

主論文の要旨

Mice carrying a schizophrenia-associated mutation of the *Arhgap10* gene are vulnerable to the effects of methamphetamine treatment on cognitive function: association with morphological abnormalities in striatal neurons

Arhgap10 遺伝子の統合失調症関連変異を有するマウスは認知機能に対するメタンフェタミンの作用に脆弱である：
線条体神経細胞の形態学的異常との関連

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
臨床医薬学講座 医療薬学分野

(指導：山田 清文 教授)

羽田 和弘

【緒言】

統合失調症は人口の約 1%が罹患すると言われている有病率の高い精神疾患である。しかし、詳細な病因は未だ解明されておらず、さらなる研究が求められている。統合失調症の原因として、遺伝因子と環境因子の関与により発症することが報告されている。近年我々は、2940 名の日本人統合失調症患者および 2402 名の健常者を対象としたゲノムコピー数変異 (CNV) 解析により Rho GTPase activating protein 10 (*Arhgap10*) 遺伝子変異を持つ患者を 7 名同定した (Sekiguchi et al., Transl Psychiatry 10, 274, 2020)。このうちの 1 名は *Arhgap10* 遺伝子の欠損と一塩基変異を併せ持ち、重篤な精神症状を呈した。CNV 解析で同定された *Arhgap10* 遺伝子変異の機能を明らかにするためにモデルマウス (*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウス) を作製し、網羅的な行動解析を行った。その結果、*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスにおいては、高架式十字迷路試験における不安様行動の増加とメタンフェタミン誘発性運動過多の増強が認められた。しかし、*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異とエンドフェノタイプとの関係については不明な点が多い。本研究では、神経発達に伴う *Arhgap10* 遺伝子の発現変化と *Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスにおける Rho シグナルの変化、大脳基底核の神経細胞の形態学的変化、視覚弁別学習能とメタンフェタミンに対する反応性について検討した。

【対象及び方法】

1. *Arhgap10* 遺伝子の時空間的な発現解析

胎生 14 日目、出生後 0 日、7 日、21 日、35 日、56 日の野生型マウスより脳を採取し、線条体、前頭皮質、海馬、小脳、および脳幹 (黒質や腹側被蓋野、縫線核などを含む) を切り出し、Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法を用いて *Arhgap10* 遺伝子の mRNA 発現レベルを定量した。さらに、出生後 56 日における脳内 *Arhgap10* 遺伝子の mRNA 発現の部位差を調べるため、側坐核、線条体、前頭皮質、海馬、黒質・腹側被蓋野、縫線核を切り出し、qRT-PCR 法を用いて *Arhgap10* 遺伝子の mRNA 発現レベルを定量した。また、*in situ* hybridization 法を用いて組織学的に *Arhgap10* 遺伝子発現を解析した。

2. *Arhgap10* 遺伝子の下流シグナル解析

Arhgap10 S490P/NHEJ 変異マウスおよび野生型マウスの線条体及び側坐核を採取し、pMYPT1 (Thr696) および pPAK1 (Ser144)/PAK2 (Ser141) 抗体を用いて Western Blotting を行った。

3. メタンフェタミン誘発性ドーパミン遊離の解析

Arhgap10 S490P/NHEJ 変異マウスおよび野生型マウスの側坐核に透析プローブを挿入し、メタンフェタミン処置 (1.0 mg/kg, i.p.) 後のドーパミン遊離量を *in vivo* microdialysis 法により測定した。

4. 神経細胞の形態学的解析

Arhgap10 S490P/NHEJ 変異マウスおよび野生型マウスにおける線条体および側坐核神経細胞の形態を評価するために Golgi 染色を行った後、Sholl 解析およびスパイン形

態・密度解析を行った。

5. メタンフェタミン誘発性認知機能障害の行動薬理的解析

Arhgap10 S490P/NHEJ 変異マウスおよび野生型マウスを用いて視覚弁別学習試験および逆転学習を行った。さらに *Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスおよび野生型マウスに低用量メタンフェタミン (0.3 mg/kg, i.p.) を投与し、視覚弁別学習試験を行った。

6. メタンフェタミン誘発性 c-Fos 発現の解析

低用量メタンフェタミン (0.3 mg/kg, i.p.) を処置した *Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスおよび野生型マウスを用いて c-Fos 染色を行い、線条体及び側坐核における c-Fos 陽性細胞数を定量した。

【結果】

1. *Arhgap10* 遺伝子の時空間的な発現解析

野生型マウスにおける *Arhgap10* 遺伝子の mRNA 発現は線条体、前頭皮質、小脳において週齢依存的に有意に増加し、成熟期マウス脳では線条体、側坐核、小脳において高い発現を示した。しかし、海馬、黒質・腹側被蓋野および縫線核における発現は低かった。さらに、*in situ* hybridization 法により線条体および小脳において *Arhgap10* 遺伝子が高発現することを確認した。

2. *Arhgap10* 遺伝子の下流シグナル解析

Arhgap10 S490P/NHEJ 変異マウスは、野生型マウスと比較して、線条体及び側坐核における pMYPT1 (Thr696) および pPAK1 (Ser144)/PAK2 (Ser141) の発現量が有意に上昇した。

3. メタンフェタミン誘発性ドーパミン遊離の解析

Arhgap10 S490P/NHEJ 変異マウスにおけるメタンフェタミン処置 (1.0 mg/kg, i.p.) 後の側坐核ドーパミン遊離量は野生型マウスとの間に有意な差を認めなかった。

4. 神経細胞の形態学的解析

野生型と比較して *Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスの線条体及び側坐核の神経細胞では、樹状突起の複雑性が有意に増加していた。また、*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスの樹状突起上のスパイン密度は野生型と比べて有意に増加し、特に mushroom 型スパインの顕著な増加が観察された。

5. メタンフェタミン誘発性認知機能障害の行動薬理的解析

視覚弁別学習試験および逆転学習を行った結果、*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスの視覚弁別学習機能に有意な変化は認められなかった。一方、十分に視覚弁別学習を習得したマウスに低用量メタンフェタミン (0.3 mg/kg, i.p.) を投与すると、*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスでは視覚弁別障害が観察されたが、野生型マウスでは障害は認められなかった。

6. メタンフェタミン誘発性 c-Fos 発現の解析

背内側線条体及び側坐核コア領域においてメタンフェタミン (0.3 mg/kg, i.p.) 誘発性の c-Fos 陽性細胞数が、野生型マウスに比べて *Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスでは

有意に増加した。

【考察】

マウス脳内における *Arhgap10* 遺伝子発現は週齢依存的に増加し、成熟期マウス脳では線条体、側坐核および小脳において高い発現を示すことが明らかとなった。線条体および側坐核は脳基底核を構成する部位であり、GABA 作動性中型有棘神経細胞 (MSNs) が神経細胞の 95% を占める。MSNs はドーパミン D1 受容体 (D1R) を発現する D1R-MSNs とドーパミン D2 受容体 (D2R) を発現する D2R-MSNs に大別され、それぞれドーパミン神経やグルタミン酸神経の入力を受けている。D1R-MSNs、D2R-MSNs、ペリサイトおよびアストロサイトなどで *Arhgap10* 遺伝子の発現が報告されており、*Arhgap10* 遺伝子変異によりこれら細胞の機能変化が考えられる。ARHGAP10 は Rho-GAP ファミリーに属し、活性型 RhoA または Cdc42 と結合し、不活性型へと変換することで細胞機能や形態の制御に関与している。今回の結果から *Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスの線条体および側坐核において、pMYPT1 および pPAK1/2 の上昇がみられた。また、*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスの線条体及び側坐核の MSNs では樹状突起の複雑性とスパイン密度が増加しており、*Arhgap10* 遺伝子変異との関係が示唆された。興味深いことに我々は、*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスの前頭前皮質ではスパイン密度が低下することを既に報告している。これらスパイン密度の相反する結果は統合失調症患者の死後脳解析でも報告されており、そのメカニズムを詳細に研究することで統合失調症の病態解明につながる可能性がある。

メタンフェタミンはシナプス小胞に取り込まれ、またドーパミントランスポーターを逆回転させることにより神経終末からのドーパミン遊離を促進するが、メタンフェタミン誘発性ドーパミン遊離に関して *Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスと野生型マウスとの間に有意な差は認められなかった。一方、視覚弁別学習には皮質-線条体経路が重要な役割を果たしているが、低用量のメタンフェタミンを投与した場合、*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスでは視覚弁別障害が認められ、背内側線条体及び側坐核コアでは c-Fos 陽性細胞数が野生型マウスに比較して有意に増加した。従って、*Arhgap10* S490P/NHEJ 変異マウスでは、線条体および側坐核の MSNs においてメタンフェタミン誘発性ドーパミン遊離に対する反応性が亢進している可能性がある。

【結語】

Arhgap10 遺伝子変異は線条体及び側坐核神経細胞において下流シグナルを亢進し、形態学的異常を引き起こすことで、メタンフェタミンに対する過感受性に関与している。