

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790067

研究課題名(和文)

プロテオミクスを基盤とした統合失調症の新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文)

Identification of drug target for novel antipsychotics based on proteomic approach

研究代表者

永井 拓 (NAGAI TAKU)

名古屋大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10377426

研究成果の概要(和文)：本研究では、フェンシクリジン(PCP)連続投与マウスを用いて新規創薬標的の可能性について検討した。二次元電気泳動によってタンパク質を分離した結果、PCP連続投与群において14-3-3著しいタンパク発現の減少が認められた。14-3-3免疫活性はアストロサイトマーカであるS100陽性細胞と一致した。また、新規物質探索試験において14-3-3阻害薬を前頭皮質に微量注入したマウスでは記憶障害が認められた。以上の結果から前頭皮質における14-3-3の発現低下が認知機能障害に一部関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Repeated administration of phencyclidine (PCP) has known to produces schizophrenic-like symptoms in mice. To examine the changes in protein expression after repeated PCP treatment in the prefrontal cortex (PFC) of mice, we performed proteomic analysis by using 2D-DIGE. Proteomic analysis reveals that the remarkable change in the expression levels of 14-3-3 protein θ was observed in the PFC after repeated treatment with PCP. The signals was localized to cells positive for S100, a marker of glial cells, in the PFC. Microinjection of 14-3-3 protein inhibitor into the PFC lead to memory impairment in a novel object recognition test. These results suggest that dysfunction of 14-3-3 protein θ in the PFC may be involved in the molecular mechanisms underlying the schizophrenic-like symptoms in repeated PCP-treated mice.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学、脳・神経、神経化学、基礎研究、蛋白質、プロテオーム、統合失調症、グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、罹患率が1%と高く、多く

の症例は青年期に発症すると、長期にわたって学業面でも就労面でも患者の社会的機能を低下させ、その10%は自殺既遂に至る。また、現在可能な薬物療法、心理社会的治療を行っても十分な治療効果が得られない症例が2/3に達することから、統合失調症の病態を解明し、病態に即した治療法・予防法を見いだすことは、社会的要請の高い研究課題である。統合失調症の病態は明確化されていないが、ドパミン受容体拮抗作用を有する抗精神病薬が幻覚・妄想などの陽性症状を軽減させること、逆にアンフェタミンやコカインなどのドパミン作動薬が陽性症状を悪化させることが知られている。その他、フェンシクリジンやケタミンなどのグルタミン酸受容体拮抗薬は統合失調症の陽性症状と陰性症状（感情の平板化、意欲低下など）の両者に類似した症状を引き起こすことが報告されている。したがって、統合失調症の病態には、ドパミン作動性神経の過活動およびグルタミン酸作動性神経の機能低下が関与していると考えられている。我々は、メタンフェタミンを連続投与したマウスに認められる行動感作（*locomotor sensitization*）に腫瘍壊死因子、組織プラスミノゲン活性化因子、マトリックスメタロプロテアーゼ、グリア細胞由来神経栄養因子、Shati が関与していることを見出した。一方、フェンシクリジンを連続投与したマウスにおいて意欲低下や社会性行動障害および認知障害（潜在学習や連合学習）などの陰性症状様の異常行動が発現することを世界に先駆けて報告し、治療薬の評価系を既に確立してきた。

2. 研究の目的

養子研究や双生児研究などの疫学的研究により統合失調症の発症に遺伝因子が関与していることが実証されており、*disrupted-in-schizophrenia 1*、ディスバインデ

インなどが統合失調症関連遺伝子として同定されている。これら統合失調症関連遺伝子はドパミンおよびグルタミン酸作動性神経系の機能調節に関与していることが報告されている。しかし、一卵性双生児であっても統合失調症不一致例が存在することから、遺伝因子以外の環境因子も発症に関与していることが示唆されている。また、一卵性双生児の統合失調症一致例であっても、統合失調症の発症時期は心理社会的成長に最も重要な時期である思春期および青年期に多く認められる。したがって、遺伝因子や環境因子による神経伝達障害が、その後のタンパク質の発現や翻訳後修飾を伴う神経ネットワークの異常をもたらし、統合失調症の精神障害を不完全な状態から診断可能な状態へ移行させている可能性が高い。

一方、ポストゲノム時代の到来により、プロテオーム解析に代表される網羅的解析法が注目されているが、この研究手法を用いることにより、既存の仮説に囚われることなく病態を捕らえることが可能となった。プロテオーム解析はタンパク質の発現変化だけでなく、様々な翻訳後修飾に関する情報を得ることが可能である。上記の観点を踏まえて、本研究では、PCP連続投与マウスを用いて統合失調症新規関連分子の同定を試みるとともに創薬標的の可能性について検討した。

3. 研究の方法

実験には7週齢の雄性ICRマウスを使用した。ICRマウスにPCP（10 mg/kg）を14日間皮下投与し、モデル動物を作製した。

Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis（2D-DIGE）法を用いてタンパク質発現を解析した。2D-DIGE法により発現に変化が認められたスポットを質量分析装置（LC-MS/MS）およびデータベース（Mascot）検索によりタンパク質の同定を行った。脳内の

発現の局在については蛍光免疫染色法を用いて組織化学的に解析した。さらに、認知記憶能力については新規物質探索試験を用いて行動薬理的に評価した。

4. 研究成果

二次元電気泳動によってタンパク質を分離した結果、約 960 個のスポットが検出された。各群の検出されたスポット数の平均は生理食塩水投与群が 965±18 個、PCP 連続投与群が 960±15 個であった。個々のスポットについて解析した結果、9 個のスポットに有意な発現変化が認められた。PCP 連続投与群において発現が増加したスポットが 7 個、逆に発現が減少したスポットが 2 個検出された。発現変化が認められた 9 スポットについて質量分析およびデータベース検索を行った結果、7 スポットを同定した。特に著しいタンパク発現の減少が認められた 14-3-30 に着目して脳内の発現を免疫染色法によって調べた。PCP 連続投与マウスの前頭皮質における 14-3-30 陽性細胞は生理食塩水投与マウスに比べ減少しており、14-3-30 免疫活性はアストロサイトマーカーである S100 陽性細胞と一致した。また、新規物質探索試験において 14-3-3 阻害薬を前頭皮質に微量注入したマウスでは PCP 連続投与マウスと同様に記憶障害が認められた。以上の結果から PCP 連続投与マウスにおいて発現が変化するタンパク群が存在し、統合失調症関連分子である可能性が示唆された。特に、前頭皮質における 14-3-30 の発現低下が認知機能障害に一部関与していると考えられた。今後は発現に差が認められた他のタンパク群について、その機能に関する解析を行う予定である。

精神疾患の中でも統合失調症は、科学のおよび社会的にも注目されている疾患であり、本疾患の発症機序の解明および治療法の開発は非常に重要である。本研究により、これ

まで知られていなかった統合失調症に關与する細胞内のシグナル伝達に関する情報はもちろんのこと、新規の関連タンパク質が同定された可能性が高く、その意義は大きいと考えられる。

我々は、これまでに統合失調症モデル動物を作製し、治療薬の行動評価系を既に確立している。したがって、本研究により同定された分子の機能を活性化もしくは抑制することにより、統合失調症の新規治療薬の開発に繋がる情報を提供できるものと考えている。また、本研究によって得られた結果がどのような臨床的意義を有しているかを調べるために臨床研究へ発展させる必要があると考えている。

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 4 件)

① Yun, J., Koike, H., Ibi, D., Toth, E., Mizoguchi, H., Nitta, A., Yoneyama, M., Ogita, K., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Nagai, T., Yamada, K. Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: Possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.* 114: 1840–1851, 2010. 査読有

② Yu, J., Nagai, T., Ibi, D., Kitahara, Y., Nabeshima, T., Yamada, K. Nicotine ameliorates emotional and cognitive impairments induced by neonatal polyI:C treatment in mice. *Open Behav. Sci. J.* 4: 9-18, 2010. 査読有

③ Nagai, T., Kitahara, Y., Shiraki, A., Hikita, T., Taya, S., Kaibuchi, K. and Yamada, K. Dysfunction of dopamine release in the prefrontal cortex of dysbindin deficient sandy mice: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett.* 470: 134-138, 2010. 査読有

④ Nagai, T., Murai, R., Matsui, K., Kamei, H., Noda, Y., Furukawa, H. and Nabeshima, T. Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology* 202, 315-328, 2009. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 永井拓, 于静華, 北原裕子, 衣斐大祐, 鍋島俊隆, 山田清文. 新生仔期 polyI:C 処置によって誘発される不安様行動および学習記憶障害. 第 20 回日本医療薬学会年会(千葉), (2010. 11, 13-14).

② 永井拓, 山田清文. Methamphetamine increased Npas4, a neuronal PAS domain 4 expression; a possible role in neurite outgrowth and phosphorylated synapsin I expression. 第 45 回日本アルコール・薬物医学会、第 22 回日本アルコール精神医学会、第 13 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム、平成 22 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. (小倉), (2010. 10. 7-9).

③ 永井拓, 衣斐大祐, 鍋島俊隆, 澤明, 山田清文. 周産期の免疫異常が神経精神発達におよぼす影響 (シンポジウム). *Neuro2010* 第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会. (神戸), (2010. 9. 2-4).

④ Nagai, T., Ibi, D., Mizoguchi, H., Nabeshima, T., Yamada, K. Neonatal polyI:C treatment in mice induces schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neuroscience* 2009, the 39th annual meeting of the Society for Neuroscience. (Chicago, USA), (2009, 10. 17-21).

⑤ 永井拓, 鍋島俊隆, 山田清文. ニコチンの報酬効果における組織プラスミノージェン活性化因子の関与 (シンポジウム). 第 44 回日本アルコール・薬物医学会、第 21 回日本アルコール精神医学会、第 12 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成 21 年度合同学術総会 (横浜), (2009, 9. 7-9).

[図書] (計 1 件)

① 永井拓, 鍋島俊隆, 山田清文. 第 II 編第 4 章報酬機構関連 3 依存性薬物による精神障害の分子機序. 「実践行動薬理学」, (編集・(社)日本薬理学会 編集責任者・武田弘志, 辻稔, 赤池昭紀), pp272-281, 金芳堂, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 統合失調症マーカー及びその利用

発明者: 尾崎紀夫, 永井拓, 吉見陽,

山田真之亮.

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-147017

出願年月日: 2010 年 6 月 29 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

永井 拓 (NAGAI TAKU)

名古屋大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 10377426

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし