103　精神疾患の神経回路病態の解明	疋田　貴俊

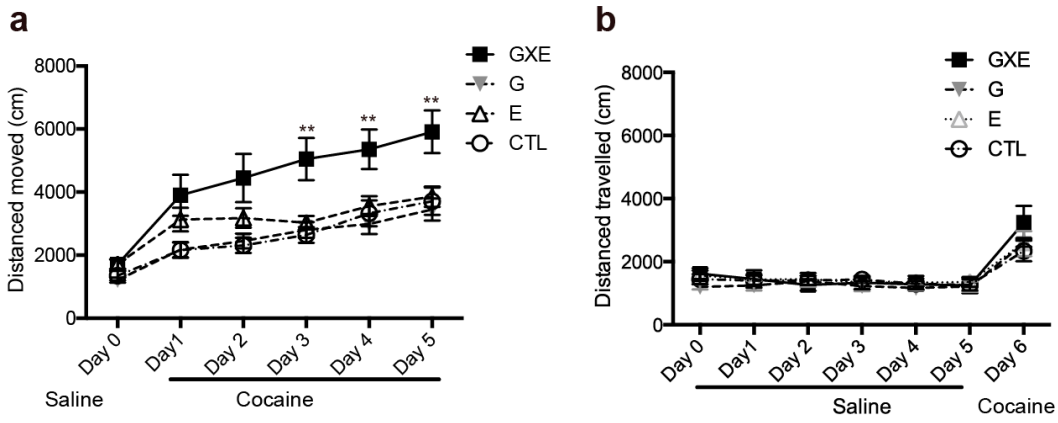
【目的】精神疾患は遺伝要因と環境要因の組み合わせによって発症する複合疾患である。研究代表者が開発したスコットランドの精神疾患多発家系で見つかった変異型 DISC1 遺伝子を前脳神経細胞に導入したトランスジェニックマウスは遺伝要因のみでは表現型に乏しいが、周産期あるいは思春期に環境要因を導入することで成年期において行動異常を呈する。そこで本マウスモデルを用いて、遺伝ー環境相互作用による精神疾患発症の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】変異型 DISC1 トランスジェニックマウスを集団飼育する群（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。コカイン投与後の行動量測定と、コカインによる条件付け場所嗜好試験によって薬物依存行動を観察した。

それぞれのマウスの脳スライスから、側坐核、大脳皮質前頭前野、腹側被蓋野を取り出し、PDE4 の mRNA 発現量、蛋白量の測定、酵素活性の測定を行った。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、それぞれのリン酸化抗体を用いて調べた。

【結果】DISC1 遺伝子変異と思春期での社会的孤立という遺伝ー環境相互作用が、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。

コカインによる行動感作における遺伝ー環境相互作用



103. 精神疾患の神経回路病態の解明

疋田　貴俊

大阪大学 大学院医学系研究科 情報機能医学講座 高次脳機能学研究室

Key words：大脳基底核，薬物依存症，ドーパミン，DISC1，モデルマウス

緒　言

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。薬物依存は他の多くの精神疾患と共存し、思春期の環境ストレスにより発症するが、その遺伝ー環境相互作用の分子機構は明らかでは無い。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［1］。そこで本マウスモデルを用いて、遺伝ー環境相互作用による薬物依存発症の分子機構を明らかにすることを目的とした［2］。

方　法

1.　実験動物

変異型 DISC1 トランスジェニックマウス［1］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。

2. 行動実験

薬物依存行動の観察は既報［3］に従った。コカイン投与は 10 mg/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。

3. 生化学実験

それぞれのマウスの脳スライスから、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［4］に従い、それぞれのリン酸化抗体を用いて調べた。

結　果

1.　コカイン連日投与による行動量変化における遺伝ー環境相互作用

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（G）、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 10 mg/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をしてより大きな行動量増加が観察された（図 1a、**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）。

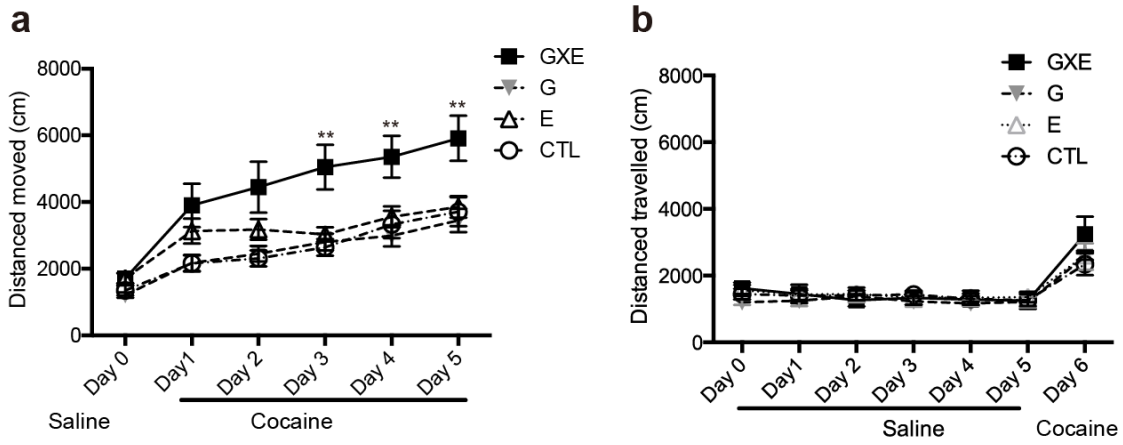


図 1.　コカイン連日投与による行動量変化における遺伝ー環境相互作用

a)　コカイン連日投与による行動量増大。縦軸は 10 分間の移動距離の平均を示した。エラーバーは標準誤差を示した。Three-way repeated measure ANOVA により遺伝因子×時間 P＝0.018、環境因子×時間 P＝0.046、遺伝×環境×時間 P＝0.011 とそれぞれの交互作用に有意差があった。**は、Bonferroni correction による post hoc 検定で、G×E と G、E、CTL のそれぞれに P＜0.01 の有意差を示した。

b)　連日の生理食塩水投与後の行動量とコカイン投与後の行動量。縦軸は 10 分間の移動距離の平均を示した。エラーバーは標準誤差を示した。Three-way repeated measure ANOVA により遺伝因子×時間 P＝0.14、環境因子×時間 P＝0.72、遺伝×環境×時間 P＝0.39 と交互作用に有意差はなかった。

このコカイン連日投与による行動感作は薬物依存の指標とされる［5］。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［2］。

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

2. コカイン依存行動の獲得における遺伝ー環境相互作用の分子機構

次に、コカイン依存行動の獲得における遺伝ー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［6］。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［7］。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［8］。DISC1 は PDE4 への結合により酵素活性を変化させる［9］。

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［2］。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［2］。

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、*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、腹側被蓋野の PDE4 酵素活性は GXE、E、G、CTL の 4 群で差がなかった［2］。

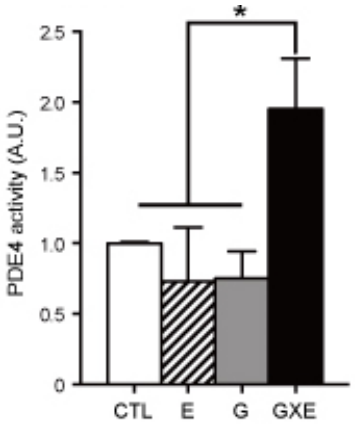


図 2. 側坐核における PDE4 酵素活性の遺伝ー環境相互作用

側坐核における PDE4 酵素活性の CTL を 1 とした相対値の平均を示した。エラーバーは標準誤差を示した。Two-way ANOVA により遺伝×環境交互作用に P＝0.0092 と有意差があった。*は、Bonferroni correction による post hoc 検定で、GXE と G、E、CTL のそれぞれに P＜0.05 の有意差を示した。

これらの側坐核特異的な 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［2］。

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［2］。

3. ロリプラムの薬物依存行動への影響

最後に、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）。

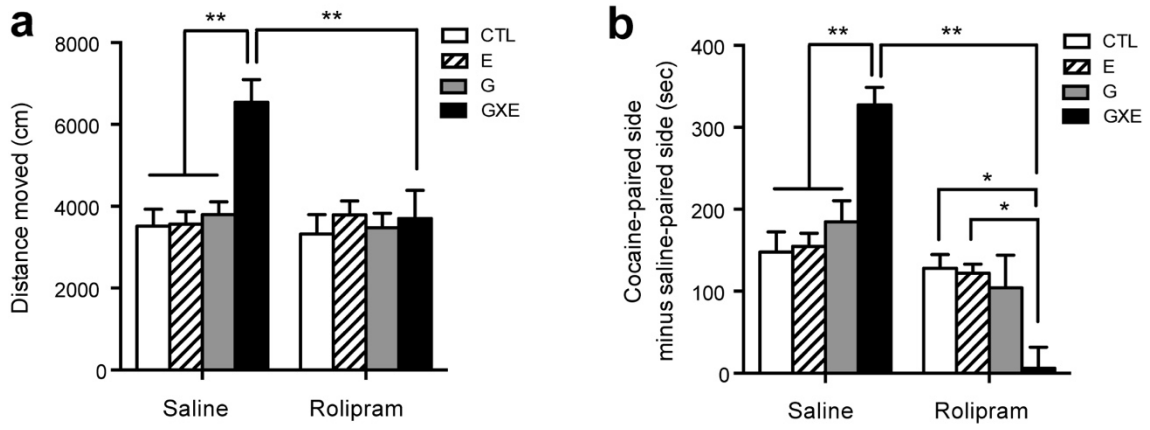


図 3. 薬物依存行動へのロリプラムの影響

a) コカインによる行動量増大。5 日間連日コカイン投与を行い、5 日目のコカイン投与後 10 分間の行動量の平均を示した。エラーバーは標準誤差を示した。生理食塩水あるいはロリプラムをコカイン投与の 20 分前に処置した。Three-way ANOVA により遺伝因子 $P = 0.022$、環境因子 $P = 0.017$、薬剤因子 $P = 0.013$ とそれぞれの主効果に有意差があった。遺伝×環境×薬剤の交互作用に有意差があった（$P = 0.011$）。**は、Bonferroni correction による post hoc 検定で $P < 0.01$ の有意差を示した。

b) コカインによる条件付け場所嗜好性試験。3 日間のコカインによる場所条件付けを行い、4 日目のコカインと条件付けした部屋の滞在時間から生理食塩水と条件付けした部屋の滞在時間を引いた値の平均を示した。エラーバーは標準誤差を示した。Three-way ANOVA により遺伝因子の主効果 $P = 0.42$、環境因子の主効果 $P = 0.60$ はそれぞれ有意ではなかったが、薬剤因子の主効果は有意であった（$P < 0.001$）。遺伝×環境×薬剤の交互作用に有意差があった（$P = 0.001$）。Bonferroni correction による post hoc 検定で**$P < 0.01$、*$P < 0.05$ の有意差を示した。

考　察

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ー環境相互作用が、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［4］。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［10］。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ー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。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学蛋白質研究所高次脳機能学研究室の Tom Macpherson、森田真規子、久留米大学医学部薬理学講座の西昭徳、黒岩真帆美、首藤隆秀、外角直樹、ジョンズ・ホプキンス大学医学部精神医学部門の澤明、丹羽美苗である。

文　献

1) Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, Seshadri S, Hikida T, Matsumoto Y, Cascella NG, Kano S, Ozaki N, Nabeshima T, Sawa A. Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. Science. 2013 Jan 18;339(6117):335-9. PMID: 23329051 DOI: 10.1126/science.1226931

2) Hikida T, Morita M, Kuroiwa M, Macpherson T, Shuto T, Sotogaku N, Niwa M, Sawa A, Nishi A. Adolescent psychosocial stress enhances sensitization to cocaine exposure in genetically vulnerable mice. Neurosci Res. 2019 Mar 1. pii: S0168-0102(19)30021-5. [Epub ahead of print] PMID: 30831136 DOI: 10.1016/j.neures.2019.02.007

3) Hikida T, Kaneko S, Isobe T, Kitabatake Y, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S. Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 6;98(23):13351-4. Epub 2001 Oct 23. PMID: 11606786 DOI: 10.1073/pnas.231488998

4) Nishi A, Kuroiwa M, Miller DB, O'Callaghan JP, Bateup HS, Shuto T, Sotogaku N, Fukuda T, Heintz N, Greengard P, Snyder GL. Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. J Neurosci. 2008 Oct 15;28(42):10460-71. PMID: 18923023 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2518-08.2008

5) Kalivas PW, Stewart J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. Brain Res Brain Res Rev. 1991 Sep-Dec;16(3):223-44. PMID: 1665095 DOI: 10.1016/0165-0173(91)90007-U

6) Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jul;85(14):5274-8. PMID: 2899326 DOI: 10.1073/pnas.85.14.5274

7) Hikida T, Gamo NJ, Sawa A. DISC1 as a therapeutic target for mental illnesses. Expert Opin Ther Targets. 2012 Dec;16(12):1151-60. doi: 10.1517/14728222.2012.719879. Epub 2012 Nov 6. PMID: 23130881 DOI: 10.1517/14728222.2012.719879

8) Nishi A, Snyder GL. Advanced research on dopamine signaling to develop drugs for the treatment of mental disorders: biochemical and behavioral profiles of phosphodiesterase inhibition in dopaminergic neurotransmission. J Pharmacol Sci. 2010;114(1):6-16. Epub 2010 Aug 12. PMID: 20716858 DOI: 10.1254/jphs.10R01FM

9) Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR, Malloy MP, Chubb JE, Huston E, Baillie GS, Thomson PA, Hill EV, Brandon NJ, Rain JC, Camargo LM, Whiting PJ, Houslay MD, Blackwood DH, Muir WJ, Porteous DJ. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. Science. 2005 Nov 18;310(5751):1187-91. PMID: 16293762 DOI: 10.1126/science.1112915

10) Ferguson SM, Eskenazi D, Ishikawa M, Wanat MJ, Phillips PE, Dong Y, Roth BL, Neumaier JF. Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. Nat Neurosci. 2011 Jan;14(1):22-4. Epub 2010 Dec 5. PMID: 21131952 DOI: 10.1038/nn.2703