

平成10年度厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

## 研究報告書

研究課題名 H10- 脳-017

うつ病の発症機序と治癒機転の分子生物学的研究

主任研究者

樋口輝彦

うつ病の発症機序と治癒機転の分子生物学的研究

主任研究者 樋口 輝彦 昭和大学藤が丘病院精神神経科学教室教授

研究要旨

うつ病の発症機序と抗うつ薬による治癒機転に関する脳内分子を昨年度に引き続き検討し、以下の所見を得た。(1) RNA-fingerprinting法により、抗うつ薬の連続投与後にラット前頭葉皮質で発現量が変化する遺伝子群 (HSC70のsplice variantのほかfrizzled-3-protein, cysteine string protein, rin, thioredoxin, kf-1やその類縁遺伝子) を見出した。(2) 脳内の転写因子CREBのリン酸化は、拘束ストレス負荷および抗うつ薬投与で亢進し、ストレス脆弱ラットではその程度は大きかった。一方、脱リン酸化酵素カルシニューリン mRNA発現はいずれの処理でも変化しなかった。(3)  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性キナーゼII活性化時とは対照的に、抗うつ薬の長期添加によりPC12細胞のノルアドレナリン (NA) 取り込み能とNAトランスポーター (抗うつ薬結合部位) mRNA発現が抑制された。(4) ストレス負荷や気分安定薬リチウムによる神経系細胞の細胞内 $Ca^{2+}$ 動員系の抑制にはプロテアーゼが関与し、その回復にはHSP70の発現が関与していた。(5) うつ病死後脳ではcAMP産生系の亢進に関わらずCREBのリン酸化の低下が認められた。また、うつ病患者の血小板では5-HT刺激性 $Ca^{2+}$ 動員のcAMP系による抑制が低下しており、cAMP系とIPs系の不均衡が推測された。以上より、うつ病の発症機序と治癒機転には $Ca^{2+}$ 動員やリン酸化能を含む細胞内情報伝達系やストレス蛋白の活性変化に加え、転写調節因子も含む各種未知遺伝子産物も関与している可能性が示された。

分担研究者

上島国利 昭和大学医学部精神医学教授  
小口勝司 昭和大学医学部第一薬理学教授  
木内祐二 昭和大学薬学部病態生理学教授  
山脇成人 広島大学医学部神経精神医学教授  
森信 繁 滋賀医科大学医学部精神医学講師  
小澤寛樹 札幌医科大学医学部神経精神医学講師

A. 研究目的

有病率が4%にもほり社会生活上長期に亘り多大な影響を与えるうつ病の発症機序と治癒機転の研究は緊急かつ必要性の高い課題である。従来より動物を用いた抗うつ薬や電撃ショックの作用機転の検討に基づき、うつ病態と抗うつ作用の解明が試みられてきたが、現在でもその基盤となる神経化学的変化は明らかでなく、また国内では患者脳から得られた情報も少ない。抗うつ薬は連投で始めて効果が得られるため、その抗うつ作用には何らかの機能蛋白の発現を介した可塑的変化の関与が指摘されている。また、抗うつ薬は従来より知られるモノアミントランスポーターに加え、モノアミン受容体以降のG蛋白、アデニル酸シクラーゼ、イノシトール3リン酸、細胞内カルシウム動態やプロテインキナーゼなどの細胞内情報伝達系に作用する可能性も指摘され、その作用機序解明にはこれらの蛋白やその発現調節系を対象とした分子レベルの研究が望まれる。一方、抗うつ薬の標的分子として上述のような既知蛋白質のみの変化を想定して研究を進めることの危険性も指摘さ

れ、抗うつ薬投与後の未知遺伝子の発現量の変化もスクリーニングできるDifferential Display法 (RNA-fingerprinting法) を用いた検討も望まれる。うつ病の発症機序とその治癒機転に関わる分子メカニズムを明らかにするためには上記のような総合的なアプローチが求められており、われわれは報告の少ない患者脳での検討も含め複数のin vitroおよびin vivo実験系を用いて検討を行った。初年度には以下の研究成果が得られた。(1) 抗うつ薬の連続投与後、ラット脳内で発現量が変化する遺伝子群の存在が示唆された。(2) 抗うつ薬連続投与後にラット前頭皮質でcAMP依存性プロテインキナーゼ活性が亢進した。(3) 拘束ストレス負荷により、ラット脳内の転写因子CREBのリン酸化が亢進した。(4) PC12細胞のノルアドレナリントランスポーター (NAT) 機能とその発現量が $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ類により調節されることが示された。(5) 各種ストレス負荷、リチウムにより神経系培養細胞の細胞内 $Ca^{2+}$ 動員系が抑制された。(6) うつ病死後脳でcAMP産生系とIPs産生系のいずれもが有意に変動していた。以上より、うつ病、ストレス負荷、あるいは抗うつ薬投与時には神経系細胞内でリン酸化能を含む各種細胞内情報伝達系の活性変化とともに、複数の未知遺伝子産物の発現変化も生じている可能性が示された。そこで2年度にはこれらの所見をさらに詳細に解析し、うつ病の発症機序と治癒機転への関与を検討した。

B. 研究方法

(1) ラットにイミプラミンあるいはサートラリン 5 mgおよび10 mg/日を21日間腹腔内投与後、脳内各部位を摘出し

た。得られたcDNAを全90通りのプライマーの組み合わせでPCRを行い、電気泳動後、RNA fingerprintingを検出した。薬物処置群で特異的に増加しているPCR産物のバンドを回収して塩基配列を決定し、既知の遺伝子の塩基配列と比較検討した。さらに、Northern Blot法、RPA法、RT-PCR法で遺伝子発現増加、Western Blot法で蛋白量増加の確認を行った。未知遺伝子の場合にはRACE法で全塩基配列を決定した。

(2) 急性拘束ストレス後あるいはバロキセチン急性投与後の大脳皮質前頭部、海馬のリン酸化CREBの変化はimmunoblotting法で検討した。急性あるいは慢性拘束ストレス後、急性あるいは慢性抗うつ薬（デシプラミン、Org4428）投与後の同部位のカルシニューリンA $\alpha$ 、B $\alpha$ のmRNA発現量はNorthern Blot法あるいはin situ hybridization法で検討した。

(3) PC12細胞を抗うつ薬を含む各種精神作用薬存在下で1、2または5日間培養した。培養終了後、細胞をクレブスリング液で十分洗浄した後、50 nM [<sup>3</sup>H]NAを加え37°Cで10分間インキュベーションして取り込みを行った。一方、NATのmRNA発現量の変化はRT-PCR法で検出した。また、NAT蛋白の細胞内局在の変化を可視化するため、NATにc-mycエピトープを挿入し蛍光蛋白GFPを融合した蛋白の培養細胞への発現を試みた。

(4) C6細胞に熱ストレス処置（44°C、30分）し、あるいはリチウムを添加して培養し、セロトニンまたはトロンビン刺激性の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇（fura-2蛍光強度）を検討した。また、上記に対するheat shock protein (HSP) 合成阻害薬クエルセチン、プロテアーゼ阻害薬DEVD、セリンプロテアーゼのプラスミンの効果も検討した。

(5) 単極性うつ病患者および対照患者死後脳の前頭葉皮質から調整した膜標本でアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性、セロトニン刺激性ホスホオリパーゼC (PLC) 活性、I型AC、PLC $\beta$ 、総CREB、リン酸化CREB蛋白量 (Immunoblotting法) を検討した。また、大うつ病患者および対照患者から得た血小板のセロトニン刺激性細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化（fura-2蛍光強度）も検討した。

## C. 研究結果

(1) RNA-fingerprinting法では、対照群と比較し、イミプラミン、サートラリン連投ラットの脳から得たRNAサンプルに共通して増加しているPCR産物は74種あった。すでに塩基配列を決定したものにはHSC70のsplice variant, frizzled-3-protein (遺伝子欠損によりWilliams症候群生じる), cysteine string protein (神経終末Ca<sup>2+</sup>チャネル抑制に関与), kf-1 (Zing finger domainを有する直早期遺伝子の候補)のほかrin (Rasスーパーファミリー), thioredoxin (グルコシルコイド受容体や転写調節因子の機能調節に関与)の類縁遺伝子などがあり、その多くでmRNA発現あるいは蛋白発現の増加を確認した。

(2) ラット大脳皮質前頭部、海馬内のリン酸化CREBは、拘束ストレス15および45分負荷あるいはバロキセチン投与30-60分後に増大した。慢性過密飼育で体重減少するストレス脆弱群のラットでは拘束ストレス負荷後、リン酸化CREBはより増大した。一方、大脳皮質前頭部、海馬内の

カルシニューリン mRNA発現量は急性または慢性拘束ストレス負荷、抗うつ薬急性または慢性投与後のいずれでも明らかな変動はなかった。

(3) イミプラミン、アミトリプチリン、デシプラミン、ノルトリプチリン、ニソキセチンの5日間添加によりNA取り込みとNAT mRNAの発現量も濃度依存的に抑制された。セロトニンあるいはトバミン選択的取り込み阻害薬や抗精神分裂病薬、抗てんかん薬では明確な効果はなかった。また、c-Mycエピトープを含むNAT-GFP融合遺伝子のHEK293細胞への導入と細胞膜への発現が確認され、生細胞でのNAT蛋白の細胞内局在の変化の可視化が可能になった。

(4) リチウムの24時間処置はC6細胞のトロンビン刺激性細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を抑制したが、リチウム前処置はプラスミン処置による同じ抑制効果に対して相加作用を示さず、百日咳毒素処置は相加作用を示した。このことはリチウムの作用点がGq, Giとは独立でプラスミンの作用部位と共通である可能性を示している。熱ストレス負荷後、セロトニン刺激性細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は抑制されるが、クエルセチン前処置あるいはDEVD前処置により抑制からの回復が阻害された。

(5) うつ病患者の前頭葉皮質では健常患者に比較し、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン存在下のAC活性、I型AC蛋白量、セロトニン刺激性PLC活性、PLC $\beta$ 蛋白量は有意に増加し、総CREB、リン酸化CREB蛋白量は低下していた。一方、うつ病患者の血小板では健常者に比較しセロトニン刺激性細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度増加が有意に大きく、フォルスコリン誘導体NKH477前処理のこの増加に対する抑制率は有意に低下していた。

## D. 考察

Differential Display法 (RNA-fingerprinting法) を用い抗うつ薬の治癒機転に関与する蛋白質を遺伝子レベルで検索した結果、抗うつ薬連投後にラット前頭皮質で複数の遺伝子 (HSC70のsplice variantのほかfrizzled-3-protein, cysteine string protein, rin, thioredoxin, kf-1やその類縁遺伝子) の発現が増加している可能性が示された。これらの遺伝子産物にはストレス蛋白や神経機能との関連が推測される蛋白、遺伝子の転写活性に影響を与えると予想される蛋白も含まれる。長期投与後に薬効が認められる抗うつ薬の作用機序には何らかの機能蛋白の発現を含む脳内の可塑的变化がその基盤となっている可能性も高く、今回示した遺伝子産物はその推測される機能から考えるといずれも興味深い。今後、その機能解析も含め、うつ病の病態や治癒機転との関連についてさらに検討を加える予定である。

一方、神経機能の長期的、可塑的な調節に深く関与することが報告されている既知の細胞内情報伝達系に関しては、ストレス負荷、抗うつ薬 (あるいはリチウム) 投与のいずれの場合もセカンドメッセンジャー系 (Ca<sup>2+</sup>、cAMP産生系) の変化が生じる可能性が示唆された。これがさらにプロテインキナーゼ類によるCREB等の転写因子のリン酸化レベルの変化を介し、長期的な神経機能の変化をもたらすという仮説も想定される。

これらのin vitro、in vivoの実験結果を裏付けるように、

うつ病患者の死後脳ではcAMP産生系、IPs産生系という主要なセカンドメッセンジャー系の不均衡が生じるとともにリン酸化CREB蛋白量は低下していた。また、うつ病患者血小板のCa<sup>2+</sup>動態の変動も示唆されたことより、うつ病の病態に細胞内情報伝達系の機能異常が関与している可能性が示された。

RNA-fingerprinting法により抗うつ薬投与時に増加することが推測された遺伝子産物と、他の分担研究で明らかになったストレス負荷や抗うつ薬投与時、あるいはうつ病患者での各種細胞内情報伝達系の変動との関連性は興味深く、今後は両者の相互関係についても検討を加える。

## E. 結論

(1) RNA-fingerprinting法により、抗うつ薬の連続投与後にラット前頭葉皮質で発現量が変化する遺伝子群を見出した。(2) 脳内の転写因子CREBのリン酸化は、拘束ストレス負荷および抗うつ薬投与で亢進し、ストレス脆弱ラットではその程度は大きかった。一方、カルシニューリンのmRNA発現の変化は認められなかった。(3) 抗うつ薬の長期添加によりPC12細胞のNA取り込み能とNAT mRNA発現が抑制された。(4) ストレス負荷や気分安定薬リチウムによる神経系細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>動員系の抑制にはプロテアーゼが関与し、その回復にはHSP70の発現が関与していた。(5) うつ病死後脳ではcAMP産生系の亢進に関わらずCREBのリン酸化の低下が認められた。また、うつ病患者の血小板では5-HT刺激性Ca<sup>2+</sup>動員のcAMP系による抑制が低下しており、cAMP系とIPs系の不均衡が推測された。以上より、うつ病の発症機序と治癒機転にはCa<sup>2+</sup>動員、cAMP産生系やリン酸化能を含む細胞内情報伝達系やストレス蛋白の活性変化とともに、転写調節因子も含む各種未知遺伝子産物も関与している可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 樋口輝彦. 「生物学的成因・病態」臨床精神医学講座4「気分障害」1998 pp43-52.
- 樋口輝彦. 睡眠障害・感情障害-基礎から臨床まで Central Nervous Systems 1 ライフサイエンス (東京)1998 pp58-65.
- 樋口輝彦. 躁うつ病の脳科学 臨床科学 1998 34 : 1739-1548.
- Uchida J, Kiuchi Y, Oguchi K et al. Ca<sup>2+</sup>-Dependent enhancement of [<sup>3</sup>H]noradrenaline uptake in PC12 cells through calmodulin-dependent kinases. Brain Res, 1998 809: 155-164.
- Morinobu S, Fujimaki K et al., Stimulation of adenylyl cyclase and induction of BDNF and TrkB mRNA by NKH477, a novel and potent forskolin derivative. J Neurochem., in press.
- 森信 繁、加藤進昌: CREBリン酸化-脱リン酸化機能と精神機能、脳と神経の科学 1998 9: 295-300.
- 森信 繁 他: 抗うつ薬・ストレスの及ぼすラット脳内calcineurin mRNA発現への影響. 日本神経精神薬理雑誌 1998 18: 389.
- 小澤寛樹、齋藤利和、高畑直彦. 脳シグナルカスケードと精神疾患. 精神誌 1998, 100:748-754.
- Odagaki, Y, Nishi N, Ozawa H et al., Measurement of receptor-mediated functional activation of G proteins postmortem human brain membranes. Brain Res, 1998 789: 84-91.
- Ozawa H, Takahata N. The role of G proteins in pathophysiology and treatment of affective disorders. In: Signal Transduction in

Affective Disorders (eds Ozawa H, Saito T, Takahata N), Springer-Verlag, 1998 pp49-65.

- Saito T, Ozawa H, Kamada H, Maeda H, Takahata N. Differential effects of chronic administration of the antidepressants amitriptyline and rolipram on adenylyl cyclase activity. Jpn J Psychopharmacol 1998 18:23-25.
- 山口高史, 小澤寛樹ら. 脳情報伝達系からみた感情障害の病態と新規抗うつ薬の探索. 精神薬理基金年報, 1998 29: 102-108.
- Takebayashi M, Kagaya A, Yamawaki S et al. Differential regulation by pregnenolone sulfate of intracellular Ca<sup>2+</sup> increase by amino acids in primary cultured rat cortical neurons. Neurochem Int, 1998 32: 205-211.
- Tawara Y, Kagaya A, Yamawaki S et al. 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, 1998 51: 517-525.
- Kagaya A and Yamawaki S. Immunological aspects of mood disorders: Interaction between cytokine and intracellular signaling. In: Signal Transduction in Affective Disorder (eds. Ozawa H, Saito T, Takahashi N), Springer Verlag, 1998 pp35-47.
- Yamawaki S and Kagaya A. Intracellular calcium signaling systems in the pathophysiology of affective disorders. In: Ca Ion Modulators: New Wave of Psychotropic Drugs (eds. Inoue K and Watanabe Y), Harwood Academic Publishers, 1998 pp135-145.
- Yamawaki S, Kagaya A et al. Intracellular calcium signaling systems in the pathophysiology of affective disorders. Life Sci, 1998 62: 1665-1670.
- 竹林実、加賀谷有行、山脇成人. セロトニン仮説 こころの臨床la carte増刊号 1998 8月 pp86-89.

## 2. 学会発表

- Yamada M, Yamada M, Kiuchi Y, Oguchi K, Higuchi T, Kamijima K. Specific induction of gene expression by antidepressants in rat brain. Psychopharmacology (XXIth CINP Congress), 1998.
- Yamada M, Yamada M, Kiuchi Y, Oguchi K, Higuchi T, Kamijima K. Specific induction of antidepressant related genes in rat frontal cortex identified with mRNA fingerprinting technique. 第72会日本薬理学会年会、札幌、3月、1999.
- 内田淳、大野稔、木内祐二、山元俊憲、小口勝司. PC12細胞のノルアドレナリントランスポーターに対する神経作用薬長期暴露の効果. 第71会日本薬理学会年会、京都、3月、1998.
- Kiuchi Y, Oguchi K et al. Possible regulation of noradrenaline transporter in PC12 cells by calcium/calmodulin-dependent kinases. XIIIth International Congress of Pharmacology, München, Germany, July, 1998.
- 森信繁 他. 抗うつ薬・ストレスの及ぼすラット脳内calcineurin mRNA発現への影響. 第28回日本神経精神薬理学会、東京、10月、1998.
- Morinobu S et al. Pretreatment with FK506 amplified the stress-induced gene expression. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Los Angeles, USA, Nov, 1998.
- Ukai W, Ozawa H, Saito T et al. Effect of cognitive enhancer aniracetam in rely on the changes in signal transduction. 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Los Angeles, USA, Nov, 1998.
- 小澤寛樹、齋藤利和、高畑直彦. セミナー: 脳シグナルカスケードと精神疾患. 第94回日本神経精神学会総会、沖縄、5月、1998.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

うつ病の発症機序と治癒機転の分子生物学的研究

分担研究者 小口勝司 昭和大学医学部第一薬理学教室教授  
木内祐二 昭和大学薬学部病態生理学教室教授

研究要旨 抗うつ薬の主要な標的蛋白であるモノアミントランスポーターの調節機構を検討した。PC12細胞のノルアドレナリントランスポーター (NAT) 遺伝子発現量とノルアドレナリン取り込み能がノルアドレナリン選択性の高い取り込み阻害薬の5日間添加で濃度依存的に抑制されたが、セロトニン選択的取り込み阻害薬や抗精神分裂病薬、抗てんかん薬などの他の精神作用薬では抑制されないことが明らかになり、抗うつ薬慢性投与はモノアミントランスポーターの発現にも作用している可能性が示唆された。また、初年度の研究で NATの細胞膜への移行がリン酸化を介し促進的に調節される可能性が示唆されたが、この現象を可視化するため、NATにc-mycエピトープを挿入し蛍光蛋白GFPを融合した蛋白の培養細胞への発現を試みた。

A. 研究目的

殆どの抗うつ薬はモノアミントランスポーターに直接結合してモノアミン取り込みの抑制作用を示すが、数週間の連投後に認められる抗うつ作用との関連性は必ずしも明らかでない。しかし、モノアミントランスポーターが抗うつ作用とうつ病の発症機序に関与している可能性は以前より推測されている。そこで、我々は以下の2方面からモノアミントランスポーターの機能調節の検討を行い抗うつ作用の機序解明にアプローチした。

(1) 抗うつ薬が連投後に初めて抗うつ作用を発揮するのは直接の標的蛋白であるモノアミントランスポーターの機能や発現に対する遅発性作用を介している可能性もある。そこでノルアドレナリントランスポーター (NAT) を発現するPC12細胞を用い抗うつ薬の長期添加がNAT遺伝子発現とNA取り込み能に及ぼす影響について*in vitro*で検討した。

(2) 初年度の研究ではPC12細胞のノルアドレナリン (NA) 取り込みは、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性キナーゼ (CaMキナーゼII、ミオシン軽鎖キナーゼなど) の活性化を介したNATの細胞膜上への移行を介して急速に促進され、また長期的にもNAT遺伝子の転写促進はリン酸化を介して調節されていることが示唆された。このリン酸化を介した調節機構のうちトランスポーターの細胞膜への移行をさらに検討するために、生細胞でNAT蛋白の細胞内局在の変化を可視化することを試みた。

B. 研究方法

(1) PC12細胞を各種精神作用薬存在下で1、2または5日間培養した。薬物は、モノアミン取り込み

阻害薬としてイミプラミン、アミトリプチリン (NA+セロトニン取り込み阻害)、デシプラミン、ノルトリプチリン、ニソキセチン (NA取り込み阻害)、サートラリン、シタロプラム (セロトニン取り込み阻害)、GBR12909 (ドパミン取り込み阻害)、抗精神分裂病薬 (ハロペリドール、クロルプロマジン、スルピリド)、抗てんかん薬 (ジアゼパム、フェノバルビタール、バルプロ酸) を用い最終濃度10 - 1000 nMになるように培地に添加した。培養終了後、細胞をクレブスーリング液で懸濁し、遠心操作により2回洗浄した後、50 nM [<sup>3</sup>H]NAを加え37°Cで10分間インキュベーションして取り込みを行った。また、NATのmRNA発現量の変化をRT-PCR法で検出するため、同様に薬物添加した細胞から抽出したtotal RNAからcDNAを合成し、ラットNATに特異的なプライマーを用いPCR法で増幅後、電気泳動を行った。

(2) NAT蛋白の細胞内局在の変化を可視化するため、NAT蛋白の第2細胞外ループに相当する位置に14アミノ酸から成るc-Mycエピトープが挿入されるようにcDNAを作成し、GFP蛋白がC末端に付加されるように設計されたベクター (pEGFP-N1 Vector) にこのcDNAを挿入した。このベクターをリン酸カルシウム法でHEK293細胞に導入し、48時間後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。観察後、細胞をc-Mycエピトープに対する抗体を用いて免疫染色した。

C. 研究結果

(1) イミプラミン、アミトリプチリン、デシプラミン、ノルトリプチリン、ニソキセチンの5日間添加によりNA取り込みが濃度依存的に著明に抑制され (100 nMで45-100%抑制)、同時にNAT mRNAの発現量も濃度依存的に抑制された。イミプラミン、ニ

ソキセチンの取り込み抑制効果は1日添加では認められず、2日添加で軽度認められた。その他の薬物の5日間添加では取り込み抑制は100 nMまでは認められず、NAT mRNA発現量の変化も明確でなかった。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡での観察の結果、NAT-GFP遺伝子導入細胞の細胞質に比較的均質に蛍光が認められ、蛋白の発現が確認された。上記の蛋白発現細胞のうち約40%の細胞が抗c-Myc抗体を用いた免疫染色で陽性を示し、細胞膜への発現が確認された。

#### D. 考察

今回、我々は抗うつ薬を含むモノアミン取り込み阻害薬を長期間神経細胞に添加しNA取り込み能に及ぼす効果を検討し、抗うつ薬連投後に生じると推測される神経化学的変化の一部を明らかにすることを試みた。NA取り込み阻害作用の強いイミプラミン、デシプラミン、ノルトリプチリン、ニソキセチン5日間添加はNAの取り込みを抑制したのに対し、セロトニンおよびドパミン取り込みの選択的阻害剤や抗精神病薬、抗てんかん薬は明らかな効果を示さなかった。すなわちモノアミン取り込み阻害薬のうち長期添加後にPC12細胞のNA取り込み能を持続的に抑制するのは、NA取り込み阻害薬に比較的特異的であることが推測される。同じ薬物の処置がNAT mRNA発現を抑制することも明らかになったことから、NA取り込み阻害薬長期添加後の持続的なNA取り込み抑制には、NAT遺伝子発現の抑制が関与している可能性が示された。昨年報告した蛋白リン酸化がこの現象に関与しているかは興味深いところであるが、その正確な機序は現在のところ不明である。また、この発現の抑制作用が抗うつ作用に直接関連しているのかは今後検討を加える予定である。

今回、NATにc-mycエピトープを挿入し蛍光蛋白GFPを融合した蛋白を培養細胞へ発現することに成功した。この細胞を用いることにより、GFPの蛍光によりNAT蛋白の発現を確認できるとともに細胞内局在の変化を生細胞で可視化でき、また、抗c-Myc抗体を用いた免疫染色で細胞膜への蛋白発現が確認できるため細胞膜への移行の変化を検討することも可能となった。今後、この細胞を用いて、リン酸化を介した細胞膜への移行とそれに及ぼす抗うつ薬の作用の詳細を検討する予定である。

#### E. 結論

PC12細胞のNAT mRNA発現量とNA取り込み能がNA選択性の高い取り込み阻害薬の5日間添加で濃度依存的に抑制されることが明らかになり、抗うつ薬慢性投与はモノアミントランスポーターの発現調節機構にも関与している可能性が示唆された。また、

NAT蛋白の細胞内分布の変化を観察するためNATにc-Mycエピトープを挿入し蛍光蛋白GFPを融合した蛋白を培養細胞へ発現させることに成功した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

C. Tadokoro, Y. Kiuchi, Y. Yamazaki, K. Oguchi, K. Kamijima. Effects of imipramine and sertraline on protein kinase activity in rat frontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 342: 51-54, 1998.

J. Uchida, Y. Kiuchi, M. Ohno, A. Yura, K. Oguchi : Ca<sup>2+</sup>-dependent enhancement of [<sup>3</sup>H]noradrenaline uptake in PC12 cells through calmodulin-dependent kinases. *Brain Res.* 8092:155-64, 1998.

##### 2. 学会発表

木内祐二、大野稔、内田淳、小口勝司. ノルアドレナリントランスポーター機能および蛋白発現の調節機構の解明. 第27回日本神経精神薬理学会年会、鹿児島、10月、1997.

Y. Kiuchi, M. Ohno, J. Uchida, H. Oyamada, M. Iwase, K. Oguchi. Regulation of noradrenaline transporter in PC12 cells by calcium/calmodulin-dependent kinases. 27th Annual Meeting, Society for Neuroscience, New Orleans, USA, November, 1997.

内田淳、大野稔、木内祐二、山元俊憲、小口勝司. PC12細胞のノルアドレナリントランスポーターに対する神経作用薬長期暴露の効果. 第71回日本薬理学会年会、京都、3月、1998.

Y. Kiuchi, M. Ohno, J. Uchida, H. Oyamada, Y. Yamazaki, K. Oguchi. Possible regulation of noradrenaline transporter in PC12 cells by calcium/calmodulin-dependent kinases. XIIIth International Congress of Pharmacology, München, Germany, July, 1998.

### 研究要旨

神経系由来培養細胞を用いて、ストレスや気分障害治療薬が細胞内カルシウム動員系にどのような影響を及ぼすか検討した。熱ストレスあるいは気分安定薬であるリチウムにより細胞内カルシウム動員系が抑制された。熱ストレスによる抑制は、セロトニンによる反応とトロンピンによる反応ともみられ、回復にはHSP70の発現が関与していた。一方、リチウムによる抑制は、トロンピンによる反応だけに観察された。熱ストレスとリチウムによる細胞内カルシウム動員系の抑制は、受容体の種類により異なったが、その抑制効果にはプロテアーゼが両者ともに関連していた。

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

### A. 研究目的

これまでに躁うつ病患者血小板において、セロトニン-2A受容体を介した細胞内カルシウム濃度上昇が亢進すると報告してきた。さらに躁うつ病患者において気分安定薬であるリチウム服用中であれば細胞内カルシウム濃度上昇は見られていないことから、気分障害の成因と治療において細胞内カルシウム動員が関連していることが推測される。従って、培養細胞を用いて、ストレスやリチウムが細胞内カルシウム動員にどのような影響を及ぼすか検討した。

### B. 研究方法

ラットC6グリオーマ細胞を10% fetal calf serum (FCS)を含むDulbecco's modified Eagles medium (DMEM)を用いて、10%CO<sub>2</sub>、37℃で培養した。細胞内カルシウム濃度の測定24時間前にFCSを含まないDMEMへ培養液を交換した。この間に薬物による前処置や、44℃で30分間の熱ストレス処置を行った。細胞を剥離、遠心した後上清を捨てKrebs-Ringer-HEPES緩衝液中で浮遊させた後、fura-2/AMを3μM、37℃で30分間処置し細胞内へ取り込ませた。再度遠心し上清を捨ててKrebs-Ringer-HEPES溶液中で再浮遊させた後、セロトニンとトロンピン刺激による細胞内カルシウム濃度変化を、分光蛍光度計を用いて測定した。

Gαq蛋白量をウエスタンブロット法により解析した。

### C. 研究結果

#### 1. 熱ストレスによる細胞内カルシウム動員の変化

熱ストレスはセロトニン刺激性細胞内カルシウム

動員を1時間後から6時間後まで抑制し、12時間から24時間後にはもとのレベルまで回復した。抗HSP-70抗体により認識される蛋白質HSC-70が熱ストレス負荷細胞、非負荷細胞すべてにみとめられたが、熱ストレス6~9時間後の細胞には2種類の蛋白質HSC-70、HSP-70が発現していた。一方、さらに、HSP合成阻害薬であるクエルセチンを細胞に前処置しておく、HSP-70の発現がなくなり、熱ストレス12時間後の細胞内カルシウム動員の抑制からの回復が阻害された。プロテアーゼ阻害薬であるDEVDの処置においても、セロトニン刺激性細胞内カルシウム動員の抑制からの回復が阻害された。また、熱ストレスはトロンピン刺激性細胞内カルシウム動員に対しても1時間後から抑制した。

#### 2. リチウムによる細胞内カルシウム動員の変化

リチウム24時間処置は、セロトニン(10μM)刺激性細胞内カルシウム動員を変化させなかったが、トロンピン(0.5 U/ml)刺激性細胞内カルシウム動員を抑制した。リチウム1mM以上で有意に抑制し、10mM処置では9時間処置から時間依存性に有意に抑制した。トロンピン受容体はG<sub>q</sub>と結合していることが知られているが、10mMリチウムを24時間処置しウエスタンブロット法でGαqの量を測定したが変化を認めなかった。Giを不活化する百日咳毒素(IAP, 10 ng/ml)を処置するとトロンピン刺激性細胞内カルシウム動員は抑制された。

トロンピンレセプターは、レセプターに結合しているアルギニン・セリンのペプチドが蛋白分解されることにより活性化し、なかでもセリン蛋白分解酵素(プロテアーゼ)により活性化するといわれている。一方、セリンプロテアーゼであるプラスミンは、徐々にアルギニン・セリンのペプチドを蛋白分解するため、その結果トロンピン刺激性細胞内カルシウム動員を逆に抑制するといわれている。本研究でもプラスミンによるトロンピン刺激性細胞内カルシウム動員の抑制効果は認められた。さらにリチウ

ムを前処置していてもプラスミンによるトロンビン刺激性細胞内カルシウム動員の抑制効果には変化を及ぼしていなかった。

#### D. 考察

熱ストレスはセロトニンおよびトロンビン刺激性細胞内カルシウム動員を抑制し、その回復にはHSP70の発現が重要な役割を演じており、その過程でプロテアーゼ活性を介している可能性が考えられた。

一方、リチウムはトロンビン刺激性の細胞内カルシウム動員に対して抑制効果を示した。リチウム処置による抑制効果とIAP処置による抑制効果は相加的であったこと、ウエスタンブロット法でG $\alpha$ iの量は変化しなかったことから、リチウムの作用点としてGq、Giとは独立した部位が考えられた。また、作用点の候補として、アルギニン・セリンのペプチドに作用するプロテアーゼのひとつであるプラスミンの作用部位と共通である可能性が示唆された。

#### E. 結論

躁うつ病の病因と治療薬の作用機序について細胞内カルシウム動員および種々のプロテアーゼ活性が密接に関連していると考えられた。

#### F. 研究発表

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

Akira Kugaya, Ariyuki Kagaya, Hidenobu Zensho, Takahiro Oyamada, Yasutaka Tawara, Masatoshi Inagaki, Yosuke Uchitomi and Shigeto Yamawaki. (1997) Modulation of endothelin-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization by interleukin-1 $\beta$  and lipopolysaccharide in C6 rat glioma cells. *Neuropeptides* 31: 187-192.

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.

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 Ca<sup>2+</sup> changes and spontaneous Ca<sup>2+</sup> oscillation in cultured rat frontal cortical neurons. *J. Neural Transm.* 104: 811-824

Takahiro Oyamada, Teruo Hayashi, Ariyuki Kagaya, Norio Yokota and Shigeto Yamawaki (1998) Effect of dantrolene on K<sup>+</sup>- and caffeine-induced dopamine release in rat striatum assessed by in vivo microdialysis. *Neurochem. Int.* 32: 171-176.

Minoru Takebayashi, Ariyuki Kagaya, Yosuke Uchitomi, Norio Yokota, Jun Horiguchi and Shigeto Yamawaki. (1998) Differential regulation by pregnenolone sulfate on intracellular Ca<sup>2+</sup> increase by amino acids in primary cultured rat cortical neurons. *Neurochem. Int.* 32: 205-211.

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.

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.

Minoru Takebayashi, Ariyuki Kagaya, Yosuke Uchitomi, Akira Kugaya, Mitsutaro Muraoka, Norio Yokota, Jun Horiguchi, and Shigeto Yamawaki. (1998) Plasma dehydroepiandrosterone sulfate in unipolar major depression. *J. Neural Transm.* 105: 537-542.

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

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.

Shigeto Yamawaki, Ariyuki Kagaya, Yasutaka Tawara and Masatoshi Inagaki. (1998) Intracellular calcium signaling systems in the pathophysiology of affective



- disorders. Life Sci. 62: 1665-1670.
- Teuro 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)
- Masatoshi Inagaki, Ariyuki Kagaya, Minoru Takebayashi, Jun Horiguchi, and Shigeto Yamawaki. (1998) Effect of acute and chronic administration of dehydroepiandrosterone on ( $\pm$ )-1-(2, 5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane-induced wet dog shaking behavior in rats. J. Neural Transm. (in press).
- 加賀谷有行, 山脇成人. (1997) 感情障害と細胞内カルシウム動員系 感情障害と精神・免疫・内分泌相関 (山脇成人編) 新興医学出版 pp.105-113.
- 加賀谷有行, 堀口淳, 山脇成人 (1998) 抗うつ薬の分子薬理とうつ病の仮説 (松下正明, 樋口輝彦, 田邊敬貴, 広瀬徹也, 丹羽真一, 中安信夫 編) 精神医学年報1998-1999 先端医学社 pp.77-87
- 加賀谷有行, 山脇成人. (1996) 精神障害とカルシウム Clinical Neuroscience 14: 217-219
- 山脇成人, 久賀谷亮, 加賀谷有行, 横田則夫, 内富庸介. (1996) 免疫と脳のクロストークが領域における Psychoimmunology - 癌治療と宿主 8: 31-38
- 加賀谷有行, 内富庸介, 横田則夫, 堀口淳, 山脇成人. (1996) セロトニン-2A受容体~細胞内情報伝達系と感情障害 脳と精神の医学 7: 255-260.
- 加賀谷有行, 横田則夫, 堀口淳, 山脇成人 (1997) 新しい抗うつ薬の探索 治療学 (特集: 抗うつ薬-内科診療で求められる実証的知識) 31:743-745
- 加賀谷有行, 横田則夫, 堀口淳, 山脇成人 (1997) 精神疾患における細胞内カルシウム情報伝達系-神経系のモデルとしての有用性- 神経精神薬理 19: 847-853.
- 竹林実, 加賀谷有行, 山脇成人 (1998) セロトニン仮説 こころの臨床 a la carte 増刊号 8月 pp.86-89.
- 加賀谷有行, 山脇成人, 神庭重信 (1998) 感情障害の病態生理-ストレス、免疫機能、細胞内情報伝達系の相互作用に関して- 脳の科学 20: 761-766.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
（分担）研究報告書

うつ病の発症機序と治癒機転の分子生物学的研究

分担研究者 森信 繁 滋賀医科大学精神医学教室 講師

研究要旨：うつ病発症の重要な要因である、ストレス脆弱性形成の解明に関する分子生物学的研究を行い、以下の成果を上げた。1) 拘束ストレス負荷によって、ラット脳内の転写因子 CREB (cAMP response element binding protein) リン酸化が亢進する。2) 慢性過密飼育によって弁別されたストレス脆弱ラットはストレス耐性ラットと比較して、拘束ストレスによる CREB リン酸化の亢進が大きい。3) リン酸化 CREB を脱リン酸化する酵素 calcineurin mRNA 発現の、ストレス・抗うつ薬による影響を検討したが、有意な変化はみられなかった。4) 抗うつ薬(paroxetine)急性投与によって、CREB リン酸化の亢進がみられる。5) これらの結果は、ストレス脆弱性=ストレスによる遺伝子発現易変性と考えると、CREB リン酸化機能が脆弱性を規定する重要な要因であることを示すと思われる。

A. 研究目的

うつ病の発症には精神的な過度のストレスが前駆することが多く、ストレスと病状発現との時間的経過から考察するに、ストレスによる脳内細胞情報伝達系の障害を介した遺伝子発現変化がうつ病の病態と密接に関連していると仮定される。うつ病の発症過程を解明する上で、神経伝達物質受容体・細胞内情報伝達物質変化によって活性化され遺伝子発現を司る、転写因子機能のストレスや抗うつ薬による調節の解明は、重要なテーマと考えられる。従って本年度の研究の目的は、ストレス脆弱性=ストレスによる遺伝子発現易変性という前提にたつて、種々の遺伝子発現調節に関与している転写因子 cAMP response element binding protein (CREB)のリン酸化機能とストレス・抗うつ薬投与の関係を調べ、うつ病発症脆弱性の機序を細胞内情報伝達機能から解明する点にある。

B. 研究方法

実験にはすべて、Sprague-Dawley 雄性ラット（体重 250-300 g）を用いた。慢性過密飼育

は野村らの方法に準拠し、通常 3 匹に対して用いられるケージに 6 匹を 14 日間飼育した。連日体重を測定し、2 週間で体重増加が普通飼育ラットと差のない群をストレス耐性群と、体重増加が有意に少ない群をストレス脆弱群とした。抗うつ薬 paroxetine 投与は、7.5 mg/kg を腹腔内投与 1 日 1 回で行った。

phospho-CREB (p-CREB) の測定は、phospho-specific CREB (Ser133) antibody (New England Lab.)を用いた immunoblotting 法にて行った。Calcineurin mRNA 発現は、calcineurin B $\alpha$  の一部に相補的な 51 mer の oligonucleotide を probe とした Northern blot hybridization 法と、calcineurin A $\alpha$  の一部に相補的な 45 mer の oligonucleotide を probe とした *in situ* hybridization 法で検討した。

C. 研究結果

1) 急性拘束ストレスによるラット脳内 CREB リン酸化への影響

ラット大脳皮質前頭部・海馬内の CREB リン酸化状態を、急性拘束ストレス 5, 15, 45 分及び 45 分拘束ストレス後 30 分の段階で測定した。その結果、拘束ストレス 15, 45 分の処

置にて、大脳皮質前頭部・海馬の両領域で有意な p-CREB 増大を得た。

#### 2) ストレス脆弱性と脳内 CREB のリン酸化

慢性過密飼育によってラットをストレス耐性群とストレス脆弱群に分類し、慢性過密飼育終了後に 45 分拘束ストレスを負荷し、大脳皮質前頭部・海馬内の CREB リン酸化を測定した。その結果、ストレス脆弱ラットでは両脳部位で、有意にストレス耐性ラットに比較して、p-CREB 発現の亢進が得られていた。

#### 3) Paroxetine 投与による脳内 CREB リン酸化

抗うつ薬 paroxetine 急性投与による、ラット大脳皮質前頭部・海馬の CREB リン酸化への影響を検討した。その結果、paroxetine 投与後 30, 60 分後で有意な p-CREB 発現の亢進の得られていることが分かった。

#### 4) 拘束ストレスの脳内 calcineurin 発現への影響

急性拘束ストレス(15, 45, 90 分)、急性拘束ストレス終了後 30, 60 分、慢性拘束ストレス(45 分ストレスを 14 日間)の、ラット大脳皮質前頭部・海馬内 calcineurin mRNA 発現への影響を Northern blot hybridization 法で検討した。その結果、上記いずれの拘束条件下にても有意な calcineurin mRNA 発現の変動はみられなかった。このため、細かい海馬内での発現変化をみる目的で、*in situ* hybridization 法を用いて急性拘束ストレス(45 分間)の calcineurin mRNA 発現への影響を検討したが、有意な発現量の変動はみられなかった。

#### 5) 抗うつ薬急性・慢性投与による脳内 calcineurin 発現への影響

抗うつ薬(desipramine, Org4428)の急性・慢性(7, 14, 21 日間)投与(最終投与から 2 時間後)による、ラット大脳皮質前頭部・海馬内 calcineurin mRNA 発現への影響を Northern blot hybridization 法で検討した。その結果、上記いずれの条件下にても有意な calcineurin mRNA 発現の変動はみられなかった。

### 3. 考察

これまで本分担研究者らをはじめとする多

くのストレスによる脳内遺伝子発現変動への研究から、c-fos, brain-derived neurotrophic factor など種々の遺伝子発現がストレスによって調節され、それらの発現変動のメカニズムには p-CREB 発現亢進による転写活性化が密接に関連していると推測されていた。本分担研究者らは本年度の研究によって、はじめて拘束ストレスによってラット大脳皮質前頭部・海馬内 CREB リン酸化が亢進することを示し、これまで仮説であったストレス性遺伝子発現変動の細胞内メカニズムを実証した。同時に、抗うつ薬もストレスと同様に脳内 CREB リン酸化を促進する作用のあることを明らかとした。従って、抗うつ薬はストレスと同じく核内で CREB リン酸化に直接影響をもたらし、ストレスによる CREB リン酸化を介した遺伝子発現を抑制することで、抗うつ作用を発揮している可能性が予測される。この仮説を証明するには抗うつ薬投与とストレス負荷を同時に行い、ストレスによる CREB リン酸化の変化が抗うつ薬によって、抑制されていることを明らかにする必要があると考えられる。加えて本分担研究者らは、過密飼育ストレスによるストレス耐性の個体差分類から、ストレス脆弱ラットではストレスによる脳内 CREB リン酸化が大きいことを明らかとしている。この結果はうつ病発症脆弱性の分子メカニズムの解明に極めて重要な所見であり、今後はどのような細胞内情報過程の変化が、ストレス脆弱性に関与する CREB リン酸化亢進を引き起こすのかを明らかとし、うつ病発症の予防案を提唱したいと考えている。

細胞内情報伝達系での calcineurin の主要作用の一つは、p-CREB の脱リン酸化である。本研究では、ストレスによる CREB リン酸化の亢進が、ストレスによる calcineurin 発現の低下に伴う脱リン酸化過程の障害によるものではないかと考え、種々のストレス条件での calcineurin mRNA 発現を検討したが、有意な変化はみられなかった。従って今回の実験結果は、ストレスによる calcineurin 発現の低下による、p-CREB の脱リン酸化過程の障害は

引き起こされていないことを示唆しているが、本実験は直接 calcineurin の機能を検討した研究ではない。従って今後この仮説を検証するには、ストレスによる calcineurin の serin/threonine phosphatase 活性の変化を明らかにする必要があると思われる。

## E. 結論

本年度の研究結果から、以下の結論を得た。

- 1) 拘束ストレスによって、ラット大脳皮質前頭部・海馬内 CREB はリン酸化され、ストレス脆弱ラットではストレス性 CREB のリン酸化の程度が大きいかも明かとなった。
- 2) 抗うつ薬もストレスと同様に CREB リン酸化を調節しており、CREB リン酸化過程がうつ病の発症・治癒機転のメカニズムとして、重要であることを提唱した。
- 3) ストレスによる CREB リン酸化亢進のメカニズムとして、脱リン酸化を司る酵素である calcineurin 発現のストレスによる低下を検討したが、ストレスは calcineurin mRNA 発現には無関係であることが分かった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) S. Morinobu et al., Stimulation of adenylyl cyclase and induction of brain-derived neurotrophic factor and TrkB mRNA by NKH477, a novel and potent forskolin derivative. *J Neurochem* (in press).

2) 森信 繁、加藤進昌 CREB リン酸化—脱リン酸化機能と精神機能. *脳と精神の医学* 9: 295-300, 1998.

3) 森信 繁 他 抗うつ薬・ストレスの及すラット脳内 calcineurin mRNA 発現への影響. *日本神経精神薬理雑誌* 18: 389, 1998.

### 2. 学会発表

1) 森信 繁 他 ホルスコリン誘導体 NKH477 の投与によるラット脳内 brain-derived neurotrophic factor mRNA 発現の効果について. 第 20 回日本生物学的精神医学会 1998, 3.

2) 藤巻康一郎 他 FK506 前投与によるストレス性遺伝子発現変化への影響. 第 20

回日本生物学的精神医学会 1998, 3.

3) 森信 繁 他 抗うつ薬・ストレスの及すラット脳内 calcineurin mRNA 発現への影響. 第 28 日本神経精神薬理学会 1998, 10.

4) S. Morinobu et al., Pretreatment with FK506 amplifies the stress-induced gene expression. 第 28 回米国神経科学会議 1998, 11.

厚生省科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

うつ病死後脳を用いた脳情報伝達系に関する研究

分担研究者 小澤 寛樹 札幌医科大学医学部神経精神医学講座 講師

研究要旨：うつ病態における分子生化学的基盤としての中枢および末梢（血小板）におけるアデニル酸シクラーゼ（AC）系とホスホリパーゼC（PLC）系の変化を検討し、脳病態と関連した生物学的マーカーを開発することを試みた。Ca<sup>2+</sup>調節性のcAMP産生機能（死後脳研究）及びcAMP調節性の細胞内Ca<sup>2+</sup>動員系機構（血小板研究）の変化を単極性うつ病患者と対照群間で比較検討した。うつ病患者死後脳の前頭葉部において、アデニル酸シクラーゼ（AC）活性の基礎活性値は低下していたが、I型ACの蛋白質量増加に帰因すると推察されるCa<sup>2+</sup>調節性のcAMP産生機能の亢進が認められた。しかしcAMP情報伝達系の下流にあるcAMP response element binding protein (CREB)のリン酸化の低下が認められた。5-HT刺激性の血小板Ca<sup>2+</sup>濃度の基礎値からの増加量はうつ病群で有意に増加していた。cAMP産生を賦活化するforskolin誘導体NKH477の前処置は5-HT刺激性のCa<sup>2+</sup>動員を抑制したが、その抑制率はうつ病群において有意に低下していた。以上、うつ病患者の中枢・末梢両組織において両セカンドメッセンジャー系の不均衡が感情障害の病態基盤に関与していること、また血小板におけるcAMP調節性の細胞内Ca<sup>2+</sup>動員系機構の変化が新たな生物学的指標として意義をもつと推察された。

A. 研究目的

本研究では単極性うつ病患者の中枢および末梢（血小板）におけるAC系とPLC系の変化を検討し、感情障害病態および脳病態と関連した生物学的マーカー法を開発することを試みた

B. 研究方法

死後脳研究：単極性うつ病患者（DSM-IVのうつ病性傷害の診断基準による、11名）及び年齢、死後経過時間をマッチさせた精神神経疾患の既歴のない対照群（12名）の死後脳を用いて、大脳皮質膜標本（前頭葉）を作製し実験に供した。AC活性測定はHattaらの方法、PLCβ活性測定はJopeらの方法に従った。各種蛋白質の免疫反応性膜標本を4-12% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて蛋白質電気泳動後、各種抗体を反応させ、検出システムにはECL法を用いた。

血小板研究：未治療の大うつ病患者（DSM-IVの診断基準による、15名、40.0±14.0才）及び年齢をマッチさせた健常者（17名、43.2±16.0才）の末梢血からPRP(platelet rich plasma)を調整し、fura-2/AMを負荷後、日本分光CAF-110分光光度計を用いて血小板内遊離Ca<sup>2+</sup>濃度を求めた。

C. 研究結果

1) 死後脳研究

a) Ca<sup>2+</sup>調節性AC活性変化 Ca<sup>2+</sup>非存在下における基礎AC活性値はうつ病群で健常者群と比較し有意に減少していた。一方Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin刺激時のAC活性には有意差は認められなかった。基礎活性値からの増加量を算出すると、AC活性のCa<sup>2+</sup>に対する反応性はうつ病群で有意に亢進していた。

b) 5-HT刺激性PLCβ活性変化

基礎、GTPγS (3 μM) 単独、GTPγS 共存下 5-HT (10 μM)

刺激時のPLCβ活性には有意な変化は認められなかったが、基礎活性値からの増加率を算出すると5-HTに対する感受性がうつ病群で有意に増加していた。

c). PLCβ<sub>1</sub>及びI型AC、総CREB、リン酸化CREBの蛋白質発現量の変化

前頭葉における主要なCa<sup>2+</sup>感受性ACであるI型AC及びPLCβ<sub>1</sub>蛋白質量は、いずれもうつ病群で有意に増加していたが、Gα<sub>s</sub>、Gα<sub>i</sub>及び細胞骨格系であるtubulin量には有意な変化は認められなかった。さらに症数は少ないが、総CREB、リン酸化CREBの蛋白質発現量はうつ病群においてともに低下していた。

また、アルツハイマー病脳においてはCa<sup>2+</sup> / CaM感受性ACによるcAMP産生系の低下、とくにACの1型の量的低下し、CREBリン酸化が低下を示していた。またヘロイン依存およびアルコール依存症死後脳においてもAC活性の減少が認められた。

2) 血小板研究

a) NKH477の5-HT刺激性Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に対する作用

NKH477の前処置により5-HT (10 μM) 刺激性のCa<sup>2+</sup>濃度上昇は、用量依存的に抑制され、そのIC<sub>50</sub>値は約0.3 μMと算出された。

b) 大うつ病群における変化

血小板Ca<sup>2+</sup>濃度の基礎値は、大うつ病群と対象群との間に有意な差は認められなかった。5-HT (10 μM) 刺激性の血小板Ca<sup>2+</sup>濃度の基礎値からの増加量(ΔnM)は大うつ病群で有意に増加していた。NKH477 (0.3 μM) 前処置による5-HT刺激性Ca<sup>2+</sup>濃度の増加量に対する抑制率(%)は、大うつ病群において有意に低下していた。

D. 考察

本研究ではうつ病患者死後脳の前頭葉部においてAC活性の基礎活性値での低下が認められたが、Ca<sup>2+</sup>に対するACの反応性はうつ病群で有意に亢進していた。さらに、

Ca<sup>2+</sup>により活性化をうける I 型 AC の免疫反応性の亢進がうつ病群で認められた。両者の間に有意な相関性が認められたこと及び I 型 AC が大脳皮質部における主要な Ca<sup>2+</sup>感受性サブタイプであることから、この反応性の亢進は主に I 型 AC の蛋白レベルでの増加を反映しているものと推察された。

我々や他の研究者が指摘したCa<sup>2+</sup>非存在下における基礎AC活性値低下は本研究においても確認できた。しかし、Ca<sup>2+</sup>に対する反応性はうつ病群で亢進していた。この結果は、うつ病患者前頭葉ではCa<sup>2+</sup>感受性のACサブタイプの蛋白量が増加しているものの、Ca<sup>2+</sup>非感受性のACサブタイプの蛋白量が減少しているためcAMP産生機能においてもCa<sup>2+</sup>感受性・非感受性のACにおいてインバランスが生じていることが推察される。そして最終的なターゲット蛋白としてである総CREB、リン酸化CREBの蛋白質発現量はうつ病群においてともに低下していた。また発症危険因子としてうつ状態が知られているアルツハイマー病脳においてはCa<sup>2+</sup> / CaM感受性ACによる cAMP 産生系の低下、とくにACの1型の量的低下し、さらにうつ病と同様にCREBリン酸化が低下していること明らかにした。このことからうつ病 (情動) 及び記憶障害においてcAMPシグナルカスケードの減弱が共通して生じている可能性が推察される。

一方、cAMP 産生機能の低下とは対照的に、PLCβ活性の5-HT 刺激に対する反応性の亢進、即ちイノシトールリン酸 (IPs) 産生機能の亢進がうつ病群において認められた。双極性感情障害患者の死後脳を用いた研究では5-HT 刺激性 PLC 活性で低下が、cAMP 産生機能の増強が報告されている。本研究結果とこれまでの報告を併せると、躁状態、うつ状態の病態基盤並びに両セカンドメッセンジャー系産生機能の不均衡が関与していると考えられた。

AC を活性化する forskolin の水溶性誘導体である NKH477 は、5-HT による血小板内 Ca<sup>2+</sup>動員を強力に抑制した。血小板における細胞内 Ca<sup>2+</sup>動員系に対する cAMP による抑制機構の存在が知られているが、形質膜 Ca<sup>2+</sup>ポンプ (PMCA) のリン酸化による細胞外への Ca<sup>2+</sup>排出機構の促進が cAMP による Ca<sup>2+</sup>動員系に対する抑制作用に関与していることが考えられている。

5-HT 刺激による血小板 Ca<sup>2+</sup>濃度の基礎値からの増加量はうつ病群で有意に増加しており、これまでの報告とよく一致した。一方、NKH477 前処置による5-HT 刺激性 Ca<sup>2+</sup>濃度の増加量に対する抑制率は、うつ病群において有意に低下しており、Ca<sup>2+</sup>動員に対する cAMP を介した抑制機能がうつ病群血小板において低下していることが示唆された。うつ病患者血小板における cAMP 産生機能は低下していると示唆されており、本研究認められた Ca<sup>2+</sup>動員に対する cAMP 介在性の抑制機能の低下は、AC 自身の機能低下を反映している可能性がある。今後、抑うつ期と寛解期における NKH477 に対する反応性の変化を検討することにより、本反応性が state marker になり得るかの検討を加えていく必要がある。

## E. 結論

うつ病患者の中核・末梢両組織において両セカンドメッセンジャー系の不均衡が感情障害の病態基盤に関与

していること、また血小板における cAMP 調節性の細胞内 Ca<sup>2+</sup>動員系機構の変化が新たな生物学的指標として意義をもつと推察された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamamoto M, Ozawa H, Saito T, Hatta S, Riederer P, Takahata N. Ca<sup>2+</sup>/CaM-sensitive adenylyl cyclase activity is decreased in the Alzheimer's brain: Possible relation to type I adenylyl cyclase. *J Neural Transm* 1997, 104:721-732.

橋本恵理, 小澤寛樹, 齋藤利和, 高畑直彦, Froelich L, Riederer P. アルコール依存症者死後脳におけるアデニル酸シクラーゼ系の変化. *アルコールと医生物* 1997, 17:127-131.

小澤寛樹, 鎌田裕樹, 山本恵, 七戸真, 橋本恵理, 前田英雄, 石川博基, 齋藤利和, 高畑直彦, 八田慎一. 感情障害の病態における細胞骨格系とシグナル伝達系の関連性. *精神薬療基金研究年報*. 1997, 28:95-101.

齋藤利和, 池田望, 鎌田裕樹, 小澤寛樹, 芦沢健, 土岐完, 山本恵, 石川博基, 前田英雄, 渡部正行, 高畑直彦, 八田慎一, 雨宮紀人. ラット脳 cAMP 産生系に及ぼす塩酸トラゾドン長期投与の影響. *医と薬学* 1997, 37:1159-1163.

小澤寛樹, 齋藤利和, 高畑直彦. アデニル酸シクラーゼ系を中心とした血小板の細胞内情報伝達機構. *神経薬理* 1997, 19:863-873.

小澤寛樹, 齋藤利和, 高畑直彦. 脳シグナルカスケードと精神疾患. *精神誌* 1998, 100:748-754

Hashimoto E, Froelich L, Ozawa H, Saito T, Maurer K, Boning J, Takahata N, Riederer P. Reduced immunoreactivity of type I adenylyl cyclase in the postmortem brains of alcoholics. *Alcohol Cli Exp Res* 1998, 22:88S-92S.

Shichinohe S, Ozawa H, Saito T, Hashimoto E, Riedere P, Takahata N. Differential alteration of adenylyl cyclase subtypes I, II and V/VI in postmortem human brain of heroin addicts. *Alcohol Cli Exp Res* 1998, 22:84S-87S.

Odagaki Y, Nishi N, Ozawa H, Saito T, Takahata N, Riederer P, Koyama T. Measurement of receptor-mediated functional activation of G proteins postmortem human brain membranes. *Brain Res* 1998, 789:84-91.

Kamada H, Saito T, Ozawa H, Takahata N. Effects of chronic administration of antidepressants on cerebral cortical adenylyl cyclase coupling in rat brain. *Neuroscience Research Communication* 1998, 23:55-60

Saito T, Ozawa H, Kamada H, Maeda H, Takahata N. Differential effects of chronic administration of the antidepressants amitriptyline and rolipram on adenylyl cyclase activity. *Jpn J Psychopharmacol* 1998, 18:23-25.

Ozawa H, Takahata N. The role of G proteins in pathophysiology and treatment of affective disorders. *eds. by Ozawa H., Saito T and Takahata*

N. Signal Transduction in Affective Disorders. Springer-Verlag, Tokyo, 1998, 49-65.

山口高史, 小澤寛樹, 前田英雄, 鵜飼渉, 山本, 七戸真, 橋本恵理, 石川博基, 齋藤利和, 高畑直彦. 脳情報伝達系からみた感情障害の病態と新規抗うつ薬の探索. 精神薬療基金研究年報. 1998, 29:102-108.

小澤寛樹, 齋藤利和. 最近のトピックス、精神疾患に関するシグナルトランスダクション療法. 日本神経精神薬理学雑誌 1998, 18:69

小澤寛樹. 2次メッセンジャー不均衡仮説. こころの臨床 1998, 17 (増刊号):103-106

## 2. 学会発表

Saito T, Sohma H, Hashimoto E, Ozawa H, Goetz M, Boening J, Riederer P. In: Symposium: Adaptive changes in the nervous system to alcohol. Alterations in adenylate cyclase in postmortem brain of alcoholics. The 9th Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism: 1998 : Copenhagen. Denmark.

Ukai W, Ozawa H, Yamaguchi T, Hashimoto E, Shichinohe S, Saito T. Effect of cognitive

enhancer aniracetam is rely on the changes in signal transduction. In : The 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience: 1998 Nov 7-12: Los Angeles. U.S.A. (Soc. Neurosci. Abst., 1998, 24 (Part 2):2178(864.3))

Yamamoto-Sasaki M, Ozawa H, Hashimoto E, Yamaguchi T, Ukai W, Shichinohe S, Saito T, Riederer P. Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB) in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. In : The 28th Annual Meeting of Society for Neuroscience: 1998 7-12: Los Angeles. U.S.A. (Soc. Neurosci. Abst., 1998, 24(Part 1):1216 (477.7))

小澤寛樹, 齋藤利和, 高畑直彦. セミナー: 脳シグナルカスケードと精神疾患. 第94回日本精神神経学会総会. 1998 May 20-22: 沖縄. 日本.