)。それに対して、大脳皮

質前頭前野 (図 2 b)、腹側被蓋野 (図 2 c) の PDE4 酵素活性は GXE、E、G、CTL の 4 群で差がなかった。

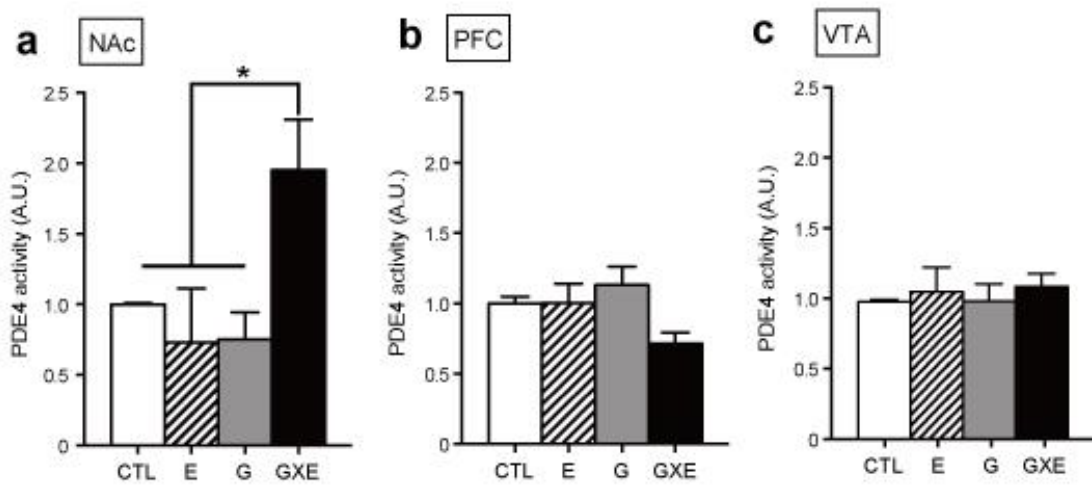


図 2. 側坐核(a)、大脳皮質前頭前野(b)、腹側被蓋野(c)における PDE4 の cAMP 分解酵素活性。Hikida et al., *Neurosci Res*, 2019 より引用。

図 2 で見られた PDE4 酵素活性の変化が神経細胞内シグナルにどのような影響を与えているかをシグナル分子のリン酸化を測定することにより調べた。

ドーパミン D1 受容体アゴニストである SKF81297 を側坐核スライスに投与すると、DARPP32 と GluA1 の両方のリン酸化シグナルが上昇した。しかし、そのリン酸化シグナルの上昇度を GXE、E、G、CTL の 4 群で比較したところ、有意な差が見られなかった (Hikida et al., *Neurosci Res*, 2019)。

次に PDE4 アンタゴニストであるロリプラムを側坐核スライスに投与すると、DARPP32 と GluA1 の両方のリン酸化シグナルが上昇した。そのリン酸化シグナルの上昇度を GXE、E、G、CTL の 4 群で比較したところ、GXE マウスで他のマウス群と比較をして有意なリン酸化シグナルの上昇をみとめた (Hikida et al., *Neurosci Res*, 2019)。

そこで、ロリプラムが GXE マウスの薬物依存行動を抑制する可能性を考え、コカイン依存行動におけるロリプラム投与の影響を調べた。コカイン投与 20 分前にロリプラム投与を行ったところ、GXE マウスで観察された連日コカイン投与による行動量増大と条件付け場所嗜好性の増加を共に抑制することが出来た (図 3、a、行動量、\*\* $P < 0.01$ ,  $n = 7$  each ; b、条件付け場所嗜好性試験、\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 5$  each)。

今回は DISC1 遺伝子変異と思春期での社会的孤立という遺伝-環境相互作用が、薬物依存行動を増悪させることを示し、その分子機構として、側坐核特異的な PDE4 の酵素活性上昇によるものであることを示した。

側坐核において PDE4 は間接路を構成するドーパミン D2 受容体発現神経細胞に局在することが知られている (Nishi et al., *J Neurosci*, 2008)。また、間接路の人為的な機能抑

制は薬物依存行動の増悪を惹起する (Ferguson et al., Nat Neurosci, 2011)。これらを合わせて考えると、GXE マウスにおける側坐核特異的な PDE4 酵素活性上昇は、ドーパミン D2 受容体発現神経細胞の機能を抑制することによって、薬物依存行動の増悪が惹起されていることが示唆される。本モデル動物は、精神疾患における遺伝-環境相互作用を調べる良いモデルであり、今後、様々な精神疾患病態の神経回路・分子機構の研究に有用であると考えられる。

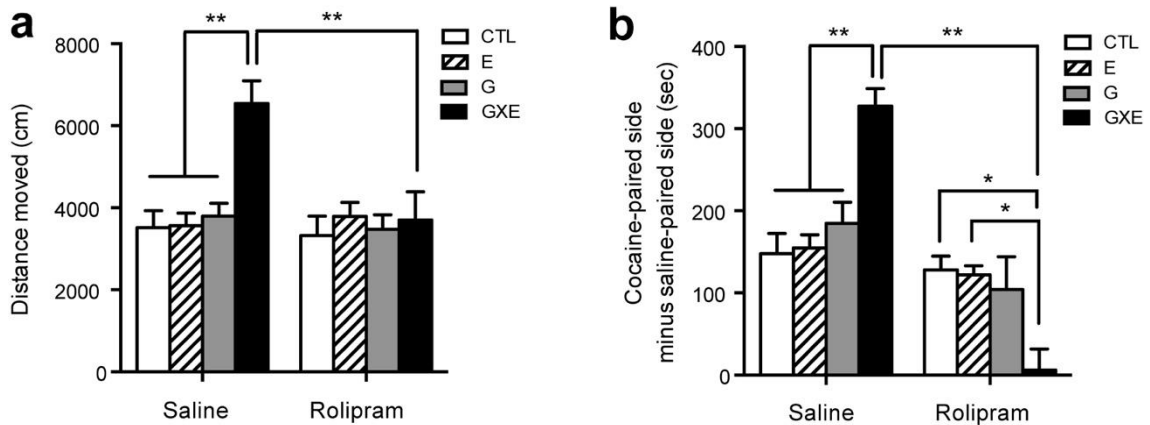


図3. コカイン連日投与による行動量増大(a)と条件付け場所嗜好性(b)におけるロリプラム投与の効果。Hikida et al., Neurosci Res, 2019 より引用。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

薬物依存は社会生活に多大なる影響を与える精神疾患であり、その発症機構の解明は社会生活への貢献・波及効果が大きい。本モデル動物を用いた研究の今後の発展は、治療法や予防法の開発につながることを期待できる。