グルタミン酸作動性神経系と 統合失調症モデル動物

毛利 彰宏¹⁾, 野田 幸裕^{1,2)}, 溝口 博之¹⁾, 鍋島 俊隆¹⁾

要約: 非競合的 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬であるフェンシクリジン (PCP) の乱用者は、統合失調症とよく似た精神症状を示すことから、統合失調症の病態仮説として「グルタミン酸作動性神経系機能低下仮説」が提唱されている。PCP は単回で投与した場合には一過性の多様な薬理作用を示すが、連続投与した場合は、依存患者が摂取を中止した後も、その精神症状が数週間持続する様に、動物でも行動変化が持続する。例えば PCP をマウスに連続投与すると、休薬後において少量の PCP を投与すると運動過多が増強（自発性障害：陽性症状様作用）され、一方、強制的に水泳をさせても泳がなくなる無動状態が増強（意欲低下の増強：陰性症状様作用）され、水探索試験における潜在学習や恐怖条件づけ試験における連合学習が障害（認知機能障害）される。このような PCP 連続投与マウスに認められる情動・認知機能障害にグルタミン酸作動性神経系がどのように関与しているのか分子機序を調べたところ、運動過多の増強は PCP が NMDA 受容体拮抗作用を示し、その結果ドバミン作動性神経系を亢進することによっていた。生理食塩水連続投与マウスでは強制水泳ストレス負荷および水探索や恐怖条件づけ試験で訓練すると Ca^{2+} /calmodulin kinase II や extracellular signaling-regulated kinase のリン酸化が著しく増加するが、PCP 連続投与マウスでは増加しなかった。一方、PCP 連続投与マウスの細胞外グルタミン酸の基礎遊離量は著しく減少していた。これはグリア型グルタミン酸トランスポーターの GLAST の発現が増加し、グルタミン酸の再取り込みが増加しているためであることが考えられ

た。したがって、PCP 連続投与マウスに認められる精神行動障害には、グルタミン酸作動性神経系の前シナプス機能および NMDA 受容体を介する細胞内シグナル伝達の低下が関与しているものと考えられる。

はじめに

統合失調症の発症危険率は人口の約 1%といわれ、主に思春期以降に発症し、慢性化、進行し易い精神疾患で、陽性症状（幻覚、妄想、緊張病症状等）、陰性症状（感情鈍磨、意欲の低下、疎通性障害等）および認知障害などが認められる疾患である。同じ家系に患者が多いので、遺伝が強く関与していることが考えられているが、1つの遺伝子だけでなく、いくつかの遺伝子が関与していると考えられている。また、遺伝だけでなく育った環境も関係すると言われている。このように発症機序が複雑であるため病態の原因については不明な部分が多い。新しい治療方法を考えるためには臨床での研究に加え、適切な病態動物モデルを用いた基礎的研究や新しい治療薬の有効性を評価することが必要である。これまでの臨床および基礎的研究において、統合失調症の発症原因について非競合的 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬のフェンシクリジン (PCP) が薬物依存者に統合失調症によく似た精神症状（陽性症状、陰性症状や認知障害）を示す(1) ことから、統合失調症は NMDA 受容体の機能が低下すると発症するという「グルタミン酸作動性神経系機能低下仮説 (NMDA 受容体機能低下仮説)」が提唱されている(2)。この仮説を支える臨床データは、統合失調症患者の死後脳において NMDA 受容体を構

キーワード：統合失調症，グルタミン酸作動性神経系，*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体，フェンシクリジン (PCP)，動物モデル

¹⁾名古屋大学 大学院医学系研究科 医療薬学・附属病院薬剤部（〒466-8560 名古屋市昭和区鶴舞町 65）

²⁾名城大学 薬学部 医薬連携実習部門・病態解析学（〒468-8503 名古屋市天白区八事山 150）

e-mail: a-mouri@med.nagoya-u.ac.jp

原稿受領日：2005 年 8 月 11 日，会誌編集委員会依頼原稿

Title: Dysfunction of glutamatergic systems and potential animal models of schizophrenia

Author: Akihiro Mouri, Yukihiro Noda, Hiroyuki Mizoguchi, Toshitaka Nabeshima

表1 グルタミン酸作動性神経系機能低下仮説に基いた統合失調症動物モデル

			NMDA 受容体 アンタゴニスト 連続投与モデル	NMDA 受容体遺伝子変異マウス		
				NR1KD	NR1 点変異	NR2A KO
陽性症状		運動量・常同行動	行動感作 ^{12, 13), a)}	増加 ^{16), b)}	増加 ^{17), b)}	増加 ^{18), b)}
陰性症状	社会性行動		低下 ^{19, 20)}	低下 ¹⁶⁾	データなし	データなし
	強制水泳(無動化)		増強 ^{13, 21-24)}	データなし	データなし	データなし
認知障害	作業記憶	T 型迷路・放射状迷路	障害 ^{36, 37)}	データなし	データなし	データなし
	情報処理障害	Pre pulse inhibition	障害 ³⁸⁾	障害 ³⁹⁾	変化なし ¹⁷⁾	変化なし ⁴⁰⁾
	潜在学習	水探索試験	障害 ²⁶⁾	データなし	データなし	障害 ¹⁸⁾
	連合学習	恐怖条件付け学習	障害 ²⁷⁾	データなし	データなし	障害 ³⁰⁾

NR1KD：NR1 の発現が 5-10%，NR1 点変異：NR1 のグリシン結合部位を点変異，NR2A KO：NR2A を欠損。

^{a)}PCP 連続投与後における PCP 投与による運動量の増加，^{b)}新規環境下における運動量の増加。

成している NR1 サブユニットの活性（リン酸化タンパク量）が低下していること(3)，4 種類の NR2 サブユニット（NR2A, NR2B, NR2C, NR2D）の発現の割合が統合失調症と健常者とは異なること(4)，NMDA 受容体サブユニットの遺伝子の変異が統合失調症の発症に関連性が高いこと(5-7) などが報告されている。特に糸川ら(7) は，NR2A サブユニットの mRNA の合成（転写調節）を行う遺伝子の塩基配列の中で，グアニン - チミンが多く繰り返されている人は，統合失調症に罹患する割合が高かったり，統合失調症の症状の程度を評価する陽性陰性症状評価尺度（PANSS：Positive and Negative Symptom Scale）のスコアが高くなり症状が重篤になったりすることを報告している。また，培養細胞を用いた実験において，このグアニン - チミンの繰り返し回数が多いほど NR2A サブユニットの転写活性が低下し，実際にグアニン - チミンの繰り返しが多い統合失調症患者の死後脳を用いた受容体結合実験において NMDA 受容体の数が減少している(7)。したがって，NMDA 受容体の機能低下が統合失調症の発症に大きく寄与していることが考えられる(7)。一方，NMDA 受容体のグリシン結合部位に作用し，NMDA 受容体機能を亢進させるグリシン，D-セリンおよび D-サイクロセリンは薬物治療において，統合失調症の症状に対して治療効果を示すことが報告されている(8-10)。本稿では，我々が開発した PCP 連続投与動物モデルの行動障害とグルタミン酸作動性神経系機能低下仮説がどのように関連しているのかについて紹介する。

1. フェンシクリジン連続投与動物の精神行動障害

1) 陽性症状様行動障害

PCP (5 mg/kg) をラットに単回投与すると，前頭前皮質および側坐核でのドパミンの遊離が増加し，運動量も増加する(11)。PCP (10 mg/kg) を 14 日間連続投与しておいたマウスに低用量の PCP (3 mg/kg) を再投与すると，単回投与した時に比べて側坐核のドパミン遊離量の増加と，運動過多が多くなる（行動感作）(12, 13) (表 1)。単回投与動物における運動量の増加および連続投与動物における行動感作は，主としてドパミン D2 受容体を遮断する作用をもつ定型および種々の受容体を遮断する非定型抗精神病薬によって抑制された(11-13)。これは臨床において陽性症状に対して定型および非定型抗精神病薬がともに有効であることと一致している。しかし，単回投与時とは異なり，連続投与後に PCP を再投与しても前頭前皮質のドパミンの遊離は増強されない(14)。統合失調症患者では前頭前皮質のドパミン作動性神経機能が低下しているという報告があることから(15)，PCP 連続投与動物における行動感作の方が単回投与動物における運動量の増加よりも統合失調症様陽性症状モデルとして有用であると思われる。一方，NMDA 受容体機能を低下させるため遺伝子改変技術を利用して NR1 の発現量を正常の 5-10% に減少させた NR1 ノックダウンマウス (NR1-ND マウス)，NR1 のグリシン結合部位を点変異させたマウス (NR1 点変異マウス) および NR2A を欠損させたマウス (NR2A-KO マウス) は，野生型マウスと比較して自発運動量が著しく増加していた(16-18) ことから，NMDA 受容体機能の低下に

図1 グルタミン酸作動性神経系シグナル伝達異常と行動障害

より陽性症状様行動障害が起こることが考えられる(表1)。

2) 陰性症状様行動障害

①社会性行動試験と強制水泳試験

別々のケージで飼育され、それまで接触する機会の無かった2匹のマウスやラットを同時に観察ケージに入れると、お互いに匂いを嗅ぐ、毛繕いをする、後をついて歩くといった社会性行動を示す。PCP (2 mg/kg) を3日間連続投与されたラットにおいては、社会性行動の障害が認められ、この社会性行動障害に対する抗精神病薬の効果が、臨床における陰性症状に対する効果と似ていることから、Sams-Dodd は、PCP による社会性行動の低下は陰性症状モデルとして有用であると言っている(19)。我々は、PCP (10 mg/kg) を2週間連続投与したマウスにおいても社会性行動障害が認められ、この障害はPCP最終投与4週間後においても認められることを報告した(20)(表1)。PCP連続投与による社会性行動障害は、非定型抗精神病薬(クロザピン)を1週間投与すると緩解されるが、定型抗精神病薬(ハロペリドール)では緩解されない(20)。

我々は、陰性症状の評価方法として、強制水泳試験も用いている。すなわち、水を入れた狭いシリンダーにマウスやラットを入れると、最初はそこから逃げようと激しく動くが、やがて水に浮かんでいるだけで動かない状態(無動化あるいは絶望状態)になる。抗うつ薬が正常動物の無動時間を減少させることから、強制水泳試験は抗うつ薬のスクリーニングによく使われている。この強制水泳試験における無動化状態の延長

を意欲の低下としてとらえ、陰性症状モデルとして用いている。PCP (10 mg/kg) を2週間連続投与し、最終投与の翌日に強制水泳試験を行なうと、無動状態の著しい増強(意欲低下の増強)が認められ、この無動状態の増強は、PCP投与を中止した後3週間を経ても認められる(13, 21-24)(表1)。PCP連続投与による無動状態の増強は、非定型抗精神病薬によって緩解されるが、定型抗精神病薬や抗うつ薬のイミプラミンでは緩解されないことから、PCP連続投与動物はうつ病モデルではなく統合失調症の陰性症状モデルとして有用であることを報告した(22)。

②PCP連続投与マウスにおける強制水泳ストレス負荷後の細胞内シグナル伝達系の変化

神経伝達物質をはじめとする種々のシグナル分子は、細胞表面の受容体に結合し、細胞内のセカンドメッセンジャーを活性化することによって細胞内で様々な反応を引き起こす。中でも細胞内のカルシウムイオン(Ca^{2+})は、神経細胞における主要なセカンドメッセンジャーとしていくつもの重要な機能を担っている。そのうち重要な経路が、 Ca^{2+} /calmodulin kinase II (CaMKII)の活性化であり、NMDA受容体が刺激されると活性化される。CaMKIIは神経細胞に豊富に存在し、神経伝達物質合成酵素やシナプス小胞結合タンパク、イオンチャネル、神経伝達物質受容体などをリン酸化することによって、それらのタンパクの機能を調節し、記憶・学習をはじめとする精神機能に重要な役割を果たしている(25)。そこで、強制水泳試験でストレスをかけた後に、CaMKIIの活性変化(リン酸化タンパク変化)についてウエスタンブロット法を用いて検討した。生理食塩水連続投与マウスでは強制水泳ストレスをかけると前頭前皮質でCaMKIIのリン酸化タンパクが、非ストレス生理食塩水連続投与マウスのそれに比べて著しく増加していた。しかし、PCP連続投与マウスでは強制水泳による無動状態が増強されたが、リン酸化タンパクの増加は認められなかった。D-サイクロセリンを強制水泳試験前に投与すると、PCP連続投与マウスにおける無動状態の増加と前頭前皮質CaMKIIの不活性化が緩解された。また、PCP連続投与によって前頭前皮質のNR1のリン酸化率が低下していたので、NMDA受容体シグナル伝達系の障害が強制水泳試験の無動状態の増加に関連しているものと考えられる(図1)。社会性行動障害はNR1-NDマウスにおいても観察されているため(16)、前頭前皮質のNMDA受容体シグナル伝達障害は陰性症状様行動障害の共通因子である可能性が考えられる。

3) 認知障害

①水探索試験と恐怖条件付け試験

統合失調症患者では陽性症状や陰性症状ばかりでなく、注意力も低下していると考えられている。水探索試験は、マウスが一度ある環境に曝されたときどれだけその環境を認知しているかを調べるもので、装置の構成についての空間的記憶とその中にある給水用のノズルの位置についての記憶を測定することができる。これらの記憶は自由な探索行動の中でマウスを絶水していなくても獲得されるため、動物の潜在的な学習能力（注意力）を反映すると考えられている。生理食塩水連続投与マウスは、絶水状態で訓練していないのに、テストでは素早く水を見つけ、訓練を受けていないマウスと比較し、飲水までの時間が短くなる。PCP 連続投与マウスでは訓練した時に給水ノズルへの接触回数などの行動には生理食塩水連続投与マウスと差は認められないが、テスト時にノズルを見つけるまでの時間が延び、潜在学習が障害されている。PCP 最終投与から4日間休薬しても、この潜在学習障害は認められる(26)(表1)。非定型抗精神病薬（クロザピン）を訓練試行前に投与すると PCP による潜在学習障害は改善するが、定型抗精神病薬（ハロペリドール）はそのような改善作用を示さない(26)。

マウスに電気ショック（無条件刺激）を与えるとすくみ行動を示す（無条件反応）。次に音（条件刺激）を聞かせてから電気ショックをマウスに繰り返し与えると、音のみを聞かせただけでもすくみ反応（条件反応）を示すようになる。この音刺激は、条件付け前にはマウスにとって何の意味を持たなかったにもかかわらず、音刺激と電気ショックを一緒に与えると、音刺激は恐怖の予告となる。これは連合学習と呼ばれ、恐怖条件付け試験を用いて調べることができる。訓練後に生理食塩水連続投与マウスに音刺激を示すと、すくみ行動をしている時間が訓練時よりも長くなる。PCP 連続投与マウスでは訓練時のすくみ行動は生理食塩水連続投与マウスと差がないが、テスト時にすくみ行動をしている時間は、生理食塩水連続投与マウス比べて短く、連合学習が障害されている(27)(表1)。非定型抗精神病薬（オランザピン）を PCP 最終投与の翌日から7日間連続投与しておくと、PCP による連合学習の障害は改善されるが、定型抗精神病薬（ハロペリドール）はそのような改善作用を示さない(27)。

②PCP連続投与マウスにおける記憶学習試験時の細胞内シグナル伝達系の変化

NMDA 受容体が刺激されると CaMKII 以外に extracellular signaling-regulated kinase (ERK) も活性化

される。恐怖条件付け試験における連合学習の形成には、訓練後の扁桃体の ERK の活性化が重要な役割を果たしていることが知られている(28,29)。そこで、水探索試験あるいは恐怖条件付け試験の訓練をして、PCP 連続投与マウスの前頭前皮質での CaMKII および扁桃体での ERK の活性変化（リン酸化タンパクの変化）について検討をおこなった。生理食塩水連続投与マウスでは前頭前皮質の CaMKII および扁桃体の ERK のリン酸化タンパクは、訓練後に著しく増加していたが、PCP 連続投与マウスではそのようなリン酸化タンパクの増加は認められなかった。一方、NR2A-KO マウスでは、NMDA やグルタミン酸刺激による Ca^{2+} 取り込み量および [^3H]-MK-801 の結合量が、野生型マウスのそれらと比較して著しく減少しており、両学習能も障害されていた(18,30)。NR2A-KO マウスでも前頭前皮質の CaMKII および扁桃体の ERK のリン酸化は、訓練しても変化は認められなかった。NR2A-KO マウスでの結果と合わせて考えると、PCP 連続投与マウスでは訓練しても前頭前皮質の CaMKII および扁桃体の ERK の活性化が認められないのは、PCP 連続投与によって NR1 のリン酸化率の低下などによって NMDA 受容体の機能が低下したことによるものと思われる（図1）。

4) PCP連続投与マウスの前シナプス機能の変化

統合失調症では、後シナプスにおける細胞内シグナル伝達系の異常ばかりでなく、前シナプスにあたる神経突起終末の減少や神経伝達物質の合成、遊離、取り込み機構などの異常も報告されている(31-34)。PCP を単回投与するとグルタミン酸の遊離が増えることが知られているが(35)、PCP を連続投与した後にグルタミン酸の遊離がどのような影響を受けるかについてはほとんど検討されていない。PCP をマウスに14日間連続投与し、最終投与24時間後に前頭前皮質の細胞外のグルタミン酸濃度をマイクロダイアリシス法により解析した。その結果、PCP 連続投与マウスの前頭前皮質の細胞外のグルタミン酸濃度は、生理食塩水連続投与マウスのそれに比べて著しく減少していた。この結果から、PCP の連続投与によってグルタミン酸の再取り込み能が亢進している可能性が考えられる。そこで、グルタミン酸再取り込みに重要なグリア型グルタミン酸トランスポーターである GLAST を免疫組織学的に検討した。PCP 連続投与マウスの前頭前皮質において GLAST が著しく増えていた。ウエスタンブロッティング法においても PCP 連続投与マウスの前頭前皮質で GLAST タンパクが生理食塩水連続投与マウスと比べ著しく増えていた。PCP 連続投与によ

図2 統合失調症モデル動物と行動障害

り前頭前皮質の GLAST が増加した結果, 前頭前皮質における細胞外のグルタミン酸遊離量が減少したものと考えられる (図1).

おわりに

PCP 連続投与動物は陽性, 陰性症状および認知障害などの統合失調症様行動障害を休薬後も持続的に示す (図2). これら行動障害は NMDA 受容体細胞内シグナル伝達障害が関与しており, PCP 連続投与動物はグルタミン酸作動性神経系機能低下仮説に基づいた動物モデルと考えられる (図1). 今後, PCP 連続投与動物モデルにおける行動障害の発現機序を解明することで, 統合失調症の病因の解明および新規治療薬の開発の一助になることが期待される.

文 献

- 1) Javitt DC, et al. Am J Psychiatry. 1991;148:1301-1308.
- 2) Carlsson A, et al. Life Sci. 1997;61:75-94.
- 3) Emamian ES, et al. J Neurosci. 2004;24:1561-1564.
- 4) Akbarian S, et al. J Neurosci. 1996;16:19-30.
- 5) Ohtsuki T, et al. Mol Psychiatry. 2001;6:211-216.
- 6) Rice SR, et al. Mol Psychiatry. 2001;6:274-284.
- 7) Itokawa M, et al. Pharmacogenetics. 2003;13:271-278.
- 8) Heresco-Levy U, et al. Biol Psychiatry. 2004;55:165-171.
- 9) Heresco-Levy U, et al. Biol Psychiatry. 2005;57:577-585.
- 10) Heresco-Levy U, et al. Am J Psychiatry. 2002;159:480-482.
- 11) Takahara R, et al. Neuropsychopharmacology. 2003;28:1117-1124.
- 12) Kitaichi K, et al. Jpn J Pharmacol. 1994;66:181-189.
- 13) Nagai T, et al. Neuroreport. 2003;14:269-272.
- 14) Jentsch JD, et al. Neurosci Lett. 1998;258:175-178.
- 15) Goldman-Rakic PS, et al. Psychopharmacology. 2004;174:3-16.
- 16) Mohn AR, et al. Cell. 1999;98:427-436.
- 17) Ballard TM, et al. J Neurosci. 2002;22:6713-6723.
- 18) Miyamoto Y, et al. J Neurosci. 2001;21:750-757.
- 19) Sams-Dadd F. Neuropsychopharmacology. 1998;18:293-304.
- 20) Qiao H, et al. Neuroreport. 2001;12:11-15.
- 21) Noda Y, et al. Br J Pharmacol. 1995;116:2531-2537.
- 22) Noda Y, et al. Eur J Pharmacol. 1997;324:135-140.
- 23) Noda Y, et al. Neuropsychopharmacology. 2000;23:375-387.
- 24) Wang C, et al. Neuroscience. 2001;107:535-550.
- 25) Wang H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:4287-4292.
- 26) Noda Y, et al. Ann Rep Mitsubishi Pharma Res. Found. 2004;36:127-133.
- 27) Enomoto T, et al. Mol Pharmacol. 2005; in press.
- 28) Atkins CM, et al. Nat Neurosci. 1998;1:602-609.
- 29) Schafe GE, et al. J Neurosci. 2000;20:8177-8187.
- 30) Kiyama Y, et al. J Neurosci. 1998;18:6704-6712.
- 31) Lewis DA, et al. Neuron. 2000;28:325-334.
- 32) Vukosavic S, et al. Neurosci Res. 2001;40:133-140.
- 33) Vawter MP, et al. Mol Psychiatry. 2002;7:571-578.
- 34) Halim ND, et al. Mol Psychiatry. 2003;8:797-810.
- 35) Adams B, et al. J Neurosci. 1998;18:5545-5554.
- 36) Jentsch JD, et al. Neuropsychopharmacology. 1997;17:92-99.
- 37) Noda Y, et al. Soc Neurosci Abstr. 2000;26:3.
- 38) Martinez ZA, et al. Neuropsychopharmacology. 1999;21:28-39.
- 39) Duncan GE, et al. Behav Brain Res. 2004;153:507-519.
- 40) Takeuchi T, et al. Eur J Neurosci. 2001;14:153-160.

毛利 彰宏 (もうり あきひろ)

名古屋大学 大学院医学系研究科 医療薬学 博士課程3年生.

◇2001年 岐阜薬科大学薬学部卒業, '03年 岐阜薬科大学大学院薬学研究科修士課程修了, 同年 名古屋大学大学院医学系研究科博士課程入学, 現在に至る.

◇研究テーマ: 疾患モデルにおける情動・学習機能およびその発症機序の解明

◇趣味: うたた寝とドライブ.