

平成10年度厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業研究報告書

課題番号（H10-長寿-120）

高齢者の精神機能老化の機序解明と
その対策に関する研究

主任研究者 武田 雅俊 大阪大学医学系研究科
神経機能医学精神医学・教授

分担研究者 新井 平伊 順天堂大学医学部精神医学教室・教授
神庭 重信 山梨医科大学精神神経教室・教授
山脇 成人 広島大学医学部精神神経医学・教授

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
総括研究報告書

高齢者の精神機能老化の機序解明とその対策に関する研究

主任研究者 武田雅俊

大阪大学大学院医学系研究科・神経機能医学・精神医学・教授

精神機能の老化として、認知力障害と感情障害とを取り上げ精神機能の老化過程における中枢神経系のストレス応答蛋白、細胞内情報伝達系、サイトカイン、神経ペプチド、下垂体副腎系などの関与について精神神経免疫学的立場から検討した。精神機能の老化過程の生物学的指標を明らかにするとともに、ストレス蛋白の関与を明らかにし、高齢者における認知障害・感情障害の発生機序を解明するための研究を方向づけた。生物学的パラメータは老化に伴う精神機能低下のよい指標となりうることが示唆され、引き続きこのような精神神経免疫学的パラメータについての検討を進めることにより老化に伴う精神機能障害を予防する方策が開発可能であることが示された。

キーワード：脳機能老化、老年期うつ病、認知障害、ストレス蛋白、セロトニン受容体機能

研究組織

主任研究者 武田雅俊
(大阪大学大学院医学系研究科・教授)
分担研究者 新井平伊
(順天堂大学医学部・教授)
分担研究者 神庭重信
(山梨医科大学・教授)
分担研究者 山脇成人
(広島大学医学部・教授)

められ、脳の老化過程により精神機能が低下すると考えられてはいるものの、今なおその知見は断片的である。高齢者の精神機能の老化は、知的機能・認知能力の低下にはじまるが、感情、意欲、性格の変化も大きい。このような精神機能低下の生物学的基盤を解明することは、現在、最も必要とされている研究課題である。本研究では、まず、精神機能の老化を客観的に把握するための生物学的指標を明らかにするための研究を行った。このことにより、高齢者における精神機能の評価および、病的な老化との鑑別が可能となるからである。そして、多くの高齢者に認められる精神機能の低下を予防する方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

この領域の研究課題は、今までの老年期痴呆

A. 研究目的

老年期精神障害はその有病率の高さと高齢者人口の急増とにより、精神医学の中でも重要な疾患となっている。これまでの臨床研究により、老年期精神障害の特徴が明らかにされ、その診断法や対処法についても一定の進展が認

の症候学の蓄積と、近年の精神神経免疫学の発達があっはじめて可能となるものであり、最近の細胞生物学的知見との組み合わせにより大きな成果が期待される。従って、本研究では臨床研究と基礎研究が有機的に統合されるような班員構成とし、基礎・臨床の研究成果を総合して新たな知見を得るべくつとめた。

新井は、免疫学的指標として高齢者のNK活性の加齢変化について検討した。神庭は、ホルモン調節系としての視床下部-下垂体-副腎皮質系(PHA系)に関して検討し、またHPA系の調節機構として脳内蛋白キナーゼB(Akt)系について検討した。山脇は、高齢者のうつ状態の発症機構についての解明を進めているが、高齢者の脳血流低下とうつ状態との関係から、神経伝達物質の検討としてセロトニン系について新たに実験動物を用いて検討した。武田は、細胞内情報伝達系として神経細胞のストレス応答蛋白について研究してきたが、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定されたプレセニリン1遺伝子とストレス蛋白の生物学的機能について検討した。

C. 研究結果

(1)老化による免疫機能変化について(新井):

老化に伴う末梢の免疫細胞について検討するために、健常者91名を対象にしてNK細胞のキラー活性・NKサブセットを測定し年齢との相関性を調べた。全体のNK活性に年齢との相関性は見られなかったが、NKサブセットは特に活性の強いサブセットを中心に年齢に相関して増加していた。加齢により個々のNK細胞のキラー活性は低下するが、細胞数を増加することにより全体のキラー活性を保っているという可能性が示唆された。NK活性に影響を与えるIFN- γ ・IL-1 β ・IL-4の産生能を測定し年齢との相関性を調べたところ、IFN- γ 産生能は加齢により増加し、IL-1 β は加齢により減少、IL-4は加齢により増加を示した。

(2)老化とストレス反応に関する研究(神庭):

老化による視床下部-下垂体-副腎皮質系(HPA

系)の変化とHPA系を調節するプロテインキナーゼB/Akt系について検討した。老齡ラットのHPA系の反応性については、老齡ラット、若令ラットともにデキサメサゾン前投与によってACTHストレスに対する反応性に差は認められなかったが、血中コルチコステロンのストレスによる反応は若令ラット群では完全に抑制されていたのに対して老齡群ではストレスによる上昇が観察された。また、海馬におけるAktシグナルについては、免疫組織学的検討により活性型Aktの免疫活性が海馬のCA1やCA3領域、下垂体、大脳皮質など広い領域の神経細胞に認められ、中でも海馬CA1領域において老齡群で有意な活性型Akt陽性細胞の増加が認められた。

(3)潜在性脳梗塞モデル動物の研究(山脇):

潜在性脳梗塞(SCI)に伴ううつ病の発症機序を解明する目的で、モデル動物作成を試みた。従来、serotonin-2A(5-HT_{2A})受容体機能亢進を示すdexamethadone慢性処置ラットがうつ病モデルとして報告されているが、今回の研究結果では、高血圧自然発症ラット(SHR)にdexamethadone慢性処置をしても5-HT_{2A}受容体結合能及びその関連行動に変化を認めなかった。しかしながら、diazoxideによって軽度脳虚血処置を行ったSHRではdexamethadone慢性処置により5-HT_{2A}受容体関連行動の有意な亢進が認められた。5-HT_{2A}受容体結合能には変化が認められなかったことから、この病態は受容体以降の情報伝達系に存在する可能性が示唆された。

(4)小胞体ストレス応答蛋白の研究(武田):

家族性アルツハイマー病(FAD)の原因遺伝子として同定されたプレセニリン1(PS1)機能について検討した。PS1は主に小胞体(ER)に局在するとされており、ERに負荷されるストレスに対するPS1の反応は、老化脳の精神機能に影響する可能性がある。そこで、変異PS1と野生型PS1とのERに対するストレス反応性について比較検討した。変異型PS1または野生型PS1

を遺伝子導入した 293T 細胞や、内因性 PS1 を I213T に改変した knock-in mouse の初代神経細胞に、ER へのストレスとしてカルシウムイオノファまたは tunicamycin を添加した。細胞障害の指標として培養液中の LDH 量を測定したところ、遺伝子導入細胞、knock-in 細胞共に、変異型の PS1 が存在すると、ER ストレスに対する脆弱性が上昇することが示された。ER ストレスに対する細胞反応として GRP78 誘導が報告されているが、各細胞の ER ストレス後の GRP78 mRNA の発現について Northern ブロットにて検討した。その結果、変異 PS1 発現細胞では ER ストレス後の GRP78 mRNA 発現が野生型発現細胞より低下することが示された。GRP78 の発現は、ER に何らかのストレスが加わり折り畳まれない蛋白が ER に蓄積されたときの unfolded protein response で起こると考えており、変異型 PS1 が発現していると、この機構発現が障害され、それが神経細胞の脆弱性に関与することが示された。

D. 考察

近年、精神機能の老化過程に関与する中枢神経系の変化として、神経細胞内の情報伝達系に関与するセカンドメッセンジャー(cAMP, Ca, DAG, IP3)、細胞骨格蛋白のリン酸化/脱リン酸化、核内転写調節因子(c-fos, jun, AP1)などとともに、各種ストレス蛋白(HSP, APP, PS1, PS2, ACT など)の動態についての研究が必要と考えられている。また、外界からの情報を処する神経細胞と免疫系細胞間のクロストークの様態が明らかにされつつあり、神経ペプチド、サイトカインを介して両者の機能が互いに調節されていることが知られるようになっている。

本研究では、このような背景を踏まえて、脳の老化過程における細胞内・細胞間の相互作用の変化を明らかにし、その生物学的指標を明らかにするとともに、精神機能老化による認知障害・感情障害の発症機序を明らかにするための

研究を行った。

まず、加齢変化による免疫系の NK 活性について検討した。その結果、加齢により個々の NK 活性は低下するが、活性の高いサブセットを中心とした NK 細胞数が加齢とともに増加することにより、全体としての NK 活性を維持しているという可能性が示唆された。加齢によっても本来維持されるべき NK 活性は、認知障害・感情障害を呈する高齢者においての変化を検討することが必要である。

続いて、加齢による HPA 系の調節機能について検討した。老齢ラットにおいてストレスに対する ACTH 反応性の上昇が持続することが知られているが、この ACTH 反応性はデキサメサゾンの前投与により、認められなくなった。ACTH は、視床下部において放出された副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) やバソプレッシン (AVP) が下垂体門脈系を介して下垂体全容に達したときに放出することから、ACTH 反応性の差は、CRH、AVP の分泌、またはこの 2 つのペプチドに対する下垂体前葉細胞の反応性が、デキサメサゾンにより押さえられたことによって生じたと考えられる。デキサメサゾンの結果は、中枢および末梢でグルココルチコイドによるネガティブフィードバックに老化による差が生じていることを示唆する所見と考えられ、今後更なる検討が必要と考えられる。Akt 系については、これまで培養細胞を中心にその存在と機能に関して検討が行われてきたが、本研究により、この活性型である pAkt が生体内に存在することを明らかにした。pAkt の免疫活性は、海馬で強く認められ、老齢群では CA1 領域において、pAkt 陽性細胞数が増加していた。老化に伴う海馬領域神経細胞のアポトーシスの制御機構に関係している可能性もある。

また、潜在性脳梗塞とうつ症状の発症については、潜在性脳梗塞モデル動物として SHR ラットを用いて、脳内神経伝達物質の変化について検討した。これまでも、うつ病の病態に大脳皮

質の 5-HT-2A 神経系の機能異常や視床下部—下垂体—副腎皮質系の機能異常が関与する可能性が指摘されており、Dexamethasone 慢性投与によるラット大脳皮質の 5-HT-2A 受容体密度が増加するという報告や DOI 誘発性 WDS が前大脳皮質の 5-HT-2A 受容体を介しているという報告と同様に、今回の実験でも WKY 系で dexamethasone 慢性投与で 5-HT-2A 受容体の感受性亢進という結果が得られた。他方 SHR 系では、dexamethasone 慢性投与では同様の変化が認められなかった。高血圧自然発症ラットに diazoxide による軽度脳虚血負荷を行うと dexamethasone 処置により 5-HT2A 受容体機能が亢進することが確認されたことは、これらの処置をしたラットが SCI を伴ううつ病の病態モデル動物になりうることを示唆された。しかし 5-HT2A 受容体結合能に変化が認められなかったことから、5-HT2A 受容体機能亢進の要因は細胞内情報伝達系に存在する可能性が推測された。ず、何らかの種差、たとえば SHR 系のストレス耐性の高さが推測された。

このようなストレス反応性に関する細胞内調節機構を検討するために、小胞体(ER)蛋白であるプレセニン-1蛋白(PS1)の機能について検討し、脳の加齢に伴うストレス反応性の低下が PS1 を介して調節されている可能性について検討した。変異型 PS1 は ER ストレスに対する GRP78 の誘導を阻害することが示されたことを考えると、変異型 PS1 が GRP78 誘導を起こす unfold protein response (UPR)を抑制し、それが神経細胞の脆弱性につながることを示唆している。このような観点から、PS1 の機能、さらには ER ストレスと脳の老化過程との関係が明らかにされる可能性がある。この機序については、UPR の上流で ER ストレスを関知する ER 膜蛋白である Ire1p と PS1 との相互作用が考えられる。

E. 結論

本年度の研究により以下のことを明らかに

した。

- (1) 各種サイトカイン産生能は脳の老化により変化しており、精神機能の老化現象と関係している。
- (2) 老化による HPA 系制御異常にはグルココルチコイドによるフィードバック機構が関与しており、老化による海馬領域の pAkt 陽性細胞の増加は精神機能老化と関係している。
- (3) 潜在性脳梗塞モデルラットが老年期うつ病モデル動物として有用であることを示したが、このモデルでは 5-HT2A 受容体結合能は変化していない。
- (4) アルツハイマー病の原因遺伝であるプレセニン-1 変異により小胞体ストレスに対する反応が低下しており、精神機能の老化にプレセニン-1 機能が関与する。

F. 研究発表

- 1) Takayuki Yamaji, Ariyuki Kagaya, Yosuke Uchitomi, Norio Yokota and Shigeto Yamawaki. (1997) Chronic treatment with antidepressants, verapamil, or lithium inhibits the serotonin-induced intracellular calcium response in individual C6 rat glioma cells. *Life Sci.* 60: 817-823
- 2) Akira Kugaya, Ariyuki Kagaya, Hidenobu Zensho, Takahiro Oyamada, Yasutaka Tawara, Masatoshi Inagaki, Yosuke Uchitomi and Shigeto Yamawaki. (1997) Modulation of endothelin-induced intracellular Ca²⁺ mobilization by interleukin-1b and lipopolysaccharide in C6 rat glioma cells. *Neuropeptides* 31: 187-192.
- 3) Ariyuki Kagaya, Yosuke Uchitomi, Eiichi Takezaki, Mayumi Fukue, Ken Tsukano, Akira Kugaya, Hideaki Minagawa, Minoru Takebayashi, Hidenobu Zensho, Takahiro Oyamada and Shigeto Yamawaki. (1997) Plasma levels of cyclic GMP, immune parameters and depressive status during interferon therapy: A prospective study in Japan.

Neuropsychobiol. 35: 128-131.

- 4) Teruo Hayashi, Ariyuki Kagaya, Minoru Takebayashi, Takahiro Oyamada, Masatoshi Inagaki, Yasutaka Tawara, Norio Yokota, Jun Horiguchi, Tsung-Ping Su and Shigeto Yamawaki. (1997) Effect of dantrolene on KCl- or NMDA-induced intracellular Ca²⁺ changes and spontaneous Ca²⁺ oscillation in cultured rat frontal cortical neurons. *J. Neural Transm.* 104: 811-824
- 5) Ichiro Yanai, Tokumi Fujikawa, Masashi Osada, Shigeto Yamawaki and Yoshikuni Touhoda (1997) Change in auditory P300 in patients with major depression and silent cerebral infarction. *Journal of Affective Disorders* 46:263-271.
- 6) Ichiro Yanai, Tokumi Fujikawa, Jun Horiguchi, Shigeto Yamawaki and Yoshikuni Touhoda (1998) The 3-year course and outcome of patients with major depression and silent cerebral infarction. *Journal of Affective Disorders* 47:25-30.
- 7) Takahiro Oyamada, Teruo Hayashi, Ariyuki Kagaya, Norio Yokota and Shigeto Yamawaki (1998) Effect of dantrolene on K⁺- and caffeine-induced dopamine release in rat striatum assessed by in vivo microdialysis. *Neurochem. Int.* 32: 171-176.
- 8) Minoru Takebayashi, Ariyuki Kagaya, Yosuke Uchitomi, Norio Yokota, Jun Horiguchi and Shigeto Yamawaki. (1998) Differential regulation by pregnenolone sulfate on intracellular Ca²⁺ increase by amino acids in primary cultured rat cortical neurons. *Neurochem. Int.* 32: 205-211.
- 9) Yasutaka Tawara, Ariyuki Kagaya, Yosuke Uchitomi, Jun Horiguchi and Shigeto Yamawaki. (1998) Lipopolysaccharide regulates both serotonin- and thrombin-induced intracellular calcium mobilization in rat C6 glioma cells: possible involvement of nitric oxide synthase-mediated pathway. *J. Neurosci. Res.* 51: 517-525.
- 10) Mitsutaro Muraoka, Hiroshi Hayakawa,

Ariyuki Kagaya, Toru Kojima and Shigeto Yamawaki. (1998) Effects of carbon monoxide exposure on serotonergic neuronal systems in rat brain. *Life Sci.* 62: 2101-2108.

11) Minoru Takebayashi, Ariyuki Kagaya, Yosuke Uchitomi, Akira Kagaya, Mitsutaro Muraoka, Norio Yokota, Jun Horiguchi, and Shigeto Yamawaki. (1998) Plasma

dehydroepiandrosterone sulfate in unipolar major depression. *J. Neural Transm.* 105: 537-542.

12) Ariyuki Kagaya and Shigeto Yamawaki. (1998) Immunological aspects of mood disorders: Interaction between cytokine and intracellular calcium signaling. *Signal Transduction in Affective Disorders.* (eds. Hiroki Ozawa, Toshikazu Saito and Naohiko Takahata) Springer-Verlag pp35-47

13) Shigeto Yamawaki and Ariyuki Kagaya. (1998) Intracellular calcium signaling systems in the pathophysiology of affective disorders. *Ca Ion Modulators: New Wave of Psychotropic Drugs.* (eds. Inoue, K. and Watanabe, Y.) Harwood Academic Publishers pp.135-145.

14) Teruo Hayashi, T.P. Su, Ariyuki Kagaya, Akira Nishida, Masami Shimizu and Shigeto Yamawaki (1998) Neuroleptics with differential affinity at dopamine D₂ receptors and sigma receptors affect differentially the N-methyl-D-aspartate-induced increase in intracellular calcium concentration : involvement of protein kinase. *SYNAPSE* (in press)

15) Masatoshi Inagaki, Ariyuki Kagaya, Minoru Takebayashi, Jun Horiguchi, and Shigeto Yamawaki. (1998) Effect of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone on (±)-1-(2, 5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2 aminopropane-induced wet dog shaking behavior in rats. *J. Neural Transm.* (in press).

Neurochem. Int. 32: 171-176.

16) Frequent breathing-related EEG arousals in four patients with mild obstructive sleep apneas.

A Mikami, T Watanabe, M Motonishi, H Honda, K Kyotani, S Uruha, K Terashima, Y Teshima, Y Sigita, M Takeda

Psych Clin Neurosci 53313-3151999

17)Clinical characteristics of upper airway resistance syndrome. T Watanabe, A Mikami, M Taniguchi, M Motonishi, H Honda, K Kyotani, S Uruha, K Terashima, Y Teshima, I Egawa, Y Sigita, M Takeda

Psych Clin Neurosci 53337-3391999

18)Role of somatosensory feedback from tools in realizing movements by patients with ideomotor apraxia.

Y Wada, Y Nakakawa, T Nishikawa, N Aso, M Inokawa, A Kashiwagi, H Tanabe, M Takeda.

Eur Neurol 41, 73-78, 1999

19)Basic and clinical studies on ApoE gene typing by kine probe assay (LiPA) as a biological marker for Alzheimer's disease and related disorders; Multicenter study in Japan.

Nishimura T, Takeda M, Shinosaki K, Nishikawa T, Nakamura Y, Yoshida H, Sasaki H, Arai H, Hirai S, Shouji M, Isse K, Tanaka T, Hamamoto M, Yamamoto H, Matsubayashi T, Nakashima K, Urakami K, Adachi Y, Nakamura S, Toji H, Yoshida H

Meth Find Exp Clin Pharmacol 20,973-799, 1998

20)Regional distribution of presenilin-1 messenger RNA in the embryonic rat brain; comparison with beta-amyloid precursor protein messenger RNA localization

H Tanimukai, K Sato, T Kudo, Y Kashiwagi, M Tohyama, M Takeda

Neuroscience 90,1,27-39, 1999.

21)Tau protein levels in cerebrospinal fluid and apolipoprotein E genotyping in differential diagnosis of dementia

Takeda M, Shinosaki K, Nishikawa T, Kudo T, Nakamura Y, Tanaka T, Kashiwagi Y, Nishimura T

Annals of Psychiatry, Vol.7, 1999, pages 135-146.

22) The cell death-promoting gene DP75, which interacts with the BCL2family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein.

K Imaizumi, T Morihara, Y Mori, T Katayama, M Tsuda, T Furuyama, A Wanaka, M Takeda, M Tohyama

J Biological Chemistry 274, 7975-7981,1999.

23)Diminished facial expression despite the existence of pleasant emotional experience in schizophrenia

Iwase M, Yamashita K, Takahashi K, Kajimoto O, Shimizu A, Nishikawa T, Shinosaki K, Sugita Y, Takeda M

Meth Find Exp Clin Pharmacol, in press, May 1999

24)Retrograde temporal order amnesia resulting from damage to the fornix

Yasuno F, Hirata M, Takimoto H, Taniguchi M, Nakagawa Y, Ikejiri Y, Nishikawa T, Shinosaki K, Tanabe H, Sugita Y, Takeda M

J Neurol Neurosurg Psychiat, in press, 1999

25)Perception and conception; separate memory systems in the medial temporal lobe

Yasuno F, Nishikawa T, Tokunaga H, Nakagawa Y, Ikejiri Y, Oku N, Hashikawa K, Shinosaki K, Tanabe H, Sugita Y, Nishimura T, Takeda M

Meth Find Exp Clin Pharmacol, in press, 1999

26)Presenilin-2 mutation and polymorphism in Japanese Alzheimer patients

H.Tanimukai, I.Tsujio, R.Hashimoto, T.Kudo, K.Kamino, K Shinosaki, M.Takeda
Clin.Chem.Acta, in press,1999

27)Tau protein is a potential biological marker for normal pressure hydrocephalus

T.Kudo, T.Mima, T.Morihara, H.Tanimukai, I.Tsujio, R.Hashimoto, Y.Koike, S.Tagami, H.Mori, Y.Nakamura, T.Tanaka, K.Horibe, K.Sato, S.Oi, H.Matsuda, K.Moritake, K.Mori, K Shinosaki,

M.Takeda

Neurol.Res. in press, 1999

28) IPP isomerase, an enzyme of mevalonate pathway, is preferentially expressed in postnatal cortical neurons and induced after nerve transection

Morihara T, Tanabe K, Yoneda T, Tanaka T, Kudo T, Gomi F, Kiyama H, Imaizumi K, Tohyama M, Takeda M

Mol Brain Res 1999 (in press)

29)Pulse exposure of cultured rat neurons to aluminum-maltol affected the axonal transport system.

Kashiwagi Y, Nakamura Y, Miyamae Y, Hashimoto R, Takeda M

Neurosci Lett 252, 5-8,1998.

30)Altered adhesion efficiency and fibronectin content in fibroblasts from schizophrenic patients
Y Miyamae, Y Nakamura, Y Kashiwagi, T Tanaka, T Kudo, M.Takeda

Psychiat Clin Neurosci 52, 345-352, 1998.

31)Extent of phosphorylation of tau protein at Ser199/202 in Alzheimer disease brain
Y Ikura, T Kudo, T Tanaka, H Tanii, I Grundke-Iqbal, K Iqbal, M.Takeda

NeuroReport 1998 (in press)

32)Alzheimer-associated presenilin 1 gene is induced in gerbil hippocampus after transient ischemia.

H Tanimukai, K Imaizumi, T Kudo, T Katayama, M Tsuda, T Takagi, M.Takeda

Mol Brain Res 54,212-218,1998.

33) White matter changes in the gerbil brain under chronic cerebral hypoperfusion

T Kurumatani, T Kudo, Y Ikura, M.Takeda
Stroke 29, 1058-1062,1998

34) Basic and Clinical Studies on the Measurement of Tau Protein in Cerebrospinal Fluid as a Biological Marker for Alzheimer's Disease and Related Disorders; Multicenter

Study in Japan

T Nishimura, M.Takeda, Y Nakamura, T Yoshida, H Arai, H Sasaki, M Shoji, S Hirai, K Khise, K Tanaka, M. Hamamoto, H Yamamoto, T Matsubayashi, K Urakami, Y Adachi, K Nakashima, H Toji, S Nakamura, H Yoshida
Meth Find Expt Clin Pharmacol 20,227-235,1998

35)Aberrant muscle activation in patients after resection of non-primary areas; demonstration by surface electromyography

Yoshimine T, Tanabe H, Maruno M, Kato A, Hirano S, Taniguchi M, Nakagawa Y, Nishikawa T, Takeda M, Hayakaya T:

Neurosci Lett, 244,153-156, 1998

36)Dantrolene sodium reverses the increase in cAMP response element and TPA responsive element DNA-binding activity in the rabbit brain following haloperidol administration and heat stress.

H Tanii, N Taniguchi, I Tsujio, M Asanuma, E Iwata, T Kudo, N Ogawa, M.Takeda

Psychiatry Clin Neurosci 51,415-419,1997

37) Domaom- and site-specific phosphorylation of bovine NF-L by Rho-associated kinase.

R Hashimoto, Y Nakamura, H Goto, Y Wada, S Sakoda, K Kaibuchi, M Inagaki, M.Takeda

Biochem Biophys Res Commun 245,407-411,1998

38)Increased tau protein level in postmortum cerebrospinal fluid

T Morihara, T Kudo, Y Ikura, Y Kashiwagi, Y Miyamae, Y Nakamura, T Tanaka, K Shinozaki, T Nishikawa, M.Takeda

Psychiat Clin Neurosci 52, 107-110,1998.

39)Kamino K, Yoshiwa A, Nishiwaki Y, Sato N, Tateishi K, Judo T, Nishimura T, Takeda M, Miki T, Ogihara T: Integration of genetic factors into pathogenesis of Alzheimer's disease. in "Research and Practice in Alzheimer's Disease" eds Vellas B, Fitten J, Frisoni G, Serdi Publishers, Paris,

France 51-70,1988

40) Loss of inositol 1,4,5-triphosphate receptor sites and decreased PKC levels correlate with staging of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology.

T Kurumatani, J Fastbom, WL Bonkale, N Bogdanovic, B Winblad, TG Ohm, RF Cowburn. *Brain Res* 796,209-221,1998.

41) A variety of presenilin 1 mutations in Japanese familial early-onset Alzheimer's disease

K Kamino, Y Nishiwaki, A Yoshiwa, M Takeda, S Sato, Y Sakaki, K II, T Miki, T Ogihara.]

Alzheimer's Disease; Biology, Diagnosis and Treatment (Iqbal, Winblad, Nishimura, Takeda, Wisniewski eds) John Wiley, pp79-84,1997.

42) Dantrolene sodium reverses the increase in cAMP response element and TPA responsive element DNA-binding activity in the rabbit brain following haloperidol administration and heat stress.

H Tanii, N Taniguchi, I Tsujio, M Asanuma, E Iwata, T Kudo, N Ogawa, M Takeda
Psychiatry Clin Neurosci 51,415-419,1997

43) Temporal and regional profiles of cytoskeletal protein accumulation in the rat brain following traumatic brain injury. G.Kanayama, M.Takeda,

T. Morihara, Y. Miyamae, K. Shinosaki, T.Nishikawa, H.Niigawa, T.Nishimura.

Psychiat Clin Neurosci 51, 157-165,1997.

44) Abnormal distribution of neurofilament L in neurons with Alzheimer's disease. Y. Nakamura,

R.Hashimoto, Y.Kashiwagi, Y.Miyamae, K.Shinosaki, T.Nishikawa, H.Hattori, T.Kudo,

M.Takeda.

Neurosci Lett 225,1-4,1997.

45) 馬場元, 江渡江: 老化とNK細胞. *精神科治療学*, 13(6); 790-791,1998.

46) 柴田展人, 馬場元, 新井平伊他: 孤発性アルツハイマー型痴呆とpresenilin-1遺伝子イントロン多型の関連について. *精神医学*,

40;619-622,1998.

47) 馬場元, 木村通宏, 岩本典彦: アルツハイマー病の生物学・分子生物学⑥脳脊髄液・血清所見/診断マーカー. *老年精神医学雑誌*, 9(9); 1089-1096, 1998.

48) 一宮洋介, 新井平伊: Alzheimer型痴呆. *臨床精神医学講座* 第12巻; 201-221,1998.

馬場元, 岩本典彦, 新井平伊: アルツハイマー病の生物学・分子生物学⑩アルツハイマー病の精神神経免疫学的所見. *老年精神医学雑誌*, 10(2); 233-239, 1999.

49) 杉山仁視, 久保田正春, 袖庭重信: 科学的基盤としての神経・免疫・内分泌相関, *リエゾン精神医学・精神科救急医療* (黒澤尚, 山脇成人編), 中山書店, 東京, 1998.

50) 袖庭重信. 老化とストレス反応性に関する研究. 免疫系、HPA系を中心に一, *長寿科学総合研究平成九年度研究報告* Vol.1.3, p 26-29, 1998.

変異プレセニリン1発現細胞のストレス反応について

武田雅俊（大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学神経機能医学講座教授）

工藤 喬（大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学神経機能医学講座助手）

谷向 仁（大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学神経機能医学講座大学院生）

中野有香（大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学神経機能医学講座大学院生）

プレセニリン1 (PS1)は、家族性アルツハイマー病(FAD)の原因遺伝子として注目されている。PS1 は主に小胞体(ER)に局在があると言われており、ER に負荷されるストレスに対する PS1 の反応は、アルツハイマー病(AD)の病態解明に大きなヒントを与えてくれると考えられる。そこで、変異 PS1 と野生型との ER に対するストレス反応性を比較した。変異型 PS1 または野生型 PS1 を遺伝子導入した 293T 細胞や、内因性 PS1 を I213T に改変した knock-in mouse の初代神経細胞に、ER へのストレスとしてカルシウムイオノファまたは tunicamycin を添加した。細胞障害の指標として培養液中の LDH 量を測定したところ、遺伝子導入細胞、knock-in 細胞共に、変異型の PS1 が存在すると、ER ストレスに対する脆弱性が上昇することが示された。ER ストレスに対する細胞反応として GRP78 誘導が報告されているが、各細胞の ER ストレス後の GRP78mRNA の発現について Northern blotting にて検討した。その結果、変異 PS1 発現細胞では ER ストレス後の GRP78mRNA 発現が野生型発現細胞より低下することが示された。GRP78 の発現は、ER に何らかのストレスが加わり unfolded な蛋白が ER に蓄積されたときの unfolded protein response で起こると考えており、変異型 PS1 が発現していると、この機構発現が障害され、それが神経細胞の脆弱性に関与することが示された。

キーワード：アルツハイマー病、プレセニリン1、小胞体、ストレス、GRP78

A. 研究目的

様々なストレスに対する老化に伴う脆弱化が注目されている。アルツハイマー病(AD)の病態は老化の究極と位置付けられ、AD のストレス反応性の検討は、老化に伴うストレス反応の変化のメカニズムを知る上で重要であ

ると考えられる。細胞小器官の内、小胞体(ER)は様々なストレスに対する反応が近年研究され明らかになってきている。家族性アルツハイマー病(FAD)の原因遺伝子として注目されているプレセニリン1 (PS1)は主に ER に局在しているとされ、この変異と ER のストレス

反応の変化の関連は重要なテーマである。我々は、砂ネズミを用いた虚血実験を行い、虚血後の海馬で PS1 が誘導され、しかもその誘導は虚血耐性な部分ほど強いことを示し、プレセニリンがストレスに反応することを明らかにしている¹⁾。今回は、変異 PS1 と野生型の小胞体に対する ER へのストレス反応性への影響を検討した。

B. 研究方式

変異 A246E、 Δ E9 または野生型 PS1 を発現ベクター pcDNA (Invitrogen) ライゲーションし、LipofectAMINE (GIBCO BRL) を用いたリポフェクション法で 293T 細胞に遺伝子導入した。3 日の培養の後、小胞体へのストレスとして 5 μ M カルシウムイオノファ (A23187) または 10 μ g/ml tunicamycin を添加し、12 時間インキュベーターで培養した。細胞障害は、培地中の LDH 量について LDH アッセイキット (極東製薬) を用いて測定した。細胞から RNA を調整し、小胞体ストレスに対する反応性を示す指標として GRP78 の mRNA の発現について Northern blotting にて検討した。

PS1 遺伝子に点突然変異を導入した knock-in mouse は、胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた発生工学的手法により作製した。まず、マウスゲノム DNA ライブラリーよりマウス PS1 遺伝子をクローニングし塩基配列およびエクソン・イントロン構造の決定を行い、マウス PS1 遺伝子はヒト PS1 遺伝子とほぼ同様の構造をもち、種間で極めてよく保存されていることを確認した。この遺伝子クローンをを用いて、我々の教室で独自に同定した、第 213 番目のアミノ酸のイソロイシンがスレオニンへ置換する変異を PCR 法で導入した。

またイントロン 7 に、セレクションマーカーとして loxP 配列に挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、このターゲッティングベクターを electroporation にて ES 細胞に導入した。その後、PCR 法・サザン法で陽性クローンを同定し、これを用いて 8 細胞期胚凝集法にてキメラマウスを作成した。得られた 6 匹のキメラマウスの内 3 匹で、germ-line transmission が確認された。この 3 匹のキメラマウスと CAG-Cre トランスジェニックマウスとの交配を行い、Cre-loxP システムを利用してイントロン 7 に挿入してあったネオマイシン遺伝子を除去した。このようにして得られた PS1 遺伝子に変異をもつヘテロマウスを掛け合わせて胎生 17.5 日の胎児を得た。胎児より大脳皮質を摘出し胎児毎に初代培養に供し、同時に肝臓を取り出し遺伝子型同定を行った。得られた初代培養神経細胞は 5 日間の飼育の後、293T 細胞と同様に ER ストレスを与えられ、LDH と GRP78 について検討した。

C. 研究結果

変異 A246E 及び Δ E9 を導入した 293T 細胞はカルシウムイオノファや tunicamycin による ER ストレスに対し、培地中に遊離する LDH 量が、野生型 PS1 を導入した細胞より有意に上昇していた。これは、変異型導入細胞が ER ストレスに脆弱であることを示している。ER ストレスに対する細胞の反応として、ストレス後の GRP78mRNA の発現について検討したところ、野生型導入細胞ではストレス後に GRP78 が大量に誘導されるのに対し、変異導入細胞ではその誘導が抑制されていることが観察された。

knock-in mouse の初代培養細胞を用いても

同様の実験を行った。ER ストレス後の I213T ホモ接合体細胞の遊離 LDH 量は、ヘテロ接合体、野生型細胞よりホモ接合体細胞の脆弱性上昇が認められた。GRP78mRNA 発現量はホモ接合体細胞で、ヘテロ接合体や野生型細胞より遊離に比し、抑制されていた。

D. 考察

プレセニンと細胞死の関係を論じる知見はいくつか報告されている。免疫細胞において細胞死蛋白のクローニングから ALG3 という PS 2 の C 末端領域に非常に相同性の高い遺伝子がクローニングされ²⁾、更に PS 2 の遺伝子導入実験で PS 2 の proapoptotic な性質が示されている³⁾。また、変異 PS 1 を導入した神経細胞もアポトーシス刺激に脆弱性を示すことが示されている⁴⁾。これらは PS1 が細胞死につながるストレス応答に関与していることを示唆している。

様々な刺激で ER ストレスは生じるが、ER 局在の PS1 と ER ストレスの関係は興味深い。ER ストレスが加わると、それを関知し反応する機構が想定されているが、そのうちの 하나가 GRP78 の誘導機構である。ER ストレスはすなわち ER 内に折り畳み構造の異常なタンパク質 unfolded protein が蓄積することをさすが、これが GRP78 の転写の引き金になり⁵⁾、GRP78 は分子シャペロンとして正常な折り畳みを促す役割を果たす⁶⁾。これを unfolded protein response(UPR) と言われている。今回の結果は、変異型 PS1 が GRP78 誘導を起こす UPR を抑制し、それが神経細胞の脆弱性につながることを示している。この結果は、PS1 を強制発現させた細胞系ばかりでなく、発現レベルは内因性のものと同等と考えられる knock-in mouse の神経細胞でもし

めされた。

今後の疑問は、なぜ変異型の PS1 が UPR を抑制するかに移る。1つの可能性として UPR の上流で ER ストレスを関知する ER 膜蛋白である Ire1p⁷⁾ と ER の膜に同じく存在する PS1 との関連が考えられる。もう1つの可能性としては、我々が得た脳虚血後に PS1 が誘導される事実より、この誘導が UPR に重要で、変異型 PS1 は PS1 自体の誘導が悪く、その結果として UPR が抑制されることも考えられる。これらの点については、今後検討していきたい。

E. 結論

変異型の PS1 は、ER ストレスに対する GRP78 誘導を抑制し、神経細胞の脆弱性を上昇させることが示唆された。

F. 引用文献

- 1) H.Tanimukai et al: Mol.Brain Res., 54(2):212, 1998.
- 2) P.Vito et al: Science, 271:521, 1996.
- 3) B.Wolozin et al: Science, 274:1710, 1996.
- 4) Q.Guo et al: J.Neurosci., 17:4212, 1997.
- 5) Y.Kozutsumi et al: Nature, 332:462, 1988.
- 6) M.Gething et al: Nature, 355:33, 1992.
- 7) K.Mori et al: Cell, 74:743, 1993.

G. 研究発表

学会発表

- ① T.Kudo et al: Presenilin 1 is induced in gerbil hippocampus after transient ischemia. The 6th international conference on Alzheimer's disease and related disorders, 1998

老化による免疫機能変化に関する 生物学的研究

新井 平伊（順天堂大学医学部教授）

健常者 91 名を対象にナチュラルキラー(NK)細胞のキラー活性、サブセットおよびリンパ球からの各種サイトカイン産生能を測定した。その結果 NK 活性には年齢との相関性はなかったが、NK 細胞数は活性の高いサブセットを中心に年齢との正の相関が見られた。同時に各種サイトカイン産生能にみられた加齢変化が、この結果にどう影響を与えているかが今後の課題である。

キーワード：ナチュラルキラー、NK、老化、加齢、サイトカイン

A. 研究目的

近年急速に進む我が国の高齢化に伴い、高齢者医療の問題がクローズアップされている。その中でも高齢者のメンタルケアは QOL の観点から重要視されており、老年精神医学のさらなる発展が強く望まれている。このためには精神機能の老化による変化を理解する必要があるが、精神機能の客観的評価は困難であり、精神機能の生物学的指標が求められている。こうした現状の中、リンパ球成分の一つであるナチュラルキラー細胞（NK 細胞）が精神機能の生物学的指標として期待されている。NK 細胞のキラー活性（NK 活性）は以前よりストレスや抑うつとの相関性が報告されているが、加齢変化については統一した見解をいまだ得られていない。この理由として NK 活性はそれに影響を与える要素が多く、非常に不安定であることがあげられる。そこで今回、NK 細胞のサブセットや NK 細胞のキラー活性や分化・増殖に影響を与えているサイトカインの産生能を同時に測定し検

討することで、より詳細に NK 活性の加齢変化を知ることができると考えた。これによって NK 活性の加齢変化を解明できれば、NK 活性をより理解することができ、将来的に高齢者のストレスに対する反応性など精神機能変化の客観的評価が可能となることが期待できる。このことは高齢者のメンタルケアにおいて非常に有意義なものと考えられる。また、NK 細胞は生体において免疫監視機構の主役をなしているため、NK 細胞の加齢変化を解明することは高齢者の癌や感染症などの予防につながり、この点でも有意義であると考えられる。今回は NK 活性とリンパ球サブセットを測定すると同時に、NK 活性や NK 細胞増殖に関連すると思われるサイトカインについて、リンパ球からの産生能を測定し考察を加えた。

B. 研究方式

1. NK 活性の測定

NK 細胞活性は、エフェクター対ターゲット細胞比 (E/T) = 20 における % サイトト

キシティとして測定した。日内変動による誤差をさけるため、採血は午前10時から12時に統一した。エフェクター細胞は、被検者の末梢血を conray-ficall (d=1.077)を用いて比重遠心分離して得られた単核細胞を RPMI1640 Medium(10%FCS 加)を加えて 1×10^6 /ml に細胞濃度を調整した。ターゲット細胞にはヒト赤芽球性白血病細胞株 K-562 を用いた。K-562 を RPMI1640medium (10%FCS 加)中で継代培養したものを遠心分離によって集め、50~100 μ Ci の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウムを添加して 37°Cで1時間培養することによって ^{51}Cr 標識した。これを 1×10^6 / ml に濃度調整し使用した。上記により調整されたターゲット細胞をマイクロプレートに分注し、これに最大解離群には 1N-HCl を、自然解離群(control)には RPMI 1640 medium (10%FCS 加)を、そして実験解離群にはエフェクター細胞を E/T=20 の比率で分注した。これをプレート遠心器で 800rpm、5 分間遠心した後 5%CO₂ 培養器で 3.5 時間培養した。培養した後各 well から上清を採取し γ -シンチレーションカウンターにて細胞障害により遊離した ^{51}Cr を測定した。NK 活性値は (実験解離 - 自然解離) / (最大解離 - 自然解離) により算出した。

2. NK サブセットの測定

上記と同様の手順で採取した血液 (全血) に FITC、PE、PreCP でそれぞれ蛍光標識した抗 CD3 モノクローナル抗体、抗 CD16 モノクローナル抗体、抗 CD56 モノクローナル抗体を添加し、4°Cで 30 分間培養した。これに lysing reagent を添加して室温で 15 分間静置した後 PBS で洗浄し、最後に lysing reagent を加えてレーザーフローサイトメーターにて測定した。

3. サイトカイン産生能の測定

細胞濃度を 1×10^6 /ml に調整したリンパ球に PMA および ionomycin を添加して 5%CO₂ 培養器で 37°C、4 時間培養し、得られた培養液をインターロイキン (IL) -1 β 、4、インターフェロン (IFN) - γ の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit を用いて各々のサイトカイン濃度を測定した。

C. 研究結果

対象は 21 歳から 76 歳の 91 名 (男性 56 名、女性 35 名) の健常者で、平均年齢は 43.03 ± 17.83 (mean \pm S.D.)歳、そのうち男性は 44.77 ± 2.31 歳、女性は 40.26 ± 18.63 歳で t 検定で男女間に有意な年齢差はなかった。F 検定にて男女間での年齢の分散は等しかった ($p > 0.24$)。NK 活性の平均値は $43.15 \pm 16.76\%$ で、全体でも男女別にみても年齢との相関性はなかったが、t 検定にて性差が認められ、男性で有意に高値を示した ($p < 0.005$)。NK 細胞数 (NK 細胞すべてのサブセット) は平均値 $18.22 \pm 10.41\%$ で、年齢と正の相関が見られた ($p < 0.0005$)。これに性差はみられなかった。NK 細胞のなかでも最も活性の高いサブセット (CD16⁺56⁺3⁻) は平均値 $16.54 \pm 9.53\%$ で、これも年齢との相関性がみられた ($p < 0.001$)。性差はなかった。その他のサブセットでは CD16⁺56⁻3⁻ は平均値 $1.14 \pm 2.04\%$ で年齢との正の相関がみられた ($p < 0.005$) が、CD16⁻56⁺3⁻ では平均値 $0.54 \pm 0.31\%$ で負の相関が見られた ($p < 0.001$)。これらに性差はなかった。IFN- γ 産生能は平均値 640.20 ± 314.02 pg/ml で年齢と正の相関がみられた ($p < 0.01$)。性差はなかった。IL-1 β は平均値 133.89 ± 70.63 pg/ml で年齢との負の相関がみられた ($p < 0.01$)。性差はなかった。IL-4 は平均値 9.30 ± 15.84 pg/ml で

年齢と正の相関がみられた($p < 0.05$)。これには性差がみられ、男性に有意に高値を示した($p < 0.05$)。

D. 考察

NK 細胞が老化によりどう変化するか、1980年頃より様々な報告が多数ある。Batoryらや Krishnaraj ら、Harada らは加齢により NK 活性は上昇すると報告し、Marini らや Mysliwska らはむしろ活性が低下しているとしている。また、Murasko らや Facchini らは加齢による変化なしと報告した。文献の数からは「加齢による変化なし」の報告が多いが、最近では加齢により活性も末梢血液中の NK 細胞数も増加するという報告が多いように思われる。それでもいまだ NK 細胞の加齢変化については、統一した見解は得られていない。NK 活性や NK 細胞数は癌や炎症性疾患などの身体疾患はもちろん、その時の被検者の精神状態や喫煙、飲酒、運動、睡眠等により著明に変化してしまう。さらに個体差も大きく、これらのアーチファクトがデータに影響を与えてしまう。今回の結果から、老化によって個々の NK 活性は低下しているが、活性の高いサブセットを中心とした NK 細胞数が加齢とともに増加し、全体としての NK 活性を維持しているという可能性が示唆された。生体の免疫能は老化により低下するが、すべての免疫系の機能が低下するわけではなく、顆粒球やマクロファージ等の自然免疫系は老化による変化が少ない。一方、T 細胞や B 細胞による獲得免疫系は老化により著しく低下する。これら獲得免疫系の加齢による機能低下は、その分化、成熟の場である胸腺の機能低下に依るところが多い。NK 細胞は骨髄で T 細胞と同じ幹細胞より分化するが、T 細胞が胸腺で成熟するのに対し、

NK 細胞は胸腺では成熟しない。そして最終的には顆粒球やマクロファージと同様の自然免疫系を担うようになる。このことから考えると胸腺機能低下の影響を受けない NK 細胞が、獲得免疫系の機能低下を補うように分化・成熟の反応性を亢進させることがあっても不思議ではないだろう。NK 細胞を活性化する主なサイトカインは IL-2 と IFN- γ であるが、今回の結果では IFN- γ 産生能の増加がみられた。しかし IFN- γ は NK 細胞からも産生されるためこの増加が NK 細胞数増加の原因なのか結果なのかは今回の実験からは不明である。また、加齢とともに減少の傾向をみせた IL-1 も NK 細胞に IL-2 レセプターを発現させ、活性化を促すサイトカインである。また IL-4 は IL-2 に対して抑制的に働くが、今回このサイトカインは加齢により増加傾向を示した。従って NK 細胞数と個々の NK 活性の差は加齢によるこれらサイトカインの産生パターンの変化の結果なのか、それともリンパ球サブセットの加齢変化がサイトカイン産生パターンを変化させたのかを明らかにすることが今後の課題と言える。今後 NK 細胞上のサイトカインレセプターの発現や経時的なサイトカイン産生の変化をみる必要がある。加えて NK 活性とサイトカインの相互関係が明らかになれば、精神状態による NK 活性の変化がサイトカインを介して起こるものなのか、またはその他の機序によって起こるものかも明らかになるであろう。

E. 結論

21 歳から 76 歳の健常者 91 名を対象に NK 細胞のキラー活性、NK サブセットを測定し年齢との相関性を調べた。この結果全体の NK 活性は年齢との相関性は見られなかった

が、NK サブセットは特に活性の強いサブセットを中心に年齢に相関して増加することが解った。このことから加齢により個々のNK細胞のキラー活性は低下するが、細胞数を増加することにより全体のキラー活性を保っているという可能性が示唆された。また同時にNK活性に影響を与えるIFN- γ 、IL-1 β 、IL-4の産生能を測定し年齢との相関性を調べた。この結果IFN- γ 産生能は加齢により増加し、IL-1 β は加齢により減少、IL-4は加齢により増加を示した。NK細胞数と個々のNK活性の差は加齢によるこれらサイトカインの産生パターンの変化の結果なのか、それともリンパ球サブセットの加齢変化がサイトカイン産生パターンを変化させたのかを明らかにすることが今後の課題と言えよう。

F. 引用文献

- ① 広川 勝彦, 笠井 道之, 倉島 知恵理, 宇津山 正典; サイトカインと病態, 老化, 臨床免疫, 27(Suppl. 16): 497-506, 1995.
- ② R.A.Miller; The aging and immune system: primer and prospectus. SCIENCE, 273: 70-74, 1996

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 馬場 元, 江渡 江: 老化とNK細胞. 精神科治療学, 13(6): 790-791, 1998.
 - ② 柴田 展人, 馬場 元, 新井 平伊他: 孤発性アルツハイマー型痴呆とpresenilin-1遺伝子イントロン多型の関連について. 精神医学, 40:619-622, 1998.
 - ③ 馬場 元, 木村 通宏, 岩本 典彦: アルツハイマー病の生物学・分子生物学⑥ 脳脊髄液・血清所見/診断マーカー. 老年精神医学雑誌, 9(9): 1089-1096, 1998.
 - ④ 一宮 洋介, 新井 平伊: Alzheimer型痴呆. 臨床精神医学講座 第12巻; 201-221, 1998.
 - ⑤ 馬場 元, 岩本 典彦, 新井 平伊: アルツハイマー病の生物学・分子生物学⑩ アルツハイマー病の精神神経免疫学的所見. 老年精神医学雑誌, 10(2): 233-239, 1999.
- ### 2. 学会発表
- ⑥ 馬場 元, 新井 平伊他; Presenilin-1遺伝子と蛋白の発現と分布について—ヒト剖検脳を用いた In situ hybridization と免疫組織化学による検討—, 第20回日本生物学的精神医学会, 1998.
 - ⑦ H.Baba, H.Arai, et.al.; Localization of presenilin 1(PS-1) in Alzheimer's disease and control brains.—in situ hybridization and immunohistochemical study—, 6th international conference on Alzheimer's disease and related disorders, 1998.
 - ⑧ 馬場 元, 江渡 江, 石塚 卓也, 新井 平伊他; 老化による免疫機能変化に関する生物学的研究—ナチュラルキラー細胞活性と関連するサイトカインについて—, 第95回日本精神神経学会総会, 1999.
 - ⑨ 大沼 徹, 新井 平伊, P.C.Emson 他; 精神分裂病患者前頭前野におけるGABA_A受容体 α -1サブユニット, GABAトランスポーター(hGAT-1)のmRNA発現量とGABA含有量の比較, 第21回日本生物学的精神医学会, 1999.

老化とストレス反応性に関する研究

—免疫系、HPA系を中心に—

分担研究者：神庭重信（山梨医科大学 精神神経医学講座）

研究協力者：久保田 正春、丹羽 政信

（山梨医科大学 精神神経医学講座）

老化による視床下部—下垂体—副腎皮質系(HPA系)の変化、HPA系に影響を与えると考えられる海馬でのプロテインキナーゼ B / Aktに関する検討を行った。HPA系に関しては、昨年度の検討ではストレス反応性について老齡ラット群と若令ラット群で ACTH の反応性に差が認められていたが、本年度合成のステロイドであるデキサメサゾンの前投与によって差が認められなくなった。Akt に関してはラットの脳内でpAkt陽性細胞の存在が確認され、特に海馬のCA1領域で若令群と比較して有意に老齡ラット群で多かった。

キーワード：視床下部—下垂体—副腎皮質系(HPA系)、老化、ストレス、
プロテインキナーゼ B / Akt (Akt)

A. 研究目的

老化のみならずうつ病、ストレス後精神障害、精神分裂病など、精神機能に異常のある疾患では海馬の萎縮が報告されてこれらの病態との関連がいられている。この海馬の萎縮には血中の糖質コルチコイドの増加が関連することがいわれており^{1), 2)}、実際、クッシング病などでも海馬の萎縮とそれとともなうと考えられる短期記憶の障害が報告されている。一方で、糖質コルチコイドは視床下部—下垂体—副腎皮質系(HPA系)の一部であるが、この HPA 系にはサイトカインの一種であるインターロイキン 1β が視床下部で促進的に作用することが最近報告されている^{3), 4)}。また、インターロイキンと関係した酵素である ICE(インターロイキン転換酵素)は、アポトーシスと関連したカスパー 1 として働くことも知られるなど免疫系、HPA系そして海馬のアポトーシスは相互に関連し

老化という状態を修飾していると考えられる。このため、これらの系の相互関係と、老化による変化を検討することは老化の病態の理解には不可欠である。

昨年の検討では、老化による視床下部—下垂体—副腎皮質系(HPA)のストレスに対する反応性について検討を行い、老齡ラットでストレスによる ACTH の反応性の上昇は若令ラットより大きく、一方でコルチコステロン反応性は小さいことが明らかとなった⁵⁾。この老化による HPA の異常の機構を明らかとするために、デキサメサゾンを前投与した上で、ストレスに対するホルモンの変化についての検討を行った。

一方で、海馬での神経細胞死、特にアポトーシスを制御する因子として最近注目されているプロテインキナーゼ B / Akt、とくにその活性型のリン酸化 Akt(pAkt)に関して^{6), 7), 8)}、まずラットの脳で

発現が認められるかどうかを検討し、さらに老化による変化の有無に関して検討した。pAkt 陽性細胞の検討には免疫組織化学的手法を主として用いることとした。

B. 研究方法

1) 老齢ラットのストレス反応におけるグルココルチコイドの影響の検討

実験動物はSD系のラット8週令と73週令を用いた。ラットは日本クレア社から購入し、1週間動物実験施設の環境(温度、湿度は一定、明期を6時~18時とする明暗サイクル)に慣らせた。その後、ハロセン麻酔下で右頸静脈にカニューレを挿入、ヘパリンで満たして栓をし、さらに1週間の回復期をおいた。

各々のラットが10週令及び75週令となった所で、前日にデキサメサゾンを経口投与したラットに、1時間の拘束ストレス(以下ストレス)を負荷し、拘束負荷時を0分として、前値、0、30、60、120分と経時的に採血を行った。採血は0.8mlの採血後、同量の生理的食塩水を循環内に戻すことで循環血液量に変化しないようにした。血液は採取後速やかに血漿分離を行い、血漿は測定まで-80°Cで保存した。血中のコルチコステロン、ACTHの測定にはRIAを用いた。統計学的検定にはone-way ANOVAを用いた。

2) 老齢ラットにおけるAktの発現状況の検討

10週令および75週令のラットを用いて検討を行った。動物は購入後、動物実験施設の環境に1週間、十分に慣らせた後、ネンブタール麻酔下にて4%パラホルムアルデヒドで灌流固定をおこなった。固定後速やかに脳を摘出し、後固定の後、凍結、薄切を行った。染色にはフリーフローティング法を用い、pAkt抗体でインキュベーションを行った後、2次抗体、ABCキットを用いて染色をおこなった。染色後、顕微鏡でpAkt陽性細胞数を、単一の測定者が計測した。

C. 研究結果

1) 老齢ラット、若令ラットともにデキサメサゾン前投与によってACTHのストレスに対する反応性に差は認められなくなった。しかし、血中のコルチコステロンに関しては、ストレスによる反応は若令ラット群では完全に抑制されていたのに対して老齢群ではストレスによる上昇が観察された。

2) 活性型Aktの免疫活性が海馬のCA1やCA3領域、下垂体、大脳皮質など広い領域の神経細胞に認められた。その中でも海馬のCA1領域において老齢群で有意な活性型Akt陽性細胞の増加が認められた。

D. 考察

昨年度認められた、老齢ラットにおけるストレスに対するACTH反応性の上昇は、本年度行われたデキサメサゾンの前投与により、認められなくなった。ACTHは、視床下部において放出された副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)やバソプレッシン(AVP)が下垂体門脈系を介して下垂体全容に達したときに放出することが知られているが、本年度の結果は、昨年度認められたACTHの反応性の差に関しては、CRH、AVPの分泌、またはこの2つのペプチドに対する下垂体前葉細胞の反応性が、デキサメサゾンにより押さえられたことによって生じたと考えられる。

また、デキサメサゾン前投与によって、ストレス下でのACTHの分泌が、老齢群、若令群で差が認められなくなかったのに対して、末梢でコルチコステロン値に差が生じたことは、デキサメサゾンによる副腎でのコルチコステロン分泌抑制に差があったためと考えられる。

これらのデキサメサゾンの結果は、中枢および末梢でグルココルチコイドによるネガティブフィードバックに老化による差が生じていることを示唆する所見と考えられ、今後更なる検討が必要と考えられる。

Aktは、これまで培養細胞を中心にその存在と機能に関して検討が行われてきているが、本年度の検討において我々は、この活性型であるpAktが、生体内でも認められることを示した。pAktの免疫活性は、海馬でもっとも強く認められ、老齡群ではそのCA1領域において、pAkt陽性細胞数が増加していた。Hassan ら(1996)は老化にともなった海馬のアポトーシス増加の報告をしているが、我々の発見はこの老化によるアポトーシスの制御機構に関係している可能性もあると考えられた。

E. 結論

本年度の検討で、老化によるHPA系の制御異常には、中枢および末梢のグルココルチコイドによるフィードバック機構が関与している可能性が示された。また、海馬における pAkt の陽性細胞が老齡群で増加していることから、pAkt が老化による海馬のアポトーシスに関係している可能性が考えられた。

F 引用文献

- 1) Hassan AHS, Von Rosenstiel P, Patchev VK et al. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Experimental Neurology* 140: 43-52, 1996
- 2) Cameron HA and Gould F. Distinct population of cells in the adult dentate gyrus undergo mitosis or apoptosis in response to adrenalectomy. *J Comp Neurol* 369: 56-63
- 3) F. Shintani, T. Nakaki, S. Kanba et al: Involvement of interleukine-1 in immobilization stress induced increase in plasma adrenocorticotrophic hormone and in release of hypothalamic monoamines in the rat. 15: 1961-1970, 1995.
- 4) 杉山仁視, 久保田正春, 神庭重信: 科学的基盤としての神経・免疫・内分泌相関, リエゾン精神

医学・精神科救急医療(黒澤尚, 山脇成人 編), 中山書店, 東京, 1998.

5) 神庭重信. 老化とストレス反応性に関する研究. 一免疫系、HPA系を中心に一, 長寿科学総合研究平成九年度研究報告 Vol1.3, pp26-29, 1998.

6) Crowder RJ and Freeman RS.

Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 18: 2933-2943, 1998.

7) Eves EM, Xiong W, Bellacosa A et al. Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. *Mol Cell Biol* 18: 2143-2152, 1998.

8) Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD et al. The PI3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Development* 11: 701-713, 1997.

G. 学会発表

久保田正春、岸雅廣、工藤耕太郎、丹羽政信、杉山仁視、有田順、神庭重信. 老化によるラット海馬のプロテインキナーゼ B/Akt 発現の変化. 第 21 回生物学的精神医学会(仙台)

老年期うつ病の発症機序に関する研究 —潜在性脳梗塞モデルラットを用いた検討—

分担研究者 山脇成人 広島大学医学部神経精神医学講座・教授

老年期うつ病の主要部分を占める器質性うつ病のうち、潜在性脳梗塞(SCI)に伴ううつ病の発症機序を解明する目的で、モデル動物の作成を試みた。従来、serotonin-2A(5-HT_{2A})受容体機能亢進を示す dexamethadone 慢性処置ラットがうつ病モデルとして報告されている。今回の研究結果では、高血圧自然発症ラット(SHR)に dexamethadone 慢性処置をしても 5-HT_{2A} 受容体結合能及びその関連行動に変化を認めなかったが、diazoxide によって軽度脳虚血処置を行った SHR では dexamethadone 慢性処置により 5-HT_{2A} 受容体関連行動の有意な亢進が認められ、SCI に伴ううつ病の病態モデルになりうることを示唆された。しかしながら、5-HT_{2A} 受容体結合能には変化が認められなかったことから、この病態の異常性は受容体以降の情報伝達系に存在する可能性が示唆され、今後の検討が必要であると考えられた。

キーワード：老年期うつ病、潜在性脳梗塞、脳血管性うつ病、セロトニン受容体機能

A. 研究目的

高齢化社会に伴って、老年期精神障害が大きな問題となっているが、中でも、うつ病は頻度が高く対応が急がれている。老年期においては対象喪失（退職、配偶者や友人の死など）が誘因になることが多く、老年期うつ病の発症には、従来から心理社会的要因の関与が重視されてきた。しかし我々はその一方で、加齢に伴う脳器質変化（特に脳血管病変）とうつ病の関係について検討してきた。脳血管障害とうつ病に関して、これまでの研究は脳卒中後のうつ病に関するものが中心であったが、我々は、老年期うつ病の発症と潜在性脳梗塞(Scilent Cerebral Infarct; SCI)との間に密接な関連があることを報告してきた^{3) 4) 5) 6)}。

本年度は、昨年度報告したヒト高齢者の SCI を伴ううつ病の発症機序を解明するために、高血圧自然発症ラットに脳虚血処置を負荷して微小脳梗塞を誘発し、これにデキサメサゾン処置を行ったラットを SCI を伴う動物モデルとして、serotonin-2A 受容体機能について行動薬理的、神経化学的に検討した。

B. 方法

実験は広島大学動物実験指針に則り行った。

250-300 g の 14 週齢の雄性ラット (Wistar Kyoto

rats ; WKY 系および Spontaneously Hypertensive Rats ; SHR 系) を用いた。

温度 21-25 度、湿度 40-60 %、明暗 12 時間周期 (明期は 8:00-20:00) の条件で、水および固形飼料は自由に摂取できるようにして飼育した。体重測定は毎日 19:00-20:00 に電磁式はかり HF-300 (研精工業) を用いて行った。

脳虚血処置として diazoxide (5 mg / kg, s.c.) または vehicle (0.1N NaOH 1ml / kg) の単回処置を行った。血圧はソフトロン BP-98A を用いて tail-cuff 法により測定した。翌日より 14 日間 dexamethasone (1 mg / kg, s.c.) または vehicle (sesame oil 1ml / kg) を投与した。

最終投与翌日に、行動量 (水平方向と垂直方向) を SCANET MV-10 を用いて暗室で 15 分間測定し、serotonin-2A(5-HT_{2A}) agonist である (±)-1-(2, 5-dimethoxy-4 iodophenyl) - 2 - aminopropane (DOI) (1 mg / kg, s.c.) 誘発性の wet dog shake 行動 (WDS) を 15 分間測定した。

自発運動量の測定は、赤外線ビームの遮断回数を指標にした運動量測定装置 SCANET MV-10 (東洋産業) を用い、この装置内に 45 x 45 x 45 cm の透明アクリル製のボックスをおきラットの運動量を測定した。15 分間で暗室内において床面にはラットの尿吸収目的で