

治験の段階にある抗がん剤が統合失調症モデル動物にも効果 思春期のマウスで過剰なシナプス除去を予防

1. 発表者：

林（高木） 朗子（東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 構造生理部門 助教）

2. 発表のポイント：

- ◆マウスにおいて統合失調症の発症関連遺伝子の機能を抑制すると、思春期に相当する時期にシナプス（注1）が過剰に除去されることを見出しました。
- ◆このマウスに新規抗がん剤候補薬を投与すると、過剰なシナプスの除去と感覚運動情報制御機能（注2）の障害が予防されました。
- ◆「シナプスを保護する」という従来の統合失調症の治療戦略にない新たな観点は、早期介入による治療有用性を示唆しました。

2. 発表概要：

統合失調症は思春期から成人にかけて100人に1人が発症し、幻聴や妄想、意欲低下、認知機能障害などのさまざまな精神神経症状により社会生活が障害される精神疾患です。統合失調症の発症には遺伝因子が関与し、そして前頭野における神経細胞の接合部位（シナプス）が減少していることが報告されているものの、遺伝子の機能不全がどのように思春期の神経回路網形成に影響をあたえ、統合失調症への発症につながるのかは解明されていません。

東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター構造生理学部門の林（高木）助教らの研究グループは、マウスにおいて統合失調症の発症関連分子として確立されている遺伝子DISC1（注3）が機能不全に陥ると、思春期にシナプスが過剰に除去され、成体時にはシナプス密度が大きく減少することを見出しました。PAK阻害剤であるFRAX486（注4）は、この過剰なシナプスの除去を予防し、統合失調症に関連する症状の一つである感覚運動情報制御機能の障害も改善させました。

これまでの統合失調症の創薬はドーパミン遮断薬を中心とした開発が進められてきましたが、その効果は限定的でした。PAK阻害剤は各種がんに対する治験がすでに進行しており、正常の細胞機能に対する影響が少ない安全性の高い薬剤であることが示されつつあります。本研究は、「シナプスを保護する」という従来の統合失調症の治療戦略にない新たな観点により、特に早期介入による治療効果、ならびに既存の創薬の相乗効果の可能性を示唆し、今後の統合失調症の治療戦略に応用されることが期待されます。

本研究は、米国ジョンズホプキンス大学医学部統合失調症センター長の澤明教授、米国ベンチャー企業Afraxis, Incらによる共同研究グループの成果です。

4. 発表内容：

<研究の背景と経緯>

統合失調症は思春期から成人にかけて100人に1人が発症し、幻聴や妄想、意欲低下、認知機能障害などのさまざまな精神神経症状により社会生活が障害される精神疾患です。統合失調症の発症には遺伝因子が関与し、前頭野における神経細胞の接合部位（シナプス）に見られるスパイン（注1）と呼ばれる小突起構造が減少していることが報告されているものの、遺伝子

の機能不全がどのように思春期の神経回路網形成に影響をあたえ、最終的な疾患病態へ進行するのは解明されていません。

そこで統合失調症の発症関連分子として確立されている遺伝子 DISC1 に注目し、神経培養細胞や生きたままのマウス前頭葉のライブ撮影を行うことで、DISC1 の機能を抑制した神経細胞におけるシナプスの動態を観察し、その分子基盤の解明を試みました。

<研究方法と発見の内容>

はじめにラット大脳皮質の神経細胞初代培養系で DISC1 の機能を抑制し、神経細胞のスパインのサイズや密度を測定しました。DISC1 の機能が抑制されていない対照細胞と比較して、DISC1 が抑制された神経細胞ではスパインのサイズ・密度ともに大きく減少しており、統合失調症患者の死後脳で見られる現象と矛盾しない所見を得ました。DISC1 の機能を抑制した神経細胞では、PAK（注4）と呼ばれる酵素の機能が上昇していることがウエスタンブロット法（注5）で確認できたため、PAK の働きを阻害することによって、DISC1 の機能を抑制することによりスパイン減少を予防する可能性を検証しました。シナプス保護の効果を指標に PAK 阻害剤をスクリーニングし、3種類の化合物を見出しました。そして、これらの3種類の化合物（FRAX120、355、486、注4）は、DISC1 の機能の抑制によるスパインサイズや密度の減少を予防できるだけでなく、すでに縮小しているスパインのサイズを正常化する作用を有し、シナプス保護作用を介して統合失調症様症状の新しい治療戦略になりうるのではないかと、という仮説を検証しました。

この仮説を検証するためにまず、2光子レーザー顕微鏡（注6）を用いてマウスの DISC1 の機能を抑制した神経細胞を生きたままその動きをライブ撮影しました（図A）。生後間もない人やマウスなどの動物の脳には過剰なシナプスが存在しますが、神経発達とともに必要なシナプスは強められ、不要なシナプスは除去（シナプスの刈り込み）されて、神経回路は成熟することが知られています。本研究グループにおいても、DISC1 の機能を抑制していない対照マウスでは、生後35日（マウスの思春期に相当）から生後60日目（マウスの成体期に相当）にかけて約1割程度のシナプスが刈り込まれることを観察しました。一方で、DISC1 の機能を抑制したマウスでは生後35日において既にスパイン密度が減少しており、生後60日になるとそのうちの4割ものスパインがさらに刈り込まれ、成体時にはスパイン密度が対照マウスと比較し半数以下になることを見出しました（図B）。同一の個体群に感覚運動情報制御機能の指標である PPI（注7）を測定したところ DISC1 の機能を抑制したマウスでは PPI の障害が見られました。

次に、DISC1 の機能を抑制したマウスにおける PAK 阻害剤の効果を検証するために、上記化合物のうち FRAX486 を生後35日から60日まで連日腹腔に投与したところ、過剰なスパインの刈り込みは完全に予防され、PPI の障害は部分的に正常化することを見出しました（図C）。PAK 阻害効果のない偽薬を投与しても上記の効果は認められなかったため、シナプス保護効果や PPI 改善効果は、PAK を阻害することにより得られたものと考えられます。

<今後の展開>

これらの結果は、FRAX486 という PAK 阻害剤がシナプス密度の減少を防止し、さらに統合失調症に関連する症状をも予防できることを示唆します。これまでの統合失調症の創薬はドーパミン遮断薬を中心とした開発が進められてきましたが、その効果は幻覚や妄想などの陽性症状に限定的で、意欲低下や認知障害などの患者の社会予後に直結した精神機能にはほとんど奏功しないことが良く知られています。本研究の PAK 阻害剤は前頭野のシナプス密度減少を予防できることより、統合失調症患者で生じている神経回路網の異常を予防できる可能性があります。また PAK 阻害剤は各種がんに対する治験がすでに進行しており、正常の細胞機能に対する影響が少ない安全性の高い薬剤であることが示されつつあります。これらの知見を精神神経疾患創

薬へ応用することで、シナプス保護という新しい観点より見た統合失調症の治療戦略が加速されると期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「米国科学アカデミー紀要（英語：Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America、略称：PNAS）」

論文タイトル：PAKs inhibitors ameliorate schizophrenia-associated dendritic spine deterioration in vitro and in vivo during late adolescence.

著者：Akiko Hayashi-Takagi, Yoichi Araki, Mayumi Nakamura, Benedikt Vollrath, Sergio G. Duron, Zhen Yan, Haruo Kasai, Richard L. Huganir, David A. Campbell, and Akira Sawa

6. 問い合わせ先：

林 朗子（はやし あきこ）※旧姓使用（本名：高木）

東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター 構造生理学部門 助教

TEL：03-5841-1440

電子メール：hayashi888@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

（注1）シナプス、樹状突起スパイン：

シナプスとは神経細胞間に形成されるシグナル伝達などの神経活動に関わる接合部位とその構造です。人の大脳皮質では膨大な数の神経細胞が約60兆のシナプスを介して連絡した神経回路網を形成しています。シナプスは興奮性シナプスと抑制性シナプスに大別され、興奮性シナプスとは、シナプス伝達によってシナプス後細胞を脱分極させ、活動電位の発火を促進するシナプスのことです。大脳皮質の興奮性シナプスの約8割は、スパインという小突起構造を形成し、スパインは学習・経験に応じてその形態・サイズが劇的に変化し、それに伴い電気的伝達効率を変化させます。それ故に、スパインは脳機能の記憶素子と考えられ、統合失調症の死後脳ではスパイン密度が低下していることが繰り返し報告されていました。

（注2）感覚運動情報制御機能（sensorimotor gating）：

生体には「感覚のフィルター機能」が備わっており、必要な感覚しか認知されません。これは、重要でない過剰な信号が大脳皮質に行かないように感覚入力を制限するものであり、この機能が障害されると重要度の低い感覚刺激を排除して必要とされる感覚に注意を向けるといった、普段私たちが無意識に行っている注意や集中などの認知情報処理が障害されるとされています。統合失調症ではこの感覚フィルター機能の障害があるため、認知機能の低下や思考障害、さらには幻聴などの発生機序の一因として示唆されています。感覚フィルター機能はプレパルス抑制テスト（PPI）によって定量化できます。

（注3）DISC1：

統合失調症やうつ病が多発するスコットランドの大家系の連鎖解析により同定された疾患関連遺伝子。神経発達期の神経細胞で機能し、神経遊走や神経突起伸展、またシナプス形成に関与することが知られています。シナプスにおいては、DISC1はグルタミン酸作動性シナプスのシナプス後肥厚部に局在し、シナプス形態可塑性の主要な制御分子Kal-7と結合し、その下流分子であるRac1やPAKシグナルを調整することが報告されていました（Hayashi-Takagi A et al, 2010, Nature Neurosci； Brandon NJ and Sawa A, 2011, Nature Rev Neurosci）。

(注4) PAK、FRAX120、355、486 :

PAK (p21 activated kinase) は細胞骨格の構築に関わるリン酸化酵素 (キナーゼ) で、Rac のエフェクタータンパク質として機能し、多くのアクチン調節タンパク質をリン酸化します。PAK は各種のがんの増殖に必須であるが、正常な細胞の増殖には必須でないことが明らかになりつつあり、つまり、このキナーゼを阻害/遮断する物質は従来の化学療法剤と異なって副作用の低いがん治療薬になる可能性を秘め、PAK 遮断剤は各種のがんで治験が進行しています。一方で、PAK は神経細胞にも豊富に存在し、アクチン細胞骨格系を介してシナプス形態を制御することが知られています。X 染色体の異常に起因する遺伝性精神発達障害である脆弱 X 症候群においても樹状突起スパインの形態異常が報告されており、PAK 阻害剤は同モデルマウスの症状を抑制することも注目を集めています (Dolan BM et al, 2013, PNAS)。

FRAX は米国ベンチャー企業 Afraxis, Inc の開発した PAK 阻害剤であり、その中でも FRAX486 は血液脳関門の透過性に優れているため、腹腔への投与により脳内の PAK 機能を制御できる働きがあります。

(注5) : ウェスタンブロット法

電気泳動によって分子量のサイズにより分離したタンパク質を膜に転写し、任意のタンパク質に対する抗体でそのタンパク質の発現やリン酸化状態などを検出する手法。

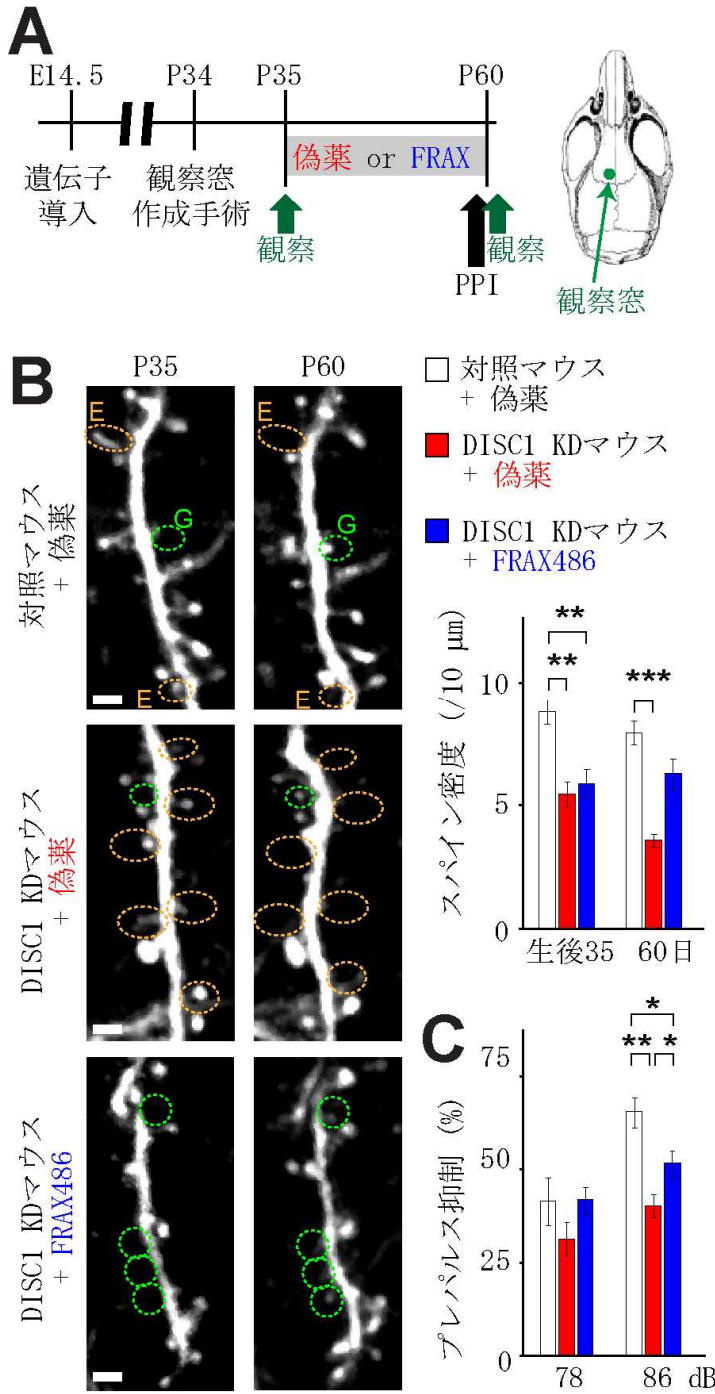
(注6) 2光子励起顕微鏡 :

2光子励起顕微鏡とは、物質励起に2光子吸収過程を利用した顕微鏡であり、通常の1光子励起に必要な波長の2倍以上の長波長レーザー光で励起します。光の散乱は波長の4乗に反比例するので、例えば1光子励起レーザー500 nm (ナノメートル) に対して、2光子励起に用いる1000 nm レーザー光では組織の散乱は原理的に1/16倍へ減少するため、通常の蛍光顕微鏡では組織表面からせいぜい数十 μ m (マイクロメートル) であった深部到達度が、1mm程度までの深部の画像を取得でき、また長波長であるがゆえに光毒性も大きく軽減するという利点を備えた顕微鏡です。このような生体観察には圧倒的に有利な特性のため、生きたままの脳を内部まで比較的低い侵襲度でライブ撮影が可能になりました。さらには同一の個体の行動を同時に解析することにより、脳の内部で見られた現象と行動レベルでの現象を同時に観察し、両者の関係を模索できます。

(注7) プレパルス抑制 (prepulse inhibition、PPI) :

突然の驚愕音への反応を、その直前に、同種かつ驚愕を引き起こさない程度の弱い刺激を与えることによって抑制する現象をいい、上記の感覚運動情報制御機能 (sensorimotor gating) を反映する指標の一つと考えられています。PPI は人間やマウスなどのモデル動物でも定量的に数値化することが可能な生物学的指標であり、統合失調症などの精神疾患の患者でPPIが低下していることが報告されています。

8. 添付資料：



図A マウスのライブ撮影実験

前頭野の神経細胞で DISC1 の機能が抑制されるようにマウスを遺伝子改変した。マウスの生後 34 日目に 2 光子レーザー観察のための観察窓を前頭野上に作製した。生後 35 日から 60 日にかけて偽薬もしくは FRAX を投与。生後 35 日と 60 日にスピンの形態および密度を観察、60 日には PPI を測定した。

図B 2光子レーザー顕微鏡によるスピン撮影

生後 35 日の時点で、DISC1 の機能を抑制したマウス (DISC1 KD マウス) のスピン密度は減少していた。生後 35 日から 60 日にかけてのスピンの刈り込みが、DISC1 の機能を抑制していない対照マウスでは 1 割弱であることに比べて、DISC1 KD マウスでは 4 割に達し、生後 60 日の時点では対照マウスの半数以下しか残存しないことが観察された。FRAX486 の投与により DISC1 KD マウスのスピン減少は完全に予防できた。図内の E はスピン消失を、G はスピン新生を示す。

図C プレパルス抑制試験 (PPI)

DISC1 の機能を抑制したマウスで検出された PPI の異常は、FRAX486 投与により部分的にだが統計学的に有意に改善された。

<本研究の主な助成事業>

科学研究費補助金 新学術領域『マイクロエンドフェノタイプによる精神病態学の創出』

研究代表：喜田 聡 (東京農業大学 応用生物科学部バイオサイエンス学科 教授)

(林 (高木) は、計画研究者として参加)

戦略的創造研究推進事業

さきがけ『脳神経回路の形成・動作と制御』

領域代表：村上 富士夫 (大阪大学大学院生命機能研究科 教授)

(林 (高木) は、さきがけ研究者として参加)