

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790086

研究課題名(和文) 情動制御分子としての II 型 PGD2 受容体 CRTH2 の分子薬理的機能解析

研究課題名(英文) Molecular pharmacological analyses of CRTH2, the type II PGD2 receptor, as a molecule regulating emotional function

研究代表者

新谷 紀人 (Shintani, Norihito)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10335367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：II型プロスタノイド受容体CRTH2は末梢炎症に対する促進的機能が明らかにされた一方、中枢神経系における機能は不明な点が多い。本研究では、これまで見出しつつある情動障害の発現に対する脳CRTH2の関与について、その炎症病態時の情動障害に対する選択的関与を明らかにするほか、認知機能制御における役割をヒトと実験動物の双方で新たに見出した。また、CRTH2の中枢機能を分子レベルで評価できる新手法として、CRTH2ノックダウン系などを確立した。

研究成果の概要(英文)：Although accumulating evidences established stimulatory roles of prostanoid receptor CRTH2 in peripheral inflammation, its brain function is poorly understood. This study has revealed the specific involvement of brain CRTH2 in the emotional impairment in mice sickness behavior models, and its possible roles in the regulation of cognition both in experimental animals and human subjects. This study has also developed a knockdown system of CRTH2 etc., which will contribute to further molecular analysis of CRTH2 in the central nervous system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・薬理系薬学

キーワード：PGD2 情動機能 認知機能 sickness behavior 統合失調症 うつ病 ノルアドレナリン ノックダウン

## 1. 研究開始当初の背景

Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper type 2 cells (CRTH2)は、多くの研究から、prostaglandin (PG) D<sub>2</sub> の II 型受容体として末梢炎症反応に促進的に関与することが明らかにされているが、その中枢機能はほとんど明らかでない。

一方で研究代表者は、神経ペプチド pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)の下流標的としてリポカリン型 PGD 合成酵素(L-PGDS)等を同定するとともに、CRTH2 が PACAP の下流で機能する可能性を見出した。また、15d-PGJ<sub>2</sub>による NGF 誘発性の神経突起伸展促進作用に CRTH2 を介した p38 MAP kinase の活性化が関与することを見出すほか、内因性の CRTH2 が、定常時の意欲調節や炎症病態時の意欲低下、ならびに炎症病態時の扁桃体や視床下部室傍核の活性化に関与する可能性を見出していた。

すなわち CRTH2 は、これらの脳部位で意欲低下などの情動機能異常の発現に重要な役割を果たす可能性が考えられていたが、他の精神疾患モデルで CRTH2 シグナルがどのような役割を担い、またどのような発現機構で機能しているかは不明であった。またマウスと同様に、ヒトでも情動関連機能と関連するかどうか不明であった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、代表者が得た知見から導かれる仮説“CRTH2 は情動障害の新規創薬標的になる”を基礎・臨床の実験系で検証すると共に、CRTH2 の中枢機能を分子レベルで評価できる新手法の開発を目的に実施した。

## 3. 研究の方法

基礎研究は、大阪大学組換え DNA 実験委員会、大阪大学動物実験委員会で承認された計画に従い、臨床研究は大阪大学倫理委員会で承認された計画に従い実施した。

疾患モデルの作製： Sickness behavior のモデルとして lipopolysaccharide (LPS)や colon26 細胞の投与、統合失調症のモデルとして MK-801 の急性投与、うつ病モデルとしてコルチコステロンの 21 日間連続投与を行うことで種々の疾患モデルを作製した。情動機能評価として、social interaction test, novel-object exploration test, forced swim test, novelty-suppressed test を、認知機能評価として、fear conditioning test, novel-object recognition test, Y-maze test, rota-rod test を実施した。CRTH2 の遺伝子欠損(KO)マウスと CRTH2 の拮抗薬を用いた検討により、CRTH2 の関与を解析した。

一遺伝子多型の解析： 包括型脳科学研究推進支援ネットワークの支援を頂いた。統合失調症患者および健常者由来のゲノム DNA を用い、各群で CRTH2 遺伝子上の 5 つの一塩基多型(SNP)の頻度を解析した。また各 SNP と人格・性格傾向や認知機能との関連を解析した。

神経基盤解析： I 型受容体 DP の拮抗薬や PG 合成の律速酵素である cyclooxygenase (COX-1, COX-2)の阻害剤、また PACAP 遺伝子欠損マウスを用いた検討を行った。脳内の神経活性化を c-Fos の発現誘導を指標として免疫組織化学的手法により解析した。また、大脳皮質前頭前野、海馬、視床下部、扁桃体の mRNA 発現量やモノアミン含量の変化を real-time PCR 法や HPLC 法で解析した。

新手法開発： 5 種の CRTH2 shRNA 発現ベクターまたはスクランブル配列を組み込んだベクターを、神経芽細胞腫 Neuro2a に導入し、CRTH2 mRNA の発現抑制効果を real-time PCR 法で評価した。神経突起の伸展等、神経細胞の形態変化を半網羅的に解析できる実験系を構築すると共に、DIG-labeled RNA プローブを用いた non-R1 の *in situ* hybridization (ISH) 解析系の確立を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) 炎症時の脳機能変化と CRTH2

低用量の LPS 投与により、マウスでは一過性の自発運動量の減少が誘発される一方、社会性行動や新奇物体探索行動が持続的に減少するなど、情動関連障害が長期的に誘発されることを明らかにした(論文)。一方で CRTH2 の遺伝子欠損や拮抗薬の脳室内投与は、LPS やガン細胞で誘発される様々な行動変化のうち、上述の情動関連障害のみを選択的に消失させることを見出した。また、これらの変化は COX-2 阻害薬でも消失する一方、DP 拮抗薬や COX-1 阻害薬では全く影響されなかった。さらに CRTH2 の阻害は、LPS による扁桃体・視床下部の活性化を選択的に抑制することも明らかにした。本結果から、炎症病態時の意欲低下等に対する治療薬としての CRTH2 拮抗薬の有用性が示された(論文 など)。

### (2) ヒト CRTH2 遺伝子の関連解析

SNP1-SNP2、SNP2-SNP3、SNP1-SNP2-SNP3 のハプロタイプが統合失調症と弱い関連をもつこと、また WMS、WCST、WAIS-III などの認知機能試験の結果から、SNP2 が統合失調症患者の注意力障害と関連することを示唆した。また驚くことに、SNP2 以外の 4 つの SNPs は全て、疾患とは関連なく、種々の認知機能と関連することを見出した(例えば SNP4 は WCST の達成度と強く関連 (P=0.00035))。一方で申請当時に示唆されていた、CRTH2 と新奇性追求や衝動性などの人格・性格傾向との関連は健常者内でも全く認められなかった。本結果から、CRTH2 と認知機能との関連が新たに示唆された(論文執筆中)。

### (3) CRTH2 と認知・情動機能との関連

コルチコステロン (CORT) モデルや PACAP-KO マウスの様々な行動変化のうち、CRTH2 は forced swim test における無動時間の延長や、社会性行動の低下など、特定の情動関連障害に選択的に関与することを見出した。また海馬において、CORT によりノルアドレナリン代謝回転が増加していることを

見出すとともに、野生型と比較して CRTH2-KO マウスではノルアドレナリンの代謝産物である MHPG が増加していることを見出した。すなわち、CRTH2 とノルアドレナリン神経系の関連を初めて明らかにした。また本モデルでは、扁桃体 COX-2 発現の増加、海馬 L-PGDS 発現の増加を認め、扁桃体機能調節における CRTH2 の重要性を再確認するとともに、本モデルにおける PG と海馬機能との関連を新たに示した(以上、近日論文投稿予定)。一方で認知機能との関連については、定常時の CRTH2-KO マウスの認知機能はいずれも正常である一方、MK-801 急性投与モデルにおける空間認知機能の障害が CRTH2 の阻害で選択的に改善されることを見出した。現在、これらの行動変化と関連した脳内神経核の活性化変化を検討している。

#### (4)CRTH2 の機能解析に資する新手法の開発

各種 shRNA の機能評価を行った結果、1 つのベクターで約 10% までの CRTH2 発現抑制が確認できた。また初代培養海馬神経細胞を用いた、培養 7 日目までの形態変化の解析から、神経細胞の軸索や樹状突起の伸展・分岐と細胞体サイズの増加との時間的連関を明らかにした(論文投稿中)。これらの実験系を用いることで、神経細胞の発達における CRTH2 の機能解明が進むと期待される。なお ISH 法では、Pc-Fos 等について特異的なシグナルを得ることができたが、CRTH2 ではシグナルが弱く、追加の条件設定が必要だと考えている。

#### [総括と意義]

本研究により、CRTH2 は情動機能に加え認知機能にも関連する可能性が、ヒトと実験動物の両方で明らかになった。また情動機能や認知機能が障害される動物モデルにおいて、CRTH2 の阻害はいずれも著明かつ選択的な改善効果を示すことも明らかになった。以上の成果は、CRTH2 がこれら疾患の新たな治療標的になることを示すと共に、CRTH2 の中枢機能解析によって情動や認知機能の制御様式が詳細に明らかになることを期待させる。また特に論文は、CRTH2 の *in vivo* 中枢機能を明らかにした世界初の報告となった。今後、本成果に基づいた多くの研究がなされることで、神経精神領域における分子病態研究や創薬研究が大きく進展することを期待する。

#### 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 2 件)

Ryota Haba, Norihito Shintani(co-1st author), Yusuke Onaka, Takuya Kanoh, Hyper Wang, Risa Takenaga, Atsuko Hayata, Hiroyuki Hirai, Kin-ya Nagata, Masataka Nakamura, Atsushi Kasai, Ryota Hashimoto, Kazuki Nagayasu, Takanobu Nakazawa, Hitoshi Hashimoto, Akemichi Baba. Central CRTH2, a Second Prostaglandin D2 Receptor,

Mediates Emotional Impairment in the Lipopolysaccharide and Tumor-Induced Sickness Behavior Model. *Journal of Neuroscience*, 34(7): 2514-2523 (2014) 査読あり

Ryota Haba, Norihito Shintani(co-1st author), Yusuke Onaka, Hyper Wang, Risa Takenaga, Atsuko Hayata, Akemichi Baba, Hitoshi Hashimoto. Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. *Behavioral Brain Research*, 17: 423-431 (2012) 査読あり

#### [学会発表](計 12 件)

Yusuke Onaka, Norihito Shintani, Hitoshi Hashimoto. Anti-depressive phenotype in mice lacking prostanoid receptor DP2. The 8th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, 2014 年 6 月 11 日、大阪大学銀杏会館三和ホール(大阪府)

尾中 勇祐、新谷 紀人、武永 理佐、叶 拓也、木野村 元彦、羽場 亮太、平井 博之、永田 欽也、中村 正孝、早田 敦子、笠井 淳司、馬場 明道、橋本 均。情動障害モデルにおける行動変化に CRTH2 の遺伝子欠損が与える影響。第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2013 年 10 月 25 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

Yusuke Onaka, Takuya Kanoh, Norihito Shintani, Risa Takenaga, Ryota Haba, Atsuko Hayata, Atsushi Kasai, Hiroyuki Hirai, Kin-ya Nagata, Masataka Nakamura, Akemichi Baba, Hitoshi Hashimoto. Altered cognitive function in mice lacking prostanoid receptor DP2. Neuro2013, 2013 年 6 月 22 日、京都国際会議場(京都府)

橋本 均、新谷 紀人、羽場 亮太、尾中 勇祐。プロスタグランジン D2 受容体サブタイプ DP2 (CRTH2) の脳機能、GPCR 研究会 2013、2013 年 5 月 11 日、日本科学未来館(東京都)

新谷 紀人、羽場 亮太、尾中 勇祐、武永 理佐、叶 拓也、平井 博之、永田 欽也、中村 正孝、早田 敦子、馬場 明道、橋本 均。プロスタノイド受容体 CRTH2 の sickness behavior 発現における役割。日本薬学会第 113 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

叶 拓也、新谷 紀人、尾中 勇祐、武永 理佐、羽場 亮太、早田 敦子、平井 博之、永田 欽也、中村 正孝、馬場 明道、橋本 均。プロスタノイド受容体 CRTH2 欠損マウスでは MK-801 による認知障害は認められない。第 86 回 日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡国際会議場(福岡県)

Norihito Shintani, Yusuke Onaka, Risa Takenaga, Takuya Kanoh, Ryota Haba, Atsuko Hayata, Hiroyuki Hirai, Kin-ya Nagata, Masataka Nakamura, Akemichi Baba, Hitoshi Hashimoto. Selective involvement of prostanoid receptor CRTH2 in depression-like behaviors. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry 2012年10月1日, 神戸国際会議場(兵庫県)

尾中 勇祐、新谷 紀人、武永 理佐、叶 拓也、羽場 亮太、平井 博之、永田 欽也、中村 正孝、早田 敦子、馬場 明道、橋本 均. 情動障害モデルの行動異常におけるプロスタノイド受容体 CRTH2 の関与、第 11 回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム 2012、2012年9月16日、九州大学病院キャンパス コラボ (福岡県)

武永 理佐、尾中 勇祐、叶 拓也、新谷 紀人、羽場 亮太、平井 博之、永田 欽也、中村 正孝、早田 敦子、馬場 明道、橋本 均. 担ガン動物の行動異常発現におけるプロスタノイド受容体 CRTH2 の役割. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012、2012年9月1日、神戸学院大学(兵庫県)

Ryota Haba, Norihito Shintani, Yusuke Onaka, Risa Takenaga, Atsuko Hayata, Hiroyuki Hirai, Kin-ya Nagata, Masataka Nakamura, Akemichi Baba, Hitoshi Hashimoto. Specific roles of prostanoid receptor CRTH2 in LPS-induced sickness behaviors. The 32nd Naito Conference, 2011年9月27日, ハヶ岳ロイヤルホテル(山梨県)

武永 理佐、羽場 亮太、尾中 勇祐、新谷 紀人、早田 敦子、馬場 明道、橋本 均. Lipopolysaccharide によって誘発される新奇物体への探索行動の減少における cyclooxygenase-2 の選択的な関与. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011、2011年8月31日、北里大学薬学部コンベンションホール(東京都)

羽場 亮太、新谷 紀人、尾中 勇祐、武永 理佐、早田 敦子、馬場 明道、橋本 均. LPS による扁桃体中心核の活性化における CRTH2 の関与メカニズム. 2011年7月8日、ウイנק 愛知(愛知県)

〔その他〕

ホームページ等

執筆者自身による研究論文レビュー (BioMedサーカス com). 新谷紀人、羽場亮太、橋本均、馬場明道. 炎症時の情動関連障害はプロスタノイド受容体 CRTH2 を介して発現する. [http://biomedcircus.com/paper\\_03\\_27.htm](http://biomedcircus.com/paper_03_27.htm)

新谷 紀人 (SHINTANI NORIHITO)  
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：10335367

6. 研究組織

(1) 研究代表者