

# 隔離飼育動物モデルにおけるエピジェネティックな精神神経性障害の発症機構解明と薬物（和漢薬）制御

申請代表者	矢部 武士	摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室	教授
所外共同研究者	荒木 良太	摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室	助教
所内共同研究者	松本 欣三	複合薬物薬理学分野	教授

## 【報告セミナー要旨】

### 【背景・目的】

統合失調症や不安障害などの精神疾患は決して稀な疾患ではないにもかかわらず、詳細な発症機序が不明であることや、既存薬では十分な治療効果が見られないことなどから、発症機序の解明と新たな治療戦略の開発が求められている。本研究では、隔離飼育といった環境因子の影響により精神疾患様の異常行動を示すマウス（隔離飼育マウス）を用い、背側縫線核におけるGABA神経関連遺伝子のエピジェネティクス制御に焦点をあて、異常行動の発症機序と漢方薬の改善作用を解析している。昨年度は、隔離飼育マウスの背側縫線核においてGABA<sub>B1a</sub>（GABA<sub>B</sub>受容体サブユニットの1つ）の発現増加とGABA<sub>B1a</sub>遺伝子プロモーター領域におけるDNAメチル化の減少とヒストンアセチル化の増加といったエピジェネティックな変化といった分子基盤異常を見出した。また漢方薬の作用解析の結果、隔離飼育マウスが示す社会性の多動反応に対して加味温胆湯が改善作用を示すことを見出した。本年度は、GABA<sub>B</sub>受容体機能と異常行動との関連性を追及すると共に、GABA<sub>B1a</sub>の発現増加に対する加味温胆湯の影響を解析する。

### 【方法】

隔離飼育マウスは、ddY系雄性マウスを3週齢から周囲の見えないケージにて6週間個別飼育することで作製した。隔離飼育マウスを用いて、遺伝子発現解析、DNAメチル化解析、行動薬理的解析を行った。

### 【結果・考察】

隔離飼育マウスにおいて見られる他のマウスと遭遇した際の多動や攻撃行動は、GABA<sub>B</sub>受容体アゴニストの背側縫線核内投与により増悪し、GABA<sub>B</sub>受容体アンタゴニストの背側縫線核内投与により減弱した。一方で、隔離飼育マウスが示す新奇環境下における多動や強制水泳試験における無動時間（うつ様行動）の増加は、GABA<sub>B</sub>受容体リガンドの影響を受けなかった。本結果は、背側縫線核のGABA<sub>B</sub>受容体が、他のマウスと遭遇するといった社会的刺激に対する応答異常に関与することを示唆するものである(*Neuropharmacology*, **101**, 1-12, 2016)。これまでの検討から、社会的刺激に対する応答異常に対して加味温胆湯が改善作用を示すことを見出していることから、次に、背側縫線核のGABA<sub>B1a</sub>発現増加に対する加味温胆湯の影響を解析した。その結果、隔離飼育マウスで見られたGABA<sub>B1a</sub>のmRNA発現増加に対して、加味温胆湯は影響を与えなかった。本結果から、加味温胆湯は隔離飼育マウスの背側縫線核におけるGABA<sub>B1a</sub>のエピジェネティクス制御変化を介することなく、社会的刺激に対する応答異常を改善しているものと考えられる。

## ■背景・目的

統合失調症、うつ病、不安障害などの精神疾患は、現代社会においては決して稀な疾患ではない。これらの疾患の発症機序は未だ十分に解明されていないものの、これまでに蓄積された知見からアミノ酸・モノアミン神経系を標的とした薬物の有効性が見出されており、現状の精神疾患治療においては、アミノ酸・モノアミン神経系を標的とした薬物が頻用されている。しかしながら、これらの薬物は、副作用が高頻度で認められることや、薬物に反応しない治療抵抗性患者が多数存在することなど、多くの問題点を抱えており、現状の精神疾患治療に対する満足度は決して高いものではない。一方で近年、漢方薬の抑肝散が治療抵抗性統合失調症に対して治療効果を示し、かつ副作用が見られないことが報告されるなど<sup>1)</sup>、精神疾患領域における新たな治療戦略の一つとして漢方薬による治療が注目されている。しかしながら、漢方薬は長い年月に及ぶ使用経験に基づき治療法が確立されてきたものであり、西洋薬とは異なり科学的根拠に乏しい。現在では根拠に基づいた医療が求められており、治療効果における科学的根拠の蓄積が漢方薬治療を進める上での課題となっている。こうした問題点、課題点を解決するにあたり、疾患発症の分子基盤解明及びその分子基盤に対する漢方薬の作用を解析する必要がある。

精神疾患は遺伝要因と環境要因が相互に作用することで発症するものと認識されている。近年、遺伝要因と環境要因を結ぶ機構として、環境要因が引き起こすDNAやヒストン蛋白質の化学的修飾による遺伝子発現制御、いわゆるエピジェネティクス制御が注目されており、精神疾患の発症においてもエピジェネティクス制御の関与が示唆されている。我々は前年度（平成26年度）の本研究助成において、精神疾患発症の分子基盤解明を目的に、発育期に他個体から隔離して飼育した隔離飼育マウスを用いて、精神機能異常に関与するエピジェネティクス制御変動を追究してきた。その結果、隔離飼育マウスでは背側縫線核という脳部位において、GABA<sub>B</sub>受容体サブユニットの1つであるGABA<sub>B1a</sub>の発現量が増加していること、GABA<sub>B1a</sub>遺伝子のプロモーター領域においてDNAメチル化の減少とヒストンアセチル化の増加といったエピジェネティクス変動が見られることを明らかにした。さらに、行動薬理的検討から、隔離飼育マウスで見られた背側縫線核のGABA<sub>B1a</sub>の発現増加が、新奇マウスと遭遇した際に観察される多動や攻撃行動に関与する可能性を見出しており、隔離飼育といった環境要因により引き起こされたエピジェネティクス変動により、背側縫線核のGABA<sub>B</sub>受容体の発現量が増加することで精神機能異常が生じる可能性を示した。また、新奇マウスと遭遇した際に隔離飼育マウスで観察される多動に対して、2週間の加味温胆湯の投与が有意な改善効果を示すことを見出した。本結果は、環境要因により引き起こされる精神機能異常に対して加味温胆湯が有効であることを示すものであり、加味温胆湯がエピジェネティクス制御に影響を与える可能性も考えられる。

そこで本年度の継続研究では、隔離飼育マウスが示す異常行動と背側縫線核におけるGABA<sub>B1a</sub>遺伝子のエピジェネティクス制御変動との関連性をより詳細に解析するとともに、加味温胆湯がエピジェネティクス制御に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## ■方法

### 隔離飼育マウスの作成

雄性のddY系マウス (Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd., Kyoto, Japan) を3週齢から6～8週間、集団飼育マウスは透明なケージ (24 × 17 × 12 cm) にて5匹で、隔離飼育マウスは同じサイズの周囲が灰色のケージにて1匹で飼育して実験に用いた。動物は、室温23 ± 1℃で明期8:00～

20:00、暗期 20:00 ~ 8:00 の 12 時間明暗サイクルで飼育した。水および飼料は自由に摂取させた。

### 漢方薬の投与

漢方薬は水に溶解し、集団飼育あるいは隔離飼育の 6 週目から 1 日 1 回 2 週間経口投与し、最終投与の翌日に各種解析を行った。

### mRNA 発現量の解析

マウスの背側縫線核または大脳皮質前頭前野を採取し、TRIzol 試薬 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて total RNA を抽出した。ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、抽出した total RNA 1  $\mu$ g から cDNA を合成した。合成した cDNA の定量は、表 1 のプライマーを用いて real-time PCR 法により行い、 $\beta$ -actin の発現量で補正した。

表 1. mRNA 発現量の解析に用いたプライマー

mRNA	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
GABA <sub>B1a</sub>	ACGTCACCTCGGAAGGTTG	CACAGGCAGGAAATTGATGGC
$\beta$ -actin	ACCCACACTGTGCCCATCTA	GCCACAGGATTCCATACCCA

### DNA メチル化の解析

9 週齢の集団飼育マウスまたは隔離飼育マウスの背側縫線核または大脳皮質前頭前野からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理した DNA を鋳型とし、表 2 のプライマーを用いて PCR 法により CpG アイランドを増幅しクローニングした。各サンプルにつき 8 ~ 10 クローンの塩基配列を解析した。

表 2. DNA メチル化の解析に用いたプライマー

CpG アイランド	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
1	TTGGATTTTTGTGGAAGAAGAATAG	CACCAACAACAACAACATCTA
2	AAGTTTTTTTTTTAGTTTTTTTTTTTTT	AAATCTACTTCACAATCCCAAAA

### 脳内への薬物投与

ガイドカニューレを背側縫線核 (ブレグマから後方 4.4 mm、右側 1.5 mm、26 度の角度で深さ 3.8 mm) に固定し、1 週間の回復期間の後に行動実験を行った。マウス 1 匹あたり 0.2  $\mu$ l の薬液を 5 分間かけて投与し、10 分後に行動実験を行った。薬物はリンゲル液 (147.2 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 6.0) に溶解した。

### 社会的な刺激の負荷と行動解析

透明なアクリルケージ (30  $\times$  30  $\times$  35 cm) に網目状の仕切りをし、resident として 9 週齢の集団飼育または隔離飼育マウスを大きい区画に入れ、3 時間の馴化の後、intruder として同週齢の新奇マ

ウスを小さい区画に入れた（図1）。その後20分間のresidentの行動をANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL)を用いて解析した。

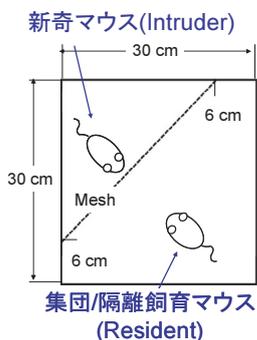


図1. 社会的な刺激の負荷に用いるケージ

### 攻撃行動の解析

9週齢の集団飼育または隔離飼育マウスと、intruderマウスとして9週齢の同性ddY系マウスを、測定用ケージ（透明ケージ：24 × 17 × 12 cm）に入れ、20分間ビデオ録画し、総攻撃行動時間を測定した。集団飼育または隔離飼育マウスが示すintruderマウスへの噛み付き行動を攻撃行動として解析した。

### 新奇環境下における運動量の解析

透明なアクリルケージ（30 × 30 × 35cm）に9週齢の集団飼育または隔離飼育マウスを入れ、30分間の移動距離をANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL)を用いて解析した。

### 強制水泳試験

柱形の透明な測定シリンダー（高さ27 cm、直径18 cm）に水温25℃の水を13 cm深さまで入れ、その中で9週齢の集団飼育または隔離飼育マウスを6分間水泳させ、その様子をビデオ撮影した。試験終了後、体温低下を防ぐためにマウスをよく乾燥させた。6分間の試験のうち、後半の4分間の無動時間を解析した。

## ■結果・考察

### GABA<sub>B1</sub> 遺伝子のCpGアイランドにおけるDNAメチル化の解析

DNAのメチル化は、CpGサイトと呼ばれるシトシンとグアニンが並んだジヌクレオチドのシトシンにおいて生じることが知られている。多くの遺伝子のプロモーター領域にはCpGサイトが集中したCpGアイランドが存在しており、このCpGアイランドにおけるDNAのメチル化が遺伝子の転写を調節するものと考えられている。GABA<sub>B1</sub> 遺伝子にはGABA<sub>B1a</sub>とGABA<sub>B1b</sub>といった2つの主要なスプライシングバリエントが存在するが、これらのスプライシングバリエントの転写は異なるプロモーター領域を介して調節されている<sup>2)</sup>。GABA<sub>B1a</sub>とGABA<sub>B1b</sub>の転写開始点周辺にはそれぞれCpGアイランドが存在しており（図2A；以下、GABA<sub>B1a</sub>転写開始点周辺に存在するCpGアイランドを

CpGアイランド1、GABA<sub>B1b</sub>転写開始点周辺に存在するCpGアイランドをCpGアイランド2とする)、CpGアイランド1におけるDNAのメチル化がGABA<sub>B1a</sub>の転写を、CpGアイランド2におけるDNAのメチル化がGABA<sub>B1b</sub>の転写を調節していると考えられる。前年度の検討から、隔離飼育マウスの背側縫線核では、CpGアイランド1において、DNAのメチル化が増加していることを見出した。しかしながら、具体的にどのCpG部位のメチル化が変動するかについては明らかになっていなかった。そこで本研究では、バイサルファイトシーケンス法を用いて、隔離飼育マウスでメチル化が変動するCpG部位の解析を行った。

その結果、隔離飼育マウスにおいて、CpGアイランド1に存在する53箇所のCpG部位のうち転写開始点から下流516塩基対に位置するCpG部位のメチル化が有意に減少していることを見出した(図2B)。一方で、CpGアイランド2においてはメチル化の変動が見られるCpG部位は確認できなかった(図2C)。メチル化の変動が見られたCpG部位の周辺には、神経活動依存的に誘導される最初期遺伝子であるEgr-1の結合部位が存在すること、隔離飼育マウスの背側縫線核でEgr-1のmRNA発現量が減少していること(data not shown)、Egr-1がDNAメチル基転移酵素をリクルートすること<sup>3)</sup>などから、転写開始点から下流516塩基対に位置するCpG部位におけるDNAメチル化に、Egr-1の発現変動が関与する可能性が考えられる。現在、本CpG部位におけるDNAのメチル化とEgr-1との関連性について解析を行っている。

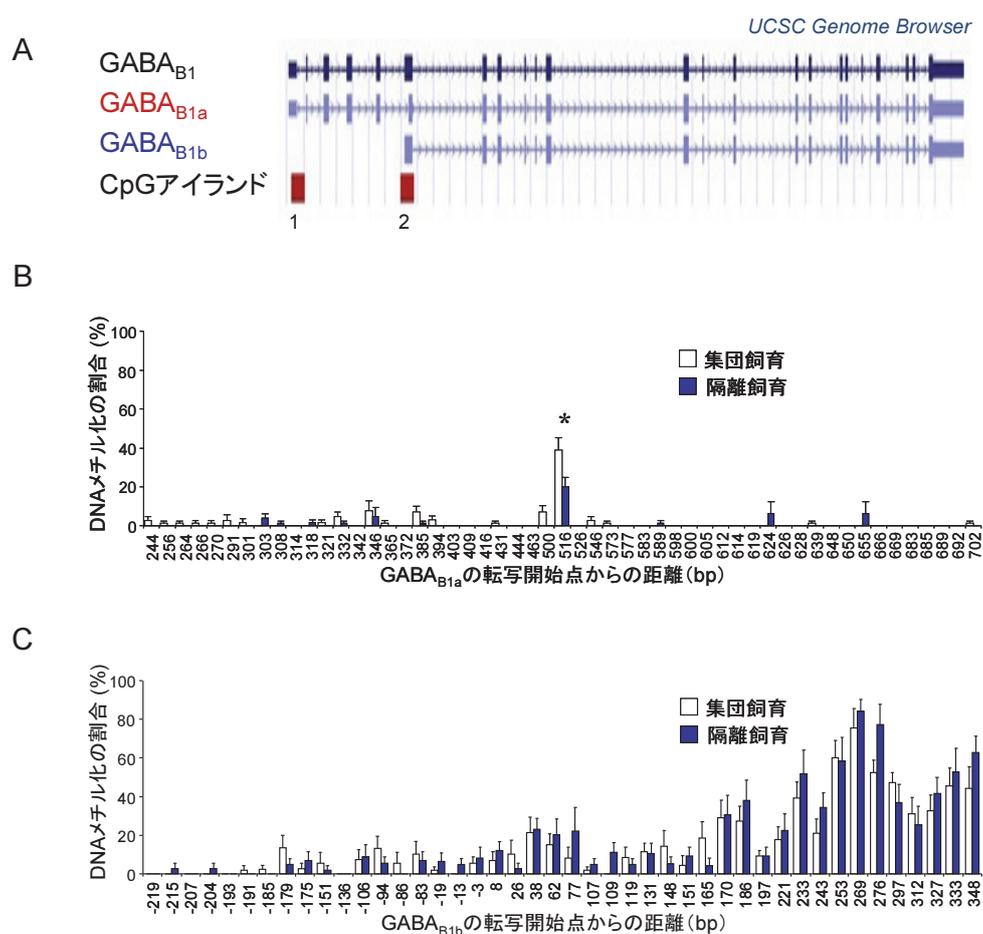


図2. GABA<sub>B1</sub>遺伝子におけるCpGアイランドの位置(A)と、背側縫線核におけるCpGアイランド1(B)とCpGアイランド2(C)のDNAのメチル化の割合。  
\* $p < 0.05$  vs. 集団飼育。

### 背側縫線核のGABA<sub>B</sub>受容体機能が異常行動に与える影響の解析

前年度の検討から、背側縫線核にGABA<sub>B</sub>受容体アンタゴニストを投与することで、新奇マウスと遭遇した際に観察される多動や攻撃行動が抑制されることを明らかにした。こうした異常行動は新奇マウスと遭遇するといった社会的な刺激により誘発される行動であることから、社会的な刺激に対する応答性の異常を反映するものと考えられる。すなわち、背側縫線核のGABA<sub>B</sub>受容体は社会的な刺激に対する応答性を調節するものと想定される。この仮説を裏付けるために、背側縫線核へのGABA<sub>B</sub>受容体アゴニストの投与が異常行動に与える影響を解析した。その結果、アゴニスト baclofen (0.06 nmol)の投与は新奇マウスと遭遇した際に隔離飼育マウスで換算される多動や攻撃行動を有意に増悪した(図3A、B)。以上の結果は、GABA<sub>B</sub>受容体の機能亢進が社会的な刺激に対する過剰な応答を誘発することを示唆している。

これまでの検討から、背側縫線核のGABA<sub>B</sub>受容体が社会的な刺激に対する応答に関与すること明らかになった一方で、新奇環境やストレスフルな環境に対する応答性と背側縫線核のGABA<sub>B</sub>受容体との関連性は不明である。そこで、GABA<sub>B</sub>受容体リガンドの背側縫線核内投与が隔離飼育マウスで

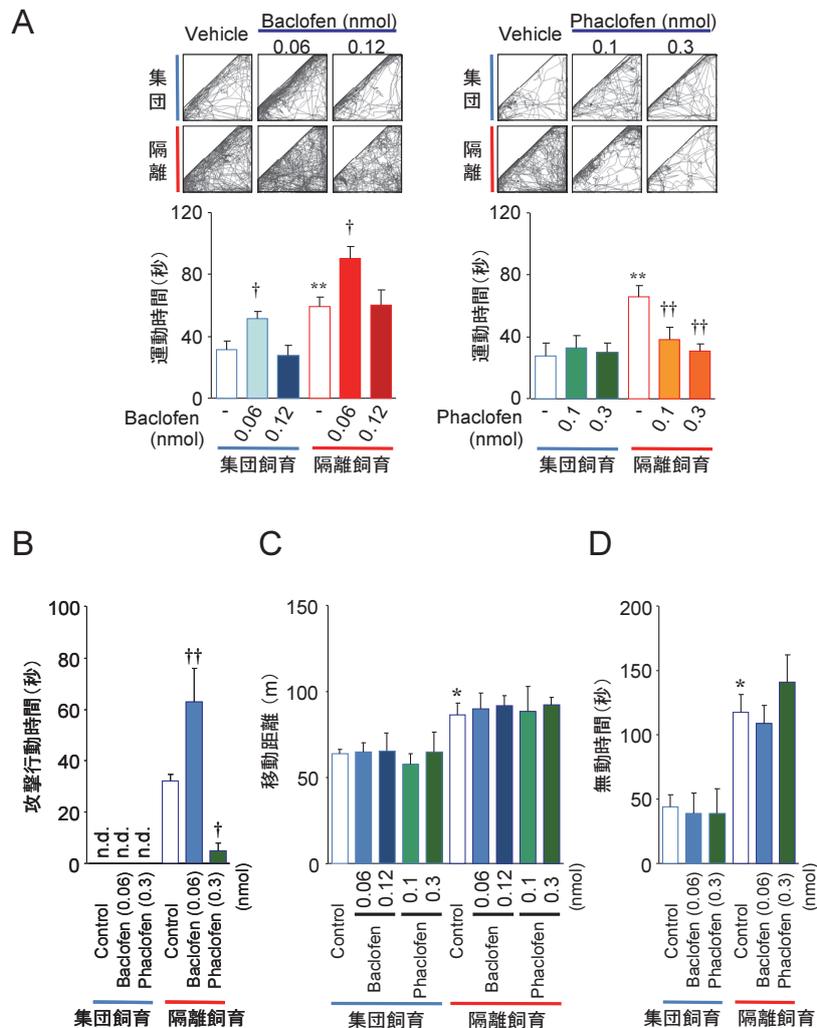


図3. 新奇マウスと遭遇した際の多動 (A)、攻撃行動 (B)、新奇環境下における多動 (C)、強制水泳試験における無動時間 (D) に対するGABA<sub>B</sub>受容体リガンドの背側縫線核内投与の影響。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. 集団飼育。<sup>†</sup> $p < 0.05$ , <sup>††</sup> $p < 0.01$  vs. vehicle。

観察される新奇環境下における多動や強制水泳ストレス負荷時の無動時間の増加に与える影響を解析した。その結果、GABA<sub>B</sub>受容体アゴニスト baclofen (0.06 nmol)、GABA<sub>B</sub>受容体アンタゴニスト phaclofen (0.3 nmol) はともに、隔離飼育マウスで観察される新奇環境下における多動や強制水泳ストレス負荷時の無動時間の増加に対してなんら影響を与えなかった (図 3 C、D)。以上、前年度と今年度の結果から、背側縫線核の GABA<sub>B</sub> 受容体は社会的な刺激に対する応答性を選択的に調節することが示唆された。隔離飼育環境は社会的な刺激が欠如した環境であることから、隔離飼育マウスでは社会的な刺激に応答する神経回路の一部である背側縫線核において、エピジェネティクス制御を変動させるものと考えられる。

#### 隔離飼育マウスの背側縫線核において見られる GABA<sub>B1a</sub> の発現増加に対する加味温胆湯の作用

前年度の検討より、加味温胆湯を 2 週間投与することで、新奇マウスと遭遇した際に隔離飼育マウスで観察される多動が抑制されることを明らかとした。本年度は、加味温胆湯の多動抑制作用における GABA<sub>B1a</sub> 遺伝子のエピジェネティクス制御変動の関与を明らかにするために、隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現増加に対する加味温胆湯の影響について解析した。その結果、これまでの検討どおり、隔離飼育マウスでは背側縫線核において、GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現量の増加が見られたが、加味温胆湯はこの発現増加に対してなんら影響を与えなかった (図 4)。本結果から、加味温胆湯による多動抑制作用に GABA<sub>B1a</sub> のエピジェネティクス制御変動は関与しないものと考えられる。

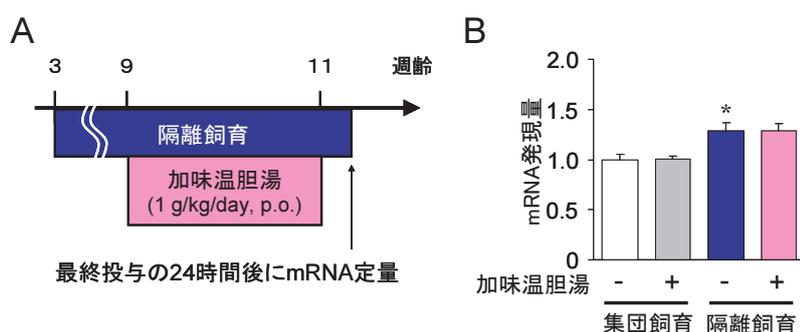


図 4. 加味温胆湯の投与スケジュール (A) と背側縫線核における GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現量増加に対する加味温胆湯の影響 (B)。\* $p < 0.05$  vs. 集団飼育。

## ■ 結論

これまでの研究から、隔離飼育といった環境要因により背側縫線核において GABA<sub>B1a</sub> の転写開始点の下流 516 塩基対に位置するシトシンのメチル化が減少することで、GABA<sub>B1a</sub> の発現量が増加する可能性、背側縫線核の GABA<sub>B</sub> 受容体の機能亢進が社会的な刺激に対する過剰な応答を誘発する可能性を示した。

また、漢方薬の加味温胆湯は、新奇マウスと遭遇した際に隔離飼育マウスが示す多動を有意に改善したものの、背側縫線核における GABA<sub>B1a</sub> の発現増加は改善しなかった。本結果は、社会的な刺激に対する過剰な応答に対する加味温胆湯の改善作用に、GABA<sub>B1a</sub> のエピジェネティクス制御変動は関与しないことを意味するものである。

今後、背側縫線核における GABA<sub>B1a</sub> のエピジェネティクス制御に作用する漢方処方を見出すにあたり、臨床現場において社会性不安障害などの社会的な刺激に対する応答異常に対して用いられてい

る漢方処方解析を行っていくことが必要と考えられる。

## ■引用文献

1. Miyaoka T., Furuya M., Horiguchi J., Wake R., Hashioka S., Tohyama M., Mori N., Minabe Y., Iyo M., Ueno S., Ezoe S., Murotani K., Hoshino S., Seno H. Efficacy and safety of yokukansan in treatment-resistant schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial (a Positive and Negative Syndrome Scale, five-factor analysis). *Psychopharmacology*, **232**: 155-164, 2015.
2. Steiger JL., Bandyopadhyay S., Farb DH., Russek SJ. cAMP response element-binding protein, activating transcription factor-4, and upstream stimulatory factor differentially control hippocampal GABABR1a and GABABR1b subunit gene expression through alternative promoters. *The Journal of neuroscience*, **24**, 6115-6126, 2004.
3. Cartron PF., Blanquart C., Hervouet E., Gregoire M., Vallette FM. HDAC1-mSin3a-NCOR1, Dnmt3b-HDAC1-Egr1 and Dnmt1-PCNA-UHRF1-G9a regulate the NY-ESO1 gene expression. *Mol Oncol.* **7**, 452-463, 2013.