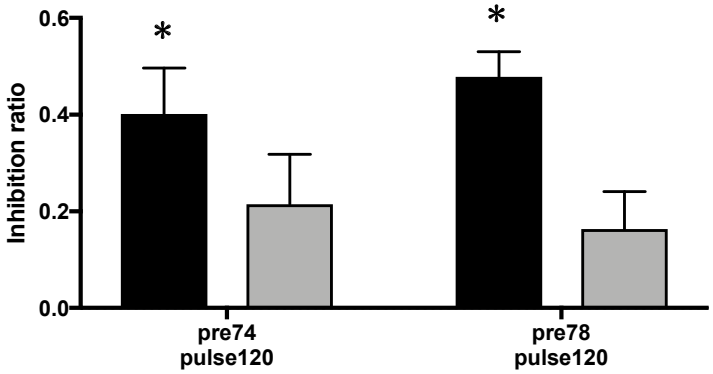
53　AMPA受容体異常に着目した統合失調症モデル動物の解析	宮崎　智之

【目的】統合失調症は妄想・幻覚といった陽性症状と気分の平板化等の陰性症状を主体とする精神疾患である。社会復帰が困難な患者も多く、そのメカニズム解明とそれに基づいた新規治療法開発は喫緊の課題である。グルタミン酸AMPA 受容体はシナプス機能を担う最重要分子であり、精神・神経機能における重要性が明らかになっている。AMPA 受容体の発現量が統合失調症等の精神疾患モデル動物において変化することが報告されているが、これらモデル動物の多くはヒトにおけるシナプス機能に基づいて作製・最適化されておらず、ヒト病態を正確に反映しているか否かについては議論が多い。本研究では、我々が臨床研究により明らかにした「統合失調症の症状特異的に AMPA 受容体量が変化する脳領域」の情報を基に構成概念妥当性が高い精神疾患モデル動物の創出を行うことを目的とした。同定された脳領域が統合失調症疾患病理を形成する責任領域であるかを動物実験により明らかにすることで、構成概念妥当性が高い統合失調症モデル動物の創出を行うことを目的とした。

【方法】本研究は以下の 3 つの方法により、統合失調症患者で得られた知見が科学的に正解であるかを検証した。1. 失調症モデルマウスの作製。2. 統合失調症モデルマウスの電気生理学実験。3. 統合失調症モデルマウスの行動実験。プレパルス抑制（PPI）試験、オープンフィールド試験、3 チャンバー社会的相互作用（社会的選好）試験。

【結果】本研究では脳領域 A の AMPA 受容体のノックダウンマウスを作製し、統合失調症に関連するいくつかの行動評価を行った。その結果、プレパルス抑制試験、オープンフィールド試験および 3 チャンバー社会認識試験のすべてにおいて正常マウス（scramble RNA 投与マウス）と比較し、それら行動結果が著しく障害されることが明らかとなった。こうした複数の行動評価により、当該モデルマウスが統合失調症患者と類似した行動表現型を示すことが明らかになった。このように脳領域 A の AMPA 受容体を局所的にノックダウンした動物モデルは、構成概念妥当性が高く、このモデル動物を用いた解析により、統合失調症の発症を規定する脳領域・神経回路網を同定すれば、統合失調症における AMPA 受容体を標的とした治療法開発の選択肢拡大に繋がると期待される。

脳領域 A における AMPA 受容体のノックダウンは AMPA 受容体電流を低下させる



53. AMPA 受容体異常に着目した統合失調症モデル動物の解析

宮崎　智之

横浜市立大学 医学部 生理学

Key words：AMPA 受容体，統合失調症，モデル動物，行動解析

緒　言

統合失調症は妄想・幻覚といった陽性症状と気分の平板化等の陰性症状を主体とする精神疾患である。社会復帰が困難な患者も多く、そのメカニズム解明とそれに基づいた新規治療法開発は喫緊の課題である。グルタミン酸 AMPA 受容体はシナプス機能を担う最重要分子であり、精神・神経機能における重要性が明らかになっている。AMPA 受容体の発現量が統合失調症等の精神疾患モデル動物において変化することが報告されているが、これらモデル動物の多くはヒトにおけるシナプス機能に基づいて作製・最適化されておらず、ヒト病態を正確に反映しているか否かについては議論が多い。近年では、ヒト死後脳を用いた研究により AMPA 受容体が精神・神経疾患の発症に関与していることが明らかになってきた。一方で、活動依存的に劇的に発現量や局在が変化する AMPA 受容体の状況は生体脳と死後脳では大きく異なる。「シナプス病」とも言われる精神疾患の疾患病態をより正確に解析するために、AMPA 受容体をヒト生体脳で可視化する方法が切望されてきたが、これまで開発された probe はヒト生体脳での AMPA 受容体密度の定量化に至らなかった［1］。その結果、AMPA 受容体を軸とした精神・神経疾患の病態解明、診断法の確立、治療薬の開発は遅々として進まなかった。我々は AMPA 受容体を可視化できる技術として PET（陽電子断層撮像法）薬剤の開発に着手し、1. AMPA 受容体への結合部位をグルタミン酸と競合しない、2. AMPA 受容体に高い特異性を有す、3. 脳移行性が高い AMPA 受容体結合化合物のデザインを行い、それを ^{11}C にて放射性標識した化合物の合成展開を行った。その結果、ヒト生体脳で AMPA 受容体を可視化できる PET 薬剤の開発に世界で初めて成功した［2，3］。この AMPA-PET を用いて統合失調症病態の解明に取り組むべく、我々はこれまでに 40 名の統合失調症患者の AMPA-PET 撮像を実施してきた。その結果、複数の脳領域で AMPA 受容体密度が低下し、それが統合失調症の重症度（Positive and Negative Syndrome Scale：PANSS）と高い負の相関を示すことが明らかになった。

本研究では、我々が臨床研究により明らかにした「統合失調症の症状特異的に AMPA 受容体量が変化する脳領域」の情報を基に構成概念妥当性が高い精神疾患モデル動物の創出を行った。同定された脳領域が統合失調症疾患病理を形成する責任領域であるかを動物実験により明らかにすることで、構成概念妥当性が高い統合失調症モデル動物の創出を行った。

方　法

1. 統合失調症モデルマウスの作製

統合失調症患者において疾患重症度と AMPA 受容体密度との間に負の相関を示した脳領域 A をターゲットとして、AMPA 受容体特異的 shRNA を用いたノックダウンでマウスの AMPA 受容体発現を抑制した動物を作製した。shRNA および scramble RNA の配列およびウイルス作製は既報の通りに行った［2］。レンチウイルスを *in vivo* 導入するため、マウスをイソフルランで麻酔し、定位固定装置で固定した。頭蓋骨に重なる皮膚を切り、脳を露出させた。ウイルス注射は、10 μl シリンジ（Hamilton）を使用してスポットあたり 1 分間、0.6 μl/min の速度で実施した。

2. 統合失調症モデルマウスの電気生理学実験

レンチウイルス導入後 3 週間目、shRNA およびスクランブル RNA を導入したマウスをイソフルランで麻酔し、断

頭後、脳を氷冷解剖バッファーにすばやく移した。冠状脳スライス（400μm）をダイセクションバッファーで切断し、室温でACSF中60分間インキュベートした後、全細胞記録を行った。記録チャンバーは、0.1 mMピクロトキシンおよび0.1 mM DL-2-アミノ-5 ホスホノペンタン酸、1 mM TTX を含む ACSF で灌流した。全細胞記録ピペット（3～5 MΩ）に細胞内溶液を充填した。全細胞の記録は脳領域 A の錐体ニューロンから得た。記録された細胞を−60 mV でクランプし、AMPA受容体を介した電流を記録した。

3. 統合失調症モデルマウスの行動実験

3.1. プレパルス抑制（PPI）試験

レンチウイルス導入後 3 週間目から 6 日間にわたり、PPI 試験装置への馴化とマウスのハンドリングをそれぞれ10分間行った。上記PPI試験装置への馴化開始から7日目において PPI 試験を行い、Inhibition ratio を算出した。Inhibition ratio については「prepulse 74 dB/pulse 120 dB」、「prepulse 78 dB/pulse 120 dB」及び「prepulse 84 dB/pulse 120 dB」において算出した。

3.2. オープンフィールド試験

マウスのハンドリングとPPI試験装置への馴化開始後3日目においてオープンフィールド試験を実施した。50 cm×50 cmのオープンフィールド内の行動量を、イメージングソフトウェアを用いて60分間追跡した。

3.3. 3チャンバー社会的相互作用（社会的選好）試験

3チャンバー社会的相互作用（社会的選好）試験は上記PPI試験実施後1週間において実施した。具体的には、5分間の試験装置への馴化の後、他個体のいないチャンバー（emptyチャンバー）と、他個体のいるチャンバー（strangerチャンバー）とにおけるテストマウスの滞在時間を10分間計測した。

結　果

1.　脳領域Aでの AMPA 受容体ノックダウンは AMPA 受容体電流を低下させる

私たちがデザインした AMPA 受容体に対する shRNA が適切に AMPA 受容体をノックダウンしたことを確かめるため、GluA1、2、3 に対する shRNA を搭載したレンチウイルスをマウス脳領域 A にマイクロインジェクションし、その 3 週間後に急性脳切片を作製し AMPA-miniatureEPSC を測定した。その結果 shRNA を注入されたマウスでは scramble RNA を注入したマウスに比べ有意に AMPA 電流が低下した（図 1）。

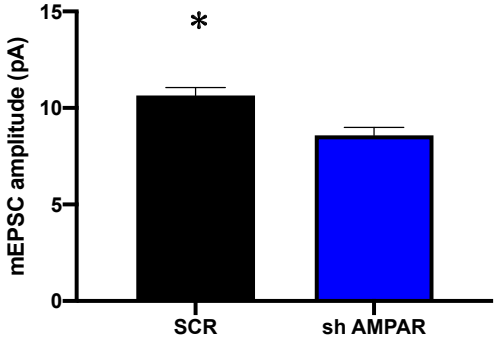


図 1. 脳領域 A における AMPA 受容体のノックダウンは AMPA 受容体電流を低下させる
脳領域 A に AMPA 受容体に対する shRNA を打ち込んだ動物では、scramble RNA を打ち込んだ動物に対して有意に低い AMPA 受容体電流を示した。
黒バー：SCR（n=6）、青バー：shAMPAR（n=5）；＊P<0.05、student t-test。

2. 脳領域 A での AMPA 受容体ノックダウンはプレパルス抑制試験で陽性を示す

私たちの統合失調症患者の臨床画像データから、脳領域 A の AMPA 受容体量と疾患重症度が相関することより、当該脳領域が統合失調症の症状を規定していると考えた。これを証明するため、GluA1、2、3 に対する shRNA を搭載したレンチウイルスをマウス脳領域 A にマイクロインジェクションし、その 3 週間後にプレパルス抑制試験を行った。図 2 に示す結果から明らかなように、「prepulse 74 dB/pulse 120 dB」及び「prepulse 78 dB/pulse 120 dB」では、AMPA 受容体に対する shRNA を導入したマウス群に比べて、対照の scramble RNA を導入したマウス群では、プレパルスによる抑制が有意に起こっており、すなわち AMPA 受容体に対する shRNA を導入したマウス群では有意に起こっておらず、統合失調症様の症状を示した（図 2）。

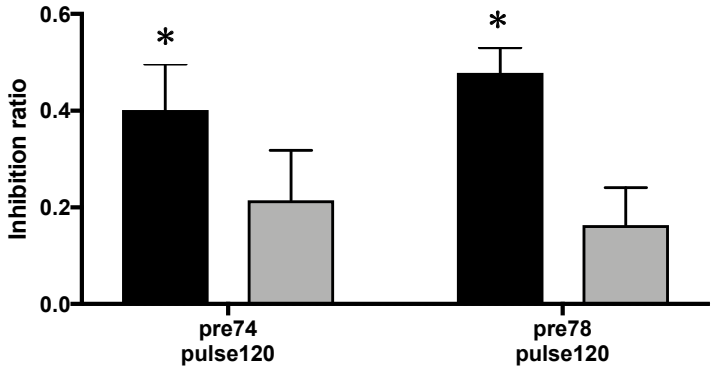


図 2. 脳領域 A における AMPA 受容体のノックダウンはプレパルス抑制を阻害する

脳領域 A に AMPA 受容体に対する shRNA を打ち込んだ動物では、両方の試験条件においてプレパルスによる抑制効果が scramble RNA を打ち込んだ動物に対して有意に弱かった。

黒バー：SCR（n＝10）、グレーバー：shAMPAR（n＝10）；＊P＜0.05、student t-test。

3. 脳領域 A での AMPA 受容体ノックダウンは新規環境への順応性を低下させる

続いて統合失調症患者でも認められる新規環境への順応についてオープンフィールド試験による検討を行った。図 3 に示した結果から明らかなように、対照の scramble RNA を導入したマウス群に比べて、AMPA 受容体に対する shRNA を導入したマウス群では、30 分後以降の移動距離の減少割合が有意に低く、すなわち、30 分後以降も移動距離が有意に長く（図 3 左）、AMPA 受容体に対する shRNA を導入したマウス群では、新奇環境への順応性が低いことが明らかとなった（図 3 右）。

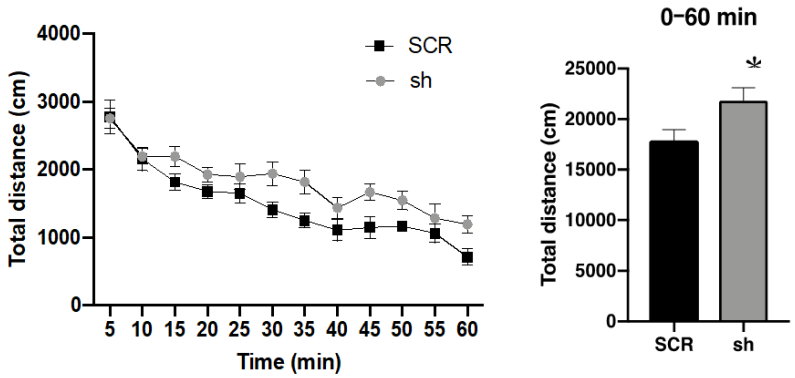


図 3. 脳領域 A における AMPA 受容体のノックダウンは新規環境適応能力を低下させる

脳領域 A に AMPA 受容体に対する shRNA を打ち込んだ動物では、オープンフィールドにおける探索距離が scramble RNA を打ち込んだ動物に対して有意に延長していた。左図は経時的な探索距離の推移を示し、右図は全 60 分間の総移動距離を示す。

黒バー：SCR（n＝10）、グレーバー：shAMPAR（n＝10）；＊P＜0.05、student t-test。

4. 脳領域 A での AMPA 受容体ノックダウンは社会性行動を障害する

続いて新規環境順応について、場所ではなく個体を対象として検討を行った。3 部屋が区切られた BOX において、両側の部屋にカラのかごと、もう一方にマウスを入れたかごを用意した（図 4 左）。図 4 右に示した結果から明らかなように、対照の scramble RNA を導入したマウス群では、empty チャンバーよりも stranger チャンバーにおける滞在時間が有意に長く、他個体へ接近する割合が高く、社会性が高いといえる。一方、AMPA 受容体に対する shRNA を導入したマウス群では、empty チャンバーにおける滞在時間と、stranger チャンバーにおける滞在時間との間に有意差がなく、他個体へ接近する割合が低下し、社会性が低いといえる。

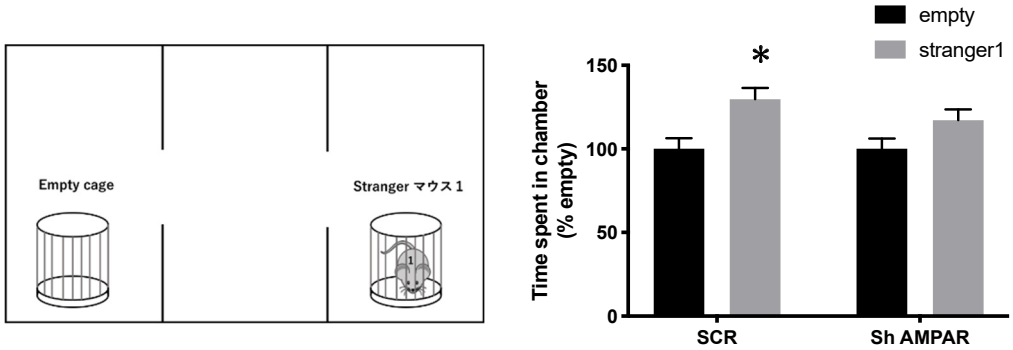


図 4. 脳領域 A における AMPA 受容体のノックダウンは社会性行動を低下させる

脳領域 A に AMPA 受容体に対する shRNA を打ち込んだ動物では、3 チャンバーを用いた社会認識行動におけるマウスへのアプローチ時間が scramble RNA を打ち込んだ動物に対して有意に延長していた。左図は 3 チャンバーの模式図を示し、右図は空ケージと他個体への接触時間を示す。

黒バー：SCR（n＝10）、グレーバー：shAMPAR（n＝10）；＊P＜0.05、student t-test。

考　察

統合失調症の治療薬・治療方法の開発のためには、ヒト病態を正確に反映した構成概念妥当性の高い精神疾患動物モデルの作製が不可欠である。これまでも統合失調症患者において AMPA 受容体量が変化しているとの報告が死後脳解析を中心として多くあったが結果が一致しておらず、生きた統合失調症患者脳内での AMPA 受容体の定量が切望されていた。その目的において我々は AMPA 受容体 PET 薬剤の開発に世界で初めて成功し、統合失調症患者での撮像により疾患重症度と AMPA 受容体密度が高い負の相関を示す脳領域 A の同定に成功した。このことは、統合失調症の病態病理における AMPA 受容体密度の変化の有意義性を示す。

本研究では脳領域 A の AMPA 受容体のノックダウンマウスを作製し、統合失調症に関連するいくつかの行動評価を行った。その結果、プレパルス抑制試験、オープンフィールド試験および 3 チャンバー社会認識試験のすべてにおいて正常マウス（scramble RNA 投与マウス）と比較し、それら行動結果が著しく障害されることが明らかとなった。こうした複数の行動評価により、当該モデルマウスが統合失調症患者と類似した行動表現型を示すことが明らかになった。

このように脳領域 A の AMPA 受容体を局所的にノックダウンした動物モデルは、構成概念妥当性が高く、このモデル動物を用いた解析により、統合失調症の発症を規定する脳領域・神経回路網を同定すれば、統合失調症における AMPA 受容体を標的とした治療法開発の選択肢拡大に繋がると期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、公立大学法人横浜市立大学大学院医学研究科生理学研究室の高橋琢哉教授、太田航助教、一條貞満特任助教である。

文　献

1) Miyazaki T, Abe H, Uchida H, Takahashi T. Translational medicine of the glutamate AMPA receptor. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2021;97(1):1-21. DOI: 10.2183/pjab.97.001.

2) Miyazaki T, Nakajima W, et al. Visualization of AMPA receptors in living human brain with positron emission tomography. Nat Med. 2020 Feb; 26(2):281-288. DOI: 10.1038/s41591-019-0723-9.

3) Arisawa T, Miyazaki T, et al. [^{11}C]K-2 image with positron emission tomography represents cell surface AMPA receptors. Neurosci Res. 2021 Dec;173:106-113. DOI: 10.1016/j.neures.2021.05.009.