

主論文の要旨

Inhibition of Rho-kinase ameliorates decreased spine density in the medial prefrontal cortex and methamphetamine-induced cognitive dysfunction in mice carrying schizophrenia-associated mutations of the *Arhgap10* gene

Rho-kinaseの阻害は、統合失調症に関連する*Arhgap10*遺伝子変異を有するマウス内側前頭前皮質のスパイン密度の減少とmethamphetamine誘発性認知機能障害を改善する

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)

田中 里奈子

【緒言】

近年我々は、日本人統合失調症患者対象のゲノム解析により発症に強く関与する *ARHGAP10* 遺伝子のコピー数変異 (CNV) を同定した。さらにその中の患者の一人は対立遺伝子の *ARHGAP10* 遺伝子エクソン 17 の一塩基変異 (SNV: p.S490P) も併せて保有していた (Sekiguchi et al. 2020)。*ARHGAP10* 遺伝子ミスセンス変異 (p.S490P) は野生型 *ARHGAP10* に比べ RhoA との結合能が低いことが確認され、患者由来の *ARHGAP10* 遺伝子変異は *ARHGAP10* の機能低下を引き起こすことが示唆された (Sekiguchi et al. 2020)。*ARHGAP10* は活性型である GTP 結合型 RhoA を不活性型の GDP 結合型に変換することにより、低分子量 G タンパク質 RhoA を負に制御する。また、RhoA のエフェクター分子である Rho-kinase はアクチン動態を制御することで神経細胞のスパイン形態変化に関与している (Newey et al. 2005)。

そこで、この患者の遺伝子変異 (SNV/CNV) を模した *Arhgap10* 遺伝子改変マウス (*Arhgap10* S490P/NHEJ マウス) を作製し、病理学的解析並びに行動解析を行った。その結果、*ARHGAP10* の下流分子 Rho-kinase の異常な活性化及び統合失調症患者で見られる内側前頭前皮質における錐体細胞のスパイン密度低下、野生型マウスには影響を及ぼさない低用量の methamphetamine により認知機能が低下することを見出した (Sekiguchi et al. 2020, Hada et al. 2021)。しかし、これらの表現型と Rho-kinase の関係は不明である。

そこで本研究では、*Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの内側前頭前皮質におけるスパイン密度の低下及び methamphetamine 誘発性の認知機能障害に対する Rho-kinase 阻害剤 fasudil の効果を検討した。

【対象及び方法】

本研究では、8–15 週齢の雄性 *Arhgap10* S490P/NHEJ マウス及び同腹子の野生型マウスを用いた。fasudil (20 mg/kg) 又は vehicle を腹腔内投与し、その 60 分後に線条体、側坐核及び内側前頭前皮質を摘出した。western blotting 法によりリン酸化 myosin phosphatase-targeting subunit 1 (MYPT1) (Thr696) 及び MYPT1 の発現量を定量した。さらに、マウス脳切片を作製し、免疫染色法により内側前頭前皮質の neuronal nuclei (NeuN) 陽性細胞数及びリン酸化 MYPT1 (Thr696) 陽性細胞数をカウントした。また、fasudil (20 mg/kg) 又は vehicle を 7 日間経口投与した翌日に脳を摘出し、ゴルジ染色法により内側前頭前皮質第 2/3 層における錐体細胞のスパイン密度を解析した。さらに、認知機能を評価するために視覚弁別試験を行った。十分に視覚弁別学習の成立した *Arhgap10* S490P/NHEJ マウスを用い、視覚弁別試験開始 5 分前に fasudil (3–20 mg/kg)、30 分前に低用量 methamphetamine (0.3 mg/kg) を腹腔内投与した。なお、低用量 methamphetamine (0.3 mg/kg) は野生型マウスの視覚弁別試験の成績に影響を与えないことを確認している (Hada, Wulaer et al. 2021)。また、fasudil (3–20 mg/kg) 及び低用量 methamphetamine (0.3 mg/kg) を腹腔内投与した *Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの脳切片を作製し、免疫染色法により内側前頭前皮質の c-Fos 陽性細胞数をカウントした。

【結果】

Rho-kinase 阻害剤 fasudil の腹腔内投与は、*Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの線条体及び側坐核において Rho-kinase の基質である MYPT1 のリン酸化(Thr696)レベルの増加を有意に低下させた(Fig. 1A, B, C, D)。また、western blotting 法では、*Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの内側前頭前皮質において MYPT1 のリン酸化(Thr696)レベルに差が見られなかった(Fig. 1E, F)。一方、免疫組織学的解析では fasudil の腹腔内投与により *Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの内側前頭前皮質の神経細胞マーカー NeuN とリン酸化 MYPT1(Thr696)の共陽性細胞数の増加が有意に低下した(Fig. 2)。また、fasudil を 7 日間経口投与することにより、*Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの内側前頭前皮質におけるスパイン密度の低下を有意に改善した(Fig. 3)。さらに、fasudil の投与は低用量 methamphetamine 処置 *Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの視覚弁別能の低下を改善し(Fig. 4)、methamphetamine により増加した内側前頭前皮質における神経活動マーカー c-Fos 陽性細胞数を有意に減少させた(Fig. 5)。

【考察】

Fasudil の投与により *Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの線条体、側坐核及び内側前頭前皮質においてリン酸化 MYPT1(Thr696)レベルが抑制されたことから、fasudil は脳内において Rho-kinase 活性を抑制することが示唆された(Fig. 1, 2)。次に、ゴルジ染色の結果より Rho-kinase が *Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの内側前頭前皮質第 2/3 層における錐体細胞のスパイン密度低下に寄与することが示唆された(Fig. 3)。RhoA/Rho-kinase シグナルは、アクチン細胞骨格を調節し、神経細胞のスパインの収縮及び消失と神経突起の退縮を促進することが知られている(Sarowar et al. 2020, Martin-Camara et al. 2021)。我々は Rho-kinase 阻害剤 Y-27632 が、*ARHGAP10* 変異を有する統合失調症患者由来の人工多能性幹細胞から分化したチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞の神経突起伸長の障害を改善することを報告している(Sekiguchi et al. 2020)。さらに、本研究の結果は他グループの RhoA 又は Rho-kinase の阻害剤が様々な神経精神疾患モデルマウスの異常なスパイン形態を改善するという報告と一致する(Bobo-Jiménez et al. 2017, Francis et al. 2019)。続いて、視覚弁別試験の結果より、Rho-kinase が低用量 methamphetamine により誘発される認知機能障害に関与することが示唆された(Fig. 4)。fasudil が低用量 methamphetamine 処置後の内側前頭前皮質における c-Fos 陽性細胞数の増加を抑制したことから、Rho-kinase は低用量 methamphetamine により惹起される内側前頭前皮質の異常な神経活動の活性化に寄与することが示唆された(Fig. 5)。視覚弁別試験では、皮質—線条体回路が重要な役割を果たしている。特に前頭前皮質の神経活動は、刺激と応答の関連付けや逆転学習時によって活性化される(Asaad et al. 1998, Brigman et al. 2013, Bissonette et al. 2015)。我々は、野生型マウスにおいて Y-27632 を内側前頭前皮質へ局所投与することにより、methamphetamine(1 mg/kg)誘発性の視覚弁別障害が改善することを報告している(Liao et al. 2022)。これらの結果より、Rho-kinase を介した内側前頭前皮質における methamphetamine 誘発性の異常な神経細胞の

活性化が、*Arhgap10* S490P/NHEJ マウスの methamphetamine に誘発される認知機能障害と関連していることが示唆された。

【結語】

本研究で得られた知見より、Rho-kinase は *Arhgap10* S490P/NHEJ マウスのスパイン形態の神経病理学的変化と methamphetamine 誘発性の認知機能障害に重要な役割を果たしていることが示唆された。したがって、RhoA/Rho-kinase シグナルは *ARHGAP10* 遺伝子変異を有する統合失調症患者に対する新しい治療標的になり得る可能性が示された。

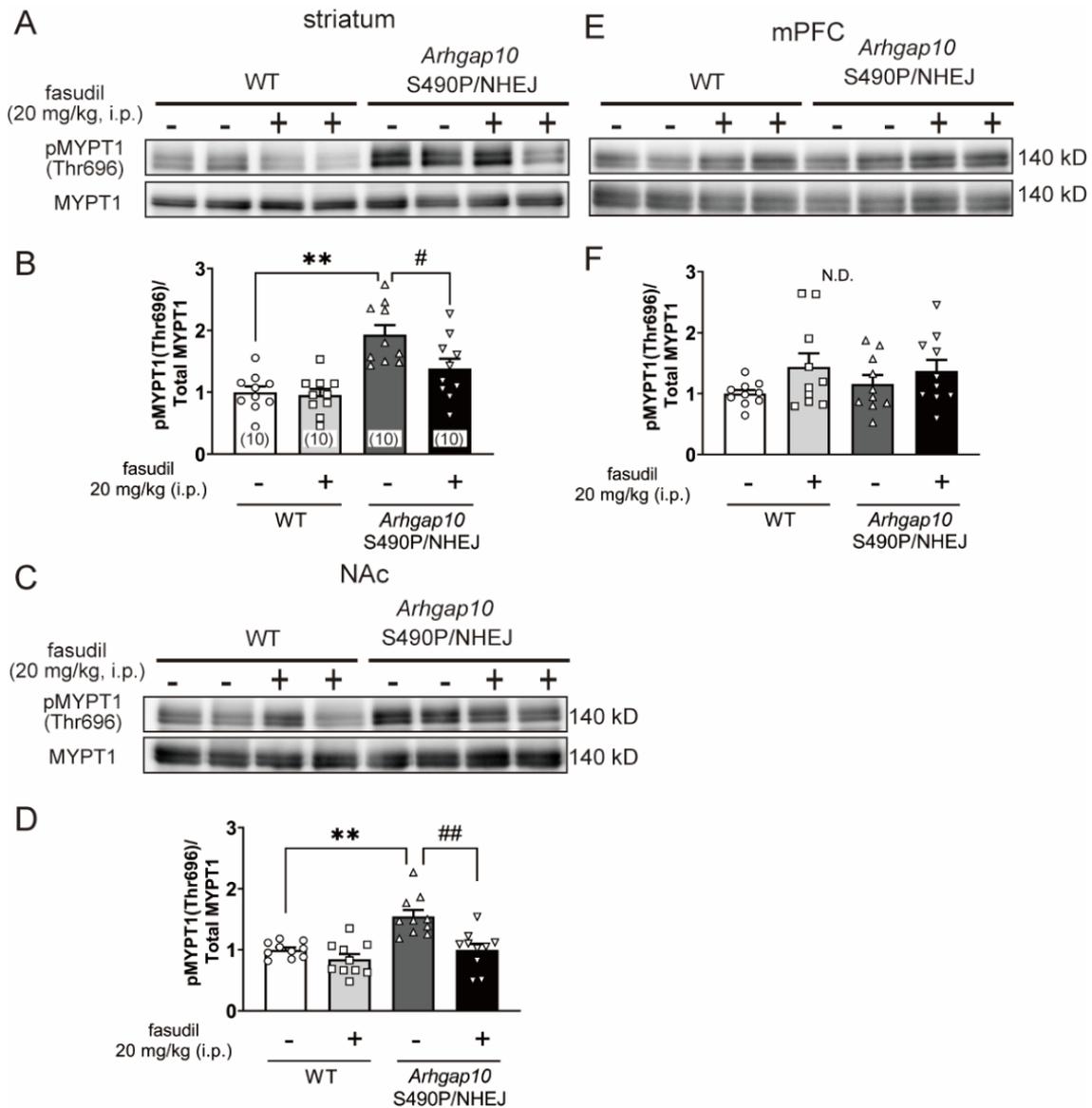


Fig. 1 The effect of fasudil on phosphorylation levels of MYPT1 at Thr696 in *Arhgap10* S490P/NHEJ mice. A, C, E: Western blotting of pMYPT1 (Thr696) and total MYPT1 in the striatum (A), NAc (C), and medial prefrontal cortex (mPFC) (E). B, D, F: Ratios of pMYPT1 (Thr696) levels to total MYPT1 levels in the striatum (B), NAc (D), and mPFC (F) of *Arhgap10* S490P/NHEJ mice or WT mice 60 min after fasudil (20 mg/kg, i.p.) treatment. Data represent the mean \pm SEM (n = 10 mice per group) and were analyzed by Tukey's multiple comparison test. **P < 0.01 compared with WT mice and #P < 0.05, ##P < 0.01 compared with the vehicle group.

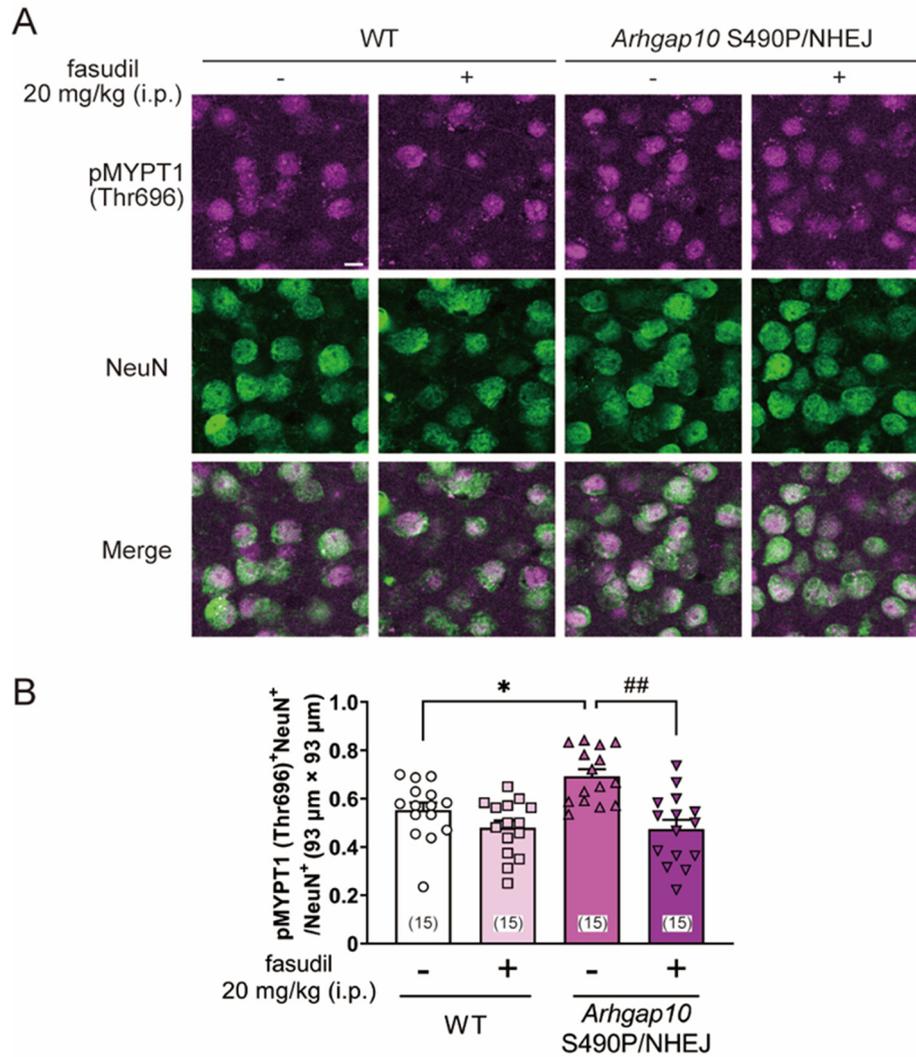


Fig. 2 The effect of fasudil on expression levels of pMYPT1 (Thr696) on NeuN-positive neurons in the mPFC of *Arhgap10* S490P/NHEJ mice. A. Representative images of pMYPT1 (Thr696) (magenta) and NeuN (green) immunoreactivity in the mPFC of *Arhgap10* S490P/NHEJ mice (scale bar indicates 10 μ m). B. Ratio of pMYPT1 (Thr696) and NeuN double-positive neurons to NeuN-positive neurons in the mPFC of *Arhgap10* S490P/NHEJ mice or WT mice 60 min after fasudil (20 mg/kg, i.p.) treatment. Data represent the mean \pm SEM (n = 15 slices in each of 5 mice per group (3 slices per mouse)) and were analyzed by Tukey's multiple comparison test. *P < 0.05 compared with WT mice and ##P < 0.01 compared with the vehicle group.

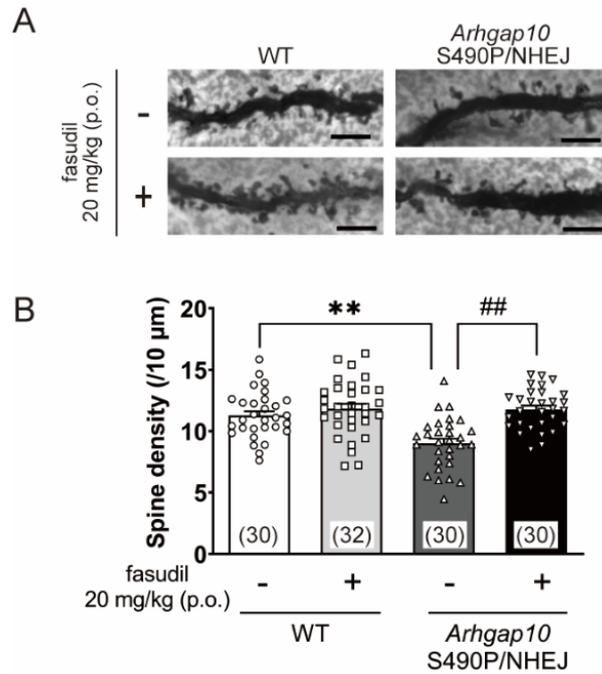


Fig. 3 The effect of fasudil on spine density in the mPFC of *Arhgap10* S490P/NHEJ mice. **A**. Representative images of dendritic spines (scale bar indicates 5 μm). **B**. Spine density of layer 2/3 pyramidal neurons in the mPFC of *Arhgap10* S490P/NHEJ mice or WT mice after fasudil (20 mg/kg, p.o.) treatment for 7 days. Data represent the mean \pm SEM ($n = 30\text{--}32$ dendrites in each of 5 mice per group (6–7 dendrites per mouse)) and were analyzed by Tukey’s multiple comparison test. ** $P < 0.01$ compared with WT mice and ## $P < 0.01$ compared with the vehicle group.

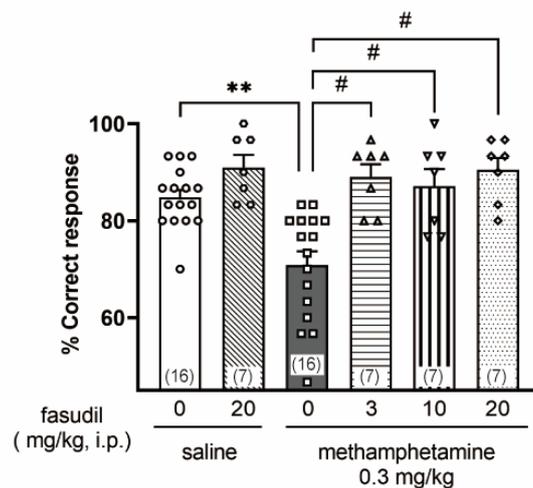


Fig. 4 The effect of fasudil on the methamphetamine-induced impairment of visual discrimination in *Arhgap10* S490P/NHEJ mice. Percentage of correct responses in the visual discrimination task. The animals were treated with methamphetamine (0.3 mg/kg, i.p.) and fasudil (20 mg/kg, i.p.) 30 min and 5 min before the task, respectively. Data represent the mean \pm SEM ($n = 7\text{--}16$ mice per group) and were analyzed by Tukey’s multiple comparison test. ** $P < 0.01$ compared with WT mice and # $P < 0.05$ compared with the vehicle group.

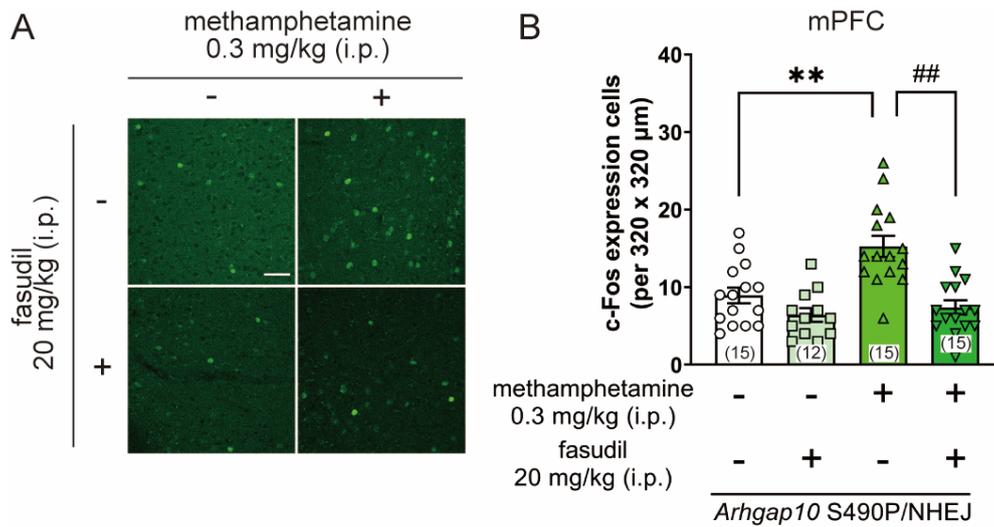


Fig. 5 The effect of fasudil on the number of c-Fos-positive cells in the mPFC of *Arhgap10* S490P/NHEJ mice A. Representative images of c-Fos immunoreactivity in the mPFC of *Arhgap10* S490P/NHEJ mice (scale bar indicates 50 μm). B. Number of c-Fos-positive cells in the mPFC of *Arhgap10* S490P/NHEJ mice. The animals were treated with methamphetamine (0.3 mg/kg, i.p.) and fasudil (20 mg/kg, i.p.) 150 min and 125 min before perfusion, respectively. Data represent the mean ± SEM (n = 12–15 slices in each of 4–5 mice per group (3 slices per mouse)). *P < 0.05, **P < 0.01 compared with the saline-saline-treated group and ##P < 0.01 compared with the methamphetamine-saline-treated group.