

平成22年 5月10日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790309

研究課題名（和文） 統合失調症モデル動物を用いた疾患危険因子の同定とその治療薬の開発

研究課題名（英文） The drug development and identification of risk factor through animal model of schizophrenia

研究代表者

中川西 修 (NAKAGAWASAI OSAMU)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50296018

研究成果の概要（和文）：神経発達障害仮説に基づいた統合失調症動物モデルである幼若期腹側海馬(neonatal ventral hippocampal; NVH)障害ラットを作製し、統合失調症の危険因子として報告されているニューレグリン-1(NRG-1)及びその受容体の一つである erbB4 受容体の変化をラットの前頭前皮質をターゲットにし検討を行った。その結果、前頭前皮質の NRG-1 レベルは NVH 障害ラットの思春期後に減少していた。erbB4 受容体レベルの変化は認められなかったが erbB4 受容体チロシンキナーゼのリン酸化は NVH 障害ラットの思春期後に減少していた。また NVH 障害ラットは認知障害を思春期後に示す。そのラットの前頭前皮質へ NRG-1 を投与したところ認知障害を改善した。従って、NVH 障害ラットの認知障害には erbB4 シグナリングの低下が関与し、NRG-1/erbB4 受容体シグナリングの調節因子が統合失調症の新たな治療ターゲットとなる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：Recent molecular genetics studies in human have implicated the gene encoding neuregulin-1 (NRG-1) as a candidate susceptibility gene for schizophrenia. Neonatal ventral hippocampal (NVH) lesions in rats have been considered as a putative model of schizophrenia with characteristic post-pubertal alteration in response to stress and neuroleptics. In this study, we examined the levels of NRG-1, erbB4 receptors and the receptor's signaling in prefrontal cortex (PFC) of post-pubertal rats with NVH lesions, by using immunohistochemical and immunoblotting analyses. Quantitative analyses revealed that post-pubertal NVH-lesioned animals display significantly decreased levels of NRG-1 and erbB4 phosphorylation in PFC compared to sham controls. Microinjection of NRG-1 to PFC of NVH lesioned rats attenuated deficits in prepulse inhibition (PPI). These results that abnormal of erbB4 signaling in the PFC may play important roles in PPI deficits in NVH lesioned rats. NRG-1/erbB4 signaling may be novel therapeutic targets for schizophrenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：

キーワード：統合失調症モデル動物，前頭前皮質，ニューレグリン，神経発達障害

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、生涯発症率が約1%と高い頻度で生じる精神疾患である。この疾患は、遺伝的要因及び胎生期、周産期または生後発達期の栄養障害、覚醒剤などの薬物使用、ウイルス感染、放射線障害、神経発生過程の障害などとの関連性が疑われている。また、統合失調症の死後脳では、海馬体積が減少していることが報告されている。筆者はこの様な神経発達障害説に基づいてラット幼若期に腹側海馬を神経毒であるイボテン酸により破壊した幼若期腹側海馬 (neonatal ventral hippocampus:NVH) 障害ラットを作製し、種々の精神機能の解析に応用している。この NVH 障害ラットは、異常行動[統合失調症患者でも観察される prepulse inhibition (PPI) の障害(認知障害)、amphetamine などの統合失調症様異常発現薬への感受性亢進及びストレスへの感受性亢進]が思春期前ではなく思春期後に発現するため、統合失調症の神経発達障害モデルとしての有用性が期待されている。従って、この動物を用いて統合失調症の病態メカニズムの解明、治療薬の開発は極めて重要であると考えられる。これまで NVH 障害ラットを作製しその動物の脳内セロトニン(5-HT)神経の変化を検討したところ前頭前皮質の 5-HT_{2A} 受容体の機能亢進がその動物の認知障害に関与していることを証明し、この 5-HT 受容体の機能亢進はグルタミン酸神経機能低下に起因している可能性を示唆してきた。

2. 研究の目的

そのグルタミン酸神経の機能低下を引き

起こす原因の一つとして、統合失調症患者のリスク遺伝子として注目されている neuregulin-1 (NRG-1) 及びその受容体の一つである erbB4 受容体に注目した。この NRG-1 は、脳神経やグリアの分化・発達に必須なサイトカインであり、NMDA 受容体や GABA 受容体機能を調節していることが最近発見されている。さらに、NRG-1 及びその受容体である erbB4 受容体 knockout マウスは PPI 障害を呈する。従って、本研究では認知機能に関連した部位である前頭前皮質 (PFC) に焦点をあて、NVH 障害ラットのこの領域における NRG-1/erbB4 シグナリングの変化及び異常行動への関与を明らかにする目的で、神経化学的並びに行動薬理的な検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物及び外科的処置

生後7日目の雄性SD系ラットの両側腹側海馬にイボテン酸を注入し、この領域を破壊した。生後37日目(思春期前)と生後70-80日目(思春期後)に行動観察、免疫組織化学的染色、イムノブロットングを行った。

(2) 免疫組織化学的染色

生後70-80日目のラットに対して麻酔を施し、還流脱血直後、4% paraformaldehyde (0.2% glutaraldehyde 含有) により組織固定を行った。脳切片はクリオスタットにより 20 μ m の凍結切片を作製した。二抗体法による免疫組織化学的染色は、須藤らの方法に準じ、一次抗体には NRG-1 α / β 1/2 antibody、二次抗体には Anti-rabbit IgG-goat serum labeled with FITC を用い、得られたサンプルは顕微測光解析システム装置によって分析を行っ

た。

(3) イムノブロットティング

生後 37 日目または生後 75 日目にラットを断頭し、脳を取り出し直ちに PFC を分割後、Proteo Extract[®] Subcellular Proteome Extraction Kit により細胞膜分画をサンプルとして調整した。サンプル (タンパク量として 20 μ g) を 10% SDS-PAGE 後、PVDF membrane に転写し各々 NRG-1 α / β 1/2 antibody、erbB4 antibody、phosphotyrosine-erbB4 (p-erbB4) antibody とともにインキュベートを行った。タンパクレベルは ECL plus western blotting detection system で検出した。

(4) NRG-1 の投与

思春期後の sham 群及び lesion 群をペントバルビタール麻酔下、PFC の PrL 領域付近に NRG-1 100ng, 500ng, 1000ng を一側性 0.5 μ L ずつ投与した。PPI の測定は投与 24 時間後に行った。

(5) Prepulse inhibition

通常、驚愕反応を誘発する音刺激 (pulse) に先行して、微弱な音刺激 (prepulse) を負荷すると驚愕反応が抑制される。この抑制を PPI という。本実験では驚愕反応測定装置を用い、70dB の白色雑音の環境下にラットを置き、大きな音 (120dB, 50msec) の直前 (100msec) に小さな先行音刺激 (76-85dB, 30msec) を負荷することによって生じる驚愕反応の抑制 (PPI) の程度を床に取り付けられた圧センサーで測定した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学的染色法により皮質領域の NRG-1 レベルは思春期後においてコントロール群と比較し NVH 障害群の PrL, Cg1, M2, M1 領域で有意な減少が認められた (図 1)。

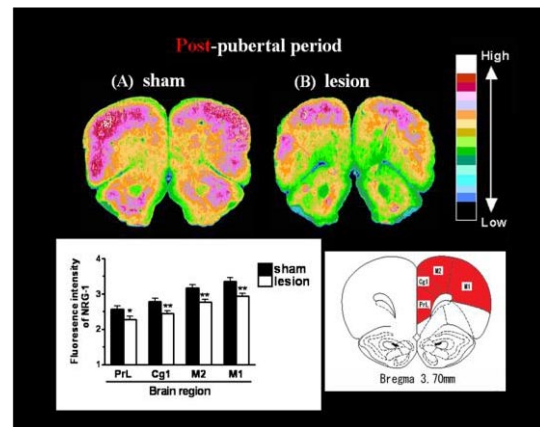


図 1 思春期後における前頭前皮質における NRG-1 の蛍光強度分布

(2) イムノブロット法により前頭前皮質における NRG-1 レベルは思春期前 (生後 35 日目)、思春期後いずれにおいてもコントロール群と比較し NVH 障害群で有意に減少が認められた (図 2)。

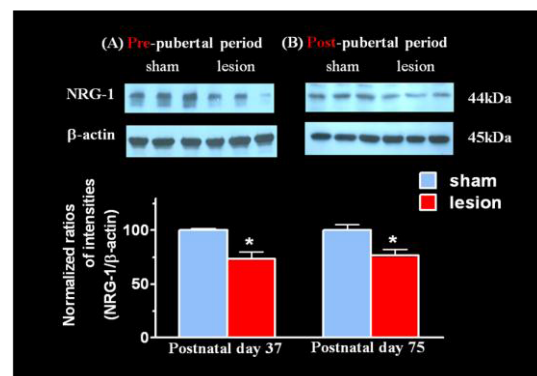


図 2 イムノブロット法による前頭前皮質における NRG-1 レベルの変化

(3) 前頭前皮質における erbB4 受容体レベルは思春期前、思春期後いずれにおいても両群間で有意な差は認められなかった。一方、erbB4 受容体チロシンキナーゼのリン酸化は思春期後においてコントロール群と比較し NVH 障害群で有意な減少が認められた (図 3)。

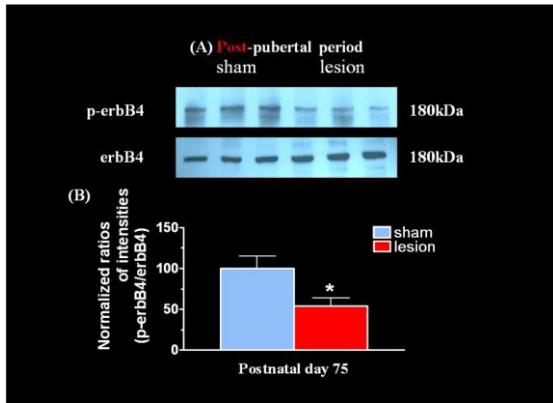


図3 イムノプロット法による前頭前皮質における erbB4リン酸化レベルの変化

(4) NRG-1 を前頭前皮質へ微量注入し思春期後の NVH 障害ラットが示す PPI 障害が改善するか否か検討したところ、NRG-1 (500 or 1000ng/0.5 μ l) の投与により NVH 障害ラットが示す PPI 障害を有意に改善させた(図4)。

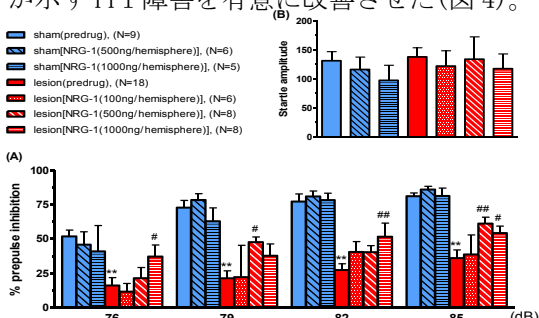


図4 NVH 障害ラットの PPI 障害に対する NRG-1 の効果

従って、NVH 障害ラットの PPI 障害には erbB4 シグナリングの低下が関与し、NRG-1/erbB4 受容体シグナリングの調節因子が統合失調症の新たな治療ターゲットとなる可能性を示唆した。

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2件)

- (1) Nakagawasai O, Onogi H, Mitazaki S, Sato A, Watanabe K, Saito H, Murai S, Nakaya K, Murakami M, Takahashi E, Tan-No K, Tadano T. Behavioral and neurochemical

characterization of mice deficient in the N-type Ca²⁺ channel alpha1B subunit, Behav Brain Res, 査読有り, 208, 224-230, 2010.

- (2) Onogi H, Hozumi M, Nakagawasai O, Arai Y, Ishigaki S, Sato A, Furuta S, Niijima F, Tan-No K, Tadano T. Central administration of *p*-hydroxyamphetamine produces a behavioral stimulant effect in rodents: evidence for the involvement of dopaminergic systems, Psychopharmacology, 査読有り, 208, 323-331, 2010.

[学会発表] (計3件)

- (1) 小野木 弘志, 中川西 修, 佐藤敦, 中谷孝太, 荒井裕一朗, 新島富紀枝, 丹野孝一, 只野武, 幼若期腹側海馬障害雌性ラットにおける性周期依存的なプレパルスインヒビションの変化, 第83回日本薬理学会年会, 平成22年3月18日, 大阪国際会議場(大阪)

- (2) 中谷 孝太, 中川西 修, 小野木弘志, 佐藤敦, 新島富紀枝, 丹野孝一, 只野武, メマンチンの感覚運動制御機構に及ぼす影響, 第83回日本薬理学会年会, 平成22年3月18日, 大阪国際会議場(大阪)

- (3) Nakagawasai O, Mitazaki S, Onogi H, Watanabe K, Sato A, Niijima F, Tan-No K, Miyamoto A, Tadano T. Serotonergic functions in a neurodevelopment model of schizophrenia, The XXVI CINP Congress, July 16, 2008, Munich, Germany

[その他]

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川西 修 (NAKAGAWASAI OSAMU)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 50296018