様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：１３９０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2024
課題番号：２０Ｋ０７９６５

研究課題名（和文）統合失調症治療薬の細胞種特異的な細胞内シグナル解析

研究課題名（英文）Cell type specific analysis of intracellular signal in antipsychotics

研究代表者
黒田　啓介（Kuroda, Keisuke）

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：８０６３１４３１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、独自に開発したリン酸化プロテオミクス法を駆使して同定したリン酸化蛋白質に着目し、側坐核D2R-MSNにおける統合失調症治療薬ごとのリン酸化シグナルごとの変化を比較した。その結果、PKAやMAPKの活性化が大きく異なること、D2R-MSNとドーパミン作動性神経について治療薬投与時のリン酸化反応が異なることを見出した。とくに、治療抵抗性統合失調症に有効とされるクロザピンは、PKAシグナルを殆ど変化させなかった。また、いくつかの統合失調症治療薬において、単回投与によりマウスの血糖値が上昇すること、およびこの現象が別の薬剤によって抑制できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ドーパミンを抑制したりD2Rを阻害すると側坐核のD2R-MSNにおいてPKAシグナルが活性化する。統合失調症治療薬は側坐核のD2Rを抑制することで幻覚や妄想などの症状を改善していると考えられている。本研究により、D2R-PKAシグナル活性化の程度、すなわちD2Rの抑制作用は、薬剤によって大きく異なることが明らかとなった。また、統合失調症治療薬は代謝異常や糖尿病の副作用が知られている。統合失調症治療薬の投与による血糖値の上昇は、本薬剤が糖尿病を引き起こすメカニズムとの関係が示唆される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on phosphorylated proteins identified using our proprietary phosphoproteomics method and compared changes in phosphorylation signals for each antipsychotic drug in the nucleus accumbens D2R-MSN. The results revealed significant differences in the activation of PKA and MAPK, as well as differences in phosphorylation responses between D2R-MSN and dopaminergic neurons upon drug administration. Notably, clozapine, which is considered effective for treatment-resistant schizophrenia, caused minimal changes in PKA signaling. Additionally, we observed that single doses of certain antipsychotic drugs caused an increase in blood glucose levels in mice, and that this phenomenon could be inhibited by another drug.

研究分野：神経科学

キーワード：統合失調症治療薬　ドーパミン　細胞腫特異的　シグナル解析　糖尿病　血糖値

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

脳は、分子・細胞・神経回路・脳・個体にいたる階層性を持つ大規模で複雑なシステムであり、その機能解明のためには脳システムの全体像を捉えながら研究を遂行する必要がある。脳科学において細胞内シグナル伝達機構を分子レベルで解明することは、脳機能の理解だけでなく、精神神経疾患の病因や病態の解明、治療法の開発に非常に重要である。多くの疾患は正常な細胞内シグナルが働かなくなるか、異常な細胞内シグナルが活性化することにより引き起こされている。細胞内シグナル伝達機構を解明することは、生命現象の理解だけでなく、病因や病態の解明、治療法の開発に非常に重要である。しかしながら、細胞の種類や時期によって細胞内シグナルを担う蛋白質の構成が異なるため、それぞれの細胞種毎に解析を行う必要がある。これまで細胞内シグナル研究は試験管内や培養細胞内で盛んに行われてきた。その際、癌細胞由来のセルラインは、その性質が均質であるため、たくさんの細胞を集めて行った実験の結果と、個々の細胞内で起こる現象は同じと考えることができた。一方、脳は様々な種類の神経細胞とグリア細胞から構成され、それらが相互作用しているため、単一の細胞種を培養した実験結果や脳組織を用いた実験結果は、個々の神経細胞・グリア細胞内で起こっている現象と必ずしも一致しない。そのほかにも、薬剤投与実験では、ヘテロな細胞集団に対して同時に薬剤が作用するため、個々の細胞で起こっている現象を捉えられない。また遺伝子改変マウスを用いた実験は細胞特異性を確保できるが作製や解析に多くの時間と費用がかかるため、1 つの現象に対し複数の細胞内シグナル分子を迅速かつ詳細に操作・解析することは現実的に難しい。

精神神経疾患の病態解明や新規治療薬開発のためには、細胞種特異的なシグナル解析を個体内で行う必要がある。研究代表者はこれまで、各種神経伝達物質によって活性化される細胞内シグナルをリン酸化プロテオミクス法によって網羅的に解析する方法の開発や、時期や部位特異的に標的蛋白質の発現や活性を制御する実験系の確立を行ってきた。これらを用いて、ドーパミン D1 受容体(D1R)を発現する中型有棘神経細胞(D1R-MSN)と、D2 受容体(D2R)およびアデノシン A2A 受容体(A2AR)を発現する中型有棘神経細胞(D2R-MSN)において、ドーパミンによって引き起こされる細胞内シグナルの解析を行い、Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rap1 が D1R の下流で活性化され D1R-MSN の興奮性を制御すること（Nagai, Kuroda et al. Neuron 2016)、D2R-MSN における PKA-Rap1 経路がアデノシンとドーパミンのバランスによって制御されていること（Zhang, Kuroda et al. Neurochem Int. 2018）を報告してきた。

２．研究の目的

現在、統合失調症治療薬としてドーパミン D2 受容体拮抗薬が使われており、側坐核の D2 受容体を抑制することで幻覚や妄想などの症状を改善していると考えられている。統合失調症治療薬は、以前は D2 受容体選択性の高いハロペリドールなどの定型薬が使われていたが、近年はドーパミン以外の受容体への作用を有する非定型薬が使われている。しかし、現在でも、治療抵抗性の統合失調症が 20～30%存在する。非定型薬であるクロザピンは特に難治性の統合失調症に対し有効であると認められているが、無顆粒球症の重篤な副作用があり、より安全な治療薬の開発が求められている。

本研究では、統合失調症治療薬が脳内で引き起こすリン酸化シグナルを細胞種特異的に解析し薬理作用を明らかにする。これらの成果により、新規治療薬の開発や疾患の病因病態の解明に資する新しい知見の提供を目指す。

３．研究の方法

(1)統合失調症治療薬が脳内で引き起こすリン酸化シグナルの解析

線条体および側坐核は、統合失調症治療薬およびパーキンソン病治療薬の作用部位と考えられている。線条体側坐核の主な構成要素はドーパミン D1 受容体(D1R)を発現する D1R-MSN と D2 受容体(D2R)およびアデノシン A2A 受容体(A2AR)を発現する D2R-MSN である。覚醒剤やコカインは、ドーパミンを増加させ D1R や D2R を活性化する。殆どの統合失調症治療薬はドーパミン D2 受容体(D2R)拮抗薬である。パーキンソン病治療薬としては、ドパミン D1 受容体(D1R)作動薬やアデノシン A2A 受容体(A2AR)拮抗薬が使われている。線条体側坐核において、ドーパミンや D1R 作動薬（パーキンソン病治療薬）は D1 受容体を刺激し、D1R-MSN の Gs、アデニル酸シクラーゼ、PKA を活性化することで、D1R-MSN の神経活動を促進する。A2A 受容体拮抗薬（パーキンソン病治療薬）は A2A 受容体を抑制し、D2R-MSN の Gs、アデニル酸シクラーゼ、PKA を抑制することで、D2R-MSN の神経活動を抑制する。D2R 拮抗薬（統合失調症治療薬）は、D2R による Gi を介した PKA の抑制を解除し、D2R-MSN の神経活動を促進する。統合失調症治療薬によるリン酸化シグナルの変化について PKA シグナルを中心に詳細な解析を実施した。

(2) 統合失調症治療薬が引き起こす高血糖の解析

統合失調治療薬のうちクロザピンおよびオランザピンは代謝異常や糖尿病の副作用が知られている。とくにクロザピンは他の治療薬では治療できない治療抵抗性統合失調症に対して有効性

が認められている。しかし、クロザピン投与により血糖値が大幅に上昇し、糖尿病性ケトアシドーシスや糖尿病性昏睡といった重篤な副作用を生じることがある。統合失調症治療薬が血糖値に与える影響を調べるため、８種類の抗精神病薬をマウスに腹腔内注射し、解析を行った。

４．研究成果

(1)統合失調症治療薬が脳内で引き起こすリン酸化シグナルの解析

臨床で主に使用されている統合失調症治療薬（ドーパミン D2 受容体拮抗薬、部分作動薬）のうちハロペリドールを用いて先行して解析を行い、その後 5 種類（ハロペリドール、リスペリドン、アリピプラゾール、オランザピン、クロザピン）の比較を行った。各治療薬の投与濃度は過去の文献をもとに決定した。統合失調症治療薬を投与したマウスの線条体から脳ライセートを作製した。ハロペリドール、リスペリドン、オランザピン投与によって、PKA の基質である GluR1 (Ser845)と Tyrosine Hydroxylase (Ser40)および p44 ERK (Thr202/Thy204)のリン酸化が亢進することを見出した。一方、p42 ERK (Thr185/Tyr187)はクロザピン投与によってリン酸化が低下した。アリピプラゾールはこれらのリン酸化を変化させなかった。PKC の基質である GluR1 (Ser831)、また mTOR (Ser2448)、Akt(Thr308, Ser473)、GSK3β(Ser9)、AMPK(Thr172)について解析を行ったが、統合失調症治療薬投与による変化は認められなかった。

これらの実験結果から、当初の目的の１つである統合失調症治療薬間に共通する細胞内シグナル変化および行動変化について、残念ながら明らかな変化を見出すことは出来なかった。一方、5 種類の統合失調症治療薬は、細胞内シグナルについて明らかな違いが認められた。ハロペリドールの結果については、側坐核 D2R-MSN の細胞内シグナルに関する論文として報告した（Lin et al. 2021）。

なお D2 受容体部分作動薬であるアリピプラゾールについては本研究で調べた殆どの細胞内シグナルにおいて変化が認められなかった。D2 受容体拮抗薬であるはずのクロザピンについても p42 ERK (Thr185/Tyr187)以外に変化が認められなかった。このことから、クロザピンの生体内における D2 受容体拮抗作用は非常に弱いと考えられる。治療抵抗性統合失調症の原因の1つとして、統合失調症治療薬の過量投与によって引き起こされるドーパミン過感受性の関与が疑われている。クロザピンが D2 受容体拮抗作用以外のメカニズムによって統合失調症治療薬としての作用を発揮することで、治療抵抗性統合失調症を改善している可能性が示唆される。

(2) 統合失調症治療薬が引き起こす高血糖の解析

臨床で主に使用されている統合失調症治療薬(ドーパミン D2 受容体拮抗薬、部分作動薬)から、8 種類を選定した。統合失調症治療薬 8 種類の投与を行ったマウスの血糖を測定し、いくつかの統合失調症治療薬で血糖値が上昇することを見出した。この血糖値上昇が、薬剤 X によって抑制出来ることを見出した。薬剤投与マウスから採血をおこない各種ホルモンの血中濃度を測定する方法を確立した。統合失調症治療薬による血糖値上昇に自律神経系や各種ホルモンの血中濃度が関与していることを見出した。ホルモン Y のノックアウトマウスにおいて統合失調症治療薬による血糖上昇がキャンセルされることを見出した。ホルモン Y のノックアウトマウスにおいて血糖上昇がキャンセルされる薬剤とキャンセルされない薬剤があることを見出した。薬剤 X がホルモン Y を介して血糖を上昇させるメカニズムについて解析を行った。

血糖値上昇は統合失調症治療薬の重篤な副作用として知られている。本研究はそのメカニズム解明につながると考えられる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　5件）

１．著者名 Funahashi Y, Ahammad RU, Zhang X, Hossen E, Kawatani M, Nakamuta S, Yoshimi A, Wu M, Wang H, Wu M, Li X, Faruk MO, Shohag MH, Lin YH, Tsuboi D, Nishioka T, Kuroda K, Amano M, Noda Y, Yamada K, Sakimura K, Nagai T, Yamashita T, Uchino S, Kaibuchi K.	４．巻 17
２．論文標題 Signal flow in the NMDA receptor-dependent phosphoproteome regulates postsynaptic plasticity for aversive learning	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Science Signaling	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.ado9852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Tsuboi Daisuke、Otsuka Takeshi、Shimomura Takushi、Faruk Md Omar、Yamahashi Yukie、Amano Mutsuki、Funahashi Yasuhiro、Kuroda Keisuke、Nishioka Tomoki、Kobayashi Kenta、Sano Hiromi、Nagai Taku、Yamada Kiyofumi、Tzingounis Anastasios V.、Nambu Atsushi、Kubo Yoshihiro、Kawaguchi Yasuo、Kaibuchi Kozo	４．巻 40
２．論文標題 Dopamine drives neuronal excitability via KCNQ channel phosphorylation for reward behavior	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Cell Reports	６．最初と最後の頁 111309～111309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Nagaoka Koki、Nagashima Takuya、Asaoka Nozomi、Yamamoto Hiroki、Toda Chihiro、Kayanuma Gen、Siswanto Soni、Funahashi Yasuhiro、Kuroda Keisuke、Kaibuchi Kozo、Mori Yasuo、Nagayasu Kazuki、Shirakawa Hisashi、Kaneko Shuji	４．巻 6
２．論文標題 Striatal TRPV1 activation by acetaminophen ameliorates dopamine D2 receptor antagonist-induced orofacial dyskinesia	５．発行年 2021年
３．雑誌名 JCI Insight	６．最初と最後の頁 e145632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.145632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Lin You-Hsin、Yamahashi Yukie、Kuroda Keisuke、Faruk Md. Omar、Zhang Xinjian、Yamada Kiyofumi、Yamanaka Akihiro、Nagai Taku、Kaibuchi Kozo	４．巻 143
２．論文標題 Accumbal D2R-medium spiny neurons regulate aversive behaviors through PKA-Rap1 pathway	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Neurochemistry International	６．最初と最後の頁 104935～104935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2020.104935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 Sekiguchi Mariko、Sobue Akira、Kushima Itaru、Wang Chenyao、Arioka Yuko、Kato Hidekazu、Kodama Akiko、Kuroda Keisuke、Ikeda Masashi、Iwata Nakao、Shimamura Teppei、Nagai Taku、Nabeshima Toshitaka、Kaibuchi Kozo、Yamada Kiyofumi、Mori Daisuke、Ozaki Norio et al.	4．巻 10
2．論文標題 ARHGAP10, which encodes Rho GTPase-activating protein 10, is a novel gene for schizophrenia risk	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Translational Psychiatry	6．最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-020-00917-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 三浦 宗一郎，小島 崇裕，近藤 怜苑，林 良敬，黒田 啓介
2．発表標題 抗精神病薬クロザピンはグルカゴンを介して高血糖を引き起こす
3．学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
体調測定装置	KURODA Keisuke	同左
産業財産権の種類、番号	出願年	国内・外国の別
特許、C20240199JP#P01	2024年	国内

〔取得〕　計0件

〔その他〕

—

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関