

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

2013年6月11日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010年～2012年

課題番号：22591269

研究課題名（和文）抗精神病薬シグナル伝達を利用した統合失調症の新たな治療標的分子の開発

研究課題名（英文）Development of a new therapeutic target molecule for schizophrenia from antipsychotics signaling

研究代表者

服部 功太郎 (HATTORI KOTARO)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第3部 室長

研究者番号：50415569

研究成果の概要（和文）：

抗精神病薬の引き起こす Fyn キナーゼ活性化の下流分子として新たに二つの分子を同定した。二つの分子のうち、一方については抗精神病薬投与によるリン酸化部位の同定も行った。また、統合失調症死後脳では Fyn のタンパク質の発現が亢進していること、ドーパミン等の開口放出に関わる CADPS2 の mRNA 発現が亢進していることも見出した。さらに脳脊髄液を用いた解析では Fyn の活性制御に関わる IL-6 の増加、ドーパミンの代謝産物である HVA の増加を見出した。以上のように、抗精神病薬のシグナル伝達に関わる分子群が新たに見出され、一部は統合失調症の分子病態に関わることが明らかとなった。治療標的になりうるか否かについては更に解析が必要である。

研究成果の概要（英文）：

We have identified two molecules as downstream substrates for Fyn-mediate anti-psychotic signaling. For one of those molecules, we also determined antipsychotics-mediate phosphorylation sites. Using post-mortem brain samples, we found that the Fyn protein levels are increased in the schizophrenia frontal cortices compared to the controls. Also, the mRNA expression of CADPS2, which is involved in the exocytosis of monoamines, was increased in schizophrenia brains. In the cerebrospinal fluids, the levels of IL-6, which is upstream regulator of Fyn, and the levels of dopamine metabolite, HVA, were increased in schizophrenia. Thus, we have identified a group of molecules involved in antipsychotic signaling and, found that a part of those molecules should be involved in the schizophrenia pathology. Further research is required to clarify whether those molecules could be therapeutic targets for schizophrenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1500000	450000	1950000
2011年度	1400000	420000	1820000
2012年度	500000	150000	650000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：医歯薬学

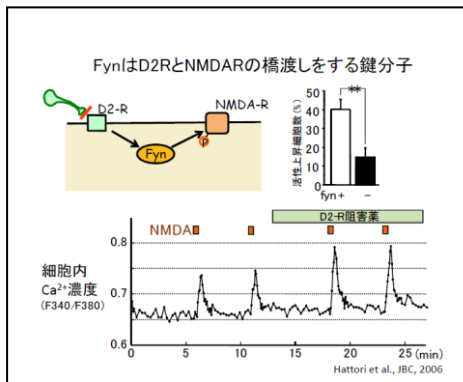
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：神経科学, 精神疾患, 薬理学, シグナル伝達

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。

我々は、このD2RとNMDARとを結ぶ経路にFynチロシンキナーゼが存在し、D2RによるNMDARの制御を担っていることを近年つきとめていた(Hattori et al, 2006)。すなわち、通常の線条体神経細胞ではD2Rの阻害でNMDARの活性が上昇するが、Fyn欠損細胞では、その効果は著しく減じていた。また、マウスにハロペリドールを投与するとFynは活性化しNMDARのリン酸化が生じるが、Fyn欠損マウスでは、そのような反応が消失していた。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D2R→Fyn→NMDARというシグナル伝達系が関わることが明らかとなっていた。



さらにプロテオミクス解析により、抗精神病薬によりリン酸化されるFyn下流分子を複数同定していた。

一方、我々は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も見出していた(Hattori et al, 2009)。fynのmRNAの発現量自体には明らかな差がみられなかったが、fynの異常なスプライシング変異体fyn Δ 7の割合が増えていた。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ていた。

2. 研究の目的

本研究では抗精神病薬下流のシグナル伝達機構を明らかにし、新たな治療薬の分子ターゲットの発見を目指す。

具体的には、抗精神病薬により活性化するFynと、その下流分子の精神薬理学的機能を

明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Fyn下流分子の同定

これまでのLC-MSを用いた予備的解析により、抗精神病薬投与でFynを介してリン酸化が亢進すると考えられた2分子(分子A、B)について、まず、免疫沈降を用いた確認実験を行った。

マウスにHaloperidolおよびClozapine, Olanzapine, Salineを投与し、大脳皮質、線条体を取り出した。各分子の特異的抗体で免疫沈降後、ウェスタンブロットで比較解析を行った。さらに、分子Aについては、主要な6個のチロシン残基をリン酸化特異抗体で解析した。分子Bについては、LC-MS/MS法を用いたリン酸化部位の同定も試みた。

(2) 死後脳検体を用いた解析

当初、臨床検体を用いた解析は計画していなかった。しかし、動物モデルの限界を学会等で指摘されることが多く、Fynシグナル伝達の抗精神病効果における役割を考える上で、患者試料の解析の必要性を痛感した。そこで、スタンレー研究所より供与された統合失調症15例を含む死後脳前頭皮質60検体を用い、Fynの活性状態や下流分子をSandwich ELISAやDot-blot法を用いて解析した。さらに、fyn mRNAの発現解析や、シナプスの開口放出に関わりfynとの関係が示唆される、CADPS2の発現解析もqPCRを用いて行った。

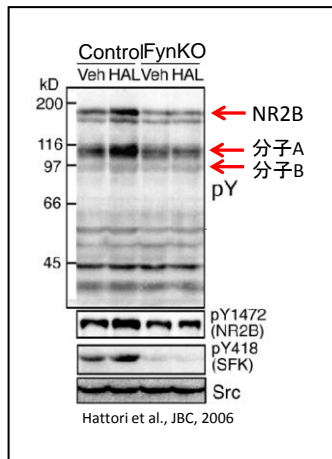
(3) 脳脊髄液を用いた解析

次に我々が現在収集を行っている脳脊髄液を用いた解析を行うことにした。既に400検体以上集積し、症状や抗精神病薬投与量との相関の解析も可能であるため、本研究目的に合致していると思われた。具体的にはFynの測定やFynの上流制御分子のひとつであるインターロイキン-6(IL-6)の量をELISAを用いておこなった。さらにドーパミンの代謝産物であるホモバニリン酸(HVA)の測定もHPLCを用いて行った。

4. 研究成果

(1) Fyn下流分子の同定

抗精神病薬投与によりFynを介してリン酸化する新規同定分子のうち、一方(分子A)についてはリン酸化部位が明らかになった。マウスに抗精神病薬を投与すると、6個のチロシン残基のうち、機能的に重要な3つの残基のリン酸化が有意に亢進した。分子Bについては、リン酸化部位の同定はできなかったものの、抗精神病薬でチロシンリン酸化が亢進することを免疫沈降で確認した。

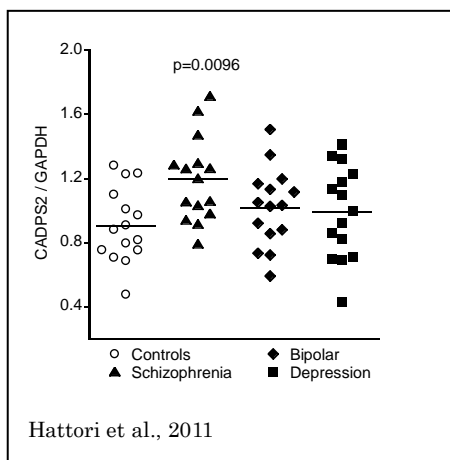


(2) 死後脳を用いた解析

統合失調症死後脳検体では、Fyn タンパク質の発現量およびFynの活性が有意に亢進していることが明らかとなった。一方、下流分子AおよびBの量自体には変化がなかった。

再現確認用の105検体(統合失調症、健常、双極性障害各35例)のコホートでもFynタンパク質が増加していることを確認した。両コホートともFynのタンパク質の量と抗精神病薬の生涯投与量との間に相関はみられなかった。またマウス(n=15)にリスペリドンを経口投与し、溶媒投与群と比較した場合でも前脳におけるFynタンパク質の量に変化を認めなかった。以上のように統合失調症死後脳におけるFynタンパク質の量の変化は、2種のコホートの盲研解析で確認されたため、統合失調症の分子病態に関わっている可能性が高いと考えられた。

また、fyn mRNA 発現では健常群と統合失調症群との間に明らかな違いはみられなかった。一方、発現部位やドーパミン受容体機能との関わりからFynとの関連が示唆されたCADPS2については、統合失調症群で発現が亢進していることを見出した(Hattori et al., 2011)。

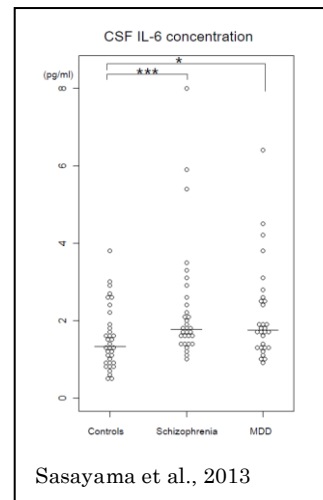


(3) 脳脊髄液の解析

脳脊髄液中のFynタンパク質の濃度は低く、

測定が困難であった。今後も感度の向上を試みていく予定である。

一方、インターロイキン-6(IL-6)は測定可能でありELISAで解析を行った。その結果、健常群と比較し統合失調症群およびうつ病群では有意にIL-6が増加していた。治療薬との相関はなく、また血中濃度との相関も認められなかった。血液中より髄液中の方がIL-6濃度は高かった。IL-6は血液脳関門を通過し、脳においても視床下部のプロスタグランジン産生など重要な役割を果たすことが知られており、脳におけるFynの活性化や統合失調症脳病態に関わっている可能性があると考えられた(Sasayama et al., 2013)。



HVAについても統合失調症群で有意な増加がみられた。HVA量はPANSSスコアと相関し、HVAが低いほど重症度が高かった。

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6件)

- ① Sasayama D, Hattori K, Wakabayashi C, Teraishi T, Hori H, Ota M, et al. Increased cerebrospinal fluid interleukin-6 levels in patients with schizophrenia and those with major depressive disorder. 査読あり、2013, J Psychiatr Res. doi: 10.1016/j.jpsychires.2012.12.001.
- ② 服部功太郎, 功刀浩 うつ病の脳脊髄液マーカー 医学のあゆみ 244(5): 502-506, 2013.
- ③ Sasayama D, Hattori K, Teraishi T, Hori H, Ota M, Yoshida S, et al. Negative correlation between cerebrospinal fluid oxytocin levels and negative symptoms of male patients with

schizophrenia. Schizophr Res. 査読あり、2012, 139(1-3):201-6. doi: 10.1016/j.schres.2012.06.016

- ④ Hattori K, Tanaka H, Yamamoto N, Teraishi T, Hori H, Kinoshita Y, et al. Blood CADPS2DeltaExon3 expression is associated with intelligence and memory in healthy adults. Biol Psychol. 査読あり、2012, 89(1):117-22. doi: 10.1016/j.biopsycho.2011.09.017.
- ⑤ 服部 功太郎, 寺石 俊也, 篠山 大明, 功刀 浩 脳脊髄液 (CSF) からみた統合失調症のモノアミン代謝産物の解析 精神科治療学 26(12): 1557-1563, 2011
- ⑥ Hattori K, Tanaka H, Wakabayashi C, Yamamoto N, Uchiyama H, Teraishi T, et al. Expression of Ca(2) (+)-dependent activator protein for secretion 2 is increased in the brains of schizophrenic patients. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 査読あり、2011, 35(7):1738-43. doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.05.004.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 服部功太郎, 篠山大明, 寺石俊也, 功刀浩: 精神疾患 CSF バイオリソースの構築と躁うつ病の CSF アミン代謝産物の解析、第 31 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、別府、11.16-17, 2012
- ② Hattori K, Sasayama D, Teraishi T, Kunugi H: Analyses of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia, The 2nd Meeting of East Asian Bipolar Forum, Fukuoka, Japan 9.7-8, 2012
- ③ Sasayama D, Hattori K, Tanaka H, Hori H, Teraishi T, Ota M, Amano N, Kunugi H: Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia, the 3rd Schizophrenia International Research Society Conference Schizophrenia, Florence, Italy, 4.14-18, 2012
- ④ Hattori K, Sasayama D, Teraishi T, Fujii T, Tanaka H, Kunugi H: Analyses of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia, the 3rd Schizophrenia

International Research Society Conference Schizophrenia, Florence, Italy, 4.14-18, 2012

- ⑤ Hattori K, Sasayama D, Teraishi T, Fujii T, Tanaka H, Kunugi H: Analyses of monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia and depression, 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), Seoul, Korea, 9.23-24, 2011
- ⑥ 服部功太郎, 寺石俊也, 篠山大明, 吉田寿美子, 岡本長久, 石川正憲, 有馬邦正, 功刀浩: 統合失調症髄液中アミン代謝産物の解析、札幌、7.18-19, 2011
- ⑦ 服部功太郎, 篠山大明, 寺石俊也, 吉田寿美子, 功刀浩: 気分障害脳脊髄液中アミン代謝産物の解析、第 30 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、京都、7.15-16, 2011
- ⑧ 服部功太郎, 篠山大明, 寺石俊也, 田中治子, 吉田寿美子, 功刀浩: 統合失調症髄液中アミン代謝産物の解析、第 33 回生物学的精神医学会、東京、5.21-22, 2011
- ⑨ Hattori K, Tanaka H, Wakabayashi C, Uchiyama H, Yamamoto N, Hori H, Teraishi T, Arima K, Kunugi H: Analyses of Fyn-tyrosine kinase and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in the post-mortem brains of schizophrenia, 13th International Congress on Schizophrenia Research, Colorado, USA, 4.2-6, 2011
- ⑩ 服部功太郎, 田中治子, 山本宜子, 功刀浩: 統合失調症死後脳における NMDA 受容体および Fyn の解析、第 32 回生物学的精神医学会、小倉、2010.10.8
- ⑪ Hattori K, Tanaka H, Uchiyama H, Yamamoto N, Iijima Y, Fujii T, Hori H, Teraishi T, Kinoshita Y, Matsuo J, Kawamoto Y, Arima K, Kunugi H: Analyses of fyn-tyrosine-kinase in the genome and post-mortem brains of psychiatric disorders, XXVII Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP) Congress, Hong Kong, China, 6.6 - 10,

2010

- ⑫ 服部功太郎、田中治子、山本宜子、内山博文、堀弘明、寺石俊也、木下裕紀子、松尾淳子、川本由実子、有馬邦正、樋口輝彦、功刀浩：統合失調症・気分障害のゲノム・死後脳を用いた Fyn チロシンキナーゼの解析, 第 29 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、箱根、6. 18-19, 2010
- ⑬ Hattori K, Uchiyama H, Yamamoto N, Iijima Y, Fujii T, Hori H, Teraishi T, Tatsumi M, Omori M, Okamoto N, Arima K, Higuchi T, Kunugi H: Evaluation of fyn-tyrosine kinase in the brains of psychiatric disorders, 2nd Schizophrenia International Research Conference, Florence, Italy, 4. 10-14, 2010

[図書] (計 1 件)

- ① 服部功太郎、寺石俊哉、篠山大明、功刀浩：気分障害患者の脳脊髄液 (CSF) 中モノアミン代謝産物、躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会編、「気分障害の薬理・生化学 ～うつ病の脳内メカニズム研究：進歩と挑戦」医薬ジャーナル 2013

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 功太郎 (HATTORI KOTARO)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第三部
室長

研究者番号：50415569