

博士課程用 (甲)

## 学位論文の内容の要旨

( 藤原 和之 ) 印

Haploinsufficiency of the glutamate decarboxylase 67 gene in a subset of GABAergic neurons induces schizophrenia-related behavioral phenotypes

(GABA作動性ニューロン亜集団におけるグルタミン酸脱炭酸酵素67のハプロ不全は、統合失調症関連表現型を生む)

## 【背景と目的】

統合失調症は人口の約1%が罹患する頻度の高い精神疾患である。その発症メカニズムや病態生理は大部分が不明のままであったが、近年の死後脳研究によって、大脳皮質のグルタミン酸脱炭酸酵素67 (GAD67)の発現が低下していることが明らかになってきた。GAD67は大脳における主要な抑制性神経伝達物質のγ-アミノ酪酸(GABA)を合成する酵素であり、GABA作動性ニューロンに選択的に発現している。統合失調症死後脳では、このGABA作動性ニューロンの中でも特にパルブアルブミン(PV)を発現する細胞 (PVニューロン) やソマトスタチン(SST)を発現する細胞(SSTニューロン)において、GAD67の減少が起きていると報告されている。死後脳研究は横断的な観察研究である為、このGAD67の減少が疾患プロセスの結果であるのか、それとも原因となっているのかを検討することができない。そこで本研究では、PVニューロンを含むGABA作動性ニューロンのおよそ半数に限局してGAD67をノックアウトしたマウスを作製し、統合失調症で見られる所見を模倣することを試みた。このモデル動物の行動学的表現型を調べ、「GABA作動性ニューロンの亜集団におけるGAD67の低下が、統合失調症に関連する表現型を生み出す」という仮説を検証した。

## 【研究方法】

1. PV-CreマウスとGAD67-floxマウスを交配し、PV-Cre; GAD67<sup>flox/flox</sup>, PV-Cre; GAD67<sup>flox/+</sup>マウスを作製した。個体のゲノタイプを同定するため、尾組織からDNAを採取してPCRを行った。なお、以降の実験におけるコントロールはGAD67<sup>flox/+</sup>マウスとした。
2. PV-Cre; GAD67<sup>flox/flox</sup>マウスおよびPV-Cre; GAD67<sup>flox/+</sup>マウスにおけるGAD67タンパクの減少を確認するため、生後3カ月齢の個体から大脳皮質を採取してホモジェネートを調製し、そのSI画分に対して抗GAD抗体によるウェスタンブロット解析を行った。定量の際には、同時に測定したβ-アクチンに対して標準化を行った。
3. PV-Cre; GAD67<sup>flox/flox</sup>マウスおよびPV-Cre; GAD67<sup>flox/+</sup>マウスのPV陽性ニューロンにおいてGAD67タンパクが減少していることを確認するため、抗PV抗体と抗GAD67抗体による蛍光二重免疫染色を行い、蛍光強度を定量した。
4. PV-Cre; GAD67<sup>flox/flox</sup>マウスおよびPV-Cre; GAD67<sup>flox/+</sup>マウスのPV陽性ニューロンにおけるGAD67タンパクの減少が細胞内のGABA量に影響を与えているか半定量的に調べるため、抗PV抗体と抗GABA抗体による蛍光二重免疫染色を行い、蛍光強度を定量した。
5. PV-Cre; GAD67<sup>flox/+</sup>マウスから海馬スライス標本作製し、パッチクランプ法による電気生理学実験を行った。抑制性伝達が障害されていることを示す為、海馬CA1領域の錐体細胞から抑制性シナプス後電流IPSCを記録した。また、NMDA受容体の特性を調べる為、current-voltage curve(I-V曲線)を記録した。
6. PV-Cre; GAD67<sup>flox/+</sup>マウス (3カ月齢以上の雄) に対して行動テストバッテリーを行い、行動学的な表現型

を同定した。統合失調症の中間表現型とされるプレパルス抑制試験や、NMDA受容体拮抗薬であるMK-801への感受性試験、社会性行動の評価等を実施した。

7. 6と同様の行動学試験を、GAD67グローバルノックアウトマウス(GAD67<sup>fl/fl</sup>)に対しても行った。

#### 【結果と考察】

1. PV-Cre; GAD67<sup>fl/fl</sup>マウスおよびPV-Cre; GAD67<sup>fl/+</sup>マウスを作製したところ、PV-Cre; GAD67<sup>fl/fl</sup>マウスは生後1カ月齢～2カ月齢にかけておよそ20%が突然死し、一部の個体は明らかなたんかん発作を示した。一方、PV-Cre; GAD67<sup>fl/+</sup>マウスでは突然死は見られず、生存曲線はコントロールマウスと同等であった。
2. PV-Cre; GAD67<sup>fl/fl</sup>マウスの大脳皮質では、GAD67タンパク量は約50%に減少していた。一方、GADのもう一つのアイソフォームであるGAD65タンパク量は約150%に増加していた。
3. PV-Cre; GAD67<sup>fl/fl</sup>マウスおよびPV-Cre; GAD67<sup>fl/+</sup>のPV陽性ニューロンの細胞体におけるGAD67シグナルは、有意に減少していた。
4. PV-Cre; GAD67<sup>fl/fl</sup>マウスおよびPV-Cre; GAD67<sup>fl/+</sup>のPV陽性ニューロンの細胞体におけるGABAシグナルは、有意に減少していた。PV-Cre; GAD67<sup>fl/fl</sup>マウスにおいては、PVシグナルが有意に上昇していた。
5. PV-Cre; GAD67<sup>fl/+</sup>マウスの海馬では、GABA<sub>A</sub>受容体を介するIPSCの振幅が有意に減弱していた。また、NMDA受容体のI-V曲線がコントロールマウスに比べて有意に浅くなっていた。
6. PV-Cre; GAD67<sup>fl/+</sup>マウスは、不安様行動、協調運動機能、ワーキングメモリー、うつ様行動、恐怖条件付けについては、コントロールマウスと差がなかった一方で、NMDA受容体拮抗薬に対する感受性の増大、プレパルス抑制の減弱、社会新奇嗜好性の減弱を示した。
7. GAD67<sup>fl/fl</sup>マウスでは、全ての行動試験にてコントロールマウスと差が認められなかった。

#### 【結論】

本研究では、PVニューロンを主体とする一部のGABA作動性ニューロンにおいてGAD67を減少させ、その表現型を観察した。ホモノックアウト体であるPV-Cre; GAD67<sup>fl/fl</sup>マウスではたんかんや突然死が見られ、代償性と思われるGAD65の増加やPVの増加が認められた。一方、ヘテロノックアウト体であるPV-Cre; GAD67<sup>fl/+</sup>マウスは、GAD67の減少量は有意であるがより穏やかであり、ヒトの死後脳所見に比較される。このPV-Cre; GAD67<sup>fl/+</sup>マウスにおいても有意な抑制性シナプス伝達の減弱が認められ、なおかつNMDA受容体の特性の変化や、プレパルス抑制の障害など統合失調症に関連する行動学的表現型を示した。以上より、死後脳研究で見られる一部のGABA作動性ニューロン選択的なGAD67減少が、統合失調症の発症あるいは発症脆弱性に関与していることが示唆された。