

—総説—

ジアシルグリセロールキナーゼ β (DGK β) 欠損マウスを用いた 高次脳機能における DGK β の機能解析

石坂光絵, 原英彰*

要約: ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロールをリン酸化し、ホスファチジン酸へと変換する酵素である。現在までに哺乳類において 10 種類のアイソフォームが同定されており、脳において強く発現していることが知られている。DGK β は I 型に分類される DGK アイソフォームであり、マウス脳においては、嗅球、皮質、海馬、線条体において特に強く発現している。しかしながら、その機能については不明な点が多いため、DGK β 欠損マウスを用いて表現型解析を行った。DGK β 欠損マウスでは、躁病様の表現型が認められ、これら表現型は既存の躁病治療薬で改善されることが明らかとなった。また、DGK β 欠損マウスは多動性に加えて注意欠損様の行動が認められ、注意欠陥多動性障害 (ADHD) 治療薬メチルフェニデートは注意欠損様の行動を改善することが示唆された。さらに、DGK β 欠損マウスに痙攣誘発薬を投与したところ、痙攣行動の増悪が認められ、その一因に海馬における抑制性神経細胞の減少が考えられる。以上の結果より、DGK β の欠損が躁病をはじめとする様々な疾患に関与している可能性およびこれら疾患の病態解明・治療薬探索に DGK β 欠損マウスが有用であると考えられる。

索引用語: ジアシルグリセロールキナーゼ β 、高次脳機能、欠損マウス

The Role of Diacylglycerol Kinase β (DGK β) in Higher Brain Function: Behavioral Analyses of DGK β Knockout Mice

Mitsue ISHISAKA, Hideaki HARA*

Abstract: Diacylglycerol kinase (DGK) is an enzyme that converts diacylglycerol to phosphatidic acid. To date, ten isoforms of DGKs have been identified in mammals, and it is reported that DGKs is strongly expressed in the brain. DGK β , a type of DGK, is expressed in the olfactory bulb, cortex, hippocampus, and striatum. The roles of DGK β are still unknown. We generated the DGK β knockout (KO) mice and investigated the phenotypes of DGK β KO mice. DGK β KO mice showed mania-like behaviors such as hyperactivity and reduced anxiety. These mania-like behaviors were ameliorated after commonly used medication for mania were administered. Furthermore, DGK β KO mice showed attention-deficit behavior, which was ameliorated by treatment with methylphenidate. Furthermore, DGK β KO mice showed increased seizure sensitivity due to the decreased numbers of depressor neurons in the hippocampus. These results suggest that deficit of DGK β is involved in various neurological diseases including mania, and DGK β KO mice would be useful to elucidate the pathogenesis and find the therapeutic targets in these disorders of the central nervous system.

Key phrases: diacylglycerol kinase β , higher brain function, knock-out mice

1. 緒言

細胞膜上に存在する Gq タンパク質共役型受容体が成長因子やホルモン、神経伝達物質などによる刺激を受けると、

ホスホリパーゼ C (PLC) の活性化が生じ、ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸からジアシルグリセロール (DG) が産生される¹⁾。DG は直接的にプロテインキナーゼ C (PKC) と結合し、PKC を活性化する²⁾。PKC の他にも、

岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西 1 丁目 25-4)

Molecular Pharmacology, Department of Biofunctional Evaluation, Gifu Pharmaceutical University (1-25-4 Daigaku-nishi, Gifu 501-1196, JAPAN)

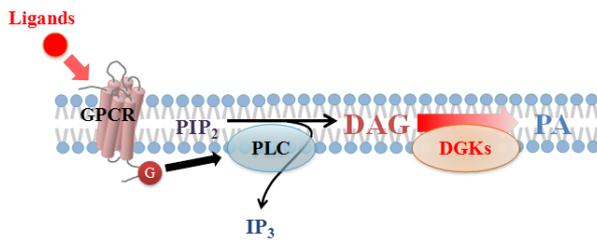


Fig. 1. Gq-protein-coupled receptor downstream signaling.

GPCR : G-protein-coupled receptor, G : G-protein, PLC : phospholipase C, PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, IP₃ : inositol 1,4,5-trisphosphate, DG : diacylglycerol, DGK : diacylglycerol kinase, PA : phosphatidic acid

DG は RAS グアニルヌクレオチド放出タンパク質など、様々なタンパク質の活性化にも関与している³⁾。そして DG は、ホスファチジン酸 (PA) へと変換され、PA もまた mammalian target of rapamycin (mTOR) や Raf-1 キナーゼなどの様々なタンパク質の活性化に関与している⁴⁾。ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はこの DG から PA への変換を行う酵素であり、細胞内の DG と PA のバランスを制御することで他の細胞内シグナルに大きな影響を与えていると考えられる (Fig. 1)⁵⁾。

現在までに、哺乳類においては、10 種類の DGK アイソフォームが同定されている⁶⁻¹⁵⁾。DGK の多くは、特に中枢神経系に多く発現していることが知られているが、その構造や発現分布、機能は多種多様である (Fig. 2)¹⁶⁻²²⁾。

中でも、I 型 DGK に分類される DGK β の発現は神経細胞の細胞表面および細胞骨格に局在しており、とくに皮質、線条体、海馬、嗅球において強く認められ、脳での発現部位はドパミン投射部位と一致している⁷⁾。また、線条体の中型有棘ニューロンにおいて、DGK β はドパミン D1、D2 受容体と共発現している²³⁾。これらの報告より、DGK β がドパミン神経伝達において何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

ドパミン神経伝達の機能不全は、パーキンソン病、統合失調症、双極性障害、注意欠損多動性障害 (attention deficit hyperactivity disorder: ADHD)、薬物乱用等に関与していることが知られている。双極性障害患者においては、C 末端が欠損した DGK β のスプライスバリエントが確認されている²⁴⁾。当研究室のこれまでの研究において、DGK β 欠損マウスは躁病様の行動を示し、それらは双極性障害治療薬であるリチウム塩により改善されることを明らかにした²⁵⁾。また、この DGK β 欠損マウスにおいては、スパイン形成並びに記憶に障害が認められる^{26, 27)}。これらの知見より、DGK β は精神疾患や脳高次機能において重要な役割を果たしていることが示唆されている。

筆者らは本研究において、DGK β 欠損マウスを用いて、

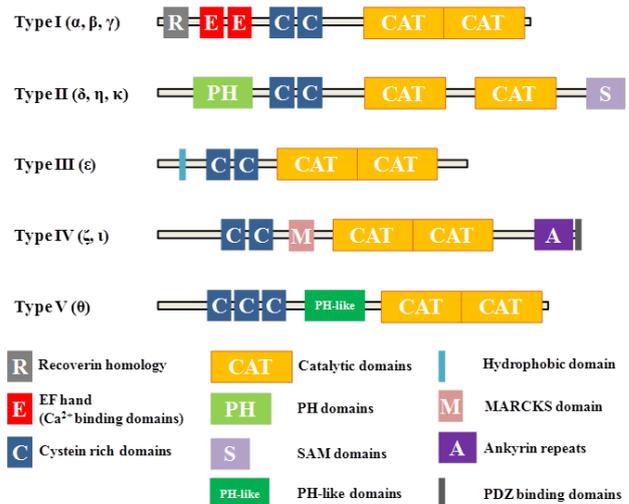


Fig. 2. The structures and classification of DGKs.

DGK isoforms are classified into five types.

PH: pleckstrin homology, MARCKS: myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate

The figure was cited from ref 22.

高次脳機能における DGK β の役割の解明を試みた。

2. DGK β 欠損マウスの躁病様表現型に対する 双極性障害治療薬の作用

2-1. 自発活動量に対する作用の検討²⁸⁾

マウスの自発活動量はオープンフィールド試験を用いて行った。縦 30×横 30×高さ 30 cm の試験装置を用い、薬物投与後速やかにマウスを試験装置内に移し、30 分間マウスの馴化を行った。その後 60 分間のマウスの行動をビデオカメラにより撮影し、Etho Vision XT (Noldus, Wageningen, Netherland) により解析を行った。

これまでの検討において、DGK β 欠損マウスは自発活動量の増加、不安レベルの低下が認められている²⁵⁾。本検討では、双極性障害の治療に用いられているバルプロ酸、オランザピンの作用を検討した。まず、これら治療薬の単回投与による効果を検討したが、有意な改善作用は認められなかった。

つぎに、DGK β 欠損マウスの自発活動量に及ぼすバルプロ酸およびオランザピンの慢性投与の影響を検討した。オープンフィールド試験は、薬物投与を開始してから 15 日目に行った。マウスの自発活動量に関して、有意な遺伝子要因 [F(1,103) = 31.47, p < 0.01] および薬物要因 [F(2,103) = 9.24, p < 0.01] の作用が認められた。また、DGK β 欠損マウスで認められた自発活動量の亢進は、バルプロ酸およびオランザピンの慢性投与により有意に改善された。オランザピンの慢性投与は、野生型マウスにおいても自発活動量を有意に減少させたが、バルプロ酸の慢性投与は野生型マウスの自発活動量に影響を及ぼさなかった (Fig.3)。

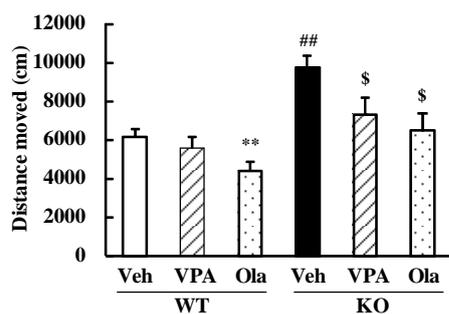


Fig. 3. The effect of chronic treatment of valproate (VPA) and olanzapine (Ola) on the locomotor activity of WT and DGKβ KO mice.

The distance moved during the 1-h duration of open field test. Values are expressed as the mean ± SEM (n = 10 - 28). ##p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice (Student's t-test). **p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice, \$ p < 0.05 vs. vehicle-treated KO mice (Dunnett's test). The figure was cited from ref 28.

これらの結果より、バルプロ酸およびオランザピンの慢性投与は、DGKβ 欠損マウスにおいて認められる自発活動量の亢進を有意に改善することが明らかとなった。

2-2. 不安レベルに対する作用の検討²⁸⁾

DGKβ 欠損マウスの不安レベルに及ぼすバルプロ酸およびオランザピンの慢性投与の影響に関して検討を行った。不安レベルの指標として、オープンフィールド試験での中央滞在時間および中央侵入回数を用いた。マウスの中央滞在時間に関して、有意な遺伝子要因 [F(1,103) = 4.82, p < 0.05] および薬物要因 [F(2,103) = 6.71, p < 0.01] の主作用が認められた。また、マウスの中央への侵入回数に関しても、有意な遺伝子要因 [F(1,103) = 15.01, p < 0.01] および薬物要因 [F(2,103) = 8.77, p < 0.01] の作用が認められた。DGKβ 欠損マウスにおいて認められる中央滞在時間の増加や中央への侵入回数の増大は、バルプロ酸およびオランザピンの慢性投与によって有意に減少した (Fig. 4)。野生型マウスにおいては、自発活動量の結果と同様に、オランザピンの慢性投与は中央滞在時間および中央への侵入回数を減少させたが、バルプロ酸にはそのような影響は認められなかった。

以上の結果より、DGKβ 欠損マウスにおいて認められる不安レベルの低下といった異常な行動は、バルプロ酸、オランザピンの慢性投与により有意に改善されることが明らかとなった。

3. DGKβ 欠損マウスの注意欠損多動性障害様行動に対する精神刺激薬の作用

3-1. DGKβ 欠損マウスの注意欠損様行動²⁹⁾

DGKβ 欠損マウスの注意欠損行動を検討するために、既報³⁰⁾に従い object-based attention test を行った。この試験に

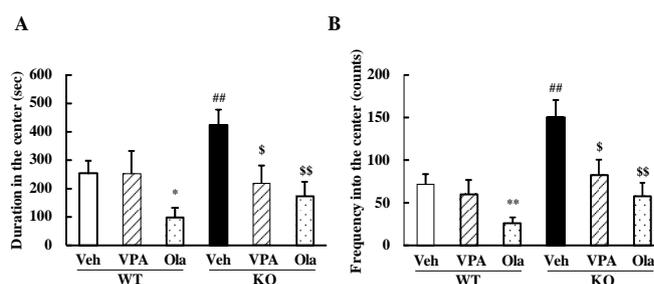


Fig. 4. The effect of chronic treatment of valproate (VPA) and olanzapine (Ola) on the anxiety levels of WT and DGKβ KO mice.

(A) Duration in the central zone, and (B) frequency in the central zone during the 1-h duration of open field test. Values are expressed as the mean ± SEM (n = 10 - 28). ##p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice (Student's t-test). *p < 0.05 vs. vehicle-treated WT mice, \$p < 0.05, \$\$p < 0.01 vs. vehicle-treated KO mice (Dunnett's test). The figure was cited from ref 28.

おいては、3分間または6分間の獲得試行の後に保持試行を行った (Fig. 5A, D)。これまでの報告において、3分間の獲得試行の後の保持試行における成績は注意力に依存するもの、6分間の獲得試行の後の保持試行における成績は海馬依存性の学習に依存するものであることが知られている³⁰⁾。3分間および6分間いずれの獲得試行においても、二種類の積み木に対するマウスの探索時間は、野生型マウスおよび DGKβ 欠損マウスの両方において明らかな変化は認められなかった (Fig. 5B, E)。このことから、新奇の積み木に対する嗜好性には DGKβ の遺伝子差がないことが確認された。つぎに、3分間獲得試行の後の保持試行においては、DGKβ 欠損マウスにおいては、新奇の積み木に対する探索の割合は野生型マウスのものに比べ有意に減少していた (Fig. 5C)。この結果より、DGKβ 欠損マウスにおいては、野生型マウスに比べ、注意力の低下が示唆された。一方、6分間の獲得試行を行った後の保持試行における野生型マウスおよび DGKβ 欠損マウスの新奇の積み木に対する認識率においては、有意な変化は認められなかった (Fig. 5F)。このことから、物体の認識における海馬依存学習能力においては、野生型マウスおよび DGKβ 欠損マウス間に差がないことが示唆された。

つぎに、DGKβ 欠損マウスの注意力の低下に対するメチルフェニデートの作用を検討した。野生型マウスにおいては、保持試行においてメチルフェニデート処置により新奇の積み木の認識率の有意な低下が認められ、このことから注意力の低下が惹起されたことが明らかとなった。一方、DGKβ 欠損マウスにおいては、メチルフェニデートの投与によって新奇の積み木の認識率の有意な増加が認められた (Fig. 6)。この結果より、DGKβ 欠損マウスにおいて認め

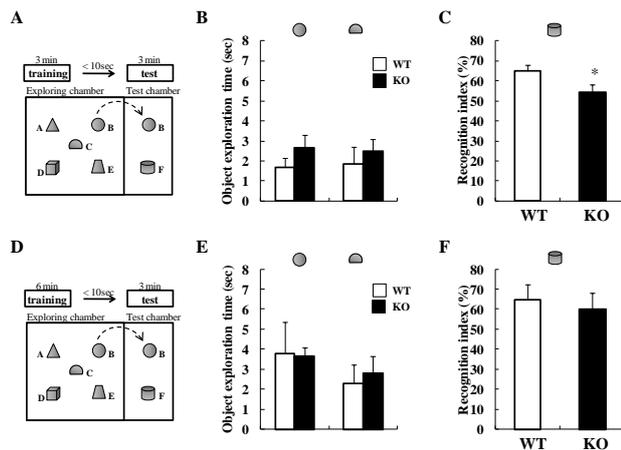


Fig. 5. DGK β KO mice showed an attention-deficit behavior in object based attention test.

(A) Mice were exposed to five object for 3 min (training session), then, after an interval of 10 sec, they were exposed to two objects that include a familiar and a novel objects for 3 min (retention session). (B) Object exploration time during the 3-min training session. (C) The novel-object discriminating abilities of mice were expressed as a recognition index. Values are expressed as the mean \pm SEM. (KO: $n = 8$, WT: $n = 9$) $*p < 0.05$ vs. WT mice (t-test). (D) Mice were exposed to five objects for 6 min (training session), then, after an interval of 10 sec, they were exposed to two objects that include a familiar and a novel objects for 3 min (retention session). (E) Object exploration time during the 6-min training session. (F) The novel object discriminating abilities of mice were expressed as a recognition index. Values are expressed as the mean \pm SEM. (KO: $n = 6$, WT: $n = 7$). The figure was cited from ref 29.

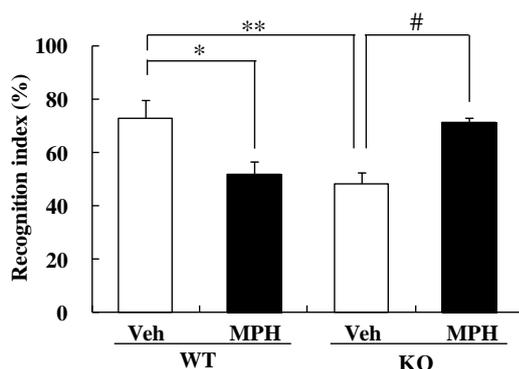


Fig. 6. The effect of methylphenidate (MPH) on the attention-deficit behavior of DGK β KO mice in the object-based attention test.

The effect of MPH on the recognition index in retention phase after 3-min training phase. Values are expressed as the mean \pm SEM. ($n = 6$ or 7) $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ vs. vehicle-treated WT mice, # $p < 0.05$ vs. vehicle-treated KO mice (Tukey's test). The figure was cited from ref 29.

られた注意欠損の表現型はメチルフェニデートの投与により改善することが明らかとなった。

3-2. メチルフェニデート投与後の野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの行動変化²⁹⁾

メチルフェニデートは ADHD の治療薬として使用されているが、一般的に野生型マウスにおいては細胞外のドパミン量を増加させ、結果的に自発活動量を増加させる³¹⁾。まず初めに、種々濃度のメチルフェニデートを野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスに投与し、その自発活動量の変化を 90 分間観察した。これまでの検討と同様、溶媒投与を行った DGK β 欠損マウスの自発活動量は、野生型マウスに比べ有意に増加した (Fig. 7A)。野生型マウスにおいて、メチルフェニデート投与を行うと自発活動量は増加し、3、30 mg/kg メチルフェニデート投与群において有意な自発活動量の増加が認められた (i.e., MPH 0.3 mg/kg; $p = 0.318$, MPH 3 mg/kg; $p = 0.005$, and MPH 30 mg/kg; $p = 0.003$ vs. vehicle-treated WT mice) (Fig. 7A)。しかしながら、DGK β 欠損マウスにおいてメチルフェニデート投与による自発活動量の変化は認められなかった (MPH 0.3 mg/kg; $p = 1.000$, MPH 3 mg/kg; $p = 0.958$, and MPH 30 mg/kg; $p = 1.000$ vs. vehicle-treated KO mice) (Fig. 7A)。また、メチルフェニデート 30 mg/kg 投与後の自発活動量の経時的な変化を検討した。野生型マウスにおいて、メチルフェニデート投与後に急激な自発活動量の増加が認められ、その後低下した後、再度溶媒投与群に比べ有意な増加が継続的に認められた (Fig. 7B)。野生型マウスに比べ、DGK β 欠損マウスにおいては、メチルフェニデートはわずかに自発活動量を増加させた。30~35 分の時点における自発活動量の変化においては、有意な遺伝的要因 [$F(1, 24) = 9.01$, $p < 0.01$]、薬物要因 [$F(1, 24) = 31.69$, $p < 0.001$]が認められ、また遺伝子・薬物の作用において交互作用が認められた [$F(1, 24) = 14.32$, $p < 0.001$] (Fig. 7C)。

3-3. メチルフェニデート投与後のタンパク質リン酸化レベル²⁹⁾

精神刺激薬投与後の活動量変化においては、線条体における ERK1/2 のリン酸化の関連が示唆されている³²⁾。このことから、メチルフェニデート投与後の線条体におけるリン酸化 ERK1/2 の発現量についての検討を行った。通常条件下において、野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの線条体でのリン酸化 ERK1/2 の発現量に変化は認められなかった。メチルフェニデート投与 5 分後において、野生型マウスではリン酸化 ERK1/2 の発現量が有意に増加した。一方、DGK β 欠損マウスではそのような変化は認められなかった (Fig. 8A, B)。また、線条体以外の部位においても、メチルフェニデートによりリン酸化 ERK1/2 の発現量に変

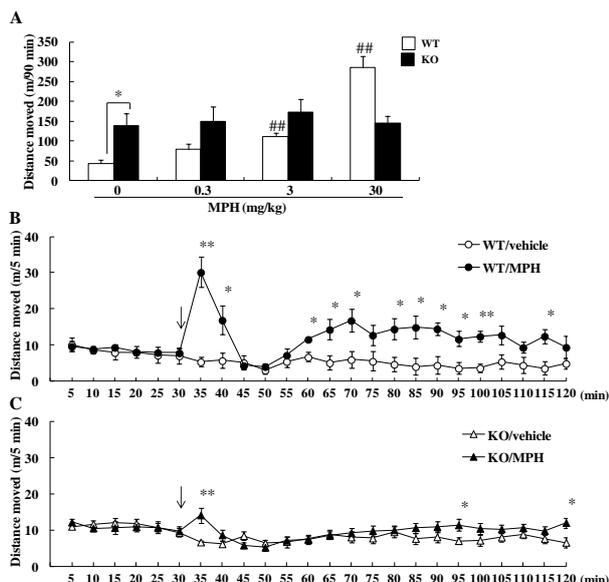


Fig. 7. DGKβ KO mice showed an abnormal response to methylphenidate (MPH).

(A) The locomotor activity after various doses of MPH. Each mouse was placed in a locomotor activity monitor for an initial period of 30 min and then injected with vehicle or MPH (0.3, 3, 30 mg/kg, i.p.). Horizontal activities of 90 min after drug treatment were recorded. Values are expressed as the mean ± SEM. (n = 5) *p < 0.05 vs. vehicle-treated WT mice (t-test), #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice (Dunnett's test). Each mouse was placed in a locomotor activity monitor for an initial period of 30 min (shown as arrow) and then injected with vehicle or MPH (30 mg/kg). Horizontal activity was recorded every 5 min for a 2-h period. Locomotor activity throughout the 2-h period of WT (B) and DGKβ KO (C) mice. Values are expressed as the mean ± SEM. (n = 4 to 10) *p < 0.05, **p < 0.01 vs. vehicle-treated group (t-test). The figure was cited from ref 29.

化が生じるかを検討した。海馬および海馬および前頭前皮質において、薬物処置 5 分後および 40 分後において検討したが、いずれの部位・時間においても、リン酸化 ERK1/2 の発現量に変化は認められなかった。この結果より、メチルフェニデートは線条体に特異的に作用していることが示唆された。この線条体におけるリン酸化 ERK1/2 発現量の変化の違いが、メチルフェニデート投与後の DGKβ 欠損マウス自発活動量の変化に関与している可能性がある。

4. DGKβ 欠損マウスの痙攣感受性に関する検討

4-1. ペンチレンテトラゾール誘発痙攣モデルにおける評価³³⁾

薬物誘発痙攣モデルにおいて、DGKβ 欠損マウスがどのような反応を示すかを検討するために、まず初めにペンチレンテトラゾールを用いてマウスにおいて痙攣を誘発した。ペンチレンテトラゾールは GABAA 受容体のアンタゴ

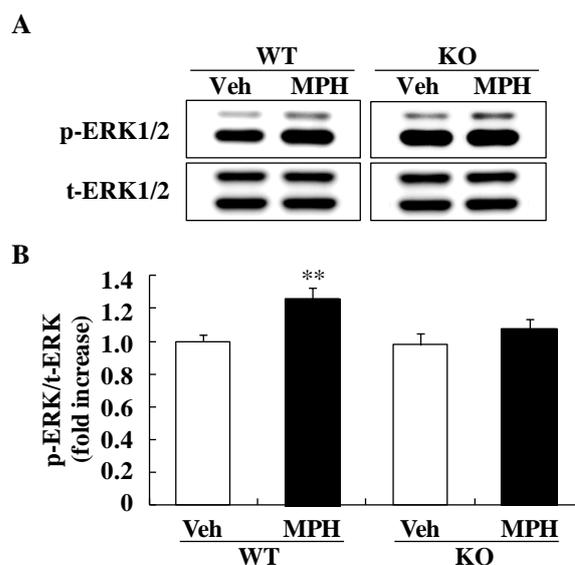


Fig. 8. Western blot analysis of the phosphorylation levels of ERK1/2 in the striatum following methylphenidate (MPH) treatment.

Phosphorylated and total ERK1/2 levels in the striatum were measured by Western blot analysis. (A) Representative immunoblots showing the expression levels of phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) and total ERK (t-ERK) in the striatum of WT and DGKβ KO mice 5 min after drug treatment. (B) Phosphorylation levels of ERK1/2 are quantified relative to the t-ERK1/2 levels. Values are expressed as the mean ± SEM. (n = 5 to 8) **p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice group (t-test). The figure was cited from ref 29.

ニストであり、強直性間代性痙攣をマウスにおいて引き起こす。60 mg/kg のペンチレンテトラゾールを投与後、すべてのマウスにおいて間代性痙攣 (スコア 4) またはそれ以上の重篤な痙攣が認められた (Table 1)。DGKβ 欠損マウスの約半数において硬直性痙攣が認められたのに対し (スコア 5; 5/9)、野生型マウスにおいてはほとんどがスコア 4 の痙攣にとどまった (10 匹中 1 匹のマウスにおいてのみ、スコア 5 の痙攣が生じた)。80 mg/kg のペンチレンテトラゾール投与後では、野生型マウスではスコア 4 以上の痙攣が認められたマウスは 5 匹中 1 匹であったのに対し、DGKβ 欠損マウスでは 5 匹中 4 匹のマウスにおいてスコア 4 以上の痙攣が認められた。

Table. 1. Occurrence of various seizure after pentylenetetrazol (PTZ) treatment in WT and DGKβ KO mice.

PTZ (mg/kg, i.p.)	60		80	
	WT	KO	WT	KO
Genotypes	WT	KO	WT	KO
n	10	9	5	5
Score 4 (clonic convulsion)	10 (100%)	9 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Score 5 (tonic convulsion)	1 (10%)	5 (56%)	1 (20%)	4 (80%)
Score 6 (death)	0	1 (11%)	1 (20%)	4 (80%)

PTZ: pentylenetetrazol, WT: wild-type mice, KO: knock-out mice

経時的な痙攣スコアの変化の検討を行ったところ、野生型マウスにおいては痙攣スコアは投与 5 分後に最大となり、その後徐々に低下した (Fig. 9A)。一方、DGK β 欠損マウスの痙攣スコアは高いままであった。30 分間の観察中において、痙攣スコアの合計値は野生型マウスに比べ、DGK β 欠損マウスでは有意に大きかった (Fig. 9B)。しかしながら、スコア 2、3、4 の痙攣に達するまでの潜時においては野生型マウスと DGK β 欠損マウスにおいて有意差は認められなかった (Fig. 9C)。30 分間の観察におけるスコア 2、3、4 の痙攣の発生回数を検討したところ、スコア 2 および 4 の痙攣の発生回数が DGK β 欠損マウスにおいて有意に増大していた (Fig. 9D)。

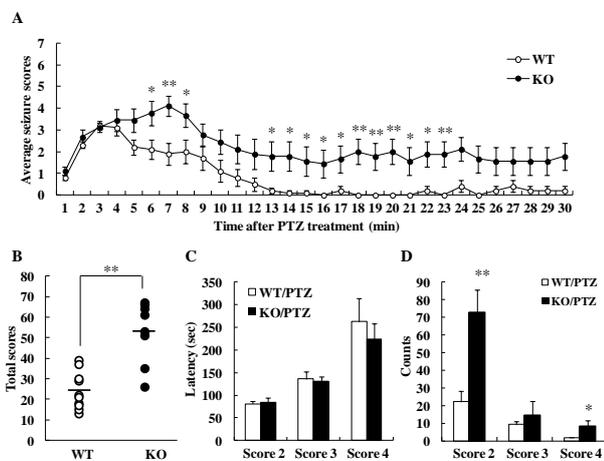


Fig. 9. Behavioral changes in DGK β KO mice after pentylenetetrazol (PTZ) treatment.

(A) Mean seizure scores per one minute, (B) total seizure scores, (C) latency to reach a given seizure score, and (D) number of occurrences of a given seizure score, in WT and DGK β KO mice after PTZ (60 mg/kg, i.p.) treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM. (WT, n = 10; KO, n = 9) *p < 0.05; **p < 0.01 vs. WT mice (Student's t-test). The figure was cited from ref 33.

4-2. カイニン酸誘発痙攣モデルにおける評価³³⁾

つぎに、DGK β 欠損マウスが他の薬剤誘発痙攣モデルにおいても感受性の増大を示すか否かについて検討するため、カイニン酸を用いて評価した。カイニン酸はカイニン酸型グルタミン酸受容体のアゴニストであり、興奮毒性による神経細胞死の研究および痙攣の研究において広く用いられている。

野生型マウスにおいては、痙攣のレベルは徐々に増大し、薬物投与 40 分後にスコア 3 の痙攣に達した (Fig. 10A)。DGK β 欠損マウスにおいても、行動の経時的な変化においては同じようなパターンが認められたが、どのタイムポイントにおいても野生型マウスに比べて痙攣スコアは高値を示した (Fig. 10A)。60 分間における痙攣スコアの合計値は、DGK β 欠損マウスにおいて有意な増加が認められた

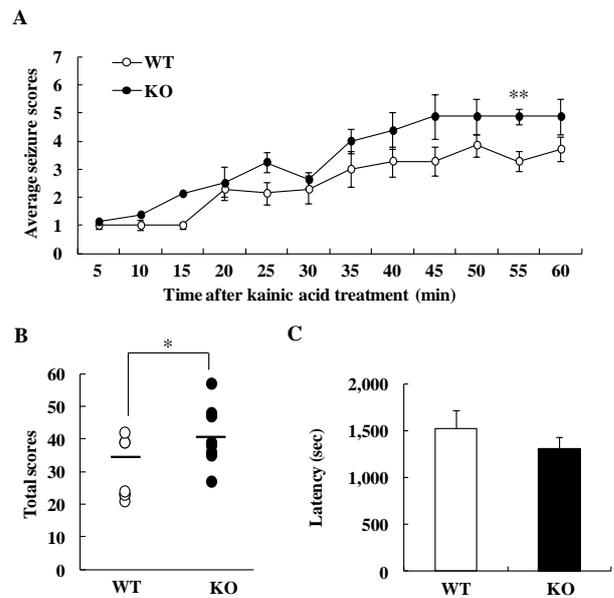


Fig. 10. Behavioral changes in DGK β knockout (KO) mice after kainic acid treatment.

(A) Mean seizure scores per five minute, (B) total seizure scores, and (C) latency to reach a given seizure score, in WT and DGK β KO mice after kainic acid (30 mg/kg, i.p.) treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM (WT, n = 7; KO, n = 8) *p < 0.05; **p < 0.01 vs. WT mice (Student's t-test). The figure was cited from ref 33.

(Fig. 10B)。しかしながら、スコア 3 の痙攣に達するまでの潜時において、両群間において明らかな差は認められなかった (Fig. 10C)。

4-3. 海馬における抑制性神経細胞数の検討³³⁾

介在性ニューロンは神経細胞の興奮の制御において重要な役割を示しており、抑制性介在ニューロンと興奮性ニューロンのバランスの乱れは諸種病態に関与している³⁴⁻³⁶⁾。実際、抑制性介在ニューロン数の減少は痙攣感受性の増大と密接に関連している³⁷⁾。

DGK β 欠損マウスの痙攣感受性の増大に、この抑制性介在ニューロン数の減少が関与している可能性が考えられるため、海馬におけるパルプアルブミンにより染色される抑制性介在ニューロンの数を検討した。DGK β 欠損マウスの海馬 CA3 領域において、パルプアルブミン陽性の抑制性介在ニューロンの数が野生型マウスに比べて減少していた (Fig. 11A, B)。

5. 考察

高次脳機能における DGK β の役割を明らかにするため、本総説では DGK β 欠損マウスの行動薬理学的解析の結果をまとめた。

DGK β 欠損マウスにおいて認められる過活動、不安レベ

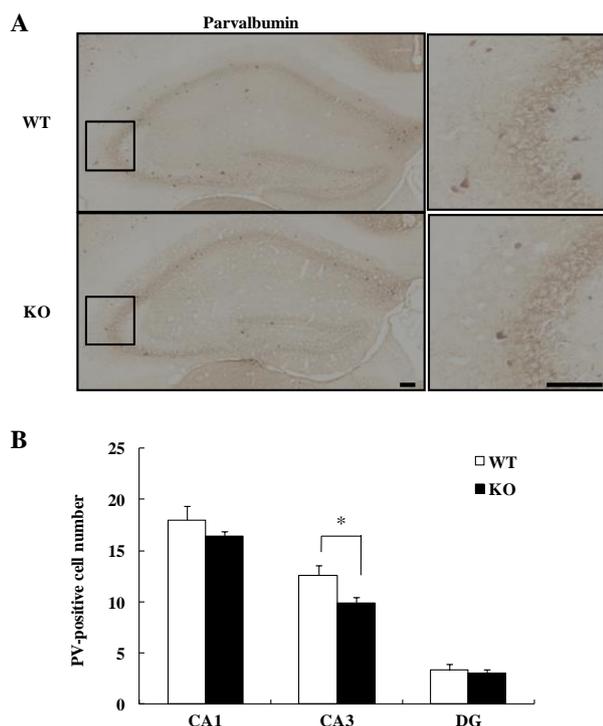


Fig. 11. Parvalbumin-positive interneurons in hippocampal subregions.

(A) Immunostaining for parvalbumin in the hippocampus of age-matched WT and DGKβ KO mice. Right panels show enlargements of the hippocampal CA3 region (shown by the box in the corresponding left panel). Scale bars = 100 μm. (B) Parvalbumin-positive cell numbers in the hippocampal subregions in WT and DGKβ KO mice. Values are expressed as the mean ± SEM. (WT, n = 6; KO, n = 5) *p < 0.05 vs. WT mice (Student's t-test). The figure was cited from ref 33.

ルの低下および認知機能の低下等の異常行動は、臨床的に躁病に対して有効であると知られているバルプロ酸やオランザピンによって改善されることが明らかとなった²⁸⁾。これらの結果は、DGKβ 欠損マウスが躁病モデルマウスとして有用である可能性を示唆するものである。

現在までに、DGK の双極性障害への関与に関してはいくつかの報告がなされている。先に述べたように、DGKβ の COOH 末端のスプライスバリエントが双極性障害患者において見出されており²⁴⁾、筆者らは、DGKβ 欠損マウスは過活動を主徴とする行動異常を示すことを明らかにしている²⁵⁾。また、他のアイソフォームについても、双極性障害への関与が示唆されている。Type II に分類される DGKη についてもいくつかの関連報告がなされており、双極性障害患者脳内において、DGKη mRNA 発現量が増大していること、DGKη の SNPs が存在することが、最近明らかにされている^{22, 38-40)}。これらの報告は、DGKs 自身またはその下流シグナルが正常な脳機能の維持に関与している可能性を示唆するものである。実際、DGKs シグナルの下流に存在する Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)、ホス

ホイノシトール経路、PKC 等は双極性障害において影響を受けている分子であり、治療ターゲットとしての可能性が示唆されている⁴¹⁾。以上、DGKβ をはじめとした DGKs の中枢神経系における役割を解明することで、双極性障害の病態解明につながる可能性が考えられる。これまでの検討において、筆者らは DGKβ 欠損マウスにおいて認められる異常行動が双極性障害に有効とされているリチウム塩の投与により改善されることを明らかにした²⁵⁾。加えて、定型抗精神病薬であるハロペリドールの効果についても検討を行い、ハロペリドールに関しては DGKβ 欠損マウスの過活動や不安レベルには有意な作用を示さないことを明らかにした²⁵⁾。本研究においては、バルプロ酸およびオランザピンの二種類の薬物を用い、それらの DGKβ 欠損マウスの異常行動に対する作用を検討した²⁸⁾。バルプロ酸はリチウム塩と同様に双極性障害の躁状態に対して広く用いられており、数々の躁病モデル動物においてもその有効性が示されている⁴²⁻⁴⁴⁾。その作用機序に関しては不明な点が多いが、神経伝達物質である γ-アミノ酪酸 (γ-aminobutyric acid: GABA) の合成促進作用が抗躁作用の一部であると考えられている。オランザピンは非定型抗精神病薬の一つであり、過活動を示すマウスにおいてその自発活動量に対して効果を示すことが明らかとなっている⁴⁵⁾。オランザピンは、ドパミンやアセチルコリンの放出促進作用を介して抗躁作用を示すことが示唆されている⁴⁶⁾。

オープンフィールド試験における自発活動量の測定は、統合失調症、薬物中毒、自閉症、躁病等多くの疾患モデル動物を用いた検討で使用されている。これまでの検討において、DGKβ 欠損マウスの過活動がリチウム塩の処置によって改善されることから、この DGKβ 欠損マウスの過活動を躁病様の行動であると仮説を立て、研究を行った。実際、バルプロ酸やオランザピンの慢性投与によって過活動をはじめとする異常行動は改善されたが、これら薬物の単回投与においてはその作用は認められなかった²⁸⁾。薬物の慢性投与は、実際の臨床におけるヒトでの使用を考えた際には現実的なものであり、双極性障害等の精神疾患患者においては治療薬を慢性投与して初めてその効果が認められることが多い。動物を用いた研究においても、躁病モデルマウスとして広く使用されているドパミントランスポーター (dopamine transporter: DAT) 欠損マウスの過活動もバルプロ酸の慢性投与によって改善されることが明らかとなっている⁴⁴⁾。この点からも、本検討において薬物の単回投与が DGKβ 欠損マウスの異常行動に対して効果を示さなかったことが臨床で認められる効果とも関連していると考えられる。以上の事からも、DGKβ 欠損マウスは躁病のモデルマウスとして有用性を示唆するものである。

また、DGKβ 欠損マウスが ADHD モデルとして有用であるか否かを明らかにすることを目的としても検討を行

った²⁹⁾。ADHD は注意の欠陥、衝動性、過活動に特徴付けられる疾患である。今回の結果から、DGK β 欠損マウスは、注意欠損行動と過活動が認められた。注意欠損行動に関しては、ADHD の治療薬として用いられているメチルフェニデートによって改善された²⁹⁾。一方、メチルフェニデート投与後の自発活動量の変化に関しては、実際の ADHD 患者やモデル動物において認められる反応とは自発活動量が抑制されなかった点で同様のものではなかった。しかしながら、メチルフェニデートの慢性的な処置や、他の ADHD 治療薬の投与によって DGK β 欠損マウスの過活動が改善される可能性は十分に考えられる。現時点では、ADHD 患者における DGK β 遺伝子の異常等の報告はなされていないが、今後詳細な検討を行うことで ADHD 病態における DGK β の関与が明らかになると考えられる。

DGK は DG を PA に変換する酵素であり、Gq タンパク共役型受容体の下流に存在する⁵⁾。ドパミン D2 受容体作動薬は線条体切片において、Gq タンパク質と PLC β の結合および細胞内カルシウムストアからのカルシウム 54 の動員を介して ERK1/2 のリン酸化を生じる⁴⁷⁾。ドパミン D1 受容体と D2 受容体は異なる細胞に発現していると考えられていたが、近年の研究から、ともに同じ細胞において発現していることが示唆されている⁴⁸⁾。このことは、ドパミン D1 および D2 受容体の両方が ERK1/2 のリン酸化を制御し、この ERK1/2 リン酸化制御においても DGK β が関与していることを示唆している。

これまでの研究から、DGK β の脳内における局在が徐々に明らかとなってきている。DGK β の発現は神経細胞に局在しており、先に述べたようにその発現は嗅球、海馬、大脳皮質、線条体に認められている^{7, 27)}。海馬においては、CA1、CA2、CA3 の上昇層および放線状層において発現しており、投射ニューロンだけでなく、介在ニューロンにおいても発現していることが明らかとなっている²⁶⁾。

DGK β 欠損マウスは薬物誘発性痙攣に対して野生型マウスに対してより重篤な症状を示した³³⁾。そのため、痙攣時のマウス海馬における DGK β の局在と発現量に関して検討した。過去の検討において、痙攣への関与が示唆されている DGK ϵ は痙攣時においては局在や発現量に変化は認められないが、DGK ϵ 欠損マウスではアラキドン酸代謝の異常により痙攣症状が緩和されることが報告されている⁴⁹⁾。一方、DGK ζ は痙攣発作時には核から細胞質へ移行すること、また、DGK ζ 欠損マウスは薬物誘発性痙攣に対して感受性の増大を示すことが明らかとなっている⁵⁰⁾。本研究においては、ペンチレンテトラゾール投与後においても DGK β の発現様式には変化は認められず、その発現は細胞表面にとどまっていたことから、DGK β はマウスにおいて痙攣発作時には応答しないタンパク質である可能性が示唆された³³⁾。海馬における介在ニューロンは GABA を発現する非主要ニューロンであり、海馬各部位における

様々な種類の GABA 作動性介在ニューロンから主要ニューロンへの抑制性の入力神経ネットワークの維持に必要不可欠である⁵¹⁾。カルシウム結合性タンパク質であるパルプアルブミン陽性の介在ニューロンは海馬の神経ネットワークオシレーションの同期を助ける役割を果たしている⁵²⁾。さらに、パルプアルブミン陽性神経細胞の減少は、痙攣感受性の増大を引き起こすことが知られている^{37, 53-55)}。DGK β 欠損マウスの海馬 CA3 領域において、パルプアルブミン陽性細胞数の減少が認められ³³⁾、この減少が DGK β 欠損マウスにおける痙攣感受性の増大の要因であると考えられる。興味深いことに、双極性障害患者の海馬においては、パルプアルブミン陽性介在ニューロン数の減少が報告されている^{35, 56, 57)}。これまでの研究において、筆者らは DGK β 欠損マウスが躁病様の行動異常を示すこと明らかにした²⁵⁾。また、双極性障害患者においては DGK β の COOH 末端のスプライズバリエントが報告されている²⁴⁾。ラットの脳においては、DGK β タンパク質の発現量は生後 7 日目にわずかに確認され、生後 14 日、28 日の間に急速に増大する⁵⁸⁾。DGK β タンパク質の発現量増大の時期と同時期に、パルプアルブミン mRNA は皮質および海馬において認められる⁵⁹⁾。これらの知見から、DGK β がパルプアルブミン陽性介在ニューロンの発達に関与している可能性が考えられる。

6. 結論

本研究において、DGK β 欠損マウスにおいて認められる躁病様の表現型はリチウム塩だけでなく、バルプロ酸およびオランザピン等の他の既存治療薬によって改善されることが明らかとなり、これはモデル動物の予測妥当性を満たす結果であり、DGK β 欠損マウスの双極性障害躁状態のモデル動物としての有用性をより高めるものである。また、DGK β 欠損マウスは注意欠損様の行動を示し、メチルフェニデートにより改善されることから、ADHD モデル動物になりうる可能性も考えられる。また、DGK β 欠損マウスの線条体におけるドパミンシステムに異常は認められないものの、メチルフェニデート投与後の行動変化やリン酸化 ERK1/2 発現量の変化においては特徴的な変化が認められ、シグナル伝達において DGK β が ADHD 病態に何らかの重要な役割を示す可能性が考えられる。さらに、DGK β 欠損マウスでは痙攣感受性の増大が認められ、海馬 CA3 領域における抑制性介在ニューロンの減少が認められたことから、神経発達における DGK β の関与も示唆された。以上、DGK β は高次脳機能の制御機構において重要な役割を果たしており、DGK β 欠損マウスは双極性障害をはじめとする精神疾患のモデル動物として有用であると考えられる。また、DGK β 欠損マウスを用いたさらなる病態の解明や DGK β 関連シグナルの制御をターゲットとした精神疾患

に対する新規治療薬の開発が期待できる。

7. 謝辞

本研究に際して終始御懇切なる御指導ならびに御助言を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士および講師鶴間一寛博士に深謝いたします。また、諸種の御協力を頂きました薬効解析学研究室研究室諸氏に心から感謝致します。

8. 引用文献

- 1) Rhee, S.G. and Y.S. Bae, *J Biol Chem*, **272**, 15045-8 (1997)
- 2) Nishizuka, Y., *Faseb J*, **9**, 484-96 (1995)
- 3) Merida, I., A. Avila-Flores, and E. Merino, *Biochem J*, **409**, 1-18 (2008)
- 4) Ghosh, S., et al., *J Biol Chem*, **271**, 8472-80 (1996)
- 5) Kanoh, H., K. Yamada, and F. Sakane, *Trends Biochem Sci*, **15**, 47-50 (1990)
- 6) Ding, L., et al., *J Biol Chem*, **273**, 32746-52 (1998)
- 7) Goto, K. and H. Kondo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7598-602 (1993)
- 8) Goto, K. and H. Kondo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11196-201 (1996)
- 9) Goto, K., et al., *Brain Res Mol Brain Res*, **16**, 75-87 (1992)
- 10) Houssa, B., et al., *J Biol Chem*, **272**, 10422-8 (1997)
- 11) Imai, S., et al., *J Biol Chem*, **280**, 39870-81 (2005)
- 12) Kai, M., et al., *J Biol Chem*, **269**, 18492-8 (1994)
- 13) Klauck, T.M., et al., *J Biol Chem*, **271**, 19781-8 (1996)
- 14) Sakane, F., et al., *J Biol Chem*, **271**, 8394-401 (1996)
- 15) Tang, W., et al., *J Biol Chem*, **271**, 10237-41 (1996)
- 16) Hozumi, Y., et al., *J Histochem Cytochem*, **61**, 462-76 (2013)
- 17) Kobayashi, N., et al., *Eur J Cell Biol*, **86**, 433-44 (2007)
- 18) Raben, D.M. and B. Tu-Sekine, *Front Biosci*, **13**, 590-7 (2008)
- 19) Sasaki, H., et al., *Cell Tissue Res*, **326**, 35-42 (2006)
- 20) Sato, S., et al., *Biomed Res*, **32**, 329-36 (2011)
- 21) Tu-Sekine, B. and D.M. Raben, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **46**, 353-64 (2011)
- 22) Ishisaka, M. and H. Hara, *J Pharmacol Sci*, **124**, 336-43 (2014)
- 23) Hozumi, Y., et al., *Eur J Neurosci*, **28**, 2409-22 (2008)
- 24) Caricasole, A., et al., *J Biol Chem*, **277**, 4790-6 (2002)
- 25) Kakefuda, K., et al., *PLoS One*, **5**, e13447 (2010)
- 26) Hozumi, Y., et al., *BMC Neurosci*, **10**, 99 (2009)
- 27) Shirai, Y., et al., *PLoS One*, **5**, e11602 (2010)
- 28) Ishisaka, M., et al., *Pharmacol. Rep.*, **67**, 275-280 (2015)
- 29) Ishisaka, M., et al., *PLoS ONE*, **7**, e37058 (2012)
- 30) Alkam, T., et al., *Behav Brain Res*, **220**, 185-93 (2011)
- 31) Carlsson, M. and A. Carlsson, *J Neural Transm*, **75**, 221-6 (1989)
- 32) Beaulieu, J.M., et al., *J Biol Chem*, **281**, 32072-80 (2006)
- 33) Ishisaka, M., et al., *Neurosci. & Med*, **4**, 117-122 (2013)
- 34) Marco, P., et al., *Brain Res Bull*, **44**, 47-66 (1997)
- 35) Wang, A.Y., et al., *Acta Neuropathol*, **122**, 615-26 (2011)
- 36) Zhu, Z.Q., et al., *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 988-98 (1997)
- 37) Gant, J.C., et al., *Epilepsia*, **50**, 629-45 (2009)
- 38) Baum, A.E., et al., *Mol Psychiatry*, **13**, 197-207 (2008)
- 39) Moya, P.R., et al., *Int J Neuropsychopharmacol*, **13**, 1127-8 (2010)
- 40) Weber, H., et al., *Neuropsychopharmacology*, **36**, 2076-85 (2011)
- 41) Hoertel, N., P. de Maricourt, and P. Gorwood, *Expert Opin Drug Discov*, **8**, 907-18 (2013)
- 42) Rezin, G.T., et al., *Mol Neurobiol*, **49**, 877-92 (2014)
- 43) Stertz, L., et al., *Rev Bras Psiquiatr*, **36**, 39-46 (2013)
- 44) van Enkhuizen, J., et al., *Int J Neuropsychopharmacol*, **16**, 1021-31 (2013)
- 45) Scotti, M.A., et al., *Physiol Behav*, **103**, 376-83 (2011)
- 46) Huang, M., et al., *Brain Res*, **1099**, 44-55 (2006)
- 47) Yan, Z., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11607-12 (1999)
- 48) Valjent, E., et al., *J Neurosci*, **20**, 8701-9 (2000)
- 49) Musto, A. and N.G. Bazan, *Epilepsia*, **47**, 267-76 (2006)
- 50) Okada, M., et al., *Cell Signal*, **24**, 1573-82 (2012)
- 51) Freund, T.F. and G. Buzsaki, *Hippocampus*, **6**, 347-470 (1996)
- 52) Klausberger, T., et al., *J Neurosci*, **25**, 9782-93 (2005)
- 53) Andrioli, A., et al., *Neuroscience*, **149**, 131-43 (2007)
- 54) Kuruba, R., et al., *PLoS One*, **6**, e24493 (2011)
- 55) Schwaller, B., et al., *Mol Cell Neurosci*, **25**, 650-63 (2004)
- 56) Konradi, C., et al., *Arch Gen Psychiatry*, **68**, 340-50 (2011)
- 57) Pantazopoulos, H., et al., *Biol Psychiatry*, **61**, 640-52 (2007)
- 58) Adachi, N., et al., *Brain Res Mol Brain Res*, **139**, 288-99 (2005)
- 59) de Lecea, d.R. L., and S. J.A., E., *Brain Res*, **32**, 1-13 (1995)

9. 特記事項

本総説は、岐阜薬科大学博士論文（甲3号）の内容を中心にまとめたものである。