

新潟大学脳研究所
「病理リソースを活用した脳神経病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

線条体投射神経細胞特異的 *Tsc1* 遺伝子ノックアウトマウスの遺伝子発現解析

研究代表者 宮崎 晴子¹⁾
研究分担者 宮下 哲典²⁾, 原 範和²⁾, 山中 智行³⁾, 柿田 明美⁴⁾, 池内 健²⁾

1) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科分子医化学分野 2) 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター/バイオリソース研究部門遺伝子機能解析学分野 3) 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター/脳病態解析分野 4) 新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学分野

研究要旨

注意欠損・多動性障害 (ADHD) は、不注意・多動・衝動性を行動的特徴とする発達障害である。その病態には、前頭前野に加え、報酬系回路である線条体の障害が関与しているとされる。我々はこれまでに、線条体投射ニューロンで mTORC1 キナーゼを活性化したマウスが多動を示すことを明らかにした。当該マウスは本来無髄神経である線条体投射ニューロンが有髄化することから、無髄神経の機能障害が多動の一因となっている可能性がある。本研究では、多動の惹起に関与する遺伝子群を同定する目的で、当該マウスの遺伝子発現解析を行った。発現変動遺伝子の Gene ontology 解析および qPCR の結果、GABA およびドーパミンの調節異常の可能性が示唆されたことから、これらの関連分子についてタンパク質レベルにおける発現変化を検討した。

A. 研究目的

線条体は、運動制御、行動選択、意思決定、報酬予測において重要な役割を果たす大脳基底核の神経回路の一部である。線条体は大脳皮質の広い領域から興奮性の入力を受け、淡蒼球と黒質網様部へと出力している。線条体のニューロン (medium spiny neuron: MSN) の 80~95% は、これらの神経核に投射する投射ニューロンで構成されており、その大部分が無髄神経である。

我々はこれまでに、中枢における無髄神経の機能的意義を明らかにするため、無髄神経を有髄化したマウスを作製した。当該マウスは、MSN 特異的に mTORC1 キナーゼを活性化したマウス (*Tsc1^{fl/fl};Gpr88-Cre*; *Tsc1*-cKO) で、網羅的行動解析において多動を示した。

本研究では、この『無髄神経障害マウス』の遺

伝子発現解析を行い、多動の惹起に関与する遺伝子群を同定することを目的とした。新潟大学脳研究所分担者の先生方の協力により、前年度までに RNA-seq 解析による発現変動遺伝子の同定は完了している。本年度は、多動に関与する可能性のある遺伝子の抽出、発現変化の検証、さらに免疫組織化学的解析および生化学的解析によるタンパク質レベルでの発現変化の検討を実施した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

6 週齢の *Tsc1*-cKO およびそのコントロール (*Tsc1^{fl/fl}*; WT: Ctrl) に対して RNA-seq 解析を行い、発現変動遺伝子を抽出した。これらの解析は、新潟大学脳研究所の分担者が実施した。多動に関与する遺伝子群の絞り込みには、Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) を

用いた。続いて qPCR を実施し、有意差が認められた発現変動遺伝子について、Tsc1-cKO および Ctrl (10~16 週齢、各群 N = 3~4) の脳サンプルを用いて、ウェスタンブロット解析および免疫組織化学的解析を行った。さらに、HPLC により、大脳皮質および線条体におけるドーパミン量を測定した。なお、本研究の実施は岡山大学動物実験委員会および組換え DNA 実験安全管理委員会の承認を得ている (承認番号: 21110, OKU-2022990, OKU-2022569)。

C. 研究結果

Metascape を用いた Gene ontology 解析の結果、行動に関与する発現変動遺伝子が多数同定された。続いて、これらの遺伝子のうち、大脳基底核の機能に重要であり、かつ多動に関与する可能性のある GABA およびドーパミン関連遺伝子に注目して qPCR を行った。GABA 関連では、*Gad1* および *Gad2* 遺伝子の発現が有意に増加していた (*Gad1*: FC = 1.412, $p = 0.0289$; *Gad2*: FC = 1.277, $p = 0.0080$)。ドーパミン関連では、*Drd2* および *Th* 遺伝子の発現が有意に増加していた (*Drd2*: FC = 1.515, $p = 0.0249$; *Th*: FC = 2.465, $p = 0.0007$)。

免疫組織化学的解析の結果、GAD67 (*Gad1* の翻訳産物) は Tsc1-cKO の線条体で有意に増加していた ($p = 0.0457$)。また、ウェスタンブロットでも増加傾向が認められた。一方、*Th* については、免疫染色およびウェスタンブロット解析のいずれにおいても、Ctrl と比較して有意な差は認められなかった。線条体のドーパミン量については、Tsc1-cKO は Ctrl と比べて有意に減少していた ($p = 0.0087$)。一方、大脳皮質においては、両群間で有意な差は認められなかった ($p = 0.9315$)。

D. 考察

Tsc1-cKO の線条体では、GAD67 およびドーパミンの発現量がコントロールと比較して有意に変化していることが明らかとなった。GAD67 は GABA 合成に関与する酵素であることから、GABA およびドーパミンのインバランスが多動の原因となっている可能性が考えられる。今回の結果において、Tsc1-cKO の線条体ではドーパミン量は減少していた。しかしながら、ドーパミントランスポーターノックアウトマウスが多動を示

すことから (Giros B et al., Nature, 1996)、一般的には細胞外ドーパミン濃度の上昇が多動の一因であると考えられている。今回得られた結果と一般的知見が矛盾する理由として、HPLC による測定が細胞外ではなく細胞内のドーパミン量を反映しているためであると考えられる。細胞外ドーパミン量の測定には、マイクロダイアリス法などの特殊な技術が必要であり、今後の検討課題である。

E. 結論

Tsc1-cKO の線条体では GABA およびドーパミン関連遺伝子の発現が変化することが明らかとなった。また、ドーパミンのインバランスが生じていることが示された。これらの結果から、神経伝達物質の調節異常が Tsc1-cKO の多動の原因となっている可能性が考えられる。無髄神経障害が多動の要因となるかどうかについては、今後さらに解析を進める予定である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 宮崎晴子, 角田宗一郎, 昌子浩孝, 宮下哲典, 原範和, 宮川剛, 貫名信行, 大橋俊孝. 線条体投射神経細胞特異的 *Tsc1* 遺伝子ノックアウトマウスの解析. 第 47 回 日本神経科学大会 2024 年 7 月 福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし