

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18500289

研究課題名（和文）神経栄養因子ミドカイン機能低下と統合失調症における感覚ゲート機構障害

研究課題名（英文）Sensory gating deficits in schizophrenia and midkine deficiency

研究代表者

氏名（ローマ字）：清水 栄司（SHIMIZU EIJI）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00292699

研究成果の概要：

神経栄養因子ミドカインの欠損マウスの感覚運動ゲート機構障害は、グルタミン酸系ではなく、神経変性のないドーパミン系の機能低下と、その下流にある MAP カイネース ERK のリン酸化の慢性的な亢進によることが示され、ミドカインと統合失調症の関連性が示唆された。また、ヒトで、聴覚誘発電位 P50 での感覚ゲート機構検査では、統合失調症だけでなく強迫性障害や健常者への条件づけでも抑制性障害がみられることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	630,000	4,230,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経化学・神経薬理学 1103

キーワード：統合失調症、神経栄養因子、感覚ゲート機構、プレパルス抑制、P50 抑制

## 1. 研究開始当初の背景

ミドカイン（MK）は、1988年にクローニングされた分子量 13 kDa、118 個のアミノ酸からなるヘパリン結合性分泌タンパクであり、45%の塩基配列の相同性を有するプレイオトロフィン（PTN）と 2 つで新しいファミリーを構成し、他のヘパリン結合性増殖因子（FGF、HGF など）とは明らかに区別される。MK は、癌の発生、進展に早期から関わるということが知られている一方、神経栄養因子、分化因

子としての作用、神経突起伸長促進作用、神経接着作用がみられるため、脳の発達における役割が注目されていた。中枢神経系における MK の顕著な発現は、胚発生早期に始まり、出生までで終わる。MK の脳室から外側へ放射状に伸びる radial glial process における局在から、ニューロン・グリア間の信号伝達によって、神経細胞の移動（migration）による発達期の脳の構築への関与が示唆されている。作製された MK ノックアウトマウスは、外見上大きな変化を認めないものの、海

馬歯状回の一過性発達遅延を示し、発達期に Working Memory の障害と不安の亢進を示すことが明らかとなった (Genes to Cells, 1998)。また、我々は、萌芽的研究として、統合失調症患者血清での MK の低下 (Neurosciences Letters, 2003) を検出した。

## 2. 研究の目的

基礎研究では、MK ノックアウトマウスにみられる sensory gating システムの異常が、どのような分子メカニズムにおいて起こっているのかを、解明する。

臨床研究として、ヒトにおいて、事象関連電位のひとつである P50 抑制障害を脳波検査機器によりとらえることで、sensory gating システムの異常が、どのような病態と関連しているかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

基礎研究では、小動物用驚愕反応測定装置を用いて、PPI (Prepulse Inhibition) の障害を検討し、PPI の異常が、haloperidol, clozapine, glycine, D-serine, D-cycloserine のどのような薬物投与により、改善されるか検討する。MK ノックアウトマウスと野生型マウスに関して、前頭皮質、海馬、線条体などの脳部位をそれぞれ取り出し、ドーパミン系およびグルタミン酸系の神経伝達物質測定、さらに、タンパクを抽出し、MAP カイネース系など、MK 下流の信号伝達系に関して、リン酸化の変化を、Western Blot で検討する。社会相互作用 (Social Interaction) テスト、オープンフィールドテスト、新規物体テスト、移所運動量の測定などの行動実験を行う。tyrosine hydroxylase (TH) と calbindin-D28K (CB) の免疫染色を行う。

臨床研究では、Informed Consent の得られた患者および健常者を対象に、P50 抑制テストを行う。具体的には、被験者に聴覚刺激 (70-100 dB, 500msec 間隔で 120 対のクリック音) を行い、事象関連電位として観察される P50 を脳波計によりとらえる。先行する条件づけ時 P50 波の振幅と後続するテスト時 P50 波の振幅をそれぞれ測定し、比として、P50 抑制障害について検討する。さらに、Informed Consent の得られた患者および健常者を対象に、脳血流 SPECT を実施して、その血流変化を比較する。

## 4. 研究成果

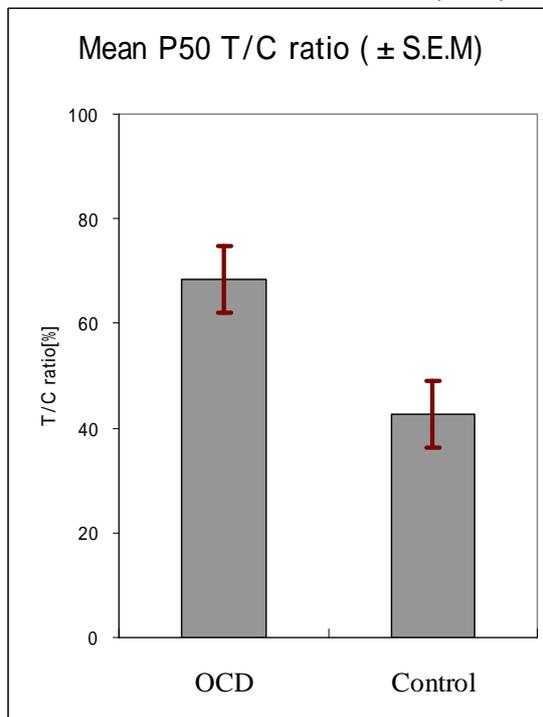
基礎研究では、

成体期 (生後 2 から 4 ヶ月) のミドカインノックアウトマウス (MK-KO) において、感覚運動ゲート機構である Prepulse Inhibition (PPI) の障害を検出したことに加えて、社会相互作用 (Social Interaction) テストにおいて、MK-KO は、野生型に比べて、有意に、2 匹のマウスの接触の頻度がより少なかった。一方で、MK-KO は、オープンフィールドテストおよび新規物体テストでは、野生型と差がなく、不安を意味するような探索行動は、変化がみられなかった。さらに、生後 4 週齢の MK-KO では、PPI の障害は、見られず、成熟依存性の PPI の障害であった。MK-KO における線条体のドーパミン、DOPAC、HVA の含量は、は野生型に比べ有意に減少、線条体のドーパミン D1、D2 受容体結合能も低下のようなドーパミン機能の低下に対して、グルタミン酸系に関しては、前頭と海馬におけるグルタミン酸、グルタミン、グリシン、D-セリンおよび L-セリンの測定、前頭と海馬における NMDA 受容体密度の測定、NMDA 受容体の選択的非競合的遮断薬 MK-801 によって誘発される移所運動量の測定を行ったが、それぞれ MK-KO と野生型に差はなかった。さらに、MK-KO の PPI 障害における抗精神病薬の改善効果を調べるために、haloperidol (0.1 or 0.2 mg/kg, i.p.) および clozapine (1 or 3 mg/kg, i.p.) を、MK-KO に投与したところ、野生型と同じレベルにまで、PPI 障害が改善された。また、MK KO マウスと野生型 (WT) マウスに関して、tyrosine hydroxylase (TH) と calbindin-D28K (CB) の免疫染色を行ったが、ドーパミン神経系の変性脱落などの所見は認めなかった。さらに、25-31 週齢の加齢マウスにおいて、MK-KO と WT での移所運動量を、パーキンソン病を起こす神経毒 MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 30mg/kg 投与前後で検討したが、有意差は認められなかった。以上から、MK-KO マウスは、グルタミン酸系に異常はみられず、神経変性のない、ドーパミン機能低下によって、PPI の障害を呈していることが示唆された。以上の MK-KO マウスの研究成果が報告された (Ohgake et al., 2009) さらに、MK KO マウスに関して MAP カイネースのリン酸化機構の解析を行ったところ、ERK のリン酸化の慢性的な亢進を認めた。以上の結果から、MK 欠損が、成体マウスの脳に、神経変性のない、ドーパミン機能の低下を起こし、統合失調症や自閉症のような、ドーパミンに関連した神経精神疾患の動物モデルでみられる、PPI の障害を呈することが明らかになった。

また、PPI について、8 週齢の雄性 d/dy マウスにおいて、NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 誘発

性 PPI 障害を改善させる効果が高用量の glycine と D-serine にはあるが、D-cycloserine にはないことを明らかにした(Kanahara et al., 2008)。NMDA 受容体の glycine 結合部位の antagonist である L701,324 によって、改善作用がなくなる結果から、glycine は、NMDA 受容体の glycine 結合部位へと作用することで、PPI 改善効果を示していることが明らかとなった。また、glycine の腹腔内投与は、左前頭前野の glycine 濃度を 20 倍も増加させることが、脳内微小透析と高速液体クロマトグラフィーにより明らかにできた。glycine と D-serine の感覚ゲート機構の改善作用の、D-cycloserine に対する優位性を示す結果を得た。

臨床研究として、統合失調症にみられる sensory gating システムの異常である事象関連電位 P50 抑制障害が、強迫性障害 (OCD) においてもみられることを世界ではじめて発見した (Hashimoto et al., 2008) (図 1)。



さらに、健常者において、恐怖条件づけをすることで一過性にみられ、恐怖除去によって、再び正常化することを世界ではじめて発見した (Kurayama et al., 2009)。また、統合失調症の脳血流について、健常者と第一エピソード患者と慢性期患者を比較したところ、患者群で、中、下、内側前頭回、前帯状回の低下は共通だが、慢性期では、低下部位が下頭頂皮質、側頭葉後部、楔部にまで拡大していることが明らかとなり、疾患の進行に伴う機能低下領域の拡大を示唆する所見を得た

(Kanahara et al., 2009)。

## 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 14 件)

1. Kurayama T, Nakazawa K, Matsuzawa D, Yoshida S, Nanbu M, Suto C, Shimizu E. Alterations of auditory p50 suppression in human fear conditioning and extinction. *Biol Psychiatry* 65(6) 495-502 2009 査読有

2. Kanahara N, Shimizu E, et al. Does hypofrontality expand to global brain area in progression of schizophrenia?: A cross-sectional study between first-episode and chronic schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(3) 410-415 2009 査読有

3. Ohgake S, Shimizu E, et al. Dopaminergic hypofunctions and prepulse inhibition deficits in mice lacking midkine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(3) 541-546 2009 査読有

4. Yoshida S, Nakazawa K, Shimizu E, Shimoyama I. Anticipatory postural adjustments modify the movement-related potentials of upper extremity voluntary movement. *Gait Posture* 27(1) 97-102 2008 査読有

5. Kanahara N., Shimizu E. et al. Glycine and D-serine, but not D-cycloserine, attenuate prepulse inhibition deficits induced by NMDA receptor antagonist MK-801. *Psychopharmacology* 198(3):363-74. 2008 査読有

6. Hashimoto T, Shimizu E, et al. Deficits in auditory P50 inhibition in obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(1) 288-296 2008 査読有

7. Okamura N, Hashimoto K, Iyo M, Shimizu E, et al. Gender-specific association of a functional coding polymorphism in the Neuropeptide S receptor gene with panic disorder but not with schizophrenia or attention-deficit/hyperactivity disorder.

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry  
31(7) 1444-1448 2007 査読有

8. Matsuzawa D, Hashimoto K, Miyatake R, Shirayama Y, Shimizu E, et al. Identification of functional polymorphisms in the promoter region of the human PICK1 gene and their association with methamphetamine psychosis. Am J Psychiatry 164(7) 1105-1114 2007 査読有

9. Shimizu E, Watanabe H, Kojima T, Hagiwara H, Fujisaki M, et al. Combined intoxication with methylone and 5-MeO-MIPT. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 31(1) 288-91 2007 査読有

10. Shimizu E, Imai M, Fujisaki M, Shinoda N, Handa S, et al. Maintenance electroconvulsive therapy (ECT) for reatment-resistant disorganized schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 31(2) 571-3 2007 査読有

11. Shimizu E, Hashimoto K, Ochi S, Fukami G, Fujisaki M, et al. Posterior cingulate gyrus metabolic changes in chronic schizophrenia with generalized cognitive deficits. J Psychiatr Res 41(1-2) 49-56 2007 査読有

12. Zhang L, Shirayama Y, Shimizu E, IYO M, Hashimoto K. Protective effects of minocycline on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in serotonergic and dopaminergic neurons of mouse brain. Eur J Pharmacol 544(1-3) 1-9 2006 査読有

13. Ito T, Sakakibara R, Nakazawa K, Uchiyama T, Shimizu E, et al. Effects of electrical stimulation of the raphe area on the micturition reflex in cats. Neuroscience 142(4) 1273-80 2006 査読有

14. Zhang L, Kitaichi K, Fujimoto Y, Nakayama H, Shimizu E, et al. Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 30(8) 1381-93 2006 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

1. 倉山太一、中澤健、松澤大輔、橋本佐、南部誠、吉田晋、伊豫雅臣、清水栄司  
古典的恐怖条件づけの獲得および消去過程における聴性誘発電位 P50 抑制の変化  
第 38 回日本臨床神経生理学会学術大会、  
神戸国際会議場、  
2008 年 11 月 12 日から 14 日

2. Nobuhisa Kanahara, Eiji Shimizu, Shintaro Ohgake, Kenji Hashimoto, Yuko Fujita, Tasuku Hashimoto, Yukihiro Shirayama, Masaomi Iyo  
Glycine improves MK-801 induced prepulse inhibition deficits in a way similar to D-serine.  
第 29 回日本生物学的精神医学会・第 37 回日本神経精神薬理学会・合同年会 札幌、  
2007 年 7 月 11 日

3. 清水栄司、金原信久、内田佳孝、橋本佐、原口正、松澤大輔、宮武良輔、藤崎美久、白山幸彦、浅野誠、橋本謙二、伊豫雅臣  
3D-SSP-SPECT による統合失調症患者の脳血流変化～病初期群、亜慢性群、慢性群における比較検討～  
第 2 回日本統合失調症学会 富山国際会議場 (富山) 2007 年 3 月 24 日

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/phys1/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 栄司 (SHIMIZU EIJI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00292699

(2) 研究分担者

伊豫 雅臣 (IYO MASAOMI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50191903

橋本 謙二 (HASHIMOTO KENJI)

千葉大学・社会精神保健教育センター・教授

研究者番号：10189483

藤崎 美久 (FUJISAKI MIHISA)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30361447  
深見 悟郎 (FUKAMI GORO)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70361433

(3)連携研究者

伊豫 雅臣 (IYO MASAOMI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：50191903  
橋本 謙二 (HASHIMOTO KENJI)  
千葉大学・社会精神保健教育センター・教授  
研究者番号：10189483

藤崎 美久 (FUJISAKI MIHISA)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30361447  
深見 悟郎 (FUKAMI GORO)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70361433