

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用

所属 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部
研究者 西川 徹

分担研究者

- | | |
|--------------------------|-------------|
| (1) 聖マリアンナ医科大学神経精神科 | 朝倉 幹雄 |
| (2) 東京大学医学部付属病院精神神経科 | 加藤 忠史 |
| (3) 三井製薬工業(株)生物科学研究所 | 曾根原和彦 |
| (4) 群馬大学医学部神経精神医学教室 | 三國 雅彦 |
| (5) 旭化成工業株式会社ライフサイエンス研究所 | 望月 大介・生垣 一郎 |

要旨

分裂病に関して病態に関連する新規候補遺伝子群に関する薬理的検討が進展した。また、難治性分裂病症状に対する改善効果をもつ D-セリンの代謝や機能に関連する新たな遺伝子が見出され、開発中の治療薬候補物質の作用機序の研究が進んだ。感情障害の研究では、ミトコンドリア機能と躁うつ病との関連、うつ病患者の視床下部-下垂体-副腎皮質系の機能テスト法の改良、うつ病モデルである慢性変動ストレス負荷ラットの脳におけるノルアドレナリンニューロンや副腎皮質刺激ホルモン放出因子の特異的な変化などが明らかになり、生物学的マーカーへの応用が期待される。

1. 研究目的

精神分裂病(分裂病)、感情障害(躁うつ病)、不安障害をはじめとする精神疾患は、それぞれ原因の異なる多くの疾患から構成されていると考えられる。思春期から壮年期を中心とした25万人以上に上る入院患者数に象徴されるように、薬物療法が発展してきたとは言え、効果が不十分なため本来の能力を回復できない例が多い。したがって、生物学的な診断法の確立と新しい治療法・予防法の開発に直結する、原因または病態マーカーとなる分子異常の解明が急がれている。本研究では、分裂病と感情障害の原因と病態を分子レベルで明らかにし、非侵襲的脳画像診断などへの応用が可能なマーカー分子や、新しい治療薬の標的となる分子および候補物質を見出すことを目的としている。そのため、分子生物学的な方法、薬理学的な方法、脳画像解析技術などを組み合わせて、分裂病と感情障害に関係がある未知の脳内分子を探索しながら研究を進め、これまで研究が行われてきた領域においても、従来とは別の視点からのアプローチを試みた。

2. 研究方法

患者および健常ボランティアに関する研究ならびに実験動物を用いた研究は、各施設の倫理委員会の承認を得た上で行った。また、患者および健常ボランティアに対しては、研究の主旨を十分説明し文書による同意を得た。個々の研究方法は、以下に示す通りである。

1) 分裂病様症状発現薬に反応する遺伝子の解析

昨年度までに、methamphetamine (MAP) または phencyclidine (PCP) を投与したラットの大脳新皮質において、生後8日齢では反応性が見られないが、50日齢では発現が変化する遺伝子を、RNA arbitrarily primed PCR法を用いて検索し、全長のmRNAに対応するcDNAの塩基配列を明らかにした。本年度は、同定した遺伝子の種々の薬物に対する反応性を、competitive RT-PCR法や28s ribosomal RNAを基準とするco-amplification RT-PCR法等により、定量的に解析した。遺伝子がコードする蛋白質の発現はウェスタンブロット分析により検討した。一部の実験では、アンチセンス法によって検出された遺伝子の発現を抑制した条件下で、MAP反復投与による逆耐性形成について検討した。

2) 内在性D-セリンの代謝および機能の解析

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。生後8日齢の動物にD-セリン、L-セリンまたは生理食塩水を投与し、一定時間後に大脳新皮質より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 日齡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。遺伝子発現の定量的解析は、exponential な増幅条件下における RT-PCR により行った。定量性を向上させるため、種々の薬物処置によってほとんど変動がないと考えられる 28S ribosomal RNA を同一チューブ内で同時に増幅し、目的とする遺伝子転写産物の発現量を 28S ribosomal RNA の発現量で補正した。すなわち、3' 末端をリン酸化処理した特殊なオリゴマーを一定の比率で加えることによって 28s の増幅のカイネティックスを調整し、できるだけ広い範囲のサイクル数で目的とする転写産物と同じ条件で定量性が得られるように工夫した。

ノーザンブロット分析は、ラットの脳各部位と各末梢臓器から調整した poly(A)-positive fraction を用い、32P で標識した cDNA プローブにより行った。また、サザンブロット分析は、BamHI、EcoRI あるいは HindIII で消化した大脳新皮質ゲノム DNA サンプルに同様のプローブを作用させて行った。

3) 分裂病の抗精神病薬抵抗性症状に対する治療法開発に関する研究

Wistar 系雄性ラット (7~9 週齡、体重 230~350 g) をウレタン (1.2~1.5 g/kg, i.p.) 麻酔し、右大腿静脈内に薬物投与用のカテーテルを挿入した。次にラットを脳定位固定装置に固定した後、Bregma (AP: 2.5?3.5mm, L: 0.5?1.5mm) の頭蓋にドリルで小孔を開け、硬膜・くも膜を切開して脳表を露出した。2%ポンタミンスカイブルーを含む 2M 塩化ナトリウム溶液を充填した微小ガラス電極 (先端径約 1 μ m) をマニピュレーターにて脳表から垂直に -2.0~-4.0mm 刺入した。ガラス電極より導出した電気信号は、微小電極用増幅器にて増幅した後、バンドパス (3kHz~50Hz) 及びハムフィルターをかけてノイズより分離してオシロスコープで観察しながら、パルスカウンタにて 10 秒当たりの発火頻度をコンピューターに取り込み記録した。実験終了後、ガラス電極より -10mA、10 分の電流をかけた後、脳を摘出して切片標本を作成し、電極の刺入位置の確認を行った。被験薬は 0.25% 酢酸または蒸留水に溶解した後、投与容量が 1ml/kg となるように生理食塩液で調整した。薬物の投与量は、文献上の用量あるいは臨床用量を考慮して設定した。

4) 新規抗精神病薬 MS-377 の有効性および作用機序研究

モルモット並びにラット脳ホモジネート用い、in vitro における標識した開発中の新規抗精神病薬 [3H]-MS-377 の結合能を調べ、各種受容体リガンドを用いた結合抑制試験を行った。また、分裂病の発症や再燃のモデルである中枢刺激薬反復投与の逆耐性現象に対する MS-377 の効果を検討するため、MAP 反復投与時に MS-377 を併用投与し、休薬後に MAP 再チャレンジした時の異常行動の出現を調べた。

5) 感情障害におけるミトコンドリア機能障害に関する分子生物学的研究

双極性障害患者 (DSM-IV) 患者 135 名および健常対照群 187 名 (細胞内 Ca 反応は、各 14 名、17 名) の末梢血 DNA よりミトコンドリア DNA (mtDNA) 断片を増幅し、SSCP (single strand conformation polymorphism) と heteroduplex を同時に観察した後、SSCP パターンについて塩基配列の解析を行った。また、RFLP 法により遺伝子型を判定した。カルシウム動態は、末梢血リンパ球を EB ウイルスにより株化し、静止時および、PAF (platelet activating factor) 刺激、thapsigargin (小胞体 Ca-ATPase 阻害薬) 刺激、ミトコンドリアプロトン勾配阻害薬 CCCP (carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone) の刺激等を行った時の細胞内 Ca 濃度を Fura-2 を指示薬とし蛍光検出器を用いて測定することにより検討した。

6) 脳画像・神経内分泌学的解析による感情障害の病態解明と治療法の開発

検査施行時、DSM-による抗うつ薬未服薬の大うつ病患者 16 例 (男性 5 例、女性 11 例; 平均年齢 51.9 \pm 14.0、ハミルトンうつ病尺度 25.3 \pm 8.4) を対象に DEX/CRH 検査を実施した。10 例の健常者データ (男性 3 例、女性 7 例; 平均年齢 45.2 \pm 8.0) と比較した。被験者には研究への参加に際しては、本研究の主旨を十分説明し、文書による同意を得たもののみ研究へ参加させた。18F-FDG PET 検査は、被験者に 18F-FDG 144-288kBq 静注後、45 分後に撮像を行い、単位面積当たりの放射能集積量を計測し、脳糖代謝を評価した。また SPM99 を用いて大うつ病群と健常者群での群間比較を行った。

7)感情障害の神経科学的成因と治療に関する研究

Wistar 系雄ラットに慢性拘束ストレス(chronic fixed stress; CFS)として金網による拘束 2.5h/日を 14 日間施行し、慢性変動ストレス(CVS)として拘束 2.5 時間(h), 水平振盪 1h, 4℃冷水 5 min, 尾クリップ 5 min, 絶飲 24 h, 絶食 24 h を無作為の順に 14 日間施行した。抗うつ薬として選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) の citalopram (CIT) 20 mg/kg あるいは fluvoxamine 20 mg/kg を 7~14 日間単独投与あるいは CVS 処置と併用投与した。CVS の初回および 14 日目の最終ストレスは拘束ストレスとした。最終ストレスの 2h 後および 24h 後に、ラットはネブタール麻酔下で開胸して、心室よりパラホルムアルデヒドを環流した後、脳を摘出した。環流固定した脳をパラフィン包埋した。マイクロトームを用いて PVN, BNST, CeA および LC 近傍を含む部位を 5 μ m の連続した切片を作成し、スライドガラス上で乾燥させた。CRH, TH mRNA の in situ ハイブリダイゼーションあるいは、モノクローナル抗体を用いた免疫染色法を行い免疫組織学的に各群を比較し検討した。 β 受容体結合実験用の脳は断頭屠殺後、前頭と頭頂・後頭の大脳皮質膜標品を作成し、 β 受容体は[3H](-)CGP12177 で標識し結合飽和実験を行い Scatchard 解析により受容体数(Bmax)と Kd を求めた。

3. 研究結果

1)分裂病に関連する新たな候補遺伝子の検索

昨年度までに、分裂病および薬物による分裂病様症状が思春期以降に発症することに着目し、分裂病関連候補遺伝子として、ラット大脳新皮質から分裂病様症状発現薬のメトアンフェタミン (MAP) またはフェンサイクリジン (PCP) に対する応答性が生後発達にともなって変化する転写産物群を検索・同定した。今年度は、このうち MAP 応答性の mrt-1 (MAP responsive transcript-1) がコードする蛋白の、抗体を用いた解析を中心に行った。mrt1 の塩基配列から、Mrt1 蛋白には、ひとつの PDZ ドメインをもった、少なくとも 2 種類のイソフォーム (Mrt1A および Mrt1B) が存在すると考えられた。そこで、Mrt1A か Mrt1B のいずれか一方にのみ反応する抗体と、双方のイソフォームに反応する抗体の 3 種類の抗体を用いて、大脳新皮質画分における分布を調べた。

脳のコモジネートでは、3 種類の抗体すべてに対する免疫反応が 62kDa 付近のバンドとして検出された。postsynaptic density では、3 種の抗体いずれによっても、ほとんど免疫反応が見られなかった。分裂病様症状発現薬の MAP やコカインによって発現が増強するバリエーションにコードされる Mrt1B は、コモジネートとシナプトゾーム画分に強い免疫反応を示したが、MAP に応答しないバリエーションの産物である Mrt1A は、シナプトゾーム画分に免疫反応が認められなかった。

これまでに報告したように、anti-mrt1 oligonucleotide を脳室内注入したラットでは、MAP を反復投与しても逆耐性が形成されないことが確認された。アンチセンスオリゴマーを注入している条件下では、Mrt1 蛋白 (Mrt1A と Mrt1B) の基礎的発現量が低下していた。また、ミスセンスオリゴマーを投与した対照群の線条体では、MAP 投与時に Mrt1 蛋白量が増加したが、アンチセンスオリゴマー投与群では変化がなかった。

2)内在性 D- セリンの代謝・機能の分子機構解明と分裂病治療薬開発への応用

大脳新皮質から、脳内 D-セリン濃度の上昇に反応して発現が増加する新規遺伝子 dsr-1 (D-serine-responsive transcript 1) をクローニングした。dsr-1 mRNA は、3' 末端側に既知の vacuolar type proton-ATPase subunit をコードする M9.2 遺伝子 mRNA と同じ 631 の塩基配列をもつことがわかったが、5' 末端側は新規配列であった。塩基配列上、2 つの ORF (open reading frame) があり、3' 末端側にコードされる蛋白は 1 つの膜貫通構造をもつことが予想された。ノーザンブロットでは、予想されるサイズの単一バンドが確認された。またサザンブロットから、dsr-1 遺伝子は、ゲノム上一コピー存在することが示された。RT-PCR により発現分布を検討したところ、脳、肺、精巣等に高く、相対的に脳での発現量が少ない M9.2 とは異なることがわかった。また、dsr-1 は D-セリンの腹腔内投与後には発現が有意に増加するが、L-セリンには有意な反応を示さなかった。M9.2 はいずれの異性体にも反応せず、dsr-1 の変化は非特異的でないことが明らかになった。

3)分裂病の抗精神病薬抵抗性症状に対する治療方法開発に関する研究

ACN111 の結合実験におけるプロフィールから、ACN111 の作用点として独自の結合部位が想定されたが、本実験系における σ 結合部位の関与も考えられた。そこで、既存の σ 結合能を持つ化合物の作用を検討した。 σ 1 結合部位に比較的選択的に結合する(+)-pentazocine は、ほとんど影響を及ぼさ

ず、 σ 1,2 結合部位に親和性のある DTG は、逆に抑制方向に発火頻度を変化させた (Fig.1)。また、 σ 結合部位に対して強い親和性を有することから抗精神分裂病薬として開発中あるいは開発を試みた化合物 (BMY14802、Dup-734、SR31742A および NE-100) についても検討したが、全て強弱はあるものの抑制方向の作用を示した。臨床において精神分裂病への有効性が報告されている rimcazole および remoxipride は、ACN111 ほど強くはないが発火頻度を増加させた。さらに、臨床での有効性が高い clozapine にも発火頻度増加作用が認められた。

4) 新規抗精神病薬 MS-377 の有効性および作用機序に関する研究

モルモット並びにラット脳ホモジネートにおける [3H]-MS-377 結合は、各種 σ 受容体リガンドで抑制され、(+)-pentazocine 結合に対する各種 σ 受容体リガンドの抑制と一致した。このことから、MS-377 は脳ホモジネートへの結合特性が σ 1 リガンドの (+)-pentazocine 結合に一致すると考えられた。一方、分裂病の再燃のモデルと考えられている MAP 反復投与ラットの逆耐性現象は、MAP に MS-377 を併用投与することにより形成されなくなった。

5) 感情障害におけるミトコンドリア機能障害に関する分子生物学的研究

躁うつ病では、脳エネルギー代謝異常所見などからミトコンドリア機能障害が示唆されことから、ミトコンドリア遺伝子の解析を続けている。シーケンス解析の結果みいだされた 28 個の変異のうち、機能的意義が推定された 10 個について、制限酵素断片長多型法 (RFLP 法) により対象者全員の遺伝子型判定を行った。その結果、5178 多型および 10398 多型が双極性障害と有意に関連していた。いずれも、NADPH-ubiquinon oxidoreductase (complex I) のサブユニットのアミノ酸配列を変化させる多型であった。5178/10398 多型で CA 型のハプロタイプを持つ者は、対照群の 16% なのに対して、双極性障害患者では 33% で有意に多かった。

培養リンパ芽球において、基礎的 [Ca²⁺]_i および全ての試薬に対する反応は、双極性障害患者と年齢の一致した健常対照群との間で有意差は見られなかった。一方、プロトンイオノフォア (CCCP) で処置後の PAF (血小板刺激因子) に対する細胞質 Ca²⁺ 反応は、双極性障害患者の方 (12.1 ± 4.9%, n = 16) が対照群 (9.2 ± 2.8%, n = 14) に比して有意に上昇していた。5178 多型との関連では、C 型をもつものでは A 型をもつものより基礎的 [Ca²⁺]_i が高い傾向があった。10398 多型との各パラメーターとの関連は見られなかった。

6) 脳画像・神経内分泌学的解析による感情障害の病態解明と治療法の開発

健常者に比べ、大うつ病群は 16 例中 11 例で明らかなリガンド取り込みの低下を示し、大うつ病患者での糖代謝の低下が示唆された。SPM による統計的解析 (右) では、左上前頭皮質での有意な糖代謝の低下が認められた。

7) 感情障害の神経科学的成因と治療に関する研究

単回拘束ストレスの 2 時間後、青斑核 (LC) のチロシン水酸化酵素 (TH) 免疫反応性は無処置ラットと比較して約 70% 増加した。単回拘束ストレス 24 時間後の TH 免疫反応は無処置動物のそれと有意な変化は見られなかった。慢性変動ストレス (CVS) では、14 日間施行 2 時間後、LC の TH の免疫反応は対照ラットと比較して約 250% 増加した。一方、CVS 14 日間施行 24 時間後の LC の TH 免疫反応は対照に比べ約 60% 減少した。

CVS による LC の TH 免疫反応性に対する SSRI (citalopram; CIT) 併用投与の作用を調べた実験では、CIT 14 日間投与後の LC の TH 免疫反応は対照動物より約 30% 減少した。CIT を併用した場合、LC の TH 免疫反応は CVS 14 日間処置 2 時間後に見られた著明な増加は見られず約 60% の増加に留まった。CVS 14 日間施行 24 時間後の TH 免疫反応は対照よりわずかに減少する傾向が見られたが有意な減少ではなかった。さらに、慢性拘束ストレス (CFS) 7 日後では、前脳の β アドレナリン受容体は減少し、CIT 併用投与はこれに影響しなかった。CVS 14 日間処置 2 時間後は前脳の β 受容体は変化しないが、24 時間後は 25% の有意な増加が見られた。CVS に SSRI を併用処置した場合、CVS 14 日間施行 2 時間後は β 受容体は有意に減少し、24 時間後は対照群と有意な変化を認めなかった。これらの β 受容体の変化は頭頂・後頭皮質では見られなかった。また β 受容体の結合親和性 (K_d) はいずれお群間に有意な変化は見られなかった。

4. 考察

1) 分裂病に関連する新たな候補遺伝子の検索

昨年度までの薬理的検討から、mrt-1 は分裂病の陽性症状の再燃や発症のモデルである中枢刺激薬が引き起こす逆耐性現象の形成および維持に関与すると推測される。今年度は、mrt-1 にコードされる蛋白質が、1) 蛋白-蛋白間相互作用に関係し PDZ および PX ドメインをひとつずつつこと、2) 少なくとも Mrt1A と Mrt1B の2種類のイソフォームがあること、3) Mrt1B 免疫反応の脳画分における分布は、前シナプスのマーカー蛋白と考えられる SNAP-25 および Kv1.4 と類似しているが、後シナプスのマーカー蛋白とされる PSD-95 の免疫反応とは異なり postsynaptic density にほとんどないこと等がわかった。Mrt1B をコードするバリエーションが MAP やコカインに選択的に応答することや、他の PDZ 蛋白には、神経伝達物質の受容体・トランスポーター・遊離装置等と細胞骨格蛋白等を結合させる働きをもつものが多く知られていることを考え合わせると、Mrt1B は主として前シナプスに局在し、膜受容体の配置変化等のシナプスの再構築をもたらすことにより、逆耐性のような可塑的な現象の成立に関与する可能性がある。今後は、Mrt1 特に Mrt1B 蛋白と結合する蛋白の検索等を行い、逆耐性現象の分子カスケードを明らかにする予定である。また、分裂病の病態に関する可能性と、新しい分裂病治療薬の標的となる可能性があり、現在ヒト相同遺伝子を解析中である。

2) 内在性 D-セリンの代謝・機能の分子機構解明と分裂病治療薬開発への応用

ラット大脳新皮質から、脳内 D-セリン濃度の上昇に反応して発現が変化する未知遺伝子群があることを見出し、そのうち dsr-1 の cDNA の塩基配列を同定した。推定される産生蛋白質は、一回の膜貫通構造を含む proton-ATPase サブユニット M9.2 蛋白と類似の構造をもつことや、proton-ATPase はアセチルコリンやモノアミンの遊離や取り込みとの関連が知られていることから、Dsr-1 蛋白は内在性 D-セリンの遊離や取り込みの機構に関与している可能性がある。また、D-セリンは、抗精神病薬抵抗性の分裂病症状ならびに PCP 投与動物におけるそのモデルとなる異常行動を改善することが報告されているため、Dsr-1 蛋白が、従来より治療効果の高い新しい抗精神病薬開発の際の標的分子となることが期待される。

3) 分裂病の抗精神病薬抵抗性症状に対する治療方法開発に関する研究

本研究において、前頭前野のドパミン感受性神経活動に対する既存の σ 結合能を持つ化合物の検討結果から、ACN111 の前頭葉活性化機序に σ 結部位 ($\sigma 1$ および $\sigma 2$) は関与しないことが示された。また臨床において抗精神分裂病効果を有する薬物 (rimcazole、remoxipride および clozapine) は ACN111 と同様に活性化方向の作用を有することが明かとなり、抗精神病薬抵抗性症状の治療薬開発において前頭葉活性化を有する薬物の有用性が示唆された。(4) 新規抗精神病薬 MS-377 の作用機序に関する研究脳組織における σ 受容体への高親和性結合や、MAP による逆耐性形成に対する阻害作用等より、MS-377 は既存の分裂病治療薬とは異なり、 $\sigma 1$ 受容体に特異的に結合し、分裂病の症状再燃を予防する可能性が示唆された。

4) 新規抗精神病薬 MS-377 の有効性および作用機序に関する研究

MS-377 は脳ホモジネートへの結合特性が $\sigma 1$ リガンドの (+)-pentazocine に一致すると考えられた。また、MS-377 はラット methamphetamine 逆耐性モデルにおいて用量依存的に異常行動を抑制した。MS-377 は既存の精神分裂病治療薬とは異なり、 $\sigma 1$ 受容体のみの特異的に結合し、精神分裂病の増悪を予防する可能性が示唆された。

5) 感情障害におけるミトコンドリア機能障害に関する分子生物学的研究

ミトコンドリア遺伝子の多型解析より、5178/10398 多型の CA 型ハプロタイプが双極性障害の危険因子になることが示唆された。10398 多型については、McMahan ら (2000) も同様の指摘をしている。したがって、これらの遺伝子のミトコンドリア代謝における役割を明らかにすることにより、躁うつ病の病態や治療薬の手がかりが得られる可能性がある。

細胞内 Ca^{2+} シグナルの調節変化に関するデータは、双極性障害で基礎的 $[Ca^{2+}]_i$ が高いとする Emamghoreishi ら (1997) の結果とは異なっている。しかし、彼らは上昇が I 型の双極性障害に限られると報告しており、本研究でも今後さらに対象例を増やし、I 型と II 型を分けて検討する必要がある。Thapsigargin への反応については、亢進を認めた Hough ら (1999) の研究と一致しない。プロトンイオノフォアで処置後の血小板刺激因子に対する細胞質 Ca^{2+} 反応に関する検討は、今回が初めてである。この条件下では、ミトコンドリアの Ca^{2+} が遮断されており、血小板刺激因子に対する反応性上昇は細胞膜ストア依存性 Ca^{2+} チャンネルの活動性亢進を反映している可能性が考えられる。双極性障害における細胞内 Ca^{2+} 動態の変化とミトコンドリア遺伝子との関連は、未だ不明であるが、

今回の結果をもとに、5178C 型多型の意義について検討する予定である。

6)脳画像・神経内分泌学的解析による感情障害の病態解明と治療法の開発

抗うつ薬未服薬で急性期うつ状態にある大うつ病患者で 18F-FDG PET 検査による脳局所糖代謝の検討を行った。SPM 解析で健康者に比し左前頭皮質で有意に糖代謝が低下していたことは、従来から報告されている感情障害における糖代謝の低下の報告と部位、laterality 共に一致するものである。しかし、少数例での検討であるので、さらに例数を増やし、また各種抗うつ薬服薬により寛解するまでの糖代謝の変化を縦断的に観察することによって、抗うつ薬の効果発現に関連する脳部位を同定できる可能性がある。

7)感情障害の神経科学的成因と治療に関する研究

CRH は青斑核のチロシン水酸化酵素を活性化して NE 遊離を促進し急性ストレス反応である不安、交感神経緊張、過覚醒等のうつ病症状の一部を形成してが、うつ病の病態は CRH 過活動に引き続くモノアミン系の変容を含む CRH カスケードの制御不全の結果と考えられる。慢性変動ストレスによって TH は低下し β 受容体が増加していることから NE の合成遊離は低下していると考えられる。CVS 後に新たなストレスに晒されると著しい TH 活性化が起り過剰な NE 遊離が β 受容体減少を引き起こす。しかし 5-HT も欠乏しているため β 受容体減少は維持されない。次いで 24 時間後には TH は著しく減少するため NE 合成遊離はさらに減少するため再び β 受容体の up-regulation が引き起こされる。CVS 後 TH は低下するが新たなストレスによって無処置ラットの TH 反応に比べ約 4 倍の過剰な増加を示すという本結果は、うつ病の病態とストレス反応性を極めて良く表している。うつ病死後脳の青斑核の THmRNA の増加が報告されているが、これはうつ病患者が死に瀕する直前の過剰なストレス状況の結果を反映していると思われる。SSRI 慢性投与は LC の TH を抑制しストレス下の過剰な NE 合成と遊離を抑制することにより結果的に NE の減少を防御すると考えられる。本結果は SSRI の抗うつ効果のみならず、再発予防効果、さらにパニック障害に対する臨床効果をよく説明できる CVS 後の LC の TH の基礎値の減少を説明するにはこれを制御する因子が非常に多いの今後の大きな課題として残される。

5. 結論

1)ラット大脳新皮質より、MAP に一定の発達段階から成熟期における応答性を獲得する新規遺伝子として同定された *mrt-1* は、蛋白間の相互作用に参与する PDZ および PX ドメインをもち、約 62kDa の、少なくとも 2 種類の蛋白質 (*Mrt1A* および *Mrt1B*) をコードすることが明らかになった。このうち、MAP 投与後に発現が誘導されると考えられる *Mrt1B* はシナプスに局在することが明らかになった。また、アンチ *mrt1* オリゴヌクレオチドを脳室内に持続注入すると、*Mrt1* 蛋白の基礎的発現と MAP 応答性の減少が見られると共に、分裂病の発症・再燃のモデルである MAP 誘発性逆耐性現象の形成が阻害されることから、シナプスでの *Mrt1* 蛋白の増加が逆耐性現象の形成過程に参与することが支持された。

2)D-セリンに応答する新規遺伝子 *dser-1* をクローニングした。脳に高い分布を示すことや vacuolar type proton-ATPase subunit と類似の構造をもつことから D-セリンの放出や取り込みに関与する可能性があり、今後、新規抗精神病薬として期待される内在性 D-セリンシグナルの調節薬開発の標的分子としての意義を検討する。

3)抗精神病薬抵抗性症状の治療薬開発につながると思われる抗 PCP 作用を有する薬物 (ACN111) の脳内機序を検討する目的で、大脳皮質前頭前野のドパミン感受性神経の発火頻度を指標にシグマ関連薬ならびに抗精神分裂病薬の作用を検討した。その結果、 σ 結合能を有する薬物は神経活動性に影響を及ぼさないか、低下させた。大脳皮質前頭前野の神経活性化作用を有する ACN111 の作用点として σ 結合部位は関与しないと考えられた。また、臨床において抗精神分裂病効果を示す rimcazole、remoxipride および clozapine は活性化方向の効果を示した。本研究から、抗精神病薬抵抗性症状の治療薬開発において前頭葉活性化を有する薬物の有用性が示唆された。

4) 開発中の抗精神病薬候補である MS-377 は、 σ_1 受容体選択的な作用をもち、分裂病の発症あるいは再燃のモデルである MAP 誘発性逆耐性現象の形成を阻害することがわかった。これらの結果から、 σ_1 受容体と分裂病の症状発現との関連が支持されるとともに、MS-377 が既存の抗精神病薬とは異なる薬理学的特徴をもつことによって、分裂病の症状改善だけでなく、その再発予防にも有効な優れ

た臨床効果を発揮することが期待された。

5) ミトコンドリア DNA の 5178C/10398A ハプロタイプが双極性障害（躁うつ病）の危険因子になることが示唆された。また、5178C 型は、培養リンパ芽球において、安静時の細胞内 Ca 値が高いことと関係していた。したがって、ミトコンドリア遺伝子の多型により細胞内 Ca 制御が異なることが、双極性障害の発症に影響している可能性がある。

6) 18F-FDG PET 検査による脳局所糖代謝の SPM 解析により、急性期うつ状態にある大うつ病患者では、健康者に比し左前頭皮質で活動性の変化があるという従来の報告を裏付ける所見を得た。さらに例数を増やし、また各種抗うつ薬服薬により寛解するまでの糖代謝の変化を縦断的に観察することによって、抗うつ薬の効果発現に関連する脳部位を同定できる可能性がある。

7) うつ病モデルである慢性変動ストレス(CVS)負荷ラットの脳において、青斑核のノルアドレナリン神経核の反応性が著しく変化しており、この変化が抗うつ薬の SSRI で抑制されることが明らかになった。本研究の結果は、うつ病においてストレス反応の異常がノルアドレナリンニューロンの調節障害によってもたらされるメカニズムを示唆しており、うつ病患者のストレス脆弱性の分子病態解明と再発予防薬開発の手がかりになると考えられる。

6. 研究発表

- 1) Murata M, Kashiwa A, Oshima A, Umino A, Kurachi M and Nishikawa T: Nomifensine-induced c-fos mRNA expression in the discrete brain areas of the developing rat. *Neurosci Lett*, in press.
- 2) Kajii Y, Toda S, Umino A and Nishikawa T: A molecular approach to identify essential factors for establishment of psychostimulant-induced behavioral sensitization. In *Contemporary Neuropsychiatry (Proceedings of the 3rd International Congress of Neuropsychiatry)*, Springer-Verlag, Tokyo, in press.
- 3) Tsuchida H, Yamamoto N, Kajii Y, Umino A and Nishikawa T: Cloning of a D-serine-regulated transcript dsr-1 from the rat cerebral cortex. *Biochem Biophysiol Res Com*, 280: 1189-1196, 2001.
- 4) Kato T, Kunugi H, Nanko S, Kato N: Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders* 62: 151-164, 2001.
- 5) Toda S, Kajii Y, Sato M, and Nishikawa T: Reciprocal expression of infant- and adult-preferring transcripts of CDCrel-1/septin gene in the rat neocortex. *Biochem Biophysiol Res Com* 273: 723-726, 2000.
- 6) 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.
- 7) Kato T, Inubushi T, Kato N: Prediction of lithium response by ³¹P-MRS in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 3: 83-85, 2000.
- 8) Kato T, Kunugi H, Nanko S, Kato N: Association of bipolar disorder with the 5178 polymorphism in mitochondrial DNA. *American Journal of Medical Genetics* 96: 182-186, 2000.
- 9) Kato T, Fujii K, Kamiya A, Kato N: White matter hyperintensity detected by magnetic resonance imaging and lithium response in bipolar disorder: A preliminary observation. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 54: 117-120, 2000.
- 10) Murashita J, Kato T, Shioiri T, Inubushi T, Kato N: Altered brain energy metabolism in lithium-resistant bipolar disorder detected by photic stimulated ³¹P-MR spectroscopy. *Psychological Medicine* 30: 107-115, 2000.
- 11) Takahashi S, Karasawa J and Horikomi K: Membrane binding property of novel antipsychotic agent MS-377 in guinea pig brain, *Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia*, 203-204, 2000.
- 12) Karasawa J, Takahashi S and Horikomi K: Binding properties of [3H] MS-377, a novel sigma-1 receptor ligand, to rat brain membranes. *European Journal of Pharmacology* 400, 51-57, 2000.
- 13) Takahashi S, Miwa T and Horikomi K: Involvement of sigma-1 receptors in methamphetamine-induced behavioral sensitization in rats. *Neuroscience Letters* 289, 21-24, 2000.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社