

特集 1 精神科ブレインバンクと脳科学研究

5. 統合失調症モデル動物作成と死後脳研究

新田 淳美¹⁾, 宮本 嘉明²⁾

抄録：精神疾患関連分子 Piccolo は、覚醒剤を連日投与したマウスの側坐核を用いて、cDNA サブトラクション法で発現量が著しく増加している分子の1つとして、筆者が所属するグループで研究を開始したものである。本分子をコードしている遺伝子である *PCLO* の変異は、ドパミンやセロトニンの取り込みを制御することから、Piccolo が精神疾患と関係していると考え、前頭前皮質の Piccolo の生理機能を明らかにするために、実験を重ねたところ、同マウスが統合失調症のモデルマウスとして活用できる可能性を示した。名古屋大学大学院医学系研究科・精神医学講座のグループが集積してきている死後脳を用いて、統合失調症患者脳 Piccolo の発現量変化についての測定をした。しかしながら、モデルマウスから得られた結果とは矛盾するものであった。向精神薬を投与されたマウスや培養細胞では、Piccolo の発現量が増加していたことから、死後脳が病態だけでなく、患者の生前の治療の過程をも反映していることがわかった。本稿では、Piccolo の発現量を制御することによる精神疾患モデルと患者死後脳の関係について紹介を行う。

日本生物学的精神医学会誌 34 (2) : 68-71, 2023

Key words : Piccolo, *PCLO*, schizophrenia, mice model, postmortem brain, prefrontal cortex, dopamine, glutamic acid, serotonin

精神疾患の多くは、1つの遺伝子の変異のみで病因を説明することができず、複数の遺伝要因・さまざまな環境要因が複雑に寄与して、発症すると考えられている。加えて、我々、薬学研究者の創薬研究においても、精神疾患治療薬の開発に向けては、適切なモデルや薬効を評価するための指標がなく、新規医薬品の創生についても悩ましいところである。

では、精神疾患のモデルマウスの作成は、結局のところ、無理なのだろうか？ と自問自答しながら、筆者らは、覚醒剤を連続投与されたマウスの側坐核での mRNA 発現量が 20 倍以上に増加している分を明らかにするために、cDNA サブトラクション法を用いて、スクリーニングを行った。その結果、*PCLO*mRNA の発現量が著しく増大していることがわかった¹⁾。

PCLO が産生するタンパク質である Piccolo は、分子量約 530kDa の巨大マルチドメインタンパク質であり、神経シナプス前膜の active zone で多数のタンパク質と相互作用し、シナプス小胞のエキソサイトosis およびエンドサイトosis を制御していることがわかっている²⁾。わが国においても、神戸大学医学部の清野教授らのグループから膵臓のランゲルハンス島からのインスリン分泌を制御する分子として、見いだされ、報告されていた⁶⁾。筆者が所属している研究グループでは、Piccolo の脳での機能についての研究を行った。その結果、覚醒剤への嗜好性を制御すること⁴⁾、また、統合失調症患者で観察される *PCLO* 上の SNP を導入した培養細胞では、ドパミンやセロトニンの取り込み能が変化すること、同 SNP を有するヒトでは、フェンタニル要

Suppressed Expression of Piccolo in the Medial Prefrontal Cortex with mice and modern brains of the patients with Schizophrenia

1) 富山大学学術研究部薬学部・和漢系 薬物治療学研究室 (〒930-0194 富山市杉谷 2630) Atsumi Nitta : Department of Pharmaceutical Therapy & Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama. 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-0194, Japan

2) 城西大学薬学部薬学科 薬物治療学研究室 (〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1) Yoshiaki Miyamoto : Laboratory of Pharmacotherapeutics and Neuropsychopharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University. 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

【新田 淳美 E-mail : nitta@pha.u-toyama.ac.jp】

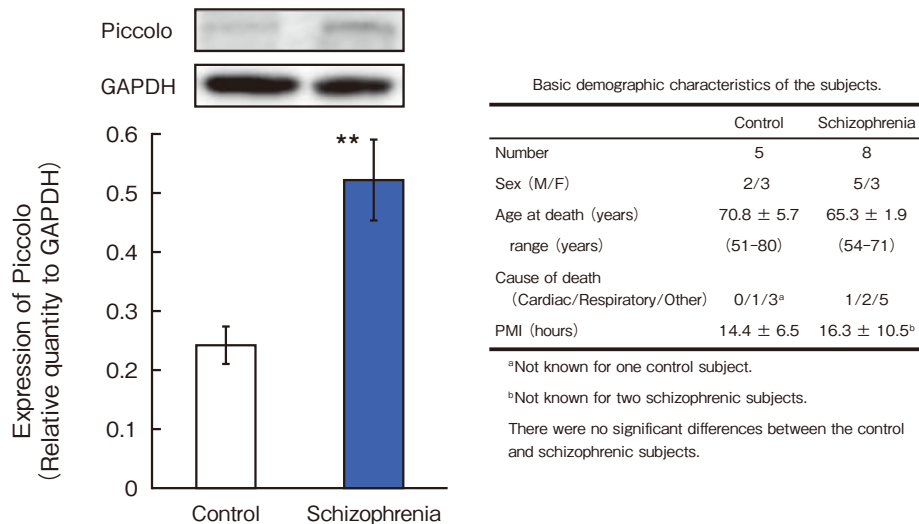


図1 統合失調症患者における Piccolo 発現の上昇

統合失調症患者 (n = 8) とコントロール患者 (n = 5) の死後脳における前頭前皮質での Piccolo タンパク質発現量を示す。Piccolo タンパク質量は、ウエスタンブロッティング法にて測定し、GAPADH を用いてノーマライズを行った。データは平均±標準誤差で示した。

求度、覚醒剤使用歴、タバコスコア、拒食などの依存関連行動との相関が観察され、また、精神・神経領域の学習記憶能力についても、関係していることがわかっている⁷⁾。

上述したような機能をもつ Piccolo が脳でどのような働きをもつかを明らかにするために、Piccolo のノックダウンまたはノックアウトマウスの作成を試みた。しかし、Piccolo は巨大タンパク質であることから、完全なノックアウトは難しく、ドパミンの取り込み能を制御する C2A ドメインが過剰発現するマウスを作成した³⁾。本マウスでは、社会性行動の一部に障害が観察されたが、精神疾病とオーバーラップするといえるほどの行動変化は観察されなかった³⁾。技術の進歩に伴い、自治医科大学の村松慎一教授らによって、miPCLO adeno-associated virus (AAV) が作成され、巨大タンパク質にもかかわらず、効率的にノックダウンすることができるようになった⁵⁾。本 AAV を前頭前皮質に注入し、Piccolo の mRNA およびタンパク質発現量を半分程度に減少させて各種、行動実験を行った。一連の行動実験の結果を考え合わせ、本マウスは、統合失調症のモデル動物となり得るのではないかと考えた。

モデル動物の確立をめざすときに、表面妥当性 (face validity)、構成妥当性 (construct validity)、予測妥当性 (predictive validity) を満たすことが理想的と考えられている。最初に、表面妥当性として、統合失調症の 3 大症状である陽性症状、陰性症状および認知機能障害が本マウスで観察されるかを検

討した。陽性症状として、行動量の増加が観察された。また、聴覚性驚愕反応・プレパルス抑制テストでも、驚愕反応の抑制が阻止された⁵⁾。認知機能障害として、Y 迷路試験や新規物体認知試験、文脈条件付け試験での記憶障害が観察された。これらの障害は、臨床用量範囲内と想定されるリスベリドンの投与によって、障害が観察されなくなり、予測妥当性も観察された⁵⁾。また、コントロールマウスでは、うつ状態が見いだされない弱いストレス (mild social defeat stress exposure) を負荷したときに、他のマウスとの社会的相互作用試験での社会性の障害、強制水泳試験などでのうつ様症状も観察された⁵⁾。以上のことから、本マウスは、統合失調症の 3 大症状を呈し、実際に使用されている治療薬で回復することが確認された。

最後に、構成妥当性を確認するために、死後脳バンクを活用した。名古屋大学のグループが維持されている統合失調症患者の死後脳での PCLO mRNA の発現量を測定したところ有意に増加していた (図 1)。筆者が行ってきた一連の Piccolo 研究では、Piccolo の発現量を減少させたときに統合失調症様の表面妥当性が観察されていることを鑑みると、逆の結果となっている。海外の研究グループからの報告でも、精神病患者の死後脳で PCLO mRNA が増加していることが報告されている。一方で、同じ研究グループから、株化樹立された培養細胞へ向精神薬を添加することが発表されている。筆者が、実施した実験でも、マウスへ定型または非定型の向精神薬を連続投

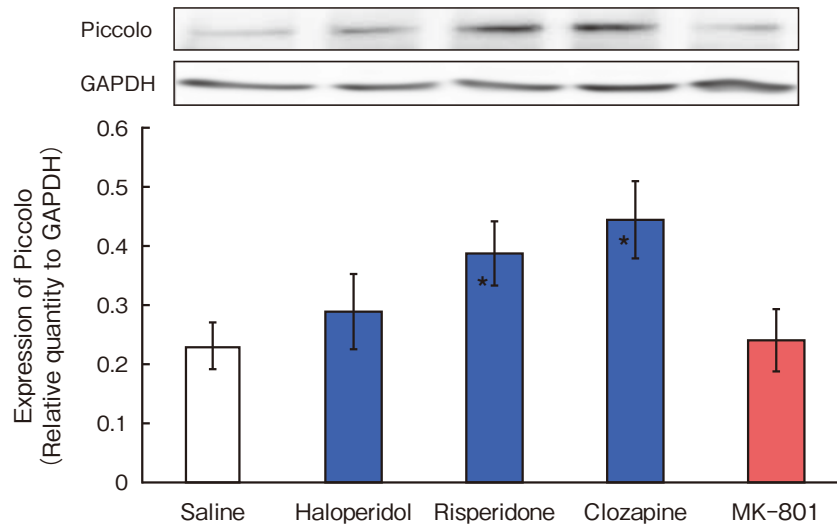


図2 抗精神病薬による Piccolo 発現の上昇

各種抗精神病薬をマウスへ投与（5日間）した後の前頭前皮質の Piccolo タンパク質の発現量を示す。Piccolo タンパク質量は、ウエスタンブロッティング法にて測定し、GAPADHを用いてノーマライズを行った。データは平均±標準誤差で示した。

与したところ、非定型の向精神薬を投与した場合には、前頭前皮質での Piccolo の発現量が増加していた（図2）。また、共同研究として使用させていただいた統合失調症患者の死後脳では、すべての患者で、いずれも非定型の統合失調症治療薬の処方歴があった。このように、死後脳は、治療や加齢の影響を受けていることから、マウスモデルとは構成妥当性が、一見矛盾するようにみえることもある。しかし、ほぼ全員の精神疾患患者が非定型の向精神薬の処方を受けており、死後脳はその患者の治療歴を物語ることができる重要な事例であると考えられる。また、本モデルマウスは、スパインの形態の変化が観察され、ドパミンやグルタミン酸の放出が前頭前皮質のみでなく、投影脳部位と考えられている線条体でも制御されていることを光遺伝学的操作で、明確にしている⁵⁾。病理学的には、プレシナプスタンパク質の1つである SNAP25 の発現量も減少しており、シナプスの機能が減少していることは間違いないことである⁵⁾。このあたりのデータも統合失調症の病態を反映している可能性が高い。

アンフェタミンなどを投与したクラシカルな統合失調症モデルマウスでは、陽性症状のみしか観察されないことや、神経伝達物質の変化やシナプスの変化にも乏しいことを考えると筆者らが見いだしたモデルは、統合失調症治療薬の開発に使用できる可能性が高いと考えられる。精神疾患のモデルまた、患者さんの死後脳についても、その生前の病歴や薬歴が記録されていれば、モデルマウスとのより深い一

致制がわかるものと思われる。

著者には、本原稿に関係する内容に対しては開示すべき利益相反はない。死後脳については、名古屋大学およびその関連グループが管理されているものについて、関係法規を遵守のうえ、使用させていただいた。AAV ベクターは、自治医大・村松教授から共同研究として恵与を受けた。

文 献

- 1) Cen X, Nitta A, Ibi D, et al (2008) Identification of piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. *Mol Psychiatry*, 13 : 451-463.
- 2) Dieck ST, Sanmartí-Vila L, Langnaese K, et al (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol*, 142 : 499-509.
- 3) Furukawa-Hibi Y, Nitta A, Fukumitsu H, et al (2010) Overexpression of piccolo C2A domain induces depression-like behavior in mice. *Neuroreport*, 21 : 1177-1181.
- 4) Kusui Y, Izuo N, Uno K, et al (2022) Knockdown of piccolo in the nucleus accumbens suppresses methamphetamine-induced hyperlocomotion and conditioned place preference in mice. *Neurochem Res*, 47 : 2856-2864.
- 5) Nitta A, Izuo N, Hamatani K, et al (2021) Schizophrenia-like behavioral impairments in mice with

- suppressed expression of piccolo in the medial prefrontal cortex. *J Pers Med*, 11 : 607.
- 6) Shibasaki T, Sunaga Y, Fujimoto K, et al (2004) Interaction of ATP sensor, cAMP sensor, Ca²⁺ sensor, and voltage-dependent Ca²⁺ channel in insulin granule exocytosis. *J Biol Chem*, 279 : 7956-7961.
- 7) Uno K, Nishizawa D, Seo S, et al (2015) The piccolo intronic single nucleotide polymorphism rs13438494 regulates dopamine and serotonin uptake and shows associations with dependence-like behavior in genomic association study. *Curr Mol Med*, 15 (3) : 265-274.

■ ABSTRACT

Suppressed Expression of Piccolo in the Medial Prefrontal Cortex with mice and modern brains of the patients with Schizophrenia

Atsumi Nitta¹⁾, Yoshiaki Miyamoto²⁾

- 1) *Department of Pharmaceutical Therapy & Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama*
2) *Laboratory of Pharmacotherapeutics and Neuropsychopharmacology, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University*

Piccolo, a presynaptic protein, plays a role in synaptic vesicle trafficking of neurotransmission process. Previous studies have revealed that the Piccolo-coding gene *PCLO* were associated with psychiatric disorders. However, few studies are available on the causal relationship between Piccolo dysfunction and psychosis symptoms in vivo. Accordingly, phenotypes in mice with suppression of Piccolo in the medial prefrontal cortex (mPFC) were evaluated. Piccolo-suppressed mice showed hyperlocomotion in a novel environment, impaired prepulse inhibition and decreased cognitive function. These behaviors were partially ameliorated by atypical antipsychotic drug. The mice exposed to mild social defeat stress exhibited additional social withdrawal and behavioral despair. Furthermore, synaptic plasticity in the mPFC and glutamatergic and dopaminergic neurotransmission by activating mPFC projection in the dorsal striatum were inhibited in Piccolo-suppressed mice. These observations suggest that disconnection with the mPFC pathway via suppression of Piccolo mediates schizophrenia symptoms, e. g. positive and negative symptoms and cognitive deficit.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 34 (2) : 68-71, 2023)
