

新規モデルマウスを用いた発達期神経機能障害による精神神経疾患の研究

藤 原 智 徳¹ 宮 東 昭 彦² 小 藤 剛 史³¹杏林大学医学部細胞生理学教室²杏林大学医学部解剖学教室³杏林大学大学院医学研究科RI部門

【研究成果のまとめ】

ヒト精神神経疾患の原因として、先天性の遺伝子異常および後天的要因による神経機能の障害が関わると考えられている。これまで精神神経疾患に関与するいくつかの原因遺伝子が同定され、それらの遺伝子を欠損したマウスを動物モデルとして先天性の遺伝子異常について詳細な研究が行われている。一方後天的要因については、適切なモデル動物がなく不明な点が多い。そこで本研究は新規にモデルマウスを作成し、それらを用いて後天的要因により精神神経疾患が生じる分子機構の解明を目的として行った。

自閉症、統合失調症などの多くの精神神経疾患で社会的行動の障害が認められることから、マウスの社会行動に着目し図1に示したような新規の社会行動の解析法を新しく確立した。この方法はNadlerらのthree chamber法を改良したもので、自発行動量、社会行動量（社会性）、社会認知能を測定することができる。われわれはこれまでの研究において、シナプス機能を制御するSTX1Aの遺伝子欠損マウス（STX1A KO）を作成し⁽¹⁾、そのマウスで自閉症様、統合失調症様の精神神経症状が見られることを明らかにしていた⁽²⁾。そこで図1の方法でSTX1A KOの社会行動について解析した。その結果、STX1A KOで既知のマウスと新規のマウスの区別ができず、社会認知機能の低下が認められた（図2A）。興味深いことに、この障害はドパミン（DA）取り込み阻害剤、D1受容体のアゴニストおよびオキシトシン（OXT）の投与により改善された（図2B）。これは、社会行動を制御するとされるDAあるいはOXT分泌がSTX1A KOで低下し、通常では見られない社会行動が誘導されたことを示唆している。

STX1A KOの行動解析結果をもとに考えると、成熟個

体の神経細胞でSTX1Aの発現量が変化したとき、シナプス機能に障害が生じ、社会行動の異常が引き起こされると予想できる。そのため、成熟個体内でSTX1Aの発現量を変化させることができれば、精神神経疾患に対する後天的要因を解析するための有用なモデルとなると考えられる。そこでわれわれは、①Cre-loxPシステムを用いたコンディショナルノックアウトマウス、②テトラサイクリンにより外来遺伝子を発現誘導するシステム（tet-ON）を用いた遺伝子組み換えマウスの作成を行なった。コンディショナルノックアウトマウス（cKO）は、組み換えベクターをES細胞に導入し、相同組み換え体を作成し、その細胞を受精卵にインジェクトしてキメラマウスを得た。また、tet-ONマウスは作成した組み換えベクターベクターを前核受精卵にインジェクションすることでキメラマウスを得た。なおこれらのキメラマウスの作成はユニテック（株）に外注した。これらのマウスは常法に従って、C57BL/6に戻し交配を行い、遺伝子組み換えマウスを作成した。次に、これらのマウスにおけるSTX1Aの発現解析を行った。cKOマウスでは正常マウスと同程度のSTX1蛋白質の発現が認められた。現在、Creによる組み換えでSTX1Aの遺伝子発現を欠損させることができるか確認している。一方、tet-ONマウスは、正常時発現量の10%程度がtetにより発現誘導が可能であった。今後これらのマウスを用い、上記のような社会行動の解析を行う予定である。

正常動物に対し、強いストレス刺激を与えることで様々な行動異常を呈することが知られている⁽⁴⁾。そこで慢性の社会的敗北ストレスを与えたマウス（SD）の社会行動について解析を行った。図3A、Bに示したように、SDでは社会行動の障害が認められた。興味深いことに、これらのマウスの海馬でSTX1Aの発現量が低下

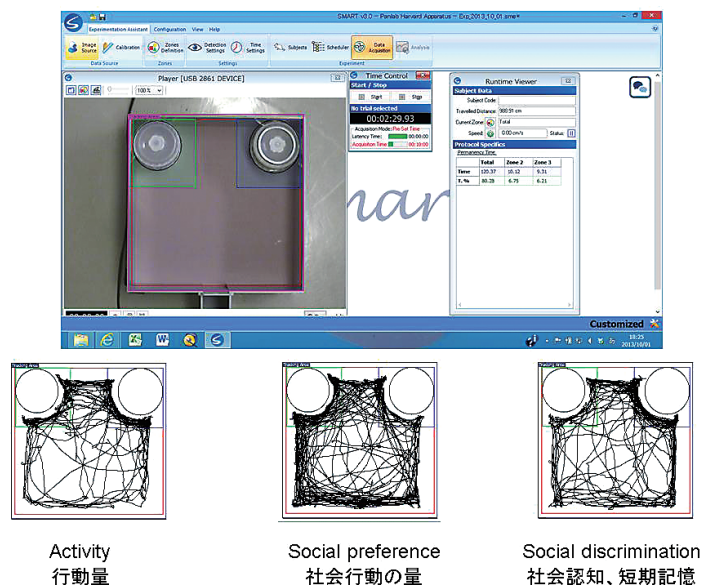


図1 SMARTシステムを用いた社会行動の解析

40cm×40cmのフィールド内に0.5cm幅のスリットが入ったシリンダー2つを設置した(上図)。このフィールド内にマウスを入れ、その行動量をSMARTシステムにより解析し、シリンダーの周辺に滞在した時間を計測した。下図は実際の例である。図中央(Session2)は、左側のシリンダー内にマウスをいれた状態でフィールド内のマウスの行動量を測定した結果である。図右はSession2の10分後、右のシリンダー内に別の新規のマウスを入れた場合の結果である。右左のシリンダー近辺に滞在する時間を比較すると、右のほうが長くなっている。

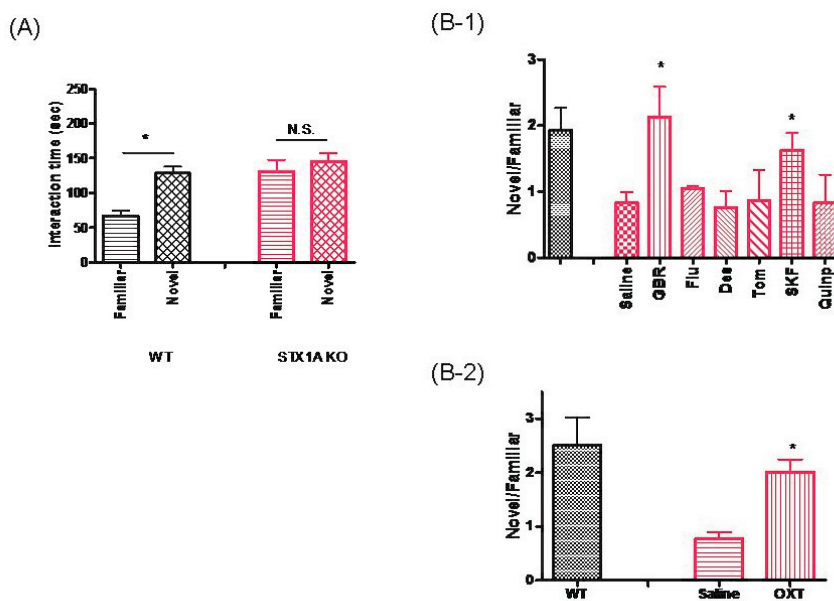


図2 STX1A KOの社会行動

(A) 正常はマウスでは新規のマウスへの接触時間が多くなるのに対し、STX1A KOでは2匹のマウスの区別がほとんどできなかった。(B-1) 社会行動異常に対する薬理的解析。STX1A KOでの異常はDA取り込み阻害剤であるGBR12935およびD1受容体アゴニストであるSKF38393の投与により改善できた。また社会行動制御に関わるとされるペプチドであるOXTを脳室内に投与した場合にもこの異常は改善された。(B-2)

していることがわかった。これはストレス刺激により誘発された何らかのエピジェネティックな変化が原因であると考えられる。現在その分子機構の解析を行っている。さらに驚いたことに、STX1Aの発現量の変化はストレス刺激を受けたマウスの仔においても認められた。これ

は、エピジェネティックな変化が次世代に遺伝することを示唆する結果である。これがどのような分子機構によるかこれまでのところ明らかにされていない。これについては本研究から見出した新たな研究課題として今後取り組んでいく。

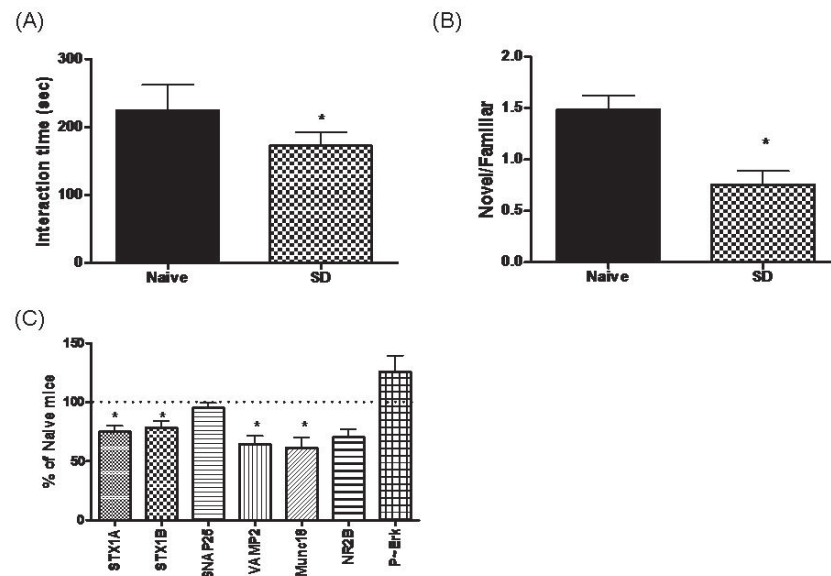


図3 慢性の社会的敗北ストレス刺激 (SD) を受けたマウスの解析
 (A), (B) 社会行動の解析。SD群では社会行動量, 社会認知能の低下が見られた。(C) SD群の海馬でのシナプス関連蛋白質の発現量解析。STX1Aを含むいくつかの蛋白質の発現量が低下していた。

本研究では上記のように数種のモデルマウスが作出できた。またこれらを用いて精神神経症状の1つである社会行動を客観的に評価できる解析法が確立できた。今後これらを用いて後天的要因による神経機能の障害により精神神経疾患が引き起こされる機構を解明していく。

参考文献

- (1) Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity.
Fujiwara T, Mishima T, Kofuji T, Chiba T, Tanaka K, Yamamoto A and Akagawa K
J Neurosci 26: 5767-5776 (2006)
- (2) HPC-1/syntaxin 1A gene knockout mice show abnormal behavior possibly related to a disruption in 5-HTergic systems.
T Fujiwara, M Snada, T Kofuji, T Yoshikawa and K Akagawa
Eur J Neurosci 32: 99-107 (2010)
- (3) Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice.
Nadler JJ, Moy SS, Dold G, Trang D, Simmons N, Perez A, Young NB, Barbaro RP, Piven J, Magnuson TR, Crawley JN
Genes Brain Behav 3: 303-14 (2004)
- (4) Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model.
Kohda K, Harada K, Kato K, Hoshino A, Motohashi J, Yamaji T, Morinobu S, Matsuoka N, Kato N
Neuroscience 148: 22-33 (2007)

論文

HPC-1/syntaxin 1A and syntaxin 1B play distinct roles in neuronal survival
 T Kofuji, T Fujiwara, M Sanada, T Mishima, K Akagawa
 J. Neurochem. (in press)

Syntaxin 1B, but Not Syntaxin 1A, Is Necessary for the Regulation of Synaptic Vesicle Exocytosis and of the Readily Releasable Pool at Central Synapses
 T Mishima, T Fujiwara, M Sanada, T Kofuji, M Kanai-Azuma, K Akagawa
 PloS one 9 (2), e90004

Presynaptic inhibitory actions of pregabalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of mouse spinal cord: Further characterization of presynaptic mechanisms.
 Matsuzawa R, Fujiwara T, Nemoto K, Fukushima T, Yamaguchi S, Akagawa K, Hori Y.
 Neurosci Lett. 2013 S0304-3940(13) 01017-3
 Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic β cells during pregnancy.
 Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Okamura T, Uchida T, Fujitani Y, Akagawa K, Kakei M, Watada H, German MS, Nagamatsu S.
 Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 110(48): 19420-5.
 Oligomerised lychee fruit-derived polyphenol attenuates cognitive impairment in senescence-accelerated mice and endoplasmic reticulum stress in neuronal cells.
 Sakurai T, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Ogasawara J, Kizaki T, Sato S, Fujiwara T, Akagawa K, Izawa T, Ohno H.
 Br J Nutr. 2013 Mar 28: 1-10.

学会発表

日本神経科学会 京都

STX1A and STX1B knockout mice exhibited autistic disorder and schizophrenia like neuropsychological abnormalities, respectively.

T Fujiwara, T Kofuji, T Mishima and K Akagawa

日本生理学会 鹿児島

HPC-1/STX1A and STX1B contribute to regulation of social

behavior.

T Fujiwara, T Kofuji, T M and K Akagawa