HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	メタンフェタミン反復投与による統合失調症病態モデル動物におけるNMDA受容体の構成パターンに着目した病態研究［全文の要約］
Author(s)	岡, 松彦
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2510 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14047号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77964
Type	doctoral thesis
File Information	Matsuhiko_Oka_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

メタンフェタミン反復投与による統合失調症病態モデル動物における NMDA 受容体の構成パターンに着目した病態研究

(A pathological study focusing on the subunit composition of NMDA receptors in animal models of schizophrenia by repeated administration of methamphetamine)

2020 年 3 月

北海道大学

岡　松彦

学位論文

メタンフェタミン反復投与による統合失調症病態モデル動物における NMDA 受容体の構成パターンに着目した病態研究

(A pathological study focusing on the subunit composition of NMDA receptors in animal models of schizophrenia by repeated administration of methamphetamine)

2020 年 3 月

北海道大学

岡　松彦

【背景と目的】

統合失調症は 2002 年に精神分裂病から呼称変更された主要な精神疾患の一つであり、性別や人種や地域によらず人口の約 1 %が罹患しているといわれる頻度の高い疾患である。10 歳代後半から 30 歳代で発症し、幻聴や被害妄想を中心とした幻覚・妄想や自我障害などの陽性症状、意志発動性の低下や感情鈍麻などの陰性症状、認知機能障害など多彩な症状を呈して QOL (quality of life)を著しく損ない、多くは再発・再燃及び急性増悪を繰り返して慢性の経過を辿る。依然として病態は解明されておらず、近年では非定型抗精神病薬が薬物療法の中心であるが難治例も多い。

当教室では統合失調症の病態解明に向け、ドパミン仮説及びグルタミン酸仮説を統合し、進行性の脳容積低下、認知機能障害及びドパミン D_2 受容体遮断薬への抵抗性の獲得を説明する動物モデルとして、「dopamine to glutamate 仮説」に基づく「病態包括進行モデル」を提唱してきた。ラットにメタンフェタミン(METH：methamphetamine) 2.5 mg/kg を投与すると前頭前野(PFC：prefrontal cortex)及び側坐核においてドパミン放出が増加し、遅発性にグルタミン酸放出も増加する。METH 2.5 mg/kg を反復投与すると、行動感作の形成に加えて①*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体遮断薬への過感受性、②prepulse inhibition (PPI)の障害及び③PFC のアポトーシスが惹起される。これら 3 現象は NMDA 受容体機能異常の存在を示唆するが、過去の研究ではその分子生物学機序が不明であった。NMDA 受容体は必須サブユニットである GluN1 を含む 7 種のサブユニット(GluN1、GluN2A-2D 及び GluN3A-3B)の四量体からなり、それぞれのサブユニットは固有の特性を持ち、サブユニットの構成は発達段階や神経活動により変化する。Grin1 遺伝子が GluN1 タンパクを、Grin2a-Grin2d 遺伝子が GluN2A-GluN2D タンパクを、Grin3a-Grin3b 遺伝子が GluN3A-GluN3B のタンパクをそれぞれコードしている。

本研究では、当教室で提唱してきた「dopamine to glutamate 仮説」に基づく「病態包括進行モデル」のメカニズムについて、分子生物学的アプローチによる解明を進める。METH 2.5 mg/kg の反復投与により統合失調症の病態進行や難治化をモデル化したモデルラットを用いて、脳における NMDA 受容体の遺伝子発現量及びタンパク質発現量を分析する。NMDA 受容体は四量体として存在することから、NMDA 受容体を構成する各々のサブユニット毎に発現量を分析することで、グルタミン酸作動性神経伝達における NMDA 受容体の機能異常について、受容体の量的変化に加えて質的変化についても検討する。更に、本モデルラットに対して非定型抗精神病薬の一つであるアセナピン(ASP：asenapine)を投与し、定型抗精神病薬の一つであるハロペリドール(HPD：haloperidol)と比較する事で、統合失調症の病態に対する NMDA 受容体の関与を検証すると共に、抗精神病薬の治療効果の機序も明らかにする。

第一章ではメタンフェタミン反復投与によるモデルラットの作成と、抗精神病薬による行動感作の抑制効果の検討、第二章ではメタンフェタミン反復投与による NMDA 受容体サブユニットの構成の変化の検討、第三章では抗精神病薬の投与による本モデル上の NMDA 受容体サブユニットの構成の変化の検討を行った。

【対象と方法】

予備実験として、7 週齢の雄性 SD(Sprague-Dawley)ラットにハンドリングの後、生理食塩水(Sal：saline)、ASP 0.03 mg/kg、ASP 0.10 mg/kg 又は ASP 0.30 mg/kg を投与し、受動型赤外線センサーを用いて動物の水平方向の運動量を測定する SUPERMEX (室町機械)により自発運動量への影響を検討した。又、7 週齢の雄性 SD ラットにハンドリングの後、Sal、ASP 0.03 mg/kg、ASP 0.10 mg/kg 又は ASP 0.30 mg/kg 及び METH 2.5 mg/kg を投与し、METH 2.5 mg/kg 誘発性の移所運動量への影響を検討した。以上よりラットの自発運動量及び METH 2.5 mg/kg 誘発性の移所運動量の亢進に対して共に有意な影響を与えない濃度として ASP 0.1 mg/kg を設定した。過去の当教室の実験で HPD 0.1 mg/kg でも同様の結果が得られていた。

第一章では、7 週齢の雄性 SD ラットにハンドリングの後、Sal 又は HPD 0.1 mg/kg 及び Sal 又は METH 2.5 mg/kg を隔日 5 回反復投与し、十分な休薬期間(5-8 日)の後に METH 0.15 mg/kg を単回投与し、移所運動量を測定した。同様に Sal 又は ASP 0.1 mg/kg 及び Sal 又は METH 2.5 mg/kg を隔日 5 回反復投与し、十分な休薬期間(5-8 日)の後に METH 0.15 mg/kg を単回投与し、移所運動量を測定した。

第二章では、7 週齢の雄性 SD ラットにハンドリングの後、Sal 又は METH 2.5 mg/kg を隔日 5 回反復投与し、十分な休薬期間(5-8 日)の後に PFC、海馬(HPC：hippocampus)及び線条体(ST：striatum)の採取を行った。脳組織は右半球を qRT-PCR (quantitative reverse transcription PCR)に、左半球をウェスタンブロッティング(WB：western blotting)に用いた。qRT-PCR では PFC、HPC 及び ST における GluN1 及び GluN2A-2D のコード遺伝子である Grin1 及び Grin2a-2d の遺伝子発現量について、β-Actin を内在性コントロール遺伝子とした ΔΔCT 法により相対比較を行った。WB では PFC 及び ST を細胞質基質分画及びシナプトソーム分画にそれぞれ単離し、各分画における GluN1 タンパク発現量を検討した。

第三章では、7 週齢の雄性 SD ラットにハンドリングの後、Sal、HPD 0.1 mg/kg 又は ASP 0.1 mg/kg 及び Sal 又は METH 2.5 mg/kg を隔日 5 回反復投与し、十分な休薬期間(5-8 日)の後に PFC、HPC 及び ST の採取を行った。qRT-PCR 及び WB は第二章と同様、qRT-PCR では PFC、HPC 及び ST における GluN1 及び GluN2A-2D のコード遺伝子である Grin1 及び Grin2a-2d の遺伝子発現量について、β-Actin を内在性コントロール遺伝子とした ΔΔCT 法により相対比較を行った。WB では PFC 及び ST を細胞質基質分画及びシナプトソーム分画にそれぞれ単離し、各分画における GluN1 タンパク発現量を検討した。

【結果】

第一章では既報の通り METH 2.5 mg/kg の反復投与により行動感作の形成を認めた。行動感作の形成は、HPD 0.1 mg/kg 又は ASP 0.1 mg/kg の投与により阻止された。

第二章では METH 2.5 mg/kg の反復投与により、qRT-PCR では PFC の Grin1 及び Grin2c、HPC の Grin1 及び Grin2a、ST の Grin1、Grin2b 及び

Grin2d の有意な遺伝子発現量の減少を認めた。ボンフェローニ補正後も PFC 及び ST の Grin1 遺伝子発現量は有意に減少していた。WB では PFC の細胞質基質分画及びシナプトソーム分画並びに ST の細胞質基質分画において GluN1 の有意なタンパク発現量の減少を認めた。

第三章では METH 2.5 mg/kg の反復投与群において PFC 及び ST の Grin1 遺伝子発現量が有意に減少していた。HPD 投与群においては NMDA 受容体サブユニットの遺伝子発現量及びタンパク発現量共に変化は認められなかったが、ASP 投与群においては PFC 及び ST の細胞質基質分画の GluN1 タンパク発現量の減少阻止効果を認めた。

【考察】

第一章について、行動感作の形成の阻止は HPD 及び ASP のドパミン D_1 受容体遮断作用によると考えられた。第二章について、PFC 及び ST において Grin1 及び GluN1 が減少していた事から、PFC 及び ST では NMDA 受容体発現量が減少しており、これが本モデルで認められる NMDA 受容体機能異常の本態の一部であると考えられた。発現量が減少したサブユニットの組み合わせとしては、PFC では GluN1/2C 又は GluN1/2A/2C、HPC では GluN1/2A、ST では GluN1/2B、GluN1/2D 又は GluN1/2B/2D が考えられた。特に PPI の障害の形成に NMDA 受容体サブユニットの減少が関与していると考えられた。第三章について、HPD 及び ASP の投与では Grin1 遺伝子及び GluN1 タンパクの発現量の低下は回復しなかったが、ASP 投与により PFC 及び ST における GluN1 タンパクの細胞内小胞輸送の減少が阻止されたものと考えられた。これは定型抗精神病薬及び非定型抗精神病薬の薬効の差異の一つである可能性がある。

METH 2.5 mg/kg の反復投与による各脳部位における NMDA 受容体サブユニットの遺伝子発現量の減少の一部は、統合失調症患者の死後脳研究で認められた変化と合致していた。現時点でドパミン神経系の過活動及び NMDA 受容体の機能異常の組み合わせが統合失調症の臨床側面を最もよく説明し得る事並びに Grin1 ノックダウンマウス及びヘテロ接合体(GluN1 +/-)マウスが有力な統合失調症モデル動物である事から、本モデルはドパミン仮説及びグルタミン酸仮説並びに薬理学的モデル及び遺伝学的モデルを包含した統合失調症の病態の一部を再現しているものと考えられる。

【結論】

METH の反復投与により統合失調症の病態の一部と考えられる NMDA 受容体サブユニットの発現の変化及びそれに対する抗精神病薬の薬効が示された。本モデルはクロザピン又はグルタミン酸受容体に作用する他の薬剤の投与による NMDA 受容体機能の変化の検討並びに新規治療法の探索に有用と考えられる。今後 METH 反復投与の時期を替える事で、神経発達障害としての統合失調症の病態の解明にも繋げられる可能性がある。