

統合失調症モデルラットにおける免疫組織化学染色法を用いた CaMKII 活性イメージング法

矢吹 悌,^a 中川西 修,^b 只野 武,^c 福永浩司^{*,a}

Imaging Monitoring Method of CaMKII Activity by Immunohistochemical Analysis in Schizophrenic Model Rats

Yasushi Yabuki,^a Osamu Nakagawasai,^b Takeshi Tadano,^c and Kohji Fukunaga^{*,a}

^aDepartment of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University; 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan; ^bDepartment of Pharmacology, Tohoku Pharmaceutical University; 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan; and ^cCollege of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University; 5-11-80 Kodatsuno, Kanazawa, Ishikawa 920-0942, Japan.

(Received December 3, 2012)

Schizophrenia is characterized by various behavioral abnormalities including cognitive dysfunction. Neonatal ventral hippocampus (NVH)-lesioned rats had been known as neurodevelopmental animal model similar to schizophrenia. Previous observations indicate that postpubertal NVH-lesioned rats exhibit impairments in prepulse inhibition (PPI), spontaneous locomotion, social interaction behavior and working memory. Here, we document the neurochemical basis of those defects in NVH-lesioned rats. Since Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), which is NMDA receptor downstream kinase, is essential for memory and learning acquisition, we developed a protocol to monitor the spatial changes in CaMKII autophosphorylation using immunohistochemical imaging of whole brain slices with anti-autophosphorylated CaMKII antibody in order to address mechanisms underlying impaired cognitive function in NVH-lesioned rats. Immunohistochemical analyses using anti-autophosphorylated CaMKII antibody revealed that CaMKII autophosphorylation was significantly reduced in the medial prefrontal cortex (mPFC) of NVH-lesioned rats compared with control animals. This immunohistochemical technique is useful to investigate temporal and special changes in CaMKII activity in rodent brain and to evaluate drugs to improve the cognitive impairment.

Key words—Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; schizophrenia; cognitive impairment; neonatal ventral hippocampus-lesioned rat

1. はじめに

統合失調症は生涯発病率が約1%と高く、主に思春期以降に発症し、妄想、幻覚、錯覚などを主症状とする陽性症状と感情鈍麻、意欲低下、社会性の低下などを主症状とする陰性症状、感覚機能障害 (prepulse inhibition (PPI) 障害) 及び一部の学習障害、作業記憶低下などの認知機能障害を呈する精神疾患である。¹⁾ 特に、認知機能障害は患者の社会

復帰の妨げとなり問題視されている。現在の臨床の薬物療法は主にドパミン受容体拮抗作用を伴う薬物を用いており、陽性症状及び陰性症状は軽減されるが、認知機能障害の改善は十分ではない。²⁾ 統合失調症の認知機能障害の改善を目的とした薬がないため、現在の統合失調症の認知機能障害に対する治療法は行動療法が主流である。認知機能障害の病態究明や新たな治療薬開発のためにモデル動物を用いる必要がある。しかし、統合失調症認知機能障害改善薬の開発に適したモデル動物は少ない。

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体のアンタゴニストである MK-801, フェンサイクリジン (PCP), ケタミンはげっ歯類に投与すると、陽性症状、陰性症状と同時に顕著な認知機能障害を起こす。³⁻⁵⁾ また、統合失調症患者ではグルタミン酸神経伝達機能

The authors declare no conflict of interest.

^a東北大学大学院薬学研究科薬理学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3), ^b東北薬科大学薬学部薬理学教室 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1), ^c金沢大学医薬保健学総合研究科環境健康科学 (〒920-0942 金沢市小立野 5-11-80)

*e-mail: kfukunaga@m.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第132年会シンポジウム S28 で発表したものを中心に記述したものである。

低下が示唆されている。統合失調症の認知機能障害はドパミン仮説だけでは説明がつかないことから、認知機能障害にはグルタミン酸神経伝達機能低下が関与していると考えられる。

グルタミン酸神経伝達を調節する主なプロテインキナーゼである Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) は、記憶・学習の獲得に必須のプロテインキナーゼである。^{6,7)} 海馬 CA1 領域において、阻害剤と遺伝子欠損マウスを用いた実験により、記憶獲得の素過程である long-term potentiation (LTP) の誘導には CaMKII の自己リン酸化反応の亢進が必須である。^{8,9)}

本稿では、統合失調症病態モデル動物における認知機能障害における CaMKII の役割を明らかにするために、CaMKII の自己リン酸化認識抗体を用いた活性化型 CaMKII の蛍光免疫染色による脳イメージング法について紹介する。本手法は小動物を用いた認知機能改善薬の評価系にも応用することが可能である。

2. CaMKII と認知機能

CaMKII は中枢神経系に多く発現しており、神経伝達物質の合成・放出及び AMPA 型グルタミン酸受容体活性を調節することにより、シナプス可塑性を制御するプロテインキナーゼである。^{10,11)} NMDA 受容体あるいは、電位依存カルシウムチャネルを介して細胞内に Ca^{2+} が流入すると、 Ca^{2+} /CaM 複合体が本酵素に結合し、構造変化することで触媒ドメインの抑制が除かれ、基質タンパク質をリン酸化する。活性化と同時に、CaMKII 分子内の Thr-286 が自己リン酸化され、恒常的に活性を有する酵素に変わる。この恒常的に活性を有する CaMKII が海馬における LTP の誘導に必須である。^{12,13)} また、CaMKII は NMDA 受容体の NR2B に直接結合し、¹⁴⁾ LTP では NMDA 受容体から流入する Ca^{2+} により活性化され、alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) 受容体サブユニット GluR1 をリン酸化し、シナプス後電流を促進する。^{15,16)} 私達は、CaMKII が NMDA 受容体の下流分子である、げっ歯類の記憶形成に深く係わることから、認知機能障害モデル動物における CaMKII 活性をモニターする方法を開発した。

一方、統合失調症において近年、グルタミン酸神経伝達機能低下仮説が注目されている。実際に、統

合失調症モデル動物における CaMKII 活性の変化が報告されている。本研究では、認知機能改善薬の評価系として CaMKII 活性を全脳領域で空間的にモニターする方法を確立することを試みた。認知機能障害モデルとしては新生仔期腹側海馬 (neonatal ventral hippocampus; NVH) 損傷ラットを用いた。NVH 損傷ラットは統合失調症モデル動物であり、新生仔期の雄性ラットの両側腹側海馬に、グルタミン酸の神経毒であるイボテン酸を注入し、腹側海馬を破壊するモデルである。¹⁷⁾ NVH 損傷ラットは、思春期前 (生後 35 日目) には、行動異常は観察されず、思春期後 (生後 60 日以降) に統合失調症様行動異常を示す動物であることが報告されている。¹⁸⁻²⁰⁾ ヒトにおいても統合失調症発症の時期は主に思春期以降であることから、NVH 損傷ラットは他の統合失調症病態モデル動物よりもヒトの病態に近いモデル動物であると考えられる。

3. 蛍光免疫組織化学染色法による CaMKII 活性イメージング

私達は今回、Brain mapping analyzer を用いた蛍光免疫組織染色法により、ラット脳における CaMKII 活性の変化を測定した。²¹⁾ この装置は、落射蛍光顕微鏡の光路にピンホールが挿入されているため、切片内のごく微小な領域だけを照射することができ、その領域から発せられる蛍光だけを選択的に測定することが可能である。さらに、電動ステージをコンピュータ制御下で二次元方向に変動させることにより、切片全面の蛍光強度分布を分析することができる。

本染色法の手順を紹介する。まずラットを還流固定後、20 μm の厚さで凍結切片を作製し、PBS で 30 分・2 回洗浄後、0.1% TritonX-100 及び 0.05% normal goat serum を含む PBS (ブロッキング液) で 1 時間ブロッキングを行った。PBS で洗浄後、ブロッキング液に CaMKII 自己リン酸化認識抗体又は CaMKII 認識抗体を 1000 倍希釈し、4°C の条件下で切片と一晚反応させた [Fig. 1(a)].²²⁾ 洗浄



矢吹 梯

2010 年東北大学薬学部卒業。2012 年東北大学大学院薬学研究科修士課程修了。現在、東北大学大学院薬学研究科博士課程在学中。福島県出身。研究テーマ：統合失調症モデル動物における認知機能障害のメカニズムと新規治療薬に関する研究。

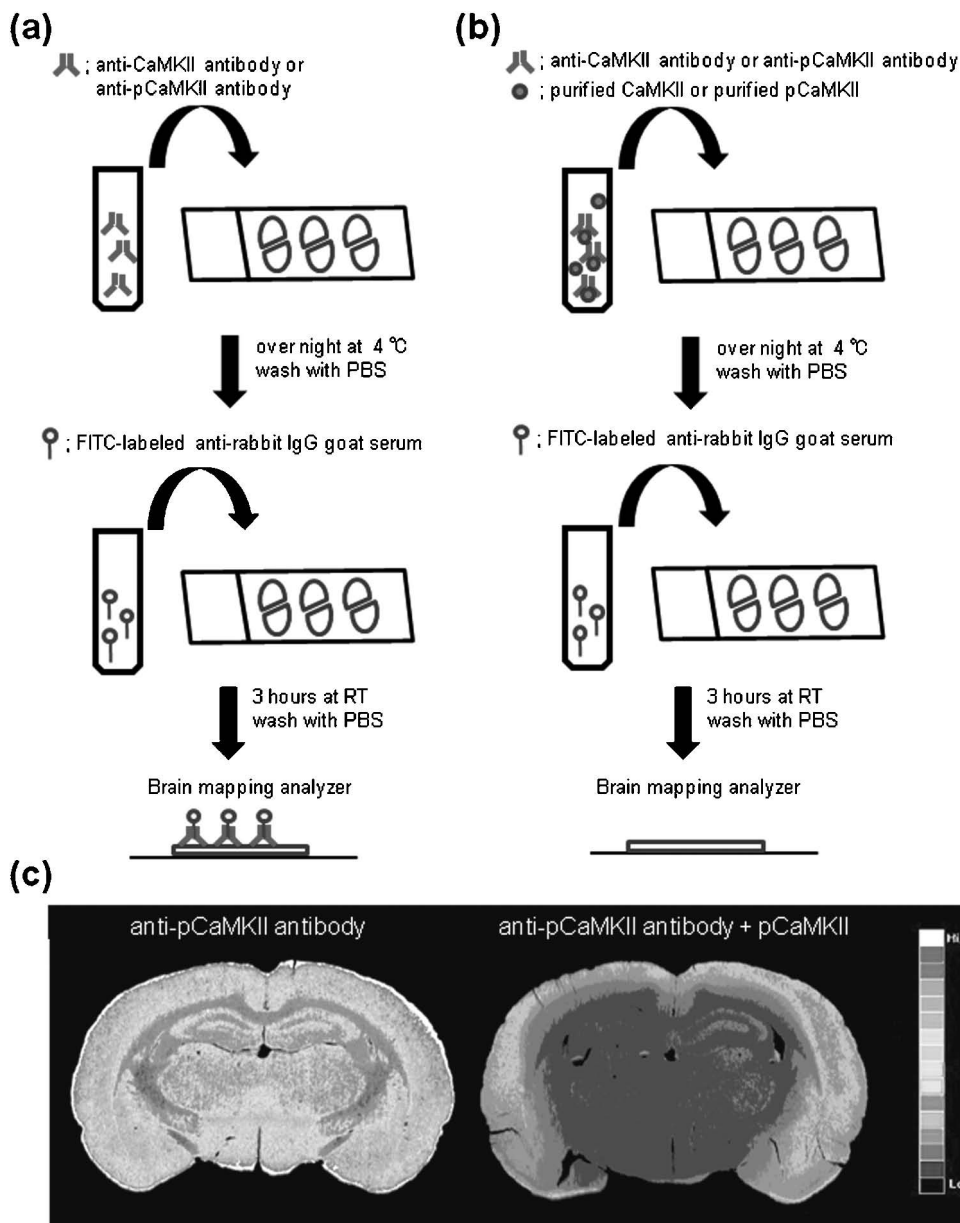


Fig. 1. CaMKII Imaging Using Brain Mapping Analyzer

(a) Anti-CaMKII antibody or anti-autophosphorylated-CaMKII (pCaMKII) antibody (diluted 1 : 1000 in PBS including 0.1% Triton X-100 and 0.05% normal goat serum (NGS)) was applied to each slice and incubated at 4°C for 12 h. After washing with PBS, the secondary antibody, FITC-labeled anti-rabbit IgG goat serum (diluted 1 : 200 in PBS), was allowed to react for 3 h in the dark room at room temperature. Stained sections were mounted in 10% glycerin-PBS and kept at 4°C in a dark room until measurements were carried out. CaMKII or pCaMKII immunofluorescence intensity was analyzed quantitatively using a modified brain mapping analyzer system. (b) To confirm antibody specificity, conventional CaMKII and pCaMKII antibodies were absorbed with 1000-fold excess purified and purified/autophosphorylated CaMKII, respectively, before incubation with brain sections. (c) Representative images of fluorescence immunostaining using autophosphorylated CaMKII (Thr 286) antibody on the left side. Adsorption of purified pCaMKII indicated antibody specificity on the right side image.

後, FITC でラベルされた二次抗体を暗室において 3 時間反応させ, PBS で 1 時間, 4 回洗浄し, 10% glycerin を含む PBS により封入し, 測定を行うまで暗室に保存した. Brain mapping analyzer による解析を行うと, Fig. 1(c) に示すような免疫反応強度を 16 レベルで分類した染色像が得られる.²³⁾ Figure 1 に示されている異なった色調は, 蛍光強度

が最も低い領域を黒で, 最も高い領域を白として表示している.

染色の特異性を確認するために, CaMKII 自己リン酸化認識抗体又は CaMKII 認識抗体の吸収実験を行った. 吸収実験では, 精製した抗原と抗体を反応させることにより, 抗体を吸収させる [Fig. 1 (b)]. 抗体が特異的であれば吸収後に, 蛍光を示

さないことになる。精製した CaMKII 又は自己リン酸化型 CaMKII をそれぞれの抗体と反応させた後、上記手法により蛍光強度を測定したところ、CaMKII 抗体、CaMKII 自己リン酸化抗体の蛍光が完全に消失した (Fig. 1)。

抗体の特異性を確認後、両抗体を用いて NVH 損傷ラットとその対照群の CaMKII 活性を測定した。同側の前頭前野領域を並べて表示すると、CaMKII を認識する抗体では蛍光強度に差がみられないことから、全タンパク質は NVH 処置で変化がみられないことを示している [Fig. 2(a)]。一方、自己リン酸化認識抗体 (pCaMKII 抗体) では対照群に比べ、NVH 損傷ラットの内側前頭前皮質において pCaMKII 蛍光強度が著しく低下していた [Fig. 2(a)]。このことは内側前頭前皮質において NVH 損傷ラットでは CaMKII 活性が低下することを示している。内側前頭前皮質は、感覚機能、情動

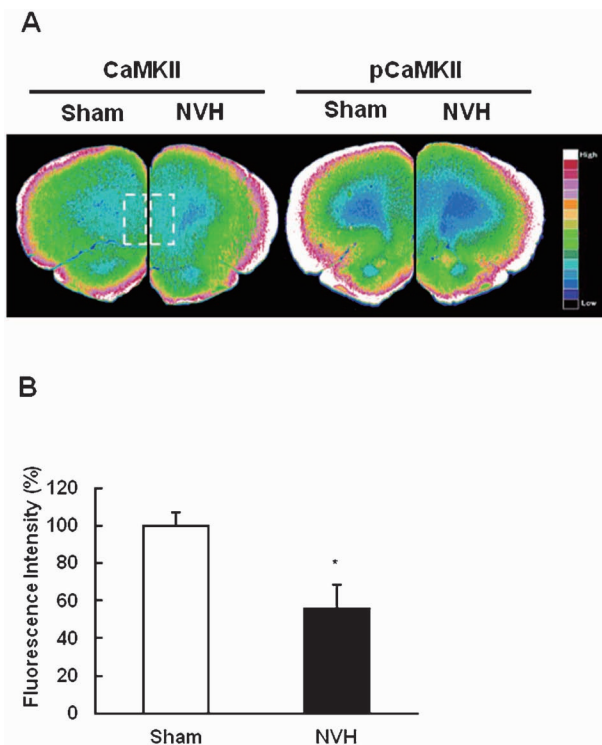


Fig. 2. CaMKII Autophosphorylation was Reduced in the Medial Prefrontal Cortex of NVH-lesioned Rats Revealed by Fluorescent Immunostaining

Representative image of fluorescent immunostaining using antibodies against CaMKII and autophosphorylated CaMKII (Thr 286). (A) Images show prefrontal cortex of each hemisphere in both sham (left) and NVH-lesioned rats (right). (B) Quantitative analyses of fluorescence intensity with anti-autophosphorylated CaMKII (Thr 286) antibody. Data are expressed as percent sham value ($n=3$ per group). Error bars represent S.E.M. * $p<0.05$ vs. sham-operated rats.

そして認知機能に関与する領域であり、統合失調症患者においても内側前頭前皮質領域の神経活動が低下している。²⁴⁾ 網羅的に解析を行ったところ、NVH 損傷ラットでは特に、内側前頭前皮質、背側線条体、背側海馬において CaMKII 活性低下が顕著であった。

4. CaMKII と統合失調症

近年、統合失調症において Ca^{2+} シグナルの異常が報告されている。統合失調症の前頭前皮質では、 Ca^{2+} /calmodulin 依存的に活性化される一酸化窒素合成酵素の活性が低下していることから Ca^{2+} シグナル伝達の機能低下が示唆されている。²⁵⁾ 一方、大脳皮質においては、神経伝達物質の放出を調節するシナプシン I を Ca^{2+} 依存的にリン酸化する CaMKII β が mRNA レベルで増加しており、これが統合失調症患者のドーパミン感受性に関与しているという報告もある。²⁶⁻²⁸⁾

さらに、統合失調症感受性遺伝子である COMT 又は dysbindin-1 ノックアウトマウスにおいて作業記憶が低下し、これと相関して、前頭前皮質における CaMKII タンパク質が低下していることから、^{29,30)} 統合失調症モデル動物においても Ca^{2+} シグナル伝達の異常が示唆され、特に CaMKII のタンパク質又は活性低下が認知機能障害に関与すると考えられる。

また、正常なマウスでは陰性症状の指標とされる強制水泳試験又は学習能の指標であるモリス水迷路試験後、前頭前皮質の CaMKII 自己リン酸化反応が亢進するのに対し、NMDA 受容体拮抗薬である PCP 投与マウスではストレス負荷後に CaMKII 自己リン酸化反応は亢進しない。^{31,32)} 同様に、陰性症状様行動及び学習障害が NMDA 受容体 NR1 サブユニットの遺伝子改変マウスにおいて認められることから、³³⁻³⁶⁾ NMDA-CaMKII シグナル伝達の低下が認知機能障害だけではなく、陰性症状様行動障害への関与が示唆される。

NVH 損傷ラットにおいても、陰性症状様行動障害及び学習能の障害が認められ、^{19,37)} 私達の Brain mapping analyzer を用いた蛍光免疫組織染色法により、前頭前皮質、背側線条体、背側海馬において CaMKII 自己リン酸化反応が著しく低下していた。PCP 投与モデル動物、統合失調症の原因遺伝子の 1 つである Neureglin 1 遺伝子改変マウスでは非定

型抗精神病薬の投与により, PPI 障害, 陰性症状様行動及び認知機能障害が改善する.³⁸⁻⁴⁰⁾しかし, NVH 損傷ラットでは非定型抗精神病薬投与により PPI 障害は改善するが,⁴¹⁾ 陰性症状様行動及び認知機能障害は改善されなかった.⁴²⁾ さらに, NVH 損傷ラットは非定型抗精神病薬では改善しない認知機能障害改善を目的とした創薬を行うための統合失調症モデル動物として有用であると考えられる。

5. おわりに

本研究で確立した Brain mapping analyzer を用いた蛍光免疫組織染色法は, CaMKII 活性を脳全体で網羅的に測定することが可能であり, 脳病態における CaMKII の関与を解析することができる。また, NVH 損傷ラットでは, 前頭前野, 背側線条体, 海馬 CA1 領域で CaMKII 活性低下が顕著であり, 非定型抗精神病薬であるリスペリドンによってもこれらの脳部位での活性は回復しない。今後は CaMKII 活性を改善する薬剤のスクリーニングに本法を用い, 非定型抗精神病薬に代わる新規認知機能障害改善薬の探索を行う予定である。

REFERENCES

- Ban T. A., Guy W., Wilson W. H., *Psychiatr. Dev.*, **2**, 179-199 (1984).
- Conklin H. M., Curtis C. E., Calkins M. E., Iacono W. G., *Neuropsychologia*, **43**, 930-942 (2005).
- Krystal J. H., Karper L. P., Seibyl J. P., Freeman G. K., Delaney R., Bremner J. D., Heninger G. R., Bowers M. B. Jr., Charney D. S., *Arch. Gen. Psychiatry*, **51**, 199-214 (1994).
- Carlsson M. L., Carlsson A., Nilsson M., *Curr. Med. Chem.*, **11**, 267-277 (2004).
- Lisman J. E., Coyle J. T., Green R. W., Javitt D. C., Benes F. M., Heckers S., Grace A. A., *Trends Neurosci.*, **31**, 234-242 (2008).
- Fukunaga K., Shioda N., Miyamoto E., "Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Neural Signaling Mechanisms," ed. by Lajtha A., Springer, New York, 2009, pp. 163-183.
- Moriguchi S., Yabuki Y., Fukunaga K., *J. Neurochem.*, **120**, 541-551 (2012).
- Giese K. P., Fedorov N. B., Filipkowski R. K., Silva A. J., *Science*, **279**, 870-873 (1998).
- Collingridge G. L., Isaac J. T., Wang Y. T., *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 952-962 (2004).
- Ouimet C. C., McGuinness T. L., Greengard P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5604-5608 (1984).
- Erondu N. E., Kennedy M. B., *J. Neurosci.*, **5**, 3270-3277 (1985).
- Colbran R. J., Schworer C. M., Hashimoto Y., Fong Y. L., Rich D. P., Smith M. K., Soderling T. R., *Biochem. J.*, **258**, 313-325 (1989).
- Fukunaga K., Stoppini L., Miyamoto E., Muller D., *J. Biol. Chem.*, **268**, 7863-7867 (1993).
- Barria A., Malinow R., *Neuron*, **48**, 289-301 (2005).
- Derkach V., Barria A., Soderling T. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3269-3274 (1999).
- Roche K. W., O'Brien R. J., Mammen A. L., Bernhardt J., Huganir R. L., *Neuron*, **16**, 1179-1188 (1996).
- Laplante F., Nakagawasai O., Srivastava L. K., Quirion R., *Neuropsychopharmacology*, **30**, 1076-1087 (2005).
- Lipska B. K., Jaskiw G. E., Weinberger D. R., *Neuropsychopharmacology*, **9**, 67-75 (1993).
- Lipska B. K., Aultman J. M., Verma A., Weinberger D. R., Moghaddam B., *Neuropsychopharmacology*, **27**, 47-54 (2002).
- Marcotte E. R., Pearson D. M., Srivastava L. K., *J. Psychiatry Neurosci.*, **26**, 395-410 (2001).
- Sutoo D., Akiyama K., Yabe K., *Brain Res.*, **933**, 1-11 (2002).
- Fukunaga K., Goto S., Miyamoto E., *J. Neurochem.*, **51**, 1070-1078 (1988).
- Nakagawasai O., Hozumi S., Tan-No K., Nijima F., Arai Y., Yasuhara H., Tadano T., *Behav. Brain Res.*, **142**, 63-67 (2003).
- Barch D. M., Ceaser A., *Trends Cogn. Sci.*, **16**, 27-34 (2012).
- Xing G., Chavko M., Zhang L. X., Yang S., Post R. M., *Schizophr. Res.*, **58**, 21-30 (2002).
- Novak G., Seeman P., Talerico T., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **82**, 95-100 (2000).
- Castner S. A., Goldman-Rakic P. S., *Neuropsychopharmacology*, **20**, 10-28 (1999).
- Lidow M. S., *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **43**,

- 70–84 (2003).
- 29) Papaleo F., Crawley J. N., Song J., Lipska B. K., Pickel J., Weinberger D. R., Chen J., *J. Neurosci.*, **28**, 8709–8723 (2008).
- 30) Papaleo F., Yang F., Garcia S., Chen J., Lu B., Crawley J. N., Weinberger D. R., *Mol. Psychiatry*, **17**, 85–98 (2012).
- 31) Mouri A., Noda Y., Noda A., Nakamura T., Tokura T., Yura Y., Nitta A., Furukawa H., Nabeshima T., *Mol. Pharmacol.*, **71**, 1598–1609 (2007).
- 32) Murai R., Noda Y., Matsui K., Kamei H., Mouri A., Matsuba K., Nitta A., Furukawa H., Nabeshima T., *Behav. Brain Res.*, **180**, 152–160 (2007).
- 33) Mohn A. R., Gainetdinov R. R., Caron M. G., Koller B. H., *Cell*, **98**, 427–436 (1999).
- 34) Rampon C., Tang Y. P., Goodhouse J., Shimizu E., Kyin M., Tsien J. Z., *Nat. Neurosci.*, **3**, 238–244 (2000).
- 35) Rondi-Reig L., Petit G. H., Tobin C., Tonegawa S., Mariani J., Berthoz A., *J. Neurosci.*, **26**, 4071–4081 (2006).
- 36) Tsien J. Z., Huerta P. T., Tonegawa S., *Cell*, **87**, 1327–1338 (1996).
- 37) Sams-Dodd F., Lipska B. K., Weinberger D. R., *Psychopharmacology (Berl.)*, **132**, 303–310 (1997).
- 38) Noda Y., Yamada K., Furukawa H., Nabeshima T., *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 2531–2537 (1995).
- 39) McLean S. L., Neill J. C., Idris N. F., Marston H. M., Wong E. H., Shahid M., *Behav. Brain Res.*, **214**, 240–247 (2010).
- 40) Pan B., Huang X. F., Deng C., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **35**, 924–930 (2011).
- 41) Le Pen G., Moreau J. L., *Neuropsychopharmacology*, **27**, 1–11 (2002).
- 42) Rueter L. E., Ballard M. E., Gallagher K. B., Basso A. M., Curzon P., Kohlhaas K. L., *Psychopharmacology (Berl.)*, **176**, 312–319 (2004).