

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791245

研究課題名(和文) グルタミン酸受容体及びカンナビノイド受容体に着目した統合失調症陰性症状の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of schizophrenia negative symptoms that focuses on the glutamate receptors and cannabinoid receptor

研究代表者

上松 謙 (Uematsu, Ken)

久留米大学・高次脳疾患研究所・助教

研究者番号：60441672

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)：研究実施計画に基づき、マウス線条体スライスを用いた、カンナビノイド受容体作動薬刺激により、神経後細胞に特異的に発現するリン酸化蛋白dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 KDa (DARPP-32)のリン酸化解析を、ウエスタンブロット法で測定した。ここでは、カンナビノイド受容体作動薬刺激によって、DARPP-32のスレオニン34残基リン酸化亢進する傾向が得られた。カンナビノイド受容体の発現する培養細胞の作成も完了したが、当初の目的であったグルタミン酸情報伝達系との相互作用、関連解明までは至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Based on the research implementation plan, I analyzed phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 KDa (DARPP-32) which expressed especially in post synaptic cells. I treated mouse striatal slices for cannabinoid receptor agonist stimulation. Experiments were examined by western blotting methods using phospho specific antibody of DARPP-32 threonine 34 residue (Thr 34). The result is that DARPP-32 Thr 34 increase phosphorylation level by cannabinoid receptor agonist expectedly. I completed to generate cell culture for the expression of cannabinoid receptor. However, interaction between glutamate signaling to cannbinoid is future plan of this work.

研究分野：精神薬理学

キーワード：統合失調症 グルタミン酸受容体 カンナビノイド受容体

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の薬物療法は、従来の定型抗精神病薬から非定型抗精神病薬へ移行してきている。しかし、陰性症状である、感情鈍麻、自発性、意欲の低下、無関心は改善が難しいとされ、その病態に興奮性アミノ酸仮説が提唱されている。イオン型グルタミン酸受容体である、NMDA 型受容体部分拮抗薬、フェンサイクリジンの薬物乱用で、統合失調症様の陰性症状が出現することから、グルタミン酸神経伝達系と陰性症状の関連が考えられてきた。グルタミン酸受容体のひとつである、代謝型グルタミン酸受容体 5 型 (mGluR5) は、グルタミン酸情報伝達を緩やかに調節する受容体である。mGluR5 欠損マウスの解析では、統合失調症患者で認められる prepulse inhibition の障害や、海馬 CA1 部位における LTP の障害が報告されており、認知、記憶、学習の面で統合失調症への関与が示唆される。さらに、mGluR5 作動薬により、内因性カンナビノイド (2-アラキドノイルグリセロール [2-AG]) がシナプス後細胞から産生・放出され、逆行性にシナプス前終末に存在するカンナビノイド受容体 1 (CB₁R) を活性化し、グルタミン酸を含む神経伝達物質の放出を抑制することが報告されている。CB₁R は大麻の主成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノールの標的受容体である。脳内カンナビノイドシステムの変容は、意欲、満足感を創生する脳内報酬系の破綻をきたし、統合失調症陰性症状の本質と考えられるアンヘドニア (無快楽症) との関連が示唆される。

2. 研究の目的

本件研究では、研究代表者が、蛋白リン酸化により代謝型グルタミン酸受容体 5 型 (mGluR5) の生理的機能が修飾され、活性が調節されることに着目し研究を推進しており、mGluR5 の新規リン酸化部位の発見と、その機能解析により、mGluR5 の活性調節機構の解明を行った。さらに研究を進展させ、カンナビノイド受容体 1 (CB₁R) への内因性カンナビノイド (2-アラキドノイルグリセロール [2-AG]) を介した影響、シナプス後細胞に存在する CB₁R を介した細胞内情報伝達系も確

認を行い、mGluR5 やその他の受容体との関連の解明を進める目的で研究を遂行した。

3. 研究の方法

シナプス後細胞に特異的に発現するリン酸化蛋白 dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 KDa (DARPP-32) は応募者ら研究グループが解析を続けている。DARPP-32 リン酸化反応は、様々な条件下でなされ、多数の論文報告があり情報の蓄積がなされている。

(1) 6-8 週齢の C57Black/6 マウス脳を取り出し、冷温下に 350 μ m の脳スライスを作成した。スライスから線条体を切り出し、95% 酸素 / 5% 二酸化炭素気泡下に、クレブス重炭酸塩緩衝液に 1 時間前処置を行った。前処置後、スライスは試薬を用いて処置を行い、ドライアイスで瞬間凍結した。サンプルを 1% SDS にて超音波破砕を行い、その後 10 分間煮沸処理した。100 μ g のサンプルを 10% SDS - PAGE を用いて電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写した。DARPP-32、スレオニン 34 残基のリン酸化を特異的に検出するリン酸化抗体を用いてウエスタンブロット法にて解析した。

(2) 培養細胞上で、CB₁R を発現させて、細胞内カルシウム動態やマップキナーゼリン酸化解析を行う実験計画に沿って、CB₁R のクローニングを行い、発現ベクターに組み込みプラスミド DNA を作成、HEK293 細胞や CHO-K1 細胞に遺伝子導入を行った。一時発現を確認した上で、恒久発現株の作成を行った。

4. 研究成果

(1) リン酸化シグナルを示す実験データ (図 1) より、CB₁R 作動薬によって、DARPP-32、スレオニン 34 残基のリン酸化が亢進したことが分かった。この反応は、比較的 15 秒から 1 分間の早い処置時間経過で出現する。また、サンプル数が不十分であり、統計学的解析には実験の繰り返し、再現が必要であるため結論を出すには至っていない。引き続き、実験を行い、結論を得たいと考えている。

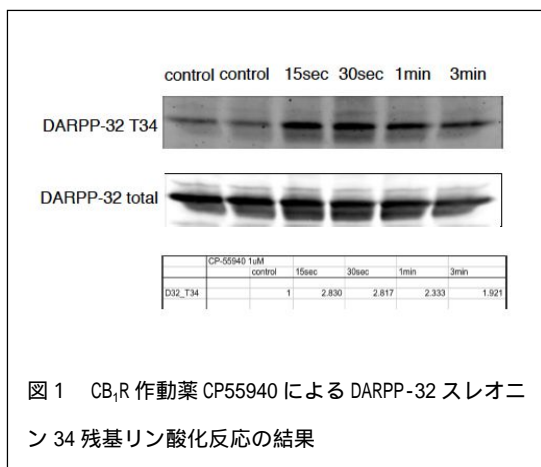


図1 CB₁R 作動薬 CP55940 による DARPP-32 スレオニン 34 残基リン酸化反応の結果

(2)培養細胞に CB₁R を発現させ、CB₁R 作動薬や拮抗薬とうの試薬を用いて、細胞内カルシウム動態や、マップキナーゼリン酸化解析を行う予定であるが、その準備として、CB₁R の遺伝子クローニング、発現ベクターへのクローン組み込み、HEK293 細胞、CHO-K1 細胞へ発現ベクターを一時的遺伝子導入、蛋白発現の確認を行った。蛋白の発現が確認され(図2)、安定発現株の作成まで行った。しかし、細胞内カルシウム動態の解析等には至らず、今後も実験を続けていく計画である。

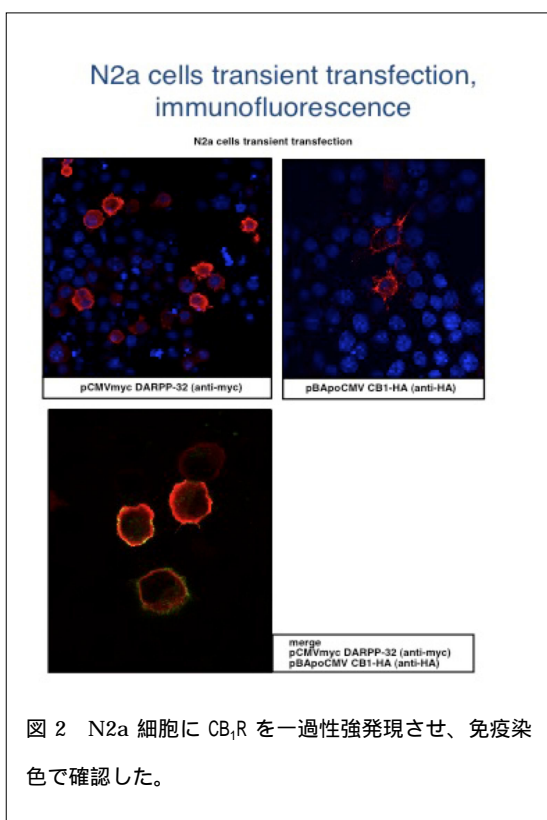


図2 N2a 細胞に CB₁R を一過性強発現させ、免疫染色で確認した。

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 1 件)

Uematsu K, Heiman M, Zelenina M, Padovan J, Chait BT, Aperia A, Nishi A, Greengard P. Protein Kinase A directly phosphorylates metabotropic glutamate receptor 5 to modulate its function. *Journal of Neurochemistry*. 査読有り
2015.Mar;132(6):677-86.
Doi:10.1111/jnc.13038

[学会発表] (計 1 件)

上松謙, 森田喜一郎, 内村直尚, 西昭徳
フィンゴリモドはスフィンゴシン-1-リン酸受容体を介して線条体中型有棘神経細胞のプロテインキナーゼ A / DARPP-32 シグナル伝達を制御する
日本神経科学会 2014.9.11 - 14
(神奈川県横浜市西区みなとみらい 1-1-1、パシフィコ横浜)

[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 :
出願年月日 :

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上松 謙 (Uematsu Ken)

久留米大学・高次脳疾患研究所・助教

研究者番号：60441672

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：