

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32203
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23890200
 研究課題名（和文） 高感度定量プロテオミクスを用いた抗精神病薬の作用機序探索
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of action of antipsychotics by highly sensitive quantitative proteomics

研究代表者
 有銘 預世布（ARIME YOSEFU）
 獨協医科大学・医学部・助教
 研究者番号：80609404

研究成果の概要（和文）：本研究は脳内タンパク質における定量プロテオミクス系を構築し、抗精神病薬の作用機序を探索することを目的とした。フェンサイクリジン（PCP）慢性投与マウスに臨床を反映した用量で抗精神病薬を浸透圧ポンプで慢性投与すると、低用量 PCP に対する反応性亢進を有意に抑制させることを見出した。また、細胞分画法および膜タンパク質を含む各種タンパク質特異的な定量用ペプチドの作成、LC-MS/MS を用いた多検体タンパク質同時定量系を構築した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to set up the experimental system of quantitative proteomics for mouse brain protein and explore the mechanism of action of antipsychotics. We found that enhanced response to an acute phencyclidine (PCP) challenge in mice previously undergoing chronic PCP treatment, called as sensitization, was significantly attenuated by treatment with clinically relevant antipsychotics dose regimen using osmotic minipump. And, we established a method of cell fractionation, peptides specific for each target protein including membrane protein and simultaneous quantification method for their proteins using LC-MS/MS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：精神神経科学

科研費の分科・細目：研究活動スタート支援

キーワード：統合失調症、モデルマウス、行動、抗精神病薬、受容体占拠率、定量プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は思春期・青年期に発症することが多く、世界的に人口の約 1%に見られ、治療を行っても十分な効果が得られずに生活障害を引き起こすことも多く、社会的要請の高い課題である。統合失調症に対する主な治療

法である薬物療法の中核を担う抗精神病薬はドーパミン D2 受容体拮抗作用を共通して有しており、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などのドーパミン作動薬やフェンサイクリジン（PCP）、ケタミンなどの NMDA 受容体拮抗薬が症状を

増悪させることが分かっている。また PCP の乱用者は、統合失調症の陽性症状と陰性症状の両者に酷似した精神症状と認知機能障害を示すことが知られている。陽電子放射断層撮像法 (PET) などの脳機能画像研究から、抗精神病薬投与の際、線条体での 65~70%以上の D2 受容体占拠率が抗精神病作用の発現には必要で、80%以上で錐体外路症状 (EPS) などの副作用を招くことが分かっている。また、抗精神病薬は臨床的には十分な効果発現に数週を要するなど、急性の D2 受容体占拠のみでは説明ができないことが多く、抗精神病薬による持続的な神経伝達変化により誘導される多数の脳内タンパク質によって媒介されていると想定されるが、どのようにして治療効果を発揮するのかが明らかになっていない。

さらに、抗精神病薬の血中半減期はげっ歯類ではヒトと比べて極めて短時間であることが分かっているが、これまでの動物モデルを使用した研究で広く行われてきた皮下・腹腔内への急性および慢性投与では、持続的な線条体での 65~80%の D2 受容体占拠という臨床用量が反映されていないという重大な問題点があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、統合失調症の動物モデルに臨床用量を反映した抗精神病薬の投与量・投与方法により慢性投与を行い、行動障害への作用を検討すること、また脳内タンパク質における定量プロテオミクス系を構築し、治療薬投与によりモデルにおいて発現変動するタンパク質群を定量的に解析することによって、抗精神病薬の作用機序を探索する基盤を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 行動解析による動物モデルの選定

抗精神病薬の作用機序探索に適した持続的な行動障害を示す動物モデルを選定するため、先行研究から統合失調症の動物モデルとして複数の妥当性を有する 3 種のマウスにおいて行動試験を用いた表現型解析を行った。遺伝学的モデルとして、統合失調症の脆弱性遺伝子の 1 つと考えられている

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) に点変異 (100 番目のロイシンがプロリンに変異するミスセンス変異) をもち、統合失調症様行動を示すと報告されている DISC1 L100P マウス (Clapcote et al., Neuron 2007, Lipina et al., Genes Brain Behav 2010) を理化学研究所バイオリソースセンターから入手し (C57BL/6J 背景)、1 度だけ C57BL/6J のメスとかけ合わせた後、系統内で交配させて繁殖し、雄性マウスを実験に使用した。また薬理学的モデルとしてヒトにおいて統合

失調症と酷似した精神症状と認知機能障害を呈する PCP を慢性投与した雄性 C57BL/6J マウス (Jones et al., Br J Pharmacol 2011) を 2 種類 (①5 mg/kg を 7 日間連続で 1 日 2 回皮下投与、②10 mg/kg を 14 日間連続で 1 日 1 回皮下投与) の計 3 種類を用いた。行動試験として、オープンフィールドテスト、ソーシャルインタラクションテスト

(Crawley' s sociability and social novelty test) を試行し、測定・解析には行動解析装置 ANY-maze を使用した。

(2) 抗精神病薬投与

実際の精神科薬物療法と同様に、線条体でのドーパミン D2 受容体占拠率が 65~80%に維持可能なように浸透圧ポンプを用いた。第 1 世代抗精神病薬であるハロペリドール (0.25 mg/kg/day) と第 2 世代抗精神病薬であるオランザピン (7.5 mg/kg/day) および溶媒を上記の投与量になるように各個体の体重に合わせて濃度を調製し、浸透圧ポンプに充填した。PCP 10 mg/kg を 14 日間連続で 1 日 1 回皮下投与し、5 日間の休薬期間後に麻酔下でマウスの皮下に浸透圧ポンプを移植して、抗精神病薬および溶媒を 2 週間投与した。抗精神病薬投与開始 12 日目に PCP 3 mg/kg を皮下投与後、オープンフィールド内で運動量を測定し、PCP への反応性を解析し、14 日目に脳組織 (前頭葉、線条体、海馬) を採取した。

(3) 脳内タンパク質における定量プロテオミクス系の構築

脳内タンパク質の細胞内局在における発現量解析を行うため、脳組織 (前頭葉、線条体、海馬) から可溶性画分、粗膜画分、膜画分を調製するショ糖密度勾配遠心法を用いた実験系の確立を行なった。

タンパク質の定量解析には、東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野 (寺崎哲也教授) が独自に開発した、安定同位体標識した定量用内部標準ペプチドと HPLC 接続型質量分析装置 (LC-MS/MS) によるタンパク質群同時定量法を使用し、LC-MS/MS の MRM モードを用いて解析した。

4. 研究成果

まず、3 種類の動物モデルの表現型解析を行ったところ、DISC1 L100P ホモ・ヘテロ接合体マウスはともに同腹仔の野生型マウスと同様の新規環境下での運動量変化を示し、覚せい剤であるメタンフェタミン投与における過活動も 3 遺伝子型間で有意差なく同程度に投与量依存的に運動量が増加し、先行の Clapcote, Lipina らと一致しない結果が得られた。また、ソーシャルインタラクションテストでは 3 遺伝子型間で有意な差は認められ

ないという Clapcote らと一致した結果を得た。これらの結果は、先行研究と全く一致した実験条件ではないという環境の影響も考えられるが、L100P 変異と連鎖する異なる遺伝子の変異が既報のマウスには残存し、我々が繁殖・使用している系統では消失しているなどの L100P 変異以外の変異が残存している可能性も考えられ、少なくとも L100P の単独の変異のみでは大きな表現型の変化を引き起こさない新たな可能性が示され、より重要な変異や遺伝子相互作用の存在が示唆された。

次に、PCP 5 mg/kg を 7 日間連続で 1 日 2 回皮下投与したマウスは日毎に運動量が増加するという行動感作の形成が認められ、社会性行動の有意な低下を示し、先行研究と一致した結果を得た。しかし、PCP の最終投与から 7 日間の休薬期間をおいた後、PCP による運動量亢進作用をオープンフィールドで解析すると、溶媒投与群と有意差なく同様に運動量の増加が見られ、行動感作の影響が消失していた。次に、PCP 10 mg/kg を 14 日間連続で 1 日 1 回皮下投与したマウス（以下、PCP 慢性投与マウス）は行動感作の形成が認められ、2 週間以上の休薬期間をおいた後も行動感作が持続していたため、比較的長期間の経過観察が必要な抗精神病薬を慢性的に投与する動物モデルとして PCP 慢性投与マウスは適した妥当性を有していることが明らかになった（学会発表 1）。

次に、PCP 慢性投与マウスに抗精神病薬を浸透圧ポンプで慢性投与すると、PCP 慢性投与マウスに抗精神病薬の調製に使用した溶媒を浸透圧ポンプで 2 週間投与した群（病態モデル群）と比較して、オランザピン（7.5 mg/kg/day）群は生理食塩水を 14 日間連続で 1 日 1 回皮下投与し、抗精神病薬の調製に使用した溶媒を浸透圧ポンプで 2 週間投与した群（健常モデル群）と同程度まで PCP 3 mg/kg 投与による運動量増加作用を有意に抑制した。また、ハロペリドール（0.25 mg/kg/day）群では抑制傾向（ $p = 0.056$ ）を示した（学会発表 2）。

タンパク質の定量解析に用いる特異的定量用の合成ペプチド（神経伝達物質関連として AMPA 受容体のサブユニットである GluR1、GluR2、GluR3、NMDA 受容体のサブユニットである NR1、NR2A、NR2B、GABA 合成酵素 GAD67 等、細胞内シグナル伝達関連として ERK1、ERK2、 β -catenin、GSK3 β 等、シナプス関連分子である synaptophysin、PSD-95 等）において、MS での測定条件を確立し、細胞分画したマウス脳組織（前頭葉、線条体、海馬）でのタンパク質群同時定量系を構築した。本研究で構築した膜タンパク質を含む脳内タンパク質における定量プロテオミクス系を基盤として、今回明らかにした臨床用量の抗精

神病薬を慢性投与した PCP 慢性投与マウスにおける行動障害の改善作用、つまり表現型の変化を規定するタンパク質群を脳部位・細胞画分ごとに同定・定量することにより、複雑な脳神経回路における抗精神病薬の作用機序を解明する端緒となることが期待される。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Arime Y, Akiyama K. Comparison of behavioral characteristics between genetic and pharmacological animal models of schizophrenia. The Society for Neuroscience (SfN) 42nd Annual Meeting, New Orleans, LA, USA, Oct 13-17, 2012
2. Arime Y, Akiyama K. The effects of clinically relevant antipsychotics dose regimen on chronic phencyclidine treated mice. The Society for Neuroscience (SfN) 43rd Annual Meeting, San Diego, CA, USA, Nov 9-13, 2013

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dokkyomed.ac.jp/dusm/kousei/407.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有銘 預世布 (ARIME YOSEFU)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80609404

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：