

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月18日現在

機関番号：37104

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890228

研究課題名（和文）ホスホジエステラーゼ機能の解明：認知機能障害治療薬としての可能性を探る

研究課題名（英文）Phosphodiesterase 4 inhibition enhances the dopamine D1 receptor/PKA signaling cascade in frontal cortex.

研究代表者

黒岩 真帆美 (KUROIWA MAHOMI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20585690

研究成果の概要（和文）：ホスホジエステラーゼ(PDE)は、ドーパミン D1 受容体シグナルの制御に重要である。前頭前皮質における D1 受容体シグナルの減弱は統合失調症の認知機能障害に関連し、PDE 阻害薬は D1 受容体シグナルを増強することから、統合失調症治療効果が期待される。本研究により、大脳皮質では主に PDE4 が機能し、PKA シグナルを調節していることが明らかとなり、PDE4 阻害薬の認知機能障害治療薬としての可能性が示唆された。本研究の結果より、PDE4 の阻害が統合失調症の認知機能の改善などの精神疾患の治療につながるのではないかと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Alteration of dopamine neurotransmission in the prefrontal cortex, especially hypofunction of dopamine D1 receptors, contributes to psychotic symptoms and cognitive deficit in schizophrenia. D1 receptors signal through the cAMP/PKA second messenger cascade, which is modulated by phosphodiesterase (PDE) enzymes that hydrolyze and inactivate cyclic nucleotides. Though several PDEs are expressed in cortical neurons, the PDE4 enzyme family (PDE4A-D) has been implicated in the control of cognitive function. We revealed that PDE4, which is expressed in D1 receptor-positive cortical pyramidal neurons in layer VI, modulates the level of D1 receptor signaling in the frontal cortex, likely influencing cognitive function. These biochemical and behavioral actions of PDE4 inhibitors may contribute to the hypothesized antipsychotic actions of this class of compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：ホスホジエステラーゼ、統合失調症、大脳皮質

## 1. 研究開始当初の背景

ドーパミンは、前頭前皮質において精神機能や認知機能を調節している。統合失調症

患者の前頭前皮質において、ドーパミン D1 受容体の発現が減少しており、その減少の程度と陰性症状や認知機能障害の重症度との

間には相関関係がみられる。また、前頭前皮質のドーパミン D1 受容体の活性化によって認知機能が改善することが報告されている。近年、非定型抗精神病薬が D1 受容体を部分的に活性化することが知られ、前頭前皮質における D1 受容体を介する神経伝達が統合失調症患者における陰性症状や認知機能障害の治療ターゲットとして注目されている。しかしながら、現在臨床応用可能な D1 受容体刺激薬は存在しない。そこで我々はサイクリック AMP (cAMP) 分解酵素ホスホジエステラーゼ (PDE) に着目し、PDE 阻害薬による D1 受容体シグナル調節を検討した。

## 2. 研究の目的

PDE は、cAMP/PKA シグナル伝達の制御に重要である。PDE には 11 種類のサブタイプがあり、中枢神経系において異なる局在を示すことが知られている。大脳皮質神経には、PDE1B、PDE2A、PDE4 (A、B、D のサブタイプ) の発現が知られている。なかでも PDE4B は統合失調症脆弱因子の一つである DISC1 との関連も知られている。ドーパミンの作用は主に cAMP/PKA シグナル系を介していることから、PDE サブタイプ別のシグナル制御機構の解明は、統合失調症やパーキンソン病などのドーパミン関連疾患の病態の解明ならびに新規治療ターゲットとしても有用である。

ドーパミン D1 受容体シグナルの増強作用には統合失調症の陰性症状・認知機能障害の改善が、ドーパミン D2 受容体シグナルの拮抗作用には陽性症状の改善がそれぞれ期待される。従って本研究では、前頭前皮質において PDE 阻害薬により変化するシグナル伝達の詳細を、ドーパミンシグナルを中心として解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) ウェスタンブロット法による、細胞内シグナル伝達の解析

マウス前頭前皮質のスライスを作製し、脳スライスをバッファー中でインキュベーションしながら薬物付加を行う。その後、ウェスタンブロット法により各タンパク質の発現量およびリン酸化等を解析する。

各 PDE アイソフォームの阻害薬の単独付加、あるいは各シグナルの作用薬との併用付加により、PDE によって制御されるシグナル変化の時間経過および薬物の用量依存的変化等を検討する。

### (2) 免疫組織化学的解析による、前頭前皮質における PDE 発現パターンの検討

免疫組織染色により、前頭前皮質における錐体細胞や介在細胞、あるいは D1 受容体発現細胞や D2 受容体発現細胞といった各ニューロンタイプ別における、PDE アイソフォー

ムの発現パターンを解明する。

### (3) プレパルスインヒビションテストを用いた行動薬理的解析

プレパルスインヒビション (PPI) とは、音刺激に対する驚愕反応が、音刺激の直前に驚愕反応を起こさない弱い音刺激を与えることにより抑制される現象であり、感覚運動情報制御機能 (sensorimotor gating) の指標と考えられている。PPI の低下は統合失調症における認知機能障害のモデルとして用いられている。

本研究では、実験(1)のシグナル解析により得られたシグナル伝達の変化が、実際に動物個体レベルで影響しうるものであるか否かを検討し、さらに各シグナルに作用する薬物を使用することで認知機能障害の病態および治療のメカニズムを探る。

## 4. 研究成果

### (1) マウス前頭前皮質スライスを用いた PDE 阻害薬の効果の検討

各種 PDE 阻害薬を用い、前頭前皮質におけるプロテインキナーゼ A (PKA) シグナルの解析を行ったところ、PDE4 阻害薬ロリプラムにより、ドーパミンシグナルの作用発現に不可欠なタンパク質 DARPP-32 の PKA サイトである Thr34 残基のリン酸化が増強された (図 1)。また、GluR1、NR1、PDE4 や ERK2 など、他の PKA 基質のリン酸化も増強されていた。

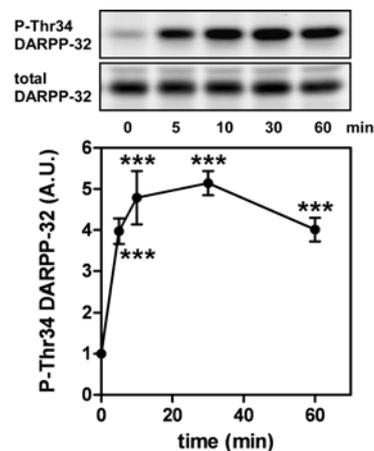


図1 前頭前皮質スライスへのPDE4阻害薬ロリプラム付加によるDARPP-32 Thr34 残基のリン酸化に対する影響

(2)前頭前皮質におけるロリプラムによる D1 受容体を介するシグナリングの増強

前頭前皮質のドーパミン D1 受容体の活性化によって認知機能が改善することが報告されている。そこで、ロリプラムによる D1 受容体アゴニスト (SKF81297) 作用の変化を解析したところ、DARPP-32 のリン酸化を指標とした SKF81297 の作用は、ロリプラムを併用することにより増強された (図 2)。この結果、PDE4 阻害薬は、D1 受容体を介するシグナルを増強することが明らかになった。

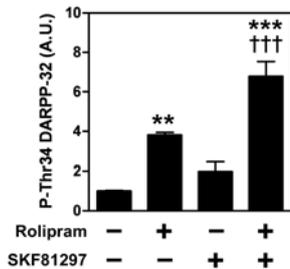


図 2 ロリプラムによる D1 受容体を介するシグナリングの増強

(3)大脳皮質における PDE 発現パターンの解析

免疫組織化学的解析により、大脳皮質における PDE4B の発現が明らかとなった (図 3)。また、大脳皮質の 6 層においては DARPP-32 との共発現も認められた。

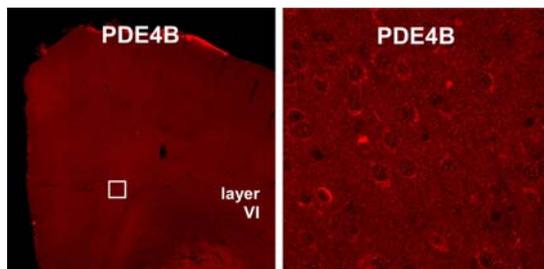


図 3 大脳皮質における PDE4B の発現  
右図は左図の四角内を拡大したもの

以上 (1)~(3) の結果より、大脳皮質では PDE4 が機能し、PKA シグナルを調節していることが明らかとなった。

(4) PDE4 阻害薬の認知機能障害に対する治療効果の検討

ロリプラムによる PKA シグナルの増強が、実際に認知機能に影響を及ぼすものであるかどうかを検討するため、統合失調症の認知機能障害の指標として用いられる、PPI テストを行った。その結果、ロリプラムにより PPI の増強が見られた (図 4 A)。さらに、DARPP-32 欠損マウスを用いた検討の結果、ロリプラムによる PPI の増強はみられなかったことから、この作用発現には DARPP-32 による PKA 作用の増幅が必要であることが明らかとなった (図 4 B)。

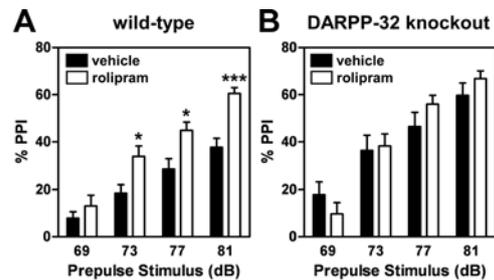


図 4 PPI テストに対するロリプラムの効果

本研究の結果より、PDE4 の阻害が統合失調症の認知機能の改善などの精神疾患の治療につながるのではないかと考えられる。

## 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)

① Kuroiwa M, Snyder GL, Shuto T, Fukuda A, Yanagawa Y, Benavides DR, Nairn AC, Bibb JA, Greengard P, Nishi A. Phosphodiesterase 4 inhibition enhances the dopamine D1 receptor/PKA/DARPP-32 signaling cascade in frontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*. 査読有 2012 vol. 219 No. 4 pp. 1065-1079  
DOI: [10.1007/s00213-011-2436-8](https://doi.org/10.1007/s00213-011-2436-8)

② Nishi A, Kuroiwa M, Shuto T. Mechanisms for the modulation of dopamine d(1) receptor signaling in striatal neurons. *Frontiers in neuroanatomy*. 査読有 2011 vol. 5 No. 43  
DOI: [10.3389/fnana.2011.00043](https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00043)

- ③Hara M, Fukui R, Hieda E, Kuroiwa M, Bateup HS, Kano T, Greengard P, Nishi A. Role of adrenoceptors in the regulation of dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons. Journal of neurochemistry. 査読有 2010 vol.113 No.4 pp.1046-59.  
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06668.x

[学会発表] (計7件)

- ① 黒岩真帆美、Effect of fluoxetine in dopamine D1 receptor signaling in the hippocampal dentate gyrus. 第41回神経精神薬理学会、2011年10月28日、京王プラザホテル (東京都)
- ② 黒岩真帆美、大脳皮質ドーパミンD1シグナルを制御するホスホジエステラーゼ4に関する研究、第40回日本神経精神薬理学会年会、2010年9月17日、仙台国際センター (宮城県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒岩 真帆美 (KUROIWA MAHOMI)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：20585690

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：