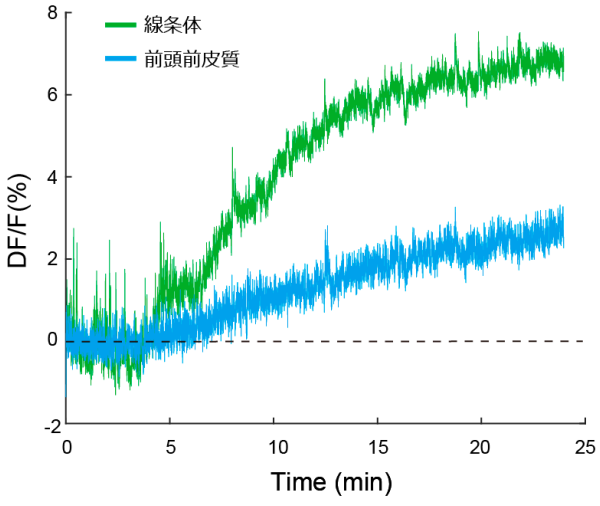
221　蛍光モノアミン測定による精神疾患メカニズムの解明	小澤　貴明

【目的】統合失調症は幻覚・妄想等の陽性症状、感情平板化等の陰性症状および認知機能障害等に特徴づけられ、現在100人に1人弱という極めて高い罹患率が示されている精神疾患である。その原因として様々な発症メカニズムが考えられているが、神経伝達物質に着目したものでは、1. グルタミン酸受容体（特にNMDA受容体）の機能低下に起因する「グルタミン酸仮説」と、2. 前頭葉のドーパミン機能の低下および皮質下脳領域のドーパミン機能の過活動に起因する「ドーパミン仮説」に基づいた研究が行われてきた。しかし、二つの仮説に関連性はあるのか、あるとしたらグルタミン酸受容体の機能低下は「いつ」「どこで」「どのような」脳内ドーパミン放出の異常を引き起こしているのかは明らかになっていない。この問題を解決するためには、グルタミン酸受容体の機能低下と関連した統合失調症モデル動物において観察される行動異常と、それに関連したドーパミン動態の異常を明らかにする必要がある。本研究では、グルタミン酸受容体の異常と関連したマウスモデルである「新生仔期NMDA受容体遮断マウス」の、統合失調症モデルとしての有用性を評価した。また、近年開発された高速蛍光ドーパミンセンサー、$GRAB_{DA}$を用いた皮質領域および皮質下領域におけるドーパミン変化量の測定法についても検討を行った。

【方法】メスマウスが出産した仔マウスを薬物処置条件に従って群分けした。MK-801条件群では生後数日間、NMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬であるMK-801を1日1回皮下投与した。統制条件であるSAL群では生理食塩水を1 ml/kgの用量で皮下投与した。生後56日目から、プレパルス抑制テストおよびメタンフェタミン反応性テストを行った。また、蛍光ドーパミンセンサーである$GRAB_{DA}$を前頭前皮質および線条体に発現させ、ファイバーフォトメトリー法を用いて、メタンフェタミン腹腔内投与後に、$GRAB_{DA}$シグナル上昇の有無を検討した。

【結果】新生仔期MK-801が成体期マウスにおけるプレパルス抑制およびメタンフェタミン反応性に及ぼす影響について様々な用量および投与期間条件を用いて検討した。その結果、低用量の新生仔期MK-801によって、成体期におけるプレパルス抑制の障害およびメタンフェタミン反応性の増強が引き起こされることが明らかになった。また、線条体および前頭前皮質から$GRAB_{DA}$シグナル多点同時記録を行ったところ、どちらの領域においてもメタンフェタミン投与後に、有意な$GRAB_{DA}$シグナルの上昇が認められた。本研究により、1. グルタミン酸受容体の機能低下と関連した統合失調症のマウスモデルおよび、2. 蛍光ドーパミンセンサーと独自のファイバーフォトメトリー技術を用いたドーパミンの多点同時記録法を確立した。今後は、本研究で確立したモデルマウスが示す強いメタンフェタミン反応性に着目し、このドーパミン測定技術を適用することで、グルタミン酸受容体の機能低下により引き起こされる統合失調症の陽性様症状と関連したドーパミン放出の異常を明らかにする。

蛍光ドーパミンセンサーを用いた多点同時ドーパミン記録



221. 蛍光モノアミン測定による精神疾患メカニズムの解明

小澤　貴明

*大阪大学 蛋白質研究所

Key words：統合失調症，動物モデル，グルタミン酸，ドーパミン，イメージング

緒　言

統合失調症は幻覚・妄想等の陽性症状、感情平板化等の陰性症状および認知機能障害等に特徴づけられ、現在 100 人に 1 人弱という極めて高い罹患率が示されている精神疾患である。その原因として様々な発症メカニズムが考えられているが、神経伝達物質に着目したものでは、1. グルタミン酸受容体（特に NMDA 受容体）の機能低下に起因する「グルタミン酸仮説」と、2. 前頭葉のドーパミン機能の低下および皮質下脳領域のドーパミン機能の過活動に起因する「ドーパミン仮説」に基づいた研究が行われてきた。しかし、二つの仮説に関連性はあるのか、あるとしたらグルタミン酸受容体の機能低下は「いつ」「どこで」「どのような」脳内ドーパミン放出の異常を引き起こしているのかは明らかになっていない。この問題を解決するためには、グルタミン酸受容体の機能低下と関連した統合失調症モデル動物において観察される行動異常と、それに関連したドーパミン動態の異常を明らかにする必要がある。

本研究では、グルタミン酸受容体の異常と関連したマウスモデルである「新生仔期 NMDA 受容体遮断マウス」の、統合失調症モデルとしての有用性を評価した。また、近年開発された高速蛍光ドーパミンセンサー、$GRAB_{DA}$ を用いた皮質領域および皮質下領域におけるドーパミン変化量の測定法についても検討を行った。

方　法

1. 実験 1：モデル動物の作製

搬入された C57BL/6 妊娠メスマウスが出産した仔マウスを薬物処置条件に従って 2 群に分けた。MK-801 条件群では生後 7 日から 9 日までの 3 日間、NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬である MK-801 を 1.0 mg/kg の用量で 1 日 1 回皮下投与した［1］。統制条件である SAL 群では生理食塩水を 1 ml/kg の用量で皮下投与した。生後 56 日目から、以下の行動テストを行った。

1) プレパルス抑制テスト：統合失調症患者においても認められる sensory motor gating 障害について検討するため、聴覚刺激を用いたプレパルス抑制テストを行った［2］。
2) メタンフェタミン反応性テスト：陽性様症状の有無について検討するため、精神刺激薬であるメタンフェタミンを腹腔内投与（1 mg/kg）し、メタンフェタミン誘導性の移動活動を比較した［2］。

2. 実験 2：モデル動物の作製（薬物投与期間の延長）

実験 1 と同様に行った。ただし、MK-801 の投与期間を生後 5 日から 14 日までの 10 日間とした。

3. 実験 3：モデル動物の作製（社会的環境ストレスの追加）

実験 1 と同様に行った。ただし、MK-801 の投与期間を生後 5 日から 9 日までの 5 日間とした。また生後 21 日齢より個別飼育を行うことで、社会的環境ストレスを与え、統合失調様の行動変容の生起を促した［3］。

4. 実験 4：モデル動物の作製（薬物投与のさらなる減量）

実験 1 と同様に行った。ただし、MK-801 の投与期間を生後 7 日から 10 日までの 4 日間とした。また、投与量を 0.1 あるいは 0.2 mg/kg とした［4］。

*現在の所属：大阪大学 蛋白質研究所 高次脳機能学研究室

5. 実験５：多点ドーパミン計測法の確立

アデノ随伴ウイルスベクターを用いて蛍光ドーパミンセンサーである $GRAB_{DA}$ を前頭前皮質および線条体に発現させた［5，6］。蛍光強度の測定は、同時に埋め込まれたファイバーフォトメトリー用の光ファイバーを介して行った。実験では自由行動下のマウスにおいてメタンフェタミン（2mg/kg）を腹腔内投与することで、$GRAB_{DA}$ シグナルの上昇が観察されるかどうか検討した。

結果および考察

1. 新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬投与が成体期のプレパルス抑制およびメタンフェタミン反応性に及ぼす影響

統合失調症患者では、プレパルス抑制の障害や、メタンフェタミンを含む精神刺激薬への反応性の増加が報告されている。そのため、統合失調症モデルマウスの妥当性検討において、この 2 つの表現型を確認することは重要である。

実験 1 および 2 において、比較的高濃度の MK-801（1 mg/kg）を新生仔期において 3 日間（実験 1）あるいは 10 日間投与（実験 2）した。成体期においてプレパルス抑制試験を行ったところ、どちらの実験においても、統制群と比較して MK-801 群における有意なプレパルス抑制率の変化は認められなかった（実験 1、データ省略；実験 2、図 1A）。次に、メタンフェタミン反応性試験ついて、実験 1 の 3 日投与条件では、MK-810 によるメタンフェタミン反応性の変化は認められなかった（データ省略）。一方、10 日間の薬物投与を行った実験 2 では、我々の予想とは逆に、MK-801 群におけるメタンフェタミン反応性の有意な減少が認められた（図 2A）。

思春期における隔離飼育ストレスは、統合失調症モデル動物における行動異常を助長することが知られている［3］。そのため、実験 3 では、新生仔期に 5 日間の MK-801（1 mg/kg）投与を行った後、21 日齢時点でマウスを集団飼育群（2～4 匹）あるいは個別飼育群に群分けした。成体期においてプレパルス抑制試験を行ったところ、薬物投与および隔離飼育ストレスの効果は認められなかった（図 1B）。また、メタンフェタミン反応性試験では、実験 2 と同様、MK-801 群におけるメタンフェタミン反応性の有意な減少が認められた。一方で、個別飼育を行うと、MK-801 投与の有無にかかわらず、メタンフェタミン反応性が上昇した（図 2B）。

実験 1 から実験 3 において、新生仔期 MK-801 投与によるプレパルス抑制の障害およびメタンフェタミン投与の効果について検討した。しかし、我々の予想に反して、MK-801 の投与はプレパルス抑制に影響を及ぼさず、メタンフェタミン反応性は、 MK-801 投与によって逆に減少した。これらの結果の中でも、特にメタンフェタミン反応性の有意な低下は今回用いた高用量の MK-801 によるドーパミン神経系機能損傷の可能性を示唆する。そのため、次の実験 4 では MK-801 投与量を 1 mg/kg から 0.1 あるいは 0.2 mg/kg に減らし、再度検討を試みた。その結果、0.1 mg/kg 投与条件おいて、プレパルス抑制の有意な減少（図 1C）と、メタンフェタミン反応性の有意な増加が観察された（図 2C）。

以上の結果より、新生仔期低濃度 MK-801 投与によって、成体期に、1. プレパルス抑制の障害および 2. メタンフェタミン反応性の増強を示す、統合失調症モデルマウスを作製できることが示された。

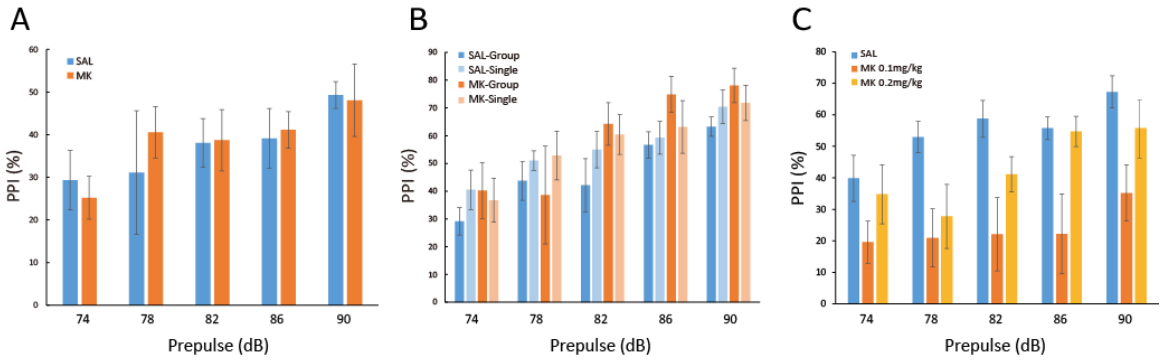


図 1. プレパルス抑制試験

実験 2（A）、実験 2（B）、実験 3（C）におけるプレパルス抑制率。

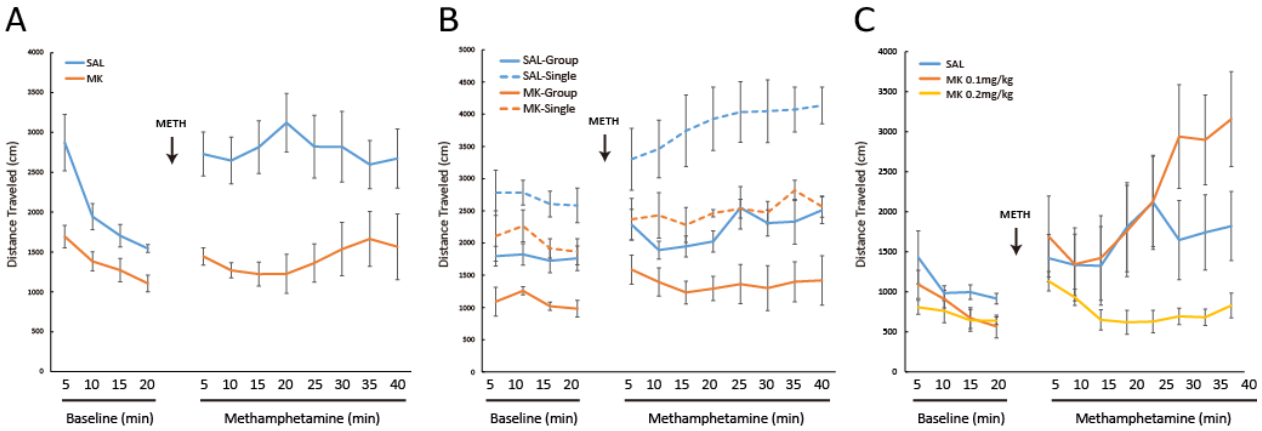


図 2.　メタンフェタミン反応性試験

実験 2（A）、実験 3（B）、実験 4（C）におけるオープンフィールドでの移動活動量。ベースライン 20 分間およびメタンフェタミン（2 mg/kg）投与後の 40 分間。黒矢印は Methamphetamine 投与タイミングを示す。

2.　ドーパミンセンサーGRAB$_{DA}$ を用いた線条体および前頭前皮質おけるドーパミン放出の定量

線条体および前頭前皮質から GRAB$_{DA}$ シグナル多点同時記録を行ったところ、どちらの領域においてもメタンフェタミン投与後に、有意な GRAB$_{DA}$ シグナルの上昇が認められた（図 3）。この結果は、GRAB$_{DA}$ の使用により、強いドーパミン入力を受ける側坐核のみならず、従来難しかった皮質領域からのドーパミン測定が可能であることを示す。また、独自のファイバーフォトメトリー技術を用いることで、複数脳領域からの同時記録も行うことが可能であることも示された。今後は、本研究で明らかにしたモデルマウスが示す強いメタンフェタミン反応性に着目し、このドーパミン測定技術を適用することで、グルタミン酸受容体の機能低下により引き起こされる統合失調症の陽性様症状と関連したドーパミン放出の異常を明らかにする。

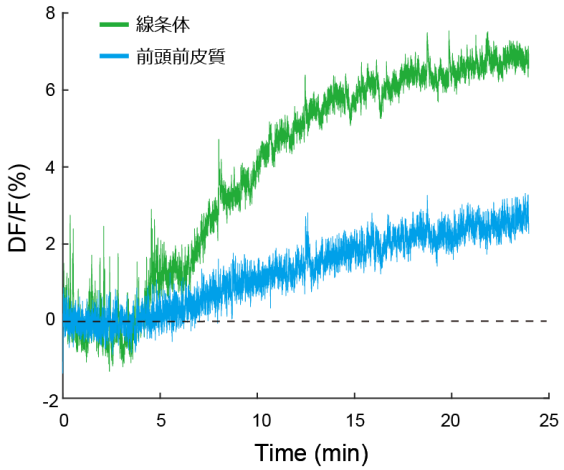


図 3.　ドーパミンセンサーGRAB$_{DA}$ の蛍光変化量

メタンフェタミン（2 mg/kg）投与後、25 分間における線条体および前頭前皮質でのドーパミンセンサーGRAB$_{DA}$ の蛍光変化量。

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疋田貴俊教授、尾谷典子氏、米丸ひなの氏である。

文　献

1） Yang L, Liu F, Yuan Q, Zhu J, Wang W, Li X, et al. Fluoxetine attenuates prepulse inhibition deficit induced by neonatal administration of MK-801 in mice. Neuroreport. 2020; 1128–1133. doi:10.1097/WNR.0000000000001524. PMID: 32956214.

2） Uehara T, Sumiyoshi T, Seo T, Matsuoka T, Itoh H, Suzuki M, et al. Neonatal exposure to MK-801, an N-methyl-d-aspartate receptor antagonist, enhances methamphetamine-induced locomotion and disrupts sensorimotor gating in pre- and postpubertal rats. Brain Res. 2010;1352: 223–230. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.013. PMID: 20633540.

3） Hikida T, Morita M, Kuroiwa M, Macpherson T, Shuto T, Sotogaku N, et al. Adolescent psychosocial stress enhances sensitization to cocaine exposure in genetically vulnerable mice. Neurosci Res. 2020;151: 38–45. doi:10.1016/j.neures.2019.02.007. PMID: 30831136.

4） Elhardt M, Martinez L, Tejada-Simon MV. Neurochemical, behavioral and architectural changes after chronic inactivation of NMDA receptors in mice. Neurosci Lett. 2010;468: 166–171. doi:10.1016/j.neulet.2009.10.091. PMID: 19895868.

5） Sun F, Zeng J, Jing M, Zhou J, Feng J, Owen SF, et al. A genetically-encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. Cell. 2018;174: 332528. doi:10.1101/332528. PMID: 30007419.

6） Sun F, Zhou J, Dai B, Qian T, Zeng J, Li X, et al. Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity in vivo. Nat Methods. 2020;17: 1156–1166. doi:10.1038/s41592-020-00981-9. PMID: 33087905.