

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591391
 研究課題名（和文） Fyn チロシンキナーゼ活性化を介する抗精神病薬の作用機序に関する
 精神薬理学的解析
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of antipsychotic function
 through fyn-tyrosine kinase
 研究代表者
 服部 功太郎 (HATTORI KOTARO)
 国立精神・神経センター 神経研究所 微細構造研究部 室長
 研究者番号：50415569

研究成果の概要：

異なる性質の抗精神病薬が共通して大脳皮質や側坐核の Fyn を活性化し NMDA 受容体など基質のリン酸化を促すことがマウスを用いた解析により判明した。したがって Fyn の活性化は抗精神病薬の作用機序に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、統合失調症血中に多い Fyn 変異体を見つけ、正常 Fyn 機能に対しドミナント・ネガティブ効果を示すことを見出した。さらに、Fyn の下流にある情報伝達分子をプロテオーム解析により複数同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：抗精神病薬、統合失調症、Fyn チロシンキナーゼ、ドーパミン D2 受容体、NMDA 受容体、シグナル伝達、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の病因は未だ不明であるが、その病態に関して、ドーパミン D2 受容体 (D2R) 拮抗薬が陽性症状を軽減すること、NMDA 受容体 (NMDAR) 拮抗薬が陽性・陰性症状を誘発・悪化させることは広く認められている。したがって D2R と NMDAR との機能関連は、統合失調症の分子病態において重要な役割を果たしていると考えられる。この機能関連については、従来、数段階のシナプス伝達を介して間接的に生じているとする説が主流であったが、近年、両受容体の直接的な機能関連が

様々な脳領域の神経細胞で見いだされた。この D2R と NMDAR とを結ぶ細胞内情報伝達機構については、ほとんど分かっていなかったが、Fyn チロシンキナーゼが両者の間に介在することを我々は最近つきとめた (Hattori et al, 2006)。Fyn 欠損マウスが D2R 拮抗薬に対して反応が弱いことを偶然みつけ、D2R 拮抗薬がマウス線条体の Fyn を活性化させ、活性化した Fyn が NMDAR をリン酸化して興奮性を高めることを見出した。この研究により、抗精神病薬作用の分子機序の一つとして D2-R→Fyn→NMDA-R というシグナル伝達系が関わるこ

とが初めて明らかになった。しかし、選択的 D2R 拮抗薬以外の抗精神病薬の効果や、線条体以外の脳部位における Fyn や NMDAR におよぼす効果は分かっていなかった。また、上記の研究の過程で、D2R 拮抗薬の投与によりチロシンリン酸化を受ける分子が NMDAR 以外にも複数存在することが示唆されたが、それらの同定はされていなかった。(研究開始当初、一部同定していたが、主要なものでないことが後に判明した。)

2. 研究の目的

抗精神病薬による Fyn 活性化の精神薬理学的意義と、細胞内情報伝達系を介した抗精神病薬の作用メカニズムを明らかにすること。そのために、下記の解析を行うこと。

- (1) 精神症状に関連する脳部位における Fyn 活性化の解析
- (2) D2R 拮抗薬以外の抗精神病薬の効果の解析
- (3) 抗精神病薬投与により Fyn の下流でリン酸化を受ける分子の同定

3. 研究の方法

- (1) 精神症状に関連する脳部位における Fyn 活性化の解析

マウス脳の各領域、特に精神症状と関わり深い前頭皮質、側坐核、海馬、線条体について、薬物投与後にパンチアウトし、ウェスタンブロットにて、D2R 拮抗薬による Fyn の活性化、NMDAR のリン酸化などを検討した。さらに、用量や時間経過の影響も解析した。

- (2) D2R 拮抗薬以外の抗精神病薬の効果の解析

ハロペリドールのように D2R 拮抗作用を中心とする薬物だけでなく、クロザピン、オランザピンなど異なる受容体親和性プロファイルをもつ抗精神病薬を用いて、上記の解析を行った。

- (3) 抗精神病薬投与により Fyn の下流でリン酸化を受ける分子の同定

抗精神病薬を投与後のマウス脳を材料とし、イオン交換、ゲル濾過、リン酸化特異抗体による精製をへて、LC-MS/MS 解析により同定した。免疫沈降や、培養細胞を用いた発現実験、Fyn 欠損マウスを用いた解析により、リン酸化を受ける基質としての評価を行った。

- (4) 統合失調症に関連した Fyn の異常変異体の機能解析

研究の過程で統合失調症血中において fyn のスプライス変異体 (exon7 が欠如した fyn Δ 7) の発現が更新していることを

見出した。そこで、培養細胞を用いた遺伝子発現実験、in vitro キナーゼ・アッセイなどにより、この変異体の基質に対するリン酸化能などを解析した。

4. 研究成果

- (1) 精神症状に関連する脳部位における Fyn 活性化の解析

マウスの局所部位を、スライスおよびパンチアウトにより切り出し、得られた組織のタンパクをウェスタンブロットで解析する、微量解析系を開発した。これを用い、ハロペリドール投与後のマウス脳を検討したところ、前頭皮質、側坐核、線条体において、用量依存性の Fyn 活性化、NMDAR リン酸化などが認められた。また、それらの変化の時間経過についても解析を行った (投稿中)。

- (2) D2R 拮抗薬以外の抗精神病薬の効果の解析

上記(1)の系を用い、第 2 世代抗精神病薬のクロザピン、オランザピンについても解析を行った。両者とも、前頭皮質、側坐核においては、ハロペリドールと同様の変化を用量依存的に誘導した。一方、外側線条体では、抗精神病薬の種類により異なる反応性を示した。前頭皮質、側坐核は精神症状にかかわるため、これらの部位における Fyn 活性化、NMDAR リン酸化は、抗精神病薬を反映している可能性があった。一方、外側線条体は錐体外路系副作用にかかわるため、この部位における薬剤ごとの反応性の違いは、副作用の違い (ハロペリドールは体外路症状を誘発しやすいが、クロザピンは生じにくいなど) を反映していると考えられた。これらの発見は、抗精神病薬の作用機序に新たな視点を加えただけでなく、抗精神病薬創薬のためのマーカーとしても使用できる可能性があると考えられた (上記とともに投稿中)。

- (3) 抗精神病薬投与により Fyn の下流でリン酸化を受ける分子の同定

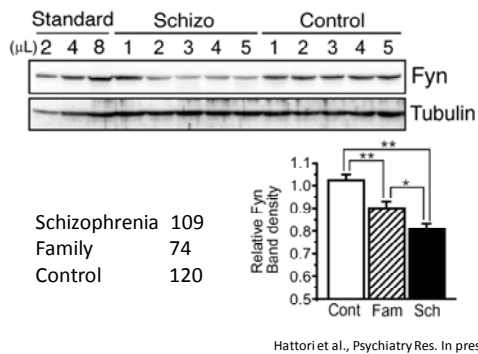
当初、免疫沈降後の LC-MS/MS 解析により、hnRNPU などのタンパクが同定されたが、解析の結果、主要な目的分子ではないことが判明した。そこで、イオン交換、ゲル濾過、抗体アフィニティーカラムなどを組み合わせて精製度を高めたところ、2つの主要分子を同定することができた。これらは、複数の抗精神病薬投与でリン酸化が亢進すること、Fyn がいないとその変化がみられないことなどが判明した。これらの分子の発見は抗精神病薬の作用機序の解明につながるだけでなく、新た

な治療標的として創薬へと結びつく可能性がある。(投稿準備中)

(4) 統合失調症に関連した Fyn の異常変異体の機能解析

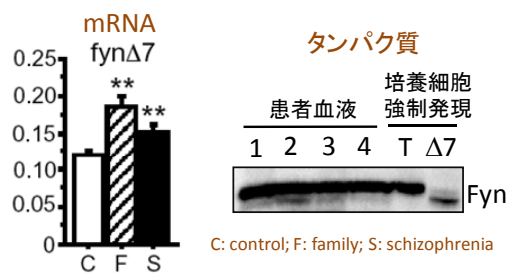
まず、統合失調症の末梢血検体において Fyn のタンパク量が減少していることを見出した(下図)。

統合失調症血液におけるFynタンパク



このメカニズムを調べるために、fyn の mRNA 発現を調べたところ、発現量自体には明らかな差がみられなかったが、エクソンの7番を欠如した fyn Δ7 という異常なスプライシング・アイソフォームの割合が増えていた。この Fyn Δ7 はタンパクとしても患者血中に存在していた。(下図)。

統合失調症血液における fynΔ7 の mRNA とタンパク質

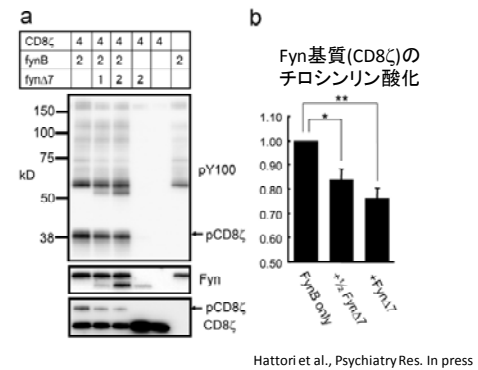


Fyn Δ 7 を培養細胞に発現させると、キナーゼとしての活性がないうえ、正常な Fyn に対してドミナントネガティブ効果をもつことが判明した。すなわち、下図のように、Fyn のもつ基質 (CD3ζ) リン酸化能は、Fyn Δ 7 の共発現により抑制された。これらの現象を論文にまとめ Psychiatry Research に受理された。

Fyn の減少、fyn Δ 7 の発現亢進についてはバイオマーカーとしての利用法を考え、今後、大量検体を用いた検討や、疾患特異性、病勢や投与薬剤量などとの関連を調べていく必要があると考えられた。また、Fyn

の変化が統合失調症分子病態にどのようにかかわるか、死後脳などでの解析とともに、(1)~(3)のような精神薬理的・分子生物学的検討を進展させていく必要性があると考えられた。

FynΔ7のDominant-negative効果



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1件)

Hattori K, Fukuzako H, Hashiguchi T, Hamada S, Murata Y, Isosaka T, Yuasa S, Yagi T. Decreased expression of Fyn protein and disbalanced alternative splicing patterns in platelets from patients with schizophrenia. Psychiatry Res., 査読有、in press.

[学会発表] (計1件)

服部功太郎 Fyn チロシンキナーゼ活性化を介する抗精神病薬作用機序の解析、Neuro2007、平成19年9月10日、横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 功太郎 (HATTORI KOTARO)

国立精神・神経センター 神経研究所 微細構造研究部 室長

研究者番号: 50415569

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者