

平成 31 年 4 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08543

研究課題名(和文) 精神疾患における脳内グルタミン酸動態変調の可視化解析

研究課題名(英文) Visualization of disrupted glutamate dynamics in the brain upon psychiatric disorders

研究代表者

大久保 洋平 (Okubo, Yohei)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：40422282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳内のグルタミン酸シグナリング動態の変調が精神疾患の原因として注目を集めているが、不明な点が多く残されている。そこで統合失調症およびうつ病を主な研究対象として、独自のグルタミン酸蛍光イメージング法を適用し、脳内グルタミン酸動態変調様態とそのメカニズムを明らかにすることを試みた。大脳皮質において新規の自発的局所グルタミン酸濃度上昇現象を発見した。神経活動遮断下でもこのグルタミン酸動態は観察されたため、グリア細胞、特にアストロサイトからの放出が期待された。病態における非神経性グルタミン酸動態変調の要因となることが期待され、メカニズムのさらなる解析と病態との関連の解明が待たれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患のメカニズムは未だ不明な点が多く、既存の治療法は社会的要請を十分に満たしていない。本研究で発見されたグルタミン酸動態を評価軸にして病態や既存薬の効果を解析することで、治療抵抗性の統合失調症やうつ病に対する新たな治療法の開発に資する知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although disruption of glutamate dynamics in the brain is attracting attention as a cause of psychiatric disorders, many points remain elusive. We thus set out to apply our unique glutamate fluorescence imaging technique for psychiatric disorders including schizophrenia and depression, and tried to clarify the disrupted glutamate dynamics and its mechanism in the brain. We for the first time found a spontaneous and spatially confined increase in glutamate concentration in the cerebral cortex. Since this glutamate dynamics was observed even under the inhibition of neuronal activity, release from glial cells, in particular astrocytes, was expected. It is expected to be a factor of non-neural factor for the disruption of glutamate dynamics in the pathological condition, and further analysis of the mechanism and elucidation of the causal relationship are awaited.

研究分野：薬理学

キーワード：統合失調症 うつ グルタミン酸 脳・神経 薬理学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精神疾患によって生じる社会的コストは甚大であり、新規創薬が強く望まれていた。しかしながら各種精神疾患のメカニズムの解明が進展していないことが、創薬の大きな障壁となっていた。統合失調症やうつ病などに対する治療薬として、ドーパミンやセロトニンなどのモノアミン伝達に作用するものが経験的に用いられてきたが、効果は限られており、薬物抵抗性の症状および患者が存在する問題は解決されていなかった。よって「モノアミン仮説」に替わる新たなシグナル機構の解明が急務となっていた。

これに関連して、イオンチャネル型グルタミン酸受容体である NMDA 受容体の遮断薬が、統合失調症様症状を惹起するという知見や、即効性の抗うつ作用を示すという知見などから、グルタミン酸-NMDA 受容体シグナリングの変調が統合失調症やうつ病の原因であるとする「グルタミン酸仮説」が提唱された。しかしながら、このグルタミン酸仮説の背景にあるメカニズムについては、これまでは有用なグルタミン酸動態測定法が存在しなかったために、十分な知見が得られていなかった。そしてこの知識の不足が、新規治療法開発における大きな障壁となっていた。

2. 研究の目的

統合失調症およびうつ病を主な研究対象として、独自に開発したグルタミン酸を可視化するための蛍光プローブ EOS (図 1 A) を適用し、病態に関連する脳内グルタミン酸動態変調とその機構を明らかにする。さらに既存のモノアミン系抗精神病薬や、グルタミン酸仮説に関連する治療薬候補分子が、グルタミン酸動態変調に対して示す改善効果の検証を行う。これにより、「グルタミン酸仮説」を直接的に検証し、疾患メカニズムの解明と新規創薬に資する知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) EOS の脳スライス標本への固定

マウスから得た急性脳スライス標本を用いて研究を進めた。スライス標本は *in vivo* 観察の困難な脳深部の解析には不可欠であり、さらに薬理的解析を詳細に行うことが可能である。また EOS を用いたこれまでの研究において、スライス標本と *in vivo* で同様の神経線維刺激依存的グルタミン酸動態が観察されている。

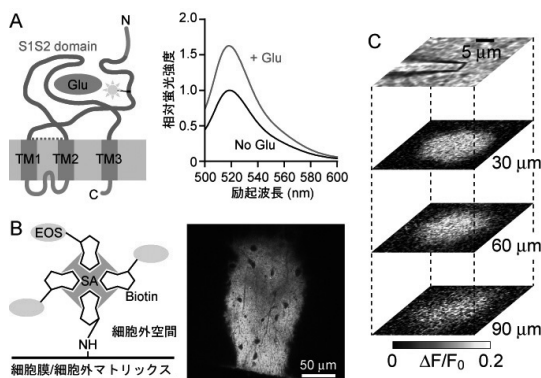


図 1 (A) EOS の構造と蛍光強度変化。(B) ビオチン-streptavidin 結合を介した EOS の固定。(C) 局所的シナプス外グルタミン酸動態の可視化。

マウス脳の各部位からスライス標本作製した。得られたスライス標本に、我々が開発した、ビオチン-streptavidin 結合を用いる方法で EOS を固定した(図 1 B)。端的に説明すると、スライス標本をビオチン標識試薬とインキュベーションすることで、細胞外空間に面する一級アミンをビオチン化する。そこに、あらかじめ *in vitro* で作製しておいた、streptavidin-EOS 複合体をインジェクションして、EOS を細胞外空間、主にシナプス外空間に固定化する。この方法により、半径 100~200 μm の比較的広い範囲に、EOS を均一に固定できることを、大脳皮質、海馬、小脳で確認した。EOS を固定したスライス標本は二光子励起顕微鏡で観察した。

(2) グルタミン酸動態変調の解析

細胞外グルタミン酸動態は、神経細胞およびアストロサイトが関与する多様な経路を介した、グルタミン酸の放出と取り込みの動的相互作用で形成される。よってグルタミン酸動態変調は、神経細胞、アストロサイト両者の変調を考慮する必要がある。静止時および神経線維刺激時のグルタミン酸動態や、グルタミン酸トランスポーター阻害薬によるアストロサイトのグルタミン酸取り込み阻害により、両者の寄与を解析した。

(3) 薬理的解析

NMDA 受容体の遮断薬であり、統合失調症様症状を惹起することが知られている MK-801 をスライス標本に投与した。これにより統合失調症に関連するグルタミン酸動態の再現を試みた。また既存のモノアミン系抗精神病薬のグルタミン酸動態への効果を解析した。

4. 研究成果

(1) 神経活動依存性グルタミン酸放出

神経線維刺激依存性のグルタミン酸動態について、振幅、持続時間、空間分布を主なパラメーターとして、刺激頻度／回数依存性を解析した。K716A-EOS(解離定数 174 nM) と L401C-EOS(解離定数 1.57 μ M) の 2 種類の EOS を使用することで、 10^{-8} ~ 10^{-5} M という低濃度域の局所グルタミン酸動態の定量に成功した (図 1 C、図 2)。これはこれまでの研究から、シナプス間隙からのグルタミン酸スピルオーバーによるグルタミン酸動態を示していると考えられる。

MK-801 や抗精神病薬存在下で同様の実験を行ったところ、現在までに有意な変化は認められていない。健常時と病態時の差異を解明し、治療薬の効果を評価するためには、他の病態モデルを用いるなど、多面的な解析が待たれる。

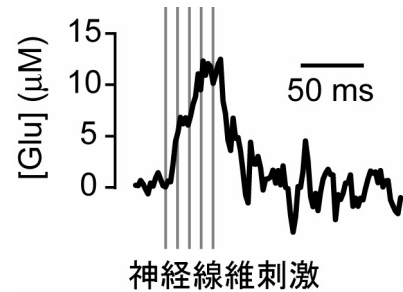


図2 神経線維刺激により惹起されるグルタミン酸動態の濃度定量

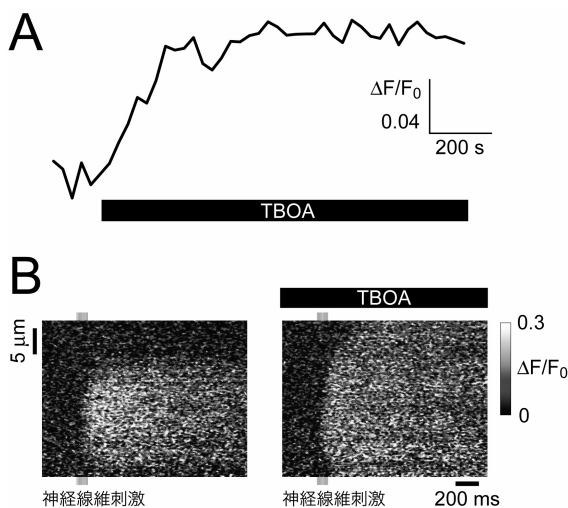


図3 グルタミン酸トランスポーター阻害薬 TBOA による静止時グルタミン酸濃度上昇(A)と神経線維刺激時グルタミン酸動態の増大(B)。

(2) アストロサイトによる取り込み

まず静止時においてアストロサイトによるグルタミン酸取り込みの寄与を解析した。静止時の細胞外グルタミン酸濃度は、主にアストロサイトからの定常的放出と取り込みを反映する。グルタミン酸トランスポーター阻害薬 TBOA により主にアストロサイトのグルタミン酸取り込みを阻害することで静止時グルタミン酸濃度が上昇した (図 3 A)。

つぎに神経線維刺激により惹起されたグルタミン酸動態について、アストロサイトの寄与を解析した。TBOA によりグルタミン酸濃度上昇が時間的空間的に延長した (図 3 B)。

この TBOA による変化は、MK-801 による NMDA 受容体の阻害の影響を確認できなかった。今後は他の病態モデルを用いるなどの再検証が必要である。

(3) 新規グルタミン酸動態の発見

静止時観察中に、自発的かつ局所的なグルタミン酸濃度上昇が起こることが観察された。この従来報告が無い新規のグルタミン酸動態は、神経活動遮断下でも観察された。よってアストロサイトからのグリア性伝達物質としてのグルタミン酸放出の関与が期待される。今後はこの新規グルタミン酸動態のメカニズムの解明を進めるとともに、病態評価のための因子としての有用性を検証する。これまでに MK-801 存在下での変化は確認できていないが、今後他の病態モデルなどでの検証を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計6件）

全て査読あり

- ① Yohei Okubo and Masamitsu Iino. Visualization of astrocytic intracellular Ca²⁺ mobilization. **J. Physiol.** 印刷中 (2019)
DOI: 10.1113/JP277609
- ② Yohei Okubo, Kazunori Kanemaru, Junji Suzuki, Kenta Kobayashi, Kenzo Hirose and Masamitsu Iino. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2-independent Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum in astrocytes. **Glia** 67:113-124 (2019)
DOI: 10.1002/glia.23531
- ③ Yohei Okubo, Yoshinori Mikami, Kazunori Kanemaru and Masamitsu Iino. Role of endoplasmic reticulum-mediated Ca²⁺ signaling in neuronal cell death. **Antioxid. Redox Signal.** 29:1147-1157 (2018)
DOI: 10.1089/ars.2018.7498
- ④ Yoshinori Mikami, Kazunori Kanemaru, Yohei Okubo, Takuya Nakaune, Junji Suzuki, Kazuki Shibata, Hiroki Sugiyama, Ryuta Koyama, Takashi Murayama, Akihiro Ito, Toshiko Yamazawa, Yuji Ikegaya, Takashi Sakurai, Nobuhito Saito, Sho Kakizawa and Masamitsu Iino. Nitric oxide-induced activation of the type 1 ryanodine receptor is critical for epileptic seizure-induced neuronal cell death. **EBioMedicine** 11:253-261 (2016)
DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.08.020
- ⑤ Jun Kubota, Yoshinori Mikami, Kazunori Kanemaru, Hiroshi Sekiya, Yohei Okubo and Masamitsu Iino. Whisker experience-dependent mGluR signaling maintains synaptic strength in the mouse adolescent cortex. **Eur. J. Neurosci.** 44:2004-2014 (2016)
DOI: 10.1111/ejn.13285

〔学会発表〕（計12件）

- ① Yohei Okubo, Kazunori Kanemaru, Masamitsu Iino. Visualization of Ca²⁺ dynamics within the endoplasmic reticulum for the study of astrocytic functions. **The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology** (2018)
- ② Yohei Okubo. Visualization of metabotropic glutamate receptor signaling in neurons. **Next Generation Pharmacology Seminar 2018** (2018)
- ③ Yohei Okubo, Junji Suzuki, Kazunori Kanemaru, Naotoshi Nakamura, Tatsuo Shibata, Masamitsu Iino. Visualization of Ca²⁺ filling mechanisms upon synaptic inputs in the endoplasmic reticulum of cerebellar Purkinje cells. **The 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease** (2017)
- ④ Yohei Okubo. Nitric oxide contributes to epileptic seizure-induced neuronal death. **The 38th world congress of the international union of physiological sciences** (2017)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharmacol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織