

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06000

研究課題名(和文) マイクログリアからみた統合失調症の覚せい剤動物モデルにおける病態解明と治療法研究

研究課題名(英文) Relationship among peripheral, prefrontal cortex proinflammatory factors, and microglial activity in psychostimulant animal model for schizophrenia

研究代表者

伊藤 侯輝 (ITO, KOKI)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：40455663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の精神刺激薬動物モデルを用い、血清と前頭前野の免疫炎症因子変動を同時にモニターして、末梢免疫炎症因子を指標とした脳内治療という新たな治療法を模索した。Methamphetamine 急性投与後と反復投与後のIL-6、IL1、TNF、IFN、マイクログリアの活性化に着目し、本モデルの免疫炎症の関係を追及した。我々の動物モデルが免疫炎症異常の特徴も網羅することが示され、新たな治療法として、末梢免疫・炎症因子を改善する(中枢移行性のない薬剤も含まれる)、マイクログリアの活動性を抑える(神経細胞に直接働かない薬剤)、ターゲット因子を直接抑える(新たな作用をもつ薬剤)を提案した。

研究成果の概要(英文)：New medicinal methods for schizophrenia with monitoring peripheral immune/inflammation factors have been performed. By using psychostimulant animal model from a point of view of abnormality of immune/inflammation functions, we focus on IL-6, IL1, TNF, IFN, and microglial hyperactivity in prefrontal cortex. Our animal model is shown to be useful for researching schizophrenia, and we may suggest the three new approaches with medication. First are drugs that indirectly improve peripheral abnormality of immune/inflammation factors, including even they can not go through blood brain barrier. Second are drugs that can directly recover above factors in the brain that have no action on neuron. The last are that can suppress microglial activity in the brain.

研究分野：schizophrenia

キーワード：schizophrenia animal model psychostimulant immune inflammation microglia

1. 研究開始当初の背景

統合失調症治療に関しては、クロールプロマジンが偶然発見されて以来、半世紀以上もの長い間、大きなブレイクスルーが認められていない。21世紀はじめに行われた国際ハップマップ計画、ヒトゲノム計画の後、統合失調症と強く関係する遺伝子の発見とその機能解析によって、病態の解明や新たな治療ターゲットの発見が期待された。しかし特に莫大な関連研究などから、最終的に統合失調症の関連遺伝子は108存在し、しかもどれも影響力は弱いことがわかった。そのため基礎研究に関しては、遺伝子の側面から統合失調症をモデル化するのが中心だったが、近年は、これらの研究手法は主流からはずれ、臨床的側面がより重視されるようになった。つまり基礎実験に関しては、臨床の要素を実験動物にいかに対応させるかを明確にする必要性が高まった。現在、統合失調症の精神刺激薬モデルの中でも、特にアメリカでは疫学的根拠から大麻を使用した基礎研究が隆盛であるが、我々の教室では長年覚せい剤モデルを研究している。なぜならヒトが例えば覚せい剤を反復すると幻覚・妄想症状が出現し、この症状は統合失調症のそれと全く見分けがつかないという事実があるからである。幻覚・妄想症状をもった覚せい剤依存者も統合失調症患者も、何らかの症状が出現して数ヶ月から数年間の前駆期を経てから幻覚・妄想症状が出現する。また、どちらも顕在発症早期はドパミン D2 受容体遮断薬が著効することも共通している。つまり覚せい剤反復による脳内変化と、統合失調症の前駆期の脳病態変化には共通の病態が存在する可能性がある。

このようなヒトにおける臨床的考察から、我々は統合失調症の覚せい剤の反復投与モデルラットを作成し、これがもつ異常行動の背景にある脳病理変化に着目してきた。つまり、このモデルに病態進行、特に顕在発症への進行を想定し、現在臨床の場で使用できる抗精神病薬や気分安定薬、抗不安薬の病態進行阻止効果を実験的に調べ、国内・外での学会発表、和文・英文での論文文化を通して、統合失調症治療の早期介入の重要性を全世界に発信してきた。

その一方で、統合失調症を顕在発症後、ほぼ永続的に幻覚・妄想症状の再燃・再発脆弱性を形成することは大きな問題として残っている。なぜなら再燃・再発により薬剤の反応性は低下し、症状も残遺し、重症化するからである。しかし、この再燃・再発脆弱性の背景にある基礎病態に関しては、未だによくわかっていない。

ヒトが覚せい剤を反復投与後に幻覚・妄想状態を呈した場合にも、統合失調症と同じような再燃・再発脆弱性を形成する。つまり一度幻覚・妄想症状が出現した後は、覚せい剤中毒患者も統合失調症患者も

些細なストレスなどがきっかけとなり、幻覚・妄想症状が一気に再現されるようになることも共通している。このように、覚せい剤モデルは、ヒトによって症候学的に確かられている確かなモデルであり、特に統合失調症の幻覚・妄想症状の成立過程と再燃・再発脆弱性の脳の基盤病態、ドパミン D2 遮断薬に対する治療反応性をも反映していると言える。本研究は、先に問題点として提示した統合失調症の幻覚・妄想症状の再燃・再発脆弱性の背景にある脳の基礎病態の解明を一つの目的としている。

ところで近年、統合失調症とサイトカインの異常に関する臨床報告が増えている。特に近年の報告では、IL-6、IL-1 などの促進性炎症因子が統合失調症患者の血液中で高いことが繰り返し報告されている。またヒトにおいて、脳の免疫・炎症をつかさどるマイクログリアの活性化が死後脳研究や PET 研究などで報告されている。少なくとも統合失調症と免疫・炎症系の異常とに何らかの関係があることは確からしく、免疫・炎症因子異常の観点から統合失調症をみることは新たな治療法の開発に大変有意義である。

覚せい剤もヒトのマイクログリアを活性化する。さらにメタンフェタミン依存患者においてグリア細胞の活性化が報告されており、その治療薬としてイブジラストのようなグリア細胞の活性化を抑える作用をもった薬剤が現在臨床治験中となっていることから、特にマイクログリアの活性化と覚せい剤中毒患者とは深く関わりを持っている。このことを合わせて考慮すると、覚せい剤モデルは、マイクログリアなどの活性化においても、統合失調症の脳病理と共通の病理がある可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、まず既に我々が確立した覚せい剤反復投与動物モデルにおいて、Methamphetamine (METH) 投与による促進性炎症因子の変動を、急性投与時の血清、全頭前野 (PFC) で検討した。またこの時の PFC でのマイクログリアの活性化を調べた。

(2) 次にこの操作を隔日に5回行い、1週間休薬期間をおいた際の定常状態での促進性炎症因子の変動を血清、PFC で調べた。またこの時の PFC でのマイクログリアの活性化を調べた。

(3) さらに少量の METH を再投与した際の促進性炎症因子の変動を血清、PFC で調べた。またこの時の PFC でのマイクログリアの活性化を調べた。

本研究では、上記(1)～(3)によって、METH 急性投与時、慢性投与後の定常状態、その後の少量の覚せい剤再投与時の3点において、血清、前頭前野 (PFC) での促進性炎症因子の変化と、PFC でのマイクログリアの活性化を同時にモニターすることで、脳と血液のサイトカイン変化を連鎖的に、総合的

に解釈することが可能となる。

本研究よって、統合失調症の幻覚・妄想の再燃・再発脆弱性の基礎病態として脳、血液内のサイトカインの推移を理解する事ができる。また末梢からの中枢治療という意味で、斬新なアイデアであり、新たな治療法に繋がるものであると考えられる。

3. 研究の方法

(1) METH 急性投与時の促進性炎症因子の変動とマイクログリアの活性化について

血清での促進性炎症因子の評価

我々が従来から用いている統合失調症の病態進行モデルのプロトコルから METH (2.5 mg/kg)をマウスに皮下投与し、1時間後に下大静脈から採血し、血清を作成した。

免疫・炎症因子を多数測定できるマイクロプレートアレイを用いて IL-6、IL-1、TNF、IFN の蛋白量を測定した。

PFC での促進性炎症因子の評価

の採血と同時に抜脳して PFC を取り分けた。同様に IL-6、IL-1、TNF、IFN の蛋白量を測定した。

PFC でのマイクログリアの活性化に関する免疫組織化学法による検討

の採血と同時に抜脳した。マイクログリア全般をターゲットとする Iba-1 抗体を用い形態変化を評価した。

PFC でのマイクログリアの活性化に関するウエスタンブロッティング法による検討

の採血と同時に抜脳した。PFC を取り分け活性化マイクログリアのみをターゲットとする PBR 抗体を用い蛋白量を評価した。

(2) 次にマウスに METH (2.5 mg/kg)を隔日に5回投与し、1週間休薬期間をおいた際の

血清 PFC での IL-6、IL-1、TNF、IFN

の変動を調べた。また同時に PFC でのマイクログリアの活性化を Iba-1 抗体を用い形態変化を評価した。

4. 研究成果

(1) METH 急性投与時の促進性炎症因子の変動とマイクログリアの活性化について

血清での促進性炎症因子の評価

血清	生食	METH	saline==1の時
IL-6	61	122	1.995
IL-1	161	290	1.809
TNF	251	318	1.267
IFN	253	253	1.0

上記表より、IFN は変化がなかったが、その他の促進性炎症因子は増加していた。

METH は中枢に作用する薬剤であるが、末梢の免疫炎症因子を大きく動かしていることがわかった。

PFC での促進性炎症因子の評価

PFC	生食	METH	saline==1の時
IL-6	224	312	1.390
IL-1	760	663	0.872
TNF	840	845	1.006
IFN	1043	893	0.856

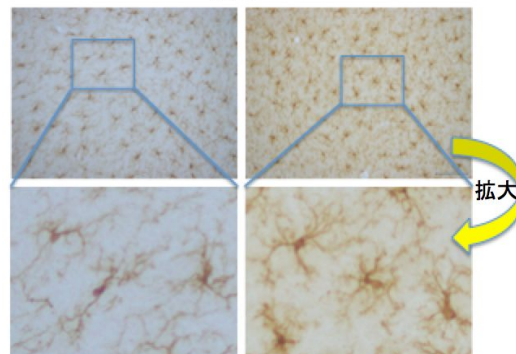
上記表より、IL-6 が上昇していたが、その他は変化がなかった。

METH は 2.5 (mg/kg)程度であれば、中枢性にはそれほど大きな変化は与えず、むしろ末梢性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

PFC でのマイクログリアの活性化に関する免疫組織化学法による検討

の採血と同時に抜脳した。マイクログリア全般をターゲットとする Iba-1 抗体を用い形態変化を評価した。

PFC

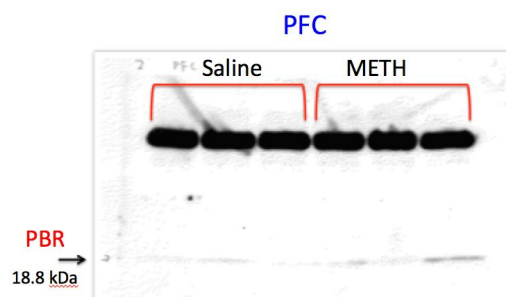


METH

生食

その結果、METH 群において手足の短縮化（形態変化）が起こっていることが確認され、活性化している可能性が考えられた。

PFC でのマイクログリアの活性化に関するウエスタンブロッティング法による検討



その結果、METH 群で PBR の発現が上昇していることが確認された。

から METH (2.5 mg/kg) 急性投与によって PFC のマイクログリアが活性化していることがわかった。

(2) 次にマウスに METH (2.5 mg/kg) を隔日に 5 回投与し、1 週間休薬期間をおいた際の血清 PFC での IL-6、IL-1、TNF、IFN の変動を調べた。また同時に PFC でのマイクログリアの活性化を Iba-1 抗体を用い形態変化を評価した。

血清での変化

血清 生食・生食群=1の時	生食・生食	METH・生食 (定常状態)	METH・METH (再発時)	METH・METH/ METH・saline
IL-6	1	0.234	0.457	1.95
IL-1β	1	0.210	0.947	4.50
TNFα	1	0.512	1.120	2.19
IFNγ	1	0.462	0.952	2.06

METH (2.5 mg/kg) の反復投与は、血清で定常状態での促進性炎症因子を一律低下させた。また METH の再投与では、それぞれ 2 倍から 4.5 倍上昇させたが、ほぼ正常範囲にとどまった。これらのことから、血清では METH (2.5 mg/kg) の投与は急性では促進性炎症因子を上昇させるが、これを反復していくとむしろ定常状態では濃度が正常より低下することがわかった。METH 再投与によっても本来の定常状態のレベル程度しか上昇しなかった。

我々の統合失調症の病態進行モデルになぞらえると、統合失調症の病態進行の背景に血清での促進性炎症因子の上昇が関係している可能性があり、幻覚妄想の再燃脆弱性の基礎病態には血清における促進性炎症因子の低下がある可能性がある。

逆に言うと、統合失調症の病態進行や再発に関してはこれらの変化を防ぐことができれば、治療効果がある可能性がある。

PFC での変化

PFC 生食・生食群=1の時	生食・生食	METH・生食 (定常状態)	METH・METH (再発時)	METH・METH/ METH・生食
IL-6	1	0.951	1.179	1.24
IL-1β	1	1.671	0.863	0.516
TNFα	1	1.434	1.643	1.15
IFNγ	1	2.153	1.418	0.659

METH の反復投与によって、PFC の定常状態では IL-6 は正常値だったが、その他は上昇していた。METH 再投与の際には、IL-6 と TNF は軽度上昇したが、その他の 2 因子は逆に低下した。

急性期では末梢では各因子はあまり大きな変化はなかったにも関わらず、慢性投与すると、その影響は PFC に徐々におよび、促進性炎症因子は定常状態であっても上昇してしまうことがわかった。

これらのことから、統合失調症の病態進行モデルになぞらえると、幻覚妄想の再燃再発

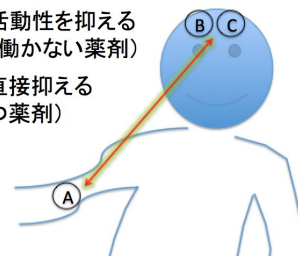
脆弱性には、PFC 定常状態で促進性炎症因子の上昇が、また再発時には IL-6 と TNF のさらなる上昇が関係している可能性がある。

逆に言うと、統合失調症の再発防止に関しては、これらの変化を防ぐことができれば、治療効果がある可能性がある。

以上の実験結果は、以下の図 A B C としてまとめることができる。統合失調症の病態進行には A 末梢の促進性炎症因子の上昇を抑える薬剤 B マイクログリアの活性化を抑える薬剤 C PFC の IL-6 上昇を抑える薬剤が、また再燃・再発防止には PFC 定常状態の促進性炎症因子上昇を防ぐ治療 (A B C すべてに可能性がある) C PFC で IL-6 や TNF 上昇を防ぐ薬剤が、これまでにない治療効果をもつ可能性がある。我々は、新たな 3 つの治療法を提案する。

3種類の新たな治療の方向性を提示したい！

- ① 末梢免疫・炎症因子を改善する
(特に中枢移行性のない薬剤)
- ② マイクログリアの活動性を抑える
(神経細胞に直接働かない薬剤)
- ③ ターゲット因子を直接抑える
(新たな作用をもつ薬剤)



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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 侯輝 (ITO KOKI)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：40455663

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()