

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790521  
 研究課題名（和文） 統合失調症の認知機能障害におけるアセチルコリン神経基盤の解明と創薬研究  
 研究課題名（英文） Research for the cholinergic basis of cognitive dysfunction in schizophrenia  
 研究代表者  
 吾郷 由希夫（AGO YUKIO）  
 大阪大学・大学院薬学研究科・助教  
 研究者番号：50403027

研究成果の概要（和文）：統合失調症において、認知機能障害の重要性は強く認識されており、患者の QOL 向上を目指す上で疾患の中核症状と考えられている。本研究では、アセチルコリン分解酵素の阻害薬でアルツハイマー病治療薬として開発されているガラントミンが、臨床において統合失調症の認知機能障害を改善することに着目し、その作用メカニズムの解析から、統合失調症認知機能障害の病態生理基盤、およびガラントミンの治療効果におけるムスカリン M<sub>1</sub> 受容体の関与を明らかにした。本受容体活性化薬の新規治療薬としての可能性を提唱するものである。

研究成果の概要（英文）：In recent years, greater attention has been given to cognitive dysfunction in schizophrenia and several studies suggest that this is a primary symptom related to patient QOL. In view of the clinical evidence that acetylcholinesterase inhibitor galantamine, currently used for the treatment of Alzheimer's disease, improves cognitive dysfunction in schizophrenia, this study examined to understand the underlying mechanism for the beneficial effect of galantamine. The present result suggests that muscarinic cholinergic system, especially M<sub>1</sub> receptors, is involved in the pathophysiology of cognitive dysfunction in schizophrenia and in the effect of galantamine. These findings also imply that muscarinic M<sub>1</sub> receptor agonists have a novel therapeutic value for cognitive dysfunction in schizophrenia.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：中枢神経薬理

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：統合失調症・認知機能障害・アセチルコリン(ACh)・環境因子・PACAP・プレレパルスインヒビション(PPI)・ムスカリン受容体・神経栄養因子

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、幻覚や妄想(陽性症状)、感情障害・社会性の欠如(陰性症状)、認知機能

障害を特徴とし、人口の約100人に1人が罹患する頻度の高い精神疾患である。近年のドパミン・D<sub>2</sub>受容体/セロトニン(5-HT)<sub>2A</sub>受容体アンタゴニスト、あるいは多受容体作用型

の非定型抗精神病薬の開発から、陽性症状の改善だけでなく陰性症状の改善ならびに副作用の軽減に関して一定の薬物療法が確立されてきたものの、未だ治療抵抗性の患者が多く存在すること、特に認知機能障害においては改善が困難なことから、新しい治療薬の開発が求められている。

近年、統合失調症患者の海馬や大脳皮質、線条体において、ニコチン性アセチルコリン (ACh)受容体やムスカリン性 ACh 受容体の発現量が低下していること、また頭頂葉において ACh 合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼの活性が低下していることが報告され、統合失調症の病態に ACh 神経系の機能低下が関与する可能性が示されている (Schizophr. Bull. 24, 325-341, 1998)。我々は、統合失調症病態における認知機能障害の改善に ACh 神経系の賦活化が有効なのではないかという仮説を立て、ACh 神経系を標的基盤とする新しい創薬アプローチの可能性について検討を行ってきた。その中で、ACh 分解酵素の阻害薬でアルツハイマー病治療薬として開発されているガラントミンが、統合失調症モデル動物において認知機能障害を反映するといわれるプレパルスインヒビション (PPI) 障害を改善することを見出した (Psychopharmacology 196, 293-301, 2008)。

## 2. 研究の目的

本研究は、統合失調症の認知機能障害における新たな創薬標的基盤として、ACh 神経系に着目し、疾患発症における“遺伝的要因”と“環境的要因”の両因子を取り入れたモデル動物を利用することで、その具体的な役割、治療標的としての可能性を追究する。つまり、認知機能障害を呈するモデルマウス (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 遺伝子欠損マウスおよび長期隔離飼育マウス) の脳内において、ACh 神経系シグナルに関わる分子の特定や、ACh 受容体の発現、機能に変化が見られるか否かの検証を行う。さらに、ガラントミンの PPI 障害改善作用の受容体機構を明らかにするため、ニコチンならびにムスカリン受容体の選択的アゴニスト・アンタゴニストを用い、どのサブタイプが重要な役割を担うかを見極める。これらを通じて、ACh 神経系を標的とする薬物開発の可能性・妥当性・差別化を追究する。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

#### ① 長期隔離飼育マウス

3 週齢の ddY 系雄性マウスを無作為に集団飼育群と隔離飼育群に分け、前者は透明なケージにおいて 5~6 匹、後者は同じ大きさの壁が灰色のケージにおいて 1 匹とし、6 週間以上飼育したのち 9~11 週齢で実験に用いた。

#### ② PACAP 遺伝子欠損マウス

ICR 系マウスの遺伝的背景を持つ雄性の PACAP 遺伝子欠損マウスおよび同腹の野生型マウスは、離乳後 5~6 匹で群飼育し、9~11 週齢で実験に用いた。マウスの遺伝子型解析は、尾から DNA を抽出し PCR 法にて判定した。

なお、全ての動物は、室温：22 ± 1℃、照明時間：1 日 12 時間 (8:00-20:00) の環境下におき、水と固形飼料は自由に摂取させた。なお、動物実験は「大阪大学大学院薬学研究科動物実験規定」に準じて倫理的に行った。

### (2) 聴覚性驚愕反応試験

PPI とは、聴覚性驚愕反応試験において、突然の音刺激 (パルス) に対する驚愕反応が、刺激の直前に小さな音刺激 (プレパルス) を差し挟むことにより大幅に抑制される現象を指し、感覚情報処理機能の指標とされている。PPI の障害は感覚情報の氾濫をきたし、注意障害や認知の断片化を引き起こすため、統合失調症患者でみられる PPI 障害は、本疾患における複雑な認知機能障害の一要因となっている (Arch. Gen. Psychiatry 63, 1325-1335, 2006)。

試験には、SR-LAB システム (San Diego Instruments, San Diego, CA., USA) を用い、パルスとして 120 dB を、プレパルスとして 68、71 および 74 dB を負荷して測定した。驚愕反応の記録は、パルス刺激開始から 100 msec 間行い、その間の最大反応強度を計測し、プレパルスにおける PPI (%) を以下の式により算出した。PPI (%) = 100 - [(プレパルス + パルスに対する反応 / パルス単独に対する反応) × 100]

### (3) 脳内神経伝達物質遊離解析

脳内の細胞外ドパミン遊離量は、*in vivo* マイクロダイアリシス法により解析し、あらかじめ目的部位に透析プローブを挿入するための手術を施し、実験当日、リンゲル液を灌流することによりマウスの無麻酔・無拘束下で神経伝達物質を回収し、高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器システムにて測定した。

### (4) ACh 受容体機能評価

#### ① 自発運動量測定

マウスの自発運動量は SUPERMEX® 運動量測定システム (Muromachi Kikai Co., Ltd.,

Tokyo)を用いて測定した。生理食塩水または薬物を投与後、直ちにマウスを1匹ずつ透明のテストケースに入れ、防音ボックス内で30分間自発運動量を解析した。

#### ②直腸体温測定

マウスの直腸体温はBAT-12 デジタル温度計®(Physitemp Instruments Inc., Clifton)を用いて測定した。試験当日の朝 9:00-10:00の間に、15分間隔で2回体温を測定した。その後、測定場所に対する馴化時間を設けた後、定常状態の体温を測定し、生理食塩水または薬物を投与した。投与後15分間隔で60分まで体温測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 精神疾患モデル動物のACh神経機能評価

これまでに、直接的なACh神経の障害によってPPI障害が誘発されることは報告されているが(Neuroscience 114, 91-98, 2002)、実際にPPI障害モデル動物でのACh神経機能に関する検討は全くなされていない。そこで精神疾患モデル動物の認知機能障害におけるACh神経系の関与を明らかにするため、PACAP遺伝子欠損マウスおよび長期隔離飼育マウスのACh神経機能評価を行った。大脳皮質前頭前野、線条体、海馬におけるACh合成酵素(コリンアセチルトランスフェラーゼ)および分解酵素(AChエステラーゼ)の活性については、それぞれ野生型マウスおよび群飼育マウスと同程度であり、変化は認められなかった。一方で、ニコチンおよびムスカリン受容体リガンドを用いた行動薬理的・神経化学的解析から、長期隔離飼育マウスにおいて、ニコチン受容体機能は保持されているものの、ムスカリン受容体、特にM<sub>1</sub>受容体機能が低下していることを見出した。すなわち、ニコチンによる体温下降作用、自発運動量低下作用は、群飼育マウスおよび長期隔離飼育マウスと同等であったのに対し、ムスカリン受容体アゴニストであるオキソトレモリンによる自発運動量の低下、ならびに選択的M<sub>1</sub>受容体アゴニストであるN-デスメチルクロザピンによる大脳皮質前頭前野ドパミン遊離の増加は、長期隔離飼育マウスにおいて減弱していた(図1)。

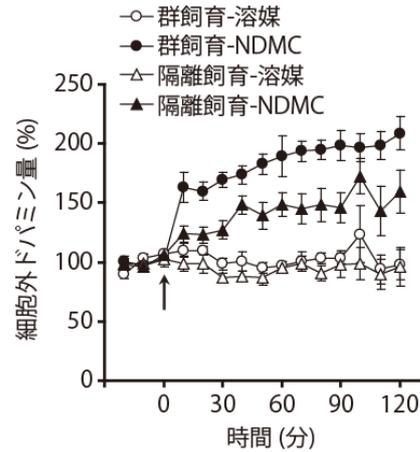


図1 選択的M<sub>1</sub>受容体アゴニストN-デスメチルクロザピンによる大脳皮質ドパミン遊離の増加に対する長期隔離飼育の影響。溶媒あるいはN-デスメチルクロザピン(5 mg/kg: NDMC)を基礎遊離が安定した後に腹腔内投与した(矢印)。

#### (2) ガラントミンのPPI障害改善作用の受容体機構

長期隔離飼育マウスにおけるガラントミンのPPI障害改善作用は、非選択的ニコチン受容体アンタゴニストであるメカミラミン、ならびに選択的α7ニコチン受容体アンタゴニストであるメチルリカコニチンによっては拮抗されなかった。一方で、非選択的ムスカリン受容体アンタゴニストであるスコポラミン、ならびに選択的M<sub>1</sub>ムスカリン受容体アンタゴニストのテレンゼピンが、ガラントミンのPPI障害改善作用を抑制すること、さらに選択的M<sub>1</sub>受容体アゴニストであるN-デスメチルクロザピンが隔離飼育マウスのPPI障害を改善することを見出した。長期隔離飼育マウス脳においてM<sub>1</sub>ムスカリン受容体機能が特異的に低下していたことから、隔離飼育といった環境的ストレスによって誘発される感覚情報処理機能障害において、ムスカリン受容体、特にM<sub>1</sub>受容体の機能調節が密接に関与していることが示唆された。

#### (3) 脳内神経栄養因子・成長因子発現に対するPACAP遺伝子欠損の影響

PACAPが神経細胞の発達期、脳における遊走や神経突起の伸展に影響を与え、神経回路の構築に関与することが示唆されている。一方、大脳皮質へのACh神経の投射には、標的由来神経栄養因子NGF(nerve growth factor)の働きが重要であることが報告されている(J. Neurosci. 17, 3796-3803, 1997)。すなわち、生後すぐに大脳皮質に抗NGF抗体を投与すると、脱分極刺激によるACh遊離応答の減弱や、学習能力の低下が起こることが示されている。そこで、PACAP遺伝子欠損マウスの示すPPI障害に神経栄養因子や成長因子の発現変化が関与している可能

性を考え、神経栄養因子の発現量について網羅的に解析した。その結果、NGFをはじめ、BDNF、NT-3、VEGF、GDNF に関して変化は見られなかったものの、海馬においてインスリン様成長因子 1 (IGF-1)の有意な低下が認められた(図 2)。IGF-1 は神経新生などに深く関与することから、PACAP 遺伝子欠損マウスの認知機能や PPI などの海馬機能の障害に一部寄与している可能性が見出された。

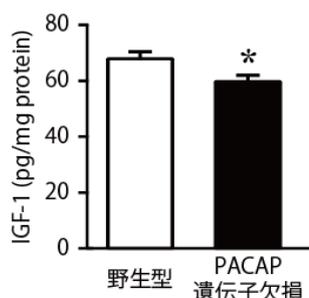


図 2 PACAP 遺伝子欠損マウスの海馬 IGF-1 発現量. \* $P < 0.05$  vs. 野生型マウス.

## 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 7 件)

① Ken Koda, Yukio Ago, Koji Yano, Momoe Nishimura, Hisako Kobayashi, Asako Fukada, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda, Involvement of decreased muscarinic receptor function in prepulse inhibition deficits in mice reared in social isolation, *British Journal of Pharmacology*, 査読有、162 巻、(2011)、763-772

② Yukio Ago, Masanori Yoneyama, Toshihiro Ishihama, Shunsuke Kataoka, Koichi Kawada, Tetsuya Tanaka, Kiyokazu Ogita, Norihito Shintani, Hitoshi Hashimoto, Akemichi Baba, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda, Role of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in adult hippocampal neurogenesis, *Neuroscience*, 査読有、172 巻、(2011)、554-561

③ Toshihiro Ishihama, Yukio Ago, Norihito Shintani, Hitoshi Hashimoto, Akemichi Baba, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda, Environmental factors during early developmental period influence psychobehavioral abnormalities in adult PACAP-deficient mice. *Behavioural Brain*

*Research*, 査読有、209 巻、(2010)、274-280

④ 吾郷由希夫, 感覚情報処理機能障害に対するガラントミンの有効性とそのメカニズム、*薬学雑誌*, 査読有、130 巻、(2010)、1305-1310

⑤ 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫, うつ病と副腎皮質ステロイドホルモン受容体、*日本薬理学雑誌*, 査読有、134 巻、(2009)、304-308

⑥ 吾郷由希夫, 松田敏夫, ガラントミンによるムスカリン性アセチルコリン受容体活性化の機構、*生体の科学*, 査読無、60 巻、(2009)、408-409

⑦ 吾郷由希夫, 川崎俊之, 代謝型グルタミン酸受容体と精神疾患、*脳 21*, 査読無、12 巻、(2009)、333-339

[学会発表] (計 26 件)

① 香田健, 吾郷由希夫, 矢野耕史, 深田亜沙子, 梨子田哲明, 太田友樹, 田熊一敬, 松田敏夫, ムスカリン受容体への作用の違いが長期隔離飼育誘発プレパルスインヒビション障害に対するガラントミンとドネペジルの作用の違いに関与する、第 84 回日本薬理学会年会、2011.3.22、横浜

② 深田亜沙子, 吾郷由希夫, 香田健, 矢野耕史, 田熊一敬, 松田敏夫, 長期隔離飼育マウス脳のムスカリンM1 受容体機能低下、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010. 10.30、枚方

③ 山田さやか, 片岡駿介, 竹本光佑, 吾郷由希夫, 新谷紀人, 橋本均, 馬場明道, 田熊一敬, 松田敏夫, 豊かな環境飼育による PACAP 遺伝子欠損マウス異常行動改善の持続性、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010. 10.30、枚方

④ 吾郷由希夫, 香田健, 矢野耕史, 田熊一敬, 松田敏夫, アルツハイマー病治療薬ガラントミンの感覚情報処理障害改善作用、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010. 10.30、枚方 (招待講演)

⑤ 吾郷由希夫, 米山雅紀, 荻田喜代一, 新谷紀人, 橋本均, 馬場明道, 田熊一敬, 松田敏夫, 海馬神経新生、栄養因子産生における pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide の役割、第 20 回日本臨床神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会、2010.9.16、仙台

⑥ 香田健、吾郷由希夫、矢野耕史、梨子田哲明、西村百恵、深田亜沙子、田熊一敬、松田敏夫、隔離飼育誘発プレバルスインヒビション障害に対するガラントミン、ドネペジルの異なる作用の受容体機構、第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2010.9.15、仙台

⑦ 深田亜沙子、吾郷由希夫、香田健、矢野耕史、田熊一敬、松田敏夫、長期社会的隔離飼育による脳内ムスカリン性アセチルコリン受容体の機能低下、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2010、2010.9.11、京都

⑧ 吾郷由希夫、米山雅紀、荻田喜代一、新谷紀人、橋本均、馬場明道、田熊一敬、松田敏夫、豊かな環境による海馬神経新生、栄養因子産生における神経ペプチド PACAP の役割、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 合同大会 (Neuro2010)、2010.9.4、神戸

⑨ Yukio Ago、Ken Koda、Koji Yano、Kazuhiro Takuma、Toshio Matsuda、Alzheimer's disease drug galantamine, but not donepezil, improves social isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition via muscarinic acetylcholine receptors, The 2010 XXVII Congress of the CINP (Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum)、2010.6.7、Hong Kong (China)

⑩ 西村百恵、香田健、矢野耕史、吾郷由希夫、田熊一敬、松田敏夫、長期隔離飼育マウスの脳アセチルコリン神経系の機能解析、第 83 回日本薬理学会年会、2010.3.17、大阪

⑪ 吾郷由希夫、荒木良太、矢野耕史、田熊一敬、松田敏夫、発育期環境ストレス負荷による精神機能障害と創薬、第 83 回日本薬理学会年会、2010.3.16、大阪

⑫ 吾郷由希夫、矢野耕史、荒木良太、田熊一敬、松田敏夫、グルココルチコイド長期負荷による中枢神経機能障害、第 83 回日本薬理学会年会、2010.3.16、大阪

⑬ Yukio Ago、Ken Koda、Koji Yano、Tetsuaki Nashida、Kazuhiro Takuma、Toshio Matsuda、Galantamine, but not donepezil, improves isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition: Implication of M<sub>1</sub> muscarinic acetylcholine receptors, The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP)、2009.11.13、京都

⑭ Shunsuke Kataoka、Toshihiro Ishihama、Chika Manabe、Yukio Ago、Norihiro Shintani、Hitoshi Hashimoto、Akemichi Baba、Kazuhiro Takuma、Toshio Matsuda、Early environmental enrichment improves some behavioral abnormalities in PACAP-KO mice, The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP)、2009.11.13、京都

⑮ 吾郷由希夫、香田健、矢野耕史、梨子田哲明、田熊一敬、松田敏夫、ガラントミンの長期隔離飼育誘発プレバルスインヒビション障害改善作用：ムスカリン性アセチルコリン M<sub>1</sub> 受容体の関与、第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2009.11.13、京都

⑯ 片岡駿介、石濱壽紘、真邊知佳、吾郷由希夫、新谷紀人、橋本均、馬場明道、田熊一敬、松田敏夫、幼若期環境強化の PACAP 遺伝子欠損マウス異常行動に与える影響、第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2009.11.13、京都

⑰ 吾郷由希夫、香田健、矢野耕史、田熊一敬、松田敏夫、アルツハイマー病治療薬ガラントミンの感覚情報処理障害改善作用、第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2009.10.24 日、大阪

⑱ Toshihiro Ishihama、Shunsuke Kataoka、Chika Manabe、Yukio Ago、Norihiro Shintani、Hitoshi Hashimoto、Akemichi Baba、Kazuhiro Takuma、Toshio Matsuda、Effects of environmental factors during development on abnormal phenotypes in PACAP knock-out mice、The 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides、2009.10.6、鹿児島

⑲ 矢野耕史、香田健、吾郷由希夫、喜多祐紀、田熊一敬、松田敏夫、ガラントミンはドパミン D<sub>1</sub> 受容体の活性化とアセチルコリンエステラーゼ阻害作用によりマウス大脳皮質において細胞外アセチルコリン量を増加させる、第 32 回日本神経科学大会、2009.9.17、名古屋

⑳ Toshihiro Ishihama、Shunsuke Kataoka、Chika Manabe、Yukio Ago、Norihiro Shintani、Hitoshi Hashimoto、Akemichi Baba、Kazuhiro Takuma、Toshio Matsuda、Environmental factors during development regulate the behavioral phenotypes of PACAP knockout mice, The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSJ Joint Meeting、

2009.8.28、 Busan (Korea)

㉑ Ken Koda, Koji Yano, Yukio Ago, Yuki Kita, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda, Galantamine enhances cholinergic neurotransmission in vivo in mouse prefrontal cortex、 The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSN Joint Meeting、 2009.8.28、 Busan (Korea)

㉒ Yukio Ago, Koji Yano, Ken Koda, Yuki Kita, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda, Involvement of prefrontal dopaminergic system in antidepressant-like effect of the glucocorticoid receptor antagonist、 The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APSN Joint Meeting、 2009.8.27、 Busan (Korea)

㉓ 矢野耕史、香田健、西村百恵、梨子田哲明、吾郷由希夫、田熊一徹、松田敏夫、ガラントミンの感覚情報処理障害改善作用におけるムスカリンM1 受容体の関与、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2009、2009.8.24、東京

㉔ 真邊知佳、石濱壽紘、片岡駿介、吾郷由希夫、新谷紀人、橋本均、馬場明道、田熊一徹、松田敏夫、PACAP遺伝子欠損マウスの行動異常に対する発育環境の影響、第115回日本薬理学会近畿部会、2009.6.26、金沢

㉕ 矢野耕史、香田健、吾郷由希夫、西村百恵、田熊一徹、松田敏夫、ガラントミンのムスカリン受容体活性化を介したアポモルヒネ誘発プレパルスインヒビション障害抑制作用、第52回日本神経化学学会大会、2009.6.24、群馬

㉖ 石濱壽紘、片岡駿介、真邊知佳、吾郷由希夫、新谷紀人、橋本均、馬場明道、田熊一徹、松田敏夫、PACAP 遺伝子欠損マウス表現型の発育期環境因子依存性、第6回GPCR研究会、2009.5.8、東京

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

吾郷 由希夫 (AGO YUKIO)  
大阪大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：50403027