

GABA 仮説に基づいた統合失調症モデルラットの病態解析

研究代表者 柳川 右千夫¹⁾

研究分担者 那波 宏之²⁾, 藤原 和之¹⁾, 柿崎 利和¹⁾, 宮田 茂雄¹⁾, 姜 玮茹¹⁾

1) 群馬大学大学院医学系研究科遺伝発達行動学分野 2) 新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

研究要旨

GABA は代表的な抑制性神経伝達物質であり、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD; GAD65 と GAD67 の 2 型存在) により合成される。統合失調症死後脳における GAD67 発現低下や GAD67 ミスセンス変異をもつ統合失調症家系の存在から、GABA 神経伝達の障害が統合失調症の病因や病態に関連すると提唱されている (統合失調症の GABA 仮説)。我々等はこの仮説を検証するために GAD67 ノックアウトラットを作製・解析した結果、作業記憶の障害を見出し、このラットが統合失調症モデル動物であることを示唆した。本研究では、GAD67 ノックアウトラットの病態を明らかにする目的で脳の生化学的変化について検討した。GAD67 ノックアウトラットおよび野生型ラットの大脳皮質および小脳にける GABA 含量を測定した結果、いずれの領域でもノックアウトラットで野生型ラットより GABA 含量が低下していた。この脳内 GABA 含量の低下が作業記憶の障害に関与することが推測された。

A. 研究目的

統合失調症には、ドーパミン仮説、グルタミン酸仮説や神経発達障害仮説など種々の病態仮説がある。GABA 神経伝達の障害が統合失調症の病因や病態に関連するという仮説 (統合失調症の GABA 仮説) は、統合失調症患者の死後脳で GABA 含量の低下、GAD67 の発現低下が観察されること、GAD67 遺伝子のミスセンス変異をもつ統合失調症患者の家系の存在などから提唱されている。しかしながら、GABA や GAD67 が実際に統合失調症の病態に寄与するかどうかは不明である。そこで、我々は GAD67 ノックアウトラットが統合失調症モデル動物になるかどうか検討した。GAD67 ノックアウトラットを作製し、行動解析を行った結果、作業記憶の障害を見出した。この結果は、GAD67 ノックアウトラットが認知機能障害をもつ統合失調症モデル動物であることを示唆する。これらの結果に基づき、GAD67 ノックアウトラットの病態生理や分子病

態を明らかにすることで統合失調症の病因や病態の解明を目指している。本年度は、GAD67 ノックアウトラット脳における生化学的解析を行った。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究での動物実験は、群馬大学動物実験委員会で承認されている (承認番号 19-009)。GAD67 ノックアウトラットヘテロ接合体 (GAD67^{+/+}ラット) 同士を交配し、GAD67 ノックアウトラットホモ接合体 (GAD67^{-/-}ラット) と野生型ラット (GAD67^{+/+}ラット) を得た。各遺伝子型は離乳期に PCR を用いたゲノタイピングで同定した。20 日齢から 24 日齢の GAD67^{-/-}ラット、GAD67^{+/+}ラット、GAD67^{+/+}ラットから大脳皮質と小脳を取り出し、ホモゲナイズ後、遠心分離し、S1 画分を得た。この S1 画分について、オルトフタルアルデヒド試薬で誘導体化を行い、HPLC (HTEC-500, EICOM 社) で分離し、蛍光

検出により、GABA とグルタミン酸の濃度を測定した。一方、S1 画分のタンパク質濃度については BCA タンパク質アッセイキットを用いて測定した。

C. 研究結果

GAD67^{-/-}ラット、GAD67^{+/-}ラット、GAD67^{+/+}ラット各 7 匹から大脳皮質と小脳の GABA 含量とグルタミン酸含量を測定した。大脳皮質の GABA 含量は、GAD67^{+/+}ラット：14.4 ± 1.5 nmol/mg of protein、GAD67^{+/-}ラット：13.0 ± 0.9 nmol/mg of protein、GAD67^{-/-}ラット：7.4 ± 0.9 nmol/mg of protein であり、小脳の GABA 含量は、GAD67^{+/+}ラット：10.9 ± 0.8 nmol/mg of protein、GAD67^{+/-}ラット：9.1 ± 0.8 nmol/mg of protein、GAD67^{-/-}ラット：4.0 ± 0.4 nmol/mg of protein であった。大脳皮質、小脳ともに、GAD67^{-/-}ラットの GABA 含量が、GAD67^{+/-}ラットや GAD67^{+/+}ラットの GABA 含量よりも有意に低かった。しかし、GAD67^{+/-}ラットと GAD67^{+/+}ラットの間では、大脳皮質、小脳ともに GABA 含量に有意差はなかった。一方、グルタミン酸含量は、大脳皮質、小脳ともに、各ゲノタイプ間で同等であり、有意な違いはなかった。

D. 考察

大脳皮質と小脳の GABA 含量について、GAD67^{-/-}ラットは GAD67^{+/+}ラットのそれぞれ 51%、44% であり、GAD67^{+/+}ラットに比べ GAD67^{-/-}ラットで減少していることが判明した。さらに、小脳の方が大脳皮質よりも減少の程度が大きいことがわかった。GABA 合成酵素には GAD67 と GAD65 の 2 種類のアイソフォームがあり、小脳の方が大脳皮質よりも GABA 合成における貢献度で GAD67 の方が GAD65 より大きいことが推測された。那波教授と数回の打ち合わせの中で、神経伝達物質の含量が脳の領域ごとで違っている可能性を指摘していただいた。今後は、GAD67 欠損による GABA 含量の低下が脳のどの領域で顕著であるかを検討する。具体的には、複

数の脳領域（大脳皮質前頭前野、視覚野、聴覚野、海馬、扁桃体など）の GABA 含量とコントロールのグルタミン酸含量を HPLC で測定する。GABA 含量低下によるドーパミン含量の変化についても同様に測定し、GAD67^{-/-}ラットにおける行動障害に関わる分子病態についてさらに検討する。

E. 結論

統合失調症モデル動物の GAD67 ノックアウトラットについて生化学的解析を行い、大脳皮質、小脳ともに GABA 含量が野生型ラットよりも低下していることを明らかにした。脳内 GABA 含量の低下が統合失調症様の行動障害と関連することが示唆された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

Miyata S, Kumagaya R, Kakizaki T, Fujihara K, Wakamatsu K, Yanagawa Y.

Loss of glutamate decarboxylase 67 in somatostatin-expressing neurons leads to anxiety-like behavior and alteration in the Akt/GSK3β signaling. Front Behav Neurosci. 13: 131, 2019.

2. 学会発表

藤原和之、柿崎利和、宮田茂雄、山田一夫、一谷幸男、梶田裕貴、大城朝一、虫明元、渡辺雅彦、宮坂佳樹、真下知士、安田浩樹、柳川右千夫
GAD67 ノックアウトラットの認知機能障害
第 41 回日本生物学的精神医学会、2019 年 6 月 22~23 日、新潟

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。