



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
Author(s)	岡, 松彦
Description	配架番号 : 2510
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14047号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14047
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93741
Type	doctoral thesis
File Information	Matsuhiko_Oka.pdf, この論文の全文



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

目次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	4 頁
緒言	6 頁
第一章: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	
1.1 緒言	11 頁
1.2 方法	13 頁
1.3 結果	16 頁
1.4 考察	22 頁
第二章: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	
2.1 緒言	23 頁
2.2 方法	25 頁
2.3 結果	30 頁
2.4 考察	33 頁
第三章: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	
3.1 緒言	35 頁
3.2 方法	37 頁
3.3 結果	38 頁
3.4 考察	43 頁
総括及び結論	44 頁
謝辞	46 頁
利益相反	47 頁
引用文献	48 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Changes in subunit composition of NMDA receptors in animal models of schizophrenia by repeated administration of methamphetamine
(Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Subunit composition of NMDA receptors in a Schizophrenia model study with a repeated methamphetamine administration model of rats
Matsuhiko Oka¹⁾, Koki Ito¹⁾, Minoru Koga²⁾, Ichiro Kusumi¹⁾
1) Department of Psychiatry, Hokkaido University Graduate School of Medicine
2) Department of Psychiatry, National Defense Medical College
第 49 回日本神経精神薬理学会年会 (JSNP 2019)

要旨

【背景と目的】

統合失調症は主要な精神疾患の一つであり、人口の約 1 %が罹患し、陽性症状、陰性症状及び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 D₂ 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①N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体遮断薬への過感受性、② prepulse inhibition の障害及び③PFC のアポトーシスが惹起される。この 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、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。

本研究は METH 2.5 mg/kg 反復投与による統合失調症病態モデル動物を用いて、本モデルの NMDA 受容体機能異常の背景にあると考えられる NMDA 受容体サブユニットの構成の変化と、それに対する定型抗精神病薬及び非定型抗精神病薬の効果について検討する。

【対象と方法】

まず、7 週齢の雄性 SD(Sprague-Dawley)ラットに定型抗精神病薬の一つであるハロペリドール(HPD : haloperidol)若しくは非定型抗精神病薬の一つであるアセナピン(ASP : asenapine)を投与して自発運動量への影響を検討した。次いで、HPD 若しくは ASP 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と 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ず、行動感作の形成を阻止する濃度として HPD 0.1 mg/kg 及び ASP 0.1 mg/kg を設定した。

更に 7 週齢の雄性 SD ラットに生理食塩水(Sal : saline)若しくは METH 2.5 mg/kg 及び Sal 若しくは HPD 0.1 mg/kg 若しくは ASP 0.1 mg/kg を隔日 5 回反復投与し、十分な休薬期間(5-8 日)の後に移所運動量の測定若しくは 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 の遺伝子発現量を、WB では PFC 及び ST の細胞質基質分画及びシナプトソーム分画における GluN1 タンパク発現量を、それぞれ検討した。

【結果】

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。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。HPD 投与群では 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 投与群では ASP-METH 群において 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】

PFC 及び ST において Grin1 及び GluN1 が減少していたことから、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と考えられた。HPD 及び ASP の投与では Grin1 及び GluN1 の発現量の低下は回復しなかったが、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として ASP 投与により PFC 及び ST における GluN1 の小胞輸送の減少が阻止されたものと考えられた。

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ことから、本モデルはドパミン仮説及びグルタミン酸仮説、或いは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及び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。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

ADL	activities of daily living
AMPA	α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate
AMPH	amphetamine
ANOVA	analysis of variance
ARMS	at risk mental state
ASP	asenapine
BPRS	brief psychotic rating scale
CNS	central nervous system
CSF	cerebrospinal fluid
DALY	disability-adjusted life-years
ERP	event-related potential
GABA	γ -aminobutyric acid
HPC	hippocampus
HPD	haloperidol
iGluR	ionotropic glutamate receptor
i.p.	intraperitoneal administration
METH	methamphetamine
MMN	mismatch negativity
mPFC	medial prefrontal cortex
MRS	magnetic resonance spectroscopy
MSN	medium-sized spiny neuron
NAc	nucleus accumbens
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
PBS	phosphate buffered saline
PCP	phencyclidine
PET	positron emission tomography
PFC	prefrontal cortex
PKA	protein kinase A
PPI	prepulse inhibition
PSD	postsynaptic density
PSD-95	postsynaptic density protein 95

PVDF	polyvinylidene difluoride
QOL	quality of life
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
Sal	saline
s.c.	subcutaneous injection
SPECT	single photon emission computed tomography
SRR	serine racemase
ST	striatum
TBS-T	tris buffered saline with tween 20
WHO	world health organization
YLL	years of life lost

緒言

【統合失調症の経過】

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、多彩な症状を呈し、多くは慢性の経過を辿る。主な症状には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、認知機能障害などがあり、慢性期には陰性症状や認知機能障害が前景に立つが、急性期には陽性症状が増悪する。統合失調症の病因については依然諸説あるが、遺伝的要因と環境要因の両方によって影響を受ける多因子性の神経発達障害であり (Lewis and Lieberman, 2000; Van Os et al., 2010; Carlsson et al., 1997)、罹患者の一卵性の同胞が統合失調症を発症するリスクは 50-80 %である (Sullivan et al., 2003)。

比較的治療反応性の良い初発エピソードで寛解を得られ維持療法として薬物療法を継続していても、統合失調症の自然経過として再燃・急性増悪する事も少なくない。初発エピソードが寛解した後、抗精神病薬の服薬を中止すると 1 年以内に約 80 %、2 年以内に 98 %と高率に再発する一方、服薬を継続していても 5 年以内に約 80 %が再発する (Robinson et al., 1999)。世界保健機関(WHO : world health organization)が疾病負担の指標としている障害調整生存年数(DALY : disability-adjusted life-years)における損失生存年数(YLL : years of life lost)では、疾患が生活障害を引き起こす程度としては全疾患の中で統合失調症の急性期が最大とされる程、生活の質(QOL : quality of life)は大きく障害される (Salomon et al., 2015)。この急性エピソードを反復する内に人格水準が低下し、日常生活動作(ADL : activities of daily living)が障害される場合もある (Harvey and Strassnig, 2012)。又、臨床場面では再燃・急性増悪のエピソードを繰り返す内に次第に難治化する事が多い。統合失調症に罹患し顕在発症した後は、速やかな症状の寛解を図った上で、再燃・急性増悪の予防と早期発見・早期治療が重要となる。

【統合失調症とドパミン】

クロルプロマジンが 1951 年に合成され (Sneader, 2002)、1952 年に精神科治療への有用性が報告された。その後、AMPH がドパミン神経系に作用する事やドパミン受容体作動薬の投与で統合失調症の症状が増悪する事などから統合失調症の病態にドパミン神経系の機能異常の関与が考えられるようになり (van Rossum, 1966)、更に(定型)抗精神病薬のドパミン D₂ 受容体親和性と有効臨床用量が相関する事が明らか

となり(Seeman and Lee, 1975; Seeman and Ulpian, 1983)、次第にドパミン仮説が定着していった。

当初ドパミン神経系の過活動と考えられていた統合失調症の病態だが、(定型)抗精神病薬では陰性症状の改善に乏しい事や治療抵抗性の一群が存在する事、又治療抵抗性統合失調症に有効性が示されたクロザピン(Kane et al., 1988)はドパミン D₂ 受容体への親和性が低い(Vauquelin et al., 2012)事などから、後に中脳辺縁系領域でのドパミン神経系の過活動と PFC でのドパミン神経系の低活動からなるという修正ドパミン仮説が提唱された(Davis et al., 1991; Walter et al., 2009; Pogarell et al., 2012; Brisch et al., 2014)。

近年では、NMDA 受容体や GABA 神経系の機能低下によってグルタミン酸作動性投射ニューロンが脱抑制し、中脳ドパミン神経系へのグルタミン酸の放出が増加する事でドパミン神経系の過活動が惹起される(Howes et al., 2015)という、ドパミン神経系の上流の機構に問題があるとする説が提唱されている。一方で ST におけるドパミン神経系の過活動に関しては、仮説ではなく事実として捉えられるようになってきている(伊藤ら, 2019)。

【統合失調症と覚醒剤精神病】

ヒトが AMPH や METH を反復乱用すると、一般的には数ヶ月の乱用後に、乱用初期には見られない幻覚・妄想を主とする精神病状態(覚醒剤精神病)が出現する。覚醒剤精神病は 1950 年代の METH の乱用の流行を受け本邦で生まれた概念である(Sato, 1992)。統合失調症様の幻覚妄想状態を呈し、覚醒剤の中止と治療により精神病状態は一旦寛解するが、一部は遷延・持続する。又、寛解後も覚醒剤の再使用や飲酒、心理的ストレスなど非特異的ストレスを機に急速に再発し、初回エピソードと同様の病像を呈する(佐藤ら, 1996; Sato, 2002)。更にエピソードを反復する度に再発・再燃脆弱性が高まる。

実験動物に低用量の AMPH や METH を反復投与すると移所運動量と常同行動が増強し、常同行動の発現潜時の短縮(Tadokoro and Kuribara, 1990)や、AMPH 及び METH の少量の急性投与による過活動の惹起が見られる(Robinson and Becker, 1986; Featherstone et al., 2008)。又、AMPH や METH は単回投与より反復投与の方が強固に行動感作を形成しやすく(Featherstone et al., 2007)、連日投与より 1 日以上の間隔で反復投与した方が行動感作を形成しやすい(曾良, 2019)。

この経過が精神病症状の再発・再燃という臨床経過に酷似する事から覚醒剤精神病は統合失調症の再燃・再発のモデルとして捉えられるようになった。モデル動物においても AMPH 及び METH の反復投与により異常行動が惹起されるメカニズムにはドパミン神経系が関与しており(Weidenauer et al., 2017)、これら AMPH 及び METH

への過敏反応性はヒトにおいては逆耐性現象、動物モデルでは行動感作として捉えられる事から、AMPH モデル及び METH モデルは統合失調症の再燃準備状態の神経基盤を探るモデルとして用いられるようになった(曾良, 2019; 橋本ら, 2018)。

統合失調症患者においては、抗精神病薬の中止後に AMPH の投与で精神病症状が増悪する事(Lieberman et al., 1987)、SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)を用いた研究では未服薬の統合失調症患者に AMPH を投与する事で ST のドパミン放出が増加する事やそのドパミン放出の程度が BPRS(Brief Psychotic Rating Scale)の陽性症状尺度の程度と相関する事(Laruelle et al., 1996)などが示されている。

【統合失調症とグルタミン酸 NMDA 受容体】

統合失調症とグルタミン酸又は NMDA 受容体の関連について、臨床場面では種々の報告がなされている。古くは NMDA 受容体遮断薬である PCP の乱用が統合失調症に類似する症状を呈した(Rainey and Crowder, 1975)事に始まり、統合失調症患者の脳脊髄液(CSF : cerebrospinal fluid)のグルタミン酸レベルが著しく低下していた事(Kim et al., 1980)、統合失調症患者では NMDA 受容体遮断薬であるケタミンへの感受性が亢進しておりケタミン投与により精神症状が増悪するが HPD の投与では改善しなかった事(Lahti et al., 1995)、健常者へのケタミン投与により統合失調症に類似した陽性症状、陰性症状、及び認知機能障害を認める事(Lahti et al., 2001; Javitt, 2007)、SPECT 研究では初発未治療の統合失調症患者で左海馬の NMDA 受容体数が減少していた事(Pilowsky et al., 2006)、MR スペクトロスコピー(MRS : magnetic resonance spectroscopy)のメタ分析では一部の脳領域でのグルタミン酸代謝産物の上昇が認められた事(Merritt et al., 2016)、ゲノム研究では統合失調症の発症に NMDA 受容体関連遺伝子である GRIN2A や serine racemase(SRR)が関連している事(Ripke et al., 2014)などが示されている。近年では、抗 NMDA 受容体抗体脳炎で統合失調症に類似した症状を呈する事(Dalmau et al., 2019)や、初発統合失調症の 6.5-9.9 %に抗 NMDA 受容体抗体が陽性であった(Vincent et al., 2011; Steiner et al., 2013)事が報じられている。又、近年では NMDA 受容体遮断薬の一つであるメマンチンによる補助療法が統合失調症の陰性症状や認知機能を改善させる事(Kishi et al., 2018; Zheng et al., 2018)などが注目されている。

統合失調症患者で見られる NMDA 受容体機能異常に基づき、グルタミン酸仮説はドパミン仮説に並び統合失調症の病態仮説の一つとされている(Olney and Farber, 1995; Goff and Coyle, 2001)。又、PCP やケタミンを用いた動物モデルは統合失調症の薬理学モデルである事が示唆されている(Jentsch and Roth, 1999; Frohlich and Van Horn, 2014)。

【NMDA 受容体のサブユニット】

中枢神経系(CNS : central nervous system)において最も重要な興奮性神経伝達物質の一つである L-グルタミン酸(L-glutamate)の受容体には、イオンチャネル型と代謝型がある。その内イオンチャネル型グルタミン酸受容体(iGluR : ionotropic glutamate receptor)は主に中枢神経系のシナプス前細胞及び後細胞の膜上に存在し、更に NMDA 受容体、AMPA(α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate)受容体、カイニン酸(Kainate)型グルタミン酸受容体、デルタ型グルタミン酸受容体に分類される。NMDA 受容体は CNS に広く存在し、記憶や学習などの認知機能や、その基盤となる神経可塑性など高次脳機能の発現や調節に不可欠な役割を果たす。NMDA 受容体はサブユニット組成が異なる複数のサブタイプが存在し、必須サブユニットである 2 つの GluN1 の他、GluN2(GluN2A-2D)と GluN3(GluN3A, 3B)の 7 種のサブユニットの四量体として組み立てられている(Fig. 1)。それぞれのサブユニットは固有の特性を持ち、サブユニットの組成は発達段階や神経活動により変化する(Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Traynelis et al., 2010; Paoletti et al., 2013)。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。



Fig. 1 NMDA 受容体サブユニットの構成の例

【当教室の「病態包括進行モデル」】

決定的な診断法や治療薬がない統合失調症において病態解明は急務であるが、責任器官が脳である為生体検査はほぼ不可能であり、生体レベルの病態解明において生化学的・分子生物学的なアプローチは実験動物を使用せざるを得ないのが現状である。

その為には病態を再現したモデル動物を用いる事が重要である。近年では 20 種を超える統合失調症の動物モデルが開発されていると推定されている(Carpenter and Koenig, 2008)。神経発達モデル、薬理学的モデル、病変モデル、遺伝学的モデルに大別され、そのいくつかは使用される方法論や原理が重複している(Jones et al., 2011)。中でも AMPH 及び METH を用いたモデルは古典的ドパミン仮説を再現する最初の薬理学的モデルとして開発され用いられてきた。

当教室では、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 D₂ 受容体遮断薬への抵抗性の獲得を説明するモデルとして、「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。本モデルは①精神病エピソード時には辺縁系などでドパミンの放出が増加し、その程度が重度な場合にはグルタミン酸の放出増加を伴う、②グルタミン酸の放出増加により NMDA 受容体は脱感作されて機能異常を来し、最終的にグルタミン酸の放出は低下する。③この結果として認知機能障害が生じる他、NMDA 受容体に対して反応性のある(恐らくはドパミン D₂ 受容体遮断薬への反応性が乏しい)病態が出現する。④グルタミン酸の放出増加により AMPA 受容体が繰り返し刺激される事による脳の萎縮性変化、の 4 段階からなる(Abekawa et al., 2008a; 橋本ら, 2018)。

【本研究について】

本研究では統合失調症における病態仮説の一つであるドパミン仮説とグルタミン酸仮説、又それらを統合するものとして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 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し、グルタミン酸作動性神経系の異常と NMDA 受容体のサブユニットの発現量変化との関係を明らかにする。又、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变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 ASP を投与し、定型抗精神病薬の一つである HPD 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、治療効果の機序も明らかにする。

第一章：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

1.1 緒言

本章では過去に当教室で用いてきたプロトコールに従ってモデルラットを作成した上で、行動実験に基づき HPD と ASP の濃度を設定する。

【ハロペリドール(HPD : haloperidol)について】

1958 年に開発された第一世代抗精神病薬(定型抗精神病薬)であり、ブチルフェノン系抗精神病薬に属する。最も多く用いられてきた抗精神病薬の一つであり、他の第一世代抗精神病薬(定型抗精神病薬)と効果は同等である(Dold et al., 2015)。ドパミン D_2 受容体とアドレナリン α_1 受容体への受容体親和性が高く、非定型精神病薬と異なりセロトニン $5-HT_{2A}$ への受容体親和性が相対的に低い。マウスでは HPD 1.0 mg/kg の腹腔内注射でカタレプシー(強硬症、catalepsy)が誘発された(Nishchal et al., 2014)。

【アセナピン(ASP : asenapine)について】

ASP は 2009 年 8 月のアメリカに始まり、「成人における統合失調症および双極 I 型障害に伴う躁病または混合エピソードの急性期治療」の適応で海外では広く用いられてきた。本邦では統合失調症の適応で 2016 年 5 月に発売された非定型抗精神病薬の一つである。セロトニン $5-HT_{2A}$ 、同 $5-HT_{2c}$ 受容体、アドレナリン α_1 、同 α_2 受容体、ヒスタミン H_1 、同 H_2 受容体など種々の受容体への高い親和性を示す一方で、定型抗精神病薬の一つである HPD に匹敵する程ドパミン D_2 受容体への親和性も高い事が特徴的である(Shahid et al., 2009)。消化管での吸収後に肝臓での初回通過効果を強く受け十分な生体利用率が得られない事から、舌下投与により口腔粘膜から吸収させる事で十分な生体利用率を確保する点も特徴的である。又、2019 年 10 月にはアメリカにて同剤の経皮吸収型製剤が承認を取得した(Citrome et al., 2019)。経皮吸収型製剤は 24 時間安定した血中濃度を維持し得る事から良好な有効性及び安全性が期待されている他、貼付の有無や投与量を視認出来る事、食事の影響を受けにくく食生活が不規則な患者や経口投与が困難な患者にも使用可能である事などについて期待されている(Abruzzo et al., 2019)。

ASP はドパミン D_2 受容体の遮断による陽性症状の改善はもとより、ドパミン D_1 受容体とドパミン D_3 受容体の遮断により認知機能や意欲の改善、セロトニン $5-HT_{1A}$ 受容体の刺激により陽性症状や認知機能障害、抑うつや不安の改善、セロトニン $5-HT_{2A}$ 受容体の遮断により陰性症状や睡眠の改善の他、錐体外路症状や血中プロラクチン上

昇の改善、セロトニン 5-HT_{2C} 受容体の遮断により抑うつや不安の改善、セロトニン 5-HT_{6/7} 受容体の遮断により認知機能障害の改善、アドレナリン α_2 受容体の遮断により抑うつや不安の改善などが見込まれる。一方でムスカリン M₁ 受容体への親和性は高くない事から、体重増加や糖脂質代謝異常、抗コリン性副作用は少なく抑えられると見込まれる。ラットへの皮下注射では、有意なカタレプシーを引き起こす ASP の最低用量は 0.5 mg/kg とされている(Frånberg et al., 2008)。

ASP は、治療抵抗性統合失調症に唯一適応を持つクロザピンと受容体親和性が類似しており、クロザピンは mPFC のシナプス前 mGlu3 受容体の活性化を介して MK-801 投与によるグルタミン酸伝達異常を正常化する(Fukuyama et al., 2019)。動物実験では、ASP は背側線条体において MK-801 の NMDA 受容体への結合を減少させた(Tarazi et al., 2009)他、MK-801 投与による異常行動を抑制した(Kołaczkowski et al., 2014)。又、クロザピンと同様にドパミン D₁ 受容体を介して PFC のドパミン放出を増強しグルタミン酸作動性伝達を促進した(Frånberg et al., 2008; Jardemark et al., 2010)他、PCP を反復投与したラットの認知機能低下を改善した(Tarazi and Neill, 2013; Snigdha et al., 2011)という報告がある。以上より ASP は NMDA 受容体に対し保護的に作用する可能性が示されている。

1.2 方法

【動物】

全ての動物実験において、7 週齢の SD(Sprague-Dawley)系雄性ラット(Sankyo Labo Service Corporation)を購入し、北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設内にて用いた。07:00-19:00 までを明期、19:00-07:00 までを暗期に設定し、一定の温度(22~24 °C)及び湿度(40~60 %)に保たれた室内でラットを飼育した。飼育ケージはプラスチック製で、その大きさは 30 cm × 25 cm × 18 cm であり、底にはペパークリール(Japan SLC)を敷き、ステンレス製メッシュで蓋をした。ラットは 1 ケージ当たり 2 匹ずつ飼育した。餌及び水は自由に摂取出来るようにした。入舎から実験及び処置開始前に最低 4 日間ハンドリング(処置馴化)を施行した。全てのラットは 1 回の実験にのみ用いた。

全ての実験は、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程第 7 条第 1 項の規定に基づき、総長より承認をうけた動物実験計画(承認番号:13-0317 及び 17-0086)の一環として行われ、「北海道大学動物実験に関する規定」に従って実施した。

【薬剤】

・ METH

大日本住友製薬株式会社より購入した。滅菌した Sal に溶解し、ラットに投与する際には 1.0 mL/kg の用量に調整した。投与経路は皮下注射を用いた。

・ HPD ・ ASP

HPD(H1512 : Sigma-Aldrich)と ASP(A7861 : Sigma-Aldrich)は共に 0.15 %酒石酸溶液に溶解し、ラットに投与する際には 1.0 mL/kg の用量に調整した。投与経路は腹腔内注射を用いた。

【移所運動量測定】

・ SUPERMEX (自発運動量測定システム)

移所運動量(Locomotion)測定には SUPERMEX (室町機械)を使用した。同装置では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の測定が可能である。データの集録はデータ集録プログラム CompACT AMS Ver.3 (室町機械)によって自動的に行われる。今回の実験では移所運動量測定の 2 時間前にラットを 1 ケージ当たり 1 匹ずつ分け、10 分単位でラットの水平方向の運動量を測定した。

・ 統計解析

行動実験における移所運動量測定結果の比較には、群と時間を独立因子として二元配置反復測定分散分析(Two-way Repeated Measures ANOVA)を用いた。その結果が

有意であった場合、多重比較にはテューキーの多重比較検定(Tukey test)を用いた。グラフは平均値±標準誤差(*SEM*)で示した。有意水準は 0.05 とした。統計比較には JMP Pro 14.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。

【投与スケジュール】

- ・実験 1：ラットの自発運動量への ASP の影響を検討する

ハンドリングの後、ラットを無作為にコントロール(Sal)群、ASP 0.03 mg/kg 群、ASP 0.10 mg/kg 群及び ASP 0.30 mg/kg 群の 4 群に分けて実験を行った。Sal、ASP 0.03 mg/kg、ASP 0.10 mg/kg 及び ASP 0.30 mg/kg をそれぞれ 1 回腹腔内注射し、投与後 120 分間の移所運動量を測定した。

- ・実験 2：METH 2.5 mg/kg 誘発性の移所運動量への ASP の影響を検討する

ハンドリングの後、ラットを無作為にコントロール(Sal-METH 2.5 mg/kg)群、ASP 0.03 mg/kg-METH 2.5 mg/kg 群、ASP 0.10 mg/kg-METH 2.5 mg/kg 群及び ASP 0.30 mg/kg-METH 2.5 mg/kg 群の 4 群に分けて実験を行った。Sal、ASP 0.03 mg/kg、ASP 0.10 mg/kg 及び ASP 0.30 mg/kg をそれぞれ 1 回腹腔内注射し、その 20 分後に METH 2.5 mg/kg をそれぞれ 1 回皮下注射した。腹腔内注射から 240 分間、即ち皮下注射から 220 分間の移所運動量を測定した。

- ・実験 3：HPD の行動感作の形成阻止効果を検討する

ハンドリングの後、ラットを無作為にコントロール(Sal-Sal)群と Sal-METH 群、HPD-Sal 群及び HPD-METH 群の 4 群に分けて実験を行った。Sal 又は HPD 0.1 mg/kg をそれぞれ 1 回腹腔内注射し、その 20 分後に Sal 又は METH 2.5 mg/kg を 1 回皮下注射した。これを隔日 5 回繰り返し、十分な休薬期間(5-8 日)の後に challenge dose として METH 0.15 mg/kg をそれぞれ 1 回皮下注射した。METH 0.15 mg/kg の皮下注射から 120 分間の移所行動量を測定した(Fig. 2)。

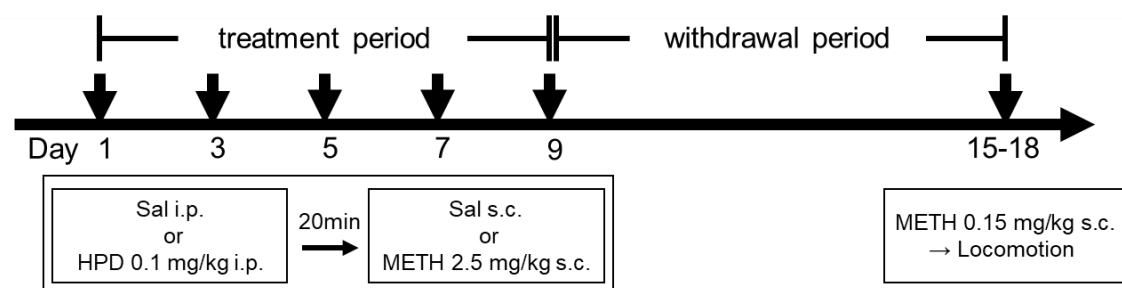


Fig. 2 実験 3 の投与スケジュール

Sal : saline、METH : methamphetamine、HPD : haloperidol

i.p. : intraperitoneal administration、s.c. : subcutaneous injection

・実験 4 : ASP の行動感作の形成阻止効果を検討する

ハンドリングの後、ラットを無作為にコントロール(Sal-Sal)群と Sal-METH 群、ASP-Sal 群及び ASP-METH 群の 4 群に分けて実験を行った。Sal 又は ASP 0.1 mg/kg をそれぞれ 1 回腹腔内注射し、その 20 分後に Sal 又は METH 2.5 mg/kg をそれぞれ 1 回皮下注射した。これを隔日 5 回繰り返す、十分な休薬期間(5-8 日)の後に challenge dose として METH 0.15 mg/kg をそれぞれ 1 回皮下注射した。METH 0.15 mg/kg の皮下注射から 120 分間の移所行動量を測定した(Fig. 3)。

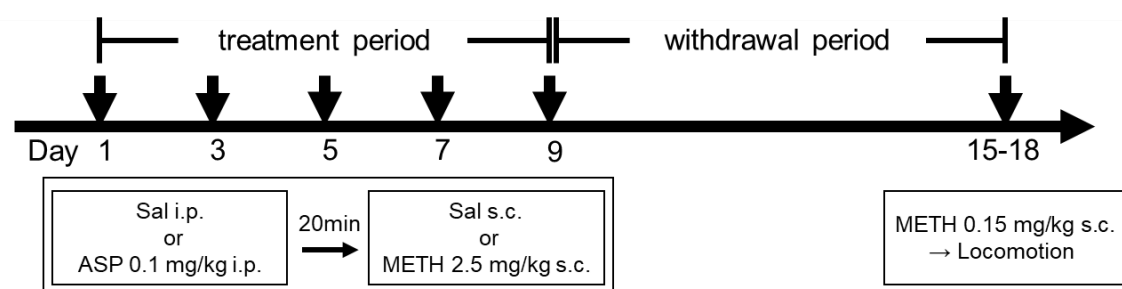


Fig. 3 実験 4 の投与スケジュール

Sal : saline、METH : methamphetamine、ASP : asenapine

i.p. : intraperitoneal administration、s.c. : subcutaneous injection

1.3 結果

- ・実験 1：ラットの自発運動量への ASP の影響を検討する

時間による有意な主効果が示された [$F_{(12, 192)} = 6.50, p < 0.01$] が、薬剤の主効果は有意ではなく [$F_{(3, 16)} = 0.70, p > 0.05$]、時間と薬剤との間の交互作用も有意ではなかった [$F_{(36, 192)} = 0.59, p > 0.05$] (Fig. 4)。ASP は 0.03 mg/kg、0.10 mg/kg 及び 0.30 mg/kg のいずれも Sal 群に対して移所運動量の差は認められず、ラットの自発運動量に影響しなかった。

- ・実験 2：METH 2.5 mg/kg 誘発性の移所運動量への ASP の影響を検討する

薬剤 [$F_{(3, 16)} = 22.864, p < 0.01$] と時間 [$F_{(8, 128)} = 41.134, p < 0.01$] の有意な主効果が示され、薬剤と時間との交互作用 [$F_{(24, 128)} = 2.583, p < 0.01$] も有意であった (Fig. 5)。事後検定 (Tukey test) では、投与後 31-60 分の Sal-METH 群 (** $p < 0.01$)、ASP 0.03-METH 群 (# $p < 0.01$) 及び ASP 0.10-METH 群 (\$ $p < 0.05$) と ASP 0.30-METH 群、投与後 61-90 分の Sal-METH 群 (** $p < 0.01$) 及び ASP 0.03-METH 群 (# $p < 0.05$) と ASP 0.30-METH 群、及び投与後 91-120 分の Sal-METH 群 (** $p < 0.01$) と ASP 0.30-METH 群との間で有意差を認めた (Fig. 5)。

ASP 0.30 mg/kg は Sal-METH 群に対し有意に移所行動量が減少しており過鎮静を来していた。ASP 0.03 mg/kg 及び ASP 0.10 mg/kg はいずれも Sal-METH 群に対して移所運動量の差は認められず、METH 2.5 mg/kg 誘発性の移所運動量に影響しなかった。

- ・実験 3：HPD の行動感作の形成阻止効果を検討する

HPD 0.1 mg/kg 投与がラットの自発運動量と METH 2.5 mg/kg 誘発性の移所運動量に影響を与えない事は当教室の過去の実験で明らかとなっていた (データは示していない)。

薬剤 [$F_{(3, 21)} = 7.44, p < 0.01$] と時間 [$F_{(4, 84)} = 29.05, p < 0.01$] の有意な主効果が示され、薬剤と時間との交互作用 [$F_{(12, 84)} = 3.72, p < 0.01$] も有意であった (Fig. 6)。事後検定 (Tukey test) では、投与後 1-30 分の Sal-Sal 群 (** $p < 0.01$)、HPD-Sal 群 (# $p < 0.05$)、及び HPD-METH 群 (\$ $p < 0.01$) と Sal-METH 群並びに投与後 31-60 分の Sal-Sal 群 (* $p < 0.05$) 及び HPD-METH 群 (\$ $p < 0.05$) と Sal-METH 群との間で有意差を認めた (Fig. 6)。

METH 0.15 mg/kg 投与後 1-30 分と 31-60 分において Sal-Sal 群に対し Sal-METH 群では有意な移所運動量の増加を認めた。投与後 1-30 分と 31-60 分において Sal-Sal 群及び HPD-METH 群の移所運動量は同程度であり、Sal-METH 群に対し有意に移

所運動量が減少していた。

・実験 4 : ASP の行動感作の形成阻止効果を検討する

時間 [$F_{(4, 92)} = 84.717, p < 0.01$] の有意な主効果が示され、薬剤と時間との交互作用 [$F_{(12, 92)} = 1.989, p < 0.05$] も有意であったが、薬剤 [$F_{(3, 23)} = 1.368, p > 0.05$] は有意ではなかった (Fig. 7)。事後検定 (Tukey test) では、投与後 31-60 分の Sal-Sal 群 (* $p < 0.05$) 及び ASP-METH 群 (§ $p < 0.05$) と Sal-METH 群との間で有意差を認めた (Fig. 6)。

METH 0.15 mg/kg 投与後 31-60 分において Sal-Sal 群に対し Sal-METH 群では有意な移所運動量の増加を認めた。投与後 31-60 分において HPD-METH 群の移所運動量は Sal-Sal 群と同程度であり、Sal-METH 群に対し有意に移所運動量が減少していた。

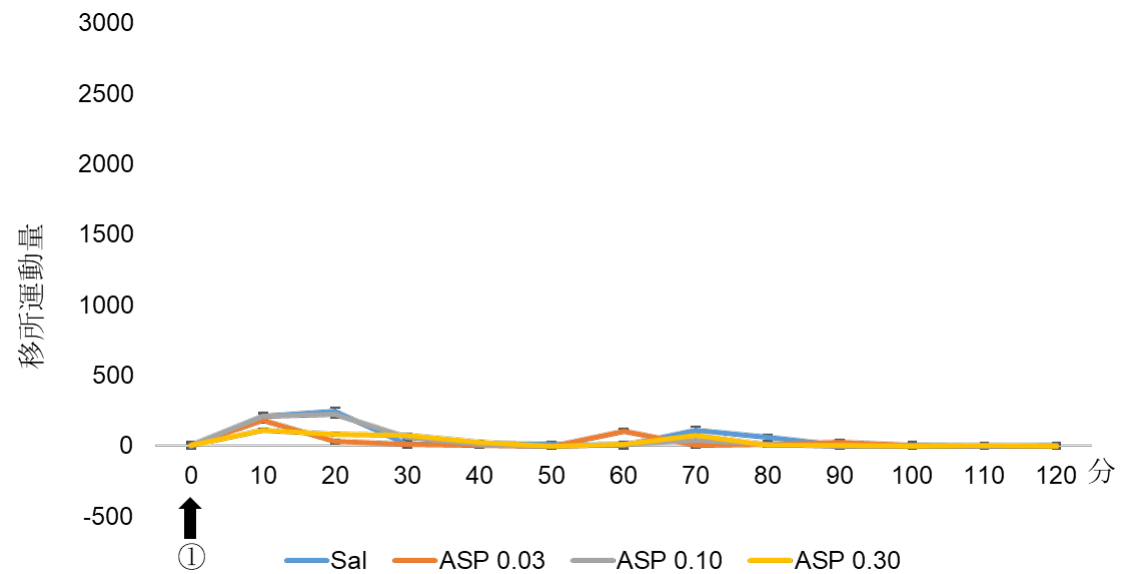


Fig. 4 ラットの自発運動量への ASP の影響

図中① : Sal 又は ASP i.p.

Two-way Repeated Measures ANOVA * $p < 0.05$

平均±標準誤差(SEM)

- Sal $N = 8$
- ASP 0.03 mg/kg $N = 4$
- ASP 0.10 mg/kg $N = 4$
- ASP 0.30 mg/kg $N = 4$

Sal : saline、ASP : asenapine、i.p. : intraperitoneal administration

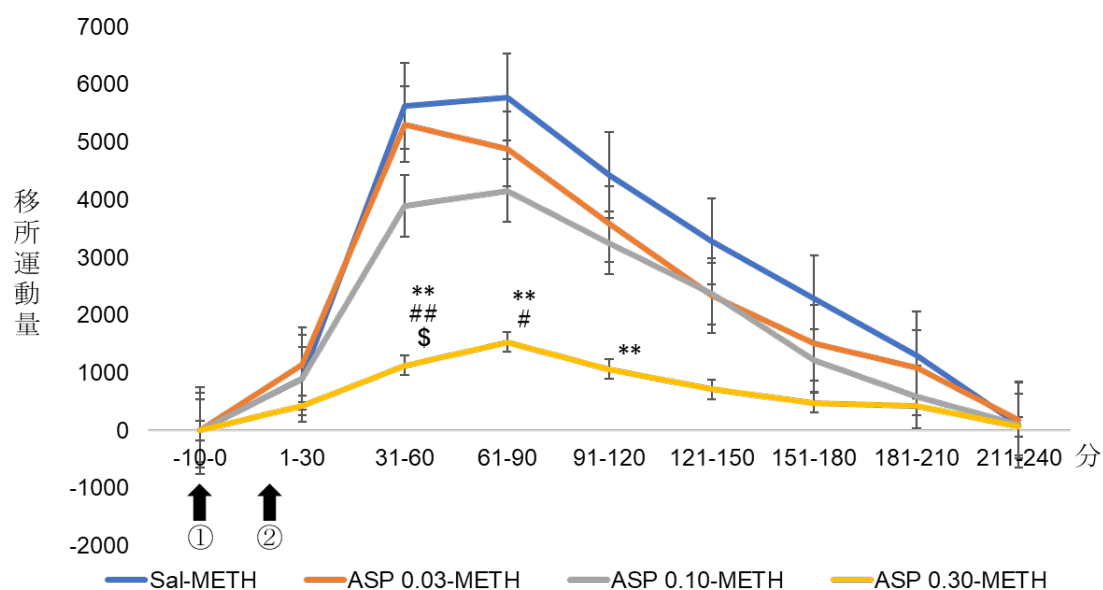


Fig. 5 METH 2.5 mg/kg 誘発性の移所運動量への ASP の影響

図中① : Sal 又は ASP i.p.

図中② : METH 2.5 mg/kg s.c.

Two-way Repeated Measures ANOVA (Tukey Test)

平均±標準誤差(SEM)

* $p < 0.05$, vs. Sal-METH、** $p < 0.01$, vs. Sal-METH

$p < 0.05$, vs. ASP 0.03-METH、## $p < 0.01$, vs. ASP 0.03-METH

\$ $p < 0.05$, vs. ASP 0.10-METH、\$\$ $p < 0.01$, vs. ASP 0.10-METH

■ Sal-METH 2.5 mg/kg	$N = 8$
■ ASP 0.03 mg/kg-METH 2.5 mg/kg	$N = 4$
■ ASP 0.10 mg/kg-METH 2.5 mg/kg	$N = 4$
■ ASP 0.30 mg/kg-METH 2.5 mg/kg	$N = 4$

Sal : saline、METH : methamphetamine、ASP : asenapine

i.p. : intraperitoneal administration、s.c. : subcutaneous injection

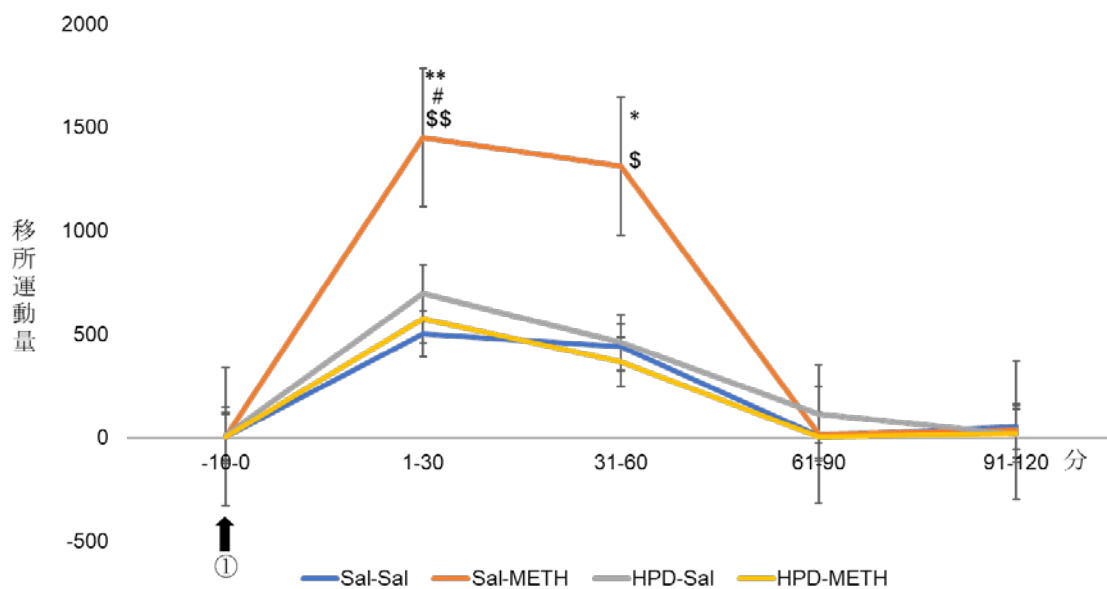


Fig. 6 HPD の行動感作の形成阻止効果

図中① METH 0.15 mg/kg s.c.

Two-way Repeated Measures ANOVA (Tukey Test)

平均±標準誤差(SEM)

* $p < 0.05$, vs. Sal-Sal, ** $p < 0.01$, vs. Sal-Sal

$p < 0.05$, vs. HPD-Sal, ## $p < 0.01$, vs. HPD-Sal

\$ $p < 0.05$, vs. HPD-METH, \$\$ $p < 0.01$, vs. HPD-METH

■ Sal-Sal 群 $N = 7$

■ Sal-METH 群 $N = 6$

■ HPD-Sal 群 $N = 6$

■ HPD-METH 群 $N = 6$

Sal : saline、METH : methamphetamine、HPD : haloperidol

s.c. : subcutaneous injection

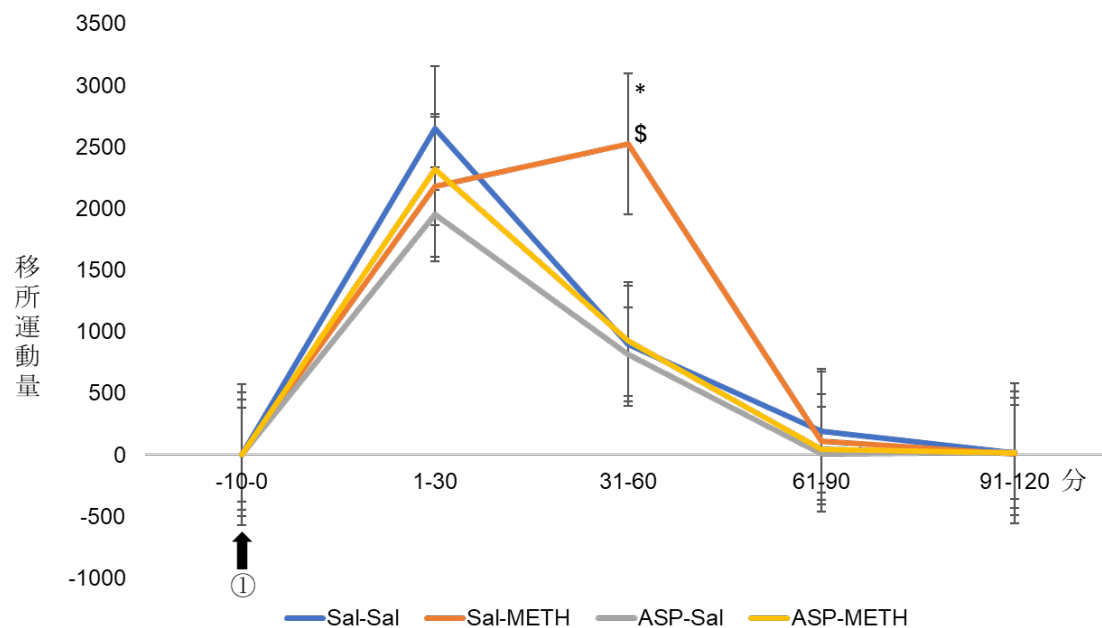


Fig. 7 ASP の行動感作の形成阻止効果

図中① METH 0.15 mg/kg s.c.

Two-way Repeated Measures ANOVA (Tukey Test)

平均±標準誤差(SEM)

* $p < 0.05$, vs. Sal-Sal, ** $p < 0.01$, vs. Sal-Sal

$p < 0.05$, vs. ASP-Sal, ## $p < 0.01$, vs. ASP-Sal

\$ $p < 0.05$, vs. ASP-METH, \$\$ $p < 0.01$, vs. ASP-METH

■ Sal-Sal 群 $N = 6$

■ Sal-METH 群 $N = 7$

■ ASP-Sal 群 $N = 7$

■ ASP-METH 群 $N = 7$

Sal : saline、METH : methamphetamine、ASP : asenapine

s.c. : subcutaneous injection

1.4 考察

実験 1・2 より HPD 0.1 mg/kg 及び ASP 0.1 mg/kg はラットの自発運動量及び METH 誘発性の移所運動量に行動上の影響を与えなかったことから、共に 0.1 mg/kg を用いる事とした(Fig. 4, 5、但し HPD のデータは示していない)。実験 3・4 より METH 0.15 mg/kg 投与後 31-60 分で有意な過活動を認めたことから、本モデルで METH 2.5 mg/kg の反復投与により行動感作が形成される事が示された。又、同じく実験 3・4 より HPD 0.1 mg/kg 及び ASP 0.1 mg/kg の投与で行動感作の形成阻止効果を認めた(Fig. 6, 7)。METH 0.15 mg/kg 投与後の移所運動量の差(Fig. 6, 7)については、行動実験の条件は統一されていたものの実験を行った時期が異なっており、ハンドリングや注射の技術の習熟度の差が行動量に反映されたものと考えられる。

狭いケージ内でラットに METH を投与すると、移所運動量は増加せず常同行動を示す。又、同様に METH を反復投与しても行動感作としての移所運動量の増加は認められず、常同行動を示す context-dependent sensitization (Ohmori et al., 1997)が形成される。本研究ではラットの自発運動量に有意な影響を与えなかったことから、HPD 0.1 mg/kg 及び ASP 0.1 mg/kg による過鎮静は否定的である。又、METH 誘発性の移所運動量に有意な影響を与えなかったことから、過鎮静下での METH の反復投与による context-dependent sensitization も否定的である。

行動感作の形成にはドパミン D₁ 受容体が関与しており(Abekawa et al., 2006)、ST のドパミン D₁ 受容体 / GluN1 複合体が中型有棘神経細胞(MSN : medium spiny neurons)、長期シナプス可塑性、コカインへの運動感作によるドパミン及びグルタミン酸入力統合を制御する(Cahill et al., 2014)。又、確立された行動感作は D₁ 受容体作動薬の投与で回復する(Shuto and Nishi, 2011)。

この実験の結果から HPD と ASP が行動感作の形成を阻止した機序を特定する事は出来ないが、ドパミン D₁ 受容体への親和性(pKi:Ki 値の負の対数値)は ASP が 8.85 ± 0.04 、HPD が 6.29 ± 0.03 とほぼ同等である(Shahid et al., 2009)ことから、これら 2 剤のドパミン D₁ 受容体遮断作用が行動感作の形成を阻止したものと考えられる。

第二章では METH 反復投与による分子生物学的機序(変化)を明らかにする。

第二章：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

2.1 緒言

当教室ではラットへの METH 1.0 mg/kg 及び METH 2.5 mg/kg の反復投与で見られる現象の差異についても検討を重ねてきた。METH 1.0 mg/kg でも MEHT 2.5 mg/kg でも反復投与により行動感作の形成が認められる(Ito et al., 2006a)が、METH 1.0 mg/kg の急性単回投与では PFC と NAc における遅発性のグルタミン酸の放出増加が見られない(Ito et al., 2006b)。又、METH 1.0 mg/kg の反復投与では、グルタミン酸の放出増加を反復する事により惹起されると考えられる MK-801 への交差感作の形成(Ito et al., 2006b)、PPI 障害(Abekawa et al., 2008)及び mPFC におけるアポトーシス(Abekawa et al., 2008)の 3 現象も認められない(Table 1)。

Table 1 METH 反復投与で見られる現象

	METH 1.0 mg/kg	METH 2.5 mg/kg
行動感作の形成(Ito et al., 2006a)	あり	あり
PFC と NAc における急性のドパミン放出の増加 (Ito et al., 2006b; Abekawa et al., 2008)	あり	あり
PFC と NAc における遅発性のグルタミン酸放出の増加 (Ito et al., 2006b; Abekawa et al., 2008)	なし	あり
MK-801 への交差感作の形成(Ito et al., 2006b)	なし	あり
PPI 障害(Abekawa et al., 2008)	なし	あり
mPFC におけるアポトーシス (Abekawa et al., 2008)	なし	あり

上記の通り、過去の実験でドパミン神経機能亢進から NMDA 受容体機能異常へと病態が拡大・変容する可能性を実験的に示してきたが、一方、NMDA 受容体の機能異常は間接的な証明に留まっていた。NMDA 受容体は 7 種のサブユニットの四量体で形成される事から、NMDA 受容体の機能異常とは即ち NMDA 受容体の発現量の低下か NMDA 受容体を構成するサブユニットのパターンの変化か、或いはその併存が考えられる。

プロトコールが若干異なるが、AMPHを反復投与したラットを用いた研究ではPFCにおいてGluN1のmRNA量とタンパク発現量が減少していた(Lu et al., 1999)。但しNMDA受容体サブユニットの量的・質的变化はGluN1のみに留まらないと考えられる。

本章ではNMDA受容体の機能異常の分子生物学機序を明らかにする目的で、PFC・HPC・STにおいて、METHを反復投与した際に見られるNMDA受容体サブユニットの発現の変化を直接的に検討する。

2.2 方法

使用した動物と薬剤は第一章と同様である。

【投与スケジュール】

ハンドリングの後、ラットを無作為にコントロール(Sal)群と METH 群の 2 群に分けて実験を行った。Sal 又は METH 2.5 mg/kg の皮下注射を隔日 5 回繰り返し、十分な休薬期間(5-8 日)の後に脳組織を採取した(Fig. 8)。採取した PFC、HPC、ST の内、右半球を用いて遺伝子発現量を、左半球を用いてタンパク発現量を検討した(後述)。

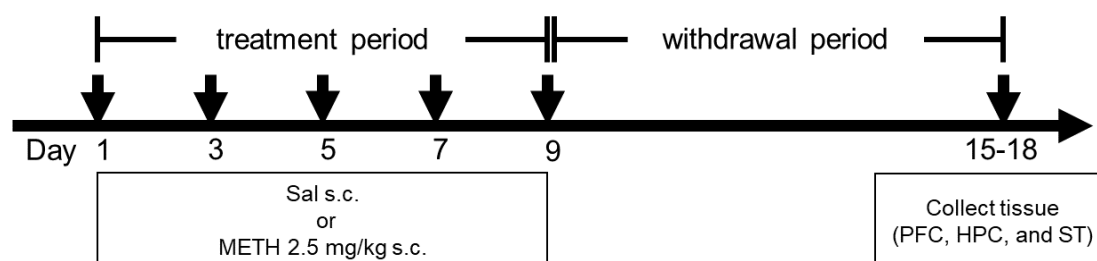


Fig. 8 投与スケジュール

Sal : saline、METH : methamphetamine

PFC : prefrontal cortex、HPC : hippocampus、ST : striatum

【qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)】

・組織採取

ラットを麻酔後、断頭して PFC、HPC 及び ST を採取した。組織採取後、それぞれの部位を RNA later™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific)に浸漬し 4 °C 下にて 24 時間保管した。その後は RNA 抽出を行うまで -80 °C にて凍結保存した。

・Total RNA 精製および cDNA 合成

RNA later™ Stabilization Solution に浸漬後、冷凍保存されていた PFC、HPC 及び ST から SV Total RNA Isolation System (Promega)を用いて total RNA を精製した。精製した total RNA の濃度を Nano Drop 2000C(Thermo Fisher Scientific)によって計測した。PFC、HPC 及び ST はいずれも 500 ng の total RNA を 65 °C で 5 分間インキュベートして RNA の変性反応を行った後、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(東洋紡)の 1×DN Master Mix を加え、37 °C で 5 分間イン

キュベートしてゲノム DNA 除去反応を行った。続いて、ゲノム除去後の total RNA に 1×RT Master Mix II を加え、37 °C で 15 分間、50 °C で 5 分間インキュベートして cDNA を合成した。これらの反応後、98 °C で 5 分間インキュベートして酵素の不活化を行った。これらのインキュベートには Veriti 96 well Thermal Cycler(Thermo Fisher Scientific)を使用し、合成された cDNA は使用するまで-30 °C にて凍結保存した。

・ qRT-PCR

THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix(東洋紡)を用いてSYBR Green法(Morrison et al., 1998)を用いたリアルタイムPCRを行った。初めに1×SYBR green mastermix、1M betaine、1×ROX dye、超純水を混合して反応液を調整した後、0.2 μMプライマーを加えて反応液を完成させ、蛍光色素対応の96穴プレート(FrameStar® FastPlate 96、4titude)に8 μLずつ分注した。希釈したcDNAあるいはネガティブコントロールとして超純水を2 μL加え、1反応10 μLで反応を行った。リアルタイムPCRと融解曲線分析はStepOnePlus Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific)により行った。初期熱変性を95 °Cで1分間行った後、1サイクルが95 °Cで15秒間、60 °Cで1分間を40サイクル反応させた。反応後は融解曲線分析を95 °Cで15秒間、60 °Cで1分間、変化率0.3 °C /秒で95 °Cまで行い、単一生成物であることを確認した。β-Actin(Actb遺伝子)を内在性コントロール遺伝子としたΔΔCT法(Livak and Schmittgen, 2001)により、各遺伝子発現の相対比較を行った。各プライマーのシーケンスは以下に示す通りである(Table 2)。

・ 統計解析

各遺伝子発現量は Wilcoxon rank-sum test により統計比較を行った。グラフは平均値+標準誤差(SEM)で示した。有意水準は 0.05 とした。統計比較には JMP Pro 14.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。

Table 2 プライマーシーケンス

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Grin1(Iwata and Yamamuro, 2016)	TCCAGCTTCAAGAGACGTAGG	CTCTCCCTATGACGGGAACA
Grin2a(Iwata and Yamamuro, 2016)	CTGGAAGAGGCAGATTGACC	TCTTCTCGTTGTGGCAGATG
Grin2b(Iwata and Yamamuro, 2016)	GCATGCCTACATGGGAAAGT	GTTGAGCACAGCTGCATCAT
Grin2c(Muguruma et al., 2007)	GCTGCGGAAGGCTTTTTGT	CTGTCCTTATCGTGCCTTTGTTC
Grin2d(Austin et al., 2015)	GCTGTCTGGGTGATGATGTTTCGTC	TGGATTTCCCAATGGTGAAGGTAGAG
β -actin(Bonefeld et al., 2008)	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAA

qRT-PCR に用いた各プライマーの配列を示す。

【ウェスタンブロッティング】

ラットを麻酔後、断頭して PFC、HPC 及び ST を採取した。採取した各部位の脳組織は、直ちに 1×プロテアーゼ阻害剤カクテル(cOmplete : Roche Diagnostics)を含むシナプトソーム単離試薬(Syn-PER : Thermo Fisher Scientific)を用いて、ガラスホモジナイザーによりホモジナイズした。ホモジネートを 4 °C 下で 10 分間、1200×G で遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、4 °C 下で 20 分間、15000×G で遠心分離した。遠心分離後、上清は細胞質基質分画として -80 °C にてタンパク質分析を行うまで保管した。上清を除去した後に残ったペレットを 1×PBS で再懸濁し、これをシナプトソーム分画として -80 °C にてタンパク質分析を行うまで保管した。

細胞質分画及びシナプトソーム分画から各分画に 1 %となるようにサルコシンナトリウム塩を加えてタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質の濃度を BCA タンパク質アッセイ(Thermo Fisher Scientific)を用いて定量した。各タンパク質サンプルに 6×SDS-PAGE ローディングバッファー(SDS-PAGE Sample Loading Buffer [6X] : G-Biosciences)を 1×となるように加え、これをウェスタンブロッティングに用いるタンパク質サンプルとした。細胞質基質分画は各サンプル 10 µg、シナプトソーム分画は各サンプル 2 µg をゲル(4-15 % Mini-PROTEAN® TGX™ : Bio-Rad)を用いて定電圧 200 V にて 30 分間電気泳動を行うことで分子量毎に分離した。電気泳動の後、TG transfer buffer (25 mM トリス塩基、192 mM グリシン、20 %メタノール)中でポアサイズが 0.2 µm のポリフッ化ビニリデン膜(PVDF、Amersham Hybond P PVDF 0.2 : GE Healthcare Life Science)に定電圧 100 V にて 1 時間電気泳動することにより転写した。転写後の PVDF メンブレンを、TBS-T(0.5 % Tween 20 を含むトリス緩衝生理食塩水)で余剰なトランスファーバッファーを除去した後、ブロッキングバッファー(TBS-T、2 %(v/v) スキムミルク(雪印))に浸し 4 °C で一晩静置しブロッキングを行った。この後、TBS-T で 1 回洗浄し、1 次抗体を TBS-T でそれぞれ抗体により適度な濃度となるように希釈したものに置き換えて、室温で 1 時間振盪した。尚、1 次抗体は GluN1 には Anti-NMDAR1 抗体 [EPR2481(2)] (ab109182 : abcam)を TBS-T と等量のブロッキングバッファーで 1/500 に希釈したものを、βactin は抗 β-Actin モノクローナル抗体(富士フイルム和光純薬)を TBS-T と等量のブロッキングバッファーで 1/1000 に希釈したものをを用いた。1 次抗体反応後のメンブレンを TBS-T で 3 回リンスし、その後、TBS-T 中で 5 分間メンブレンを振盪し、さらに TBS-T を交換し合計 3 回震盪することで余剰な一次抗体を除去した。洗浄したメンブレンを、2 次抗体である Horseradish Peroxidase Linked Whole Antibody from donkey (Amersham Biosciences)の Rabbit IgG もしくは Mouse IgG を TBS-T と等量のブロッキングバッファー(TBS-T、2 %(v/v) スキムミルク(雪印))にて 1/50000 に希釈した液に浸し、室温で 1 時間振盪した。2 次抗体反応後のメンブレンを TBS-T で 3 回リンスし、その後、TBS-T 中で 5 分間メンブレンを振盪し、さらに TBS-T を交換し合計 3 回震盪することで余剰な一次抗体を除去した。メンブレンを発光基質であるイムノスターLD (富士フイルム和光純薬)と反応させ、室温で 5 分間静置してから

ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Science)を用いて、撮像を行った。

- ・統計解析

撮像後のイメージから GluN1 及び β actin のシグナルを ImageJ (National Institutes of Health)で計測し、各検体の GluN1 のシグナル値を β actin のシグナル値で除した値を用いて Wilcoxon rank-sum test により統計比較を行った。グラフは平均値+標準誤差(*SEM*)で示した。有意水準は 0.05 とした。統計比較には JMP Pro 14.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。

2.3 結果

【qRT-PCR の結果】

NMDA 受容体サブユニットの遺伝子発現量は、コントロール(Sal)群と比較して METH 群では PFC の Grin1 (Fig. 9A; $Z = 3.17$, $p = 0.0015$)・Grin2c (Fig. 9A; $Z = 2.31$, $p = 0.0207$)、HPC の Grin1 (Fig. 9B; $Z = 2.15$, $p = 0.0315$)・Grin2a (Fig. 9B; $Z = 2.67$, $p = 0.0076$)、ST の Grin1 (Fig. 9C; $Z = 2.95$, $p = 0.0032$)・Grin2b (Fig. 9C; $Z = 2.55$, $p = 0.0108$)・Grin2d (Fig. 9C; $Z = 2.09$, $p = 0.0364$) が有意に減少していた。

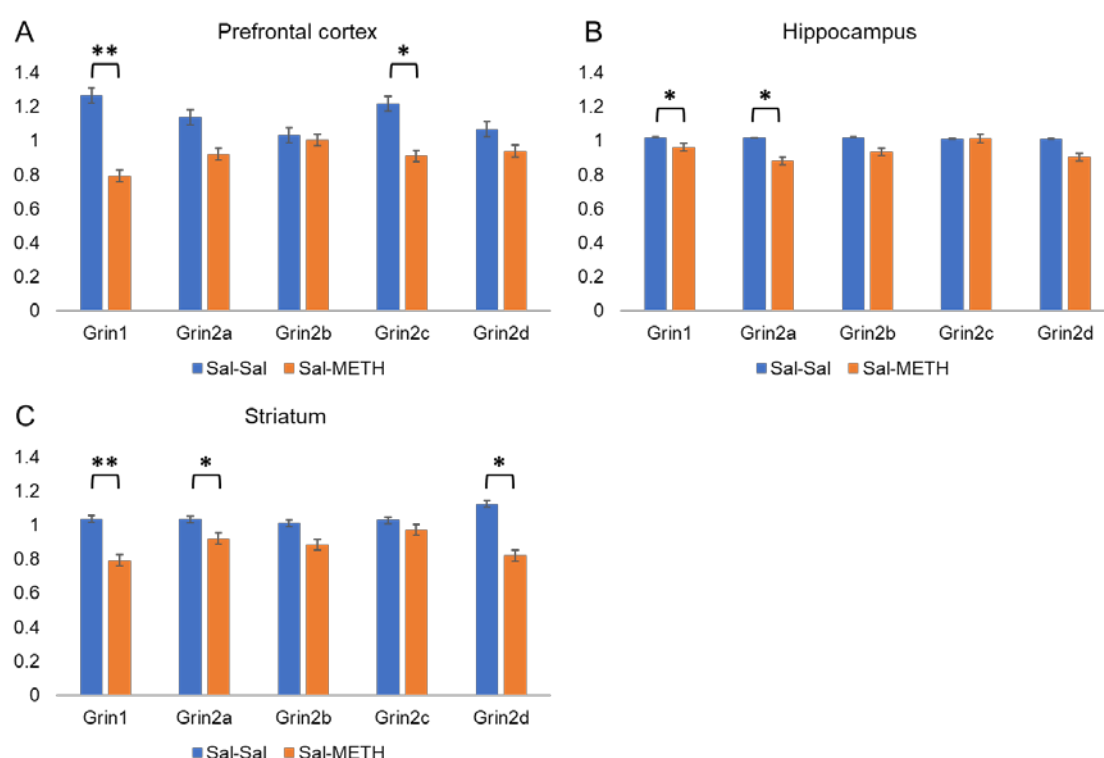


Fig. 9 NMDA 受容体サブユニットの遺伝子発現量

Wilcoxon rank-sum test (Bonferroni correction) * $p < 0.05$ ** $p < 0.0033$
平均±標準誤差(SEM) ($N = 30$)

A. PFC

Grin1 $Z = 3.17$, $p = 0.0015$

Grin2a $Z = 1.94$, $p = 0.0519$

Grin2b $Z = 0.23$, $p = 0.8187$

Grin2c $Z = 2.31$, $p = 0.0207$

Grin2d $Z = 1.34$, $p = 0.1809$

B. HPC

Grin1 $Z = 2.15$, $p = 0.0315$

Grin2a $Z = 2.67$, $p = 0.0076$
Grin2b $Z = 1.26$, $p = 0.2062$
Grin2c $Z = 1.54$, $p = 0.1224$
Grin2d $Z = 1.77$, $p = 0.0773$

C. ST

Grin1 $Z = 2.95$, $p = 0.0032$
Grin2a $Z = 1.66$, $p = 0.0963$
Grin2b $Z = 2.55$, $p = 0.0108$
Grin2c $Z = 1.43$, $p = 0.1537$
Grin2d $Z = 2.09$, $p = 0.0364$

NMDA : *N*-methyl-D-aspartate、Sal : saline、METH : methamphetamine
PFC : prefrontal cortex、HPC : hippocampus、ST : striatum

PFC と ST において、NMDA 受容体の必須サブユニットである GluN1 をコードする *Grin1* 遺伝子がボンフェローニの補正後も有意に減少していた(Fig. 9A, 9C)。この結果に基づき、次いで PFC と ST における GluN1 のタンパク発現量をウェスタンブロッティングにより検討した。

【ウェスタンブロッティングの結果】

GluN1 のタンパク発現量は、コントロール(Sal)群と比較して METH 群では PFC の細胞質基質分画(Fig. 10A; $Z = 2.11$, $p = 0.0351$)とシナプトソーム分画(Fig. 10A; $Z = 1.97$, $p = 0.0488$)で共に有意に減少していた。

ST の細胞質基質分画でもコントロール群と比較して METH 群では GluN1 が有意に減少していた(Fig. 10B; $Z = 2.57$, $p = 0.0102$)ものの、シナプトソーム分画では有意差はなかった(Fig. 10B; $Z = 0.78$, $p = 0.4357$)。

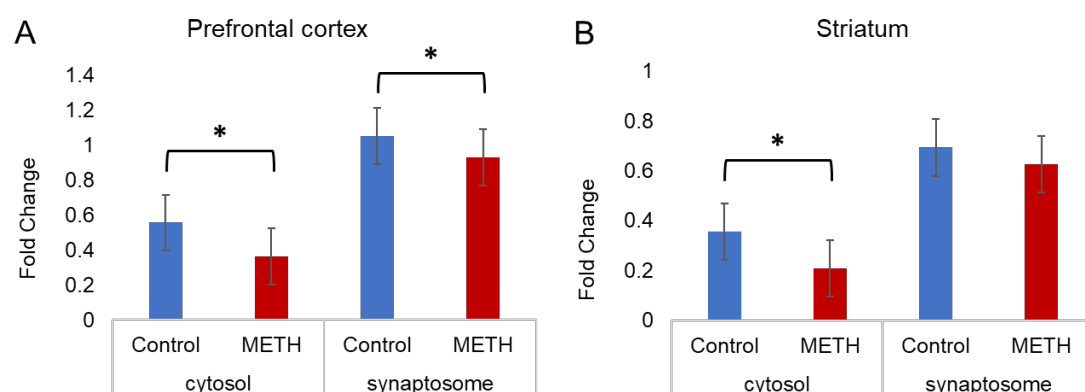


Fig. 10 NMDA 受容体サブユニットのタンパク発現量

Wilcoxon rank-sum test * $p < 0.05$

平均±標準誤差(SEM) ($N = 11-12$)

A. PFC

cytosol $Z = 2.11$, $p = 0.0351$

synaptosome $Z = 1.97$, $p = 0.0488$

B. ST

cytosol $Z = 2.57$, $p = 0.0102$

synaptosome $Z = 0.78$, $p = 0.4357$

NMDA : *N*-methyl-D-aspartate、Sal : saline、METH : methamphetamine

PFC : prefrontal cortex、HPC : hippocampus、ST : striatum

cytosol : 細胞質基質分画、synaptosome : シナプトソーム分画

2.4 考察

qRT-PCR の結果より、PFC、HPC 及び ST の全ての部位で必須サブユニットである GluN1 の遺伝子発現量が減少していた(Fig. 9)事から、NMDA 受容体の産生やシナプス後膜への発現も減少していると考えられる。ウェスタンブロッティングでも PFC 及び ST における細胞質基質分画の GluN1 のタンパク発現量の減少が確認出来た(Fig. 10)。本研究では NMDA 受容体機能異常が NMDA 受容体の内在化によるものかどうかを検討する為に細胞質基質分画とシナプトソーム分画に分けてタンパク発現量を検討したが、本研究の結果からは NMDA 受容体の内在化の関与は小さいと考えられる。特に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 が考えられる。又、上記の NMDA 受容体の発現の減少が、MK-801 への交差感作の形成、PPI 障害及び mPFC におけるアポトーシスの一因になっている可能性がある(Table 1)。

特に PPI 障害については GluN1(Inada et al., 2003; Brody et al., 2005; Fitzgerald and Pickel, 2018)、GluN2A(Spooren et al., 2004; Brody et al., 2005)、GluN2B(Takeuchi et al., 2001; Spooren et al., 2004; Brody et al., 2005; Brody et al., 2005; Hokyo et al., 2010)、GluN2C 及び GluN2D(Suryavanshi et al., 2014)、GluN3A(Brody et al., 2005)など、NMDA 受容体サブユニットと PPI の障害や回復との関連の報告は多い。MK-801 への交差感作の形成や mPFC におけるアポトーシスの機序については本研究の結果からは言及出来ず、今後の研究課題である。

本研究で用いたモデルでは、グルタミン酸放出増加によるダウンレギュレーションにより、GluN1 の産生量の低下及び小胞輸送(intracellular trafficking)の低下のいずれか或いはその両方が起きていると考えられる。小胞体で産生された NMDA 受容体は小胞によりゴルジ体へ輸送される。その後糖鎖修飾を受けて細胞表面に輸送されるが、この過程に異常がある膜タンパクは小胞体に貯留され、後に分解系に回る。グルタミン酸受容体は総量の 40-50 %がゴルジ体において見られる複雑型糖鎖修飾を受けていない事から、大半は小胞体に貯留されていると考えられる(Yuzaki, 2007; Horak et al., 2014; Lee and Zhou, 2019)。本研究では、PFC では細胞質基質分画とシナプトソーム分画共に GluN1 のタンパク発現量が減少していた事から、GluN1 の小胞輸送及びシナプス後膜での発現が共に減少していると考えられる。一方、ST では細胞質基質分画では GluN1 のタンパク発現量が有意に減少していたがシナプトソーム分画では有意差がなかった事から、ST では PFC と比較して小胞体に貯留されていた GluN1 が多かったか、小胞輸送能が高く GluN1 の産生量が減少していてもシナプス後膜の発現への影響を抑えられる機構が備わっていた為と考えられる(Fig. 10)。GluN1 を含む NMDA 受容体のサブユニットの貯蔵能や小胞輸送能の差によって、発現する NMDA 受容体への METH 反復投与の影響は脳の部位間でタイムラグがある事が考えられる。今回の PFC 及び ST の差がいずれによるものか判断出来ない点が本研究の限界である。脳の各部位での NMDA 受容体の産生量・

貯蔵量と小胞輸送について更に検討が必要である。

又、GluN1 ノックダウンマウスは統合失調症のモデル動物として用いられている。GluN1 が正常に対して 5 %から 10 %しか発現しないノックダウンマウス(Mohn et al., 1999)や、GluN1 の発現が 30 %減少するヘテロ接合体(GluN1 +/-)マウス(Duncan et al., 2004)において、自発運動量の増加、PPI 障害及び社会性行動活動の低下などが認められている。ヘテロ接合体(GluN1 +/-)マウスの事象関連電位(ERP : event-related potential)では注意に関連しない感覚情報自動処理関連電位であるミスマッチ陰性電位(MMN : mismatch negativity)の振幅が減衰していた。ヘテロ接合体(GluN1 +/-)マウスは統合失調症の再発・再燃脆弱性を最も鋭敏に反映していると言われている(Featherstone et al., 2015)。又、GluN2A ノックアウトマウス(Miyamoto et al., 2001)では自発運動量増加の他、潜在学習を反映する水探索試験や連合学習を反映する恐怖条件付け学習で、統合失調症に関連する行動異常や認知機能障害を認められている。GluN1 ノックダウンマウスに対するジアゼパム投与で社会的行動と外側中隔の神経系の活性化を示した(Mielnik et al., 2014)他、NMDA 受容体サブユニットの再発現または過剰発現により行動障害などの NMDA 受容体機能異常が改善する可能性が示唆されている(Lee and Zhou, 2019)。

統合失調症患者の死後脳研究では、健常者と比較してPFCのGluN1及びGRIN1(Catts et al., 2015; Weickert et al., 2013)、GluN2A及びGRIN2A(Errico et al., 2013)、GRIN2C(Weickert et al., 2013; Akbarian et al., 1996)、HPCのGRIN1(Law and Deakin, 2001; Gao et al., 2000)の減少などが報告されている。尚、生涯の抗精神病薬内服量(クロルプロマジン換算量)とPFCにおけるNMDA受容体サブユニットのmRNA発現量及びGluN1タンパク発現量の間に相関はなかった(Weickert et al., 2013)。メタ解析では対照群と比較してPFCにおけるGluN1 mRNAの減少のエフェクトサイズは-0.64 (95%信頼区間 : -1.08~-0.20)、GluN1タンパクの減少のエフェクトサイズは-0.44 (95%信頼区間 : -0.80~-0.07)であった(Catts et al., 2016)。統合失調症患者でもERPの内MMNの振幅の減衰は繰り返し報告されており、そのeffect sizeは0.9を超える。又、精神病発症危険状態(ARMS : at risk mental state)であっても、統合失調症非発症群に対し統合失調症発症群ではMMNが減衰するという報告もある(Erickson et al., 2016)。

本モデルで見られた NMDA 受容体サブユニット構成の変化は統合失調症患者の死後脳の変化と合致する点があり、本モデルは統合失調症の NMDA 受容体機能異常の一部を反映していると考えられる。

第三章では本モデルにおける抗精神病薬の効果について検討する目的で、HPD 0.1 mg/kg 及び ASP 0.1 mg/kg を投与し、その分子生物学的機序(変化)を明らかにする。

第三章: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

3.1 緒言

統合失調症患者は初回エピソードから数年間が、治療抵抗性、認知機能障害及び脳萎縮といった 3 様態の病態進行が最も顕著に見られる時期(critical period)と考えられる(安倍川ら, 2009)。当教室では、本モデルにおける非定型抗精神病薬の投与による NMDA 受容体機能の回復過程についても検討を重ね、非定型抗精神病薬の投与によって本モデル上の NMDA 受容体機能異常を阻止し得る事を示し、早期の治療介入の重要性を提唱してきた。

非定型抗精神病薬であるオランザピン(Abekawa et al., 2008b)、リスペリドン(Abekawa et al., 2008b)、クエチアピン(Ito et al., 2010)、アリピプラゾール(Abekawa et al., 2011)や、定型抗精神病薬である HPD(Abekawa et al., 2011)、気分安定薬であるバルプロ酸(Ito et al., 2006)やラモトリギン(Nakato et al., 2010; Nakato et al., 2011)は、用量関連性に METH 2.5 mg/kg 単回投与による mPFC でのグルタミン酸放出増加を阻止或いは顕著に抑制した。ドパミン D₁ 受容体遮断作用を持つ SCH-23390(Schering)でも同様の結果が得られている(Ito et al., 2006b)。又、これに関連して、これらの向精神病薬を METH と併用して反復投与すると、MK-801 への交差感作、PPI 障害の形成及び mPFC でのアポトーシスの誘導が阻止された。クロナゼパムはベンゾジアゼピン受容体刺激に連動する GABA 系神経伝達促進により、残存する PPI 障害を回復させたものと考えられる(Abekawa et al., 2012) (次頁 Table 3)。

Table 3 本モデルにおける各種向精神薬の効果

	MK-801 への 交差感作の形成	PPI 障害 形成	mPFC における アポトーシス誘導	
			METH と併用	Sal と併用
アリピプラゾール (Abekawa et al., 2011)	阻止	阻止	阻止	なし
オランザピン (Abekawa et al., 2008b)	阻止	阻止	阻止	なし
クエチアピン (Ito et al., 2010)	データなし	阻止	阻止	なし
リスペリドン (Abekawa et al., 2008b)	阻止	阻止	阻止	なし
ハロペリドール (Abekawa et al., 2011)	阻止	阻止	阻止	誘導
バルプロ酸 (Ito et al., 2006c)	阻止	阻止	阻止	なし
ラモトリギン (Nakato et al., 2010) (Nakato et al., 2011)	阻止	阻止	阻止	なし
クロナゼパム (Ito et al., 1997)	阻止	阻止	阻止	なし

本章では、第二章で見られた METH 2.5 mg/kg 反復投与による NMDA 受容体のサブユニットの遺伝子発現量及びタンパク発現量の減少が抗精神病薬の投与により阻止し得るかどうか、又非定型抗精神病薬(ASP)と定型抗精神病薬(HPD)の薬効の差異についても検討する。

3.2 方法

【投与スケジュール】

ハンドリングの後、ラットを無作為にコントロール(Sal-Sal)群、Sal-METH 群、HPD-Sal 群、HPD-METH 群、ASP-Sal 群及び ASP-METH 群の 6 群に分けて実験を行った。Sal、HPD 0.1 mg/kg 又は ASP 0.1 mg/kg をそれぞれ 1 回腹腔内注射し、その 20 分後に Sal 1.0 mL/kg 又は METH 2.5 mg/kg をそれぞれ 1 回皮下注射した。これを隔日 5 回繰り返し、十分な休薬期間(5-8 日)の後に組織を採取した(Fig. 11)。採取した PFC、HPC 及び ST の内、右半球を用いて遺伝子発現量を、左半球を用いてタンパク発現量を検討した。

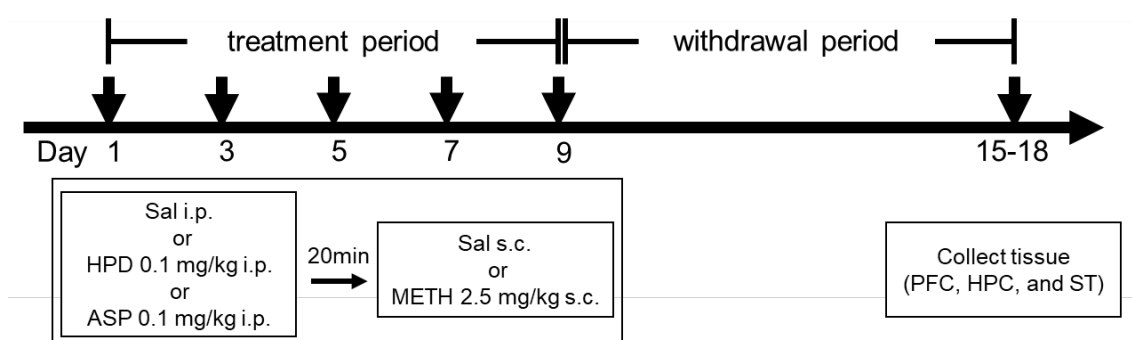


Fig. 11 投与スケジュール

Sal : saline、METH : methamphetamine

HPD : haloperidol、ASP : asenapine

i.p. : intraperitoneal administration、s.c. : subcutaneous injection

PFC : prefrontal cortex、HPC : hippocampus、ST : striatum

使用した動物と薬剤は第一章、qRT-PCR とウェスタンブロッティングの方法は第二章と同様である。

3.3 結果

【qRT-PCR の結果】

NMDA 受容体サブユニットの遺伝子発現量は、コントロール(Sal-Sal)群と比較して Sal-METH 群では PFC の Grin1 (Fig. 12; $F_{(5, 170)} = 2.92$, $p = 0.0147$)及び ST の Grin1 (Fig. 14; $F_{(5, 169)} = 2.45$, $p = 0.0355$)が有意に減少していた。HPC の Grin1 では有意な変化は見られなかった(Fig. 13; $F_{(5, 171)} = 0.89$, $p = 0.4918$)。事後検定(Dunnett test)では、PFC の Sal-Sal 群と Sal-METH 群($p = 0.0106$)、ST の Sal-Sal 群と Sal-METH 群($p = 0.0145$)との間に有意差を認めた。

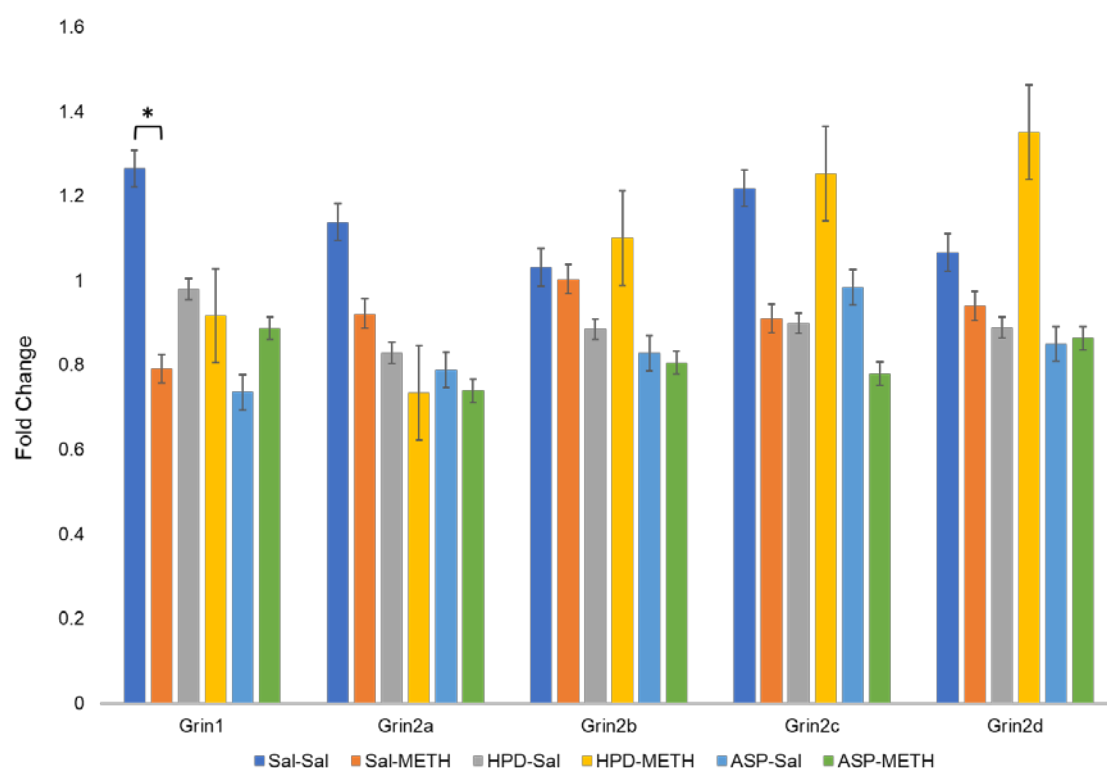


Fig. 12 PFC における NMDA 受容体サブユニットの遺伝子発現量
One-way ANOVA (Dunnett test vs. Sal-METH) * $p < 0.05$
平均±標準誤差(SEM) ($N = 27-31$)。

Grin1 $F_{(5, 170)} = 2.92$, $p = 0.0147$

Grin2a $F_{(5, 170)} = 5.35$, $p = 0.0001$

Grin2b $F_{(5, 170)} = 0.64$, $p = 0.6730$

Grin2c $F_{(5, 170)} = 0.75$, $p = 0.5893$

Grin2d $F_{(5, 170)} = 0.76$, $p = 0.5783$

PFC : prefrontal cortex、NMDA : *N*-methyl-D-aspartate

Sal : saline、METH : methamphetamine、HPD : haloperidol、ASP : asenapine

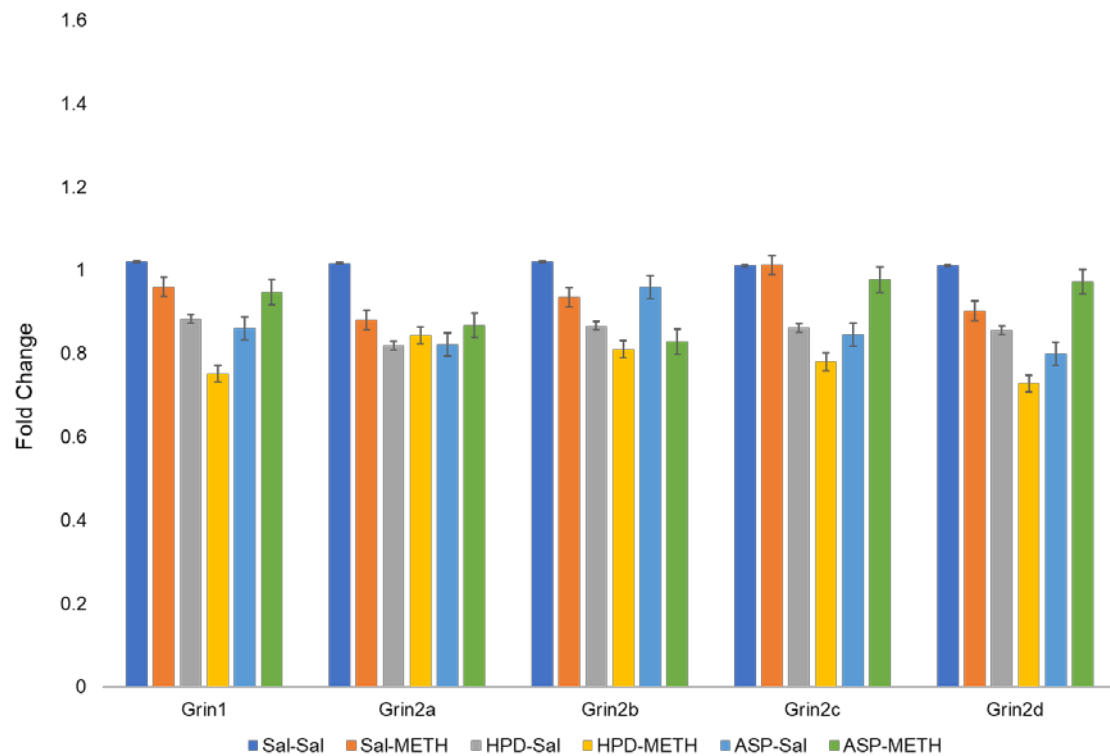


Fig. 13 HPC における NMDA 受容体サブユニットの遺伝子発現量
One-way ANOVA (Dunnett test vs. Sal-METH) * $p < 0.05$
平均±標準誤差(SEM) ($N = 27-31$)。

Grin1 $F_{(5, 171)} = 0.89, p = 0.4918$

Grin2a $F_{(5, 171)} = 1.15, p = 0.3376$

Grin2b $F_{(5, 171)} = 1.55, p = 0.1770$

Grin2c $F_{(5, 171)} = 1.04, p = 0.3954$

Grin2d $F_{(5, 171)} = 0.64, p = 0.1521$

HPC : hippocampus、NMDA : *N*-methyl-D-aspartate

Sal : saline、METH : methamphetamine、HPD : haloperidol、ASP : asenapine

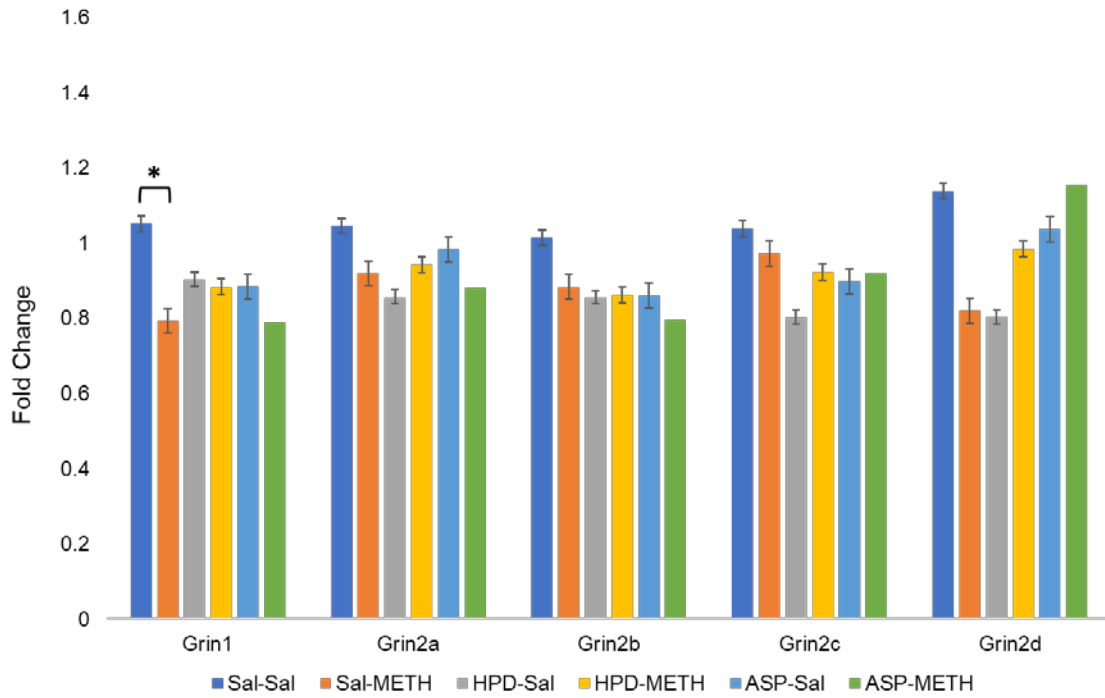


Fig. 14 STにおけるNMDA受容体サブユニットの遺伝子発現量
One-way ANOVA (Dunnett test vs. Sal-METH) * $p < 0.05$
平均±標準誤差(SEM) ($N = 27-31$)。

Grin1 $F_{(5, 169)} = 2.45, p = 0.0355$

Grin2a $F_{(5, 169)} = 0.54, p = 0.7488$

Grin2b $F_{(5, 169)} = 3.30, p = 0.0071$

Grin2c $F_{(5, 169)} = 0.89, p = 0.4870$

Grin2d $F_{(5, 169)} = 0.75, p = 0.5894$

ST : striatum、NMDA : *N*-methyl-D-aspartate

Sal : saline、METH : methamphetamine、HPD : haloperidol、ASP : asenapine

【ウェスタンブロッティングの結果】

GluN1 のタンパク発現量は、PFC の細胞質基質分画(Fig. 15A; $F_{(5, 60)} = 2.42$, $p = 0.0463$)で有意差を認めた。事後検定(Tukey test)では、PFC の細胞質基質分画で Sal-Sal 群と Sal-METH 群の間(Fig. 15A; $p = 0.0491$)、Sal-METH 群と ASP-METH 群の間(Fig. 15A; $p = 0.0280$)に有意差を認めた。PFC のシナプトソーム分画では有意な変化を認めなかった(Fig. 15B; $F_{(5, 66)} = 1.37$, $p = 0.2468$)。

ST の細胞質基質分画(Fig. 16A; $F_{(5, 66)} = 4.83$, $p = 0.0008$)で有意差を認めた。事後検定(Tukey test)では、ST の細胞質基質分画で Sal-METH 群と ASP-METH 群の間(Fig. 16A; $p = 0.0001$)で有意差を認めた。ST のシナプトソーム分画では有意な変化を認めなかった(Fig. 16B; $F_{(5, 66)} = 0.38$, $p = 0.8575$)。

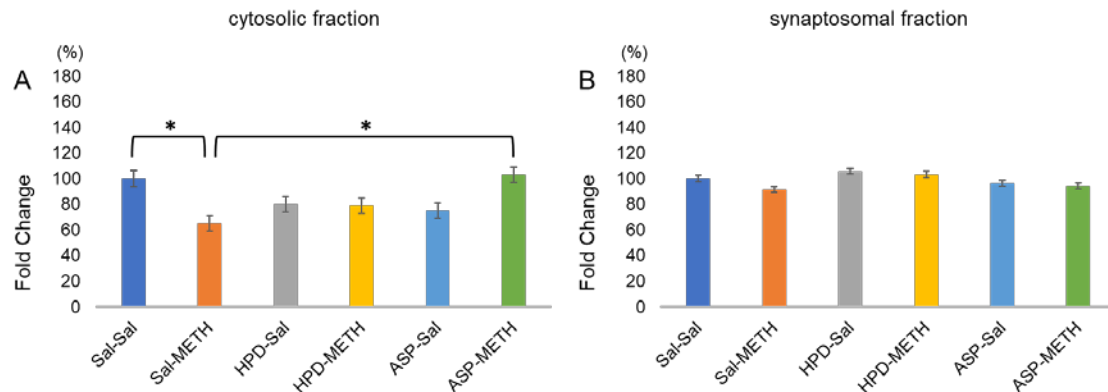


Fig. 15 PFC における NMDA 受容体サブユニットのタンパク発現量

図中 A : cytosolic fraction : 細胞質基質分画

図中 B : synaptosomal fraction : シナプトソーム分画

One-Way ANOVA (Dunnett test vs. Sal-METH) * $p < 0.05$

平均±標準誤差(SEM) ($N = 11$)

PFC : prefrontal cortex、NMDA : *N*-methyl-D-aspartate

Sal : saline、METH : methamphetamine、HPD : haloperidol、ASP : asenapine

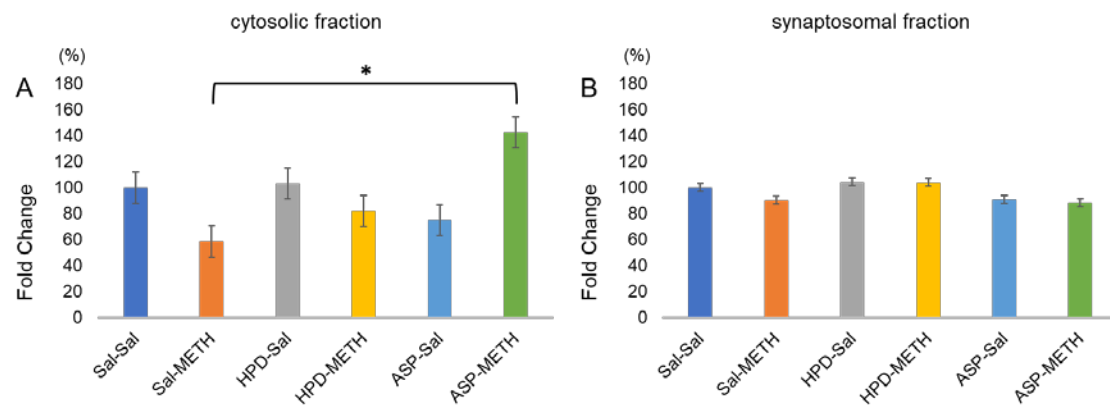


Fig. 16 STにおけるNMDA受容体サブユニットのタンパク発現量

図中 A : cytosolic fraction : 細胞質基質分画

図中 B : synaptosomal fraction : シナプトソーム分画

One-Way ANOVA (Dunnett test vs. Sal-METH) * $p < 0.05$

平均±標準誤差(*SEM*) ($N = 12$)

PFC : prefrontal cortex、NMDA : *N*-methyl-D-aspartate

Sal : saline、METH : methamphetamine、HPD : haloperidol、ASP : asenapine

3.4 考察

抗精神病薬を用いた 6 群比較でも PFC と ST の Grin1 の発現量の減少や PFC の細胞質基質分画での GluN1 の発現量の減少が明らかとなった。又、PFC 及び ST の細胞質基質分画では ASP-METH 群において GluN1 の発現量の減少を阻止した(Fig. 15, 16)。但し ASP-Sal 群では GluN1 の発現量は変わらなかったことから、ASP 及び METH の相互作用により GluN1 の小胞輸送能が変化した可能性がある。

ラットにHPD 1mg/kgを14日間反復投与するとPFCのGluN1及びGluN2Aの発現が減少するが、GluN2Bの発現は変化しなかった。又、同様にオランザピン 2 mg/kgを1日2回14日間反復投与してもPFCのGluN1、GluN2A及び GluN2Bの発現はいずれも変化しなかった。HPD反復投与後のNMDA受容体の発現の減少は、PSD-95 (postsynaptic density protein 95)の発現も減少するという報告によって裏付けられている。PSD-95はシナプス後部の主要な足場タンパク質であり、シナプス後肥厚部(PSD : postsynaptic density)において最も豊富に存在しているタンパク質の一つである。尚、HPD投与でもオランザピン投与でもHPCのGluN1、GluN2A及びGluN2Bの発現はいずれも変わらなかった。HPDの反復投与によるPFCにおけるGluN1、GluN2A及びPSD-95の発現低下は小胞輸送の変化によると考えられている(Fumagalli et al., 2008)。但し、ラットにオランザピン10 mg/kg、クロザピン20 mg/kg、HPD 1 mg/kgをそれぞれ28日間反復投与すると、海馬CA1・CA2領域におけるGluN1発現量が低下した(Krzystanek et al., 2015)という報告もある。統合失調症の死後脳研究でも抗精神病薬の種類や期間によってNMDA受容体サブユニットの発現が変化し得るとも考えられており(Kristiansen et al., 2007)、抗精神病薬はその用量や期間により、各脳部位におけるNMDA受容体への影響はそれぞれ異なると考えられる。

本研究では ASP-METH 群は HPD-METH 群と異なり細胞質基質分画の GluN1 量が保たれていた。定型抗精神病薬(HPD)と非定型抗精神病薬(ASP やオランザピン)の薬効の差の一つは PFC における GluN1 の小胞輸送能にあると考えられる。但し HPD 投与でも ASP 投与でも PFC 及び ST における Grin1 発現量の減少は阻止出来なかったことから、本モデルも METH 反復投与を重ねる事で将来的には NMDA 受容体の発現量は減少し、前述(Table 3)の NMDA 受容体機能異常を呈するものと考えられる。臨床場面では再燃・急性増悪のエピソードを反復する内に以前有効であった(非定型)抗精神病薬がかつて得られていた薬効を発揮出来なくなる現象や、クロザピンへの切り替えにより症状の改善が得られる現象を反映している可能性がある。

総括及び結論

本研究は、当教室が長年の研究の積み重ねにより提唱してきた「dopamine to glutamate 仮説」と、それに基づく「病態包括進行モデル」に見られる NMDA 受容体機能異常について、その機序の解明を試みたものに位置付けられる。

当教室の過去の研究と本研究の結果より、METH 2.5 mg/kg 投与により PFC 及び NAc において遅発性にグルタミン酸の放出が惹起され、それを反復する事で PFC 及び ST では NMDA 受容体の必須サブユニットである GluN1 の遺伝子発現量及びタンパク発現量が減少し、小胞輸送やシナプス後膜への発現量が減少する事と、脳部位によって GluN1 以外の NMDA 受容体サブユニットも減少し、時間経過と共に NMDA 受容体遮断薬への過感受性、PPI 障害及び mPFC でのアポトーシスが惹起される事、更には非定型抗精神病薬の投与により前述の NMDA 受容体機能異常の形成を阻止出来るが GluN1 などサブユニットの遺伝子発現量やタンパク発現量の減少を阻止するものではない事が示された。これは臨床場面において難治性の統合失調症には定型抗精神病薬及び非定型抗精神病薬が奏功しない一因である可能性もある。現時点で唯一治療抵抗性統合失調症に対して適応を持つクロザピンならば GluN1 を含む NMDA 受容体サブユニットの発現の減少を阻止し得る可能性は考えられる。本研究では非定型抗精神病薬が NMDA 受容体の受容体サブユニットの小胞輸送を調整している可能性が示されたが、NMDA 受容体遮断薬への過感受性、PPI 障害及び mPFC でのアポトーシスに対してどの NMDA 受容体サブユニットが関与しているかは明らかに出来なかった。NMDA 受容体の小胞輸送やシナプス上の発現については、今後 Live-cell imaging や PET・SPECT を用いた検討が必要と考えられる。

当教室で提唱した「dopamine to glutamate 仮説」の根幹をなす、PFC と NAc における METH 2.5mg/kg 投与後の遅発性のグルタミン酸放出増加(Ito et al., 2006b; Abekawa et al., 2008)の機序についても本研究から明らかにする事は出来なかった。METH の作用によるものかドパミンの作用によるものか、今後の検討課題である。

本研究では右脳を遺伝子発現量の検討に、左脳をタンパク発現量の検討に用いた。ラットの脳容積に性差や左右差はないとされている(Sahin et al., 2011)が、ラットのPFC、HPC、ST及び中脳のモノアミンの量には性差や左右差がある事が報じられている(Cory-slechta et al., 2013)。統合失調症の画像研究では脳容積について左右差が多く報じられており(Bilder et al., 1999; Narr et al., 2001; Highley, 2002; Toga and Thompson, 2003)、死後脳研究においても海馬のGluN1発現量の左右差の報告がある(Vrajová et al., 2010)。NMDA受容体の発現量や機能の左右差について言及出来ない点も本研究の限界である。

GluN1 サブユニットのセリン(Ser)⁸⁹⁷ がプロテインキナーゼ A(PKA)によりリン酸化されると NMDA 受容体が活性化する(Muniz and Isokawa, 2015)。統合失調症患者の PFC 及び HPC では、この GluN1 サブユニットの Ser⁸⁹⁷ のリン酸化が著しく低下している(Emamian et al., 2004; Li et al., 2009)。又、GluN1 の Ser⁸⁹⁷ をアラニンに置き換えたノックインマウスでは NMDA 受容体を介したシナプス伝達に重度の障害が認められた他、統合失調症と同様の社会的活動

及び PPI の障害が認められた(Li et al., 2009)。PCP 反復投与による統合失調症モデルマウスにおいて、PCP 反復投与により PFC の Ser⁸⁹⁷ での GluN1 のリン酸化レベルが有意に低下したが、非定型抗精神病薬の一つであるブロナンセリンはその低下を有意に抑制した。本研究では METH 反復投与による GluN1 のリン酸化レベルや ASP・HPD 投与による変化を検討するべく、ウェスタンブロッティングにより細胞質基質分画とシナプトソーム分画それぞれでリン酸化 GluN1 の検出を試みた(Anti-NMDAR1 (phospho S897) 抗体、ab52184:abcam) が、リン酸化 GluN1 を検出出来なかった(データは示していない)。脳組織採取の際に Syn-PER (Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞質基質分画とシナプトソーム分画に分離したが、採取後 Syn-PER (Thermo Fisher Scientific)に浸漬する際にプロテアーゼ阻害剤カクテルと併せて脱リン酸化酵素阻害剤も混入する必要があったと考えられる。併せて今後の検討課題である。

統合失調症の病態は以前不明な点が多く、種々のモデル動物も又統合失調症の病態の一部の再現に留まる。AMPH モデル及び METH モデルは統合失調症の陰性症状や認知機能障害を反映出来ていない点で(Jones et al., 2011; Marcotte et al., 2001)、NMDA 受容体遮断薬モデルも又特定の神経回路を標的に出来ない(Olney et al., 1999)上、通常、行動と脳機能の一時的な変化のみを示す(Featherstone et al., 2015)点で限界的であるとの見方もある。しかし現時点でドパミン神経系の過活動と 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(Howes et al., 2015)とあり、Grin1 ノックダウンマウスやヘテロ接合体(GluN1 +/-)マウスが統合失調症モデル動物とされている(Duncan et al., 2004; Bubeníková-Valešová et al., 2008; Bygrave et al., 2019)事から、本モデルは単にドパミン仮説にのみ基づく AMPH モデル・METH モデルの一つに留まらず、ドパミン仮説とグルタミン酸仮説、並びに薬理学的モデルと遺伝学的モデルを包含した、統合失調症の病態の一部を反映するモデルであると考えられる。本モデルを含む薬理学的モデルの大部分は専ら成人期の変化に焦点が当てられており(Harrison and Weinberger, 2005; Fatemi and Folsom, 2009; Powell, 2010; Rapoport et al., 2012)、例えば本モデルも出生前又は出生後のいずれかの期間に METH を投与する事により、神経発達障害としての統合失調症の病態の解明に繋げられる可能性がある(Lee and Zhou, 2019)。又、本研究で得られた結果が AMPH モデル・METH モデル全体に一般化出来るものかどうか、今後異なるプロトコールでモデル動物を作成し研究を重ねる必要がある。

統合失調症の病態の解明が進めば、今後病期や病態に応じて mGluR2/3 受容体遮断薬やグリシントランスポーター1 阻害薬などのグルタミン酸受容体に作用する薬剤を用いる事で、陽性症状や陰性症状とは別に認知機能障害や病態の進行(難治化)の阻止、或いは残遺状態の改善を図れる可能性がある(Abekawa et al., 2012)。本モデルは従前からあるモデルではあるが見直されるべき点も多くあり、統合失調症の病態解明と併せて再発・再燃脆弱性の改善に向けた新規治療法の探索にも有用と考えられる。

謝辞

本研究の立案及び研究計画作成についてご指導下さいました北海道大学大学院医学研究院精神医学教室講師の伊藤侯輝先生、研究計画作成及び各種実験手技の習得について連日懇切丁寧にご指導下さいました防衛医科大学校精神科学講座助教の古賀農人先生、研究計画作成について数多のご助言を下さいました北海道大学大学院医学研究院精神医学教室客員研究員の北市雄士先生、同じく大宮友貴先生、及び北海道大学病院薬剤部の石川修平先生、統計解析やその手法についてご指導下さいました北海道大学大学院医学研究院精神医学教室助教の三井信幸先生、卓越した技術により実験の遂行を終始支援して下さいました牧原圭佑様、加藤亜紀子様及び殊に外崎真理子様に深く感謝申し上げます。

末筆ではございますが、このような大変興味深い研究テーマに取り組む機会と多岐に亘るご助言及びご助力を賜りました北海道大学大学院医学研究院精神医学教室教授の久住一郎先生に厚く御礼を申し上げます。

利益相反

本研究の遂行の為 2018 年度「ノバルティス研究助成」を受けた。但し、ノバルティスファーマ株式会社及びアルコンファーマ株式会社は、本研究における研究計画、遂行、解析及び報告に一切関与していない。

引用文献

- Abekawa, T., Ito, K., and Koyama, T. (2006). Role of the simultaneous enhancement of NMDA and dopamine D1 receptor-mediated neurotransmission in the effects of clozapine on phencyclidine-induced acute increases in glutamate levels in the rat medial prefrontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* *374*, 177–193.
- Abekawa, T., Ito, K., Nakagawa, S., Nakato, Y., and Koyama, T. (2008). Olanzapine and risperidone block a high dose of methamphetamine-induced schizophrenia-like behavioral abnormalities and accompanied apoptosis in the medial prefrontal cortex. *Schizophr. Res.* *101*, 84–94.
- Abekawa, T., Ito, K., Nakagawa, S., Nakato, Y., and Koyama, T. (2011). Effects of aripiprazole and haloperidol on progression to schizophrenia-like behavioural abnormalities and apoptosis in rodents. *Schizophr. Res.* *125*, 77–87.
- Abekawa, T., Ito, K., Nakato, Y., and Koyama, T. (2012). [Innovation of an animal model for the pathophysiology of schizophrenia]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* *114*, 81–98.
- Abruzzo, A., Cerchiara, T., Luppi, B., and Bigucci, F. (2019). Transdermal Delivery of Antipsychotics: Rationale and Current Status. *CNS Drugs* *33*, 849–865.
- Akbarian, S., Sucher, N.J., Bradley, D., Tafazzoli, A., Trinh, D., Hetrick, W.P., Potkin, S.G., Sandman, C.A., Bunney, W.E., and Jones, E.G. (1996). Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J. Neurosci.* *16*, 19–30.
- Austin, P.J., Bembrick, A.L., Denyer, G.S., and Keay, K.A. (2015). Injury-Dependent and Disability-Specific Lumbar Spinal Gene Regulation following Sciatic Nerve Injury in the Rat. *PLoS One* *10*, e0124755.
- Bilder, R.M., Wu, H., Bogerts, B., Ashtari, M., Robinson, D., Woerner, M., Lieberman, J.A., and Degreef, G. (1999). Cerebral volume asymmetries in schizophrenia and mood disorders: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Int. J. Psychophysiol.* *34*, 197–205.
- Bonefeld, B.E., Elfving, B., and Wegener, G. (2008). Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse* *62*, 302–309.
- Brisch, R., Saniotis, A., Wolf, R., Biela, H., Bernstein, H.G., Steiner, J., Bogerts, B., Braun, K., Kumaratilake, J., Henneberg, M., et al. (2014). The

role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: Old fashioned, but still in vogue. *Front. Psychiatry* 5.

Brody, S.A., Nakanishi, N., Tu, S., Lipton, S.A., and Geyer, M.A. (2005). A developmental influence of the *N*-methyl-D-aspartate receptor NR3A subunit on prepulse inhibition of startle. *Biol. Psychiatry* 57, 1147–1152

Bubeníková-Valešová, V., Horáček, J., Vraiová, M., and Höschl, C. (2008). Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1014–1023.

Bygrave, A.M., Kilonzo, K., Kullmann, D.M., Bannerman, D.M., and Kätzel, D. (2019). Can *N*-Methyl-D-Aspartate Receptor Hypofunction in Schizophrenia Be Localized to an Individual Cell Type? *Front. Psychiatry* 10.

Cahill, E., Pascoli, V., Trifilieff, P., Savoldi, D., Kappès, V., Lüscher, C., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2014). D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol. Psychiatry* 19, 1295–1304.

Carlsson, A., Hansson, L.O., Waters, N., and Carlsson, M.L. (1997). Neurotransmitter aberrations in schizophrenia: new perspectives and therapeutic implications. *Life Sci.* 61, 75–94.

Carpenter, W.T., and Koenig, J.I. (2008). The evolution of drug development in schizophrenia: past issues and future opportunities. *Neuropsychopharmacology* 33, 2061–2079.

Catts, V.S., Derminio, D.S., Hahn, C.G., and Weickert, C.S. (2015). Postsynaptic density levels of the NMDA receptor NR1 subunit and PSD-95 protein in prefrontal cortex from people with schizophrenia. *Npj Schizophr.* 1, 26–30.

Catts, V.S., Lai, Y.L., Weickert, C.S., Weickert, T.W., and Catts, S. V. (2016). A quantitative review of the postmortem evidence for decreased cortical *N*-methyl-D-aspartate receptor expression levels in schizophrenia: How can we link molecular abnormalities to mismatch negativity deficits? *Biol. Psychol.* 116, 57–67.

Citrome, L., Walling, D., Zeni, C., Komaroff, M., and Park, A. (2019). O50. Efficacy and Safety of an Asenapine Transdermal Patch (Asenapine Transdermal System, HP-3070) in the Treatment of Adults With Schizophrenia: A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, 6-Week Inpatient Study. *Biol. Psychiatry* 85, S126.

Cory-slechta, D.A., Weston, D., Liu, S., and Allen, J.L. (2013). Brain hemispheric differences in the neurochemical effects of lead, prenatal stress, and the combination and their amelioration by behavioral experience. *Toxicol. Sci.* *132*, 419–430.

Cull-Candy, S.G., and Leszkiewicz, D.N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE* 2004.

Dalmau, J., Armangué, T., Planagumà, J., Radosevic, M., Mannara, F., Leypoldt, F., Geis, C., Lancaster, E., Titulaer, M.J., Rosenfeld, M.R., et al. (2019). An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models. *Lancet. Neurol.* *18*, 1045–1057.

Davis, K.L., Kahn, R.S., Ko, G., and Davidson, M. (1991). Dopamine in schizophrenia: A review and reconceptualization. *Am. J. Psychiatry* *148*, 1474–1486.

Dold, M., Samara, M.T., Li, C., Tardy, M., and Leucht, S. (2015). Haloperidol versus first-generation antipsychotics for the treatment of schizophrenia and other psychotic disorders. *Cochrane Database Syst. Rev.* *1*, CD009831.

Duncan, G.E., Moy, S.S., Perez, A., Eddy, D.M., Zinzow, W.M., Lieberman, J.A., Snouwaert, J.N., and Koller, B.H. (2004). Deficits in sensorimotor gating and tests of social behavior in a genetic model of reduced NMDA receptor function. *Behav. Brain Res.* *153*, 507–519.

Emamian, E.S., Karayiorgou, M., and Gogos, J.A. (2004). Decreased phosphorylation of NMDA receptor type 1 at serine 897 in brains of patients with Schizophrenia. *J. Neurosci.* *24*, 1561–1564.

Erickson, M.A., Ruffle, A., and Gold, J.M. (2016). A Meta-Analysis of Mismatch Negativity in Schizophrenia: From Clinical Risk to Disease Specificity and Progression. *Biol. Psychiatry* *79*, 980–987.

Errico, F., Napolitano, F., Squillace, M., Vitucci, D., Blasi, G., de Bartolomeis, A., Bertolino, A., D’Aniello, A., and Usiello, A. (2013). Decreased levels of d-aspartate and NMDA in the prefrontal cortex and striatum of patients with schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* *47*, 1432–1437.

Fatemi, S.H., and Folsom, T.D. (2009). The neurodevelopmental hypothesis of Schizophrenia, revisited. *Schizophr. Bull.* *35*, 528–548.

Featherstone, R.E., Kapur, S., and Fletcher, P.J. (2007). The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Prog. Neuro-*

Psychopharmacology Biol. Psychiatry *31*, 1556–1571.

Featherstone, R.E., Rizos, Z., Kapur, S., and Fletcher, P.J. (2008). A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. *Behav. Brain Res.* *189*, 170–179.

Featherstone, R.E., Shin, R., Kogan, J.H., Liang, Y., Matsumoto, M., and Siegel, S.J. (2015). Mice with subtle reduction of NMDA NR1 receptor subunit expression have a selective decrease in mismatch negativity: Implications for schizophrenia prodromal population. *Neurobiol. Dis.* *73*, 289–295.

Fitzgerald, M.L., and Pickel, V.M. (2018). Adolescent isolation rearing produces a prepulse inhibition deficit correlated with expression of the NMDA GluN1 subunit in the nucleus accumbens. *Brain Struct. Funct.* *223*, 3169–3181.

Frånberg, O., Wiker, C., Marcus, M.M., Konradsson, Å., Jardemark, K., Schilström, B., Shahid, M., Wong, E.H.F., and Svensson, T.H. (2008). Asenapine, a novel psychopharmacologic agent: Preclinical evidence for clinical effects in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. *196*, 417–429.

Frohlich, J., and Van Horn, J.D. (2014). Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J. Psychopharmacol.* *28*, 287–302.

Fukuyama, K., Kato, R., Murata, M., Shiroyama, T., and Okada, M. (2019). Clozapine normalizes a glutamatergic transmission abnormality induced by an impaired NMDA receptor in the thalamocortical pathway via the activation of a group iii metabotropic glutamate receptor. *Biomolecules* *9*.

Fumagalli, F., Frasca, A., Racagni, G., and Riva, M.A. (2008). Dynamic regulation of glutamatergic postsynaptic activity in rat prefrontal cortex by repeated administration of antipsychotic drugs. *Mol. Pharmacol.* *73*, 1484–1490.

Gao, X.M., Sakai, K., Roberts, R.C., Conley, R.R., Dean, B., and Tamminga, C.A. (2000). Ionotropic glutamate receptors and expression of *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: Effects of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* *157*, 1141–1149.

Goff, D.C., and Coyle, J.T. (2001). The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* *158*, 1367–1377.

- Harrison, P.J., and Weinberger, D.R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: On the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* *10*, 40–68.
- Harvey, P.D., and Strassnig, M. (2012). Predicting the severity of everyday functional disability in people with schizophrenia: Cognitive deficits, functional capacity, symptoms, and health status. *World Psychiatry* *11*, 73–79.
- Highley, J.R. (2002). Asymmetry of the Uncinate Fasciculus: A Post-mortem Study of Normal Subjects and Patients with Schizophrenia. *Cereb. Cortex* *12*, 1218–1224.
- Hokyo, A., Kanazawa, T., Uenishi, H., Tsutsumi, A., Kawashige, S., Kikuyama, H., Glatt, S.J., Koh, J., Nishimoto, Y., Matsumura, H., et al. (2010). Habituation in prepulse inhibition is affected by a polymorphism on the NMDA receptor 2B subunit gene (GRIN2B). *Psychiatr. Genet.* *20*, 191–198.
- Horak, M., Petralia, R.S., Kaniakova, M., and Sans, N. (2014). ER to synapse trafficking of NMDA receptors. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.
- Howes, O., McCutcheon, R., and Stone, J. (2015). Glutamate and dopamine in schizophrenia: An update for the 21st century. *J. Psychopharmacol.* *29*, 97–115.
- Inada, K., Ishigooka, J., Anzai, T., Suzuki, E., Miyaoka, H., and Saji, M. (2003). Antisense hippocampal knockdown of NMDA-NR1 by HVJ-liposome vector induces deficit of prepulse inhibition but not of spatial memory. *Neurosci. Res.* *45*, 473–481.
- Ito, K., Ohmori, T., Abekawa, T., and Koyama, T. (1997). Clonazepam prevents the development of sensitization to methamphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *58*, 875–879.
- Ito, K., Abekawa, T., and Koyama, T. (2006a). Valproate blocks high-dose methamphetamine-induced behavioral cross-sensitization to locomotion-inducing effect of dizocilpine (MK-801), but not methamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*. *186*, 525–533.
- Ito, K., Abekawa, T., and Koyama, T. (2006b). Relationship between development of cross-sensitization to MK-801 and delayed increases in glutamate levels in the nucleus accumbens induced by a high dose of methamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*. *187*, 293–302.

- Ito K, Abekawa T, Nakato Y, K.T. (2010). Quetiapine blocks high-dose methamphetamine-induced apoptosis in the medial prefrontal cortex and the accompanying PPI deficit. *Soc Neurosci Abstr* 159, 6.
- Iwata, H., and Yamamuro, Y. (2016). Subregional Expression of Hippocampal Glutamatergic and GABAergic Genes in F344 Rats with Social Isolation after Weaning. *Comp. Med.* 66, 4–9.
- Jardemark, K., Marcus, M.M., Shahid, M., and Svensson, T.H. (2010). Effects of asenapine on prefrontal *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated transmission: Involvement of dopamine D1 receptors. *Synapse* 64, 870–874.
- Javitt, D.C. (2007). Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, *N*-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int. Rev. Neurobiol.* 78, 69–108.
- Jentsch, J.D., and Roth, R.H. (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: From NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20, 201–225.
- Jones, C., Watson, D., and Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1162–1194.
- Kane, J., Honigfeld, G., Singer, J., and Meltzer, H. (1988). Clozapine for the Treatment-Resistant Schizophrenic: A Double-blind Comparison With Chlorpromazine. *Arch. Gen. Psychiatry* 45, 789–796.
- Kim, J.S., Kornhuber, H.H., Schmid-Burgk, W., and Holzmüller, B. (1980). Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 20, 379–382.
- Kishi, T., Ikuta, T., Oya, K., Matsunaga, S., Matsuda, Y., and Iwata, N. (2018). Anti-dementia drugs for psychopathology and cognitive impairment in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 21, 748–757.
- Kołaczkowski, M., Mierzejewski, P., Bienkowski, P., Wesołowska, A., and Newman-Tancredi, A. (2014). Antipsychotic, antidepressant, and cognitive-impairment properties of antipsychotics: rat profile and implications for behavioral and psychological symptoms of dementia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 387, 545–557.
- Kristiansen, L. V., Huerta, I., Beneyto, M., and Meador-Woodruff, J.H. (2007). NMDA receptors and schizophrenia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 48–55.

Krzystanek, M., Bogus, K., Pałasz, A., Krzystanek, E., Worthington, J.J., and Wiaderkiewicz, R. (2015). Effects of long-term treatment with the neuroleptics haloperidol, clozapine and olanzapine on immunoexpression of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B in the rat hippocampus. *Pharmacol. Reports* 67, 965–969.

Lahti, A.C., Koffel, B., Laporte, D., and Tamminga, C.A. (1995). Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13, 9–19.

Lahti, A.C., Weiler, M.A., Michaelidis, T., Parwani, A., and Tamminga, C.A. (2001). Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 25, 455–467.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Van Dyck, C.H., Gil, R., D'Souza, C.D., Erdos, J., Mccance, E., Rosenblatt, W., Fingado, C., Zoghbi, S.S., et al. (1996). Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9235–9240.

Law, A.J., and Deakin, J.F.W. (2001). Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. *Neuroreport* 12, 2971–2974.

Lee, G., and Zhou, Y. (2019). NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 185.

Lewis, D.A., and Lieberman, J.A. (2000). Catching up on schizophrenia: Natural history and neurobiology. *Neuron* 28, 325–334.

Li, B., Devidze, N., Barengolts, D., Prostack, N., Sphicas, E., Apicella, A.J., Malinow, R., and Emamian, E.S. (2009). NMDA receptor phosphorylation at a site affected in schizophrenia controls synaptic and behavioral plasticity. *J. Neurosci.* 29, 11965–11972.

Lieberman, J.A., Kane, J.M., Sarantakos, S., Gadaleta, D., Woerner, M., Alvir, J., and Ramos Lorenzi, J. (1987). Prediction of Relapse in Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 44, 597–603.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408.

Lu, W., Monteggia, L.M., and Wolf, M.E. (1999). Withdrawal from repeated

amphetamine administration reduces NMDAR1 expression in the rat substantia nigra, nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 3167–3177.

Marcotte, E.R., Pearson, D.M., and Srivastava, L.K. (2001). Animal models of schizophrenia: A critical review. *J. Psychiatry Neurosci.* *26*, 395–410.

Merritt, K., Egerton, A., Kempton, M.J., Taylor, M.J., and McGuire, P.K. (2016). Nature of Glutamate Alterations in Schizophrenia: A Meta-analysis of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Studies. *JAMA Psychiatry* *73*, 665–674.

Mielnik, C.A., Horsfall, W., and Ramsey, A.J. (2014). Diazepam improves aspects of social behaviour and neuron activation in NMDA receptor-deficient mice. *Genes, Brain Behav.* *13*, 592–602.

Miyamoto, Y., Yamada, K., Noda, Y., Mori, H., Mishina, M., and Nabeshima, T. (2001). Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. *J. Neurosci.* *21*, 750–757.

Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., and Koller, B.H. (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* *98*, 427–436.

Morrison, T. B., Weis, J. J. and Wittwer, C. T. (1998). ‘Quantification of lowcopy transcripts by continuous SYBR® green I monitoring during amplification’. *BioTechniques* *24*, 954–962.

Muguruma, M., Unami, A., Kanki, M., Kuroiwa, Y., Nishimura, J., Dewa, Y., Umemura, T., Oishi, Y., and Mitsumori, K. (2007). Possible involvement of oxidative stress in piperonyl butoxide induced hepatocarcinogenesis in rats. *Toxicology* *236*, 61–75.

Muniz, B.G., and Isokawa, M. (2015). Ghrelin receptor activity amplifies hippocampal *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated postsynaptic currents and increases phosphorylation of the GluN1 subunit at Ser896 and Ser897. *Eur. J. Neurosci.* *42*, 3045–3053.

Nakato, Y., Abekawa, T., Ito, K., Inoue, T., and Koyama, T. (2010). Lamotrigine blocks the initiation and expression of repeated high-dose methamphetamine-induced prepulse inhibition deficit in rats. *Neurosci. Lett.* *481*, 183–187.

Nakato, Y., Abekawa, T., Ito, K., Inoue, T., and Koyama, T. (2011). Lamotrigine blocks apoptosis induced by repeated administration of high-

dose methamphetamine in the medial prefrontal cortex of rats. *Neurosci. Lett.* *490*, 161–164.

Narr, K.L., Thompson, P.M., Sharma, T., Moussai, J., Zoumalan, C., Rayman, J., and Toga, A.W. (2001). Three-dimensional mapping of gyral shape and cortical surface asymmetries in schizophrenia: Gender effects. *Am. J. Psychiatry* *158*, 244–255.

Nishchal, B.S., Rai, S., Prabhu, M.N., Ullal, S.D., Rajeswari, S., and Gopalakrishna, H.N. (2014). Effect of *Tribulus terrestris* on haloperidol-induced catalepsy in mice. *Indian J. Pharm. Sci.* *76*, 564–567.

Ohmori, T., Abekawa, T., Ito, K., and Koyama, T. (1997). Context-dependent sensitization: reconsideration and a hypothesis. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* *17*, 61–68.

Olney, J.W., and Farber, N.B. (1995). Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* *52*, 998–1007.

Olney, J.W., Newcomer, J.W., and Farber, N.B. (1999). NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* *33*, 523–533.

Van Os, J., Kenis, G., and Rutten, B.P.F. (2010). The environment and schizophrenia. *Nature* *468*, 203–212.

Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 383–400.

Pilowsky, L.S., Bressan, R.A., Stone, J.M., Erlandsson, K., Mulligan, R.S., Krystal, J.H., and Ell, P.J. (2006). First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients [2]. *Mol. Psychiatry* *11*, 118–119.

Pogarell, O., Koch, W., Karch, S., Dehning, S., Müller, N., Tatsch, K., Poepperl, G., and Möller, H.J. (2012). Dopaminergic neurotransmission in patients with schizophrenia in relation to positive and negative symptoms. *Pharmacopsychiatry* *45 Suppl 1*.

Powell, S.B. (2010). Models of neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* *4*, 435–481.

Rainey, J.M., and Crowder, M.K. (1975). Prolonged psychosis attributed to phencyclidine: report of three cases. *Am. J. Psychiatry* *132*, 1076–1078.

- Rapoport, J.L., Giedd, J.N., and Gogtay, N. (2012). Neurodevelopmental model of schizophrenia: Update 2012. *Mol. Psychiatry* *17*, 1228–1238.
- Ripke, S., Neale, B.M., Corvin, A., Walters, J.T.R., Farh, K.H., Holmans, P.A., Lee, P., Bulik-Sullivan, B., Collier, D.A., Huang, H., et al. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* *511*, 421–427.
- Robinson, D., Woerner, M.G., Alvir, J.M.J., Bilder, R., Goldman, R., Geisler, S., Koreen, A., Sheitman, B., Chakos, M., Mayerhoff, D., et al. (1999). Predictors of relapse following response from a first episode of schizophrenia or schizoaffective disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* *56*, 241–247.
- Robinson, T., and Becker, J. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.* *396*, 157–198.
- van Rossum, J.M. (1966). The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* *160*, 492–494.
- Sahin, B., Aslan, H., Unal, B., Canan, S., Bilgic, S., Kaplan, S., and Tumkaya, L. (2011). Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: A stereological study. *Image Anal. Stereol.* *20*, 9.
- Salomon, J.A., Haagsma, J.A., Davis, A., de Noordhout, C.M., Polinder, S., Havelaar, A.H., Cassini, A., Devleesschauwer, B., Kretzschmar, M., Speybroeck, N., et al. (2015). Disability weights for the Global Burden of Disease 2013 study. *Lancet. Glob. Heal.* *3*, e712-23.
- Sato, M. (1992). A Lasting Vulnerability to Psychosis in Patients with Previous Methamphetamine Psychosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *654*, 160–170.
- Sato, M. (2002). [Basic and clinical studies on methamphetamine-related psychosis]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* *104*, 179–190.
- Seeman, P., and Lee, T. (1975). Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* (80-.). *188*, 1217–1219.
- Seeman, P., and Ulpian, C. (1983). Neuroleptics have identical potencies in human brain limbic and putamen regions. *Eur. J. Pharmacol.* *94*, 145–148.
- Shahid, M., Walker, G.B., Zorn, S.H., and Wong, E.H.F. (2009). Asenapine: A novel psychopharmacologic agent with a unique human receptor

signature. *J. Psychopharmacol.* *23*, 65–73.

Shuto, T., and Nishi, A. (2011). Treatment of the Psychostimulant-Sensitized Animal Model of Schizophrenia. *CNS Neurosci. Ther.* *17*, 133–139.

Sneader, W. (2002). The 50th anniversary of chlorpromazine. *Drug News Perspect.* *15*, 466–471.

Snigdha, S., Idris, N., Grayson, B., Shahid, M., and Neill, J.C. (2011). Asenapine improves phencyclidine-induced object recognition deficits in the rat: Evidence for engagement of a dopamine D1 receptor mechanism. *Psychopharmacology (Berl)*. *214*, 843–853.

Spooren, W., Mombereau, C., Maco, M., Gill, R., Kemp, J.A., Ozmen, L., Nakanishi, S., and Higgins, G.A. (2004). Pharmacological and genetic evidence indicates that combined inhibition of NR2A and NR2B subunit containing NMDA receptors is required to disrupt prepulse inhibition. *Psychopharmacology (Berl)*. *175*, 99–105.

Steiner, J., Walter, M., Glanz, W., Sarnyai, Z., Bernstein, H.G., Vielhaber, S., Kästner, A., Skalej, M., Jordan, W., Schiltz, K., et al. (2013). Increased prevalence of diverse *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptor antibodies in patients with an initial diagnosis of schizophrenia: Specific relevance of IgG NR1a antibodies for distinction from *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptor encephalitis. *JAMA Psychiatry* *70*, 271–278.

Sullivan, P.F., Kendler, K.S., and Neale, M.C. (2003). Schizophrenia as a Complex Trait: Evidence from a Meta-analysis of Twin Studies. *Arch. Gen. Psychiatry* *60*, 1187–1192.

Suryavanshi, P.S., Ugale, R.R., Yilmazer-Hanke, D., Stairs, D.J., and Dravid, S.M. (2014). GluN2C/GluN2D subunit-selective NMDA receptor potentiator CIQ reverses MK-801-induced impairment in prepulse inhibition and working memory in Y-maze test in mice. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 799–809.

Tadokoro, S., and Kuribara, H. (1990). [Modification of the behavioral effects of drugs after repeated administration--special reference to the reverse tolerance of amphetamines]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* *95*, 229–238.

Takeuchi, T., Kiyama, Y., Nakamura, K., Tsujita, M., Matsuda, I., Mori, H., Munemoto, Y., Kuriyama, H., Natsume, R., Sakimura, K., et al. (2001). Roles of the glutamate receptor $\epsilon 2$ and $\delta 2$ subunits in the potentiation and

prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. *Eur. J.*

Tarazi, F.I., and Neill, J.C. (2013). The preclinical profile of asenapine: clinical relevance for the treatment of schizophrenia and bipolar mania. *Expert Opin. Drug Discov.* *8*, 93–103.

Tarazi, F.I., Yong, K.C., Gardner, M., Wong, E.H.F., Henry, B., and Shahid, M. (2009). Asenapine exerts distinctive regional effects on ionotropic glutamate receptor subtypes in rat brain. *Synapse* *63*, 413–420.

Toga, A.W., and Thompson, P.M. (2003). Mapping brain asymmetry. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 37–48.

Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* *62*, 405–496.

Vauquelin, G., Bostoen, S., Vanderheyden, P., and Seeman, P. (2012). Clozapine, atypical antipsychotics, and the benefits of fast-off D 2 dopamine receptor antagonism. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* *385*, 337–372.

Vincent, A., Bien, C.G., Irani, S.R., and Waters, P. (2011). Autoantibodies associated with diseases of the CNS: New developments and future challenges. *Lancet Neurol.* *10*, 759–772.

Vrajavá, M., Šťastný, F., Horáček, J., Lochman, J., Šerý, O., Peková, S., Klaschka, J., and Höschl, C. (2010). Expression of the hippocampal NMDA receptor GluN1 subunit and its splicing isoforms in schizophrenia: Postmortem study. *Neurochem. Res.* *35*, 994–1002.

Walter, H., Kammerer, H., Frasch, K., Spitzer, M., and Abler, B. (2009). Altered reward functions in patients on atypical antipsychotic medication in line with the revised dopamine hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. *206*, 121–132.

Weickert, C.S., Fung, S.J., Catts, V.S., Schofield, P.R., Allen, K.M., Moore, L.T., Newell, K.A., Pellen, D., Huang, X.F., Catts, S. V., et al. (2013). Molecular evidence of *N*-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* *18*, 1185–1192.

Weidenauer, A., Bauer, M., Sauerzopf, U., Bartova, L., Praschak-Rieder, N., Sitte, H.H., Kasper, S., and Willeit, M. (2017). Making sense of: Sensitization in Schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *20*.

Yuzaki, M. (2007). Life of glutamate receptor--new mechanisms controlling number and location in neurons. *Seikagaku*. 79, 16–27.

Zheng, W., Li, X.H., Yang, X.H., Cai, D.B., Ungvari, G.S., Ng, C.H., Wang, S.B., Wang, Y.Y., Ning, Y.P., and Xiang, Y.T. (2018). Adjunctive memantine for schizophrenia: A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Psychol. Med.* 48, 72–81.

伊藤 侯輝, 久住 一郎 (2019). 統合失調症のドーパミン仮説の現在. *精神科治療学* 34, 983–988.

佐藤 光源, 伊藤 千裕, 豊田 洋布施 裕二 (1996). 覚醒剤による遅発性精神病—疾患概念と成因研究の現状. *精神医学* 38, 796-805.

安部川 智浩, 伊藤 侯輝, 仲唐 安哉, 小山 司 (2009). 統合失調症の病態進行のメカニズム. *脳と精神の医学* 20, 311–317.

曾良 一郎 (2019). 統合失調症の病態モデルとしての覚せい剤逆耐性現象. *精神科治療学* 34, 1065–1069.

橋本直樹, 久住一郎 (2018). 統合失調症の再発に関わる生物学的基盤. *精神科治療学* 33, 1037-1042