新たなメカニズムに立脚した薬剤の開発へ

新たな病態モデルとしての Cuprizone 短期曝露マウスの解析

手塚 智章

新規統合失調症治療薬創製のためのターゲットバリデーション戦略 3

要約：統合失調症は陽性症状、陰性症状および認知機能障害など特有の症状を示し、再発や再燃を繰り返す難治性の疾患である。既存の抗精神病薬は陽性症状には一定の改善効果を示すが、陰性症状や認知機能に対する効果はまだ不十分である。そのため、統合失調症治療薬はアンメット・メディカル・ニーズが高く、既存薬とは異なる新たなメカニズムに立脚した創薬が重要と考えられる。近年の画像解析技術の進展により、統合失調症患者の脳において、脱髄のような顕著な病変は認められないが、水分子の拡散異方性の低下といった白質の軽度な構造異常が検出された。白質を構成するミエリンは神経伝導速度を上げ、脳内の情報伝達に重要な役割を果たす。また、統合失調症患者では、ミクログリアやアストロサイトの活性化亢進や炎症性サイトカインの上昇が認められることから、炎症反応が亢進していると考えられる。サイトカインは細胞の増殖、分化および細胞死を調節する作用をもつことから、筆者らは統合失調症でみられる白質異常の成因の1つに、脳内炎症を設定した。この仮説に基づき、検証するツールとなり得る動物モデルとして、新たに Cuprizone 短期曝露マウスを構築した。本マウスに対する神経化学的な解析から、本マウスでは脳内で顕著な病変は生じないが、炎症反応が亢進していることが示唆された。また、行動薬理学的な解析から、本マウスでは低用量の精神刺激剤に対する感受性の亢進や認知機能の低下が認められた。これらの結果から、本マウスは統合失調症の少なくとも一部の病態を反映していると考えられる。脳の高次機能が侵される精神疾患を対象とする場合、病態全体を忠実に反映する動物モデルの構築は難しいが、病態のある側面を捉える動物モデルの作製は可能である。病態仮説を設定し、仮説に基づく評価指標を吟味して、新たなメカニズムに立脚

した薬剤の開発を進めることが重要と考える。

1. はじめに

統合失調症は、生涯発病率が約1%の難治性の精神疾患であり、思春期から青年期に好発して再発や再燃を繰り返す。統合失調症の代表的な症状の1つに、幻覚や妄想などの陽性症状がある。これまで統合失調症治療薬として、ドパミン D_2 受容体拮抗作用を機序とする定型抗精神病薬、また、ドパミン D_2 受容体拮抗作用にセロトニン $5-HT_{2A}$ 受容体をはじめとする D_2 以外の受容体への作用を併せ持つ非定型抗精神病薬が開発された。これらの既存薬は、陽性症状に対しては一定の改善効果を示す。しかし、既存薬はパーキンソン病やアカシジアなどの錐体外路系障害、乳汁分泌や性機能障害を生じる可能性のある高プロラクチン血症などの副作用も認められる。また、特に非定型抗精神病薬では肥満、糖尿病および脂質代謝異常などの代謝関連の副作用も認められる。さらに、統合失調症の他の中核症状として、感情鈍麻、社会的引きこもりおよび無気力などの陰性症状と、記憶力、注意力および判断力などが低下する認知機能障害があるが、これらの症状に対する既存薬の効果は、まだ十分ではない。したがって、統合失調症治療薬のアンメット・メディカル・ニーズは未だ高いと考えられている。

統合失調症の病因は特定されていないが、遺伝、素因および社会環境因などが複雑に関与していると想定されている。近年の解析技術の革新や基礎研究の進展により、統合失調症の新たな病態仮説が提示されており、既存薬とは異なるメカニズムに根差した創薬の可能性が高まっている。そこで本稿では、筆者らが着目した統合失調症の異常所見を概説し、その知見に立脚した病態仮説と、それに基づく新たな動物モデルを紹介

キーワード：統合失調症、白質異常、脳内炎症、グリア、動物モデル

田辺三菱製薬株式会社 薬理第一研究所 第二部 (〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地)

E-mail: Tezuka.Tomoaki@mh.mt-pharma.co.jp 原稿受領日：2013 年 8 月 19 日、依頼原稿

Title: Cuprizone short-term exposure: glial activation and psychosis-like behavior Author: Tomoaki Tezuka

介したい。

2. 統合失調症における白質異常

Magnetic resonance imaging (MRI) などの神経画像を用いた研究は、実際の患者の脳の形態を非侵襲的に調べることができる有用な方法である。近年のさらなる画像解析技術の進歩により、水分子の拡散を MRI 信号に反映する技術である拡散テンソル画像 (diffusion tensor imaging : DTI) 技術が発達した(1)。中枢神経系の組織のうち、神経線維の方向が揃っている白質では、細胞膜が水分子の透過を制限するため、神経線維に沿った方向の水分子の拡散は早く、神経線維と直行する方向の拡散は遅い性質を持つ。この水分子の拡散異方性率を測定することで、白質の微細な構造異常を非侵襲的に探ることができるようになり、白質の軽度な病変の検出が可能となった。この DTI 技術を用いた測定から、統合失調症患者の脳において、水分子の拡散異方性の低下が認められ、白質線維の統合性の低下が示されている(2)。

脳は、主に神経細胞と、オリゴデンドロサイト、ミクログリアおよびアストロサイトに代表されるグリア細胞で構成されている。これまで、神経細胞が脳の情報処理の中心的な役割を果たすのに対して、グリア細胞は神経細胞の間を埋め、栄養補給などをサポートする脇役的な存在であると考えられてきた。しかし、近年では、グリア細胞にも多様な神経伝達物質の受容体が発現していることや、受容体へのリガンド結合を経てグリア細胞自身も活性化することが明らかとなった(3,4)。これらの報告から、グリア細胞は脳機能に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。グリア細胞の1つであるオリゴデンドロサイトは、神経細胞の軸索周囲にミエリンと呼ばれる白い絶縁層を形成する。この絶縁性のミエリンが軸索を覆うことにより、個々の神経細胞の跳躍伝導を引き起こし、脳の高速演算を可能にする。ミエリンは脳の情報処理を速めるために進化の過程で獲得された構造であり、ミエリンに富んだ白質は、脳機能の発達したヒトで特に発達している。統合失調症患者においては白質に軽度な異常が認められることから、白質の異常は脳機能が障害される統合失調症ならびに周辺症状の病因となっている可能性が考えられている。

3. 統合失調症における炎症亢進

グリア細胞のうち、ミクログリアおよびアストロサイトは、主に脳内の免疫防御を担っている細胞である。これらの細胞は脳内で炎症がおきると形を変えて活性

化し、サイトカインやケモカインに代表される細胞を傷害する複数の因子を放出して神経細胞の機能不全や細胞死を引き起こす(5)。活性化したミクログリアおよびアストロサイト（両者をまとめて、以降、炎症性グリアとする）には末梢性ベンゾジアゼピン受容体が発現する。近年、新たに開発された末梢性ベンゾジアゼピン受容体の positron emission tomography (PET) リガンドを用いた解析結果から、統合失調症患者において炎症性グリアが亢進していることが明らかとなった(6,7)。

母体感染、新生児酸素欠乏および脳損傷などは、統合失調症の環境要因として知られている。これらは、いずれもサイトカインを誘導し、炎症反応を引き起こす(8,9)。また、サイトカインを胎仔期あるいは新生仔期に投与された動物は、成熟後に認知機能異常を示す(10)。サイトカインは、種々の細胞の分化、神経発達、シナプス可塑性および細胞死を調節するなど多彩な役割を果たしていることが知られており、脳発達や脳機能に影響を及ぼすと考えられている。また、統合失調症患者を用いたメタ解析において、統合失調症の初発期や再発急性期に、血中や脳脊髄液中で IL-6、IL-1 β および TNF- α などの炎症性サイトカインが亢進していることが報告されている(11-13)。

これらの報告から、脳内での炎症反応の亢進は、統合失調症患者で認められる精神症状の原因の1つと考えられており、脳内での炎症反応のメカニズム解明は、重要な研究として注目されている。また、この研究の発展は、既存薬とは異なる作用機序を持つ、新たな治療薬の開発につながる可能性を持つことが期待されている。

4. クプリゾン短期曝露マウスの解析

以上の知見から、筆者らは、統合失調症でみられる白質障害の成因の1つとして脳内炎症に着目した。そこで、脳内炎症を病態仮説に設定し、検証試験のツールとなり得る動物モデルとして、クプリゾン短期曝露マウスを構築した(14)。

銅キレーターであるクプリゾンをマウスに長期間混餌投与すると、脳において炎症性グリアや炎症性サイトカインの亢進が認められ、ミエリンが減少して脱髄を生じる。このマウスは、脱髄性疾患である多発性硬化症の動物モデルとして、これまで研究に用いられてきた(15-17)。筆者らは、統合失調症患者における軽度な白質障害をマウスで再現する目的で、従来の報告よりも短期間クプリゾンをマウスに曝露した。具体的には、8週齢の C57BL/6J 雄性マウスに 0.2%クプリゾ

ン混餌を1週間与え、このマウスをクプリゾン短期曝露マウスとした。比較対照のマウスには正常餌を1週間与えた。これらマウスの脳の凍結切片を作製し、Black-Gold 染色を用いてミエリンを染色した。その結果、両群の間でミエリンの染色強度に違いは認められなかった。また、電子顕微鏡を用いて軸索の g-ratio (軸索の直径/軸索とミエリンの直径) を計測した結果、両群間の個々の軸索の g-ratio に違いは認められなかった。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスの脳では脱髄は生じていないことが考えられた。

このクプリゾン短期曝露マウスに対し、ミクログリアのマーカーとして ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Ibal) 抗体を用いて、また、アストロサイトのマーカーとして glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いて、脳切片を染色した。その結果、対照マウスに比べ、クプリゾン短期曝露マウスにおいて、Ibal 陽性細胞および GFAP 陽性細胞のいずれの数も有意に増加しており、ミクログリアやアストロサイトは活性化していることが示唆された。さらに、定量 PCR 法を用いて、海馬および線条体での Ibal および GFAP 遺伝子の発現量を測定した。その結果、遺伝子レベルでも、免疫組織染色での結果と同様に、クプリゾン短期曝露マウスの両部位において、Ibal および GFAP のいずれも有意な発現上昇が認められた。また、炎症性サイトカインである IL-6 遺伝子も、定量 PCR 法により、クプリゾン短期曝露マウスの海馬および線条体において、有意な発現上昇が認められた。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスの脳内では、炎症反応が亢進している可能性が示唆された。

以上の神経化学的な特徴を示すクプリゾン短期曝露マウスを用い、急性の精神症状の指標として、低用量の精神刺激剤に対する感受性を測定した。ドパミンシグナルを賦活するメタンフェタミンを精神刺激剤として用い、0.3 mg/kg 皮下投与した後、60 分間の運動量を測定した結果、クプリゾン短期曝露マウスにおいて運動量の有意な増加が認められた。また、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体拮抗薬であるフェンサイクリジンを精神刺激剤として用い、2.5 mg/kg 皮下投与した後、同様に 60 分間の運動量を測定した。その結果、対照マウスに比べ、クプリゾン短期曝露マウスにおいて運動量の有意な増加が認められた。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、ドパミン賦活作用および NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗作用のいずれにおいても、感受性が亢進することが示唆された。

次に、クプリゾン短期曝露マウスを用い、空間作業

記憶の指標として、Y字迷路試験を実施して、自発交替反応を測定した。クプリゾン短期曝露マウスおよび対照マウスをY字の1つのアームに置き、自由に5分間移動させ、マウスのアームへの侵入回数を計測した。その結果、アームへの総侵入回数は両群間に違いはなかったが、3回連続で異なるルートを選択する自発交替率は、クプリゾン短期曝露マウスにおいて有意な低下を示した。さらに、再認記憶の指標として、新奇物体認識試験を実施して、探索嗜好性を測定した。あらかじめ馴化させておいたマウスを、その翌日に同一の観察箱に入れて、2個の同一物体を自由に探索させ、その3時間後に、片方の物体を新奇な物体に変え、再度マウスを観察箱に入れて5分間の探索を行わせた。その結果、クプリゾン短期曝露マウスは、対照マウスに比べて、新奇な物体に対する探索嗜好性に有意な低下が認められた。これら2つの試験結果から、クプリゾン短期曝露マウスは認知機能が低下していることが示唆された。

以上の結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、脳において脱髄といった顕著な病変は生じないが、炎症反応が亢進しているという神経化学的な特徴を持つことが示唆された。少なくとも一部の統合失調症患者においても、脱髄は認められずに、炎症性グリアあるいは IL-6 をはじめとする炎症性サイトカインが上昇している特徴を示す。また、クプリゾン短期曝露マウスは、低用量の精神刺激剤に対する感受性の亢進や認知機能の低下といった、ヒトで認められる一部の精神症状を反映した異常行動を示すことが示唆された。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、炎症反応の亢進を反映した新たな病態モデルの1つとしての可能性が示唆される。炎症亢進から異常行動に至るメカニズムには更なる研究が必要であるが、本モデルを用いた解析を進めることは、精神疾患の新たな病態理解、さらには既存薬とは異なるメカニズムに根差した新たな作用機序をもつ薬剤の開発に役立つことが期待される。

5. おわりに

ヒトの病態理解、特に細胞や分子レベルから病態が形成される過程を明らかにするためには、動物を用いた研究は重要である。しかし、ヒトと動物では脳の構造上、特に大脳皮質の構造に顕著な違いがあるため、ヒトの高次脳機能の多くは、マウスでは再現困難である。そこで、高次脳機能が侵される統合失調症に対しては、設定した病態仮説に対応する神経病理学的所見や中間表現型などの指標を利用して適切に評価する必

要があり、また、得られる情報の意義を十分に吟味して捉える必要がある。動物モデルを用いて、ヒトの病態の全体像を捉えることは難しいが、ある一面を捉えることは可能と考えられる。さらなる基礎研究の進展とともに評価ツールを拡充し、病態仮説に根差した創薬ストラテジーを取ることで、アンメット・メディカル・ニーズを満たす薬剤の開発を实践したいと考える。

著者の利益相反：手塚智章（田辺三菱製薬株式会社）。

文 献

- 1) Jellison BJ, et al. AJNR Am J Neuroradiol. 2004;25:356-369.
- 2) Ellison-Wright I, et al. Schizophr Res. 2009;108:3-10.
- 3) Fields RD, et al. Science. 2002;298:556-562.
- 4) Verhratsky A, et al. Trends Neurosci. 1996;19:346-352.
- 5) Becher B, et al. Glia. 2000;29:293-304.
- 6) Doorduyn J, et al. J Nucl Med. 2009;50:1801-1807.
- 7) Kreisl WC, et al. J Cereb Blood Flow Metab. 2013;33:53-58.
- 8) Meyer U, et al. J Neurosci. 2006;26:4752-4762.
- 9) Dammann O, et al. Pediatr Res. 1997;42:1-8.

- 10) Watanabe Y, et al. Psychiatry Clin Neurosci. 2010;64:217-230.
- 11) Miller BJ, et al. Biol Psychiatry. 2011;70:663-671.
- 12) Garver DL, et al. Neuropsychopharmacology. 2003;28:1515-1520.
- 13) Lin A, et al. Schizophr Res. 1998;32:9-15.
- 14) Tezuka T, et al. Neurobiol Dis. 2013;59:63-68.
- 15) Koutsoudaki PN, et al. Neurosci Lett. 2009;451:83-88.
- 16) Liu L, et al. Nat Neurosci. 2010;13:319-326.
- 17) Matsushima GK, et al. Brain Pathol. 2001;11:107-116.

著者プロフィール

手塚 智章（てづか ともあき）

田辺三菱製薬株式会社 薬理第一研究所 第二部。

◇ 1999 年新潟大学大学院自然科学研究科博士前期課程修了。同年三菱化学株式会社入社。医薬基盤研究所勤務。2007 年より田辺三菱製薬株式会社、薬理研究所勤務。◇研究テーマ：中枢神経系疾患、特に統合失調症治療薬の研究開発。分子・細胞生物学的手法を用いた創薬研究。◇趣味：サッカー。