

論文の内容の要旨

論文題目

Behavioral analysis of schizophrenia-like phenotypes in a mouse model of 22q11.2 deletion syndrome

(22q11.2 欠失症候群モデルマウスの作製と
行動学的手法による統合失調症様表現型の解析)

氏名：齋藤 遼

【背景と目的】

統合失調症は、思春期から青年期にかけて好発する精神疾患であり、罹患率は全人口の1%とされる。統合失調症では、陽性症状（妄想、幻覚など）、陰性症状（意欲減退、感情平板化など）および認知機能障害を特徴とする多彩な精神症状を呈し、日常生活や社会的機能に支障をきたす。統合失調症の発症には遺伝的要因が関与すると考えられており、発症リスクを高めるゲノム変異が多数報告されてきた。これまでに、統合失調症との関連が示唆される多くの一塩基多型（SNP）が同定されているが、ひとつの SNP が発症に与える影響は小さい（オッズ比: 1.1-1.3）。一方、頻度1%未満の稀なコピー数多型(Copy number variations: CNVs)の中には、統合失調症の発症リスクを数十倍にも高めるものがあると報告されている。

CNVsのひとつである22q11.2欠失症候群(22q11.2DS)は、ヒト22番染色体長腕11.2領域のヘミ接合性欠失を原因とする優性遺伝疾患である。22q11.2DS患者は、先天性心疾患、口蓋形成異常、免疫不全、特徴的な顔貌を示すなどの身体疾患に加え、統合失調症、知的障害などの精神疾患を高頻度で発症する。特に、統合失調症の発症リスクは、これまで知られている単一の遺伝的リスク因子の中で最も高い（オッズ比: 16.3-44.2）。そのため、22q11.2DSは統合失調症の発症機序を解明する上で重要なリスク因子であると考えられている。

ヒトの欠失領域に存在する遺伝子群はシンテニーを保持してマウスの16番染色体A13領域に保存されている。現在までに、当該領域を部分的に欠失させたマウスの作製・解析が行われているが、約90%の22q11.2DS患者で見られる3.0-Mb欠失を再現したマウスは作製されていない。そのため、当該領域にありながら本疾患との関連が調べられていない遺伝子が複数存在する。本研究では、統合失調症の発症機序を解明することを目的として、CRISPR/Cas9システムにより22q11.2DSの最高頻度欠失である3.0-Mb欠失を再現した遺伝子改変マウス

の作製を行った。また、この遺伝子改変マウス (*Del(3.0Mb)/+*マウス) を用いて網羅的な行動試験を行い、作製したマウスの行動の変化を調べた。さらに、精神疾患に関連する新規の表現型探索として、視覚誘発電位測定および概日リズム測定を行った。

【結果と考察】

1. *Del(3.0Mb)/+*マウスの作製と mRNA 発現量解析

*Del(3.0Mb)/+*マウスを作製するため、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を行った。標的領域の両端に設計した single-guide RNA と Cas9 mRNA を C57BL/6N 系統マウスの前核期受精卵に注入し、標的領域両端に二重鎖切断を導入した。その結果、標的領域を欠失したマウスが得られ、その変異が子孫へ正常に伝播することが確認された。系統化した変異マウスについて、標的領域に含まれる遺伝子の発現量変化を RT-PCR により mRNA レベルで検証した。その結果、変異マウスの海馬で、*Dgcr8* を除く 37 個の遺伝子の発現量が野生型 (WT) マウスの約 50% 程度まで減少していることを確認した。また、*Del(3.0Mb)/+*マウスは、出生したうちの 70.6% の個体が離乳を迎えるまでに死亡することがわかった。高い死亡率の原因を調べるため、*Del(3.0Mb)/+*マウス胎生 18.5 日胚を用いて組織学的解析を行ったところ、大動脈弓離断 (13.3%)、右鎖骨下動脈起始異常 (6.7%)、胸腺低形成 (46.7%) が観察された。これらの異常は 22q11.2DS 患者でも報告されており、*Del(3.0Mb)/+*マウスが 22q11.2DS 患者と共通する表現型を示すことが確かめられた。

2. *Del(3.0Mb)/+*マウスにおける網羅的な行動学的解析

*Del(3.0Mb)/+*マウスの行動特性を調べるため、種々の行動試験により *Del(3.0Mb)/+*マウスと WT マウスの行動を比較した。オープンフィールド試験により 10 分間の自発的活動量を測定したところ、*Del(3.0Mb)/+*マウスの総移動距離は WT マウスと比べて有意な減少が認められた。一方、ホームケージにおける 120 分間の自発的活動量を測定したところ、*Del(3.0Mb)/+*マウスと WT マウスの活動量に有意差は認められなかった。また、*Del(3.0Mb)/+*マウスの Y 字迷路試験における総アーム進入回数が WT マウスと比べて有意に減少したこと、高架式十字迷路試験において *Del(3.0Mb)/+*マウスと WT マウスの不安様傾向に有意差が認められなかったことから、*Del(3.0Mb)/+*マウスは不安様傾向があるのではなく、探索意欲が低下していることが考えられた。

聴覚刺激に対する驚愕反応の抑制を測定するプレパルス抑制 (Prepulse inhibition: PPI) は、感覚情報処理機能を反映する指標として、統合失調症の認知機能障害との関連が考えられている。PPI 試験の結果、*Del(3.0Mb)/+*マウスは WT マウスと比べて PPI の割合が有意に低下した。この結果は、統合失調症患者でも観察されるものであり、*Del(3.0Mb)/+*マウスが統合失調症モデルとしての高い妥当性を有していることが示唆された。

*Del(3.0Mb)/+*マウスの認知機能を調べるため、タッチパネル式視覚弁別学習試験を行った。その結果、*Del(3.0Mb)/+*マウスは WT マウスよりも視覚弁別学習の成績が優れていた。一方、

逆転学習課題により行動の柔軟性を調べたところ、*Del(3.0Mb)/+*マウスと WT マウスの間に有意な差は見られなかった。

3. 精神疾患に関連する新規の表現型探索

統合失調症の患者では、ヒトの顔認知に障害があることが知られており、その基盤として視覚情報処理能力の異常が関連していると考えられている。そこで、マウスに視覚刺激を与えた時に視覚野に生じる電位（視覚誘発電位）を測定することにより、視覚情報処理能力の評価を行った。その結果、*Del(3.0Mb)/+*マウスは、WT マウスと比べて視覚誘発電位の振幅が有意に低下しており、統合失調症患者と共通する表現型が新たに観察された。

22q11.2DS 患者では、睡眠障害を呈することが知られている。そこで、*Del(3.0Mb)/+*マウスにおける睡眠覚醒リズムの評価を行うため、概日リズム測定を行った。まず、概日リズム周期を測定したところ、*Del(3.0Mb)/+*マウスと WT マウスに有意な差は認められなかった。また、時差ぼけ実験により、*Del(3.0Mb)/+*マウスの時差ぼけへの適応力を調べた。マウスを明期 12 時間、暗期 12 時間の環境サイクルで飼育したのち、この明暗サイクルを 8 時間前進または後退させて時差を与え、何日かかってこの時差を解消できるか測定した。その結果、8 時間の明暗サイクルを前進させたとき、*Del(3.0Mb)/+*マウスは野生型マウスよりも時差ぼけが早く解消した。このことから、*Del(3.0Mb)/+*マウスの概日リズムは WT マウスと比べて光環境に対する感受性が高いことが示唆された。

【結論】

本研究では、CRISPR/Cas9 システムにより 22q11.2DS において最も頻度の高い 3.0-Mb 欠失を再現した *Del(3.0Mb)/+*マウスを樹立した。種々の行動試験の結果から、*Del(3.0Mb)/+*マウスの行動特性として探索意欲の低下が示唆された。この特徴は統合失調症患者における陰性症状を反映していると考えられる。また、PPI の低下、視覚誘発電位の振幅低下といった統合失調症患者と共通する表現型が観察されたことから、*Del(3.0Mb)/+*マウスは統合失調症モデルとして高い妥当性を有していると考えられた。したがって、*Del(3.0Mb)/+*マウスは、統合失調症の発症機序を解明する上で有用なモデルとなることが期待される。また、*Del(3.0Mb)/+*マウスの概日リズムは、WT マウスよりも光環境の影響を受けやすいことが示唆された。本研究の成果は、概日リズムの変化と精神疾患の関連について理解する一つの足掛かりとなるだろう。