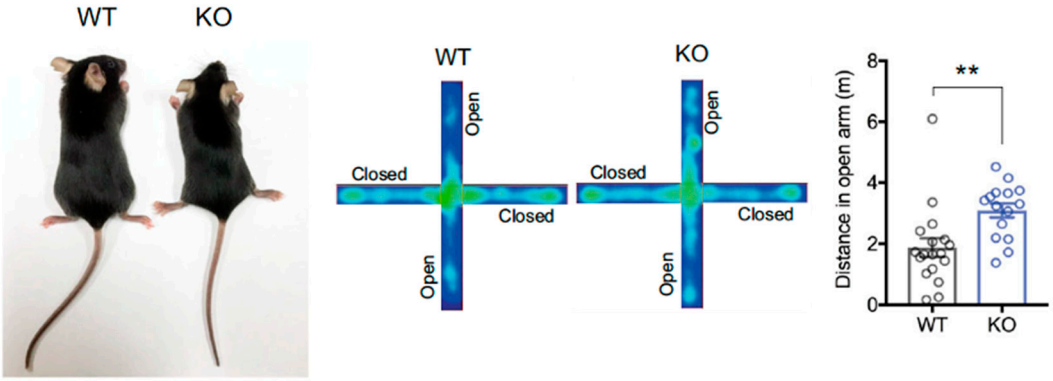
| 131　統合失調症における衝動性リスク行動の神経基盤の解明 | 臼井　紀好 |
|---|---|

**【目的】**統合失調症をはじめとする様々な精神疾患では衝動性の制御が障害されており、自殺行動、自傷行為、暴力、攻撃性、反社会性行動などの衝動性リスク行動が問題となっている。また、衝動性リスク行動は薬物やギャンブルなどの依存症だけでなく、思春期の若者にみられる社会的問題行動（暴力行為、無免許運転による事故など）とも深く関わっており、大きな社会問題となっている。本研究で着目している衝動性リスク行動は統合失調症など様々な精神疾患に見られる問題行動の一つである。衝動性リスク行動は衝動的な行動と、リスク行動の両方を意味しており、認知機能の低下によって行動にリスクが伴うのかを認知して判断する能力が低下している状態、または衝動性が高いために、結果としてリスクのある行動を冒してしまう状態の2通りが考えられる。統合失調症における衝動性は攻撃性に関連しており、関連する脳部位として背外側前頭前野、腹外側前頭前野、前帯状皮質、前頭眼窩野、および縫線核が報告されているが、詳しいことはわかっていない。そこで、本研究では統合失調症患者で変異が同定された *ZBTB16* 遺伝子のノックアウトマウスを用い、統合失調症における衝動性リスク行動の神経基盤を明らかにすることを目的とした。

**【方法】**7 週齢雄の *Zbtb16* ノックアウトマウスを用いた行動解析、脳の組織学的解析、遺伝子発現解析を行った。行動解析ではオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、3 チャンバー社会性相互作用試験、新規物体認識試験を行った。脳の組織学的解析では免疫染色によって大脳皮質の層構造と線条体を中心に解析を行った。遺伝子発現解析では RNA シークエンスによって前頭皮質の遺伝子発現解析を網羅的に解析した。

**【結果】***Zbtb16* ノックアウトマウスはオープンフィールド試験での中央部の行動量の増加、高架式十字迷路でのオープンアームの行動量の増加が観察されたことから、衝動性リスク行動を示すことを見出した。3 チャンバー社会性相互作用試験では社会新規性の低下、新規物体認識試験では認知機能の低下が観察され、統合失調症様行動を示すことを見出した。また、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは大脳皮質の層が薄くなっており、第 6 層の神経細胞数の減少と薄層化を、線条体では面積の減少を見出した。統合失調症の病態に白質が関わっていることから白質について解析したところ、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは大脳皮質のミエリン形成領域が減少しており、ミエリン形成が障害されていることを見出した。さらに、前頭皮質の遺伝子発現解析の結果、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは発現が変動する 533 個の遺伝子を同定し、これらの遺伝子が神経発生やミエリン形成に関わることを見出した。*Zbtb16* ノックアウトマウスで発現が低下した遺伝子は統合失調症患者の死後脳で発現が低下した遺伝子と関連性も示した。以上から、統合失調症患者で変異が同定された *ZBTB16* 遺伝子は衝動性リスク行動に関連する遺伝子であることを見出した。

統合失調症患者で変異が同定された *ZBTB16* 遺伝子は衝動性リスク行動に関連する



# 131. 統合失調症における衝動性リスク行動の神経基盤の解明

臼井　紀好

大阪大学 大学院医学系研究科 神経細胞生物学講座

Key words：統合失調症，衝動性，前頭皮質，線条体，遺伝子発現

## 緒　言

統合失調症をはじめとする様々な精神疾患では衝動性の制御が障害されており、自殺行動、自傷行為、暴力、攻撃性、反社会性行動などの衝動性リスク行動が問題となっている。また、衝動性リスク行動は薬物やギャンブルなどの依存症だけでなく、思春期の若者にみられる社会的問題行動（暴力行為、無免許運転による事故など）とも深く関わっており、大きな社会問題となっている。統合失調症は陽性症状（妄想、幻覚）と陰性症状（感情鈍麻、意欲低下、社会性障害）および認知機能障害を示す精神疾患である。国内有病率は約 1%、国内推定患者数は 80 万人とされている。統合失調症の原因として遺伝要因と環境要因が素因であるが、発症の原因は不明である。治療法は大きく 2 つ挙げられ、抗精神薬（抗精神薬、抗不安薬、抗うつ薬、睡眠薬など）による薬物療法と、社会生活技能訓練（SST : Social Skills Training）や作業療法などのリハビリテーションが挙げられる。

本研究で着目している衝動性リスク行動は統合失調症など様々な精神疾患に見られる問題行動の 1 つである。衝動性リスク行動は衝動的な行動と、リスク行動の両方を意味しており、認知機能の低下によって行動にリスクが伴うのかを認知して判断する能力が低下している状態、または衝動性が高いために、結果としてリスクのある行動を冒してしまう状態の 2 通りが考えられる。統合失調症における衝動性は攻撃性に関連しており、関連する脳部位として背外側前頭前野、腹外側前頭前野、前帯状皮質、前頭眼窩野、および縫線核が報告されているが、詳しいことはわかっていない。

本研究では統合失調症患者で変異が同定された *ZBTB16* 遺伝子［1，2］のノックアウトマウスを用い、統合失調症における衝動性リスク行動の神経基盤を明らかにすることを目的とした。我々は *Zbtb16* ノックアウトマウスの表現型として統合失調症で観察される社会性の障害、認知機能の障害、そして衝動性リスク行動を示すことを見出した。また、大脳皮質の薄層化、大脳皮質第 6 層の神経細胞数の減少、大脳皮質のミエリン形成不全を見出した［3］。

## 方　法

### 1. マウスの行動解析

*Zbtb16* ノックアウトマウスは米国ジャクソン研究所より購入し、ヘテロ同士の掛け合わせからノックアウトマウスを得た。行動解析は 7 週齢の雄マウスを用い、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、3 チャンバー社会性相互作用試験、新規物体認識試験を行い、衝動性、社会性、認知機能をそれぞれに試験した。プログラム作成とデータ解析は ANY-maze を用いて行った。

### 2. 脳切片の免疫染色

7 週齢の雄マウスの還流固定後に脳を取り出し、固定、包埋、凍結切片を作製した。凍結切片を用い、大脳皮質 5 層マーカーである Ctip2、大脳皮質 6 層マーカーである Tbr1、ミエリンの構成タンパク質である MBP による免疫染色と DAPI による核染色を行った。免疫染色後は凍結切片を封入後、染色シグナルを蛍光顕微鏡で観察した。細胞数、大脳皮質層の定量は顕微鏡に付属している解析ソフトもしくはマニュアルで行った。

### 3. 遺伝子発現解析

7 週齢の雄マウスの脳を取り出し、前頭皮質を回収したのちトータル RNA を精製した。精製した RNA の RIN を確

認後、polyA ビーズによって mRNA を精製、バーコードを付加した cDNA を作製してライブラリーを構築した。次世代シークエンサーで作製したライブラリーシークエンスを解読後、ゲノムにマッピングを行い、各遺伝子の発現量を定量した。バイオインフォマティクス解析によって発現変動遺伝子解析、遺伝子オントロジー解析、エンリッチメント解析、ネットワーク解析を行った。

## 結　果

### 1. *Zbtb16* ノックアウトマウスは統合失調症様行動と衝動性リスク行動を示した

衝動性、社会性、認知機能を評価するため、7 週齢の雄マウスを用いて行動解析を行った。*Zbtb16* ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ、オープンフィールド試験での中央部の行動量の増加、高架式十字迷路でのオープンアームの行動量の増加が観察され、衝動性リスク行動を示すことを見出した（図 1）。また、3 チャンバー社会性相互作用試験では社会新規性の低下、新規物体認識試験では認知機能の低下が観察され、統合失調症様行動を示すことを見出した。

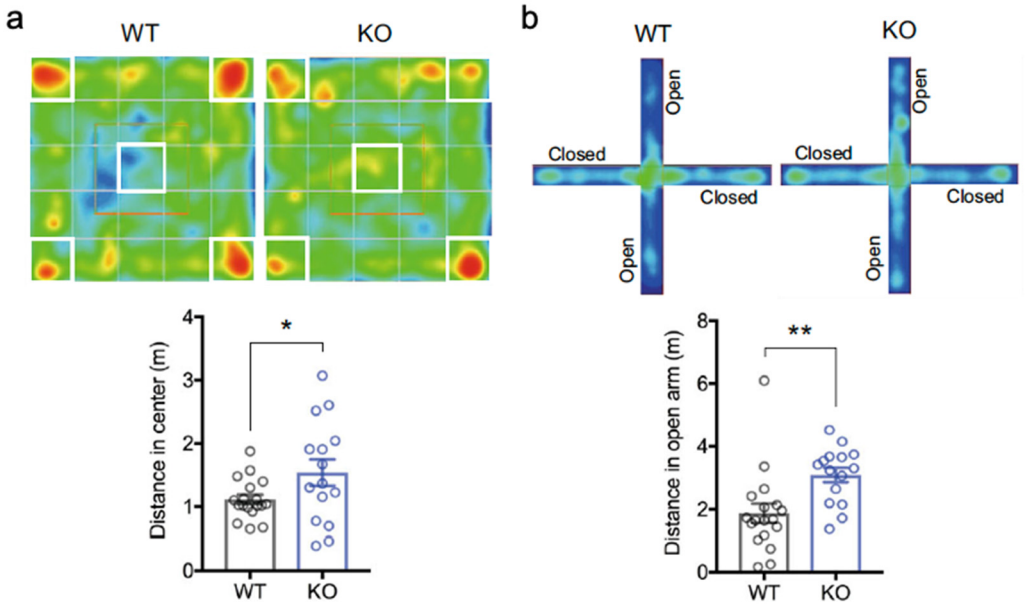



図 1. *Zbtb16* ノックアウトマウスは衝動性リスク行動を示した

a) *Zbtb16* ノックアウトマウス（KO）は野生型マウス（WT）に比べ、オープンフィールドの中央部での活動量が増加していた。平均値±標準誤差、*P＜0.05、unpaired t-test。

b) KO は高架式十字迷路のオープンアームでの活動量が増加していた。衝動性リスク行動を示した。平均値±標準誤差、**P＜0.01、unpaired t-test。

### 2. *Zbtb16* ノックアウトマウスの大脳皮質では層構造及びミエリン形成の障害が観察された

大脳皮質の組織学的解析を行ったところ、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは野生型に比べ、大脳皮質の層が薄くなっていた（図 2）。層特異的な神経細胞マーカーを用いて解析を行ったところ大脳皮質の第 6 層の Tbr1 陽性の神経細胞数の減少と薄層化を見出した（図 2）。また、統合失調症の病態に白質が関わっていることから大脳皮質におけるミエリン形成について解析したところ、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは野生型に比べ、大脳皮質の MBP 陽性のミエリン形成領域が減少しており、ミエリン形成が障害されていることを見出した（図 2）。

### 3. *Zbtb16* ノックアウトマウスでは線条体のボリュームが低下していた

線条体の組織学的解析を行ったところ、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは野生型に比べ、線条体の面積が減少していた。面積が減少した原因として考えられる線条体の神経細胞の同定については現在解析中である。

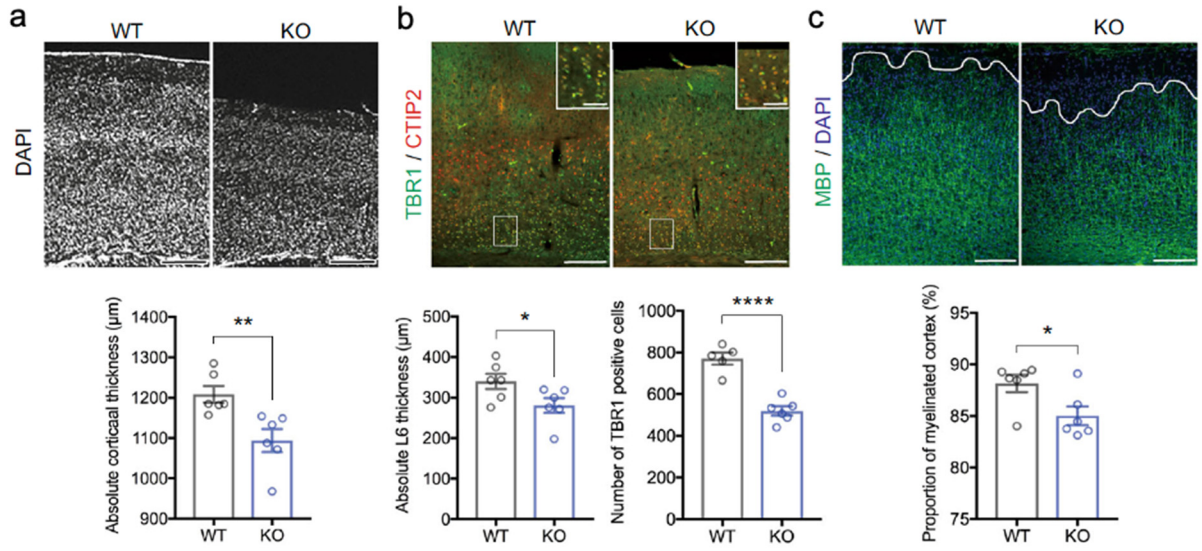



図 2. *Zbtb16* ノックアウトマウスは大脳皮質の薄層化とミエリン形成不全を示した

a) KO は WT に比べ、大脳皮質の層が薄くなっていた。平均値±標準誤差、**P<0.01、unpaired t-test。スケールバー：300 μ m。

b) KO は WT に比べ、大脳皮質第 6 層が薄くなっており、Tbr1 陽性の神経細胞数が減少していた。平均値±標準誤差、****P<0.001、*P<0.05、unpaired t-test。スケールバー：300 μ m。

c) KO は WT に比べ、大脳皮質の MBP 陽性のミエリン形成領域が減少していた。平均値±標準誤差、*P<0.05、unpaired t-test。スケールバー：300 μ m。

**4. *Zbtb16* ノックアウトマウスの前頭皮質における遺伝子発現は統合失調症に関連性を示した**

RNA シークエンスによって前頭皮質の遺伝子発現を解析した結果、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは野生型に比べ、533 個の遺伝子の発現が変動することを見出した。また、これらの発現変動遺伝子のオントロジーを解析した結果、神経発生やミエリン形成に関わることを見出した（図 3）。また、*Zbtb16* ノックアウトマウスで発現が低下した遺伝子は統合失調症患者の死後脳で発現が低下した遺伝子と関連性を示した（図 3）。

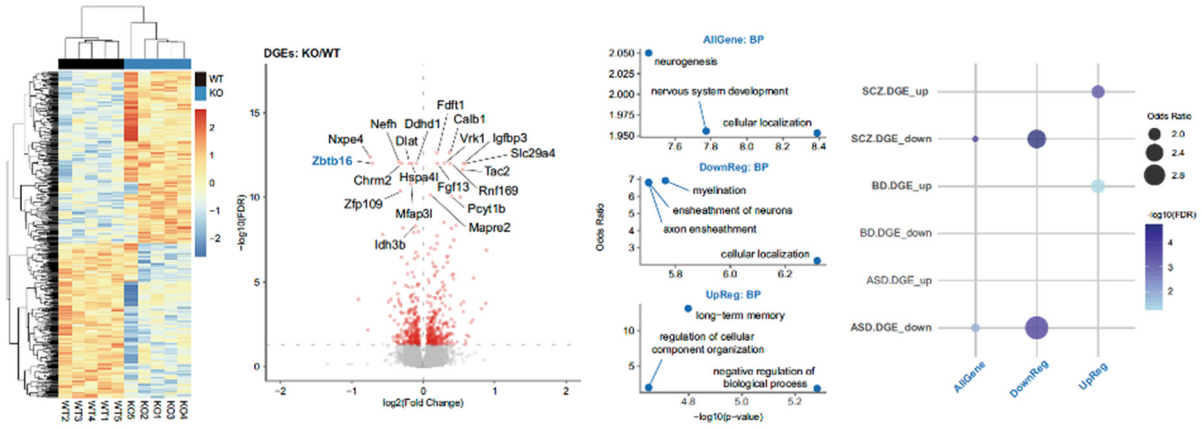



図 3. *Zbtb16* ノックアウトマウスの遺伝子発現は統合失調症に関連を示した

RNA シークエンスの結果、KO では神経発生やミエリン形成に関わる遺伝子の発現が変動していた。また、KO で遺伝子発現が低下した遺伝子は統合失調症患者の死後脳で発現が低下した遺伝子と関連性を示した。

## 考　察

統合失調症患者において変異が同定された *ZBTB16* 遺伝子のノックアウトマウスでは衝動性リスク行動を示し、遺伝子発現解析の結果から *Zbtb16* が統合失調症の病態に寄与している可能性が示唆された。また、大脳皮質第 6 層、及び線条体の形態異常が観察されたことからこれらの神経回路が統合失調症における衝動性リスク行動に関わっていることが示唆された。さらに、大脳皮質第 6 層と線条体ではドーパミン受容体が豊富に発現していることからドーパミンシグナルの異常が衝動性リスク行動に関与している可能性も示唆された。ドーパミンと衝動性に関する先行研究として、薬剤投与により新生児期にドーパミン産生ニューロンを選択的に破壊した ADHD モデルマウスでは非社会的行動、攻撃行動、衝動性が増加し、前頭前皮質の神経細胞のスパイン減少と形態が未成熟であることが報告されている［4］。現在、*Zbtb16* ノックアウトマウスにおける脳内ドーパミン量の定量、及び線条体の詳細な解析を行っており、統合失調症における衝動性リスク行動の分子メカニズムを解明していく計画である。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学系研究科神経細胞生物学講座の島田昌一教授、大阪市立大学大学院医学研究科器官構築形態学講座の近藤誠教授、福井大学子どものこころの発達研究センター脳機能発達研究部門の松﨑秀夫教授、テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター神経科学部門の Genevieve Konopka 準教授、Stefano Berto 博士である。最後になりますが、本研究をご支援頂いた上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展を心よりお祈り申し上げます。

## 文　献

1） Purcell SM, Moran JL, Fromer M, Ruderfer D, Solovieff N, Roussos P, O'Dushlaine C, Chambert K, Bergen SE, Kähler A, Duncan L, Stahl E, Genovese G, Fernández E, Collins MO, Komiyama NH, Choudhary JS, Magnusson PK, Banks E, Shakir K, Garimella K, Fennell T, DePristo M, Grant SG, Haggarty SJ, Gabriel S, Scolnick EM, Lander ES, Hultman CM, Sullivan PF, McCarroll SA, Sklar P. A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. Nature. 2014 Feb 13;506(7487):185-90. Epub 2014 Jan 22. PMID: 24463508. DOI: 10.1038/nature12975.

2） Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, Williams HJ, Dwyer S, Gormley P, Georgieva L, Rees E, Palta P, Ruderfer DM, Carrera N, Humphreys I, Johnson JS, Roussos P, Barker DD, Banks E, Milanova V, Grant SG, Hannon E, Rose SA, Chambert K, Mahajan M, Scolnick EM, Moran JL, Kirov G, Palotie A, McCarroll SA, Holmans P, Sklar P, Owen MJ, Purcell SM, O'Donovan MC. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. Nature. 2014 Feb 13;506(7487):179-84. Epub 2014 Jan 22. PMID: 24463507. DOI: 10.1038/nature12929.

3） Usui N, Berto S, Konishi A, Kondo M, Konopka G, Matsuzaki H, Shimada S. Zbtb16 regulates social cognitive behaviors and neocortical development. Transl Psychiatry. 2021 May 3;11(1):262. PMID: 33941768. DOI: 10.1038/s41398-021-01381-z.

4） Bouchatta O, Manouze H, Bouali-Benazzouz R, Kerekes N, Ba-M'hamed S, Fossat P, Landry M, Bennis M. Neonatal 6-OHDA lesion model in mouse induces Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder (ADHD)-like behaviour. Sci Rep. 2018 Oct 18;8(1):15349. PMID: 30337626. DOI: 10.1038/s41598-018-33778-0.