

精神疾患モデルマウスはストレスに弱いのか？

京都大学大学院医学研究科 宮川 剛

はじめに

統合失調症発症機序の生物学的仮説として、これまでにドーパミン仮説やグルタミン酸仮説、神経発達障害仮説等が提唱されてきたが^{6, 24, 32)}、これらの説では完全には説明できない事象も多い。近年、マサチューセッツ工科大学の利根川と宮川らは、前脳特異的 CN ノックアウトマウスが統合失調症様の表現系異常を示し、また統合失調症患者の DNA を用いた相関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相関を示すことから、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^{13, 29)}。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「統合失調症のカルシニューリン仮説」を提唱している。

一方、統合失調症患者の方は、ストレスの要因となるようなライフイベント（冠婚葬祭、引っ越し、進入学、人事異動など）をきっかけに発症することが多い。このことから、病気になりやすいかどうかの脆弱性（図 1 の横軸）と、発症のきっかけとなるストレス（図 1 の縦軸）の組み合わせにより精神疾患が発生するとするストレス脆弱性モデル（図 1）が提唱され、広く受け入れられている。本セミナーでは、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し、最後に CN-KO マウスがストレスに弱いかについて述べる。

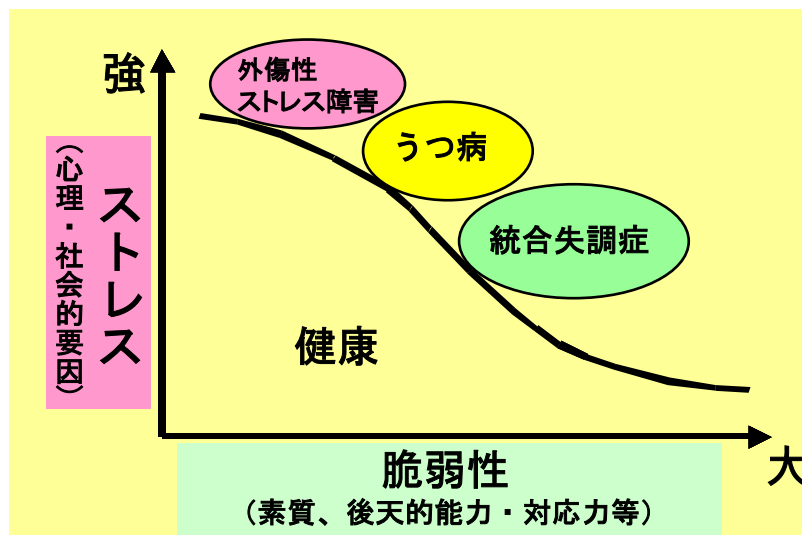


図 1：ストレス脆弱性モデル(厚労省「心の健康問題の正しい理解のための普及啓発検討会報告書」より)

カルシニューリンとは

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²¹⁾。CNA は 3 種類 (A α 、A β 、A γ)、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¹⁸⁾。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 Ca²⁺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^{8, 16, 34, 40)}。

前脳特異的カルシニューリンノックアウトマウスにおける統合失調症様の行動異常

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で CNB 欠損マウスの高次脳機能の解析を可能とした⁴¹⁾。

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^{28, 29)}(表 1)。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)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 2-A1, A2)。

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	カテゴリー	代表的テスト
学習・記憶	モリス水迷路	統合失調症	ブレパルス抑制テスト
	8方向放射状迷路 バーンス円形迷路 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)		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)
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	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
	アルコール感受性・嗜好性	痙攣感受性	薬剤誘発性痙攣 聴源発作(聴覚刺激誘発性痙攣) 扁桃核キンドリング
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	運動・運動学習	ローターロードテスト ワイアーハンガテスト 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

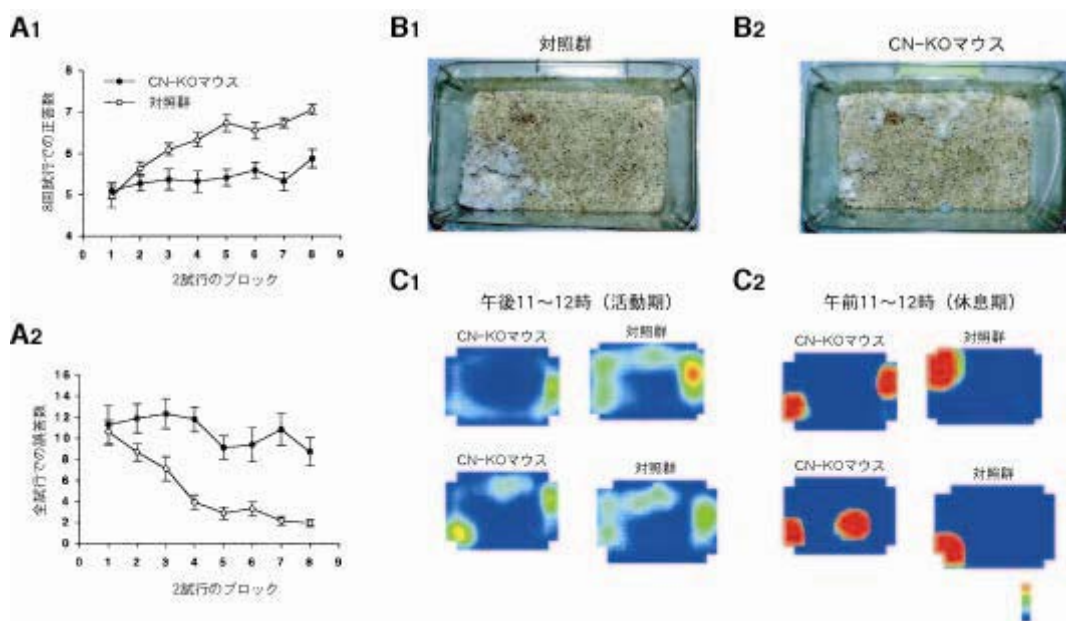


図 2 CN-KO マウスの行動異常

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) すべてののえさをとり終え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経時的にみた。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一カ所にいる (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 41、B, C: 文献 29 より抜粋)

更に、作業記憶を調べるタイプのモリス水迷路（遅延場所合わせ課題）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^{5,39)}。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 2-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 2-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³⁷⁾。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^{2,5,10,14,37,39)}。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³³⁾、NMDA 受容体阻害薬投与マウス⁶⁾、幼若期海馬破壊ラット²⁶⁾、ドーパミントランスポーター遺伝子ノックアウトマウス¹²⁾、Dvl1 遺伝子ノックアウトマウス²⁵⁾、NMDAR1 ノックダウンマウス³⁰⁾などが示す行動異常のパターンにもよく似ていた。

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相関をもつことが分かった¹³⁾。

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¹⁶⁾。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 がドー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 Neurotrophin-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^{4,15,17)}、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、ドー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^{3,11)}、CN は NFAT を介して GSK3 β を抑制することが報告されている³¹⁾。

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²⁰⁾、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²³⁾、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⁹⁾、CN が心筋の生理的・病理的肥大に関わっていることは良く知られており³⁸⁾、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³⁶⁾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だと考えられる。

統合失調症の患者の剖検脳で 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¹⁹⁾。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 であったという報告もあり²²⁾、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。

統合失調症モデルマウスはストレスに弱いのか？

さて、以上述べたように、カルシニューリンの前脳特異的ノックアウトマウスは、統合失調症の動物モデルと考えられるが、このマウスはストレスに弱いのだろうか？これについてはここで述べるのは控え、セミナーの時に議論することにしたと思う。

今後の展望

宮川らの報告²⁹⁾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注目されてきている^{1,27)}。CNのシグナル伝達経路は多岐にわたり(図3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。

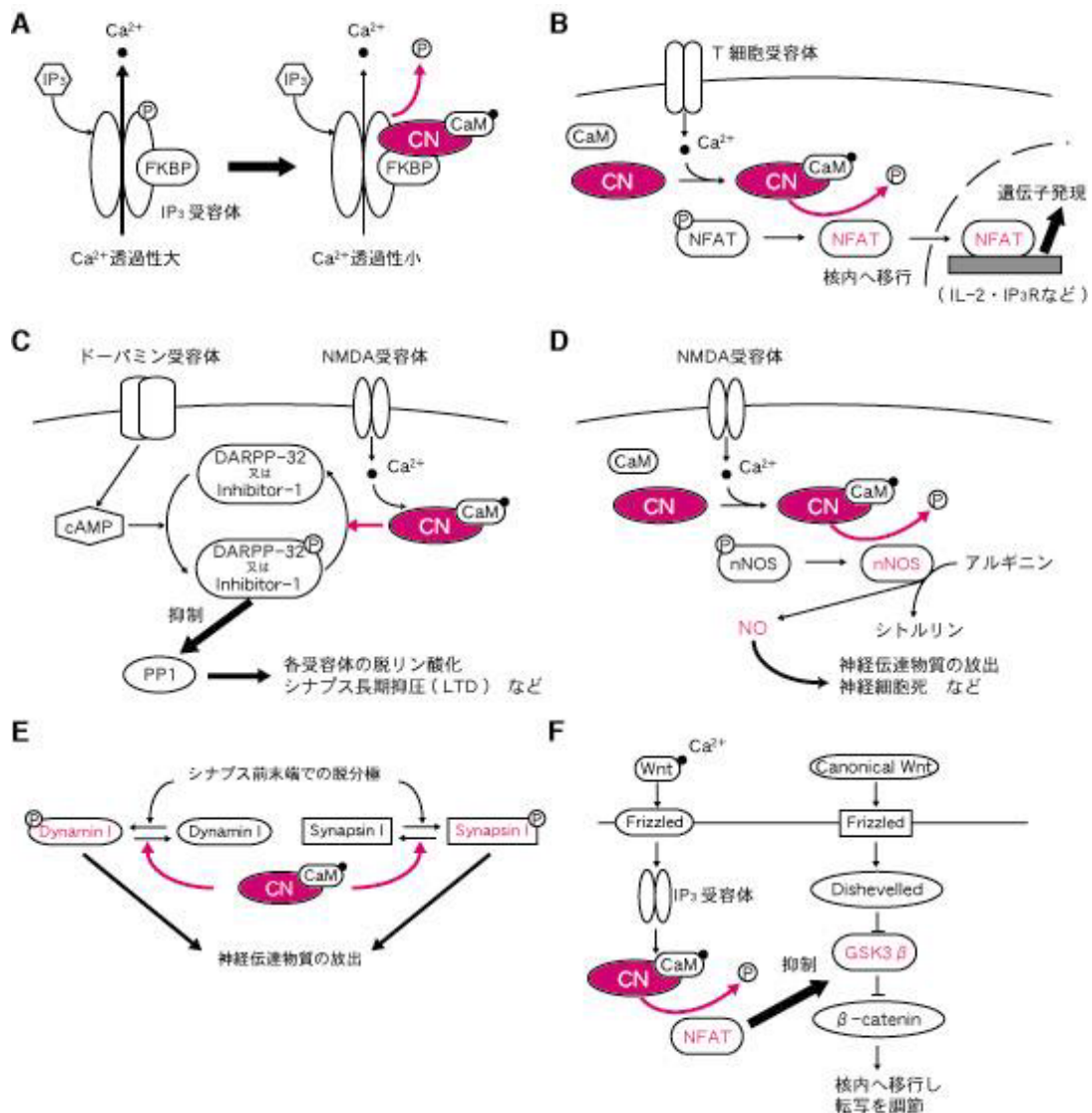


図3 CNが関与する主なシグナル伝達経路

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) に抑制性にはたらく 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言われていた nNOS を CN が活性化するのはたらしきをもっている。

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 GSK3 β が制御される。(A, D, E: 文献 35、B: 文献 7、C: 文献 16、F: 文献 31 より一部改変)

われわれの研究室 (<http://sentan1.hmro.med.kyoto-u.ac.jp/~miyakawalab/>) では、このホットな領域の研究に参加する意欲ある学生などを募集しているので、興味のあるかたは、miyakawa@hmro.med.kyoto-u.ac.jp までお気軽にご連絡いただきたい。

文献

- 1) Adler E (2003) A signal deficit in schizophrenia? *Science*, 301: 737
- 2) American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Am. Psychiatr. Assoc., Washington, DC), 4th Ed.
- 3) Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, et al (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 5099-5104
- 4) Bechstein WO (2000) Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int*, 13: 313-326
- 5) Braff DL and Geyer MA (1990) Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch Gen Psychiatry*, 47: 181-188
- 6) Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, et al (2001) Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41: 237-260
- 7) Crabtree GR (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell*, 96: 611-614
- 8) Crabtree GR (2001) Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem*, 276: 2313-2316
- 9) Davidson M (2002) Risk of cardiovascular disease and sudden death in schizophrenia. *J Clin Psychiatry*, 63 Suppl 9: 5-11
- 10) Elvevag B and Goldberg TE (2000) Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit Rev Neurobiol*, 14: 1-21
- 11) Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, et al (2004) Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. *Nature genetics*, 36: 131-137
- 12) Gainetdinov RR, Mohn AR, Bohn LM, et al (2001) Glutamatergic modulation of hyperactivity in mice lacking the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 11047-11054
- 13) Gerber DJ, Hall D, Miyakawa T, et al (2003) Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 8993-8998
- 14) Goldman-Rakic PS (1994) Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 6: 348-357
- 15) Graef IA, Wang F, Charron F, et al (2003) Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell*, 113: 657-670
- 16) Greengard P, Allen PB and Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron*, 23: 435-447
- 17) Groth RD and Mermelstein PG (2003) Brain-derived neurotrophic factor activation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-dependent transcription: a role for the transcription factor NFATc4 in neurotrophin-mediated gene expression. *J Neurosci*, 23: 8125-8134
- 18) Guerini D (1997) Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*, 235: 271-275

- 19) Hakak Y, Walker JR, Li C, et al (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 4746-4751
- 20) Henderson DC and Ettinger ER (2002) Schizophrenia and diabetes. *Int Rev Neurobiol*, 51: 481-501
- 21) Klee CB, Ran H and Wang X (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem*, 273: 13367-13370
- 22) Kontkanen O, Toronen P, Lakso M, et al (2002) Antipsychotic drug treatment induces differential gene expression in the rat cortex. *J Neurochem*, 83: 1043-1053
- 23) Lawrence MC, Bhatt HS and Easom RA (2002) NFAT regulates insulin gene promoter activity in response to synergistic pathways induced by glucose and glucagon-like peptide-1. *Diabetes*, 51: 691-698
- 24) Lewis DA and Lieberman JA (2000) Catching up on schizophrenia : Natural history and neurobiology. *Neuron*, 28: 325-334
- 25) Lijam N, Paylor R, McDonald MP, et al (1997) Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1. *Cell*, 90: 895-905
- 26) Lipska BK and Weinberger DR (2000) To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*, 23: 223-239
- 27) Manji HK, Gottesman II and Gould TD (2003) Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases. *Science's STKE*, 207: 49
- 28) 宮川 剛, 高雄啓三 (2000) 遺伝子と行動. 脳神経科学イラストレイテッド (森 寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 他/編). 羊土社, pp258-264.
- 29) Miyakawa T, Leiter LM, Gerber DJ, et al (2003) Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 8987-8992
- 30) Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, et al (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, 98: 427-436
- 31) Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, et al (2002) The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature*, 417: 295-299
- 32) Sawa A and Snyder SH (2002) Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science*, 296: 692-695
- 33) Seiden LS, Sabol KE and Ricaurte GA (1993) Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 33: 639-677
- 34) Snyder SH, Lai MM and Burnett PE (1998) Immunophilins in the nervous system. *Neuron*, 21: 283-294
- 35) Snyder SH, Sabatini DM, Lai MM, et al (1998) Neural actions of immunophilin ligands. *TiPS*, 19: 21-26
- 36) Torrey EF and Yolken RH (2001) The schizophrenia-rheumatoid arthritis connection: infectious, immune, or both? *Brain Behav Immun*, 15: 401-410
- 37) Tsai G and Coyle JT (2002) Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 165-179
- 38) Vega RB, Bassel-Duby R and Olson EN (2003) Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem*, 278: 36981-36984
- 39) Weiner I (2003) The "two-headed" latent inhibition model of schizophrenia: modeling positive and negative symptoms and their treatment. *Psychopharmacology (Berl)*, 169: 257-297
- 40) Winder DG and Sweatt JD (2001) Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 2: 461-474
- 41) Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M, et al (2001) Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell*, 107: 617-629