

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

候補遺伝子 *DISC1* の機能解析による
統合失調症の病態理解と治療戦略の構築

平成19年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 久保 健一郎

平成22（2010）年5月

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

候補遺伝子 *DISC1* の機能解析による
統合失調症の病態理解と治療戦略の構築

平成19年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 久保 健一郎

平成22（2010）年5月

目 次

I. 総合研究報告

候補遺伝子 *DISC1* の機能解析による
統合失調症の病態理解と治療戦略の構築

久保 健一郎

..... 3

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 30

III. 研究成果の刊行物・別刷

..... 31

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（総合）研究報告

候補遺伝子 *DISC1* の機能解析による統合失調症の病態理解と
治療戦略の構築

研究代表者 久保 健一郎
慶應義塾大学医学部解剖学 助教

研究要旨

本研究は、統合失調症の病態理解と治療戦略の構築に役立てる事を目的として、統合失調症候補遺伝子 *DISC1* の機能を解析した。本研究ではこれまでに、（１）*DISC1* に結合する分子として pericentriolar material-1(PCM1)および Bardet-Biedl syndrome-4 protein (BBS4) を同定し、機能的関連を証明した。一方、*DISC1* は大脳皮質の興奮性神経細胞以外にも、大脳皮質抑制性神経細胞にもその発現を認める。このため、加えて本研究では、（２）大脳皮質抑制性神経細胞への遺伝子導入技術を開発し、大脳皮質抑制性神経細胞での *DISC1* の機能解析を行った。その結果、*DISC1* が大脳皮質興奮性神経細胞のみならず、大脳抑制性神経細胞の発生にも重要な役割を果たしていることが判明した。さらに本研究では、（３）発生中マウス胎児脳前頭皮質における *DISC1* に対するノックダウンを子宮内胎児電気穿孔法を用いて行い、その成熟後の行動を解析した。その結果、発生中マウス胎児脳前頭皮質における錐体細胞特異的な *DISC1* に対するノックダウンは、成熟後の中脳皮質ドパミン経路の成熟の異常と思春期以後の行動異常に結びつくことが判明した。この結果、発生段階における神経細胞での分子的な異常が成熟後の行動異常に結びつく可能性が示された。本研究で得られた知見から、抑制性神経細胞および前頭前野の重要性が示されたが、統合失調症死後脳の所見においても、前頭葉ではγ-アミノ酪酸(GABA)の低下や GABA 生合成に関わるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の低下が報告されており、前頭葉 GABA 機能の低下が統合失調症の病因となっている可能性が指摘されている。このため、（４）「GABA 作動性神経細胞 (GABA 細胞) を前頭葉に移植することで、統合失調症認知機能障害を予防・治療できるのではないか」という仮説を立て、GABA 作動性神経細胞を用いた新たな治療戦略の構築を行った。

研究分担者

慶應義塾大学医学部解剖学助教
田中 大介

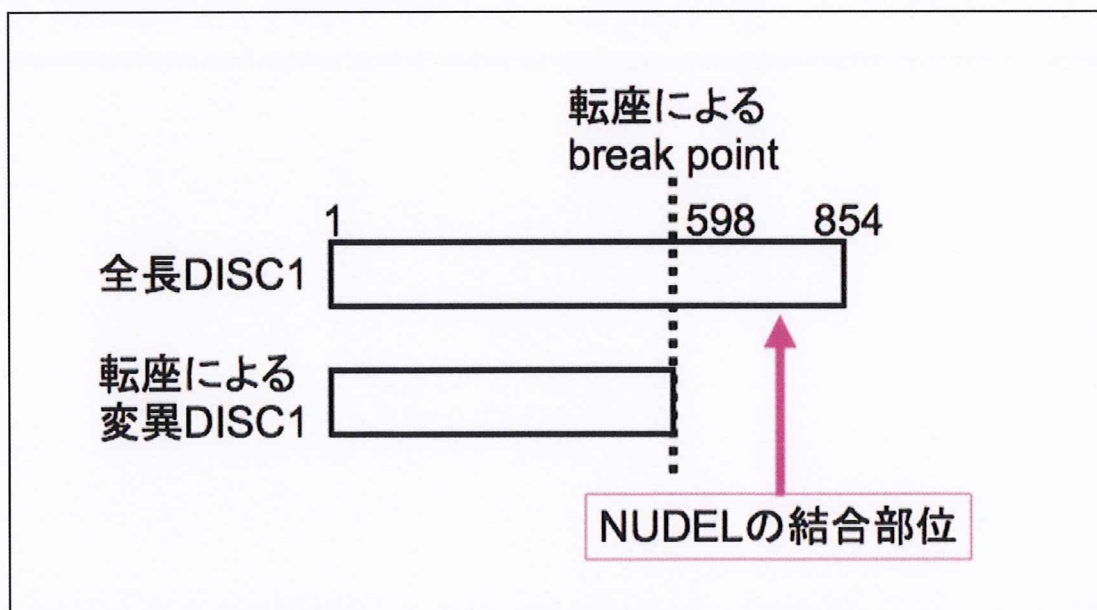
A. 研究の目的

統合失調症の成因についての仮説として、発達段階での脳の異常が、その後の統合失調症ならびに関連した精神疾患に罹患する危険性を増すとする発達障害仮説がある(Weinberger DR, McClure RK. Arch Gen Psychiatry. 2002 Jun;59(6):553-8)。この仮説自体は以前から存在したが、画像診断の発達によって統合失調症患者に脳の形態異常があることが分かり、再度注目を集めた (Wright IC *et al.* Am J Psychiatry. 2000 Jan;157(1):16-25.)。これらの形態異常を持つ統合失調症の脳の病理組織では、前頭葉を始め、辺

縁系、側頭葉などの各脳領域に微細な組織構築の乱れがあるとされており、統合失調症の死後脳で神経変性や神経毒性の亢進を示す所見や顕著なグリオーシスが見つからないため、皮質構築過程における異常に起因してこれらの構造変化が起こると考えられている (Harrison PJ. Brain. 1999 Apr;122 (Pt 4):593-624)。

さて、大脳皮質形成過程において、神経細胞は、脳室周囲で誕生し、長い距離を移動して脳表面近くに向かい、順序よく配置される。近年の分子遺伝学の急速な進展により、ヒトやマウスの皮質構造の形成に関わる分子が次々と明らかになった(上図)(Kubo K, Nakajima K. Keio J Med. 2003 Mar;52(1):8-20.)。

その一方で、統合失調症についても家系を用いた連鎖解析から、有力な候補遺伝子が見いだされた(Owen MJ *et*



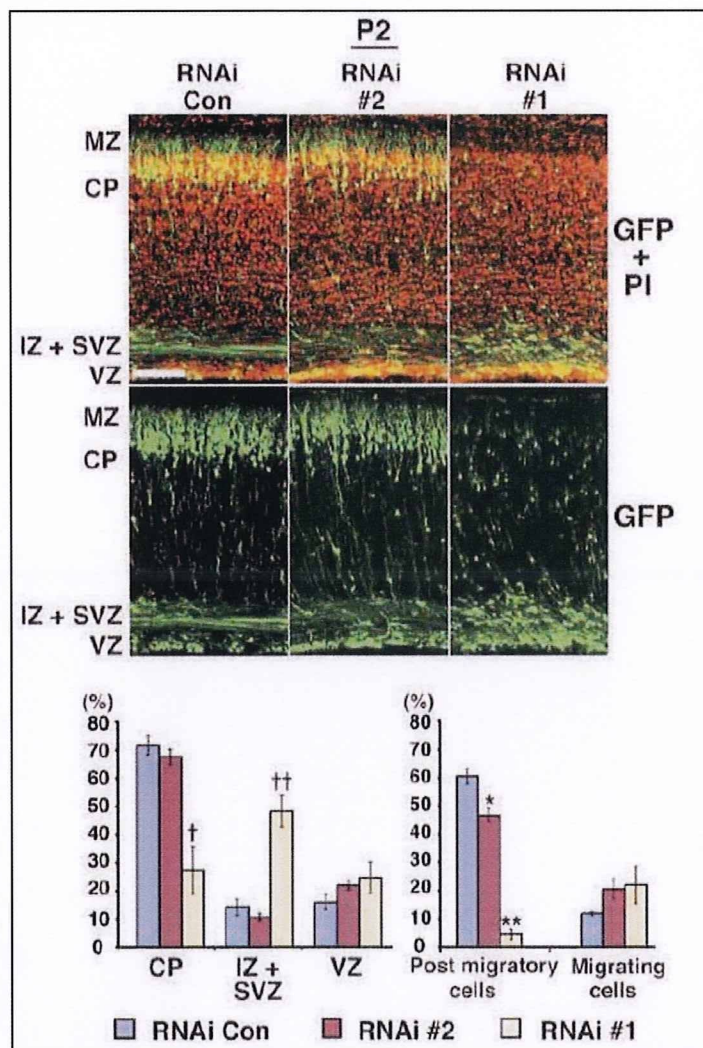
al. *Trends Genet.* 2005

Sep;21(9):518-25)。なかでも、スコットランドの精神疾患多発家系の遺伝学的研究で発見された *disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)* は、その後の解析の結果、コードする蛋白質が皮質構造形成に関わる可能性が示唆された(後述)。*DISC1* は 854 アミノ酸からなる蛋白質をコードするが、転座によって C 末の 257 アミノ酸が失われると高率で精神疾患に罹患する。共同研究者である澤らは、マウスの *DISC1* ホモ

ログをクローニングした後、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、*DISC1* と結合する可能性のある蛋白質を検索した(Ozeki Y *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):289-94)。その結果、C 末端 254 アミノ酸と結合する候補として、*NUDEL* が得られた(上図)。

免疫沈降や *in vitro binding* の結果により、*DISC1* と *NUDEL* が相互作用していること、そして注目すべきことに、転座の結果 C 末端が失われた *DISC1* は *NUDEL* と結合できなくなることが示された。*NUDEL* は I 型滑脳症の原因遺伝子である *LIS1* と結合して神経

細胞の移動に重要な役割を果たしていることが知られており、*DISC1* の *NUDEL* への結合は、*DISC1* の神経細胞移動への関与を示唆した。*DISC1* の機能欠失が統合失調症に結びつくことから、*DISC1* の脳の発生における機能を明らかにすることで、統合失調症の脳における病態理解に重要な示唆が得られることが期待された。そこで、*DISC1* の機能解析を生体内で行うため、所属研究室で開発された *in utero electroporation* 法によって脳内にプラ



スミドを導入し、DISC1 の機能を解析しようと試みた。発生中のマウス大脳皮質における DISC1 の発現が知られているため、まず siRNA 法を用いて、DISC1 をノックダウンしたときの移動中神経細胞への影響を観察した。胎生 14.5 日に *in utero* electroporation 法を用いて、GFP 発現ベクターとともに DISC1 に対する siRNA をマウス大脳皮質に導入した。生後 2 日目に固定して解析したところ、本来ならば脳の最表面に達して移動を終えているはずの神経細胞がほとんど脳の最表面には見当たらず、まだ移動途中であった（下図上右パネル、RNAi#1）。効果の弱い siRNA を導入した場合（下図上右パネル、RNAi#2）、多くの神経細胞は最表面に達しているものの、それら移動を終えた神経細胞の割合が少なかった（下図右下パネル Post-migratory cells）。これにより、DISC1 のノックダウンにより、神経細胞の移動が容量依存的に遅れることがわかった（より強いノックダウンで遅れが大きくなる）。

転座の結果 C 末端が失われた DISC1 は NUDEL との結合ができなくなる。この DISC1 を培養 PC12 細胞に導入すると、神経細胞突起の伸長が障害される。この効果は、PC12 細胞に DISC1 の siRNA を導入した場合と同じである。また、株化培養細胞に、全

長の DISC1 と C 末端が失われた DISC1 を同時に発現させると、本来 centrosome に局在する全長 DISC1 が細胞質に局在を変えてしまい、centrosome への局在が失われる。このため、C 末端が失われた DISC1 は全長 DISC1 の機能を阻害すると考えられた。この C 末端が失われた DISC1 を *in utero* electroporation 法を用いて、GFP 発現ベクターマウス大脳皮質に導入した。すると、効果が弱い siRNA を導入したときと同様、多くの神経細胞は最表面に達しているものの、それら移動を終えた神経細胞の割合が少なく、神経細胞の移動が遅れていることが示唆された。転座によって生じる C 末端が失われた DISC1 を発現すると、脳の組織構築に軽微な影響があるというこの結果は、これまで報告されてきた統合失調症の脳における微細組織異常の所見とよく一致する。

本研究においては、これらの知見に基づき、子宮内マウス胎児脳電気穿孔法による遺伝子導入を最大限活用することにより DISC1 の機能をさらに解析した。本手法は所属研究室にて開発（特許出願中）され、ここ数年で世界中に急速に広まった技術である（Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima. *Neuroscience*, 103, 865-872 (2001).）。希望する部位に特異的に遺伝子導入することができ、そして、導

入された細胞のその後の挙動や形態を樹状突起や軸索の先端まで詳細に生きたまま観察できるとともに、導入遺伝子の機能獲得（発現阻害ベクターの場合は機能欠失）の影響を容易に解析できる。当研究室では世界中から研究者を受け入れて技術指導を行っており、多くのノウハウを蓄積している。

この子宮内マウス胎児脳電気穿孔法を十分に活用することで、特にこれまで報告されている統合失調症の脳病理所見との関連を中心に解析を行うことにより、病態理解に直結した知見が得られ、新規治療法の開発に貢献できることが期待された。

関連文献：

Ken-ichiro Kubo and Kazunori Nakajima. Cell and molecular mechanisms that control cortical layer formation in the brain. *Keio J. Med.*, 52 (1), 8-20 (2003).

Atsushi Kamiya, Ken-ichiro Kubo, Toshifumi Tomoda, Manabu Takaki, Richard Youn, Yuji Ozeki, Naoya Sawamura, Una Park, Chikako Kudo, Masako Okawa, Christopher A. Ross, Mary E. Hatten, Kazunori Nakajima, and Akira Sawa. Disrupted-In-Schizophrenia-1 in development of the cerebral cortex: perturbation by its schizophrenia-associated mutation.

Nature Cell Biol., 7 (12), 1067-1078 (2005).

Weinberger DR, McClure RK. Neurotoxicity, neuroplasticity, and magnetic resonance imaging morphometry: what is happening in the schizophrenic brain? *Arch Gen Psychiatry*. 2002 Jun;59(6):553-8

Wright IC *et al.* Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000 Jan;157(1):16-25.

Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*. 1999 Apr;122 (Pt 4):593-624

Owen MJ *et al.* Schizophrenia: genes at last? *Trends Genet*. 2005 Sep;21(9):518-25

Ozeki Y *et al.* Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7;100(1):289-94

Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the

developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*,
23 (31), 9996-10001 (2003).

Hidenori Tabata and Kazunori Nakajima.
Efficient *in utero* gene transfer system to
the developing mouse brains using
electroporation-- Visualization of
neuronal migration in the developing
cortex. *Neuroscience*, 103, 865-872
(2001).

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

本研究計画における組換え DNA 実験及び動物実験については、文部科学省及び学内の実験指針に従い申請書を提出し承認を得たのち、その指針に基づいて行った。

(子宮内胎児電気穿孔法)

すべての動物実験は日本神経学会のガイドラインに従い、十分な麻酔を行いつつ、動物の苦痛が最小限となるようにあらゆる配慮が払われた。

<器具・機械>

- ・遺伝子導入装置：CUY21E (ネッパジーン社製、フットスイッチ付き)
- ・in vivo用電極：CUY650P3 (電極の径が3mm)、CUY650P5 (電極の径が5mm)
- ・解剖用具 (ピンセット中 x 2、解剖用はさみ x 2、リングピンセット x 1、持針器 x 1、INOX No.5などの精密ピンセット)
- ・インジェクション針 (成重社製芯入硝子管 (GD-1) をプレーで引いて作る。引いていない管に水を吸って、2 μ l ごとに4点の目盛をつける。これを定規にして、インジェクション針に目盛をつける。)
- ・吸引チューブ (Drummond 社 05-2000-00、もとからついている赤い

マウスピースを取り外し、ここにポアサイズ0.22 μ mのフィルター (ミリポアMillex-LG(13mm)) を取り付け、さらにピストンを外した1mlのシリンジを新しいマウスピースとして取り付ける。

- ・ファイバーライト (Kenko, Technolight KTS-100RSV)
- ・滅菌ガーゼ (ケーパイン、7.5cm x 7.5cm)
- ・手術台
- ・外科手術用テープ (3M社製、Transpore)
- ・ナイロン製縫合糸 (ネスコ社製、HT1605NA75)

- ・絹製縫合糸 (D&G社製、112451)

<試薬>

- ・プラスミド溶液はキアゲン社のMaxi kit、または超遠心により精製したプラスミドDNAをHBSバッファーで5mg/mlになるように溶かした。
- ・HBSバッファー (10xのストック溶液を滅菌水で薄めて用いた)

10xHBSバッファー

HEPES	5g(20%)
NaCl	8g(8%)
KCl	0.37g(50mM)
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.251g(7mM)
Glucose	1g(1%)

超純水で100mlに調整。ろ過滅菌して分注し、凍結保存する。

・0.1% FastGreen溶液 (Sigma F7258
の粉末を滅菌水で溶かす)

・PBS

・1/10希釈ネンブタール注射液 (大日
本製薬、ネンブタール注射液
(50mg/mlペントバルビタールNa溶
液) を滅菌水で1/10に希釈した。

・70%エタノール

《手順》

1/10に希釈したネンブタール液を
体重10 g 当り120 μ lの割合で、腹腔内
に注射して麻酔をかけた。一回分 (約
20 μ l) に分注したプラスミド溶液に、
1/10量の0.1% FastGreen溶液を加え、
マウスを手術台に仰向けに寝かせ、手
足を外科手術用テープで固定、子宮壁
を通して胎仔が見えるので、
FastGreenで着色したプラスミド溶
液をインジェクション針に吸引して、
これを側脳室の片側に注入した。次に、
PBSで子宮をよく濡らし、ピンセット
型の電極で胎仔の頭部をはさみ、電気
パルスを与えた。電圧33V、パルスオン
/オフ50/950msec、パルスの回数
4回にて行った。電流の実測値は
30-60mAとなった。

C. 研究の結果

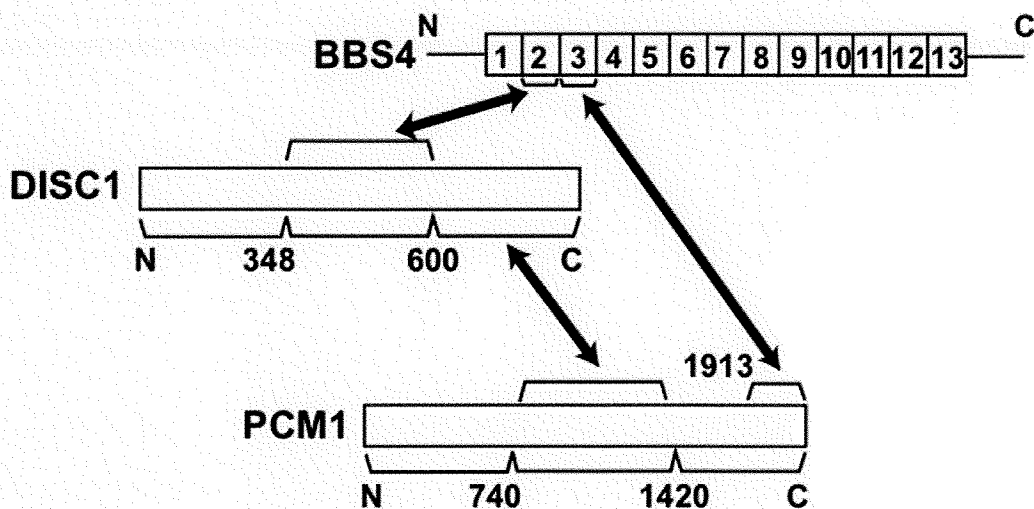
(1) 結合分子の同定

統合失調症候補分子 DISC1 の分子カスケードを明らかにすることを目的として、新たな結合分子の同定を試みた。

その際、DISC1 が脳の発生の初期において、細胞分裂や細胞移動に重要は働きをもつ中心体 (centrosome) に局在を示すことに注目した。結合分子の候補として、やはり統合失調症および双極性感情障害に連鎖を示す pericentriolar material-1(PCM1) が中心体に存在すること、さらに DISC1 に結合する p150glued が Bardet-Biedl syndrome の原因遺伝子である Bardet-Biedl syndrome-4 protein (BBS4) に結合して PCM1 を中心体に運ぶことから、PCM1、BBS4 と DISC1 の結合に注目した。免疫沈

降法によって、PCM1 と DISC1、BBS4 と DISC1 が直接結合することが判明した。培養神経細胞では内在性の PCM1、BBS4 と DISC1 がいずれも centrosome に分布して共局在していることがわかった (次ページ図)。さらに、変異体を用いた解析により、DISC1 はその N 末と C 末でそれぞれ別個に PCM1 と結合し、また DISC1 の中心部分が BBS4 と結合することが判明した (下図)。

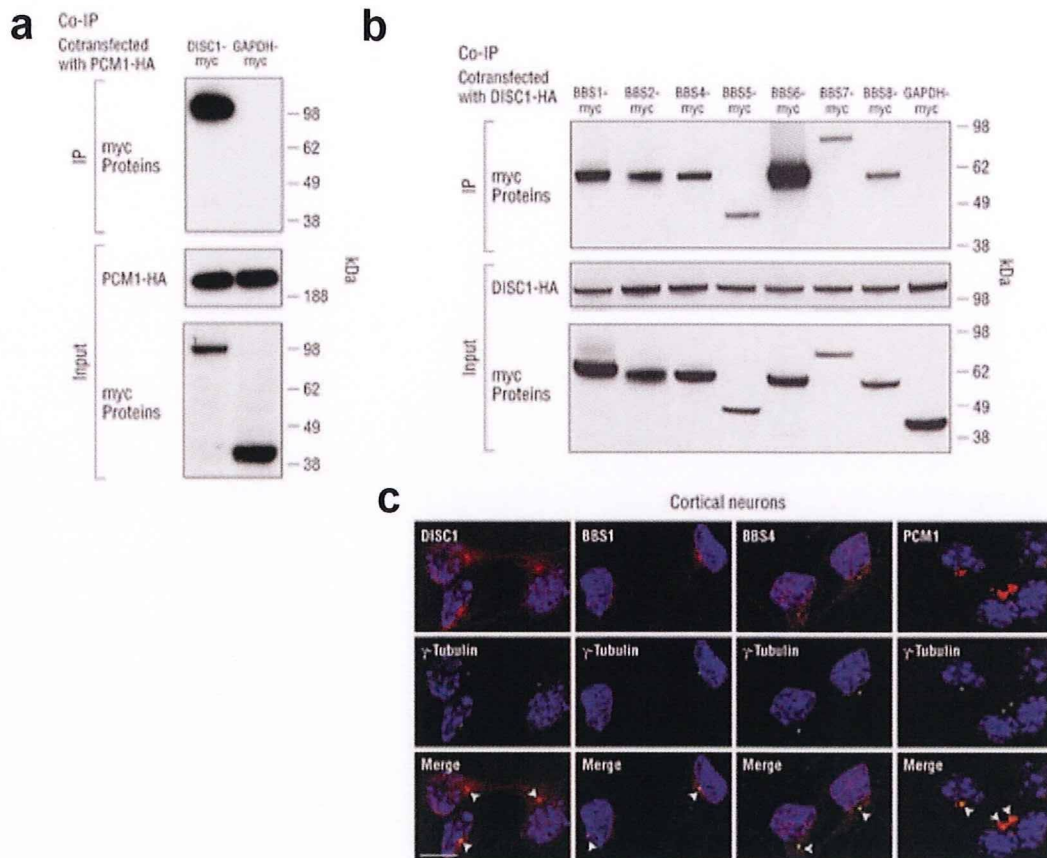
さらに、その機能的相関を調べるため、これらの分子に対する siRNA を用いて、脳の発生段階におけるこれらの分子の機能の解析を行った。当研究室で開発した子宮内胎児電気穿孔法を用いて、これらの分子に対する siRNA を発生中のマウス大脳皮質に導入し、それぞれの分子をノックダウンしたときの移動神経細胞への影響を観察したところ、ノックダウンにより、神経細胞の移動に遅れを生じるこ



とが判明した。しかも、DISC1 と BBS4 については、それらのノックダウンを同時に行うと、単独で行った場合よりもより大きな遅れが観察され、これらの分子が相補的に神経細胞移動に働いていることが機能的に証明

された (次々ページ図)。

これらの所見を共同研究者とともにまとめ、国際的精神医学専門誌である *Arch Gen Psychiatry* に発表した。

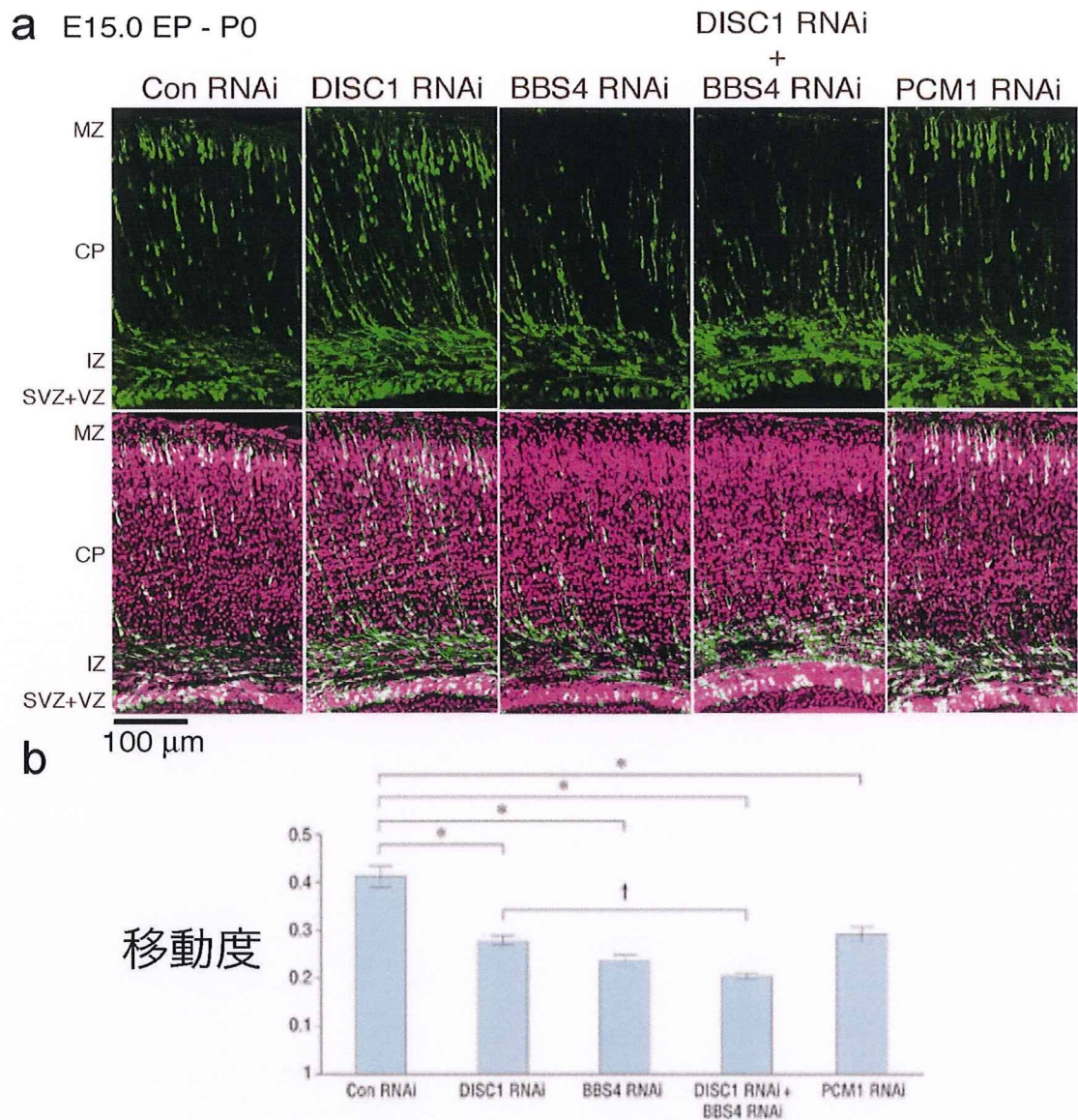


Arch. Gen. Psychiatry, 65 (9), 996-1006 (2008)より改変
図: PCM1 と DISC1, BBS と DISC1 は直接結合する

a) 培養細胞に発現させた DISC1 と PCM1 が免疫沈降法で共沈する。

b) 培養細胞に発現させた DISC1 と BBS が免疫沈降法で共沈する。

c) 培養神経細胞で DISC1, BBS4, PCM1 が centrosome (γ tubulin の免疫染色でラベルしている) に共局在する。



図： DISC1, BBS4, PCM1 のノックダウンにより神経細胞移動の遅れが生じる

a) 子宮内胎児電気穿孔法を用いて、DISC1, BBS4, PCM1 に対する shRNA 発現ベクターを発生中のマウス大脳皮質に導入し、それぞれの分子をノックダウンしたときの移動神経細胞への影響を観察し

た。ノックダウンにより、神経細胞の移動に遅れを生じることがわかった。しかも、DISC1 と BBS4 については、それらのノックダウンを同時に行うと、単独で行った場合よりもより大きな遅れが観察された。

(2) 抑制性神経細胞での DISC1 の機能解析

大脳皮質の興奮性神経細胞が脳室近傍で生まれて放射状方向に移動するのに対し、抑制性神経細胞が大脳基底核原基で生まれて接線方向への移動を行う性質を利用し、蛍光蛋白 GFP (Green Fluorescent Protein) 発現ベクターを子宮内マウス胎児脳電気穿孔

法により発生期マウス脳の大脳基底核原基特異的に導入することを試みた。様々な条件検討の結果、電極の方向を通常のプラス極を上方45度に向ける角度ではなく、下方90度に向ける角度にて電気パルスを行う事により、大脳基底核原基へ GFP の遺伝子導入を行う事に成功した。

胎生 13.5 日目に子宮内マウス胎児脳電気穿孔法を用いて大脳基底核原

基に GFP の遺伝子導入を行い、4日後に脳を固定して GFP が導入された神経細胞の移動形態を観察した(右図)。このとき、GFP 陽性の神経細胞が数多く大脳皮質に存在し、その多くは接線方向に向かって特徴的な突起を伸ばしていたことから、GFP を導入され大脳基底核原基で誕生した抑制性神経細胞が、接線方向の移動を行って大脳に移動してきたと考えられる(右図 C, D、矢印)。一部は、中間帯 (IZ) をあとにして大脳皮質板 (CP) に向かって突起を伸

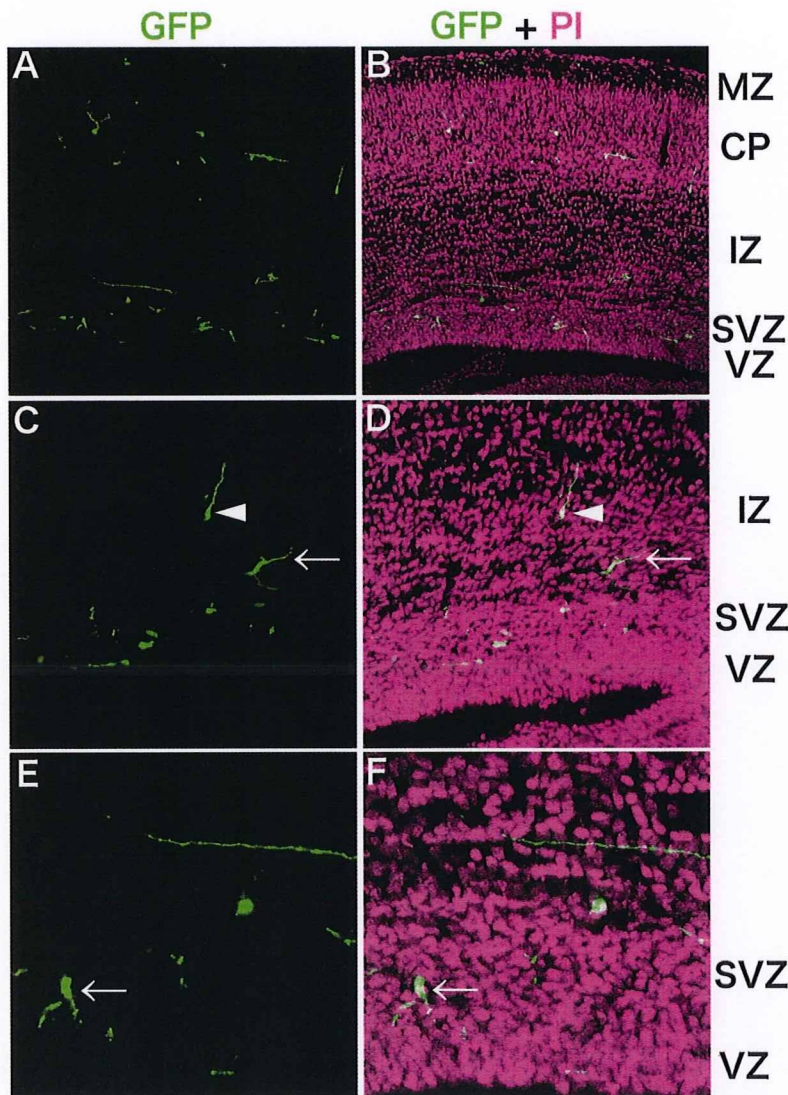


図 基底核原基にGFPを導入して4日後の大脳皮質

ばしており (前ページ図 C, D、矢頭)、最終配置部位である大脳皮質板への移動を開始していると考えられる。また、一部は脳室・脳室帯 (VZ) に向かって突起を伸ばす、これも抑制性神経細胞の移動に特徴的な像を示していた (前ページ図 E, F、矢印)。これらの GFP 陽性細胞の移動中の抑制性神経細胞に特徴的な形態から、将来大脳皮質の抑制性神経細胞を産生する基底核原基に GFP 遺伝子を導入することに成功したと考えられる。

さらに、免疫組織化学染色を行って、遺伝子の導入が抑制性神経細胞に正しく行われたかどうかを確認した (下図)。作製した脳の組織切片を抑制性神経細胞のマーカーである GABA に対する抗体を用いて免疫染色した。その結果、上記の大脳皮質に存在する GFP 陽性細胞には GABA 陽性細胞が多く存在することが判明した (下図矢印)。一部で陰性の細胞も見られたが、これは細胞の分化がまだ十分でないことや、今回用いた GABA 抗体の染

色性自体が必ずしも鋭敏ではないことがその要因と考えられた。

さらに、マウスを生後 9 日まで成育して観察した所、移動を終えて大脳皮質に到着した GFP 陽性神経細胞が、GABA 作動性抑制性神経細胞に特徴的な細胞形態を示している像が観察された (次ページ図)。

そして、ここで確立された方法を用いて、抑制性神経細胞を産生する大脳基底核原基への *DISC1* ノックダウンベクターの導入を行った (次々ページ図)。*DISC1* がノックダウンされた細胞 (次々ページ図、*DISC1* KD) と、コントロールの細胞 (次々ページ図、control) の移動形態の違いについては今後さらなる解析が必要であるが、今回用いたノックダウンベクターのノックダウン効果はすでに確立されているため (Kamiya *et al.*, Disrupted-In-Schizophrenia-1 in development of the cerebral cortex: perturbation by its schizophrenia-associated mutation.

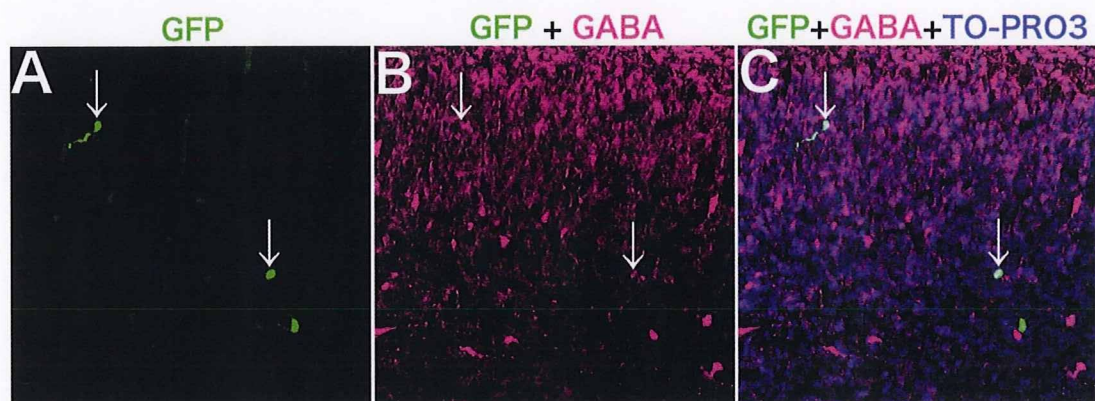


図 基底核原基にGFP発現ベクターを遺伝子導入して4日後の大脳皮質のGABA染色

Nature Cell Biol.,7 (12), 1067-1078 (2005)、このノックダウンベクターを導入された神経細胞においては、大脳皮質抑制性神経細胞特異的に発生段階に置ける *DISC1* のノックダウンが行われていると考えられる。今後さらに遺伝子導入の効率を向上させてより多くの抑制性神経細胞での *DISC1* のノックダウンを試みることにより、*DISC1* の機能阻害によってどのような病態が観察されるのかを解析していきたい。また、このマウスを出生さ

せて生体にまで育てた後、行動解析や薬理的解析に用いることも計画している。

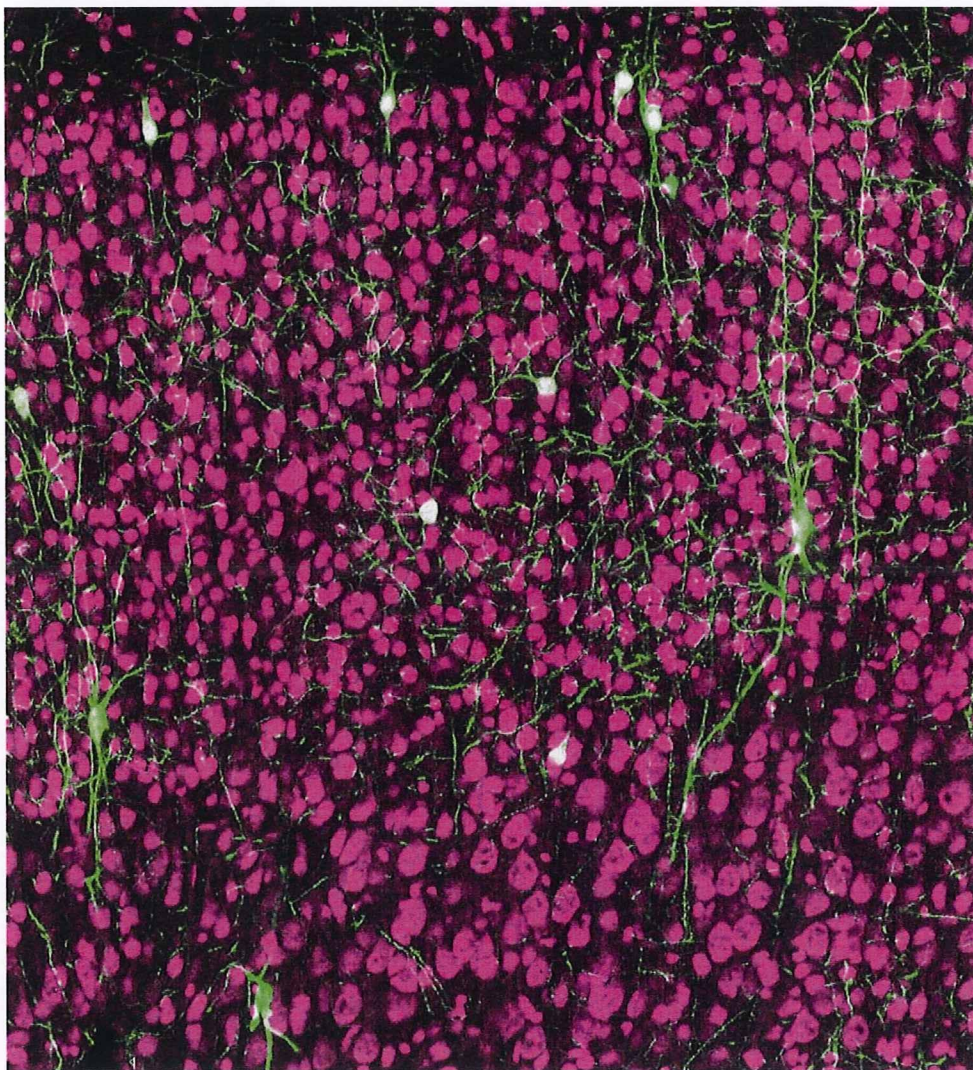


図 生後の大脳皮質に分布するGFP陽性細胞

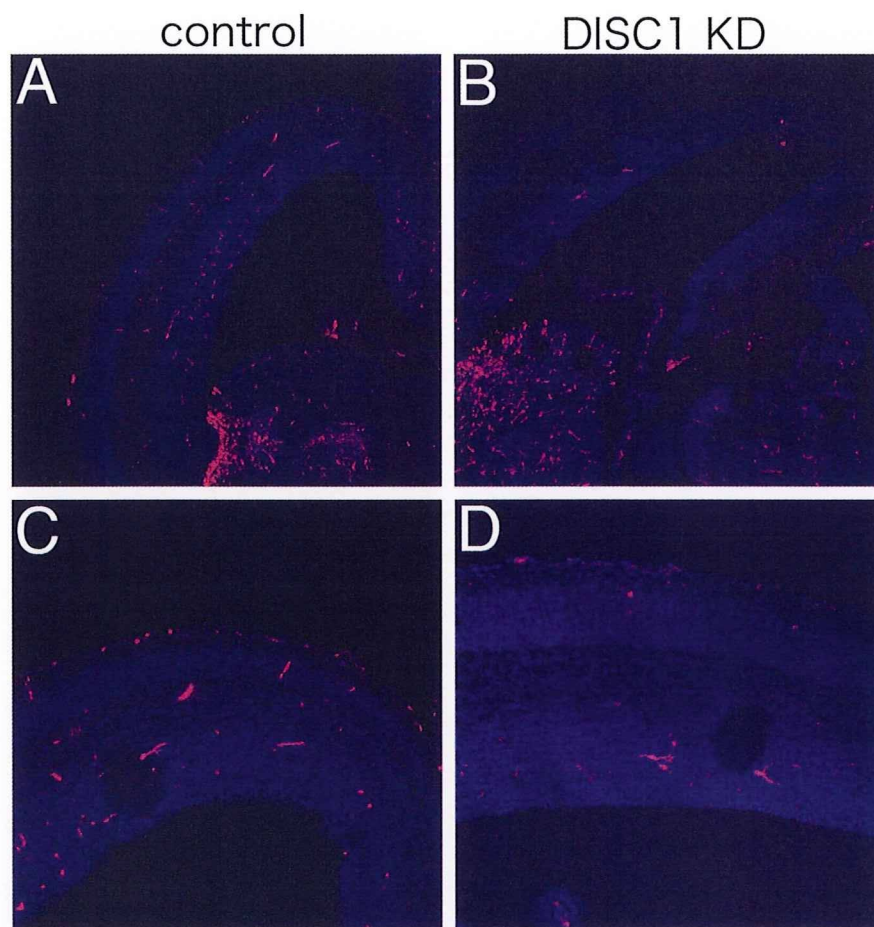


図 基底核原基にDsRed発現ベクターとノックダウンベクターを遺伝子導入して3日後の脳皮質

(3) 子宮内胎児電気穿孔法による前頭前野特異的な DISC1 ノックダウンマウスの解析

(i) 子宮内胎児電気穿孔法による前頭前野特異的な遺伝子導入法の開発

子宮内胎児電気穿孔法の前頭前皮質特異的な遺伝子発現調節への有効性を調べるために、まず緑色蛍光蛋白質 (GFP) を胎生 14 日目のマウスの両側の側脳室に注入して電気穿孔法を行った。生後 56 日目にこの脳を解析すると、GFP 陽性細胞が背外側前頭前皮質 dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC)、正中前頭前皮質 medial prefrontal cortex (mPFC)、眼窩前前頭前皮質 orbitofrontal cortex (OFC)、前帯状回皮質 anterior cingulate cortex に分布しているのが分かった。このため、この方法が前頭前皮質特異的な遺伝子導入に用いることが分かった。マーカーを用いて染色すると、この方法では興奮性の錐体細胞に遺伝子導入されており、抑制性神経細胞やグリアには遺伝子導入されていなかった。

(ii) DISC1 ノックダウンによる神経細胞突起の異常

次に、開発された遺伝子導入法を用いて、DISC1 のノックダウンベクターの導入を行った。同時に緑色蛍光蛋白質 (GFP) の導入を行い、遺伝子導入された神経細胞の形態を観察した。すると、生後 14 日目において、遺伝子導入された神経細胞は樹状突起の形態が貧弱であった。この所見は電気生理学的方法でも確認され、神経細胞膜のキャパシタンスが低下していた。これは膜の総量が減っていることを示し、突起の発達が乏しいことが裏付けられた。

(iii) DISC1 ノックダウンマウスにおける中脳皮質ドーパミン投射の異常

DISC1 のノックダウンベクターを胎生期に導入したマウスの体重を生後 14 日、28 日、56 日後に調べた。ノックダウンしたマウスとコントロールのマウスでは、体重に差を認めなかった。

それに対し、マイクロダイアリシス法を用いて測定した前頭前皮質の細胞外のドーパミンの量は、ノックダウンしたマウスで 56 日後に著明に減少していたが、28 日後では変化を認めなかった。グルタミン酸、ノルエピネフリン、セロトニンではそのような変化を認めなかったため、この変化は

ドーパミン特異的なものであると考えられた。出生以降のドーパミン量の増加はドーパミン投射の増加を反映していると考えられるため、ノックダウンしたマウスで生後56日後にドーパミンが減少しているのはドーパミン作動性神経の成熟に異常があるのではないかと考えられた。この所見と一致して、生後56日後のノックダウンしたマウスでは Tyrosine Hydroxylase (TH)の免疫染色反応が低下していた。

ドーパミン作動性神経は GABA 作動性抑制性神経細胞にもシナプス接合を行うため、この異常なドーパミン投射はドーパミン作動性神経に影響を与えている可能性もあった。このため、parvalbumin (PV)の免疫染色を用いて PV の発現レベルを調べた。すると生後56日後のノックダウンしたマウスでは PV の免疫染色反応が低下していた。

(iv) DISC1 ノックダウンマウスにおける行動異常

このような神経化学的な異常所見が、マウスの行動にどのような影響を与えるかを観察するため、Prepulse Inhibition (PPI)法を用いて sensory gating 機能を測定した。これは皮質の情報処理の主要な指標とされる。コン

トロールのマウスと比較すると、DISC1 ノックダウンマウスは生後56日目において PPI の減弱を示した。しかも、この PPI の減弱はクロザピンの投与によって回復した。そのとき、細胞外のドーパミン量はクロザピンの投与によって正常化していた。また、メタアンフェタミン投与は生後56日後のノックダウンマウスにおいて過敏な反応を示した。またその時の細胞外のドーパミン量はむしろ上昇していることが観察され、ドーパミンに関連した行動異常が惹起されていることをさらに裏付ける結果となった。

(4) GABA 作動性神経細胞の移植を用いた治療戦略の構築

「GABA 作動性神経細胞 (GABA 細胞) を前頭葉に移植することで、副作用を引き起こさずに統合失調症認知機能障害を予防・治療できるのではないか」という仮説を立て、これを検証することを目的に本研究を行った。

上記仮説の検証に向けて、まず始めに統合失調症モデルマウスにおいて GABA 細胞の前頭皮質への移植による認知機能障害の発症予防効果を検証することにした。統合失調症モデルマウスとしては非競合的 NMDA 受容体アンタゴニストであるフェンサイ