

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19786

研究課題名(和文)抗精神病薬により引き起こされる認知機能障害の分子メカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms underlying cognitive impairments following antipsychotic treatment

研究代表者

衣斐 大祐 (Ibi, Daisuke)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：40757514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症治療薬(抗精神病薬)の慢性投与により引き起こされる認知機能低下に関する分子メカニズムの解明を目的に研究を遂行した。本研究では、抗精神病薬が、前頭皮質のセロトニン5-HT_{2A}受容体を拮抗することで、I κ B α の発現を低下させ、それに続いてNF- κ Bの核内移行を増加させることを明らかにした。核内のNF- κ Bは、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)2の発現を増加させ、脳機能やシナプス構造に関わる遺伝子発現を抑制した。さらに発現増加したHDAC2は、興奮性シナプスの数を減少させ、認知機能を低下させた。本研究により抗精神病薬により引き起こされる認知機能低下に関する分子メカニズムが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Antipsychotic drugs remain the standard for schizophrenia treatment. Despite their effectiveness in treating hallucinations and delusions, prolonged exposure to antipsychotic medications leads to cognitive deficits in both schizophrenia patients and animal models. The molecular mechanisms underlying these negative effects on cognition remain to be elucidated. Here we demonstrate that chronic antipsychotic exposure increases nuclear translocation of NF- κ B in mouse frontal cortex, a trafficking event triggered via 5-HT_{2A}-receptor-dependent downregulation of the NF- κ B repressor I κ B α . This upregulation of NF- κ B activity led to its increased binding at the Hdac2 promoter, thereby augmenting Hdac2 transcription. Deletion of HDAC2 in forebrain pyramidal neurons prevented the negative effects of antipsychotic treatment on synaptic remodeling and cognition. Together, these observations may aid in developing therapeutic strategies to improve the outcome of schizophrenia treatment.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：抗精神病薬 統合失調症 HDAC2

1. 研究開始当初の背景

(1) 統合失調症の有病率は、約 1%であり、多くの場合、生活の質は著しく低下している。第一世代の定型抗精神病薬（ハロペリドールなど）と第二世代の非定型抗精神病薬（クロザピンなど）の慢性処置は、幻覚や妄想のような精神病症状には有効であるが、多くの統合失調症患者で認められる認知機能障害には抗精神病薬の有効性はあまり認められず、場合によっては長期の抗精神病薬の処置により認知機能障害が、さらに悪化してしまう事も示唆されている¹⁻⁴⁾。これら臨床研究の結果は、実験動物を用いた研究でも同様の結果が既に報告されている⁵⁾。これら認知機能の低下が、統合失調症患者の社会生活における大きな支障になっていることを考えると、抗精神病薬の慢性処置によって引き起こされる認知機能低下の分子メカニズムを明らかにする必要がある。

(2) ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）によるヒストンからのアセチル基除去は、クロマチン構造の凝集を引き起こし、遺伝子転写を抑制する⁶⁾。脳内の HDAC2 は、認知機能において重要な役割を果たしており、機能的・構造的にシナプス可塑性を抑制している⁶⁾。これまでも著者らのグループは、認知機能など脳高次機能において重要な脳部位である前頭皮質において慢性的な非定型抗精神病薬の慢性処置によって HDAC2 の発現が増加することを患者死後脳およびマウスを用いた実験から明らかにしている⁶⁾。しかしながら、非定型抗精神病薬による HDAC2 の発現増加が、抗精神病薬の作用にどのように関わっているか分かっていなかった。さらに、HDAC2 発現増加に至るシグナル経路も不明なままであった。

2. 研究の目的

慢性的な抗精神病薬処置により誘発される認知機能低下の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究では、マウスの認知機能の評価には、新奇物体認知試験、Y 迷路試験および水探索試験を用いた。また NF- κ B の *Hdac2* プロモーターへの結合を調べるためにクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法、プロモーター活性を調べるためにルシフェラーゼアッセイを行った。またマウスの脳における興奮性後シナプス（スパイン）の形態や数を調べるためにアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて eYFP を前頭皮質に発現させ、共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 慢性的な非定型抗精神病薬の処置により大脳皮質で誘導される HDAC2 の役割

定型抗精神病薬のハロペリドールと非定型抗精神病薬のクロザピン、リスペリドンで慢性的にマウスに処置したところ、グルタミ

ン酸神経における HDAC2 の過剰発現が認められた。セロトニン 5-HT_{2A} 受容体 (以下、5-HT_{2A} と表記) 欠損 (KO) マウスでは、そのような抗精神病薬の影響は認められなかった。さらに、HDAC2 発現誘導が遺伝子発現に与える影響を調べるために野生型 (wt) マウスおよびグルタミン酸神経特異的に HDAC2 を欠損させた *Hdac2*-KO マウスにクロザピンを慢性処置し、前頭皮質での RNA 発現を RNA-seq 法により網羅的に解析した。その結果、クロザピンの慢性処置によってポストシナプスの構造に関する遺伝子群の発現低下が認められたが、*Hdac2*-KO マウスではそのような遺伝子発現の変化は認められなかった。そこで次に前頭皮質の第 1 層の錐体細胞におけるスパイン (興奮性神経樹状突起上のポストシナプス) を GFP で可視化し、解析したところ wt マウスへの慢性的なクロザピンの処置は、成熟スパイン数の低下を引き起こした。さらに認知記憶を調べたところ慢性クロザピン処置は、認知記憶の低下を引き起こした。一方、*Hdac2*-KO マウスではそのようなスパインの変化および認知記憶の低下は認められなかった。以上から、慢性クロザピン処置による認知記憶の低下および成熟スパイン数の減少が、HDAC2 依存的に生じていることが示唆された。

(2) 非定型抗精神病薬による NF- κ B を介する HDAC2 転写の活性化

データベースを用いて調べたところ、I κ B α - NF- κ B シグナルが、*Hdac2* 発現制御に関与している可能性が考えられた。NF- κ B 活性化の古典的経路としては、IKK 複合体が I κ B α をリン酸化することで、I κ B α の分解が起こり、それにより抑制されていた NF- κ B (p65/p50 ヘテロダイマー) が活性化され、核内に移行し、転写因子として働くというものである。そこで前頭皮質の I κ B α および NF- κ B (p65) の発現を調べたところ、慢性的なクロザピン処置によって、マウスの前頭皮質における I κ B α の発現低下および NF- κ B の核内移行が認められたが、NF- κ B の発現そのものは影響を受けなかった。そこで核内移行した NF- κ B と *Hdac2* プロモーターの相互作用を調べたところ、蛍光異方性測定およびプロモーター解析から NF- κ B が *Hdac2* プロモーターに直接結合し、プロモーターを活性化すること、さらにクロマチン免疫沈降法からクロザピン慢性処置により *Hdac2* プロモーターへの NF- κ B の結合が、高まる事がわかった。しかし、5-HT_{2A}KO マウスでは慢性的なクロザピン処置による I κ B α - NF- κ B シグナルの活性化および *Hdac2* プロモーターへの NF- κ B の結合変化は認められなかった。さらに非定型抗精神病薬を処置されていた統合失調症患者の死後脳と無処置患者の死後脳を比較したところ、処置患者の前頭皮質において I κ B α の発現低下および NF- κ B の核内移行の増加が確認された。このことはマウスでの結果と一致していた。以上から、5HT_{2A} 依存的な I κ B α - NF- κ B

シグナルの活性化によって *Hdac2* 転写が活性化されることが明らかとなった。

(3)NF-κB 機能の抑制が、クロザピン処置による HDAC2 発現や認知に与える影響

クロザピンの作用における NF-κB の機能的役割を明らかにするために NF-κB の核内移行を抑制するドミナントネガティブ体の IκBα (dn-IκBα) を作製し、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて前頭皮質のグルタミン酸神経特異的に発現させたところ、クロザピン慢性処置による NF-κB の核内移行、HDAC2 の誘導および認知機能低下が抑制された。次に前頭皮質の NF-κB 機能そのものを抑制するために、大脳特異的に NF-κB サブユニットの 1 つである p65 の KO マウスを作出した。p65-KO マウスにクロザピンの慢性処置を行ったところ wt マウスで認められる HDAC2 の誘導および認知機能低下は見られなかったが、上流に位置すると考えられる IκBα の発現低下は確認できた。さらに NF-κB 抑制薬を脳内に微量投与しても、p65-KO マウスと同様の結果が得られた。以上より、非定型抗精神病薬による HDAC2 の誘導および認知機能低下作用には、前頭皮質グルタミン酸神経における NF-κB の核内への移行が必須であると考えられる。

(4)NF-κB 活性化による HDAC2 誘導が、シナプス可塑性および成熟スパインに与える影響

長期間の非定型抗精神病薬処置によって引き起こされる NF-κB シグナルの活性化そのものが、脳機能に与える影響について調べるために AAV を用いて活性化 IKK-β (caIKK-β) を前頭皮質の興奮性神経特異的に発現させたところ、コントロールマウスと比較して AAV-caIKK-β 発現マウスでは NF-κB の核内移行および HDAC2 発現の増加が認められた。また前頭皮質の caIKK-β 発現グルタミン酸神経細胞においてパッチクランプ法による長期増強を観察したところ LTP の低下および成熟スパイン数の減少が確認できた。しかし、caIKK-β による LTP および成熟スパイン数の低下は、*Hdac2*-KO マウスでは観察されなかった。

興味深いことに caIKK-β 発現マウスでは、認知機能の低下、薬物誘発性の多動や head-twitch 行動の悪化さらに社会性行動の異常も認められたが、いずれの行動異常も *Hdac2*-KO マウスでは認められなかった。また caIKK-β による成熟スパイン数の減少と認知機能低下の間には正の相関関係が確認できた。以上から、NF-κB 活性化によるシナプス可塑性・リモデリングの障害および行動異常は HDAC2 を介して引き起こされていることが明らかとなった。

<引用文献>

1. Husa, A.P., Rannikko, I., Moilanen, J., et al.: Lifetime use of antipsychotic medication and its relation to change of verbal learning and memory in midlife schizophrenia - an observational 9-year follow-up study. *Schizophr. Res.*, 158, 134-141 (2014).

2. Nielsen, R.E., Levander, S., Kjaersdam Telluus, G., et al. Second-generation antipsychotic effect on cognition in patients with schizophrenia--a meta-analysis of randomized clinical trials. *Acta Psychiatr. Scand.* 131, 185-196 (2015).
3. Schroder, N., de Lima, MN., Quevedo, J., et al.: Impairing effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on recognition memory: possible relation to oxidative stress. *Schizophr. Res.*, 73, 377-378 (2005).
4. Rosengarten, H. and Quartermain, D. The effect of chronic treatment with typical and atypical antipsychotics on working memory and jaw movements in three- and eighteen month-old rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 26, 1047-1054 (2002).
5. Hagan, J.J. and Jones, D.N. Predicting drug efficacy for cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 31, 830-853 (2005).
6. Kurita M, Holloway T, Garcia-Bea A et al.: HDAC2 regulates atypical antipsychotic responses through the modulation of mGlu2 promoter activity. *Nat. Neurosci.*, 15, 1245-1254 (2012)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

- Daisuke Ibi, Fumika Suzuki, Masayuki Hiramatsu. Effect of AceK (acesulfame potassium) on brain function under dietary restriction in mice, *Physiology & Behavior*, 査読有、188 巻、2018、291-297
DOI: 10.1016/j.physbeh.2018.02.024
- Amanda C. Mitchell, Behnam Javidfar, Venu Pothula, Daisuke Ibi, Erica Y. Shen, Cyril J. Peter, Lucy Bicks, Tristan Fehr, Yan Jiang, Kristen J. Brennan, Rachael L. Neve, Javier Gonzalez-Maeso, Schahram Akbarian. MEF2C transcription factor is associated with the genetic and epigenetic risk architecture of schizophrenia and improves cognition in mice, *Molecular Psychiatry*, 査読有、23 巻、2018、123-132.
DOI: 10.1038/mp.2016.254
- Daisuke Ibi, Mario de la Fuente Revenga, Nebojsa Kezunovic, Carolina Muguruza, Justin M Saunders, Supriya A Gaitonde, José L Moreno, Maryum K Ijaz, Vishaka Santosh, Alexey Kozlenkov, Terrell Holloway, Jeremy Seto, Aintzane Garcia-Bea, Mitsumasa Kurita, Grace E Mosley, Yan Jiang, Daniel J Christoffel, Luis F Callado, Scott J Russo, Stella Dracheva, Juan F López-Giménez,

Yongchao Ge, Carlos R Escalante, J Javier Meana, Schahram Akbarian, George W Huntley, Javier González-Maeso.

Antipsychotic-induced *Hdac2* transcription via NF- κ B leads to synaptic and cognitive side effects, *Nature Neuroscience*, 査読有、9 巻、2017、1247-1259
DOI: 10.1038/nn.4616

〔学会発表〕(計 14 件)

平田明里、衣斐大祐、小出菜優、木下真帆、間宮隆吉、平松正行 . 胎生期の免疫異常応答が、表現型の世代間継承に与える影響、第 138 回日本薬学会年会(金沢、2018/3/28)

衣斐大祐、大谷駿人、吉田朱里、平嶋一貴、間宮隆吉、平松正行 . Neuro2A 細胞における A 25-35 処置による細胞毒性に対するベタインの抑制作用、第 138 回日本薬学会年会(金沢、2018/3/28)

藤木佑有、衣斐大祐、小出菜優、間宮隆吉、平松正行 . 父マウスへのバルプロ酸連続投与が仔マウスの行動に与える影響、第 132 回日本薬理学会近畿部会(大阪、2017/11/24)

Norimichi Ito, Taku Nagai, Daisuke Ibi, Akira Nakajima, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada . Ifitm3 regulates poly I:C-induced neuronal impairment via rab small gtpase, *Neuroscience 2017* (ワシントン DC (USA)、2017/11/14)

Daisuke Ibi, Mario de la Fuente Revenga, Javier González-Maeso . A critical role for NF- κ B in the HDAC2-dependent control of synaptic remodelling and antipsychotic-related behaviours, *Neuroscience 2017*(ワシントン DC (USA)、2017/11/13)

Mario de la Fuente Revenga, Daisuke Ibi, Javier González-Maeso . Epigenetic role of HDAC2 in the limited therapeutic effect of the mGlu2/3 receptor agonist

pomaglumetad after chronic atypical antipsychotic treatment, *Neuroscience 2017* (ワシントン DC (USA)、2017/11/11)

小出菜優、衣斐大祐、間宮隆吉、平松正行 . Effects of maternal immune activation on the mossy fiber density and Reelin expression in the hippocampal dentate gyrus in the offspring of mice、第 60 回日本神経化学会(仙台、2017/9/7)

平嶋一貴、衣斐大祐、角谷佳保里、間宮隆吉、平松正行 . Effects of diet restriction on cognitive impairments and decreased hippocampal GAT2 expression in a genetic mouse model of Alzheimer's disease、第 60 回日本神経化学会(仙台、2017/9/7)

角谷佳保里、衣斐大祐、平嶋一貴、間宮隆吉、平松正行 . Effects of chronic betaine intake on learning and memory impairments

and hippocampal GAT2 expression in genetic mouse model of Alzheimer's disease、第 60 回日本神経化学会(仙台、2017/9/7)
吉田朱里、衣斐大祐、間宮隆吉、平松正行 . 過酸化水素誘導性細胞死における NF- κ B - HDAC2 シグナルの役割、生体機能と創薬シンポジウム 2017 (京都、2017/8/24)

鈴木杏奈、衣斐大祐、石田圭介、松竹友基、間宮隆吉、平松正行 . ペンチレンテトラゾール誘発性キンドリングてんかんモデルマウスの海馬における遺伝子発現変化に HDAC2 が与える影響、第 63 回(平成 29 年度)日本薬学会東海支部総会・大会(岐阜、2017/7/10)

吉田朱里、衣斐大祐、石田圭介、鈴木杏奈、間宮隆吉、平松正行 . 転写因子 EGR1 が HDAC2 プロモーター活性に与える影響、第 63 回(平成 29 年度)日本薬学会東海支部総会・大会(岐阜、2017/7/10)

平嶋一貴、衣斐大祐、角谷佳保里、間宮隆吉、平松正行 . 家族性アルツハイマー病モデルマウスにおける学習・記憶障害と GABA transporter 2 タンパク発現解析、第 131 回日本薬理学会近畿部会(名古屋、2017/6/30)

角谷佳保里、衣斐大祐、平嶋一貴、間宮隆吉、平松正行 . 学習・記憶障害モデルマウスにおけるベタイン飲水摂取の効果、第 131 回日本薬理学会近畿部会(名古屋、2017/6/30)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-yaku.meijo-u.ac.jp/kenkyu/chemical-pharmacology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

衣斐 大祐 (Ibi, Daisuke)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：40757514

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()