

遺伝的要因を発症機序とする加齢進行性運動失調 ならびに ADHD/OCD 様精神症状の病態分子基盤の 解明と新規治療標的分子の探索

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 佐々木 恵太

[目的]

遺伝的要因を背景とする疾患の詳細を明らかにするため、原因と考えられている遺伝子を操作・改変したモデル動物を作製し、その表現型を解析することは病態分子基盤を理解する上で極めて重要な研究手法である。しかしながら、難治性疾患に分類される一部の運動疾患や精神疾患については、その病態を反映したモデル動物が確立しているとは言い難く、早急なモデル動物の作出が期待されている。本研究では、治療法が確立されていない疾患の臨床症状を反映した新規遺伝子改変モデルマウスを作出し、詳細な病態分子基盤を解明すると共に、モデル動物を用いた行動薬理学的実験手法を駆使することで、新規治療標的分子群の同定を目標として以下の研究を実施した。

1) 慢性進行性の異常不随意運動を症状とするハンチントン病 (HD) は、線条体領域における神経変性・脱落を示す難治性疾患である。HD で観察される神経脱落の原因として変異型 huntingtin 遺伝子の存在が明らかになっているものの、HD の主症状である運動失調の病態分子基盤については十分に解明されていない。ひとつの手がかりとして、HD 死後脳を用いた遺伝子発現解析から運動機能に関連する G タンパク質 γ サブユニット 7 (G γ 7) の発現低下が見出されている。また、G γ 7 を欠損する遺伝子改変マウスを用いた実験より、G γ 7 の欠損が dopamine D1 receptor (D1R) のシグナル伝達を担う G α_{off} の発現を低下すること、自発運動異常を示すことが示唆されている。本研究では、HD における運動機能障害に G γ 7 が重要な役割を果たしていると推察し、G γ 7 欠損マウスを用いた運動機能の詳細を行動学的、生化学的に解析することで、G γ 7 欠損に起因する運動失調障害の分子基盤を解明することを目標とした。

2) 精神疾患に分類される注意欠如 (欠陥)・多動性障害 (Attention Deficit / Hyperactivity Disorder: ADHD) の遺伝子改変モデルマウスの作製と、その表現型解析を実施した。ADHD は不注意、多動性、衝動性などの特徴的な症状を主訴とする発達・行動障害である。ADHD は主に学童期に発症し、学習障害、精神遅滞を併存すること、遺伝的要因が大きく関わることが報告されている。これまで、ADHD に特徴的な多動性については盛んに研究がなされているが、精神症状と併存する学習障害については未だ十分な解析は行われていない。近年、大脳皮質と海馬領域で豊富に発現しているヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (Heparin-binding EGF-like growth factor: HB-EGF) が、統合失調症や ADHD に関与する遺伝子として同定された。大脳皮質および海馬で HB-EGF を欠損するマウスは、大脳皮質を責任領域とする自発行動量の有意な上昇や、プレパルス抑制に異常を示すなど特徴的な精神症状を示し、海馬の神経機能低下により学習障害を示すことが示唆されている。しかしながら、特徴的な精神症状と学習障害の相互関係について十分な議論はなされていない。そこで本研究では、海馬領域を病態責任領域とする海馬神経細胞特異的 HB-EGF 欠損マウスを作製し、認知機能低下を起因とする学習機能障害と精神症状の両者を解析することで、海馬領域単独で引き起こされる ADHD 様の表現型ならびに生化学的な解析を実施することとした。

[結果]

1) $G\gamma 7$ 欠損マウスを用いた行動学的な解析より、加齢進行性に異常不随意運動の指標となる clasp reflex の重篤化 (Fig. 1a, b)、ならびに Rota rod 試験法による運動協調性の低下を示すことが明らかになった (Fig. 1c)。また、ウエスタンブロッティングによる発現解析より、 $G\gamma 7$ 欠損マウスの線条体において $G\alpha_{olf}$ 、D2R の発現低下が観察された。本結果より、 $G\gamma 7$ 欠損マウスでは、 $G\gamma 7$ 欠損と共に発現低下する $G\alpha_{olf}$ より、D1R を介するドパミンシグナル伝達機構の破綻が示唆された。また、D2R の発現低下より間接路においても何らかの機能不全を示すことが示唆された。そこで D2R アゴニスト pramipexole の慢性投与により、 $G\gamma 7$ 欠損マウスが示す加齢進行性の運動失調を改善できるか検討した。その結果、clasp reflex を有意に抑制すること (Fig. 1d)、rota rod 試験による運動協調性を改善することが明らかになった (Fig. 1e)。また、pramipexole の退薬 1 週間後においても clasp reflex を有意に抑制効果が観察されたことから、pramipexole を代表とする D2R アゴニストが、HD を含む異常不随意運動の治療に有効であることが示唆された。

2) 海馬神経細胞特異的 HB-EGF 欠損マウスの行動解析の結果、初期に予想されていた学習障害を示すだけでなく (Fig. 2a, b)、ADHD 様の特徴的な精神症状である多動性 (Fig. 2c)、衝動性 (Fig. 2d)、社会活動性の低下、鬱様症状や強迫性障害様の強迫行為 (Fig. 2e) を示すことが明らかになった。また、海馬における発現変動分子群を同定するため、ウエスタンブロッティングによるタンパク質発現解析を実施した結果、神経可塑性に関わる NMDA 受容体サブユニット NR1, NR2B および PSD-95 の発現低下が観察された。これらの結果は、海馬神経可塑性の低下が学習障害のみならず精神症状の発症に関連することを示唆するものである。また、海馬神経細胞特異的 HB-EGF 欠損マウスが示す学習障害ならびに各種精神症状を改善する薬剤を探索するため、ADHD の既存治療薬 Atomoxetine と共に、異なる神経賦活化の作用機序を有する 3 種の新規治療薬剤の治療効果を検討することとした。行動薬理的な解析の結果、Atomoxetine は学習障害の改善を示さなかったものの、新規治療薬剤では有意な学習機能改善効果が見出された。また、ADHD 様症状である多動性や衝動性については、本研究で検討した 4 薬剤ともに有意な抑制効果を示した。一方、Marble burying 試験で検討を行った強迫行為に関しては、2 種の新規治療薬剤で有意な改善効果が確認できたものの、Atomoxetine では改善効果は認められなかった。

[考察]

1) HD における運動失調の病態分子基盤を明らかにすべく、HD にて発現低下が示唆されている $G\gamma 7$ を欠損するマウスを用い行動学的に解析することで、加齢進行性に重篤化する異常不随意運動、ならびに運動協調性の低下を示すことを初めて明らかにした。本結果は、HD における運動失調に $G\gamma 7$ 、 $G\alpha_{olf}$ の発現低下を介した D1R-striatonigral MSNs のドパミンシグ

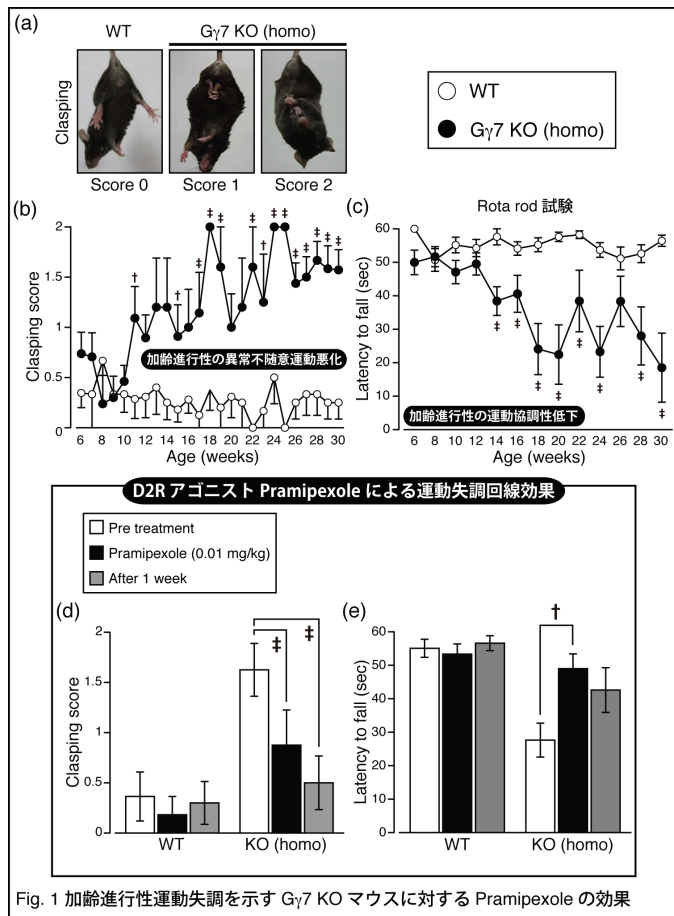


Fig. 1 加齢進行性運動失調を示す $G\gamma 7$ KO マウスに対する Pramipexole の効果

ナル破綻が影響していることを示唆する。さらに、Gy7 欠損マウスの線条体では D2R の有意な発現低下が見出された。D2R も同様に、HD 患者死後脳および他の HD モデルマウスにて発現低下が示唆されている分子であることから、D2R の発現低下もまた錐体外路における間接路の機能障害を示唆するものであると考えられた。本研究によって明らかになった Gy7 が有する運動機能制御機構への関与は、HD を含む運動失調症の詳細な病態分子基盤の解明に寄与するものであると期待される。

また、発現低下が見られる D2R の機能を改善すべく、D2R アゴニスト Pramipexole の治療効果について検討した結果、有意な運動機能改善効果を見出した。これまで、Pramipexole の適応は早期のパーキンソン病やレストレスレッグ症候群に限定されたものであったが、本研究により、D2R アゴニストが HD を含む異常不随意運動に対し有効であることを示唆するものである。D2R アゴニストによる治療は、根本的な HD の治療法ではないものの重篤化した HD 患者では異常不随意運動に起因する嚔下障害による死亡例も存在するため、本研究結果で示す新たな異常不随意運動に対する治療の可能性は、HD 患者の生活を改善する上で大変意義深いものである。

2) 海馬神経細胞特異的 HB-EGF 欠損マウスは、初期の予想された学習障害を示すのみならず ADHD 様の多動性、衝動性、注意欠如を示すと同時に、OCD 様の強迫行為の亢進を示すことが明らかになった。本結果は、精神神経科学においてこれまで十分な検討がなされていない海馬領域が、学習障害だけでなく精神症状についても重要な病態責任脳領域であることを示唆するものである。海馬神経細胞における HB-EGF の欠損は、神経興奮を担う NMDA 受容体とその関連分子 PSD-95 の発現低下を介し、神経の電氣的可塑性を低下させることで学習障害を含む認知機能低下を示したものだと考えられる。さらに本研究では、低下した海馬機能を改善する目的で数種の新規治療薬剤が有する学習機能・精神症状改善作用を検討した。その結果、学習障害のみならず、HB-EGF 欠損マウスが示す特徴的な多動性、衝動性、不注意、強迫行為をも改善することが明らかになった。本研究結果は、海馬を病態責任領域とし、認知機能障害を示す精神疾患において、海馬神経機能の改善を目的とした治療薬剤の開発が今後の重要な研究課題となることを示唆するものである。

[基礎となった学術論文]

Sasaki K, Yamasaki T, Omotuyi IO, Mishina M, Ueda H: Age-dependent dystonia in striatal Ggamma7 deficient mice is reversed by the dopamine D2 receptor agonist pramipexole. *J Neurochem*, (2013).

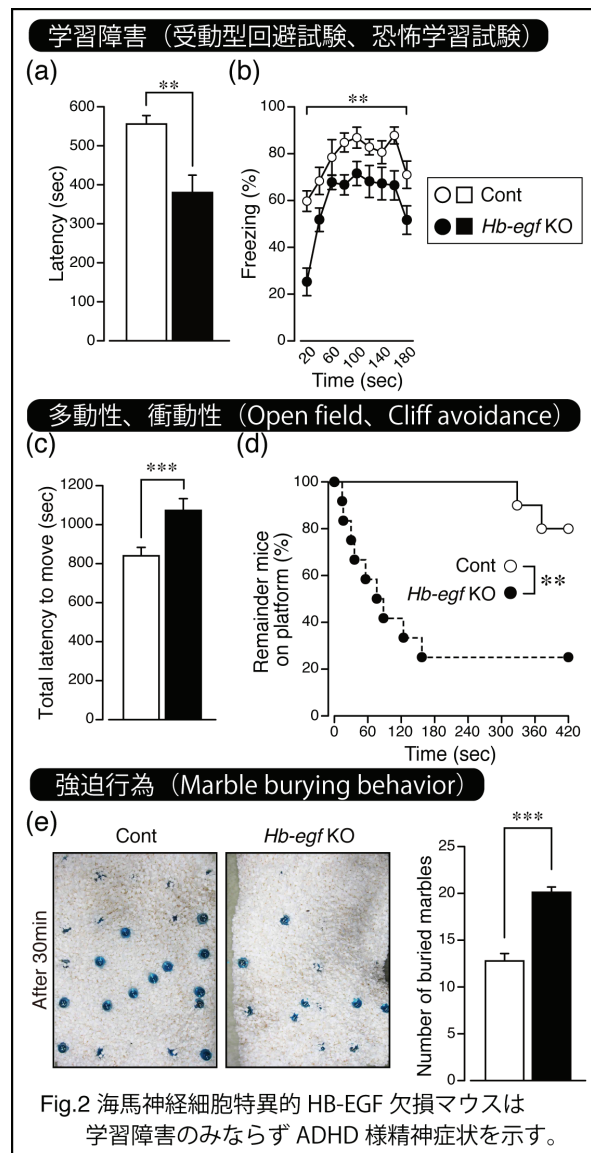


Fig.2 海馬神経細胞特異的 HB-EGF 欠損マウスは学習障害のみならず ADHD 様精神症状を示す。