

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成24年度 博士課程進学
氏名 安田光佑
指導教員名 桑原正貴

論文題名

Behavioral genetic analysis of the role of NMDA receptors at intralaminar
thalamic nuclei in brain higher-order functions
(脳の高次機能発現における視床髄板内核 NMDA 受容体の役割に
関する行動遺伝学的研究)

背景と目的

脳の活性状態は、状況に応じて劇的に変化し、意識を生み出す。睡眠時の大脳皮質の賦活化は、夢という独自の意識世界を創り出している。さらに、覚醒時にはこうした内的状態に加え、環境からの刺激に応じて、適切な行動を選択する。一方で、こうした脳全体の協調的な活動が損なわれると、高次脳機能障害を伴う統合失調症などの精神疾患を生じる。しかし、意識や高次脳機能を生み出す神経回路・分子基盤は未だ謎である。

意識と高次脳機能の神経基盤に、視床髄板内核という脳領域が関わると考えた。視床髄板内核は、意識や覚醒の調節に関わる脳幹網様体賦活化系から入力強く受け、大脳皮質の広範な領域へ投射し、同時に、報酬学習に関わる線条体と、行動選択に関わる大脳皮質との間に密接な相互連絡を持つ。さらに、統合失調症患者を対象とした死後脳の解析から、視床髄板内核での NMDA 受容体の機能低下が報告されている。しかし、視床髄板内核は、脳の深部にあり解剖学的にも複雑であるため、その行動学的な意義について十分な検証がなされていない。

そこで、本研究では、意識や高次脳機能における視床髄板内核の機能を解明することを目指し、特定の脳領域における、遺伝子の機能を行動レベルで評価ができるマウスでの分子遺伝学的アプローチを試みた。視床髄板内核 NMDA 受容体を欠損した変異マウスを作製し、行動レベルでの表現型解析を行うことで、この脳領域の機能低下が、統合失調症に関連する高次脳機能障害の発症機序に関わる可能性を検証した。

研究手法と成果

意識や高次脳機能における視床髄板内核の機能を神経回路・分子レベルで明らかにするため、第一章では、この脳領域で選択的に DNA 組換え酵素 Cre を発現するトランスジェニックマウスを確立した。この視床髄板内核 Cre マウスとレポーターマウスを交配して得られるダブルトランスジェニックマウスの組織学的解析を行い、Cre 組換えの時間・空間的パターンと、視床髄板内核における Cre 組換え効率を明らかにした。これらの結果から、この Cre マウスが視床髄板内核の機能解析に有用であることが示された。

次に、この Cre マウスと NMDA 受容体 *NR1* 遺伝子を loxP 配列 2 つで挟んだトランスジェニックマウスを交配して、視床髄板内核の NMDA 型受容体を欠損する条件の変異マウスを作製した。免疫組織化学と、逆転写 RT-PCR 法によって視床髄板内核での *NR1* 遺伝子の発現が低下していることを確認した。この変異マウスは、視床髄板内核における NMDA 受容体の意義を明らかにするために役立つと期待され、第二章、第三章の研究への基盤となるものである。

第二章では、視床髄板内核における NMDA 型受容体の行動学的な意義を明らかにするため、視床髄板内核 NMDA 型受容体を欠損する変異マウスを用い、行動レベルでの表現型解析を行った。この変異マウスでは、統合失調症の中間表現型であるプレパルス抑制が障害された。新規環境下では、探索行動の減少が認められた。NMDA 受容体選択的アンタゴニスト MK801 の全身投与はげっ歯類に過活動を誘導する事が知られるが、変異マウスでは MK-801 に対する応答性の低下が認められた。Three chambers 社会性テストでは、この変異マウスは正常な社会性と個体識別能力を示した。これらの結果から、視床髄板内核における NMDA 型受容体の機能低下が統合失調症の陽性症状および陰性症状の一端を反映することが示唆された。

続いて、この変異マウスを用いて、認知機能を評価する行動課題を行った。Y 字迷路と Morris 水迷路において、変異マウスが空間的ワーキングメモリーと空間学習・記憶に障害を持つことを見出した。また、注意・衝動性を評価する 5 選択反応時間課題において、変異マウスは衝動性の亢進と、認知的柔軟性の低下を示した。これらの結果から、視床髄板内核における NMDA 型受容体の機能低下が、統合失調症で生じる認知機能障害に類似した症状を引き起こすことが示唆された。

第三章では、視床髄板内核 NMDA 型受容体を成熟変異マウスに補うことで、認知機能が改善される可能性を検証した。具体的には、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて成熟変異マウスの視床髄板内核に *NR1* 遺伝子を導入するレスキュー実験を行った。まず、視床髄板内核 Cre マウスと Cre 依存的アデノ随伴ウイルスベクターを組み合わせることで、視床髄板内核だけに選択的に任意の遺伝子を導入する手法を確立した。変異マウスに *NR1* 遺伝子を発現する Cre 依存的アデノ随伴ウイルスベクターを投与することで、視床髄板内核で *NR1* 遺伝子が回復することを組織学的解析により示した。さら

に、視床髄板内核の *NR1* 遺伝子が回復した変異マウスでは、Y 字迷路における空間ワーキングメモリーが改善することを見出した。これらの結果から、視床髄板内核 NMDA 受容体の機能低下による認知機能障害は可逆的な変化であることが明らかになった。また、この脳領域を標的とした治療法が認知機能の改善に有効である可能性が示唆された。

研究の意義と展望

本研究は、マウス遺伝学の手法により、視床髄板内核における NMDA 受容体を介した情報伝達の障害が、高次脳機能の低下を引き起こすことを示した初めての例である。この発見は、意識や高次脳機能を生み出す神経回路・分子基盤の理解を深めるものである。

視床髄板内核は、大脳皮質の広範な領域と連絡し、高次脳機能を司る脳領域と密に連絡する解剖学的性質を持つため、多くの認知機能に関わることが指摘されているが、行動学的検証はほとんどなされていない。本研究では視床髄板内核だけに選択的に遺伝的操作を施すことができる Cre マウスを確立した。この視床髄板内核 Cre マウスは、この脳領域の機能を神経回路・行動学レベルで明らかにすることに役立ち、認知機能を生み出す神経回路基盤解明のための端緒になると期待される。

この視床髄板内核 Cre マウスを用いて、視床髄板内核 NMDA 型受容体の機能低下というメカニズムに基づいた統合失調症モデルマウスを世界で初めて確立した。このモデルマウスにおいて、陽性症状および陰性症状に加えて、空間ワーキングメモリーや記憶・学習、衝動性や認知柔軟性などの認知機能障害を見出し、視床髄板内核 NMDA 型受容体の行動学的な意義を明らかにした。このモデルマウスを使って、さらに組織学的・生理学的解析を行うことで、統合失調症の認知機能障害の発症メカニズムをより深く理解することができると期待される。

これまでの統合失調症の治療薬は、認知機能障害を改善することができないという欠点を抱えている。本研究では、視床髄板内核 NMDA 受容体の機能低下による変異マウスの認知機能障害は、アデノ随伴ウイルスベクターによって可逆的に改善されることに示した。視床髄板内核 NMDA 受容体を標的とした治療薬が認知機能の改善に有効であることが期待される。