

## 厚生科学研究補助金（特別研究事業）

## 総括研究報告書

## 治療抵抗性分裂病の発症機構と新しい治療法開発に関する研究

主任研究者 山形要人

(財) 東京都神経科学総合研究所分子神経生物学研究部門副参事研究員

## 研究要旨

分裂病様の幻覚、妄想症状を引き起こす methamphetamine (MAP)、cocaine などを反復投与すると、これらの薬物に対する反応性が増強し、ヒトでは精神症状、動物では異常行動が出現する。これは、薬物による異常な可塑的变化であり、逆耐性現象と呼ばれ、分裂病の再燃モデルとも考えられている。また、phencyclidine (PCP) が、分裂病の陽性症状だけでなく、陰性症状も引き起こすことから、興奮性アミノ酸受容体と分裂病との関連も提唱されている。そこで、MAP や PCP の投与によって、発現が活性化される遺伝子をスクリーニングし、新しい遺伝子 arc を見出した。Arc は、これらの薬物投与や電撃痙攣刺激によって脳内で誘導され、特に PCP 投与によって、皮質での一過性の増加の後、減少するという特徴的な発現変化を示した。さらに、PCP による陰性症状を抑える clozapine が、arc の一過性誘導も抑制したことから、陰性症状と Arc の発現との関連が示唆された。次に、Arc 蛋白質の機能解析のために、Arc 結合蛋白質をスクリーニングし、新しい SH3 蛋白質 SH3P13s を見出した。そして、この SH3P13s が、SH3P13 の splice variant であり、その結合蛋白質が、endocytosis に関わる dynamin 分子であること、さらに、dynamin の GTPase が、SH3P13s によって活性化されるだけでなく、Arc を加えることによって、より活性化され、endocytosis が促進されることを明らかにした。以上の結果から、MAP や PCP によって誘導された Arc 蛋白質が、SH3P13s を介して endocytosis を活性化し、受容体の sequestration を促進すると考えられる。そして、受容体が膜から消失することによって、脱感作が生じ、陰性症状が出現するという、分裂病発症の新しい機構が考えられた。

## A. 研究目的

分裂病様の幻覚、妄想症状を引き起こす methamphetamine (MAP)、cocaine など を反復投与すると、これらの薬物に対する反応性が増強し、ヒトでは精神症状、動物では異常行動が出現する。これは薬物による異常な可塑的变化であり、感受性亢進あるいは逆耐性現象と呼ばれ、分裂病の再燃モデルと考えられている。また、phencyclidine (PCP) が、分裂病の陽性症状だけでなく、陰性症状も引き起こすことから、興奮性アミノ酸受容体と分裂病との関連も提唱されている。そして、これらの薬物の作用は、不可逆的であることから、遺伝子発現を活性化し、合成された蛋白質が神経系の機能や構造を変化させると考えられる。このように、脳の病態形成に遺伝子発現が関与している例として、他に難治性てんかんが知られている。この病態メカニズムも、痙攣発作を繰り返すことによって、正常ではほとんど発現していない遺伝子産物が誘導され、海馬の神経幹細胞の増殖・分化を引き起こし、最終的には顆粒細胞間に recurrent pathway を形成するためと考えられている。

私は、電撃痙攣刺激によって誘導される遺伝子群を海馬から単離し、解析することによって、病的遺伝子産物による病態難治化のメカニズムを研究してきた。そして、同様の遺伝子発現プログラムが、MAP や

PCP によっても活性化され、薬物依存や精神病様症状が生じていると考え、電撃痙攣刺激によって発現調節される遺伝子が、麻薬や覚醒剤、抗精神病薬投与によって脳内で誘導されるかどうかを解析した。

## B. 研究方法

ラットを電撃痙攣刺激 (MECS、Maximal Electro-Convulsive Shock) し、4 時間後の海馬から cDNA ライブラリーを複製後、subtraction - differential hybridization を用いて、神経活動によって脳内で誘導される遺伝子群を単離した。クローニングした遺伝子断片をプローブにして、MAP や PCP によっても発現変化する遺伝子を Northern ブロット、in situ hybridization で選び出した。クローン #1 が、薬物によって最もよく発現制御されていたので、このクローンの全長 cDNA をライブラリーから単離し、データベースをサーチした。また、GST との融合蛋白質を大腸菌から精製し、ポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて、Western ブロティング、免疫組織化学を行った。また、このクローン #1 (arc と命名) の機能を調べるため、酵母の two-hybrid system を用いて、Arc と結合する蛋白質の cDNA をスクリーニングした。arc cDNA を PC97 vector の GAL4 DNA-binding domain の下流につなぎ、酵母 (PCY2) に導入し

た。Leu(-) プレートで生育した酵母を、PC86 の GAL4 transactivation domain の下流につないだライブラリーで形質転換した。そして、Leu (-) Trp (-) プレートで生育した酵母を X-gal で発色させることによって、Arc 結合蛋白質 (SH3P13s) を同定した。陽性酵母からプラスミドを抽出し、大腸菌に導入後、プラスミドを回収した。単離された cDNA をシーケンスし、データベースを検索した。また、得られた cDNA 断片を用いて、ライブラリーを再度スクリーニングし、SH3P13s と結合する蛋白質の cDNA (dynamamin、synapsin など) も単離した。Dynamamin の精製、GTPase 活性の測定は、Gout らの方法に従った。

### C. 研究結果

電撃痙攣刺激によって脳内で誘導される遺伝子群を subtraction - differential hybridization を用いて単離した。そして、この遺伝子群の中で、電撃痙攣刺激だけでなく、MAP や PCP の投与によっても誘導される遺伝子をスクリーニングし、arc 遺伝子を見出した。arc mRNA は、電撃痙攣刺激や長期増強 (LTP) に伴って海馬歯状回顆粒細胞で誘導され、テトロドトキシンの眼球内注入によって、対側の一次視覚野で発現量が減少した。すなわち、arc mRNA の発現量は、海馬や大脳皮質の NMDA 受容体によって調節されていると考

えられた。さらに、arc mRNA は、脳の発達期において、シナプス形成とともに発現量が増加した。arc 遺伝子発現の特徴としては、mRNA が樹状突起にソーティングされることであり、電気ショック後の海馬歯状回分子層で特に顕著であった。この現象は、MAP2 や CaMKII の mRNA でも見られるが、他の最初期遺伝子の発現パターンとは明らかに異なっている。この現象の生理的意義としては、Arc 蛋白質が神経活動によって速やかに突起内で合成され、シナプス後ニューロンの細胞内可塑的变化を引き起こすことが考えられる。

arc mRNA は、MAP (4 mg/kg) 投与によって、線条体・大脳皮質 (全層) を中心に誘導され、その誘導は、D1 受容体の選択的阻害剤 SCH23390 の前投与によって抑制された。すなわち、MAP による arc 遺伝子発現は、D1 受容体を介して活性化されると考えられた。さらに、arc mRNA は、PCP の投与によって、特徴的な発現変化を示した。PCP (10 mg/kg, ip) を投与すると、一過性 (約 2 時間をピーク) に、大脳皮質の II-III 層および VI 層、前障で arc mRNA が誘導された。しかし、その後、arc の発現量は減少し、PCP 投与後、4-8 時間ではほとんど認められなくなり、24-48 時間後には、再び、投与前のレベルに戻った。また、抗精神病薬の haloperidol (1 mg/kg)、risperidone (5 mg/kg)、

nemonapride (5 mg/kg) を投与すると、線条体、側座核を中心に arc mRNA の発現誘導が認められ、D2 受容体の遮断によっても arc 遺伝子発現が活性化されることが明らかになった。しかし、別の抗精神病薬の clozapine (5 mg/kg) は、arc の発現を皮質および線条体の両部位で減少させた。そこで、これらの抗精神病薬を前投与して、PCP による異常行動および arc 遺伝子発現活性化に及ぼす影響を調べた。

● Risperidone、nemonapride は、PCP による異常行動を抑えず、また、皮質での arc の一過性誘導にも影響を与えなかった。しかし、clozapine の前投与は、PCP による異常行動を抑えるとともに、皮質での arc の一過性誘導も抑制した。この結果から PCP による異常行動と皮質での arc 発現との関連が考えられた。

● Arc に対する抗体を精製し、ウエスタンブロットを行ったところ、Arc 蛋白質が約 55 kDa のバンドとして認められた。さらに、電気ショックや MAP の急性投与によって、Arc が海馬、線条体分画でそれぞれ誘導された。また、同じ抗体を用いた免疫組織化学では、Arc 蛋白質が、樹状突起だけでなく、核内や核周囲細胞質にも誘導されることが明らかになった。

塩基配列の解析から、Arc 蛋白質は、396 個のアミノ酸からなる分子量 45,365 kDa、等電点 4.5 の可溶性蛋白質と予想さ

れた。ホモロジーサーチを行ったところ、膜の裏打ち蛋白質である  $\alpha$ -Spectrin との低い相同性 (19.2%) が認められたが、他の蛋白質との相同性は認められず、機能を推定することが出来なかった。そこで、two-hybrid system を用いて、Arc と相互作用する蛋白質の同定を試みた。約 20 万個の海馬ライブラリーをスクリーニングし、15 個の陽性クローンを得た。これらのシーケンスを行ったところ、長さの異なる二個のクローン (abp12 および abp15) が、同一の遺伝子に由来する cDNA であることがわかった。そこで、この遺伝子断片をプローブにして、海馬のライブラリーをスクリーニングし、完全長の cDNA を単離した。塩基配列の解析から、この cDNA は、278 個のアミノ酸からなる、分子量 31.6 kDa、等電点 4.7 の可溶性蛋白質をコードすることが予想された。データベースを検索したところ、この蛋白質は、C 末端側に一個の SH3 ドメインを持つ、SH3P13 蛋白質と最も相同性が高かった。さらに、この遺伝子は、すでに報告されている SH3P13 遺伝子から、alternate splicing によってできる、splice variant であると予想されたので、この遺伝子産物を SH3P13s と名付けた。SH3P13s 蛋白質は、SH3P13 の N-末端側 69 個のアミノ酸を欠くが、他のアミノ酸配列は SH3P13 と完全に一致していた。SH3P13 蛋白質

は、N 末側の coiled-coil ドメイン、C 末側の SH3 ドメイン、そして、それらに挟まれる variable region から成るので、SH3P13s は、短い coiled-coil ドメインを持つことになる。

SH3P13s 蛋白質と Arc との結合を確認するため、in vitro で転写・翻訳した Arc を GST-SH3P13s 融合蛋白質と反応させた。その後、グルタチオンビーズを加えることによって、GST 融合蛋白質を沈降させ、結合蛋白質を電気泳動した。Arc は、GST 単独では、ビーズにほとんど結合しなかったが、GST-SH3P13s と反応させると、ビーズとともに沈降した。これは、Arc が、SH3P13s 蛋白質部分に結合することによって、ビーズと一緒に沈降したためと考えられる。

また、SH3P13s mRNA の組織分布を調べるために、各組織の RNA を用いて Northern 解析を行った。SH3P13s mRNA は、精巣に最も多く発現しており、続いて脳、そして肝臓にもわずかの発現が認められた。脳内では、嗅球、大脳皮質、海馬、線条体、視床、小脳、脳幹に発現しており、各部位の量的な差は、認められなかった。また、細胞内局在を調べるために、EGFP と arc を融合させ、ニューロblastoma とグリオーマの雑種細胞 NG108-15 に遺伝子導入した。細胞質全体に EGFP の蛍光が見られ、細胞体、突起でも融合蛋白質

の発現が認められた。

多くの SH3 蛋白質は、SH3 ドメインを介して、他の機能蛋白質に結合し、その活性を制御すると考えられている。そこで、SH3 ドメインを介して結合する蛋白質を解析するため、SH3P13s の SH3 ドメインを bait にして、もう一度、海馬のライブラリーをスクリーニングした。約 30 万個をスクリーニングし、21 個の陽性クローンを単離した。この中で、シナプ스에局在する蛋白質として、dynamin I と III、synapsin を見出した。Dynamin は GTP 結合蛋白質の一種で、エンドサイトーシスの小胞生成時に、小胞基で四量体を形成する。そして、GTP を加水分解することによって、小胞を形質膜から切断するが、Grb2 という SH3 蛋白質は、dynamin に結合し、その GTPase を活性化することが知られている。そこで、まず、SH3P13s 蛋白質の dynamin GTPase 活性に及ぼす影響を解析した。脳から精製した dynamin に、大腸菌で発現させた GST-SH3P13s 蛋白質を加え、GTP 水解活性を調べたところ、SH3 蛋白質を加えることによって、dynamin の GTPase が活性化された。また、SH3P13s の SH3 ドメインのみを加えても、GTPase 活性が亢進した。さらに、同じ反応系に、大腸菌で発現させた GST-Arc 蛋白質を加えたところ、添加した Arc の量に応じて、dynamin の GTPase 活性

が亢進した。この結果から、薬物によって誘導された Arc 蛋白質が、SH3 蛋白質に結合することによって、dynamine の GTPase 活性を上昇させたと考えられる。

#### D. 考察

Immediate early genes (=IEGs) が、脳内でも神経活動によって発現調節されることが報告されて十年になる。これらの遺伝子産物は、神経活動によって誘導され、最終的にはシナプス、すなわち神経回路網を再構築することで、学習・記憶などの高次機能が成立すると考えられる。そして、薬物依存や逆耐性、覚せい剤精神病なども、この脳の可塑的性質が、薬物によって病的に歪められた結果、生じてくると考えられる。そこで、依存性薬物による脳内遺伝子発現調節機構を解析し、新しい治療法の分子的基盤を確立するために、麻薬や覚せい剤、抗精神病薬によって発現調節される遺伝子をスクリーニングした。これらの薬物によって発現調節されることが知られている遺伝子産物は、今まで Fos、Zif268 などの転写因子だけであったが、今回のスクリーニングによって、転写因子以外の IEG 産物として初めて、Arc が見つかった。

Arc mRNA は、MAP 投与によって線条体・大脳皮質の神経細胞で誘導され、その誘導は SCH23390 によって消失したことから、arc 遺伝子発現は D1 受容体を介し

て活性化されたと考えられる。また、PCP 投与によって、Arc mRNA および蛋白質が、大脳皮質の II-III 層・VI 層、前障で 2 時間後をピークに誘導された。この一過性の arc の誘導は、PCP の即効性に対応しているとも考えられる。電撃痙攣刺激でも、arc の発現のピークは約 2 時間であることから、PCP の投与によって、ある特定のニューロンが興奮し、異常行動を引き起こすとともに、arc の遺伝子発現も活性化された可能性がある。この仮説の根拠として、PCP の異常行動を抑える clozapine が、皮質での arc の一過性誘導も抑えることがあげられる。逆に、異常行動を抑えない risperidone や nemonapride は、皮質での arc 発現に影響しない。すなわち、PCP による皮質での arc の発現を抑えることによって、分裂病の陰性症状が抑制されるとも考えられる。この仮説を検証するためには、ノックアウトマウスや in vivo 遺伝子導入系を用いて、arc の発現を抑えたときに、PCP による異常行動が出現するかどうかを確かめる必要がある。

また、誘導された arc mRNA は、樹状突起にもソーティングされることから、Arc 蛋白質が突起内で合成され、シナプス後ニューロンの細胞内可塑的变化を引き起こすと考えられる。実際、PSD (post-synaptic density) 分画を用いた Western 解析からも、Arc がシナプス後ニューロン

に多量に存在することを確認している。

その Arc 蛋白質の機能であるが、アミノ酸配列からは、 $\alpha$ -Spectrin との低い相同性が認められるだけで、特別なドメインは認められなかった。そこで、Arc の結合蛋白質を探すことによって、Arc の機能を明らかにするため、two-hybrid system を用いて、Arc 結合蛋白質をスクリーニングし、SH3P13s を見出した。そして、SH3P13s が、SH3P13 の splice variant であること、精巣や脳に多く発現していること、突起を含む細胞質に局在していることを示した。また、SH3P13s のシナプスにおける機能的役割を明らかにするため、SH3 ドメインを bait にして、その結合蛋白質をスクリーニングし、dynamamin を同定した。そして、dynamamin の GTPase 活性が、SH3P13s によって活性化されること、さらに、Arc がその活性化を亢進させることなどを明らかにした。

今回のスクリーニングで、唯一複数のクローンが得られたことから、シナプス後ニューロンにおける Arc 結合蛋白質として、SH3P13s が、まず第一に考えられる。SH3 蛋白質には、数多くの種類が知られているが、SH3P13 蛋白質と同じファミリーに属する蛋白質としては、SH3P4、SH3P8 が報告されている。これらは、すべて C-末端に一個の SH3 ドメインを持ち、N-末端側は coiled-coil ドメインで構成

されている。Yale 大学の De Camilli のグループは、これらの SH3 蛋白質が、synaptojanin に結合することを報告している。彼らは、シナプトゾームを用いた免疫電顕によって、dynamamin がシナプス前終末にあることを証明した。しかしながら、私の PSD (post-synaptic density) 分画を用いた Western 解析では、dynamamin、SH3P13s、Arc のすべてが、PSD 分画に存在することが確認されている。さらに、SH3P13s 抗体を用いた免疫電顕でも、SH3P13s がシナプス後ニューロンに存在することを確認している。

De Camilli らは、シナプス前終末の小胞のリサイクリングを研究しており、このエンドサイトーシスの過程に SH3 蛋白質、dynamamin、synaptojanin などが重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。しかし、前述したように、このエンドサイトーシスは、シナプス前終末に特異的な機構ではなく、後ニューロンでも同様の現象が観察されている。すなわち、受容体を介したエンドサイトーシスの過程にも、dynamamin やある種の SH3 蛋白質が関与していることが、最近、明らかになってきた。特に、三量体 G 蛋白質に couple した受容体の internalization が、dynamamin 依存的事であることが報告されており、MAP や PCP 投与後の受容体の sequestration に、dynamamin が関与している可能性がある。実

際、ドーパミン受容体が、リガンド刺激によって、dynamine-dependent に sequestration されることが明らかになっている。これらの報告や今回の結果をもとにして、分裂病の陰性症状の発症機構について、次のような仮説を考えている。すなわち、「MAP や PCP によって誘導された Arc 蛋白質が、SH3 蛋白質を介して dynamine GTPase を活性化し、受容体の sequestration (endocytosis) を促進する。その結果、脳内の受容体の脱感作が生じ、分裂病の陰性症状として発現する」。今後は、arc 遺伝子のノックアウトマウスを用いて、この仮説を検証していく予定である。

#### E. 結論

MAP や PCP、抗精神病薬の投与によって、脳内で誘導される遺伝子をスクリーニングし、新しい遺伝子 arc を見出した。Arc は、これらの薬物投与や電撃痙攣刺激によって脳内で誘導され、特に PCP 投与によって、皮質での一過性の増加の後、減少するという特徴的な発現変化を示した。さらに、PCP による陰性症状を抑える clozapine が、arc の一過性誘導も抑制したことから、陰性症状と Arc の発現との関連が考えられた。次に、Arc 蛋白質の機能解析のために、Arc 結合蛋白質をスクリーニングし、新しい SH3 蛋白質 SH3P13s

を見出した。そして、この SH3P13s が、SH3P13 の splice variant であり、その結合蛋白質が、endocytosis に関わる dynamine 分子であること、さらに、dynamine の GTPase が、SH3P13s によって活性化されるだけでなく、Arc によって、より活性化され、endocytosis が促進されることを明らかにした。以上の結果から、MAP や PCP によって誘導された Arc 蛋白質が、SH3P13s を介して、受容体の sequestration を促進し、陰性症状が出現するという、分裂病発症に関する新しい仮説が考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) C. Cao, K. Matsumura, K. Yamagata, Y. Watanabe.

Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. *Mol. Brain Res.*, 56 ( 1998 ) 45-56

2) 山形要人 杉浦弘子 鈴木香子  
可塑性遺伝子産物の構造と機能、日本神経精神薬理学雑誌 (*Jpn J Psychopharmacol*) 18 ( 1998 ) 133-136

3) K. Yamagata, H. Sugiura, Y. Irie, E.



Maru, H. Kato, K. Matsumura and P.F. Worley. Activity-regulated gene expression in the brain. "Slow synaptic responses and modulation", H. Higashida, K. Kuba, D.A. Brown and T. Yoshioka, ed. (Springer-Verlag), in press.

4) O. Saitoh, Y. Kubo, M. Odagiri, M. Ichikawa, K. Yamagata, and T. Sekine. RGS7 and RGS8 differentially accelerate G-protein-mediated modulation of K<sup>+</sup>-currents. J. Biol. Chem., in press.

5) K. Yamagata, H. Sugiura and K. Suzuki. Activation of arc by methamphetamine in the rat brain. Ann. N. Y. Acad. Sci., in press.

6) K. Yamagata, K. I. Andreasson, H. Sugiura, E. Maru, D. Muller, Y. Hayashi, M. Yoshioka, H. Kato and P.F. Worley. Arcadlin; an activity-regulated cadherin involved in long-term potentiation. J. Biol. Chem., in press.

7) 山形要人 鈴木香子 杉浦弘子  
COX-2 と中枢神経系  
「COX-2 の理論と実証—基礎と臨床」  
(森田育男編、メディカルレビュー社)、  
印刷中。

## 2. 学会発表

1) 山形要人, 可塑性遺伝子産物の構造と機能, 第25回脳の医学・生物学研究会, 名古屋

2) 山形要人 杉浦弘子 鈴木香子, シナプス活動による神経回路再編成の分子機構, 基礎生物学研究所ワークショップ「神経系の構築と記憶」, 岡崎 (1998, 10.6)

3) 入江康至 山形要人 都銀珠 甘業華、中枢神経特異的最初期遺伝子Arc蛋白質と相互作用する新規蛋白質 Aip-1 (Arc Interacting Protein 1) の単離と機能解析、第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 東京 (1998, 9.22)

4) 山形要人 杉浦弘子 丸栄一 吉岡成知 林要喜知 加藤宏司、LTP形成に関わる新しい神経接着分子Arcadlin., 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 東京 (1998, 9.22)

5) 須藤孝子 川上順子 山形要人 丸栄一、脳内プロスタグランジンのてんかん発作促進作用、第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会、東京 (1998, 9.22)

6) 杉浦弘子 鈴木香子 山形要人, 可塑性遺伝子産物 Arc に結合する新しい SH3 蛋白質、第71回日本生化学会大会, 名古屋 (1998, 10.16)

7) Sudo, T., Kawakami, Y., Maru, E. and Yamagata, K., Duration of after discharge induced by perforant path tetanic stimulation is moderately suppressed in COX-2 knockout mouse. 28th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Los Angeles (1998, 11.9)

8) 山形要人、杉浦弘子、鈴木香子, コカイン、アンフェタミンによって誘導される最初期遺伝子産物 Arc とその結合蛋白質, 第31回精神神経系薬物治療研究報告会, 大阪 (1998, 12.7)

G. 知的所有権の取得状況

なし