

199900389A

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）

---

抗精神病薬に抵抗性の  
分裂病症状の成因解明と治療法開発に関する研究

---

**総合研究報告書**  
**（平成9～11年度）**

主任研究者 西川 徹

平成11年3月

総合研究報告書（平成9～11年度）

目 次

I. 総合研究報告	西川 徹	1
II. 総括研究報告	西川 徹	14
III. 分担研究報告		
分裂病様症状発現薬に応答する遺伝子の探索と 内在性D-セリンの代謝および機能の分子機構解明	西川 徹	22
AMPA型グルタミン酸受容体活性増強物質の開発・分子作用機序・動物作用 ～新しい精神・神経疾患治療薬の開発を目指して～	関口正幸	28
IV. 平成9～11年度業績集		

## II. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
総括研究報告書

抗精神病薬に抵抗性の分裂病症状の成因解明と治療法開発に関する研究

主任研究者 西川 徹 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部 部長

研究要旨：RAP-PCR（RNA arbitrarily primed PCR）法および定量的RT-PCR法を用い、ラット大脳新皮質から、抗精神病薬抵抗性・反応性双方の分裂病様症状を引き起こすphencyclidine（PCP）急性投与後において生後8日には生理的食塩水を投与した対照群と差がないが生後50日には有意な発現誘導が見られる遺伝子を検索した。これまでに検出された転写産物のうちprt-1（PCP responsive transcript-1）はsynapse-associated protein 97（SAP97）遺伝子であり、生後50日齢ラットの大脳新皮質においては、1)2種類のsplicing variantsはともにPCPに対して増加反応を示すこと、2)PCPと同様にNMDA型グルタミン酸受容体遮断作用と抗精神病薬抵抗性の分裂病様症状惹起作用をもつdizocilpineにより発現が増加すること、3)ドーパミン作動薬で抗精神病薬反応性の分裂病様症状を引き起こすmethamphetamine（MAP）やコカイン、ドーパミンD1受容体遮断薬SCH-23390、GABA-A受容体アロステリック作動薬のpentobarbital等の投与後には有意な変化が見られないこと、4)PCPによる発現誘導は代表的抗精神病薬のhaloperidolの前処置を行っても抑制されないこと等が明らかとなった。これらの結果は、SAP97遺伝子の発現が分裂病患者に見られる抗精神病薬抵抗性症状に関与することを示唆している。このほかに、PCPに対して発達にしたがって応答が変化する遺伝子群としてprt-2～prt-4が見いだされ、現在解析を進めている。

一方、難治性の分裂病症状にグルタミン酸伝達異常が関与すると考えられることから、NMDA型グルタミン酸受容体のアロステリックアゴニストで、抗PCP作用を示す内在性物質であるD-セリンの脳内代謝と機能を解析するとともに、AMPA型グルタミン酸受容体のアロステリック修飾物質PEPAの臨床応用について検討した。神経細胞体を選択的に破壊するキノリン酸を注入した前頭葉皮質では、D-セリンの組織含量が著明に減少し、内在性D-セリンはこれまで報告されているグリア細胞だけでなく神経細胞体内にも蓄積されていることが示唆された。また、PEPAはラットに実験的に引き起こした記憶・学習障害に対して著しい改善作用を示し、AMPA受容体活性（特に動力学的性質）の操作が精神・神経疾患の認知機能障害の治療に有用である可能性が示唆された。

分担研究者 関口正幸  
国立精神・神経センター神経研究所  
疾病研究第四部 室長

#### A. 研究目的

抗精神病薬は、分裂病症状のうち幻覚・妄想を中心とする陽性を改善するが、感情鈍麻、意欲減退、引きこもりなどの陰性症状にはほとんど効果がなく、このことが多くの分裂病患者の十分な社会復帰を拒み続けている。また、分裂病においては原因はかりでなく、発症や症状再燃の機序も不明である。本研究では、これら未解決の問題を解明し、生物学的診断マーカーおよび新しい治療法を見出すことを目的

としている。

このため、1)分裂病は思春期以降に発症し分裂病様症状発現薬も小児期には精神障害を惹起しにくいことや、2)分裂病の再燃モデルといわれる行動感作（分裂病様症状発現薬を経験した動物やヒトのこれらの薬物に対する感受性が長期にわたって亢進し、精神病状態や異常行動が生じやすくなる現象：逆耐性現象）がラットでは生後3週以降に形成され始めるように、分裂病様症状発現薬を投与した実験動物に見られる異常も一定の発達段階から成熟期のパターンに移行すること、等に着目し、分裂病の発症、再燃、抗精神病薬抵抗性症状などに関連した分子を検索中である。本年度は、主に、分裂病様の陽性・陰性双方の症状を発現させるphencyclidine（PCP）

に対し、発達依存的に応答が変化する遺伝子をラット脳から単離・同定し、その薬理学的特徴およびヒト相同遺伝子について検討した。

一方、PCPはじめ強力なNMDA型グルタミン酸受容体遮断薬が共通して抗精神病薬抵抗性の分裂病様状態を発現させ、分裂病患者の死後脳で種々のグルタミン酸伝達系の変化が報告されていることから、少なくともNMDA受容体を介するグルタミン酸伝達異常が分裂病の病態に関係すると推測されるようになった。D-セリンは、NMDA受容体機能を促進することが知られていたが、私たちはPCPが引き起こす異常行動を抑制することや、定説に反して脳の内在性物質であることを見出した。したがって、内在性D-セリンの代謝系、グルタミン酸伝達系などは、分裂病の病態と関連するだけでなく、陰性症状にも効果を示す新しい治療薬の標的になる可能性がある。そこで、内在性D-セリンの脳における代謝および機能に関する基礎的な研究を継続した。

さらに最近、AMPA型グルタミン酸受容体と難治性分裂病症状との関係が指摘されているため、AMPA受容体の調節機構の解析を行った。AMPA受容体にはグルタミン酸が結合する部位以外に、グルタミン酸以外の化合物が結合し、受容体活性を修飾するアロステリック修飾部位が存在する。我々はこのアロステリック修飾部位に作用し、受容体活性を飛躍的に増大させる化合物PEPAを見だし、その分子薬理的解析と実験動物における精神疾患モデルに対する作用を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 動物実験

実験には、生後8~50日齢のWistar系雄性ラットを用いた。動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所の動物倫理委員会の承認を得たうえ、研究倫理規定を遵守して行われた。

### (2) PCPに应答する遺伝子の解析

#### (a) RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) による RNA fingerprinting

生後8日齢および50日齢の動物にPCPまたは生理食塩水を投与後1時間で断頭し、大脳新皮質より total RNAを抽出した。random hexamer によって合

成したcDNAをテンプレートとし、12merからなるプライマーを用いてarbitrarily primed PCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、Syber Green Iで染色後、蛍光イメージアナライザー (FluorImager SI, Molecular DynamicsまたはFMBIO II, TAKARA) で解析してfingerprintを得た。Fingerprint上で50日齢特異的に発現誘導が変化するcDNAバンドをクローニングし塩基配列を決定した。さらに、RAP-PCRクローンに基づいてoligo dT-primed cDNAをクローニングし、対応する遺伝子の構造を解析した。

#### (b) 定量的RT-PCR

Fingerprintによる結果を確認するため、5~7個体のRNAサンプルのプールからrandom hexamerを用いて合成したcDNAの希釈系列を用いてRT-PCRを行い、exponentialな増幅条件下で相対的に発現量を比較した。また、各個体のサンプルにおける絶対的な発現量を検討する実験では、各個体の一定量のRNAからcDNAを合成し、既知濃度のポイントミューテーションを導入したcDNA断片をcompetitorとしてcompetitive RT-PCRを行った。増幅産物を制限酵素処理した後にアガロースゲル電気泳動し、Syber Green Iまたはethidium bromideで染色した。DNAの定量解析は染色したゲルをCCDカメラで撮影した後、densitographにて行った。

#### (c) ノーザンプロット分析

薬物あるいは生理食塩水投与1時間後のラットの大脳新皮質、あるいは無処置ラットの脳各部位と各末梢臓器からtotal RNAを調整し、oligo dT-cellulose カラムを用いた精製によりpoly(A)-positive fractionとしてノーザンプロット分析を行った。

#### (3) 内在性D-セリンの代謝および機能の解析

ラット脳内細胞外液中のD-セリン濃度は、脳内微小透析法を用いて調べた。また、興奮毒キノリン酸によって神経細胞体を選択的に破壊した脳部位におけるD-セリン量を測定した。D-セリンおよび他のアミノ酸は、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーを使った一斉分析法により定量した。さらに、[3H]D-セリンの脳分画における取り込みと放出を検討した。存在が予想されるD-セリントランスポーターの遺伝子クローニングは、アフリカツメガエル卵

母細胞の遺伝子発現系を用いて試みた。D-セリンの代謝や機能に関連する未知分子を検索する方法のひとつとして、RAP-PCRを用い、D-またはL-セリンのを全身的に投与した生後8日令のラットの脳内で発現が変化する遺伝子転写産物を解析した。

#### (4)AMPA受容体機能の解析

##### (a)分子薬理学

PEPAのAMPA受容体活性増強作用を分子レベルで解析するために、AMPA受容体遺伝子を*Xenopus laevis*卵母細胞に移入し、受容体蛋白質を発現させた。この発現細胞からOutside-outのコンフィグレーションで膜パッチを作成し、これにグルタミン酸を投与、電気生理学的に受容体電流を測定した。

AMPA受容体は非常に早いチャネル開口・閉口のダイナミクスを持つため、通常用いられている秒単位での遅いリガンド投与では、受容体動態を正確に把握できない。そこで、ピエゾエレクトロニック素子とこれに連結したシーターピペットを用いる超高速リガンド投与法を確立した。この方法では、数百msecレベルでのリガンド投与が可能であり、AMPA受容体の開口・閉口ダイナミクスを正確に評価できる<sup>2)</sup>。実際の実験では膜パッチにグルタミン酸10 mMを投与した際の20~80%立ち上がり速度が500msec以下の場合のみデータとして採用した。PEPAは100  $\mu$ Mの濃度でグルタミン酸投与前から連続的に膜パッチに投与した。AMPA受容体の閉口ダイナミクスのうちDesensitization (グルタミン酸存在下で受容体分子にグルタミン酸が結合したままチャネルが閉じる過程)については、グルタミン酸パルス50 ~ 100 msecのdurationで与えることにより、deactivation (受容体分子からグルタミン酸が離れるときにチャネルが閉じる過程)は1 msecのdurationで与えることにより測定した。

##### (b)動物モデル-1

マウスに覚醒剤であるMetamphetamine (MAP)を投与すると自発運動量の著増が引き起こされる。この異常行動はヒトにおける覚醒剤精神症状の動物モデルと考えられている。PEPAの覚醒剤精神症状に対する作用を検討するため、ICRマウスを以下の5群に分け、測定ケージへの15分間の馴化の後、薬液を投与(全て腹腔内投与、0.3ml/1匹)した。投与後90分

間の自発運動量を、赤外線装置を用いて記録した。

1. Control群(薬液投与せず)、2. Vehicle投与群、3. MAP投与群、4. PEPA投与群、5. MAP+PEPA投与群。MAPは2 mg/kg、PEPAは16 mg/kg用いた。

##### (c)動物モデル-2

ラット中大脳動脈に閉塞手術を施すと、脳梗塞により記憶学習能の低下が起こる。本モデル系を用いてPEPAが脳の障害により引き起こされた記憶学習障害という高次脳機能障害に有効であるかどうか調べた。

SHR/NCrj系雄性ラットの中大脳動脈を熱焼灼法にて閉塞した。閉塞直後から10日間、1日1回PEPA 10 mg/kgを投与した(尾静脈注、PEPA投与群)。同様にコントロール群(閉塞後PEPAの代わりにVehicleのみを投与)、偽手術群(閉塞せずにVehicle投与)を用意した(各群は各々10匹)。

閉塞7日目から10日目まで毎日、ラットの記憶学習能をMorrisの水迷路試験<sup>3)</sup>で検討した。すなわち、水を満たした水槽にプラットフォームを設置、この水槽にラットを入れ、プラットフォームに泳ぎ着くまでの距離と時間を測定した。水槽周囲には動物の視覚の手がかり(カレンダー・パソコン等)を配置した。

## C. 研究結果

### (1)PCPに発達依存的応答を示す遺伝子群の探索

RNA fingerprint上で生後8日齢および50日齢の大脳新皮質における発現パターンをPCP投与群と生理食塩水投与群で比較し、50日齢の動物においてのみPCPによって発現が変化する複数の転写産物をクローニングした。これらの転写産物について、決定した塩基配列からそれぞれの遺伝子特異的プライマーを設計し、一定量のRNAあたりの相対的な発現量を比較した結果、50日齢においてPCP投与によりそれぞれの遺伝子発現の変化が確認された。得られた塩基配列についてDNAデータベース上で検索を行ったところ、このうち一種は97kDa synapse-associated protein (SAP97)であることが明らかとなった。SAP97にはalternative splicingによる2種類のmRNA(long-formおよびshort-form)が存在していることが知られている。そこで、finger printから得られたshort-

formだけでなく、long-formについてもその発現量を定量し、比較検討を行った。昨年度までに、SAP97mRNAは、long-formおよびshort-formともに、8日齢の動物ではPCP投与群および生理食塩水投与群の間で差は見られなかったが、50日齢動物のPCP投与群において発現量が有意に増加していることが示された。そこで、この増加の発現機序と臨床的意義を検討するため、本年度は成熟ラットの脳新皮質において、種々の薬物投与後のSAP97遺伝子の発現変化を検討した。

2種類のsplicing variantsはともに、1)PCPと同様にNMDA型グルタミン酸受容体遮断作用と抗精神病薬抵抗性の分裂病様症状惹起作用をもつdizocilpine (0.5~1.0mg/kg、皮下投与 (s.c.))により発現が増加すること、2)ドーパミン作動薬で抗精神病薬反応性の分裂病様症状を引き起こすmethamphetamine (MAP: 4.8mg/kg、s.c.)やコカイン (30mg/kg、腹腔内投与 (i.p.))、ドーパミンD1受容体遮断薬SCH-23390 (0.5mg/kg、i.p.)、GABA-A受容体アロステリック作動薬のpentobarbital (50mg/kg、i.p.)等の投与後には有意な変化が見られないこと、4)PCPによる発現誘導は代表的抗精神病薬のhaloperidol (1mg/kg、i.p.)の前処置を行っても抑制されないこと等が明らかとなった。

ヒトゲノムのSAP97遺伝子コーディングフレームに対応する領域の配列解析を行い、精神神経疾患患者のサンプルにおける分子遺伝学的解析の準備を進めた。

## (2) 内在性D-セリンに関する研究

### (a) 前頭葉皮質におけるキノリン酸局所注入後のD-セリン濃度の変化

神経細胞体を選択的に破壊するキノリン酸 (240nmol/side) を、pentobarbital麻酔下でステレオタキシーを用いて、両側の前頭葉皮質の内側部に局所注入し、1週間後に種々のアミノ酸を測定した。対照群には、溶媒であるリン酸緩衝生理食塩水を注入した。キノリン酸注入部位では、D-、L-セリン、GABA、およびグルタミン酸の組織含量が著明に減少した。また、キノリン酸の前頭葉内注入動物の線条体においては、D-、L-セリンとGABAの組織中濃度には変化がなかったが、グルタミン酸レベルが有

意に減少していた。

### (b) D-セリン代謝系に関する未知分子の探索

未知のD-セリン代謝系に関する分子を探索するため、RAP-PCRを用いて生後8日齢ラットの脳新皮質から、D-セリン投与後に転写産物量が増加する遺伝子のスクリーニングを行い、候補となる複数の種類の転写産物を得たため、構造と機能の解析を続行中である。アフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系で、D-セリンの取り込み活性が認められたため、トランスポーターの発現クローニングを続けた。

### (3) AMPA受容体機能の解析

#### (a) 分子薬理学

Outside-outパッチ法から、PEPAはAMPA受容体のDesensitizationを抑制するが、Deactivationには作用しないことが示された。GluR3-flop/GluR2-flop (1:4の量比で移入) を発現させた*Xenopus oocyte*において、グルタミン酸単独によるAMPA受容体の開口は非常に早い速度で起こり、グルタミン酸が長時間存在しても直ぐに閉じてしまった (Desensitization)。このDesensitization過程は以下の二つのパラメーターによって表すことが出来る。一つは、受容体がDesensitizationしていく速さ、一つは定常状態におけるDesensitizationの程度である。本研究では、電流応答の減衰を一次指数関数で近似することにより前者の速さ ( $\tau_{des}$ と表示) を測定、電流応答の最大振幅とグルタミン酸100 msec (又は50 msec) 投与時点での電流応答の振幅の比を計算することにより後者の程度 ( $I_{ss} / I_{peak}$ と表示) を評価した。PEPAが存在すると、Desensitizationの速さはそれほど変化しなかったが、Desensitizationの程度は、著しく阻害され、グルタミン酸単独では殆ど閉じていた受容体が、ある程度開口状態で存在することが判明した。

一方、グルタミン酸を1 msec投与して直ぐ停止したときチャンネルが閉じるカイネティクスであるDeactivationの速さ (Desensitizationの速さと同様に $\tau_{des}$ で評価) は、PEPAにより殆ど変化しなかった。

#### (b) 動物モデル-I

MAP投与群とMAP + PEPA投与群の自発運動量の経時変化 (5分毎の積算値) を調べた。なお、無投与群、Vehicle投与群、PEPA単独投与群では自発運

動量の増大は全く見られなかった。PEPA共投与群ではMAP単独投与群に比べ自発運動量の増大が少なかった。しかし、PEPA投与により、MAPによる自発運動量著増が完全に抑えられるわけではなかった。

#### (c) 動物モデル-2

ラット中大脳動脈閉塞7日後から10日後にかけて水迷路試験を行った。偽手術群は試験試行回数とともにプラットフォームにたどり着くまでの時間が短くなり、プラットフォーム位置の記憶学習が見られた。しかし、閉塞コントロール群では試行回数とともに時間の短縮はほとんど見られず、記憶学習能の障害が見られた。一方、PEPA投与群では試行回数とともに時間の短縮が見られ、閉塞手術を施したのにも関わらず、偽手術群と同程度のレベルまで記憶学習能が回復していた。

### D. 考察

#### (1) 分裂病様症状発現薬に応答する遺伝子の研究

これまでの私たちの研究から、c-fos遺伝子の発現を指標として、MAP、コカイン、およびPCP投与ラットにおける脳の神経活動の変化を検討したところ、神経活動異常のパターンは、少なくとも大脳新皮質で発達とともに著明に変化し、これらの薬物に対する行動反応が成熟期のパターンに移行する生後3週以降に成熟期に近づくことが明らかになった。このような現象は、分裂病様症状発現薬が作用して機能障害をもたらす情報処理系は、少なくとも大脳新皮質を含んでおり、生後3週以降に成熟することを示唆している。

これは、分裂病が思春期以降に発症し、分裂病様症状発現薬による異常も思春期以前には生じにくいと現象と関係する可能性がある。すなわち、分裂病で異常を来す情報処理系は、思春期頃に成熟して精神機能の制御に必須の機能を発揮するようになると仮定することができる。このような情報処理系では、その発達過程に異常があったとしても精神機能への影響は思春期まで目立たないことになり、分裂病様症状発現薬も標的が未成熟なために、この時期までは成人のような精神症状を生じさせないと考えることができる。したがって、本研究でRAP-PCR法によって検索された、発達に伴って分裂病様症状発現

薬に対する反応を獲得する遺伝子群は、分裂病で障害されている脳内情報処理系に関係する可能性がある。

成熟期の大脳新皮質におけるSAP97遺伝子mRNAの発現誘導は、1)PCPだけでなく、選択的NMDA受容体遮断薬dizocilpine投与後にも認められるが、2)MAPやコカインなどのドーパミン作動薬には有意な変動を示さないこと、3)PCP、dizocilpine、MAP、コカイン等は共通して、大脳新皮質のドーパミン伝達を亢進させること、4)ドーパミンD1受容体遮断薬SCH-23390やGABA-A受容体アロステリック作動薬のpentobarbitalの投与では変化しないことなどから、ドーパミン伝達への依存性は少なく、PCPおよびdizocilpineによって出現するが、MAP、コカインでは生じないといわれる、分裂病様の陰性症状に関与すると推測される。つまり、抗精神病薬抵抗性の分裂病症状の分子病態を明らかにする有用な手がかりとなる可能性がある。この可能性は、実際に、抗精神病薬haloperidolを前処置しても、PCPによるSAP97遺伝子mRNAの増加は抑制されないことから支持される。

#### (2) 内在性D-セリンに関する研究

特異的な抗D-セリン抗体を用いた組織化学的研究により、脳内の内在性D-セリンは主にグリア細胞に存在すると考えられている。しかし、本研究では、選択的に神経細胞体を破壊し、グリア細胞や神経軸索・神経終末を残存させた脳部位（前頭葉皮質）で、D-セリン含量の著明な減少が認められたことから、D-セリンが神経細胞体にも蓄積されていることや、D-セリン濃度が前頭葉内の介在神経によって調節を受けることが示唆される。昨年度までの研究において、前頭葉内の細胞外液中D-セリン濃度がGABA伝達によってtonicに制御されていることが明らかになったが、予備的実験で、キノリン酸注入部位における細胞外液中D-セリン濃度がGABA-A遮断薬投与時と同程度に減少しているデータを得ている。したがって、これらの結果を考え合わせると、GABA性介在神経がD-セリンシグナルを調節している可能性がある。

最近Coyleらのグループによって、抗精神病薬を投与されている精神分裂病患者にD-セリンを併用投



与し、抗精神病薬に反応しない陰性症状や認知障害の改善が得られたという臨床結果が報告された。これは、私たちが動物実験をもとに、D-セリン、D-アラニンのように、NMDA受容体グリシン調節部位を選択的に刺激薬する物質が難治性分裂病の治療に役立つという仮説と矛盾しない。

しかし、D-セリンは血液脳関門透過性が不良であることや、長期投与によって腎毒性を引き起こす危険性が考えられる。さらに、グリシン、milacemide、D-cycloserineなどNMDA受容体のグリシン結合部位に直接作用する物質の、選択性の低さあるいは部分作動薬であることのデメリットを考慮した場合、むしろ脳の内在性D-セリンの代謝に作用して間接的にNMDA受容体機能を促進させる薬物をスクリーニングすることが、分裂病治療薬開発上、より合理的なアプローチであると考えられる。また、D-セリンの代謝機構は分裂病で障害されている可能性がある。そこで、differential cloning法を用いて、D-セリン負荷時に発現が変動する遺伝子を探索することにより、D-セリン代謝に関連する候補遺伝子の同定を試みている。

### (3)AMPA受容体の機能解析

これまでに報告されているAMPA受容体活性増強薬は、受容体のDesensitization、Deactivationの両方を修飾することが知られている。本研究の分子薬理的解析においては、PEPAが既存薬とは異なるメカニズムでAMPA受容体活性を増大することが示された。言い換えれば、PEPAはAMPA受容体の「Pure desensitization blocker」であると言える。AMPA受容体の脱感作は、リン酸化等との関係でその生理学的意義がこれまでも議論されてきた。PEPAのDesensitization選択的作用特性はシナプス伝達や記憶学習におけるAMPA受容体Desensitizationの生物学的意味の検討に有用であり、応用研究が期待される。

PEPAは覚醒剤のマウス移所運動量増加作用を減弱させた結果は、AMPA受容体が覚醒剤で生ずる分裂病様の幻覚・妄想状態精神症状に関係しており、PEPAがこれらの異常を改善する可能性を示唆している。シナプスにおいてAMPA受容体とNMDA受容体はCo-localizationしている可能性が指摘されている。

従って、PEPAによるMAP作用抑制のメカニズムとしては、「PEPAによるAMPA受容体活性の増強→神経細胞脱分極の遷延→NMDA受容体の膜電位依存性マグネシウムブロックの解除の遷延→NMDA受容体活性の増大」というむしろ間接的なメカニズムが有力かもしれない。

中大脳動脈閉塞ラットにおける水迷路学習成績の低下をPEPAが改善した事実は、PEPAが認知機能障害に対してこれを改善する効果があることを示唆している。すなわち、AMPA受容体の活性、特に動力学的特性、の操作は精神・神経症状の緩和に有用である可能性を提起する。

### E. 結論

(1)初年度および第二年度に続き、分裂病関連候補遺伝子としてラット大脳新皮質からPCPに対する応答性が生後発達にともなって変化する遺伝子群を検索し、PCPによって発達依存的に誘導される遺伝子としてSAP97遺伝子が検出された。SAP97遺伝子は、MAPおよびコカインには有意な応答を示さず、PCP投与後に見られる本遺伝子発現の増加は抗精神病薬に非感受性であることがわかった。PCPが陽性・陰性双方の分裂病様症状を引き起こし、MAPやコカインは主に陽性症状を発現させることを考えあわせると、以上の所見は、少なくともSAP97遺伝子が陰性症状と関連する可能性を示唆している。

(2)神経細胞体を選択的に破壊するキノリン酸を注入したラット前頭葉皮質においては、D-セリン含量が低下することから、内在性D-セリンがグリアだけでなく神経細胞体にも存在する可能性や、大脳皮質の介在神経によって内在性D-セリンの濃度が調節されている可能性が示唆された。D-セリン代謝系分子の解明は、分裂病の分子病態の検討や、D-セリンシグナルを調節する難治性分裂病治療薬の開発に寄与すると考えられることから、differential cloning法を用いたD-セリン負荷に応答する遺伝子群の探索や、アフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系におけるD-セリントランスポーター遺伝子のクローニングの試みを続けている。

(3)PEPAは受容体Desensitizationを選択的に抑制することにより受容体活性を増強するという新しいメカ

ニズムを持つAMPA受容体アロステリックモジュレータである。PEPAはマウスにおける覚醒剤精神症状モデルを弱く抑制した。PEPAはラットに実験的に引き起こした記憶・学習障害に対して著しい改善作用を示した。以上の結果はAMPA受容体動力学的特性の操作が精神・神経疾患の治療に有用である可能性を示唆する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takezawa T, Inoue M, Aoki S, Sekiguchi M, Wada K, Anazawa H and Hanai N: Concept for organ engineering: A reconstruction method of rat liver for In vitro culture. *Tissue Engineering*. (in press)
2. Shirayama Y, Mitsushio H, Takahashi K and Nishikawa T: Differential effects of haloperidol on phencyclidine-induced reduction in substance P contents in rat brain regions. *Synapse* 35: 292-299, 2000
3. Sato M, Nakane H, Hayashida M, Koshino Y, Uchimura H, Tsutsumi T, Koyama T, Kusumi I, Akiyama K, Saito H, Saijo T, Ito C, Kubota Y, Nishikawa T, Kurada Y, Hamamura T, Fujiwara Y, Higuchi T, Yamawaki S: Algorithm for the treatment of schizophrenia in Japan. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice* 3: 271-276, 1999
4. Nakagawa T, Iino M, Sekiguchi M, Wada K and Ozawa S: Potentiating effects of 4-[2-(phenylsulfonylamino)ethylthio]-2,6-difluorophenoxyacetamide (PEPA) on excitatory synaptic transmission in dentate granule cells. *Neurosci. Res.* 35: 217-223, 1999

### b. 著書

1. Sekiguchi M, Mayer ML and Wada K: The third line of positive allosteric modulators for AMPA receptors. In *Slow Synaptic Responses and Modulation* (eds. by Kuba K, Higashida H, Brown DA and Yoshioka T) Springer, Berlin, 420-424, 2000.
2. 西川 徹: 精神疾患とグルタミン酸—精神分裂病を中心として—。グルタミン酸 最新的话题 (金澤 一郎編) pp. 3-34, Excerpta Medica, 東京, 1999.
3. 山本直樹, 西川 徹: d フェンサイクリジン 12 他 の薬物依存と脳障害。臨床精神医学講座 第8巻

薬物・アルコール関連障害 pp. 368-377, 中山書店, 東京, 1999.

### c. 総説

1. 西川 徹: 精神疾患の克服。—脳を守る21世紀生命科学の展望—。生体の科学 51: 68-73, 2000
  2. 西川 徹: 不安の薬物治療—不安の神経生物学と新しい抗不安薬—。医学のあゆみ 192: 1133-1137, 2000
  3. 吉川武男, 西川 徹: 躁うつ病 病気の分子生物学。50: 398-400, 1999.
  4. 西川 徹: 脳の内在性D-セリンに関する研究—新たな高次機能調節系と精神疾患の治療法を求めて—。脳の科学 21: 757-763, 1999.
- ### 2. 学会発表
- #### a. 特別講演, シンポジウム
1. 西川 徹, 土田英人, 川口直恵, 海野麻未, 山本直樹: 哺乳類における内在性D-セリンの代謝・機能と病態。第28回 脳の医学・生物学研究会, 名古屋, 1.22, 2000.
  2. 西川 徹: 脳内D-セリンの代謝と機能。「D-アミノ酸研究の最前線」シンポジウム, 平成11年度文部省科学研究 基盤研究A (1) 「哺乳類体内に存在するD型アミノ酸の総合的研究」研究班, 東京, 1.24, 2000
  3. 西川 徹: 薬物精神病の生物学的基礎。第25回日本医学会総会, 東京, 4.4, 1999.
  4. 梶井靖, 平岡秀一, 藤山航, 戸田重誠, 金田小幸, 海野麻未, 西川徹: 逆耐性現象成立に関与する遺伝子群。第21回日本生物学的精神医学会, 仙台, 4.22, 1999.
  5. 西川 徹, 梶井 靖, 藤山 航, 平岡秀一, 橋本隆紀, 海野麻未, 村岡新一郎, 黒田安計: 精神異常発現薬が引き起こす行動感作に関連する遺伝子群の探索。第22回日本神経科学大会, 大阪, 7.8, 1999.
  6. 西川 徹, 梶井 靖, 平岡秀一, 海野麻未, 村岡新一郎, 黒田安計: 分裂病の発症と再燃の分子機構へのアプローチ: 精神分裂病と感情障害: 病態と治療薬研究の新しい展開。第29回日本神経精神薬理学会, 広島, 9.14, 1999.
  7. 融 道男, 西川 徹: 精神分裂病の神経化学: 精神分裂病の神経化学的病態に関する新しいアプローチ。第42回日本神経化学会, 広島, 9.16, 1999.
  8. 山本直樹, 海野麻未, 平岡秀一, 土田英人, 西川 徹: フェンサイクリジン動物モデル研究から: 精

- 精神分裂病の神経化学的病態に関する新しいアプローチ. 第42回日本神経化学会, 広島, 9.16, 1999.
9. 和田圭司, 西川 徹, 関口正幸: グルタミン酸トランスポーターおよび受容体: 機能異常と病態・創薬: 神経情報信号化分子-チャンネル・トランスポーターの生理と病態. 第42回日本神経化学会, 広島, 9.16, 1999.
10. 西川 徹: 精神分裂病の生物学-最近の進歩-. 第7回「脳の世紀」シンポジウム, 東京, 9.29, 1999.
11. 西川 徹: 精神分裂病のメカニズムを探る. 第12回千里ライフサイエンスセミナーブレインサイエンスシリーズ「神経難病の最前線-治療と創薬に向けて-」, 大阪, 9.29, 1999.
12. 西川 徹, 梶井 靖, 平岡秀一, 橋本 隆紀, 海野麻未, 村岡新一郎, 黒田安計: 分裂病の動物モデルとしての覚醒剤逆耐性現象と遺伝子発現. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12.7, 1999.
- b. 国際学会
1. Toda S, Kajii Y, Kaneda K, Umino A, Sato M, Nishikawa T: Novel Variants of the gene encoding pnut/septin-like protein expressed in adult ret brain. 29th Annual Meeting: Society for Neuroscience, Miami Beach USA, 10. 25, 1999
2. Saigoh K, Nishikawa T, Matsui T, Kihara M, Takahashi T, Wada K: The stereo-specific effect of D-serine ethylester and D2-cycloserine in ataxic mutant mice. 29th Annual Meeting: Society for Neuroscience, Miami Beach USA, 10. 26, 1999
- c. 一般学会
1. 平岡秀一, 梶井靖, 西川 徹: ラット脳において Phencyclidineによる発現誘導が発達段階依存的に増強する遺伝子の同定. 第21回日本生物学的精神医学会, 仙台, 4.23, 1999.
2. 泉 剛, 佐藤大輔, 金田小幸, 海野麻未, 小山司, 西川 徹: Phencyclidineによるラット脳内c-Fos発現に対するclozapineの効果. 第21回日本生物学的精神医学会, 仙台, 4.23, 1999.
3. 藤山 航, 梶井 靖, 平岡秀一, 佐藤光源, 西川 徹: メタンフェタミン繰り返し投与後のmrt 1発現増強. 第22回日本神経科学大会, 大阪, 7.6, 1999.
4. 岩間久行, 山本直樹, 高橋勝宣, 海野麻未, 西川 徹: ラットの前頭葉におけるキノリン酸注入後の内在性D-セリンの変化. 第42回日本神経化学会, 広島, 9.16, 1999.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

### III. 分担研究報告

抗精神病薬に抵抗性の分裂病症状の成因解明と治療法開発に関する研究

分担研究課題（西川分担分）：

分裂病様症状発現薬に応答する遺伝子の探索と内在性D-セリンの代謝および機能の分子機構解明

主任研究者 西川 徹 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部 部長

研究要旨：前年度に引き続いてRAP-PCR（RNA arbitrarily primed PCR）法および定量的RT-PCR法を用い、ラット大脳新皮質から、抗精神病薬抵抗性・反応性双方の分裂病様症状を引き起こすphencyclidine（PCP）急性投与後において、生後8日には生理的食塩水を投与した対照群と差がないが生後50日には有意な発現誘導が見られる遺伝子を探索した。これまでに検出された転写産物のうちprt-1（PCP responsive transcript-1）はsynapse-associated protein 97（SAP97）遺伝子であり、生後50日齢ラットの大脳新皮質においては、1)2種類のsplicing variantsはともにPCPに対して増加反応を示すこと、2)PCPと同様にNMDA型グルタミン酸受容体遮断作用と抗精神病薬抵抗性の分裂病様症状惹起作用をもつdizocilpineにより発現が増加すること、3)ドーパミン作動薬で抗精神病薬反応性の分裂病様症状を引き起こすmethamphetamine（MAP）やコカイン、ドーパミンDI受容体遮断薬SCH-23390、GABA-A受容体アロステリック作動薬のpentobarbital等の投与後には有意な変化が見られないこと、4)PCPによる発現誘導は代表的抗精神病薬のhaloperidolの前処置を行っても抑制されないこと等が明らかとなった。これらの結果は、SAP97遺伝子の発現が分裂病患者に見られる抗精神病薬抵抗性症状に関与することを示唆している。このほかに、PCPに対して発達にしたがって応答が変化する遺伝子群としてprt-2～prt-4が見いだされ、現在解析を進めている。一方、難治性の分裂病症状にNMDA受容体を介するグルタミン酸伝達低下が関係すると考えられることから、NMDA型グルタミン酸受容体のアロステリックアゴニストで、抗PCP作用を示す内在性物質であるD-セリンの脳内代謝と機能を解析した。神経細胞体を選択的に破壊するキノリン酸を注入した前頭葉皮質では、D-セリン、GABA、グルタミン酸等の組織含量が著明に減少し、内在性D-セリンはこれまで報告されているグリア細胞だけでなく神経細胞体内にも蓄積されていることが示唆された。また、未知のD-セリン代謝系に関係する分子を探索するため、RAP-PCRを用いて生後8日齢ラットの大脳新皮質から、D-セリン投与後に転写産物量が増加する遺伝子のスクリーニングを行い、候補となる複数の種類の転写産物を得た。

A. 研究目的

抗精神病薬は、分裂病症状のうち幻覚・妄想を中心とする陽性を改善するが、感情鈍麻、意欲減退、引きこもりなどの陰性症状にはほとんど効果がなく、このことが多くの分裂病患者の十分な社会復帰を拒み続けている。また、分裂病においては原因はかりでなく、発症や症状再燃の機序も不明である。本研究では、これら未解決の問題を解明し、生物学的診断マーカーおよび新しい治療法を見出すことを目的としている。

このため、1)分裂病は思春期以降に発症し分裂病様症状発現薬も小児期には精神障害を惹起しにくいことや、2)分裂病の再燃モデルといわれる行動感作

（分裂病様症状発現薬を経験した動物やヒトのこれらの薬物に対する感受性が長期にわたって亢進し、精神病状態や異常行動が生じやすくなる現象：逆耐性現象）がラットでは生後3週以降に形成され始めるように、分裂病様症状発現薬を投与した実験動物に見られる異常も一定の発達段階から成熟期のパターンに移行すること、等に着目し、分裂病の発症、再燃、抗精神病薬抵抗性症状などに関連した分子を検索中である。本年度は、主に、分裂病様の陽性・陰性双方の症状を発現させるphencyclidine（PCP）に対し、発達依存的に応答が変化する遺伝子をラット脳から単離・同定し、その薬理学的特徴およびヒト相同遺伝子について検討した。

一方、PCPはじめ強力なNMDA型グルタミン酸受容体遮断薬が共通して抗精神病薬抵抗性の分裂病様状態を発現させ、分裂病患者の死後脳で種々のグルタミン酸伝達系の変化が報告されていることから、少なくともNMDA受容体を介するグルタミン酸伝達異常が分裂病の病態に関係すると推測されるようになった。D-セリンは、NMDA受容体機能を促進することが知られていたが、私たちはPCPが引き起こす異常行動を抑制することや、定説に反して脳の内在性物質であることを見出した。したがって、内在性D-セリンの代謝系、グルタミン酸伝達系などは、分裂病の病態と関連するだけでなく、陰性症状にも効果を示す新しい治療薬の標的になる可能性がある。そこで、内在性D-セリンの脳における代謝および機能に関する基礎的な研究を継続した。

## B. 研究方法

### (1) 動物実験

実験には、生後8~50日齢のWistar系雄性ラットを用いた。動物実験は、国立精神・神経センター神経研究所の動物倫理委員会の承認を得たうえ、研究倫理規定を遵守して行われた。

### (2) PCPに応答する遺伝子の解析

#### (a) RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) による RNA fingerprint

生後8日齢および50日齢の動物にPCPまたは生理食塩水を投与後1時間で断頭し、大脳新皮質よりtotal RNAを抽出した。random hexamerによって合成したcDNAをテンプレートとし、12merからなるプライマーを用いてarbitrarily primed PCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、Syber Green Iで染色後、蛍光イメージアナライザー (FluorImager SI, Molecular DynamicsまたはFMBIO II, TAKARA) で解析してfingerprintを得た。Fingerprint上で50日齢特異的に発現誘導が変化するcDNAバンドをクローニングし塩基配列を決定した。さらに、RAP-PCRクローンに基づいてoligo dT-primed cDNAをクローニングし、対応する遺伝子の構造を解析した。

#### (b) 定量的RT-PCR

Fingerprintによる結果を確認するため、5~7個体

のRNAサンプルのプールからrandom hexamerを用いて合成したcDNAの希釈系列を用いてRT-PCRを行い、exponentialな増幅条件下で相対的に発現量を比較した。また、各個体のサンプルにおける絶対的な発現量を検討する実験では、各個体の一定量のRNAからcDNAを合成し、既知濃度のポイントミューテーションを導入したcDNA断片をcompetitorとしてcompetitive RT-PCRを行った。増幅産物を制限酵素処理した後にアガロースゲル電気泳動し、Syber Green Iまたはethidium bromideで染色した。DNAの定量解析は染色したゲルをCCDカメラで撮影した後、densitographにて行った。

#### (c) ノーザンプロット分析

薬物あるいは生理食塩水投与1時間後のラットの大脳新皮質、あるいは無処置ラットの脳各部位と各末梢臓器からtotal RNAを調整し、oligo dT-celluloseカラムを用いた精製によりpoly(A)-positive fractionとしてノーザンプロット分析を行った。

#### (3) 内在性D-セリンの代謝および機能の解析

ラット脳内細胞外液中のD-セリン濃度は、脳内微小透析法を用いて調べた。また、興奮毒キノリン酸によって神経細胞体を選択的に破壊した脳部位におけるD-セリン量を測定した。D-セリンおよび他のアミノ酸は、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーを使った一斉分析法により定量した。さらに、<sup>3</sup>H]D-セリンの脳分画における取り込みと放出を検討した。存在が予想されるD-セリントランスポーターの遺伝子クローニングは、アフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系を用いて試みた。D-セリンの代謝や機能に関連する未知分子を検索する方法のひとつとして、RAP-PCRを用い、D-またはL-セリンのを全身的に投与した生後8日令のラットの脳内で発現が変化する遺伝子転写産物を解析した。

## C. 研究結果

### (1) PCPに発達依存的応答を示す遺伝子群の探索

RNA fingerprint上で生後8日齢および50日齢の大脳新皮質における発現パターンをPCP投与群と生理食塩水投与群と比較し、50日齢の動物においてのみPCPによって発現が変化する複数の転写産物をクローニングした。これらの転写産物について、決定し

塩基配列からそれぞれの遺伝子特異的プライマーを設計し、一定量のRNAあたりの相対的な発現量を比較した結果、50日齢においてPCP投与によりそれぞれの遺伝子発現の変化が確認された。得られた塩基配列についてDNAデータベース上で検索を行ったところ、このうち一種は97kDa synapse-associated protein (SAP97)であることが明らかとなった。SAP97にはalternative splicingによる2種類のmRNA (long-formおよびshort-form)が存在していることが知られている。そこで、finger printから得られたshort-formだけでなく、long-formについてもその発現量を定量し、比較検討を行った。昨年度までに、SAP97mRNAは、long-formおよびshort-formともに、8日齢の動物ではPCP投与群および生理食塩水投与群の間で差は見られなかったが、50日齢動物のPCP投与群において発現量が有意に増加していることが示された。そこで、この増加の発現機序と臨床的意義を検討するため、本年度は成熟ラットの大脳新皮質において、種々の薬物投与後のSAP97遺伝子の発現変化を検討した。

2種類のsplicing variantsはともに、1)PCPと同様にNMDA型グルタミン酸受容体遮断作用と抗精神病薬抵抗性の分裂病様症状惹起作用をもつdizocilpine (0.5~1.0mg/kg、皮下投与 (s.c.))により発現が増加すること、2)ドーパミン作動薬で抗精神病薬反応性の分裂病様症状を引き起こすmethamphetamine (MAP: 4.8mg/kg、s.c.)やコカイン (30mg/kg、腹腔内投与 (i.p.))、ドーパミンD1受容体遮断薬SCH-23390 (0.5mg/kg、i.p.)、GABA-A受容体アロステリック作動薬のpentobarbital (50mg/kg、i.p.)等の投与後には有意な変化が見られないこと、4)PCPによる発現誘導は代表的抗精神病薬のhaloperidol (1mg/kg、i.p.)の前処置を行っても抑制されないこと等が明らかとなった。

ヒトゲノムのSAP97遺伝子コーディングフレームに対応する領域の配列解析を行い、精神神経疾患患者のサンプルにおける分子遺伝学的解析の準備を進めた。

## (2) 内在性D-セリンに関する研究

(a)前頭葉皮質におけるキノリン酸局所注入後のD-セリン濃度の変化

神経細胞体を選択的に破壊するキノリン酸 (240nmol/side) を、pentobarbital麻酔下でステレオタキシーを用いて、両側の前頭葉皮質の内側部に局所注入し、1週間後に種々のアミノ酸を測定した。対照群には、溶媒であるリン酸緩衝生理食塩水を注入した。キノリン酸注入部位では、D-、L-セリン、GABA、およびグルタミン酸の組織含量が著明に減少した。また、キノリン酸の前頭葉内注入動物の線条体においては、D-、L-セリンとGABAの組織中濃度には変化がなかったが、グルタミン酸レベルが有意に減少していた。

## (b)D-セリン代謝系に関する未知分子の探索

未知のD-セリン代謝系に関する分子を探索するため、RAP-PCRを用いて生後8日齢ラットの大脳新皮質から、D-セリン投与後に転写産物量が増加する遺伝子のスクリーニングを行い、候補となる複数の種類の転写産物を得たため、構造と機能の解析を続行中である。アフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系で、D-セリンの取り込み活性が認められたため、トランスポーターの発現クローニングを継続した。

## D. 考察

### (1) 分裂病様症状発現薬に応答する遺伝子の研究

これまでの私たちの研究から、c-fos遺伝子の発現を指標として、MAP、コカイン、およびPCP投与ラットにおける脳の神経活動の変化を検討したところ、神経活動異常のパターンは、少なくとも大脳新皮質で発達とともに著明に変化し、これらの薬物に対する行動反応が成熟期のパターンに移行する生後3週以降に成熟期に近づくことが明らかになった。このような現象は、分裂病様症状発現薬が作用して機能障害をもたらす情報処理系は、少なくとも大脳新皮質を含んでおり、生後3週以降に成熟することを示唆している。

これは、分裂病が思春期以降に発症し、分裂病様症状発現薬による異常も思春期以前には生じにくいと現象と関係する可能性がある。すなわち、分裂病で異常を来す情報処理系は、思春期頃に成熟して精神機能の制御に必須の機能を発揮するようになると仮定することができる。このような情報処理系では、

その発達過程に異常があったとしても精神機能への影響は思春期まで目立たないことになり、分裂病様症状発現薬も標的が未成熟なために、この時期までは成人のような精神症状を生じさせないと考えることができる。したがって、本研究でRAP-PCR法によって検索された、発達に伴って分裂病様症状発現薬に対する反応を獲得する遺伝子群は、分裂病で障害されている脳内情報処理系に関係する可能性がある。

成熟期の脳新皮質におけるSAP97遺伝子mRNAの発現誘導は、1)PCPだけでなく、選択的NMDA受容体遮断薬dizocilpine投与後にも認められるが、2)MAPやコカインなどのドーパミン作動薬には有意な変動を示さないこと、3)PCP、dizocilpine、MAP、コカイン等は共通して、脳新皮質のドーパミン伝達を亢進させること、4)ドーパミンD1受容体遮断薬SCH-23390やGABA-A受容体アロステリック作動薬のpentobarbitalの投与では変化しないことなどから、ドーパミン伝達への依存性は少なく、PCPおよびdizocilpineによって出現するが、MAP、コカインでは生じないといわれる、分裂病様の陰性症状に関与すると推測される。つまり、抗精神病薬抵抗性の分裂病症状の分子病態を明らかにする有用な手がかりとなる可能性がある。この可能性は、実際に、抗精神病薬haloperidolを前処置しても、PCPによるSAP97遺伝子mRNAの増加は抑制されないことから支持される。

## (2) 内在性D-セリンに関する研究

特異的な抗D-セリン抗体を用いた組織化学的研究により、脳内の内在性D-セリンは主にグリア細胞に存在すると考えられている。しかし、本研究では、選択的に神経細胞体を破壊し、グリア細胞や神経軸索・神経終末を残存させた脳部位（前頭葉皮質）で、D-セリン含量の著明な減少が認められたことから、D-セリンが神経細胞体にも蓄積されていることや、D-セリン濃度が前頭葉内の介在神経によって調節を受けることが示唆される。昨年度までの研究において、前頭葉内の細胞外液中D-セリン濃度がGABA伝達によってtonicに制御されていることが明らかになったが、予備的実験で、キノリン酸注入部位における細胞外液中D-セリン濃度がGABA-A遮断薬投与時

と同程度に減少しているデータを得ている。したがって、これらの結果を考え合わせると、GABA性介在神経がD-セリンシグナルを調節している可能性がある。

最近Coyleらのグループによって、抗精神病薬を投与されている精神分裂病患者にD-セリンを併用投与し、抗精神病薬に反応しない陰性症状や認知障害の改善が得られたという臨床結果が報告された。これは、私たちが動物実験をもとに、D-セリン、D-アラニンのように、NMDA受容体グリシン調節部位を選択的に刺激する物質が難治性分裂病の治療に役立つという仮説と矛盾しない。

しかし、D-セリンは血液脳関門透過性が不良であることや、長期投与によって腎毒性を引き起こす危険性が考えられる。さらに、グリシン、milacemide、D-cycloserineなどNMDA受容体のグリシン結合部位に直接作用する物質の、選択性の低さあるいは部分作動薬であることのデメリットを考慮した場合、むしろ脳の内在性D-セリンの代謝に作用して間接的にNMDA受容体機能を促進させる薬物をスクリーニングすることが、分裂病治療薬開発上、より合理的なアプローチであると考えられる。また、D-セリンの代謝機構は分裂病で障害されている可能性がある。そこで、differential cloning法を用いて、D-セリン負荷時に発現が変動する遺伝子を探索することにより、D-セリン代謝に関連する候補遺伝子の同定を試みている。

## E. 結論

(1)初年度および第二年度に続き、分裂病関連候補遺伝子としてラット脳新皮質からPCPに対する応答性が生後発達にもなって変化する遺伝子群を検索し、PCPによって発達依存的に誘導される遺伝子としてSAP97遺伝子が検出された。SAP97遺伝子は、MAPおよびコカインには有意な応答を示さず、PCP投与後に見られる本遺伝子発現の増加は抗精神病薬に非感受性であることがわかった。PCPが陽性・陰性双方の分裂病様症状を引き起こし、MAPやコカインは主に陽性症状を発現させることを考えあわせると、以上の所見は、少なくともSAP97遺伝子が陰性症状と関連する可能性を示唆している。



(2)神経細胞体を選択的に破壊するキノリン酸を注入したラット前頭葉皮質においては、D-セリン含量が低下することから、内在性D-セリンがグリアだけでなく神経細胞体にも存在する可能性や、大脳皮質の介在神経によって内在性D-セリンの濃度が調節されている可能性が示唆された。D-セリン代謝系分子の解明は、分裂病の分子病態の検討や、D-セリンシグナルを調節する難治性分裂病治療薬の開発に寄与すると考えられることから、differential cloning法を用いたD-セリン負荷に応答する遺伝子群の探索や、アフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系におけるD-セリントランスポーター遺伝子のクローニングの試みを続けている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### a. 原著

1. Shirayama Y, Mitsushio H, Takahashi K and Nishikawa T: Differential effects of haloperidol on phencyclidine-induced reduction in substance P contents in rat brain regions. *Synapse* 35: 292-299, 2000
2. Sato M, Nakane H, Hayashida M, Koshino Y, Uchimura H, Tsutsumi T, Koyama T, Kusumi I, Akiyama K, Saito H, Saijo T, Ito C, Kubota Y, Nishikawa T, Kurada Y, Hamamura T, Fujiwara Y, Higuchi T, Yamawaki S: Algorithm for the treatment of schizophrenia in Japan. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice* 3: 271-276, 1999

#### b. 著書

1. 西川 徹: 精神疾患とグルタミン酸—精神分裂病を中心として—。グルタミン酸 最新の話 (金澤 一郎編) pp. 3-34, Excerpta Medica, 東京, 1999.
2. 山本直樹, 西川 徹: d フェンサイクリジン 12 他 の薬物依存と脳障害。臨床精神医学講座 第8巻 薬物・アルコール関連障害 pp. 368-377, 中山書店, 東京, 1999.

#### c. 総説

1. 西川 徹: 精神疾患の克服—脳を守る21世紀生命科学の展望—。生体の科学 51: 68-73, 2000
2. 西川 徹: 不安の薬物治療法—不安の神経生物学と新しい抗不安薬—。医学のあゆみ 192: 1133-1137, 2000

3. 吉川武男, 西川 徹: 躁うつ病 病気の分子生物学. 50: 398-400, 1999.

4. 西川 徹: 脳の内在性D-セリンに関する研究—新たな高次機能調節系と精神疾患の治療法を求めて—。脳の科学 21: 757-763, 1999.

### 2. 学会発表

#### a. 特別講演, シンポジウム

1. 西川 徹, 土田英人, 川口直恵, 海野麻未, 山本直樹: 哺乳類における内在性D-セリンの代謝・機能と病態. 第28回 脳の医学・生物学研究会, 名古屋, 1.22, 2000.
2. 西川 徹: 脳内D-セリンの代謝と機能. 「D-アミノ酸研究の最前線」シンポジウム, 平成11年度文部省科学研究 基盤研究A (1) 「哺乳類体内に存在するD型アミノ酸の総合的研究」研究班, 東京, 1.24, 2000
3. 西川 徹: 薬物精神病の生物学的基礎. 第25回日本医学会総会, 東京, 4.4, 1999.
4. 梶井靖, 平岡秀一, 藤山航, 戸田重誠, 金田小幸, 海野麻未, 西川徹: 逆耐性現象成立に関与する遺伝子群. 第21回日本生物学的精神医学会, 仙台, 4.22, 1999.
5. 西川 徹, 梶井 靖, 藤山 航, 平岡秀一, 橋本隆紀, 海野麻未, 村岡新一郎, 黒田安計: 精神異常発現薬が引き起こす行動感作に関連する遺伝子群の探索. 第22回日本神経科学大会, 大阪, 7.8, 1999.
6. 西川 徹, 梶井 靖, 平岡秀一, 海野麻未, 村岡新一郎, 黒田安計: 精神分裂病の発症と再燃の分子機構へのアプローチ: 精神分裂病と感情障害: 病態と治療薬研究の新しい展開. 第29回日本神経精神薬理学会, 広島, 9.14, 1999.
7. 融 道男, 西川 徹: 精神分裂病の神経化学: 精神分裂病の神経化学的病態に関する新しいアプローチ. 第42回日本神経化学学会, 広島, 9.16, 1999.
8. 山本直樹, 海野麻未, 平岡秀一, 土田英人, 西川 徹: フェンサイクリジン動物モデル研究から: 精神分裂病の神経化学的病態に関する新しいアプローチ. 第42回日本神経化学学会, 広島, 9.16, 1999.
9. 和田圭司, 西川 徹, 関口正幸: グルタミン酸トランスポーターおよび受容体: 機能異常と病態・創薬: 神経情報信号化分子-チャンネル・トランスポーターの生理と病態. 第42回日本神経化学学会, 広島, 9.16, 1999.
10. 西川 徹: 精神分裂病の生物学—最近の進歩—。

第7回「脳の世紀」シンポジウム, 東京, 9.29, なし  
1999.

11. 西川 徹: 精神分裂病のメカニズムを探る. 第12回千里ライフサイエンスセミナーブレインサイエンスシリーズ「神経難病の最前線-治療と創薬に向けて-」, 大阪, 9.29, 1999.

12. 西川 徹, 梶井 靖, 平岡秀一, 橋本 隆紀, 海野麻未, 村岡新一郎, 黒田安計: 分裂病の動物モデルとしての覚醒剤逆耐性現象と遺伝子発現. 第22回日本分子生物学会年会, 福岡, 12.7, 1999.

b. 国際学会

1. Toda S, Kajii Y, Kaneda K, Umino A, Sato M, Nishikawa T: Novel Variants of the gene encoding pnut/septin-like protein expressed in adult ret brain. 29th Annual Meeting: Society for Neuroscience, Miami Beach USA, 10. 25, 1999

2. Saigoh K, Nishikawa T, Matsui T, Kihara M, Takahashi T, Wada K: The stereo-specific effect of D-serine ethylester and D2-cycloserine in ataxic mutant mice. 29th Annual Meeting: Society for Neuroscience, Miami Beach USA, 10. 26, 1999

c. 一般学会

1. 平岡秀一, 梶井靖, 西川 徹: ラット脳において Phencyclidineによる発現誘導が発達段階依存的に増強する遺伝子の同定. 第21回日本生物学的精神医学会, 仙台, 4.23, 1999.

2. 泉 剛, 佐藤大輔, 金田小幸, 海野麻未, 小山司, 西川 徹: Phencyclidineによるラット脳内c-Fos発現に対するclozapineの効果. 第21回日本生物学的精神医学会, 仙台, 4.23, 1999.

3. 藤山 航, 梶井 靖, 平岡秀一, 佐藤光源, 西川 徹: メタンフェタミン繰り返し投与後のmrt1発現増強. 第22回日本神経科学大会, 大阪, 7.6, 1999.

4. 岩間久行, 山本直樹, 高橋勝宣, 海野麻未, 西川 徹: ラットの前頭葉におけるキノリン酸注入後の内在性D-セリンの変化. 第42回日本神経化学会, 広島, 9.16, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

抗精神病薬に抵抗性の分裂病症状の成因解明と治療法開発に関する研究

分担研究課題：

AMPA型グルタミン酸受容体活性増強物質の開発・分子作用機序・動物作用  
～新しい精神・神経疾患治療薬の開発を目指して～

分担研究者 関口正幸 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部 室長

研究要旨：精神疾患の病因のひとつとして脳神経細胞間の情報伝達異常が考えられる。神経細胞間の情報伝達場であるシナプスで、グルタミン酸は主要な興奮性伝達物質として機能している。そのグルタミン酸シグナルを受容する重要な分子にAMPA型グルタミン酸受容体がある。我々はこのAMPA受容体の活性を飛躍的に増大させる物質PEPAを見いだした。本研究ではPEPAの受容体作用メカニズムを遺伝子工学的手法と電気生理学的手法を用いて分子レベルで明らかにし、この知見を踏まえて、精神・神経疾患の動物モデルに対するPEPAの作用を検討した。PEPAはラットに実験的に引き起こした記憶・学習障害に対して著しい改善作用を示した。以上の結果はAMPA受容体活性（特に動力学的性質）の操作が精神・神経疾患の治療に有用である可能性を示唆する。

A. 研究目的

脳のシナプスの約70%が神経伝達物質としてグルタミン酸を用いている興奮性シナプスと考えられている。このグルタミン酸シナプス機能の異常は分裂病や記憶障害・痴呆などの多様な精神・神経疾患の病因として重要視されている。グルタミン酸シナプスで機能する生体分子のひとつAMPA受容体は伝達物質グルタミン酸の主要な受容体のひとつである。AMPA受容体にはグルタミン酸が結合する部位以外に、グルタミン酸以外の化合物が結合し、受容体活性を修飾するアロステリック修飾部位が存在する。我々はこのアロステリック修飾部位に作用し、受容体活性を飛躍的に増大させる化合物PEPAを見いだし1)、その分子薬理的解析と実験動物における精神疾患モデルに対する作用を検討した。結果的に、PEPAの記憶学習障害緩和作用が見いだされた。この結果は、脳障害により発生する精神・神経障害治療薬のターゲットとしてAMPA受容体の有用性を示唆する。

B. 研究方法

(1)分子薬理学

PEPAのAMPA受容体活性増強作用を分子レベル

で解析するために、AMPA受容体遺伝子を *Xenopus laevis* 卵母細胞に移入し、受容体蛋白質を発現させた。この発現細胞からOutside-outのコンフィグレーションで膜パッチを作成し、これにグルタミン酸を投与、電気生理学的に受容体電流を測定した。

AMPA受容体は非常に早いチャネル開口・閉口のダイナミクスを持つため、通常用いられている秒単位での遅いリガンド投与では、受容体動態を正確に把握できない。そこで、ピエゾエレクトロニック素子とこれに連結したシーターピペットを用いる超高速リガンド投与方法を確立した。この方法では、数百msecレベルでのリガンド投与が可能であり、AMPA受容体の開口・閉口ダイナミクスを正確に評価できる2)。実際の実験では膜パッチにグルタミン酸10 mMを投与した際の20～80%立ち上がり速度が500msec以下の場合のみデータとして採用した。PEPAは100 $\mu$ Mの濃度でグルタミン酸投与前から連続的に膜パッチに投与した。AMPA受容体の閉口ダイナミクスのうちDesensitization（グルタミン酸存在下で受容体分子にグルタミン酸が結合したままチャネルが閉じる過程）については、グルタミン酸パルス50～100 msecのdurationで与えることにより、deactivation（受容体分子からグルタミン酸が離れる

ときにチャンネルが閉じる過程)は1 msecのdurationで与えることにより測定した。

### (2)動物モデル-1

マウスに覚醒剤であるMetamphetamine (MAP)を投与すると自発運動量の著増が引き起こされる。この異常行動はヒトにおける覚醒剤精神症状の動物モデルと考えられている。PEPAの覚醒剤精神症状に対する作用を検討するため、ICRマウスを以下の5群に分け、測定ケージへの15分間の馴化の後、薬液を投与(全て腹腔内投与、0.3ml/1匹)した。投与後90分間の自発運動量を、赤外線装置を用いて記録した。

1. Control群(薬液投与せず)、2. Vehicle投与群、3. MAP投与群、4. PEPA投与群、5. MAP+PEPA投与群。MAPは2 mg/kg、PEPAは16 mg/kg用いた。

### (3)動物モデル-2

ラット中大脳動脈に閉塞手術を施すと、脳梗塞により記憶学習能の低下が起こる。本モデル系を用いてPEPAが脳の障害により引き起こされた記憶学習障害という高次脳機能障害に有効であるかどうか調べた。

SHR/NCrj系雄性ラットの中大脳動脈を熱焼灼法にて閉塞した。閉塞直後から10日間、1日1回PEPA 10 mg/kgを投与した(尾静脈注、PEPA投与群)。同様にコントロール群(閉塞後PEPAの代わりにVehicleのみを投与)、偽手術群(閉塞せずにVehicle投与)を用意した(各群は各々10匹)。

閉塞7日目から10日目まで毎日、ラットの記憶学習能をMorrisの水迷路試験<sup>3)</sup>で検討した。すなわち、水を満たした水槽にプラットフォームを設置、この水槽にラットを入れ、プラットフォームに泳ぎ着くまでの距離と時間を測定した。水槽周囲には動物の視覚的手がかり(カレンダー・パソコン等)を配置した。

## C. 研究結果とD. 考察

### (1)分子薬理学

Outside-outパッチ法から、PEPAはAMPA受容体のDesensitizationを抑制するが、Deactivationには作用しないことが示された。GluR3-flop/GluR2-flop (1:4の量比で移入)を発現させた*Xenopus oocyte*において、グルタミン酸単独によるAMPA受容体の開口は

非常に早い速度で起こり、グルタミン酸が長時間存在しても直ぐに閉じてしまった(Desensitization)。このDesensitization過程は以下の二つのパラメーターによって表すことが出来る。一つは、受容体がDesensitizationしていく速さ、一つは定常状態におけるDesensitizationの程度である。本研究では、電流応答の減衰を一次指数関数で近似することにより前者の速さ( $\tau_{des}$ と表示)を測定、電流応答の最大振幅とグルタミン酸100 msec(又は50 msec)投与時点での電流応答の振幅の比を計算することにより後者の程度( $I_{ss}/I_{peak}$ と表示)を評価した。PEPAが存在すると、Desensitizationの速さはそれほど変化しなかったが、Desensitizationの程度は、著しく阻害され、グルタミン酸単独では殆ど閉じていた受容体が、ある程度開口状態で存在することが判明した。

一方、グルタミン酸を1 msec投与して直ぐ停止したときチャンネルが閉じるカインेटイクスであるDeactivationの速さ(Desensitizationの速さと同様に $\tau_{dea}$ で評価)は、PEPAにより殆ど変化しなかった。

これまでに報告されているAMPA受容体活性増強薬は、受容体のDesensitization、Deactivationの両方を修飾することが知られているので、PEPAは既存薬とは異なるメカニズムでAMPA受容体活性を増大することが示された。言い換えれば、PEPAはAMPA受容体の「Pure desensitization blocker」であると言えることが出来る。AMPA受容体の脱感作は、リン酸化等との関係でその生理学的意義がこれまでも議論されてきた。PEPAのDesensitization選択的作用特性はシナプス伝達や記憶学習におけるAMPA受容体Desensitizationの生物学的意味の検討に有用であり、応用研究が期待される。

### (2)動物モデル-1

MAP投与群とMAP + PEPA投与群の自発運動量の経時変化(5分毎の積算値)を調べた。なお、無投与群、Vehicle投与群、PEPA単独投与群では自発運動量の増大は全く見られなかった。PEPA共投与群ではMAP単独投与群に比べ自発運動量の増大が少なかった。しかし、PEPA投与により、MAPによる自発運動量著増が完全に抑えられるわけではなかった。これらの結果は、PEPAが覚醒剤精神症状に影響を与えるが、これを完治するほどの強力な作用は有し