

上皮成長因子を使った新規統合失調症モデル動物の 抗精神病薬・感受性スペクトラム

任 海 学

新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

(主任：那波宏之教授)

Antipsychotic Profile of Novel Schizophrenic Animal Model Made by Epidermal Growth Factor

Manavu TOHMI

Division of Molecular Neurobiology,

Brain Research Institute, Niigata University

要 旨

プレパルスインヒビション (prepulse inhibition; PPI) は、ヒトやラットなど動物種を超えて簡便におこなうことが出来る知覚フィルター機能の測定法である。PPIは統合失調症患者や関連する精神疾患において低下することが広く知られている。上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) を幼少期に末梢慢性投与したラットは、成熟後に PPI の低下など統合失調症に類似した様々な認知行動異常を引き起こす。そこで本研究では非定型抗精神病薬のクロザピン, リスペリドンに加えて、抗精神病薬として開発が進んでいる 2 型シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase-2; COX-2) 阻害薬であるセレコキシブ (celecoxib) と、カンナビノイド受容体 CB1 のアンタゴニストである AM251 を成熟後の幼少期 EGF 投与ラットに慢性投与し、EGF 誘発性 PPI 異常に対する改善効果の評価をおこなった。その結果、非定型抗精神病薬であるクロザピンおよびリスペリドンは、PPI 異常を改善することが判明した。この実験結果は、統合失調症患者の知覚フィルター異常に対して非定型抗精神病薬が改善効果を有するという臨床的知見と整合性がある。一方、セレコキシブと AM251 の慢性投与では、幼少期 EGF 投与ラットの PPI 異常に対する改善効果は認められなかった。このことからプロスタグランジンシグナルやカンナビノイド系は、幼少期 EGF 投与ラットの PPI 異常に関与していないことが示唆された。

以上の結果から幼少期 EGF 投与ラットは、統合失調症に対する治療薬の開発に利用できる有用な動物モデルとなりうることが示された。

キーワード：プレパルスインヒビション, 上皮成長因子, 統合失調症, シクロオキシゲナーゼ, カンナビノイド受容体, 非定型抗精神病薬

Reprint requests to: Manavu TOHMI
Division of Molecular Neurobiology
Brain Research Institute
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学脳研究所分子神経生物学分野

任 海 学

緒 言

ヒトや霊長類・げっ歯類では、情報が外部環境から中枢神経系へ入力される過程において、不必要な情報を取り除く知覚フィルター機能が備わっている。この知覚フィルターを実験的に評価する方法として、音刺激驚愕反応のプレパルスインヒビション (prepulse inhibition; PPI) がある。PPI とは、音刺激による驚愕運動反射が、それに先立ち与えられた小さな音刺激 (プレパルス) により減衰する現象である。PPI は、ヒトやげっ歯類など広く動物種を超えて同様の刺激により測定することができる¹⁾。PPI は統合失調症患者で低下することがよく知られている²⁾。このことから近年では、統合失調症のモデル動物の評価法として多用されるようになった³⁾。

最近になり幼少期に上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) を末梢に慢性投与したラットが、新たに統合失調症動物モデルとして利用されていることが報告されている。このラットは成熟後、PPI の低下や統合失調症にみられるような認知機能異常を示す⁴⁾。この PPI の異常は非定型抗精神病薬のクロザピンにより改善したが、定型抗精神病薬のハロペリドールでは効果がなかった⁴⁾。

アラキドン酸からプロスタグランジン合成するシクロオキシゲナーゼ-2 (cyclooxygenase-2; COX-2) は、EGF により強力に誘導される。Muller らは、COX-2 阻害剤がリスペリドンとの共投与で統合失調症患者の精神状態を著しく改善することを報告し、抗精神病薬としての開発を開始している⁵⁾。また内在性カンナビノイド受容体 CB1 は抑制性神経伝達を中心にその修飾を行い、中枢神経系における情報処理に参与している。近年、内在性カンナビノイドと統合失調症の因果関係が示唆されている。内在性カンナビノイドの過活動により、統合失調症でみられるようなドーパミン伝達系の過活動が引き起こされるといわれる⁶⁾。統合失調症の薬理モデルにおいて、CB1 選択的アンタゴニストにより open field activity の増大が抑えられることが報告されている⁷⁾。

本実験では、新たに非定型抗精神病薬であるリスペリドンと選択的 COX-2 阻害薬であるセレコキシブ (celecoxib) および CB1 受容体選択的アンタゴニストである AM251 を幼少期 EGF 投与ラットに投与し、EGF 誘発性 PPI 低下に対する薬理効果の比較評価をおこなった。

材料と方法

・動物

生後 2 日齢の Sprague-Dawley ラットを母親とともに日本 SLC 株式会社より購入した。明暗周期を 12 時間に保ち、水と餌を自由摂取できる環境で飼育した。

・薬物投与

組換えヒト EGF (ヒゲタ醤油) は PBS で希釈し、生後 2 日から 10 日目までの 9 日間、0.875 mg/kg 体重 (投与量 12.5ml/kg 体重) で頸部に皮下投与した。対照群 (con) として同腹仔に同様の方法で PBS を投与した。

EGF 投与ラットおよび対照群の 8 週齢時にクロザピン (CZP), リスペリドン (RIS), セレコキシブ (CLX), AM251 (AM) の投与をおこなった。クロザピン, セレコキシブは 7 日間, リスペリドン, AM251 は 10 日間, 1 日 1 回投与をおこなった。クロザピン (Sigma Chemical Co) は 0.025M 塩酸に溶かし水酸化ナトリウムにより pH6.0 に調整し, 2.5mg/kg で腹腔内投与をおこなった。リスペリドン (ヤンセンファーマ株式会社) は 0.025M 塩酸に溶かしたのち水酸化ナトリウムにより pH7.0 に調整し, 1mg/kg で腹腔内投与した。セレコキシブ (製品名 CELBREX, Pharmacia Australia) は生理食塩水に溶かし, 混濁している溶液を 3.3mg/kg 用量で経口投与した。AM251 (Tocris Cookson Inc) は DMSO に溶解し, 1mg/kg で腹腔内投与をおこなった。未投薬群 (veh) には生理食塩水の腹腔内投与 (7 日間) をおこなった。

・音刺激驚愕反応及び PPI 測定

クロザピン, リスペリドン, セレコキシブ, AM251, 生理食塩水の最終投与から 24 時間以上 (セレコキシブは 1 時間) 経過してから, 音刺激

驚愕反応とPPIの測定をおこなった。音刺激驚愕反応とPPIは、小動物用驚愕反応測定装置(SR-LAB systems, 米国サンディエゴ社)を用いて測定した。驚愕強度とPPI反応への音刺激には、120dBの音刺激を用いた。未刺激のバックグラウンドノイズを70dBとし、プレパルスをバックグラウンドノイズより5, 10, 15dB高い刺激(75, 80, 85dB)で設定した。測定は次の5条件を1試行として8試行行った。(i) 120dBのみの音刺激を40ミリ秒(ii)-(iv) 20ミリ秒のプレパルス(75, 80, 85dB)刺激の100ミリ秒後に120dBで40ミリ秒(v) バックグラウンドノイズ(70dB)のみ; 未刺激驚愕強度のPPIパーセンテージは次のように計算した; $100 - [(\text{プレパルス刺激のあるときの驚愕強度} - \text{未刺激時の振動強度}) / (\text{120dBのみの刺激時の驚愕強度} - \text{未刺激時の驚愕強度})] \times 100$

・統計

全ての数値は平均値±標準誤差で提示。データの解析は一元配置分散分析あるいは重複分散分析を用い、その後Tukey検定もしくはDunnet検定をおこなった。

結 果

幼少期にEGFを慢性投与したラットに対し8週齢の時点で7日間生理食塩水(veh)投与(i.p)をした後、音刺激驚愕反応の測定をおこなった。対照群(con/veh)と比較して、EGF投与群(EGF/veh)の音刺激驚愕反応強度は有意に増大していた(図1a)(Tukey検定 $p < 0.001$)。また同時に、幼少期EGF投与ラットのPPIの有意な低下を観察した(図1b)(Tukey検定 $p < 0.001$)。

・クロザピン投与実験

EGF投与したラットに対し8週齢時に非定型抗精神病薬であるクロザピン(CZP)の慢性投与をおこない、その後音刺激驚愕反応の測定をおこなった。対照群に対するクロザピン投与(con/CZP)は、音刺激驚愕反応強度およびPPIに影響を与えなかった(con/CZP vs con/veh(図1データ) Dunnet検定 音刺激驚愕反応強度 $p = 0.999$, PPI

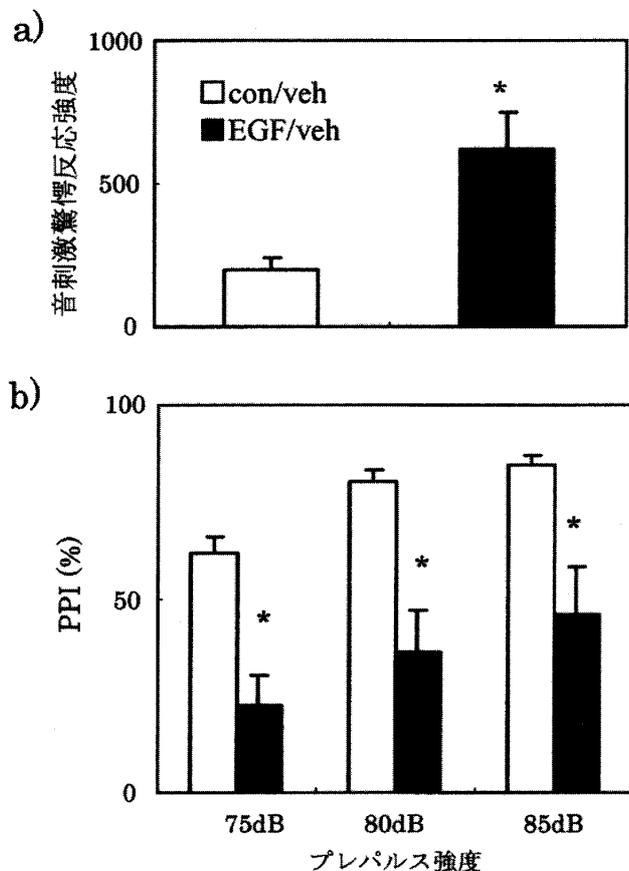


図1 幼少期EGF投与ラットの成熟後の音刺激驚愕反応

a) 幼少期EGF投与ラットの成熟後の音刺激驚愕反応強度(対照群(con/veh) 202 ± 40 , EGF群(EGF/veh) 618 ± 136). b) 同ラットのPPI (con/veh 75dB; 62 ± 4.0 , 80dB; 80 ± 2.9 , 85dB; 84 ± 2.6 , EGF/veh 75dB; 22 ± 8.2 , 80dB; 37 ± 10.6 , 85dB; 46 ± 12.5). 棒グラフ白抜き; con/veh, 黒; EGF/veh, *; $p < 0.05$ (vs con/veh)

$p = 0.902$). EGF投与群の音刺激驚愕反応強度はクロザピン投与(EGF/CZP)後も、対照群(con/CZPもしくはcon/veh)に対し増大していた(図2a)(Tukey検定 $p < 0.015$, Dunnet検定 $p < 0.001$). それに対しEGF投与ラットのPPIの異常な低下は、クロザピン投与により有意に改善されていた(図2b)(EGF/CZP vs con/CZP Tukey検定 $p = 0.850$, EGF/CZP vs con/veh Dunnet検定 $p = 0.488$, EGF/CZP vs EGF/veh

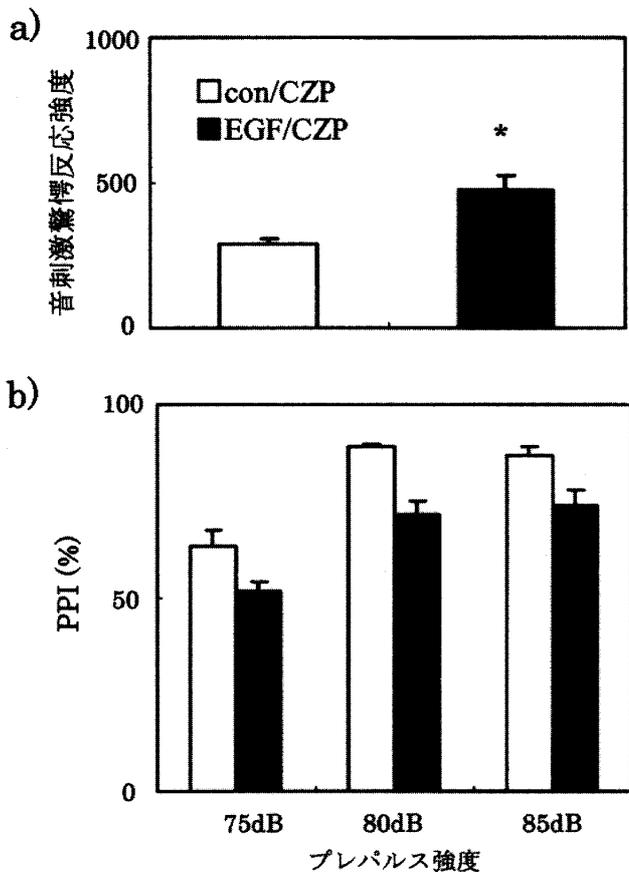


図2 幼少期 EGF 投与ラットに対するクロザピン投与実験

a) 成熟後クロザピンの慢性投与をおこなった幼少期 EGF 投与ラット (EGF/CZP) および対照群 (con/CZP) の音刺激驚愕反応強度. b) 同ラットの PPI. 棒グラフ白抜き; con/CZP, 黒; EGF/CZP, *; $p < 0.05$ (vs con/CZP)

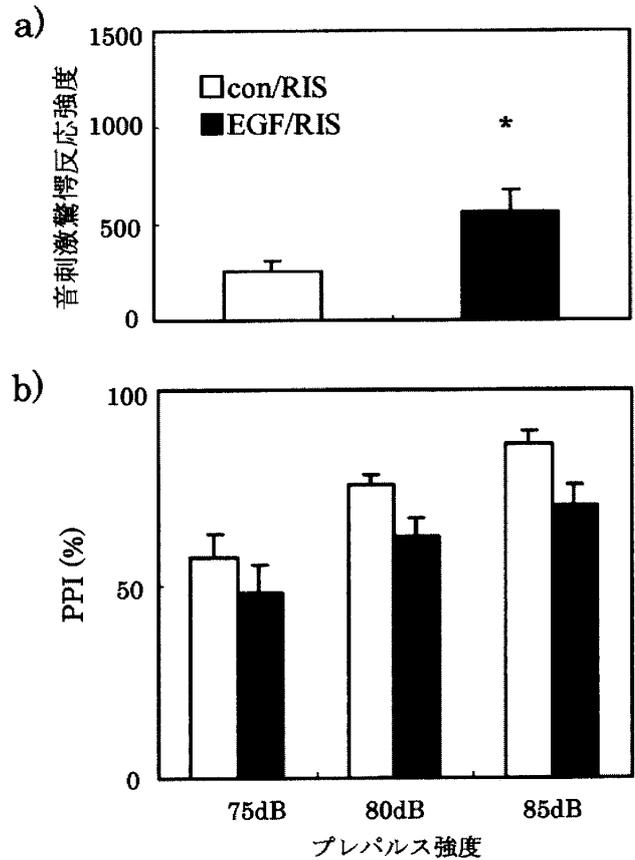


図3 幼少期 EGF 投与ラットに対するリスぺリドン投与実験

a) 成熟後リスぺリドンの慢性投与をおこなった幼少期 EGF 投与ラット (EGF/RIS) および対照群 (con/RIS) の音刺激驚愕反応強度. b) 同ラットの PPI. 棒グラフ白抜き; con/RIS, 黒; EGF/RIS, *; $p < 0.05$ (vs con/RIS)

(図1 データ) Dunnet 検定 $p < 0.001$).

・リスぺリドン投与実験

同様に EGF 投与をおこなったラットに対し 8 週齢時に非定型抗精神病薬であるリスぺリドン (RIS) の慢性投与をおこない、その後音刺激驚愕反応の測定をおこなった. 対照群に対するリスぺリドン投与 (con/RIS) は、音刺激驚愕反応強度および PPI に影響を与えなかった (con/RIS vs con/veh Dunnet 検定 音刺激驚愕反応強度 $p = 0.944$, PPI $p = 0.933$). EGF 投与群の音刺激驚愕反応強度はリスぺリドン投与 (EGF/RIS) 後も、対照群 (con/RIS もしくは con/veh) に対し増大

していた (図 3a) (Tukey 検定 $p = 0.030$, Dunnet 検定 $p = 0.029$). それに対し EGF 投与ラットの PPI の異常な低下は、リスぺリドン投与により有意に改善されていた (図 3b) (EGF/RIS vs con/RIS Tukey 検定 $p = 0.893$, EGF/RIS vs con/veh Dunnet 検定 $p = 0.198$, EGF/RIS vs EGF/veh Dunnet 検定 $p = 0.015$).

・セレコキシブ投与実験

次に EGF 投与ラット (8 週齢) に COX-2 選択的阻害薬であるセレコキシブ (CLX) 投与をおこない、その後音刺激驚愕反応の測定をおこなった. 対照群に対するセレコキシブ投与 (con/CLX)

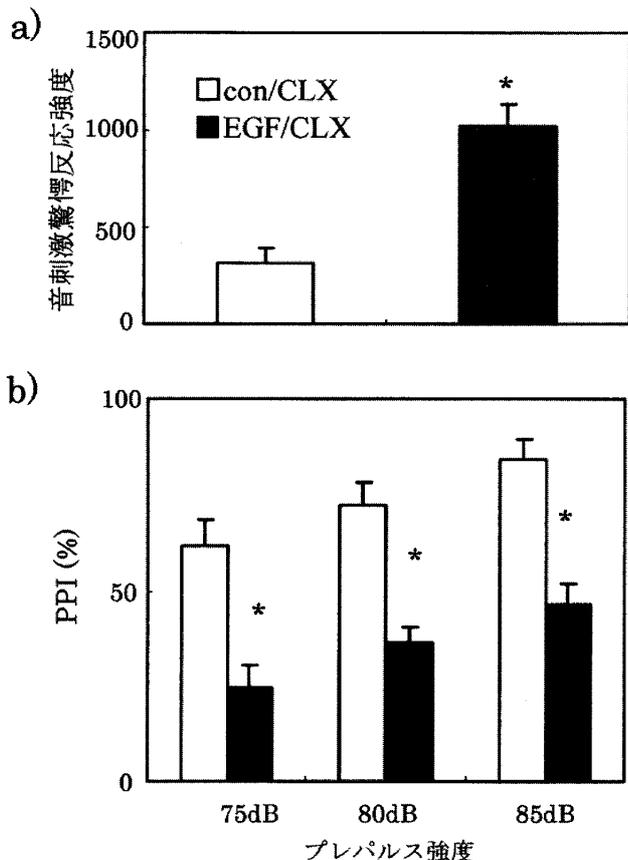


図4 幼少期 EGF 投与ラットに対するセレコキシブ実験

a) 成熟後セレコキシブの慢性投与をおこなった幼少期 EGF 投与ラット (EGF/CLX) および対照群 (con/CLX) の音刺激驚愕反応強度. b) 同ラットの PPI. 棒グラフ白抜き; con/CLX, 黒; EGF/CLX, *; $p < 0.05$ (vs con/CLX)

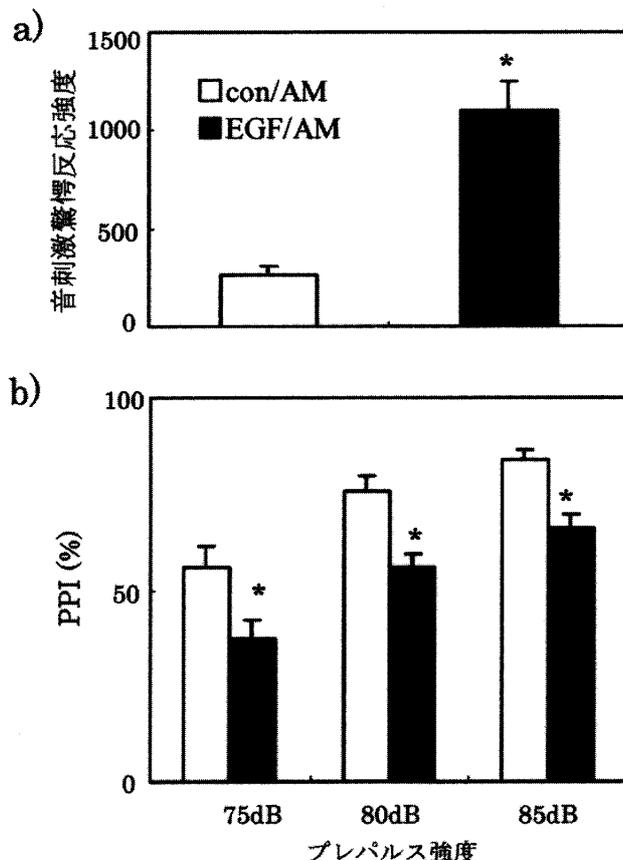


図5 幼少期 EGF 投与ラットに対する AM251 投与実験

a) 成熟後 AM251 の慢性投与をおこなった幼少期 EGF 投与ラット (EGF/AM) および対照群 (con/AM) の音刺激驚愕反応強度. b) 同ラットの PPI. 棒グラフ白抜き; EGF/AM, 黒; EGF/AM, *; $p < 0.05$ (vs con/AM)

は、音刺激驚愕反応強度および PPI に影響を与えなかった (con/CLX vs con/veh Dunnet 検定 音刺激驚愕反応強度 $p = 0.998$, PPI $p = 0.933$). 幼少期 EGF 投与群の音刺激驚愕反応強度はセレコキシブ投与 (EGF/CLX) 後も、対照群 (con/CLX) もしくは con/veh) に対し増大していた (図 4a) (Tukey 検定 $p < 0.001$, Dunnet 検定 $p < 0.001$). クロザピン、リスペリドンと違い、EGF 投与ラットの PPI 異常はセレコキシブ投与によっても改善されなかった (図 4b) (EGF/CLX vs con/CLX Tukey 検定 $p < 0.001$, EGF/CLX vs con/veh Dunnet 検定 $p < 0.001$ EGF/CLX vs EGF/veh

Dunnet 検定 $p = 0.999$).

・ AM251 投与実験

最後に EGF 投与ラット (8 週齢) にカンナビノイド受容体 CB-1 アンタゴニストである AM251 (AM) 投与をおこない、その後音刺激驚愕反応を測定した. 対照群に対する AM251 投与 (con/AM) は、音刺激驚愕反応強度および PPI に影響を与えなかった (con/AM vs con/veh Dunnet 検定 音刺激驚愕反応強度 $p = 0.979$, PPI $p = 0.845$). EGF 投与群の音刺激驚愕反応強度は AM251 投与 (EGF/AM) 後も、対照群 (con/AM もしくは con/veh) に対し増大していた (図 5a) (Tukey 検

定 $p < 0.001$, Dunnett 検定 $p < 0.001$). EGF 投与ラットの PPI の異常な低下は, AM251 投与によっても改善されなかった (図 5b) (EGF/AM vs con/AM Tukey 検定 $p = 0.0052$, EGF/AM vs con/veh Dunnett 検定 $p = 0.0068$, EGF/AM vs EGF/veh Dunnett 検定 $p = 0.099$).

考 察

幼少期に EGF を末梢に慢性投与したラットは成熟後, 新奇環境における探索行動時の立ち上がり行動の上昇⁴⁾, 八方迷路による作業記憶の障害 (未発表データ) などを示す. 加えて幼少期 EGF 投与ラットは, 成長に伴い知覚フィルター機能の障害を示唆する PPI 低下, 音刺激驚愕反応強度の増大を示すようになる. この PPI の異常は定型抗精神病薬であるハロペリドール慢性投与では効果はみられないが⁴⁾, 非定型抗精神病薬であるクロザピンおよびリスペリドンの慢性投与により改善された. これらの結果は非定型抗精神病薬の, 統合失調症患者にみられる知覚フィルター機能障害に対する有用性を示した臨床データと整合性がある²⁾. 統合失調症患者の PPI の低下はよく知られているが, ハロペリドールよりもクロザピンのような非定型抗精神病薬の方が, PPI の改善に対しより効果的であるという報告がある⁸⁾. より選択的にドーパミン受容体 D2 に結合するハロペリドールと異なり, クロザピンやリスペリドンはセロトニン受容体 5-HT₂ などにも親和性を持つことから, 統合失調症と同様に EGF 投与ラットの PPI 異常にはセロトニンの関与が示唆される⁹⁾.

同時にこの幼少期 EGF 投与ラットの PPI を指標として, 抗精神病薬として開発が進められているセレコキシブと AM251 の, 抗精神病薬としての知覚フィルターへの改善効果の評価をおこなった. 選択的に COX-2 を阻害するセレコキシブは, リスペリドンとの共投与により統合失調症の症状を著しく改善するという報告がある⁵⁾. アラキドン酸からプロスタグランジンを合成する COX-2 は, EGF 情報伝達系の活性化により強力に誘導される. これらのことから, セレコキシブの EGF 投

与ラットにみられる知覚フィルター機能異常に対する薬理効果の評価をおこなったが, PPI の低下は改善されなかった. このことからプロスタグランジンは, このモデルの PPI 異常に関与していないことが示唆される. カンナビノイド受容体 CB1 選択的アンタゴニストである AM251 による, EGF 投与ラットの PPI 異常に対する改善効果も同様に認められなかった. 近年, 内在性カンナビノイドの過活動と統合失調症との関わりが報告されているが⁶⁾, この結果は少なくとも EGF 投与ラットの知覚フィルター障害には, CB1 は関与していないのではないかと考えられる. 以上の結果より, EGF 投与ラットの成熟後に観察される知覚フィルターの異常には, 内在性カンナビノイド, プロスタグランジンシグナルともに関与していないことが示唆される.

幼少期 EGF 投与ラットの成熟後の音刺激驚愕反応強度は増大している⁴⁾. 今回用いた全ての薬物は, 幼少期 EGF 投与ラットに対しても対照群に対しても, 音刺激驚愕反応強度に影響を与えなかった. 慢性投与による非定型抗精神病薬クロザピンやリスペリドンは, 幼少期 EGF 投与ラットの PPI 低下に対する改善効果はあるが, 音刺激驚愕反応強度増大に対する改善効果は欠如していることが示された. このことは, 幼少期 EGF 投与の知覚フィルターに対する影響と音刺激驚愕反応強度にたいする影響とは, 互いに独立した現象であることを示唆している.

結 語

本稿の結果により幼少期 EGF 投与ラットの統合失調症動物モデルとしての有用性は強化され, 今後新たな治療薬の開発や統合失調症の病態・発症機序の解明に寄与することが期待される.

謝 辞

御指導, ご高閲をいただいた新潟大学脳研究所分子神経生物学分野那波宏之教授に深甚なる謝辞を表すとともに, 本研究に多大な協力を頂きました三菱ウエルファーマの二村隆史博士および新潟大学脳研

究所分子神経生物学分の渡部雄一郎先生に深謝いたします。

なお、本研究は精神神経委託費と三菱ウエルファーマ社からの研究費の支援を受けて実施された。

文 献

- 1) Swerdlow NR, Braff DL, Taaid N and Geyer MA: Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 51: 139-154, 1994.
- 2) Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I and Bali L: Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology* 15: 339-343, 1978.
- 3) Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL and Swerdlow NR: Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156: 117-154, 2001.
- 4) Futamura T, Kakita A, Tohmi M, Sotoyama H, Takahashi H and Nawa H: Neonatal perturbation of neurotrophic signaling results in abnormal sensorimotor gating and social interaction in adults: implication for epidermal growth factor in cognitive development. *Mol Psychiatry* 8: 19-29, 2003.
- 5) Muller N, Riedel M, Scheppach C, Brandstatter B, Sokullu S, Krampe K, Ulmschneider M, Engel RR, Moller HJ and Schwarz MJ: Beneficial antipsychotic effects of celecoxib add-on therapy compared to risperidone alone in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 159: 1029-1034, 2002.
- 6) Stelt M and Marzo V: The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders *European Journal of Pharmacology* 480: 133-150, 2003.
- 7) Poncelet M, Brelière M and Soubrié G: Blockade of cannabinoid (CB1) receptors by SR 141716 selectively antagonizes drug-induced reinstatement of exploratory behaviour in gerbils *Psychopharmacology* 144: 144-150, 1999.
- 8) Oranje B, Van Oel CJ, Gispen-De Wied CC, Verbaten MN and Kahn RS: Effects of typical and atypical antipsychotics on the prepulse inhibition of the startle reflex in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 22: 359-365, 2002.
- 9) Meltzer HY: The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21: 106-115, 1999.

(平成16年1月6日受付)