

精神疾患モデルマウスはストレスに弱いのか？

宮川 剛, 山崎 信幸

要約：著者は、遺伝子改変マウスに対して網羅的行動テストバッテリーを行うことで、脳に発現する遺伝子の行動レベルでの機能についての研究を行ってきた。近年、マサチューセッツ工科大学の利根川らとの共同研究によって、前脳特異的カルシニューリン (CN) ノックアウトマウスが統合失調症様の表現型異常を示すこと、また統合失調症患者のDNAを用いた関連解析からカルシニューリンAの γ サブユニットの遺伝子、*PPP3CC*の特定のハプロタイプが統合失調症と関連を示すことから、脱リン酸化酵素のカルシニューリンが統合失調症の感受性遺伝子であろうことを報告した。この知見に基づき著者らは、統合失調症の発症にCNが関与するシグナル伝達経路の異常が関わっているとする「統合失調症のカルシニューリン仮説」を提唱している。ここでは、宮川らが報告した前脳特異的CNノックアウト (CN-KO) マウスの統合失調症様の表現型異常を中心に統合失調症とCNとの関連について解説する。このマウスでは、不安様行動も顕著に亢進しており、環境の変化に弱いなど、ストレスに対する感受性も亢進していると考えられるが、精神疾患のストレス脆弱性仮説との関連についても議論する。

1. 前脳特異的カルシニューリンノックアウトマウスは統合失調症様の行動異常を示す

カルシニューリン (CN または PP2B : protein phosphatase 2B) は、カルシウム・カルモジュリンに依存性を持つ、唯一のセリン/スレオニン脱リン酸化酵素で、脱リン酸化活性を持つ触媒サブユニット (CNA) とカルシウム結合部位を持つ調節サブユニット (CNB) からなるヘテロダイマーである(1)。CNAは3種類 ($A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$)、CNBは2種類 (B1, B2)

のアイソフォームが知られている。様々な組織で発現しているが、特に中枢神経系において強く発現しており、脳の全タンパク質の1%をも占めているといわれている(2)。CNは免疫抑制剤であるシクロスポリンAやFK506により活性が阻害され、心筋肥大とも関係が深い。CNの生理的な機能については、細胞内 Ca^{2+} 放出、転写因子の機能調節、シナプスの可塑性、神経伝達物質の放出などに関係していると考えられている(3-6)。

CNはシナプス可塑性に関係していることから、学習や記憶などの高次脳機能に重要な役割を担っているのではないかと予想されていた。しかしCNBを完全に欠損させた場合、発生の段階で致死となってしまうため行動レベルでの機能を解析することはできなかった。そこで利根川らのグループでは、Cre-loxPシステムを用いて前脳特異的にCNBを欠損させたマウスを作ることによってCNB欠損マウスの高次脳機能の解析を可能とした(7)。

CN-KOマウスはホームケージでの飼育時に、実験者から素早く逃げ回り捕まえるのが難しく、実験者に噛みつくなどの行動が頻繁にみられた。このマウスの行動異常の全体像を実験的に明らかにする目的で、宮川らはマウスの網羅的な行動テストバッテリーを行った(8,9) (表1 : <http://behav.hmro.med.kyoto-u.ac.jp/>参照)。参照記憶を調べるモリス水迷路や、恐怖条件付けテストではCN-KOマウスは障害を示さなかった。一方、作業記憶 (ワーキングメモリー) を調べる八方向放射状迷路テストを行ったところ、CN-KOマウスで著しい障害が見られた (図1-A1, A2)。更に、作業記憶を調べるタイプのモリス水迷路 (遅延場所合

表1 行動テストバッテリー一覧

| カテゴリー | 代表的テスト |
|--------------|---|
| 学習・記憶 | モリス水迷路 8方向放射状迷路 バーンズ円形迷路 明暗・左右弁別テスト (T字迷路) 自発的交替テスト 受動的回避 恐怖条件付け (フリージング) |
| 不安・恐怖 | 高架式十字型迷路 明暗選択テスト オープンフィールドテスト |
| アルコール感受性・嗜好性 | 正立反射の消失 2ボトル選択 活動量変化 運動機能低下 |
| 攻撃行動 | レジデント・イントルーダーテスト 母性攻撃行動テスト |
| 統合失調症 | プレパルス抑制テスト 潜在抑制テスト オープンフィールドテスト 社会的交互作用テスト 8方向放射状迷路 モリス水迷路 (作業記憶バージョン) |
| うつ様行動 | ポーソルト強制水泳テスト テールサスペンションテスト |
| 痙攣感受性 | 薬剤誘発性痙攣 聴覚刺激誘発性痙攣 扁桃核キンドリング |
| 運動・運動学習 | ローターロッドテスト ワイアーハンダテスト フットプリントテスト ビームテスト 前庭動眼反射 瞬膜条件付け |

せ課題)でも, CN-KO マウスで著しい障害が認められた。これらの結果は, CN の欠損は参照記憶には影響を与えず, 選択的に作業記憶に障害を与えることを示している。またオープンフィールドテストでは, 活動量が顕著に亢進していることが分かった。統合失調症の症状の一つに注意の障害があり, プレパルス抑制テスト, 潜在抑制テスト等の課題で注意力が低下していることが統合失調症患者で示されている(10, 11)。同様の実験をマウスでも行うことができ, CN-KO マウスでもこれらのテストで障害が認められた。新奇場面下における社会的交互作用テストでは, マウス同士が接触している時間が短くなっていった。野生型のマウスは明期に互いに寄り添って眠るのが普通であったが, CN-KO マウスでは1匹ごとに離れて眠る傾向が強いことが, 宮川によって考案・開発されたホームケージ内社会的交互作用モニターシステムによって観察された(図1-C1, C2)。また巣作り行動も CN-KO マ

ウスでは障害されていた(図1-B1, B2)。NMDA 受容体の阻害作用を持つフェンサイクリジンやケタミンを投与すると統合失調症患者の症状が悪化することが知られている(12)。そこで CN-KO マウスで NMDA 受容体阻害薬の MK-801 を投与した時の活動を見たところ, CN-KO マウスは対照群に比べて活動量が著しく亢進することが明らかになった。

以上をまとめると, CN-KO マウスで見られる行動異常は, 作業記憶の障害, 活動量の亢進, 注意障害, 社会的行動低下, NMDA 受容体阻害薬に対する感受性の亢進などであり, これらの所見は統合失調症患者の症状に大変よく一致していた(10-15)。また統合失調症モデル動物とされるアンフェタミン投与ラット(16), NMDA 受容体阻害薬投与マウス(17), 幼若期海馬破壊ラット(18), ドパミントランスポーター遺伝子ノックアウトマウス(19), Dvl1 遺伝子ノックアウトマウス(20), NMDAR1 ノックダウンマウス(21)などが示す行動異常のパターンにもよく似ていた。

2. カルシニューリンと統合失調症

遺伝統計学的解析により統合失調症の感受性遺伝子の検索が行われており, 連鎖解析によりその候補と考えられる連鎖部位がいくつか報告されている。その中に, CNB サブユニットの遺伝子がある 2p の部位や, CN が結合するタンパク質である FKBP の遺伝子がある 6p, CNA γ サブユニットの遺伝子がある 8p など, CN に関係する遺伝子がある部位がいくつも存在している。ハプロタイプ解析を用いて各 CN 関連遺伝子について行ったところ, 8p21.3 にある CNA γ サブユニットの遺伝子 PPP3CC が統合失調症の患者に強い関連をもつことが分かった(22)。

統合失調症が CN の関与する信号伝達経路の異常と関係しているという考え方は従来のさまざまな統合失調症の仮説とも整合性が高い。dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32)/Inhibitor-1 は, 各種受容体などの脱リン酸化に広く機能している Protein phosphatase-1 (PP-1) の活性を制御する酵素である(4)。DARPP-32 は D1/D5 受容体から cAMP を介した経路で活性化され, CN により不活性化される。即ちこの経路では, CN がドパミン受容体からのシグナル伝達経路に“ブレーキ”のような役割を果たしていると考えられる。また CN は NMDA 受容体から流入した Ca^{2+} によって活性化されるので, グルタミン酸仮説とも整合性を持つ。その他, 神経成長因子である brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や Neu-

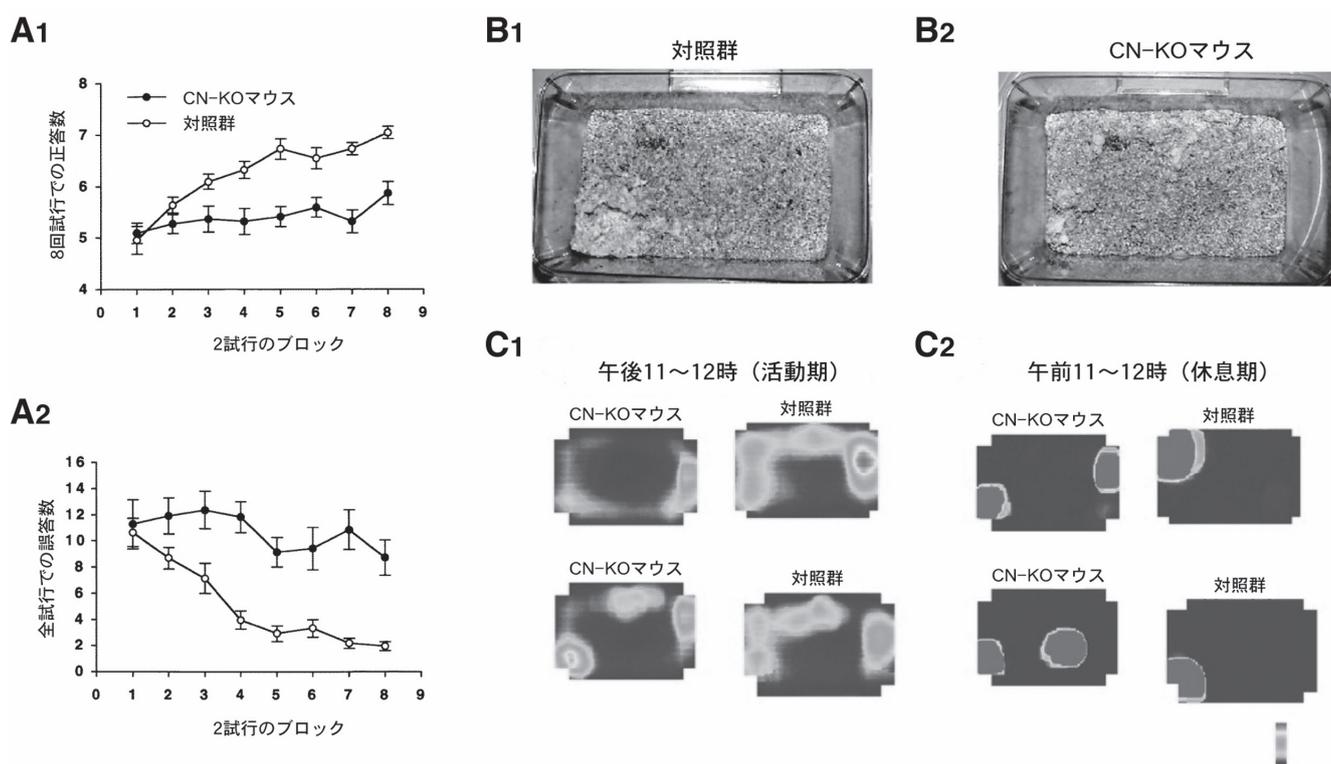


図1 CN-KOマウスの行動異常

A: 放射状迷路テスト。(A1) 最初の8回の試行でどれだけ異なるアームへ行けたか、(A2) すべてのえさをとり終るまでに何回間違えて一度行ったことのあるアームへ行けたか、を2日間の試行成績の平均をとって継続的にみた。CN-KOマウスで有意に成績が悪く、作業記憶障害を呈した。B: 巣作り行動テスト。対照群ではケージにきれいに巣を作るのに対し(B1)、CN-KOマウスはきちんとした巣を作らない傾向があった(B2)。C: 社会的交互作用テスト。同一遺伝子型のマウスを2匹新しいケージへ移し、その行動を3日間にわたって記録した。マウスは活動期にはケージの中を動き回り(C1)、休息期では動かずに1カ所にいる(C2)。休息期では対照群のマウスは2匹寄り添って寝ているが、CN-KOマウスは2匹別々の場所で寝ていることがわかった。(A: 文献7, B,C: 文献9より抜粋)

rotrophin-3が軸索の伸張に与える効果は、CNおよび転写因子である nuclear factor of activated T cell (NFAT) を介しており、またNFATのノックアウトマウスでは軸索の伸張が障害されていたという報告もあり(23-25)、神経発達障害仮説とも整合性を有する。また最近になって、ドパミンは双極性感情障害の治療薬リチウムのターゲットであるGSK3 β を活性化させ、このAkt-GSK3 β の信号伝達異常が統合失調症と関連していると報告されたが(26,27)、CNはNFATを介してGSK3 β を抑制することが報告されている(28)。

さらにCN仮説には今までの仮説では説明できないような事象とも整合性がある。統合失調症の患者は糖尿病を併発する率が高いことが知られているが(29)、CNはNFAT系を介してインスリンの遺伝子転写促進に関与しており(30)、CN阻害作用をもつ免疫抑制剤の副作用の一つとして糖尿病が挙げられている。また、統合失調症の患者は突然死することも多く、心疾患によるものが自殺に次ぐ原因だと言われているが(31)、CNが心筋の生理的・病的肥大に関わっていることは良く知られており(32)、またFK506が心毒性をもつことも知られている。リウマチの治療薬としてCN

の阻害作用を持つシクロスポリンAが使用されているが、統合失調症の患者では慢性関節リウマチの罹患率が低いというよく知られた事実(33)と一致している。また、CNはNFATを脱リン酸化してinterleukin-2(IL-2)の転写を促進させることが知られており、統合失調症患者はIL-2の発現量が減少しているなど免疫能に異常があるという知見との整合性がある。これらの事実は、CNの活性低下と統合失調症の関係を強く示唆するものと考えられる。

統合失調症の患者の死後脳でDNAマイクロアレイを用いた解析にて発現量の変化が見られた遺伝子群の中に、CNのサブユニットや基質、内在性抑制因子など少なくとも10のCN関連分子の遺伝子が含まれていたとの報告がある(34)。最近、Harrisonらのグループによって、統合失調症患者の死後脳で、3種類あるCNAすべてについて(CNA-alpha, CNA-beta, CNA-gamma)その発現量が低下していることも報告された(35)。また、非定型向精神薬であるクロザピンをラットに投与して、DNAマイクロアレイを用いて前頭前野における遺伝子の発現を調べたところ、最も発現が増加していた遺伝子はCNAであったという報

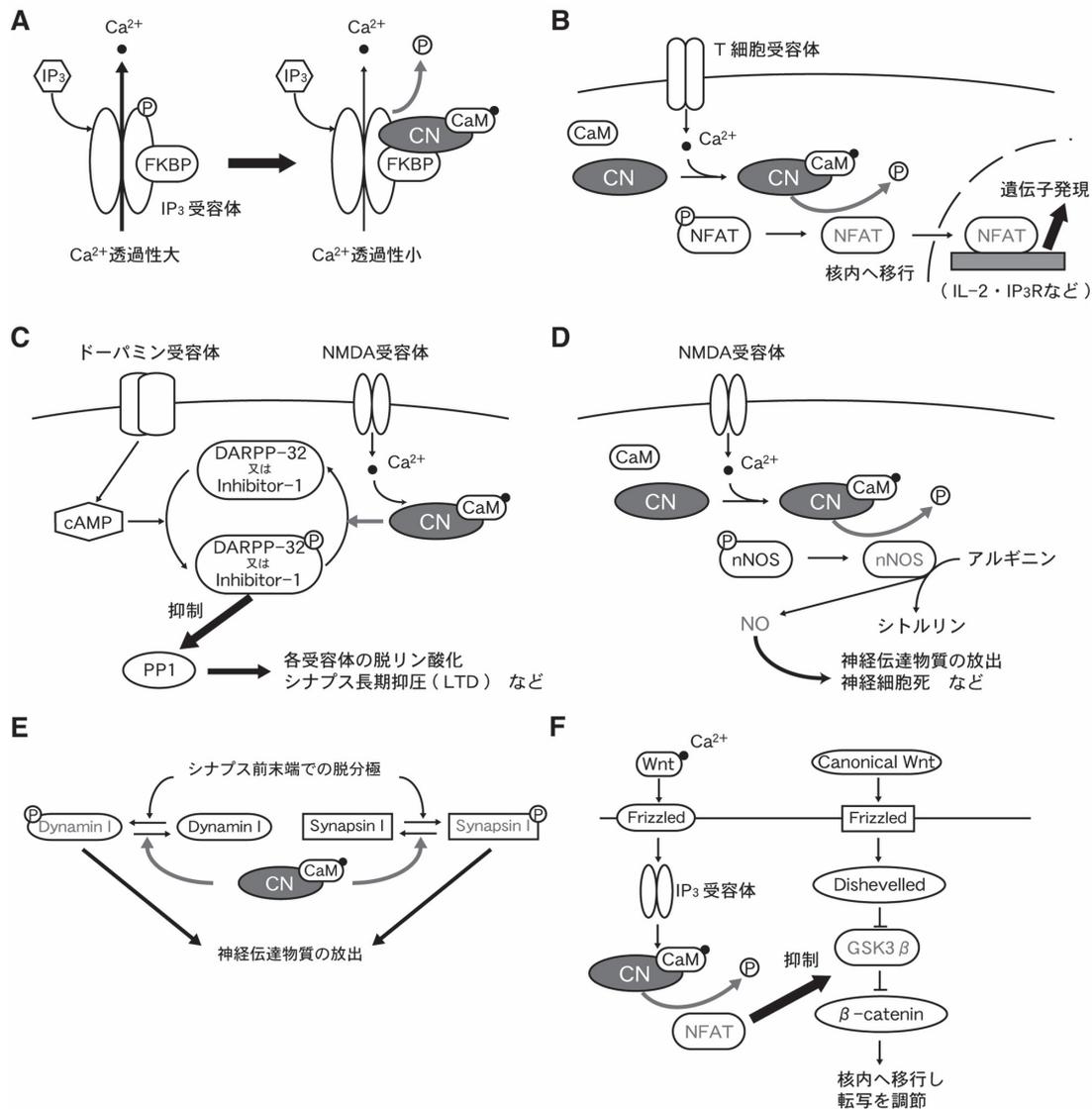


図2 CNが関与する主なシグナル伝達経路

A: IP₃/リアノジン受容体系。両受容体に結合するFKBPというタンパクにCNが結合し、受容体を脱リン酸化することでそのCa²⁺透過性を制御する。B: NFAT系。NFATはCNにより脱リン酸化されることで活性型となり、核内へ移行できるようになる。核内では様々な遺伝子の転写因子として機能する。C: DARPP-32/Inhibitor-1系。CNは、多彩な生理機能を持つprotein phosphatase-1 (PP-1)に抑制的に働くDARPP-32/Inhibitor-1の活性調節を、ドーパミン受容体の下流にあるprotein kinase Aと拮抗して行っている。D: nNOS系。神経伝達物質の放出や神経細胞死などに関係しているとされているnNOSをCNが活性化する働きをもっている。E: シナプス前タンパク系。シナプス前末端で神経伝達物質の放出に関係するタンパク、ダイナミン-1やシナプシン-1の活性制御にもCNが関係していることが知られている。F: Wntシグナル系。CNにより脱リン酸化されるNFATを通じて、Wntシグナル経路の中のGSK3βが制御される。(A, D, E: 文献40, B: 文献41, C: 文献4, F: 文献28より一部改変)

告もあり(36)、薬理作用の一部がCNシグナル伝達経路を介して発揮されている可能性も考えられる。

以上のようなことから、宮川らはCNが関与するシグナル伝達経路の異常が統合失調症の発症に関係しているのではないかと「統合失調症のカルシニューリン仮説 (CN仮説)」を提唱している。

宮川らの報告(9)を受け、CNを介したシグナル伝達経路の異常が統合失調症の発症に関連しているとする説が目目されてきている(36, 38)。CNのシグナル

伝達経路は多岐にわたり(図2に主なものを示す)、どのシグナル伝達経路が統合失調症様の行動異常に関与しているのかは未だ不明である。その疑問を解くために、著者らの研究室では現在、CNと関連が深い分子についての遺伝子改変マウスを用いて、自動化された網羅的な行動テストバッテリーを行うことで、統合失調症様症状とシグナル伝達経路の関連について研究を進めている。このような研究を通じて統合失調症の病態が解明され、新たな治療法の確立につながることを期待される。

3. CN-KOマウスはストレスに弱いのか？

さて、CN-KO マウスのストレスに対する感受性はどうか？まず、CN-KO マウスでは、Light/Dark transition テストなどの結果から、不安様行動が顕著に亢進していることがわかっている(9)。また、CN-KO マウスは突然死を示すことが多く、6 ヶ月齢の時点までに約半数が死亡する(9)。この突然死の原因はまだよくわかっていないが、ホームケージをある飼育室から別のビルディングの飼育室へ移したり、比較的ストレスが強いような行動実験を行った次の日などに急に元気がなくなり、2~3日すると死亡するというパターンが多いようである。また、ラックの一番上の棚に置いておくと死亡する率が高くなるようでもある(未発表)。統合失調症を始めとする精神疾患にはストレス脆弱性仮説という仮説がある(39)。これは、遺伝的素質や後天的な能力・対応力によってきまる発病の脆弱性(発病のしやすさ)があり、これに心理・社会的な要因によるストレスやライフイベント(引っ越し、進学、就職など)が重なって、これらの相互作用により病気が引き起こされる、というものである。CN-KO マウスでは、不安様行動が亢進していることや、環境の変化によって死亡率が高くなることなどを考慮すると、このマウスに見られる多様な精神疾患様の行動異常の一部は、各種のストレスに対する感受性の亢進に起因しているものもあるかもしれない。

文 献

- 1) Klee CB, et al. J Biol Chem. 1998;273:13367-13370.
- 2) Guerini D. Biochem Biophys Res Commun. 1997;235:271-275.

- 3) Crabtree GR. J Biol Chem. 2001;276:2313-2316.
- 4) Greengard P, et al. Neuron. 1999;23:435-447.
- 5) Snyder SH, et al. Neuron. 1998;21:283-294.
- 6) Winder DG, et al. Nat Rev Neurosci. 2001;2:461-474.
- 7) Zeng H, et al. Cell. 2001;107:617-629.
- 8) 宮川 剛, 他. 遺伝子と行動. 脳神経科学イラストレイテッド. 羊土社;2000. p. 258-264.
- 9) Miyakawa T, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:8987-8992.
- 10) Braff DL, et al. Arch Gen Psychiatry. 1990;47:181-188.
- 11) Weiner I. Psychopharmacology (Berl). 2003;169:257-297.
- 12) Tsai G, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2002;42:165-179.
- 13) American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. DSM-IV-TR. Am Psychiatr Press, Washington DC;2000.
- 14) Elvevag B, et al. Crit Rev Neurobiol. 2000;14:1-21.
- 15) Goldman-Rakic PS. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 1994;6:348-357.
- 16) Seiden LS, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1993;33:639-677.
- 17) Carlsson A, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001;41:237-260.
- 18) Lipska BK, et al. Neuropsychopharmacology. 2000;23:223-239.
- 19) Gainetdinov RR, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:11047-11054.
- 20) Lijam N, et al. Cell. 1997;90:895-905.
- 21) Mohn AR, et al. Cell. 1999;98:427-436.
- 22) Gerber DJ, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:8993-8998.
- 23) Bechstein WO. Transpl Int. 2000;13:313-326.
- 24) Graef IA, et al. Cell. 2003;113:657-670.
- 25) Groth RD, et al. J Neurosci. 2003;23:8125-8134.
- 26) Beaulieu JM, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:5099-5104.
- 27) Emamian ES, et al. Nat Genet. 2004;36:131-137.
- 28) Saneyoshi T, et al. Nature. 2002;417:295-299.
- 29) Henderson DC, et al. Int Rev Neurobiol. 2002;51:481-501.
- 30) Lawrence MC, et al. Diabetes. 2002;51:691-698.
- 31) Davidson M. J Clin Psychiatry. 2002;63 Suppl 9:5-11.
- 32) Vega RB, et al. J Biol Chem. 2003;278:36981-36984.
- 33) Torrey EF, et al. Brain Behav Immun. 2001;15:401-410.
- 34) Hakak Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:4746-4751.
- 35) Eastwood SL, et al. Biol Psychiatry. 2005;57(7):702-710.
- 36) Kontkanen O, et al. J Neurochem. 2002;83:1043-1053.
- 37) Adler E. Science. 2003;301:737.
- 38) Manji HK, et al. Science's STKE. 2003;207:49.
- 39) Zubin J, et al. J Abnorm Psychol. 1977;86(2):103-124.
- 40) Snyder SH, et al. Trends Pharmacol Sci. 1998;19:21-26.
- 41) Crabtree GR. Cell. 1999;96:611-614.

著者プロフィール

宮川 剛 (みやかわ つよし)

京都大学医学研究科 先端領域融合医学研究機構, 助教授, 生体遺伝子機能解析グループ, グループリーダー。

◇1997年東京大学大学院人文社会系研究科博士課程修了。博士(心理学)。理研 BSI 研究員, NIH 研究員, バンダービルト大学医学センター助教授(研究), MIT 主任研究員を経て, '03年より現職。日本でマウスの表現型解析コンソーシアムを立ち上げる必要があるのでは, と思っております。◇趣味: 散歩。◇主な著書:「概論・脳神経科学の large-scale 化とマウスを用いた精神疾患の研究」実験医学(特集 -ポストゲノム時代のブラックボックス- 行動を司る脳機能の分子メカニズム; 企画 宮川 剛) Vol.23 No.8 (羊土社, 2005), p1152-1158.



山崎 信幸 (やまさき のぶゆき)

◇京都大学大学院医学研究科脳病態生理学講座精神医学教室。現在, 京都大学大学院医学研究科生体遺伝子機能解析グループ(宮川グループリーダー)にて, 遺伝子改変マウスを用いた統合失調症の発症機序の研究に従事している。

