

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07936

研究課題名（和文）統合失調症のグルタミン酸神経伝達異常におけるリゾホスファチジン酸の役割

研究課題名（英文）Role of the lysophosphatidic acid in the glutamatergic neurotransmission abnormality of schizophrenia

研究代表者

山田 光彦（Yamada, Mitsuhiko）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・部長

研究者番号：60240040

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）：これまでに、抗精神病薬を投与した統合失調症患者の生体サンプル中で、リゾホスファチジン酸(LPA)濃度が減少していることを報告した。本研究では、MK-801を投与した統合失調症モデルマウスにおいて見られた内側前頭前野の細胞外グルタミン酸濃度の増加が、LPAシグナル伝達系の阻害により抑制されることを明らかとした。統合失調症の興奮性神経伝達異常にLPAシグナル伝達系が関与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症の病態背景として、興奮性神経伝達と抑制性神経伝達のバランスの破綻が注目されている。本研究では、統合失調症モデル動物における興奮性神経伝達異常にLPAシグナル伝達系が関与する可能性を明らかとした。今後、LPA受容体のリガンドや、LPAシグナル伝達系を調節する化合物が、統合失調症の治療のターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Recently, we reported that lysophosphatidic acid (LPA) levels in the medicated patients with schizophrenia were significantly lower than those observed in unmedicated patients. In the present study, we examined the role of LPA signal transduction in the pathophysiology of schizophrenia. The increase of extracellular glutamate levels of PL-PFC in mice induced by MK-801 was significantly reduced by pre-treatment of BrP-LPA (icv), which is an inhibitor of LPA signal. It is suggested that LPA plays an important role in the aberrant glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of schizophrenia.

研究分野：精神薬理

キーワード：統合失調症 グルタミン酸 リゾホスファチジン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の病態背景として「興奮性神経伝達と抑制性神経伝達のバランス (E/I バランス) の破綻」が注目されている。NMDA 型グルタミン酸受容体(NMDAR)阻害作用を有する化合物は、その力価に相関して統合失調症の陽性及び陰性症状を惹起する。また、統合失調症患者で、NMDAR 活性化に不可欠な D-セリンの減少や D-セリンの合成や分解に関与する酵素の多型が発見されている。そのため、グルタミン酸神経伝達低下の関与が広く支持されてきた(Chumakov et al. 2002)。一方、グルタミン酸放出を抑制する代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)2/3 作動薬により陽性及び陰性症状の改善がみられたという臨床試験の結果(Patil et al. 2007) や、死後脳解析におけるグルタミン酸トランスポーター-GLT1, GLAST の発現減少や GLAST 遺伝子座の欠失等の知見から、グルタミン酸神経伝達亢進の関与も注目を集めている (Shan et al. 2013)。また、同患者の死後脳解析で GABA 合成酵素(GAD67)の発現レベルの低下の報告が複数あり、GABA 神経伝達障害仮説も高く評価されている。さら、光遺伝学的手法による動物実験からも微小神経回路における E/I バランスの破綻の関与が報告されている(Yizhar et al. 2011)。

一方、リゾホスファチジン酸(LPA)は、G-タンパク共役型 LPA 受容体(LPAR)に結合し細胞内情報伝達系を調節する脂質性メディエーターである。LPAR はこれまでに 6 種のサブタイプが同定され (LPAR1~6)、末梢では、細胞増殖、血小板凝集、平滑筋収縮、がんの浸潤、中枢神経系では、情動、痛みに関与することが報告されている。精神疾患との関連では、LPAR1 欠損マウスにおいて、統合失調症で見られるプレパルス抑制の喪失や神経伝達物質レベルの変化が報告されている(Harrison et al. 2013)。また、統合失調症で見られる大脳皮質の過興奮が LPA 産生酵素 autotaxin 欠損マウスで抑制されること、シナプスの LPA 分解の機能不全では誘発されること、さらにこれまでの我々の研究で明らかとなった抗精神病薬を投与した統合失調症患者の血清および脳脊髄液中で LPA 濃度が減少していること (Gotoh et al. 2019) から、LPA シグナル伝達系の統合失調症への関与が示唆される。しかし、統合失調症の病態における LPA の機能は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、統合失調症モデル/遺伝子改変動物を用いて、LPA シグナル伝達系の統合失調症の病態への関与を明らかにすることを目的とした。具体的には、Parvalbumin 陽性細胞特異的 GAD67 遺伝子改変動物、および当研究部で新規に作製した統合失調症関連遺伝子 WD repeat domain 3 (WDR3)改変動物を用いて、神経化学的解析、分子生物学的解析、免疫組織学的解析を行った。また、NMDAR 阻害薬(MK-801)を投与した統合失調症モデルマウスを用いて、LPA シグナル伝達系を調節したときの神経化学的変化、行動学的変化を *in vivo* microdialysis 法により検討した。

3. 研究の方法

(1) 統合失調症関連遺伝子 GAD67 改変動物を用いた解析

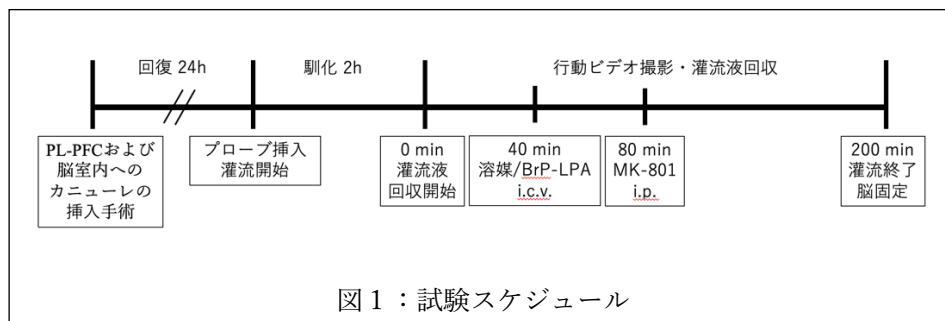
Parvalbumin 陽性細胞特異的に統合失調症関連遺伝子 GAD67 遺伝子を欠損させたマウスを用いて、血漿中の LPA 濃度および前頭葉皮質、海馬におけるアミノ酸 (グルタミン酸、D-セリン、L-セリン、グルタミン、グリシン) の含量を電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD 法) により分析した。

(2) 統合失調症関連遺伝子 WDR3 改変動物を用いた解析

C57BL/6N 系を背景とする雄性 WDR3 ノックアウトマウスを作製し、生後 10 週齢の成体期に免疫組織化学的解析を行った。さらに、WDR3 ノックアウトマウスの海馬を用いて、LPAR および LPAR 関連遺伝子の発現を real-time PCR 法により定量解析した。

(3) MK-801 を投与した統合失調症モデル動物を用いた解析

マウスの PL-PFC および脳室内にカニューレの埋め込み手術を行なった。試験当日、PL-PFC に灌流液を灌流させながらオープンフィールド試験装置内で 2 時間、馴化させた。実験開始より、PL-PFC から 20 分ごとに経時的に灌流液を回収した。灌流液回収開始 40 分後に BrP-LPA を脳室内投与、80 分後に MK-801 を腹腔内投与し、開始から 200 分まで回収した。この間、マウスの行動をビデオ撮影し、行動解析ソフトウェア (Smart Jr) により自発運動量を解析した。灌流終了後、脳を固定し、カニューレの挿入部位を確認した。経時的に回収した灌流液中のグルタミン酸、D-セリン、L-セリン、グルタミン、グリシンは、HPLC-ECD により分析した。統計解析は、二元配置分散分析法を用い、下位検定として Dunnett 法を用いた。



4. 研究成果

(1) 統合失調症関連遺伝子 GAD67 改変動物を用いた解析

これまでに、Parvalbumin 陽性細胞特異的に GAD67 遺伝子を欠損させたマウスは、生化学的・組織化学的・電気生理学的・行動学的解析により統合失調症様中間表現系を示すことが報告されている (Fujihara et al. 2015)。そこで、Parvalbumin 陽性細胞特異的 GAD67 欠損マウスを用いて血漿中の LPA 濃度を測定したが、野生型に比べて有意な差は認められなかった。また、前頭葉皮質、海馬におけるアミノ酸 (グルタミン酸、D-セリン、L-セリン、グルタミン、グリシン) の含量を HPLC-ECD 法により分析したが、いずれも野生型と比較して有意な差は認められなかった。

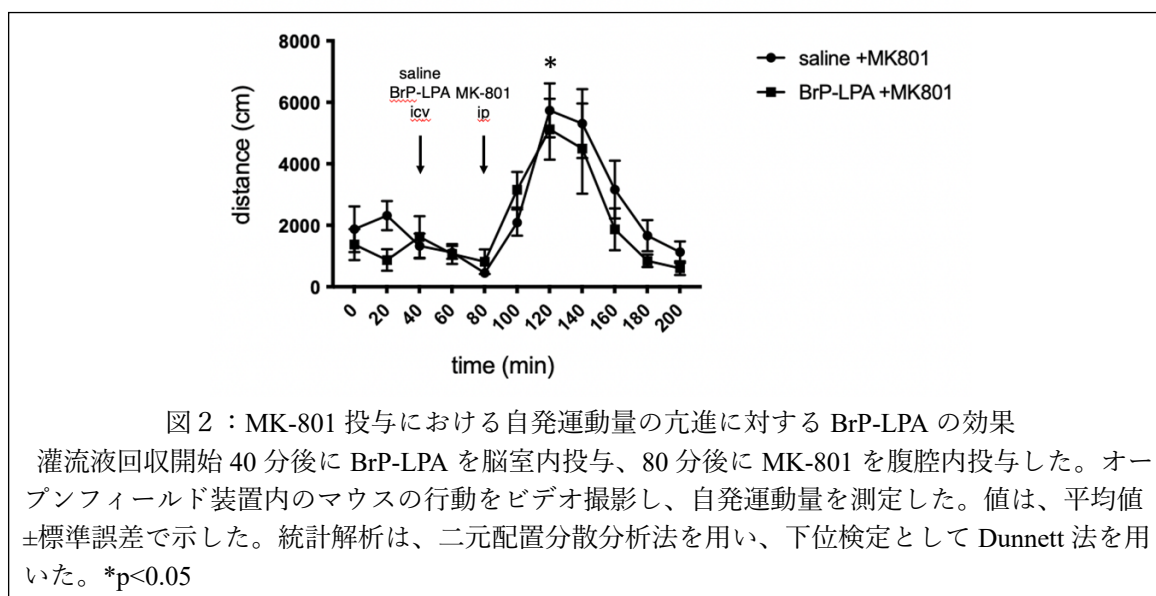
(2) 統合失調症関連遺伝子 WDR3 改変動物を用いた解析

WDR3 は、NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬である phencyclidine およびドーパミン作動薬である methamphetamine の双方に反応して、ラット脳内で発現量が増加する遺伝子である。日本人統合失調症患者のゲノムを用いた WDR3 の遺伝子領域および調節領域に座位する一塩基多型 (SNP) の解析では、WDR3 遺伝子と女性の統合失調症との関連が示唆されている (Kobayashi et al., 2018)。WDR3 ホモノックアウトマウスは誕生しなかったため、ヘテロノックアウト (WDR3-HKO) を用いた。WDR3-HKO マウスは、同腹仔の野生型マウスと比較して、成体期における体重に遺伝子型間で差はなかった。また、免疫組織化学的解析において WDR3 は脳に広く発現していることが明らかとなったが、WDR3-HKO マウスにおいて大脳皮質の層構造に異常は認められなかった。WDR3-HKO マウスの海馬を用いて、LPAR 及び LPAR 関連遺伝子の発現を real-time

PCR 法により定量解析した。野生型および WDR3-HKO マウスにおいて、LPAR1, 2, 4, 6 の発現に有意な変化は認められなかった。LPAR3 及び LPAR5 は発現量が低かったため、定量解析はできなかった。また、LPAR 産生酵素 autotaxin (ATX) 及び LPA を分解する plasticity-related gene 1 (PRG1) についても定量したが、有意な変化は認められなかった。

(3) MK-801 を投与した統合失調症モデル動物を用いた解析

MK-801 を腹腔内投与した統合失調症モデルマウスを用い、自発運動量および PL-PFC における神経化学的变化に対する BrP-LPA の影響を *in vivo* microdialysis 法により検討した。自発運動量について二元配置分散分析 (薬物 X 時間経過) を行った結果、薬物と時間経過の交互作用および薬物の主効果に有意は認められなかった。一方、時間経過の主効果は有意であった。時間経過について下位検定を行った結果、120 分の時点で有意な変化が認められた (図 2)。これらの結果より、MK-801 の腹腔内投与により自発運動量の亢進が認められたが、BrP-LPA による MK-801 の自発運動量の亢進は抑制されないことが明らかとなった (図 2)。



PL-PFC から回収した灌流液中のアミノ酸濃度を HPLC-ECD により経時的に分析し、二元配置分散分析 (薬物 X 時間経過) を行った。細胞外グルタミン酸濃度は、BrP-LPA 投与により変化は見られなかったが、MK-801 投与により増加が認められた。MK-801 投与によるグルタミン酸濃度の増加は、BrP-LPA の前処置により有意に抑制された (図 3 a)。細胞外 D-セリン濃度は、BrP-LPA、MK-801 投与により有意な変化は認められなかった (図 3 b)。細胞外 L-セリン濃度は、BrP-LPA 投与により変化は見られなかったが、MK-801 投与により、120 分の時点で有意な増加が認められた。MK-801 投与による L-セリン濃度の増加は、BrP-LPA の前処置により抑制されなかった (図 3 c)。細胞外グルタミン濃度は、BrP-LPA 投与により変化は見られなかったが、MK-801 投与により増加が認められた。MK-801 投与によるグルタミン濃度の増加は、BrP-LPA の前処置により有意に抑制された (図 3 d)。細胞外グリシン濃度は、BrP-LPA 投与により変化は見られなかったが、MK-801 投与により、120 分、140 分の時点で有意な増加が認められた。MK-801 投与によるグリシン濃度の増加は、BrP-LPA の前処置により抑制されなかった (図 3 e)。

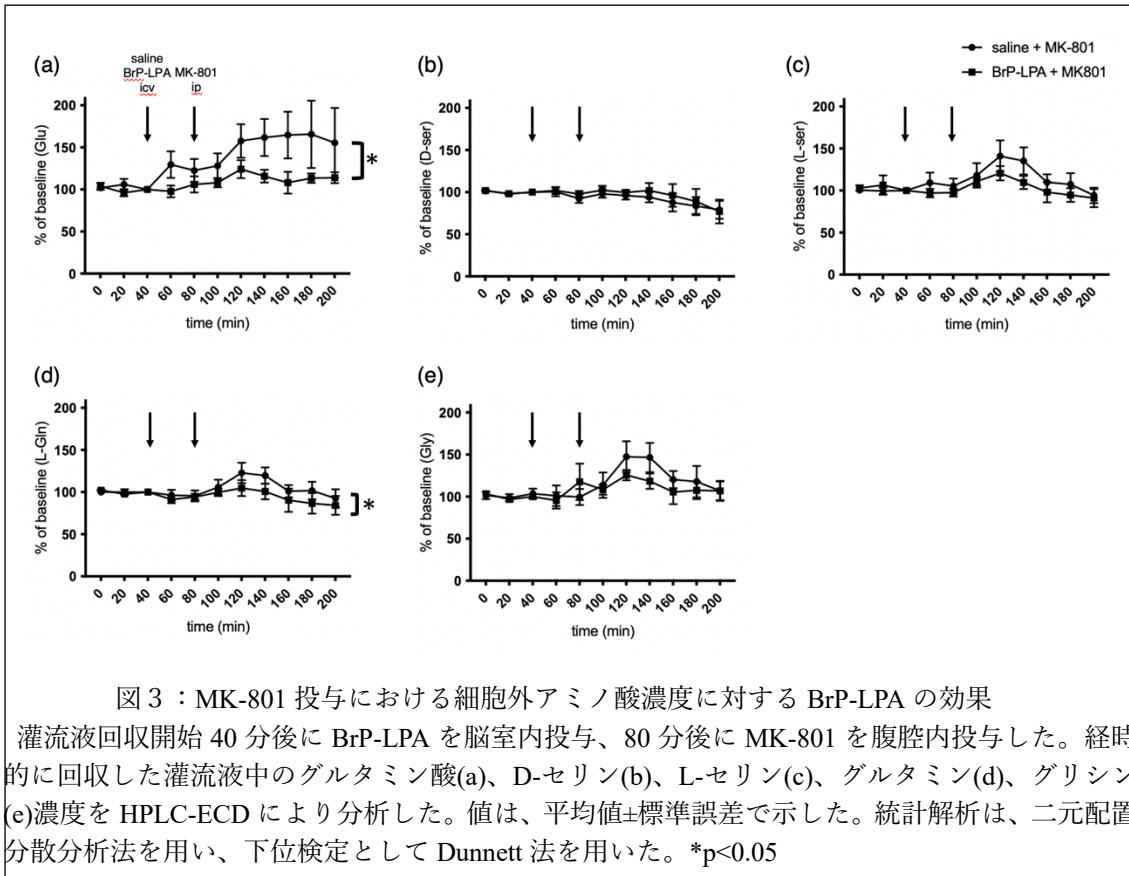


図3：MK-801投与における細胞外アミノ酸濃度に対するBrP-LPAの効果

灌流液回収開始40分後にBrP-LPAを脳室内投与、80分後にMK-801を腹腔内投与した。経時的に回収した灌流液中のグルタミン酸(a)、D-セリン(b)、L-セリン(c)、グルタミン(d)、グリシン(e)濃度をHPLC-ECDにより分析した。値は、平均値±標準誤差で示した。統計解析は、二元配置分散分析法を用い、下位検定としてDunnnett法を用いた。*p<0.05

以上、GAD67改変動物およびWDR3改変動物を用いた解析では、BrP-LPAによる神経化学的変化、分子生物学的変化は認められなかったが、MK-801を投与した統合失調症モデルにおいて、LPAシグナル伝達系の阻害により細胞外グルタミン酸およびグルタミン濃度の増加が抑制されることが明らかとなった。今後、さまざまな特徴を有する統合失調症モデル動物を用いて、LPAシグナル伝達系との関連を検討していく必要がある。また、BrP-LPAは、LPAR1, 2, 3, 4の拮抗薬でありLPA合成酵素autotaxinの阻害作用を併せ持つ薬物である。今後、受容体サブタイプやautotaxinに特異的な薬物を用いることにより、統合失調症の病態におけるLPAシグナル伝達系の詳細な役割を明らかにできると考える。

引用文献

- Chumakov et al., Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. Proc Natl Acad Sci U S A. 99:13675-80, 2002.
- Patil et al., Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. Nat Med. 13:1102-7. 2007
- Shan D et al., Abnormal expression of glutamate transporters in temporal lobe areas in elderly patients with schizophrenia. Schizophr Res. 144:1-8, 2013.
- Yizhar O et al., Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. Nature. 477:171-8. 2011
- Harrison et al., LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. Mol Cell Neurosci. 24:1170-9, 2003.
- Gotoh et al., Levels of lysophosphatidic acid in cerebrospinal fluid and plasma of patients with schizophrenia. Psychiatry Res. 273:331-335, 2019.
- Fujihara K et al., Glutamate Decarboxylase 67 Deficiency in a Subset of GABAergic Neurons Induces Schizophrenia-Related Phenotypes. Neuropsychopharmacology. 40:2475-86. 2015.
- Kobayashi M et al., Association studies of WD repeat domain 3 and chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase genes with schizophrenia in a Japanese population. PLoS One. 113:e0190991. 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Momoko Kobayashi-Tanabe, Hiroki Furuie, Misa Yamada, Mitsuhiko Yamada | 4. 巻 1800 |
| 2. 論文標題 Characterization of a WD-repeat family protein WDR3 in the brain of WDR3 hetero knockout mice. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Brain research | 6. 最初と最後の頁 148188-148188 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2022.148188 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔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 小林桃子、古家宏樹、三輪秀樹、山田美佐、山田光彦 |
| 2. 発表標題 Reduced expression of NMDA receptors (NR2A and NR2B) in the hippocampus of WD repeat domain 3 gene hetero knockout mice |
| 3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 三輪 秀樹 (Miwa Hideki) (80468488) | 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長 (82611) | |
| 研究分担者 | 古家 宏樹 (Furuie Hiroki) (90639105) | 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長 (82611) | |
| 研究分担者 | 山田 美佐 (Yamada Misa) (10384182) | 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・科研費研究員 (82611) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|