

中枢神経系でのピッコロ分子の生理機能解明と 臨床応用への可能性

富山大学大学院 医学薬学研究部（薬学）
薬物治療学研究室
新田 淳美

1. はじめに

精神疾患の病因は先天性と後天性に分かれる。即ち、遺伝子要因と環境要因に大別される。いずれの場合も脳における特定のタンパクの機能変化が直接的な原因となる。我々は、インスリンの分泌を調節するタンパクとして報告されていたピッコロが脳に存在し、精神疾患と関連の深いドパミンの再取り込みを調節すること、および、覚せい剤誘発精神病マウス脳での増加を報告してきている（Cen et al., 2008; 新田ら 2010）。加えて、双極性障害やうつ病の患者では、ピッコロの遺伝子に変異していることが報告された(Choi et al., 2011; Sullivan et al., 2009)。そこで、本分子の生理機能を行動薬理的、生化学的および分子生物学的に検討を行い精神疾患、特にうつ病と統合失調症との関連を明確にする必要がある。

今まで精神疾患の原因に関係する遺伝子は、該当疾患患者での発現変化や遺伝子変異を指標に検索されていたため家族性のものの研究が先行していた。遺伝子側からアプローチする本研究成果を得ることが出来れば、非家族性も含めて精神疾患の原因解明および治療薬開発への大きな足掛りとなると考えられる。

2. 方法

1) 実験動物

実験には、7週齢の c57BL / 6J 雄性マウス（日本 SLC、静岡）および遺伝子組み換えマウスの作成には同一バックグラウンドの系統を使用した。本実験における動物実験は富山大学動物実験指針、文部科学省動物実験指針および *the Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments Science Council of Japan, 2006* に準じ動物実験委員会で承認された上で行った。行動および生化学実験に用いるマウスについては、午前 8 時から午後 8 時を明期とする部屋で飼育し、行動実験中以外は、餌および水は自由摂取とした。

2) 遺伝子組み換え動物の作成

Piccolo 遺伝子の一部である C2A ドメインを pDEST26 ベクターに組み込んだ。本ベクターはサイトメガウイルス (CMV) プロモーターを含んでいる。C2A ドメイン遺伝子の前には *myc* を組み込み、共発現するようにした。今回用いた CMV プロモーターは、発達または増殖過程にある細胞のみで過剰発現することがわかっている (Anthony et al., 1998)。そのため、本マウスでも、胎生期および生後 1 週間程度の間のみ該当蛋白質の増加がおこっていると考えられる。このベクターが遺伝子にランダムに組み込まれることで、染色体上のどのような位置に配置されるか不明であり、元来存在していた機能遺伝子の転写が阻害される可能性があるという不確定な部分がある。

3) Social interaction 試験

実験を行う前 2 日間、観察箱にマウスを入れ 10 分間慣れさせた。観察の際には、マウスを普段同じケージで飼育していない未知のマウスと共に実験箱に入れ、10 分間お互いが接触する時間を計測した。

4) 強制水泳試験法

25°C の水を 15cm の水深で張った円筒形の水槽にマウスを投入し 6 分間の強制水泳を行い、後半 5 分間における無動時間を赤外線装置により測定した。無動時間が長いほどうつ様症状を示していると考えられる。

5) 条件性場所嗜好 (Conditioned Place Preference; CPP) 試験

CPP 試験には 2-compartment box を用いて、既報に従って行った (Noda et al., 1998)。メタンフェタミン (0.3 mg/kg) の投与は実験の直前に行った。

6) 統計処理

実験結果は平均±標準誤差で示した。有意差検定は一元配置分散分析の後、Bonferroni's テストを用いて行った。2群間比較には、Student's *t*-test を用いて 検定した。

3. 結果

1) 遺伝子過剰発現マウスの選別

受精卵にそれぞれの遺伝子を含むベクターを注入した後、メスマウスの子宮に入れ、着床および妊娠させた。その結果、得られた子供を F1 として、便宜上、由来受精卵ごとに系統に番号をつけ、いずれの系統が過剰にそれぞれの蛋白質を発現しているかを比較し、実験に用いるマウスの系統を決定した。即ち、同じ番号の系統の F1 のオスとメスを交配させ、産まれてきたマウス脳を生後 10 日目に取り出し、piccoloC2A ドメインの発現量のチェックを行い、過剰発現が観察されたものを選択した。この操作は、遺伝子過剰発現マウスの場合、挿入された外来遺伝子のコピー数が系統毎に異なること、また染色体の位置によっては、交配を続けている間に外来遺伝子が失われる可能性があるためである。Piccolo C2A ドメインでは 111 と番号をつけた系統が当該遺伝子の発現量が多かったため、その生後 1 日目のマウス脳を用いて Piccolo C2A ドメインの発現量をリアルタイム RT-PCR 法で測定したところ、mRNA が 1.5 倍に増加していた。以降の実験は、本マウスを用い、またコントロールには、Piccolo C2A 過剰発現マウスと同腹の野生型マウスを用いた。

2) Social interaction 試験

コントロールマウスと比較して Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスは、未知のマウスとの接触時間が有意に減少し、他者との社会性が減少していた。

3) 強制水泳試験法

10 分間の強制水泳をコントロールマウスと Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスに課したところ、コントロールマウスと比較して Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスに無動時間の有意な延長が観察された。このことから、Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスは、うつ様症状を示すことが考えられる。

4) 条件付場所嗜好 (Conditioned Place Preference; CPP) 試験

0.3mg/kg のメタンフェタミンは、コントロールマウスにおいて薬物依存を誘導しない程度の低濃度である。Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスは、メタンフェタミン投与を行った部屋への嗜好性がコントロールマウスより高まっていた。このことは、Piccolo C2A ドメインの過剰発現によって依存性薬物への感受性が高まったことを示すと考えられる。

4. 考察

ピッコロのドパミン遊離量調節には、生合成よりも再取り込みに関わっている、即ち、ドパミントランスポーターの細胞内局在化を示唆する研究成果も得ており、今後は、培養細胞を用いてこれらの仮説を証明したいと考えている。遺伝子組み換えマウスは実験に使用可能な個体数の確保に多くの時間とマンパワーを費やしたため、一般行動での実験結果が主となったが、社交性に欠けることや、うつ様の傾向があること、また、覚せい剤への場所嗜好性が強いことを示すことが出来た。

今までにも薬物依存形成に関連することが報告されているタンパクはいくつかあるが、Key タンパクとなるものについての統一した見解は得られていないが、本研究で見出したピッコロが薬物依存形成にどのように寄与しているかについて今後検討を重ねる予定である。本年度は CMV プロモーターを用いた遺伝子過剰発現マウスの作成を試みた。今後は、本遺伝子過剰発現マウスを用いて、詳細な生理機能を明らかにすると共に精神疾患の繋がる結果を得ることを期待している。

5. 参考論文

Anthony, N., van den, Pol., Prabhat, Ghosh, K.: Selective neuronal expression of green fluorescent protein with cytomegalovirus promoter reveals entire neuronal arbor in Transgenic mice. *J. Neurosci.* 18, 10640-10651, 1998

Cen, X., Nitta, A., Ibi, D., Zhao, Y., Niwa, M., Taguchi, K., Hamada, M., Ito, Y., Ito, Y., Wang, L. and Nabeshima, T.: Identification of piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. *Mol. Psychiatry*, 349, 451-463, 2008

Choi, KH., Higgs, BW., Wendland, JR., Francis, JS., McMahon, J., and Webster, MJ.: Gene expression and genetic variation data implicate *PCLO* in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry*. 69, 353- 359, 2011

新田淳美, 日比陽子, 宮本嘉明, 鍋島俊隆: 薬物依存におけるピッコロの役割. 日本アルコール・薬物医学会雑誌45巻6号, 525-529, 2010.

Noda, Y., Miyamoto, Y., Mamiya, T., Kamei, H., Furukawa, H., Nabeshima, T.: Involvement of dopaminergic system in phencyclidine-induced place preference in mice pretreated with phencyclidine repeatedly. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 44-51, 1998

Sullivan, PF., de Geus, EJC., Willemsen, G., James, MR., Smit, JH., Zandbelt, T., Arolt, V., Baune, BT., Blackwood, D., Cichon, S., Coventry, WL., Domschke, K., Farmer, A., Fava, SD, Gordon, Q, He, Heath, AC., Heutink, P., Holsboer, F., Hoogendijk, WJ., Hottenga, JJ., Hu, Y., Kohli, M. Lin, D., Lucae, S., MacIntyre, DJ., Maier, W., McGhee, KA., McGuffin, P., Montgomery, GW., Muir, WJ., Nolen, WA., Perlis, MM., Pirlo, RH., Posthuma, KD., Rietschel, M., Rizzu, P., Schosser, A., Smit, AB., Smoller, JW., Tzeng, J-Y., van Dyck, R., Verhage, M., FG Zitman, M., Martin, NG., Wray, NR., Boomsma, DI., and Penninx, BWJH.: Genome-wide association for major depressive disorder: a possible role for the presynaptic protein piccolo *Mol. Psychiatry* 14, 359- 375, 2009

6. 発表論文

- 1) Ohki M., Ohki Y., Ishihara M., Nishida C., Tashiro Y., Akiyama H., Komiyama H., Lund LR., Nitta A., Yamada K., Zhu Z., Ogawa H., Yagita H., Okumura K., Nakauchi H., Werb Z., Heissig B., and Hattori K. : Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood*, 115: 4302-4312, 2010.
- 2) Katsuno M., Adachi H., Minamiyama M., Waza M., Doi H., Kondo N., Mizoguchi H., Nitta A., Yamada K., Banno H., Suzuki K., Tanaka F., and Sobue G. : Disrupted TGF-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurosci.*, 30: 5702-5712, 2010.
- 3) Alkam T., Nitta A., Furukawa-Hibi Y., Niwa M., Mizoguchi H., Yamada K., and Nabeshima T. : Oral supplementation with Leu-Ile, a hydrophobic dipeptide, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of extracellular signal-regulated kinase. *Behav. Brain Res.*, 210: 184-190, 2010.
- 4) Yun J., Koike H., Ibi D., Toth E., Mizoguchi H., Nitta A., Yoneyama M., Ogita K., Yoneda Y., Nabeshima T., Nagai T., and Yamada K. : Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.*, 114: 1840-1851, 2010.
- 5) Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Fukumitsu, H., Somiya, H., Furukawa, S., Nabeshima, T., and Yamada, K. : Over expression of Piccolo C2A domain induces depression-like behavior in mice. *NeuroReport*, 21: 1177-1181, 2010.
- 6) Alkam, T., Hiramatsu, M., Mamiya, T., Aoyama, Y., Nitta, A., Yamada, K., Kim, HC. and Nabeshima, T. :Evaluation of object-based attention in mice. *Behav Brain Res.* 220,185-193 .2011.
- 7) Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Ikeda, T., Morishita, K., Liu, W., Ibi, D., Tursun, A., Nabeshima, T. and Yamada, K. :The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF *Behav Brain Res.* 220,271-280 .2011.
- 8) Furukawa-Hibi, Y., Alkam, T., Nitta, A., Matsuyama, A., Mizoguchi, H., Suzuki, K., Mossaoui S., Yu, Q., Greig, N., Nagai, T. and Yamada, K. :Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β in mice. *Behav Brain Res.* 225, 222-229. 2011.
- 9) Nakatani, M., Shinohara, Y., Takii, M., Mori, H., Asai, N., Nishimura, S., Furukawa-Hibi, Y., Miyamoto, Y. and Nitta, A. :Periocular injection of in situ hydrogels containing Leu-Ile, an inducer for neurotrophic factors, promotes retinal ganglion cell survival after optic nerve injury. *Experimental Eye Research*1. 1-7.2011.
- 10) Oyagia, A., Moriguchi, S., Nitta, A., Murata, K., Oida, Y., Tsuruma, K., Ma, Shimazawa., Fukunaga, K. and Hara, H. :Heparin-binding EGF-like growth factor is required for synaptic plasticity and memory formation. *Behav Brain Res.*1419,97-104.2011.